



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



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

Département de Biologie

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

MEMOIRE

Présenté par

Benkhaldi Dounia

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER En Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

***Activité antimicrobienne des extraits végétaux application
à l'inhibition de biofilm des bacilles thermophiles d'origine laitière***

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

Président	Mme. Benariba Nabila	Maitre de conférences classe A	Tlemcen
Encadreur	Mme. MALEK F.	Maitre de conférences de classe A	Tlemcen
Examineur	Bensalah Fatima	Maitre de conférences classe B	Tlemcen

Année Universitaire 2016/2017

Dédicace

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

À ceux qui m'ont encouragé dans mes moments les plus difficiles

*À ceux qui m'ont fait confiance, qui ont m'ont soutenus sans faille dans tous
mes projets et qui ont toujours accepté mes choix*

À mon cher père qui grâce à lui j'ai trouvé mon chemin

À ma chère maman qui m'a encouragée, et qui m'a entourée

D'amour, que Dieu la garde et la protège.

Comme je dédie aussi ce travail a tous mes chers frères et mes sœurs.

À mes amies : Yasmine, Amina, Fatiha, Merieme , Farah, Houria

Et à toute ma famille.

À toutes les personnes qui me connaît.

Et à tous la promotion de microbiologie appliquée

2016/2017

DOUNIA


Remerciement

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mme. Malek F. Maître de conférences de classe A au département de biologie, université Abou Bekr Belkaid Tlemcen pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseil et la confiance qu'il m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail.

Mes remerciements s'étendent également à Mme. Benariba Nabila. De m'avoir offrir l'extraits des plantes testées, je la remercie également pour ses conseils précieux et ses remarques, et pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le Jury. Je les adresse ma profonde reconnaissance.

J'exprime mes vifs remerciements 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 l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de Jury.

Je ne pourrai qu'exprimer un infini remerciement plein de gratitude, à tous les membres du laboratoire qui ont participé à la réalisation de ce travail. J'exprime ma profonde reconnaissance qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à toutes Les personnes qui auront contribué de près ou De loin à l'élaboration de ce mémoire.

Merci à toutes et à tous.

Table de matières

Introduction générale	1
Partie I : Synthèse Bibliographique	
Chapitre I : Les bacilles thermophiles.....	03
1- Généralités.....	03
1. Définition.....	03
2.1. Les thermophiles obligatoires.....	03
2.2. Les thermophiles facultatifs.....	03
2-Les différents groupes de bacilles thermophiles.....	03
2. Position taxonomique.....	04
3. Les caractéristiques générales des bacilles thermophiles.....	06
4.1. <i>Anoxybacillus Flavithermus</i>	07
4. 2. <i>Geobacillus</i>	07
4.2.1. Intérêt biotechnologique de <i>Geobacillus</i>	08
5. Propriétés des spores des bacilles thermophile	08
5.1. Généralités.....	08
5.2. Structure des spores des bacilles thermophiles.....	08
5.3. Propriétés de thermorésistances des bacilles thermophiles.....	10
6 .Les conditions de germinations des spores des bacilles thermophiles en industrie laitière	11
Chapitre 2: biofilm de bacilles thermophiles.....	12
2.1- Généralités sur les biofilms.....	12
2.2-Composition.....	13
2.2.1-Les microorganismes.....	13
2.2.2-La matrice.....	14
2.3- Etapes de formation de biofilm.....	14
2.3-1-Adhésion réversible des bacteries.....	15
2.3-2-Adhésion irréversible.....	15
2.3-3-Formation de micro-colonie et production des EPS.....	15
2.3-4 Maturation de biofilm.....	16
2.3-5-Détachement et dispersion du biofilm.....	17
2.4- Le biofilm dans l'industrie laitière.....	17
2.5 Les biofilm des bacilles thermophiles.....	18

2.5.1. Caractéristiques du Biofilm des bacilles thermophiles.....	18
2.4.5- Développement du biofilm des bacilles thermophiles.....	19
2.4.5- La résistance du biofilm aux agents antimicrobiens.....	19
Chapitre : 03 effets antimicrobiens des plantes médicinales.....	21
3.1. Généralité.....	21
3.2. <i>Pinus halpensis</i>	22
3.2.1. Description botanique.....	22
3.2.2. Position taxonomique	23
3.2.3. Répartition géographique	23
3.2.4. Etude Phytochimique.....	24
3.2.5. Etude biologique.....	25
3.2.5.1 Intérêt thérapeutiques, et industriel.....	25
3.2.5.2. Activité antimicrobienne.....	26
3.2.5.3. Activité antifongique.....	26
3.3. <i>Ammi Visnaga</i>	28
3.3.1. Description botanique	28
3.3.2. Position taxonomique	30
3.3.3. Répartition Géographique	30
3.3.4. Etude Phytochimique.....	30
3.3..5.Etude biologiques	32
3.3..5 .1.Intérêt thérapeutiques.....	32
3.3.5.2. Activité antimicrobienne.....	32
3.3.5.3. Activité antibiofilm.....	33
3.4. <i>Citrullus colocynthis</i>	33
3.3.1.Description botanique.....	33
3.3.2. Position taxonomique de coloquinte.....	35
3.3.3. Répartition géographique	36
3.3. 4.Etude Phytochimique.....	36

3.3.5. Etude biologiques.....	38
3.3. 5 .1. Intérêt thérapeutiques.....	38
3.3. 5 .2 .Activité antimicrobienne.....	39

Matériel et méthodes

1. Isolement des souches.....	40
1.1. Prélèvements.....	40
1.2. Préparation des dilutions décimales.....	40
1.3. Isolement des bactéries thermophiles/mésophiles.....	40
1.3.1. Sans enrichissement.....	40
1.3.1.1. Ensemencement.....	40
1.3.2. Après enrichissement.....	42
2. Identification des isolats.....	42
1.4. Critères morphologiques.....	42
1.4.1. Examen macroscopique.....	42
1.4.2. Examen microscopique.....	42
1.4.3. Coloration de Gram.....	43
1.4.4. Observation de la spore.....	43
1.5. Critères biochimiques.....	43
2.2.1 Test de catalase.....	43
3. Conservation des souches.....	43
4. Formation de biofilm.....	43
4.1 Inoculation des microplaques.....	43
4.2 Coloration au cristal violet.....	44
4.3 Lecture des plaques.....	44
1.5. Détermination de l'activité antimicrobienne des phyto-extraits.....	46
5.1. Préparation des solutions des phyto-extraits.....	46
5.2. Préparation des cultures.....	46

6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de biofilm (CMIB).....	47
--	----

Résultats et discussion

1. Identification phénotypique des souches isolées.....	49
1.1. Les caractères cultureux.....	49
1.2. Les caractères microscopiques.....	50
1.3. Les caractères biochimiques.....	51
2. Evaluation de potentiel de formation du biofilm.....	51
2.1. Lecture directe.....	51
2.2. Lecture directe	52
2.2.1. Formation de biofilm des bacilles thermophiles et mésophiles	
2.2.1.1. Les bacilles thermophiles.....	53
2.2.1.1. Les bacilles mésophiles.....	54
2.2.2. Formation du biofilm des souches de références.....	54
3. Détermination de l'activité antimicrobienne.....	55
3.1. Détermination des zones d'inhibition.....	55
3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices.....	59
4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la formation du biofilm (CMIB).....	60
Discussion	64
Conclusion	66
Références bibliographiques	67
Annexes	81

ABREVIATION

Do :	Densité Optique
Do_f :	Densité Optique de la formation du biofilm
QS :	Quorum-Sensing
PAS :	Petites protéines solubles
PIA :	Polysaccharide intercellular adhesin
PM :	poids moléculaire
PNAG:	Polysaccharide poly-N-acetylglucosamine
TSA :	Trypticase Soja Agar
TSB:	Trypticase Soja Broth
UFC :	Unité Formant Colonie
UV :	Ultraviolet

Liste des tableaux

Tableau 01 : Reclassification taxonomique du genre *Bacillus* (1986- 2004).....05

Tableau 02 : Caractéristiques de quelques bacilles thermophiles.....06

Tableau 03 : Compositions chimiques de *P. halepensis*25

Tableau 04 : Diamètre d'inhibition et MIC des tensions bactériennes étudiées.....27

Tableau 05 : Activité antifongique de l'huile essentielle du *P. halepensis*.....28

Tableau 06: Compositions chimiques d'*Ammi visnaga*.....31

Tableau 07: Concentration minimale d'inhibition (MIC) et le diamètre de la zone d'inhibition (DIZ) d'extrait brut d *Ammi visnaga* ont été déterminées contre des microorganismes pathogènes utilisés dans l'étude33

Tableau 08: nom vernaculaire de *Citrullus colocynthis*.....34

Tableau 09 : Compositions chimiques de la coloquinte.....37

Tableau 10: Activité antibactérienne de l'extrait aqueux et hydrometanolique de fruits *Citrullus colocynthis*; les feuilles et les racines par la méthode de diffusion du disque.....39

Tableau 11: Préparation des solutions des molécules antimicrobiennes46

Tableau 12 : Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.....47

Tableau 13 : Aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose TSA après 24h d'incubation.....50

Tableau 14: diamètre de zone d'inhibition de l'extrait de différentes parties d'*Ammi visnaga* contre les microorganismes utilisés dans l'étude.....57

Tableau 15: les diamètres des zones d'inhibitions de l'extrait de différentes parties d'*Pinus halpensis* et de *Citrullus colocynthis* contre les microorganismes utilisés dans l'étude.....58

Tableau 16 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour les dix souches.....58

Tableau 17 : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....59

Tableau 18 : Détermination des concentrations minimales inhibitrices de formation du biofilm (CMIB).....63

Liste des figures

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. anthracis* (c).....09

Figure 02 : Photomicrographies des motifs de localisation des spores de *B. cereus* et de *B. megaterium*.....09

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 industriel14

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 *A. flavithermus* 18h biofilm sur la surface d'acier inoxydable.....20

Figure 07: Caractéristiques reproductrices de pin d'Alep : (a) cycles fleurissants femelles multiples de la même chose période végétative, (b) cônes mûrs, (c) cône serotinus dans un jeune arbre montrant la caractéristique écorce gris-clair mince et (d) strobili masculins (L. Santos del Blanco)..... 24

Figure 08: la distribution géographique de *Pinus halpensis*.....26

Figure 09: *Ammi vinaga* L29

Figure 10: La fleur et Les grains d'*Ammi visnaga*.....29

Figure 11: *Citrullus colocynthis*.....34

Figure 12: Photographe de *Citrullus colocynthis* fruit (A) feuilles (B) racines (C) et les grains(D).....35

Figure 13 : le protocole de la mise en culture des bacilles mésophiles et thermophiles.....41

Figure 14: Schémas représentant le protocole de formation des biofilms par la méthode au cristal violet.....45

Figure 15 : Aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose TSA.....49

Figure 16: Observation microscopique des bacilles thermophiles après la coloration de Gram (G x 100 à immersion).....50

Figure 17: formation de biofilm dans les microplaques de titration52

Figure 18: Biomasse des biofilms des formes par les bacilles mésophiles et thermophiles..53

Figure 29: Biomasse des biofilms de cinq souches de référence.....54

Figure 20: Evaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits par la technique de diffusion.....	56
Figure 21: Détermination de CMIB des extrait des plantes d' <i>Ammi visnaga</i> , <i>Pinus halpensis</i> et <i>Citrullus colocynthis</i> sur la formation de biofilm de la souche 24.....	60
Figure 22: Détermination de CMIB des extrait des plantes d' <i>Ammi visnaga</i> , <i>Pinus halpensis</i> et <i>Citrullus colocynthis</i> sur la formation de biofilm de souche D'.	61
Figure 23: Détermination de CMIB des extrait des plantes d' <i>Ammi visnaga</i> , <i>Pinus halpensis</i> et <i>Citrullus colocynthis</i> sur la formation de biofilm de <i>K. pneumoniae</i>	61
Figure 24: Détermination de CMIB des extrait des plantes d' <i>Ammi visnaga</i> , <i>Pinus halpensis</i> et <i>Citrullus colocynthis</i> sur la formation de biofilm de <i>S.aureus</i>	62
Figure 25: Détermination de CMIB des extrait des plantes d' <i>Ammi visnaga</i> , <i>Pinus halpensis</i> et <i>Citrullus colocynthis</i> sur la formation de biofilm de <i>E. coli</i>	63

Synthèse

Synthèse

Bibliographique

Bibliographique

➤ Introduction générale

Les biofilms sont des communautés de micro-organismes attachés à une surface et enfouies dans une matrice organique protectrice et dont les cellules expriment des propriétés physiologiques distinctes de celles des cellules planctoniques, la plus remarquable étant une résistance accrue aux agents antimicrobiens. En raison de la nature hétérogène du biofilm, les mécanismes de résistance sont nombreux, cependant, le rôle joué par la matrice organique est souligné dans la littérature. Celle-ci confère une résistance aux cellules du biofilm par l'exclusion des biocides de la communauté bactérienne (**Mah & O'Toole, 2001**).

En industrie laitière, les biofilms microbiens sont la principale source de contamination du lait et des produits laitiers. L'un des groupes les plus communs d'organismes formant des biofilms sur les équipements laitiers est la flore bactérienne aérobie sporulée thermophiles, responsable de l'altération du lait pasteurisé et de la réduction de sa durée de vie. La persistance de ce groupe de contaminants bactériens dans l'environnement laitier, est attribuée à la résistance de leurs biofilms aux agents chimiques du nettoyage/ désinfection. Ainsi, la lutte contre ces biofilms du milieu laitier nécessite l'utilisation de nouveaux agents antimicrobiens.

A l'heure actuelle, l'utilisation des substances biologiquement actives isolées des extraits de plantes constituent une alternative intéressante. Cette matière végétale contient un grand nombre de métabolites secondaires, qui ont des caractéristiques variées notamment des activités antimicrobiennes et/ou antibiofilm. Celles-ci sont mises à profit dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique, en tant que médicaments ou suppléments alimentaires pour lutter contre l'émergence accrue de la résistance aux agents antimicrobiens.

D'une manière générale, les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés biologiquement actifs aux quels on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes, en raison d'une large variété en constituants chimiques reflétant une diversité biologique importante des ressources naturelles.

L'objectif de ce travail est de contribuer à la recherche des molécules antimicrobiennes d'origine végétale. Trois espèces des plantes médicinales : *Ammi visnaga* (khella), *Pinus halpensis* (pin d'alp) et *Citrullus colocynthis* (coloquinte), ont été utilisées pour l'étude des activités antimicrobiennes et antibiofilm de leurs extraits aqueux sur des souches de bacilles aérobies sporulés mésophiles et thermophile d'origine laitière en comparaison avec des

souches de références, selon une approche visant la détermination de la CMI et la CMIB (concentration minimale inhibitrice de la croissance en biofilm). Le plan expérimental de ce travail est le suivant :

1. Isolement des bacilles thermophiles et mésophiles à partir de laits pasteurisés recombinaés et frais (lait de vache).
2. Identification phénotypique des souches isolées.
3. Evaluation du potentiel des souches étudiées à former le biofilm sur des surfaces en polystyrène.
4. Détermination de l'activité antimicrobienne et antibiofilm des extraits aqueux des plantes suscitées.



Chapitre :

Les bacilles thermophiles

Chapitre 1 : 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 algénoIyticus</i>	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>
<i>Bacillus amyloIyticus</i>	<i>Paenibacillus amyloIyticus</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 (Setlew, 2014).

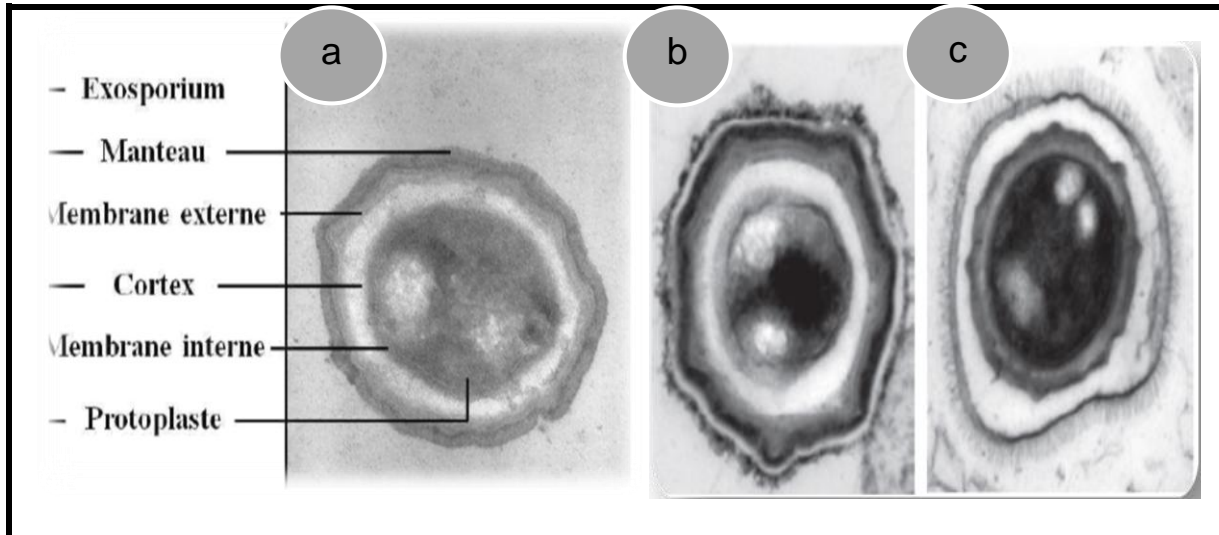


Figure 01 : Photographie en microscopie électronique à transmission d'une spore de *B.Licheniformis* produite à 45°C (a, x72 000), de *B.subtilis* (b) et de *B.anthraxis* (c) (Bernard, 2009 ; Abbas, 2014).

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).

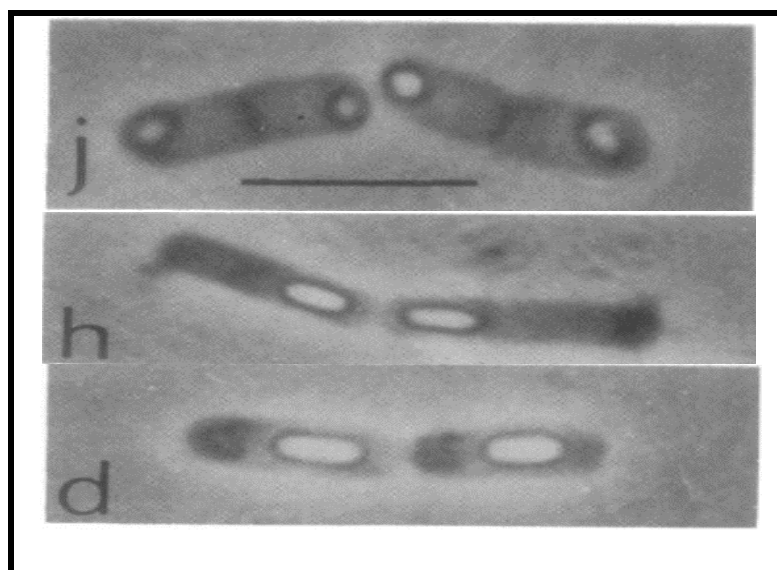


Figure 02 : Photomicrographies des motifs de localisation des spores de *B.cereus* et de *B. megaterium*. J : spore terminale ; h : spore sub-terminale ; d : spore centrale (Hitchins, 1976)

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).

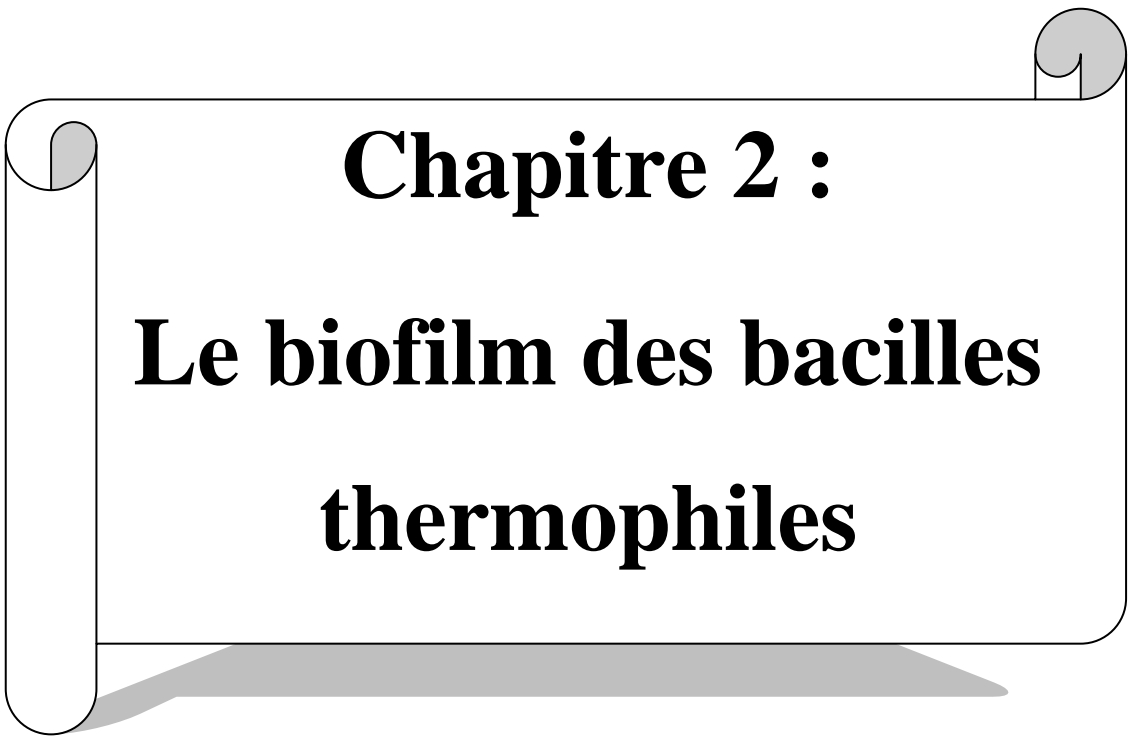
Plusieurs propriétés participent à la résistance des spores de *Bacillus*, y compris, leur faible teneur en eau, de petites protéines (PAS) solubles dans l'acide et l'acide dipicolinique (DPA) (Ponce et al., 2008 ; Setlow, 2014). Le principal facteur qui détermine la résistance des spores à la chaleur 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 2 :
Le biofilm des bacilles
thermophiles

Chapitre 2 : Le biofilm des bacilles thermophiles

2.1. Généralités 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 naturelles ou artificielles 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 navire et cathéters) (Figure03), 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).

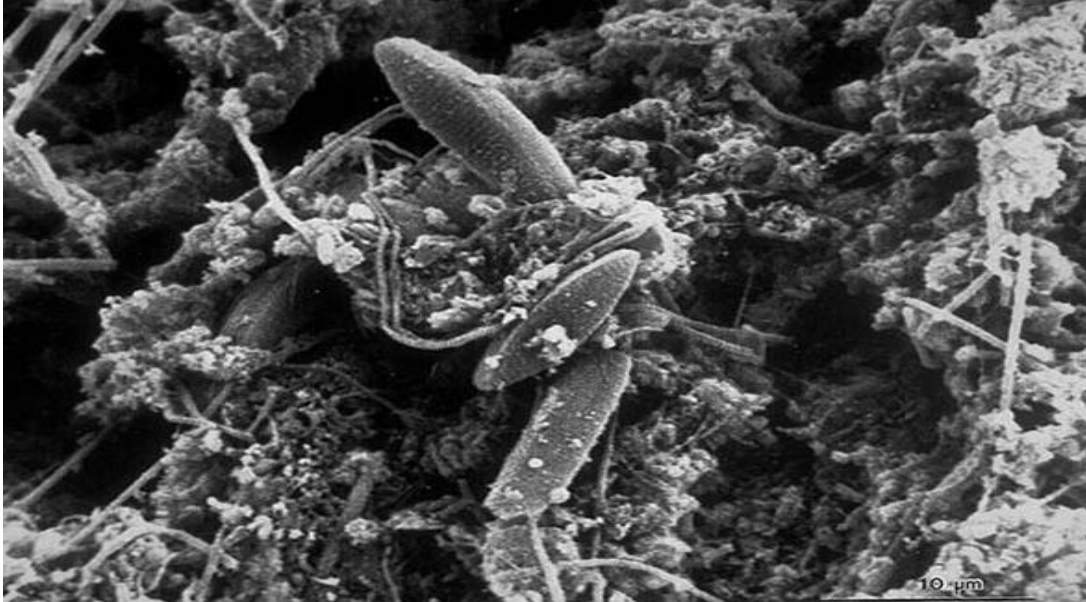


Figure 03 : micrographie électronique de balayage d'un biofilm qui s'est développé sur une surface d'acier pendant huit semaines dans un circuit de refroidissement industriel (Donlan, 2002).

2.2. 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.

2.2.1. 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 de la pression de la sélection exercée 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).

2.2.2. 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 ressource
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)

2.3. Etapes de formation du biofilm :

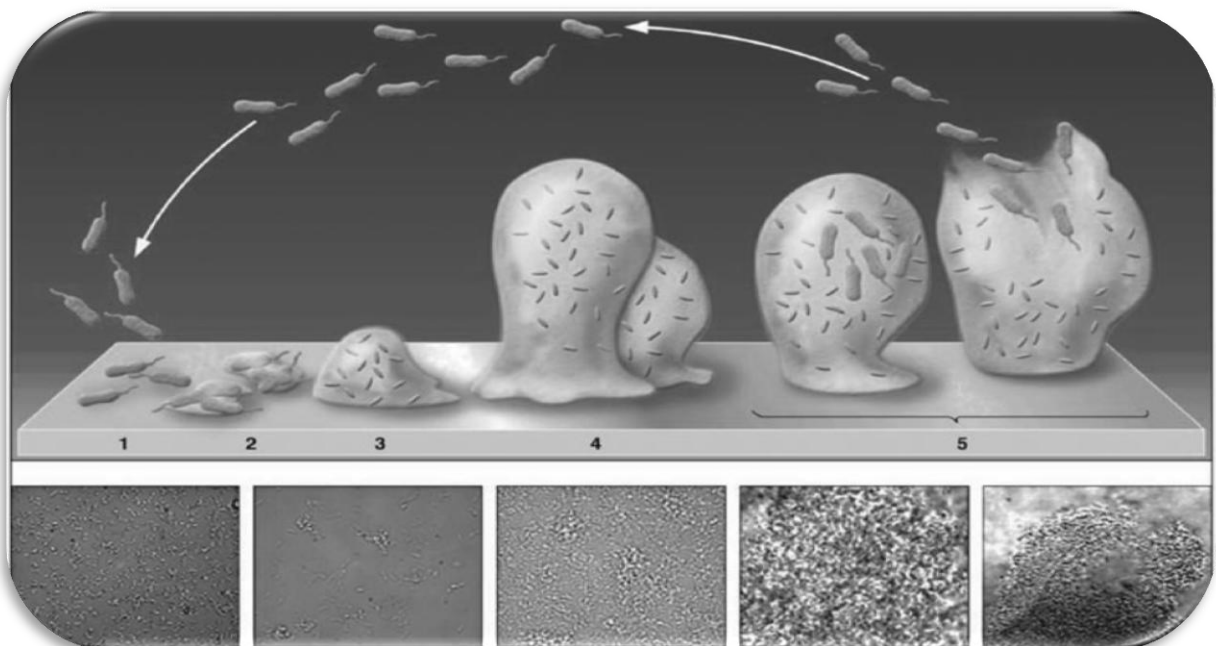


Figure 04 : les étapes de développement biofilm bactérien. (Marchand et al., 2012)

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

2.3 .1. Adhésion 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 tes que : flagelles chez *Pseudomonas aeruginosa*, et PNAG ou PIA qui présent 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)**.

2.3 .2. Adhésion irréversible :

Dans un deuxième temps, grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries qui leur permettant 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)**.

2.3.3. Formation des micro-colonies et production d'EPS :

Durant cette étapes, lorsque l'attachement irréversible des bactéries 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).

2.3.4. 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 entrainer la séparation des microorganismes d'une part, et permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments dans les parties enfuies du biofiim d'autre part, ainsi que l'évacuation des déchets (figure05). Le biofilm se développe, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique, en présence des conditions optimales (Filloux &Vallet ., 2003).

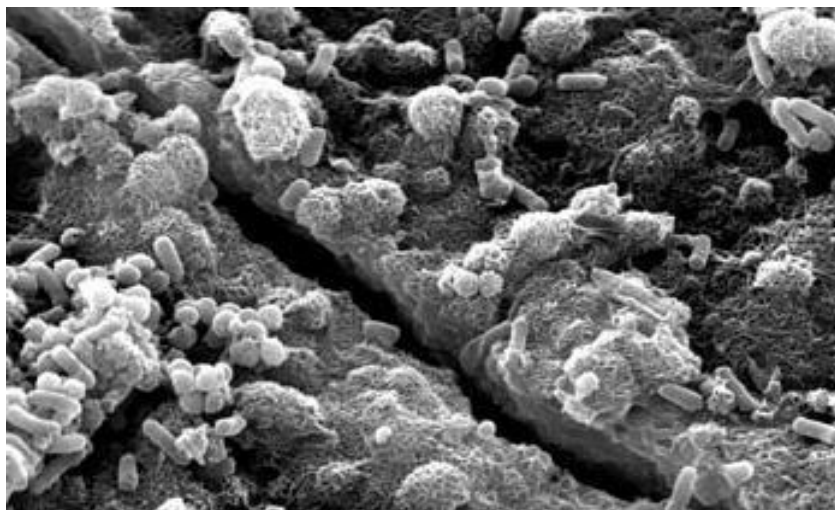


Figure 05: Photographie en microscopie électronique d'un canal de transport des nutriments dans le biofilm (Stickler , 2008).

2.3.5. 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 *quorum sensing*, et que ceci aura une influence sur les différentes étapes de la formation du biofilm (et al., 2014 ; Akbas, 2015 Tremblay). Principalement, les cellules filles sont détachées en premier du biofilm, Ce serait dû à de 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 3 processus : érosion, abrasion et sloughing :

1. L'érosion : est le résultat des forces de cisaillement en milieu liquides
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 total du biofilm.
3. sloughing : correspond à la perte instantanée des grandes parties du biofilm, affectant donc non seulement le biofilm entier mais aussi la surface du biofilm (Mogha et al., 2014).

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

2.4. 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 désinfection d'équipement et /ou 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).

2.5. Les biofilm des bacilles thermophiles

2.5.1. 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 est 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 biofilm des bacilles thermophiles sont désignés comme des biofilm 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 (Figure 06).

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

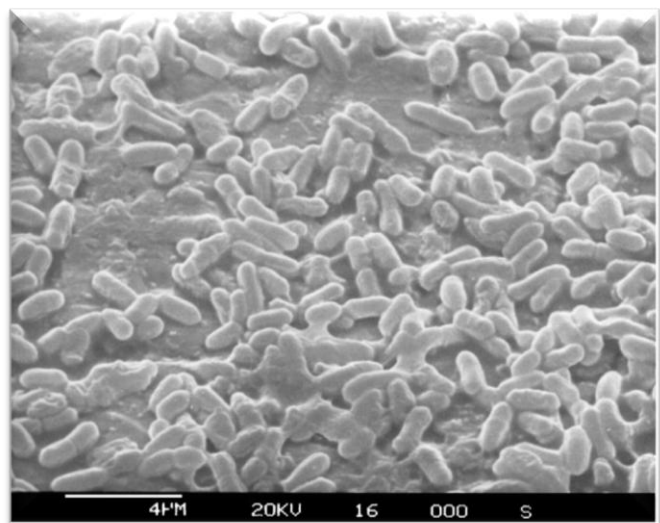


Figure 06: Micrographie électronique à balayage d'un biofilm d'*A.flavithermus* 18h sur la surface d'acier inoxydable (Burgess *et al.*, 2010).

2.5.2 . 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 : *B. Geobacillus* , *B. licheniformis* , *B. Anoxybacillus*, les *B. coagulans* et *B. pumilus* , pouvaient s'attacher à la surface d'acier inoxydable. Les spores adhérents atteignent d'approximativement le nombre de 6-7 cellules log UFC /cm², tandis que les cellules végétatives attachées peuvent atteindre approximativement 4-5 cellules log UFC /cm² (**Parkar et al., 2001**).

Les spores ont une plus grande propension que les cellules végétatives pour l'attachement (**Burgess et al., 2014**). Sous les conditions favorables (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**).

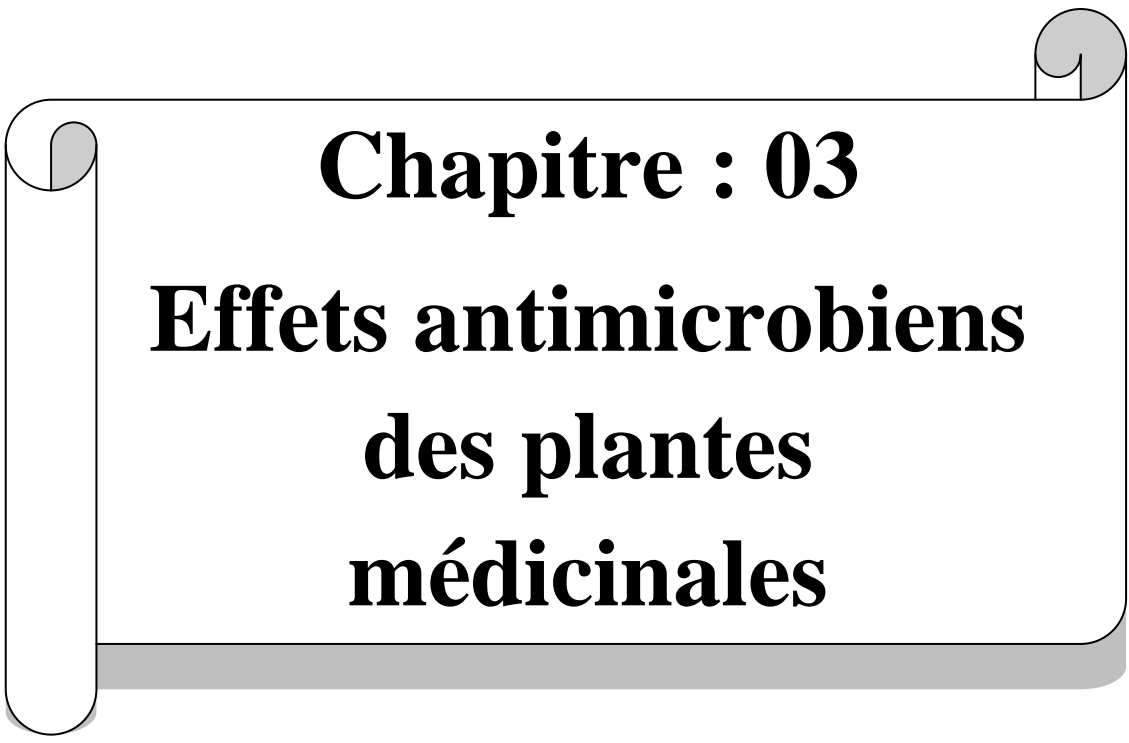
À moins de 6-8 h, les bacilles thermophiles peuvent former un biofilm de processus qui semble être beaucoup plus rapide que chez les bacilles mésophiles (**Burgess et al., 2014**). Cependant, il est également possible qu'un biofilm d'*Anoxybacillus flavithermus* peut être développé sur l'acier inoxydable,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

2. 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 généralement moins sensibles aux agents antimicrobiens et aux désinfectants et nécessitent des doses de 10 à 1000 fois en plus que ces mêmes sous forme libres et planctonique (**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. Étant 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**). L'existence d'une sous-population de bactéries en état de dormance, appelées bactéries persistantes, sont d'ailleurs probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms.
3. Certaines bactéries au sein d'un biofilm mature sont capable 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 : 03
Effets antimicrobiens
des plantes
médicinales

Chapitre : 03 Effets antimicrobiens des plantes médicinales

3.1 Généralités

Les années récentes ont été témoin d'une augmentation substantielle des infections bactériennes et fongiques, ceci doit être ajouté au problème de tolérance bactérienne accrue à survivre en présence d'antibiotiques. De plus, la contamination des aliments par des agents potentiels pathogènes provoquant des conséquences graves de santé et des pertes économiques (**Abi-Ayad et al., 2011**).

Au cours de la dernière décennie, il y a eu un intérêt accru aux produits naturels. La large variété des constitutions chimiques des espèces végétales correspondue à une diversité d'activités biologiques, telles que les activités antibactérien, cytotoxique, antifongique anti-tumorigénique et propriétés antioxydants (**Jeeb et al., 2016**).

Les plantes ont été utilisées comme médicament depuis des milliers des années (**Al-Snafi, 2013**). En effet, Il existe une grande confiance à l'égard des propriétés curatives des plantes. Ainsi dans les pays en développement, un nombre élevé de personnes dépend de la médecine traditionnelle, et d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 80% de la population rurale dépendent encore des plantes médicinales en tant qu'un système de soins de santé primaires. On estime que 35 000 à 70 000 espèces de plantes ont des vertus médicinales dans le monde (**Hashim et al., 2014**).

Les plantes synthétisent plus de 100000 petites molécules dont la majorité possède une activité antimicrobienne telle que les familles Lamiacée, Lauraceae, Zingibéraceae, Myrtaceae, Gentianacea, Contre des bactéries Gram-positives, Gram-négatives et les levures. Ceci a été éprouvé par un certain nombre de travaux (**Cheurfa, 2016**). Et d'autre espèces exposées ont aussi une activité antivirales considérable contre un ou plusieurs virus (**Rhattas et al., 2016**).

En effet, depuis l'antiquité, les huiles essentielles présentent une activité antiseptique non négligeable, elles sont utilisées dans de multiples domaines : pharmaceutique, agro-alimentaire et cosmétique (**Sadou et al., 2015**). A l'heure actuelle, 3000 huiles essentielles sont connus et 300 sont commercialisés principalement dans des domaines différents (**Abi-Ayad et al., 2011**). L'effet antimicrobien des plantes repose sur l'exploitation des parties les plus riches en métabolites secondaires, y compris la totalité de la partie aérienne de la plante (tel que les feuilles, les fruits, les fleurs), ainsi que les graines et les racines. Un nombre

important de ces composés sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci, sont selon leur usage traditionnel (Bondas et al. 2008).

3.2. *Pinus halepensis* :

3.2.1 Description botanique :

Pinus halepensis est une plante du bassin méditerranéen (García-Jiménez et al., 2017), qui possède plusieurs noms vernaculaires, en arabe porte le nom de « Sanawber », en Berbère (maroc) connue par « Tayada » (Slimani et al., 2016) et par « Azoumbi » en kabyles (Algérie). En français est également connue par le nom « Pin blanc », « Pin de Jérusalem » et « Pin d'Alep » (François, 2012). Le nom « Pin d'Alep » fait référence en Syrie à la ville d'Alep (Mauri et al., 2016), il a été décrit la première fois par Duhamel du Monceau en 1755 sous le nom: *Pinus hierosolimitana*, mais il a gardé le nom que Miller lui a attribué en 1768 (Pin d'Alep) (Nahal, 1962).

Pinus halepensis, ou pin d'Alep est un arbre variable fréquent, jusqu'à 20 m de hauteur, dont les fruits (cônes) sont Ovoïdes de 6 à 12 cm de long, d'un roux vif, luisant à maturité (Sadou et al., 2015), et ont un pétiole long de 2 ou 3 cm (Figure 07) (Chambel et al., 2013). En plus, ses bourgeons sont verticilles de couleur brun jaunâtre et dégagent une odeur résineuse et aromatique (Berroukche et al., 2014).

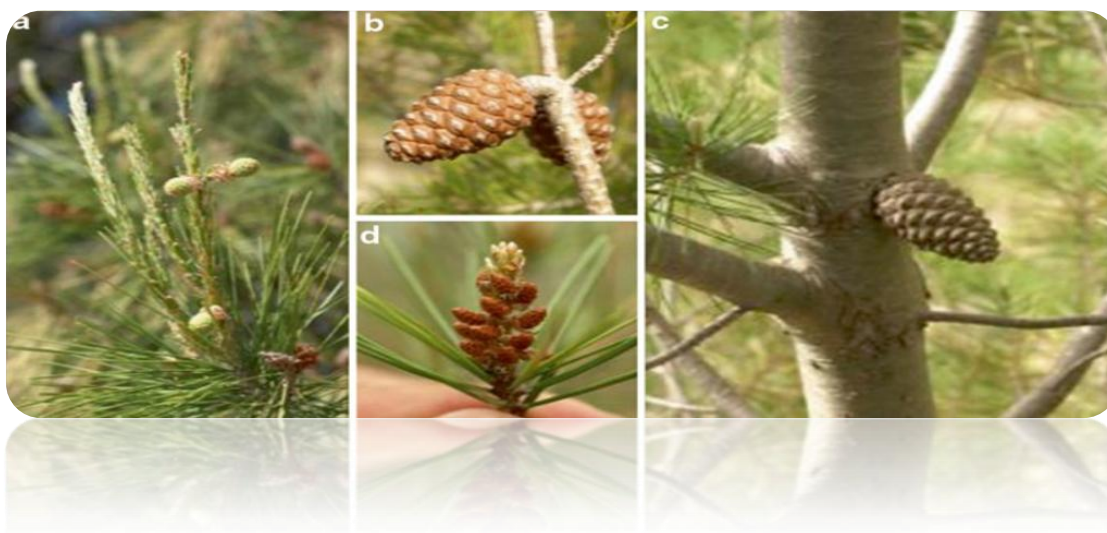


Figure 07: Caractéristiques reproductrices de pin d'Alep : (a) cycles fleurissants femelles multiples de la même chose période végétative, (b) cônes mûrs, (c) cônes serotinus dans un jeune arbre montrant la caractéristique écorce gris-clair mince et (d) strobiles masculins (L. Santos del Blanco) (Chambel et al., 2013).

Son écorce est lisse, devient crevassée de couleur gris argenté (Sadou et al., 2015) initialement, tournant vers brun-rougeâtre et finement fissuré avec l'âge (Mauri et al., 2016). Les aiguilles sont de fausses feuilles persistantes, filiformes, de couleur vert clair, organisée en paires et mesurant entre 6 et 12 cm de long et moins de 1 millimètre de large (Figure07). Par ailleurs les graines sont les plus légères parmi les pins méditerranéens avec une teinte grisâtre à brun-rougeâtre et ont une longueur moyenne de 5 à 12 cm (Chambel et al., 2013 ; Sadou et al., 2015, Mauri et al., 2016).

Le pin d'Alep est un espèce monoïque, c'est-à-dire que les fleurs mâles et les fleurs femelles sont déposés sur un même pied (fady et al., 2003), qui pousse fréquemment sur des sols calcaires assez pauvres (Sadou et al., 2015), leur croissance peut se remettre en marche très tôt en hiver et continuer de bien s'élever pendant l'automne, Par ailleurs, dans les climats doux, l'élongation est en retard. Finalement, la floraison femelle n'est pas rare, elle est multiple durant la même année (Chambel et al., 2013).

3.2.2 Position taxonomique de *Pinus halepensis* :

La systématique du pin d'Alep établie par FARJON (1996) se résume comme suit :

Règne :	Plantae
Embranchement :	Spermatophyta
Sous-embranchement :	Gymnospermae
Classe :	Pinopsida
Ordre :	Abietales
Famille :	Pinaceae (Abietaceae)
Sous-famille :	Pinoïdeae
Genre :	<i>Pinus</i>
Sous-genre :	<i>Eupinus</i>
Espèce :	<i>Pinus halepensis</i> Mill.

3.2.3 Répartition géographique :

Pinus halepensis est l'un des arbres les plus communs dans le bassin méditerranéen (Sadou et al., 2015) où il occupe environ 3,5 millions d'hectares (Taïbi et al., 2015). Selon la

figure (10) *P. halepensis* présente une discontinuité marquée par son absence en Egypte. Cependant, sa répartition en bassin méditerranéen est peut être divisé en trois lignes abdominales ,à savoir le nord d’Afrique(Maroc, Algérie ,Tunisie, Libye), Méditerranée orientale(Syrie, Lebanon, Palestine , Jordanie et Turquie), et l’Europe de l’Est (Grèce, le nord d’Italie, Croatie, et l’est de France et l’Espagne) (**Bouzenna et al.,2016**) .

En Algérie, *P. halepensis*, domine les écosystèmes forestiers dans les zones semi-arides et s’accommode bien aux terrains calcaires (**Sadou et al., 2015**). Elle est très fréquent sur tous les massifs montagneux, du Tell littoral à l’Atlas Saharien (Figure 08) (**Quézel & Barbero1992**) .Cette espèce forme des forêts dans les collines et les régions sèches du littoral méditerranéen ainsi que dans les montagnes semi-arides, elle peut atteindre parfois jusqu’à 2200 m d’altitude dans les montagnes sèches de l’intérieur, et dans les terrains calcaires du littoral algérien (**Sadou et al., 2015**).

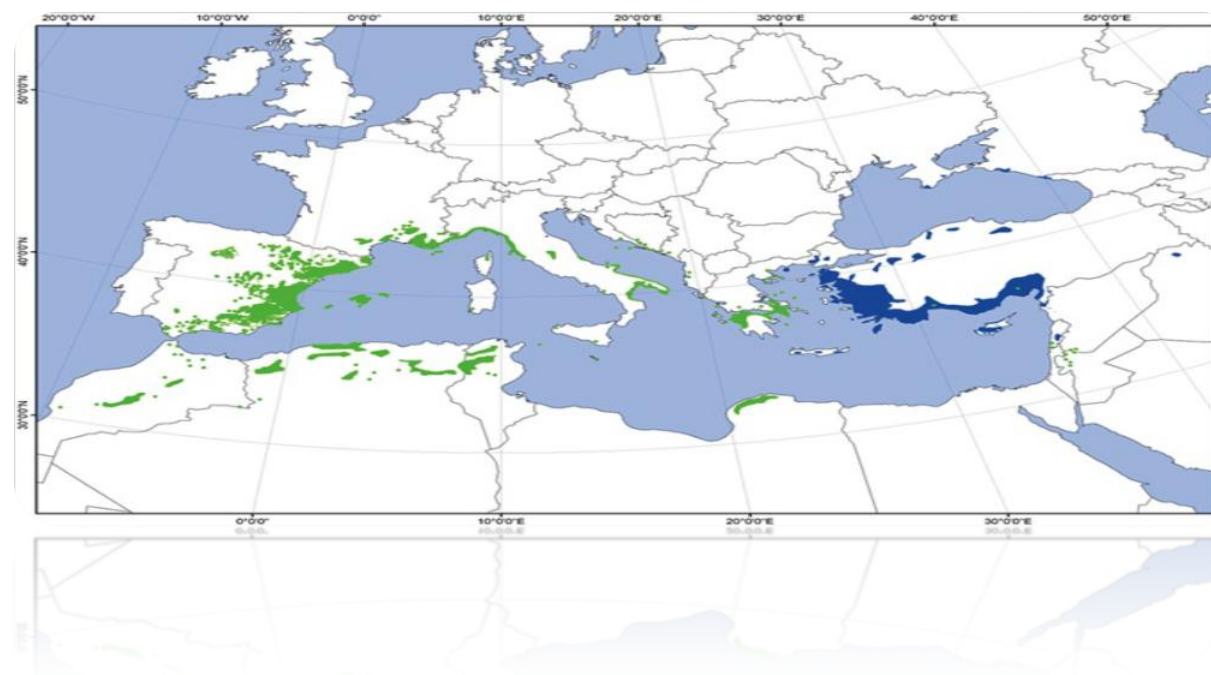



Figure 08: la distribution géographique de pinus halepensis  (**Chambel et al ,2013**).

3.2.4. Etude Phytochimique:

Des études chimiques faites sur *Pinus halepensis* rassemblées des secteurs bioclimatiques différents, ont montré sa richesse en différentes composants qui se résument dans le tableau suivant :

Chapitre : 03 Effets antimicrobiens des plantes médicinales

Tableau 03 : Compositions chimiques de *Pinus halpensis*

Partie	Composant	Référence
Aiguilles	<ul style="list-style-type: none"> • Principalement : le β-caryophyllène (31,89%), l'α-pinène (24,41%) et le β-myrcène (19,38%). • Les composés mineurs sont représenté par : l'α-terpinolène (5,27%), l'α-caryophyllène (4,76%), la Sabinène (3,42 %) et le β-pinène (2,13%). 	(Sadou et al., 2015)
Pignons	<ul style="list-style-type: none"> • protéine 22.7 %, huile 43.3 %, cendre 8.3 % et glucide total 25.7 %. • éléments minéral 1 %.: potassium, le magnésium et le calcium • acide gras non saturé 27.3 et 48.8 % : acide oleique et des acides linoléiques • acides gras saturé (8.75 %) : acide palmitic. <p>Acide myristique, Acide myristoleique, Acide palmitoleique , Acide margarique, Acide margaroleique, Acide stéarique, Acide linoléinique, Acide arachidique, Acide eicosenoique , Acide eicosadienoique , Acide eicosatrienoique , Acide behénique et des acides lignocérique ont été aussi détectés.</p>	(Cheikh-Rouhou et al., 2006)
Aiguilles Branches Bourgeons	<p>la composition de l'huile essentielle de ses parties comprend deux groupes principaux :</p> <p>un riche en Mycènes (Moy : 23,94 %), α-pinène (Moy : 13,4 %) terpinolène (Moy : 11,5 %) et isovalérate de 2-phényléthyle (Moy : 10,1%)</p> <p>l'autre dominé par le myrcène (Moy : 27,15 %), l'α-pinène (Moy : 21,8 %), et le (<i>E</i>)- β-caryophyllène (Moy : 14,15 %)</p>	(Fekih et al. 2014).

3.2.5. Etude biologique:

Le pin a des vertus thérapeutiques connues depuis longtemps en Algérie, ses bourgeons, ses aiguilles, son essence et sa résine sont utilisés en médecine traditionnelle comme expectorant, balsamique, antiseptique et antirhumatismal (**Sadou et al., 2015**).

3.2.5 .1 Intérêt thérapeutiques, et industriel :

Pinus halepensis a été utilisé en thérapeutique traditionnelle Algérienne comme celui de la médecine populaire italienne pour remédier spécifiquement les problèmes respiratoires et de la sphère orale (rhume, grippe, angine, pharyngite, asthme, etc.) (**Bouzenna et al., 2016 ; Meddour et al., 2009**).

Les décoctions des feuilles et des bourgeons de *P. halepensis* M. ont une activité protectrice inhérente contre la toxicité rénale et cela peut être dû à certaines molécules présentes dans la composition chimique. Parmi ces molécules le β -pinène ou le mono terpène qui peuvent assurer le rôle de bon régulateur des concentration sériques des électrolytes (Na ,Ca et K) au niveau du tissu rénal ,mettent en relief que les décoction des bourgeons et des feuilles ont une action antitoxique (**Berroukche et al.,2014**) et les décoctions de tous les pins ont des propriétés antiseptiques, diurétiques, vermifuge, antidiabétique et cicatrisant, cravate (**Bouzenna et al.,2016**).

Par ailleurs, les lipides de graine riches en acide linoléique, exercent un effet favorable sur des lipides du sang, en abaissant la tension artérielle et le cholestérol dans le sérum (**Cheikhrouhou et al., 2006**). En outre, les lipides neutres, les glycolipides et les phospholipides ont des effets inhibiteurs sur les maladies anti-géogénique et sont en mesure de lutter contre le cancer (**Bouzenna et al., 2016**). de plus, l'extrait de graine ont encore une propriété antioxydant et anti tumorale (liées à la présence des métabolites secondaires : composés phénoliques (**Fekih et al., 2010**).

P. halepensis peut être aussi employées comme un additif aromatisant dans les nourritures, les produits pharmaceutiques et les préparations cosmétique (**Djerrad et al., 2015 ; Bouzenna et al., 2016**) au lieu des antioxydants synthétiques toxiques (**Djerrad et al., 2015**) .

3.2.5.2. Activité antimicrobienne :

L'activité antibactérienne de *P.halpensis* récoltée de Gazaouet (Tlemcen), a été éprouvée sur différentes souches bactériennes (Gram (+), Gram (-), effectuées par la méthode de disques ainsi que par la méthode de dilution.

Les tests ont montré que l'huile a un effet antibactérien variable contre les souches testées, que certain sont sensible (*S. aureus*, *B cereus*) et d'autre sont résistantes (*E. coli*, *P. aeruginosa*). Le tableau suivant montre les différentes concentrations inhibitrices selon **Abi-Ayad et al., 2011** et **Fekih et al.,2014**.

Tableau 04 : Diamètre d'inhibition et MIC des tensions bactériennes étudiées (Abi-Ayad et al., 2011).

Souches bactériennes	Méthode de diffusion de disque Ø (mm)	Méthode de dilution d'agar MIC (µl/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> (S) ATCC 25 923	4.5 (S)	7.5 ≤ MIC ≤ 10
<i>Bacillus cereus</i> (B) ATCC 11778	3 (S)	7.5 ≤ MIC ≤ 10
<i>Escherichia coli</i> (E) ATCC25 922	0.5 (R)	≥ 17.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P) ATCC 27 853	0 (R)	≥ 17.5

Souches Résistantes R: Ø < 0.6cm; Intermediare I: 1.3 cm < diameter < 0.6cm; Sensible S: Ø > 1.3 cm

3.2.5. 3. Activité antifongique :

Les huiles essentielles des aiguilles de *P halepensis* rassemblées de trois localités différentes de Tunisie, ont été examinées pour leur activité antifongique contre des espèces fongiques sur le plan agricole important. Le résultat obtenu a prouvé que toutes les huiles ont réduit de manière significative la croissance des champignons testée (*Fusarium*, *Rhizoctonia* sp, *Microdochium nivale*, *Alternaria* sp, *Bipolaris sorokiniana*) (**Hamrouni et al., 2014**) .

De même, l'huile essentielle de *P. halepensis* de Tlemcen (Algérie) extraite à partir des aiguilles qui a montré une activité antifongique contre les champignons suivants (Tableau 05) (**Abi-Ayad et al., 2011**).

Tableau 05 : Activité antifongique de huile essentielle du *P. halepensis* (Abi-Ayad et al., 2011) .

Champignons	Diamètres d'inhibition (mm)
<i>Aspergillus flavus</i>	3
<i>Aspergillus Niger</i>	3.75
<i>Fusarium oxysporum</i>	9
<i>Rhizopusstolonifer</i>	3.5

3.3. *Ammi Visnaga* :

3.3.1. Description botanique

Ammi visnaga est une plante vivace, très fréquente dans le bassin méditerranéen (Khalfallah et al.,2011). Elle possède plusieurs non vernaculaire, « Khella, Khella baladi » (Al –Sanfi ,2013), « Gazar sheitani , kammon habashi , Bizr Alkhilla », et « Sowak Alnabi » en arabe, elle est également appelé « Tabellaout » en **Berbère** . En anglais elle est connu sous le nom « Pick tooth, Tooth pick », « Bishop`s weed »et « Herbe aux cure-dents » en français et par « Zahnstocherkraut » en allemand (Bishr et al., 2014).

Khella ou bien « Noukha » en Algérie (Belkacem et al., 2016) est une plante annuelle ou bisannuelle, qui pousse généralement au printemps (Vogel, 2013 ; Jaradat et al., 2015), et peut atteindre environ 120 cm de hauteur (Figure 09). Cette plante se caractérise par ailleurs par une légère odeur aromatique et un goût très amer (Amira, & Doha, 2015). Elle possèdent des feuilles alternes et basales, sessiles (dans les pousses supérieures) et courtes en pétioles (vers le bas) (Bishr et al., 2014). Elles sont variables, fréquentes généralement en forme ovale à triangulaire, à une teinte vert grisâtre et qui peuvent mesurer jusqu'à 20 cm de long (Bishr et al., 2014 ; Hashim et al., 2014). Ses tiges

sont rameuses, robustes, au sommet, entièrement couvertes d'un feuillage (**Bishr et al., 2014**).



Figure 09: *Ammi visnaga* L (Dirar et al., 2014)

L'inflorescence est une ombelle composée des fleurs blanches très gonflées à la base, qui se combinent pour former un large parapluie (Figure10 : a) (**Keddad et al., 2016**). Ces fleurs ont aussi leur propre parfum différent de la partie feuillue (**Bishr et al., 2014**). En outre, *Ammi visnaga* porte des fruits ovoïdes, contractés par deux méricarpes (d'environ 3 mm de longueur), ces derniers privilégiés par une couleur brun-vert avec une nuance violette et portent des graines ovales (Figure10 : b), minuscules (environ 2 mm de long) (**Bishr et al., 2014 ; Hashim et al., 2014; Meepagala et al., 2016**).

La floraison normale d'*A. visnaga* est généralement de juillet à septembre (parfois dès le mois de Mai dans les années sèches ou zones xérophiles) (**Gattefossé, 2016**).



Figure10: La fleur(a) (Jaradat et al., 2015) et les grains(b) d'*Ammi visnaga* (Pavela et al., 2016)

3.3.2. Position taxonomique d'*Ammi visnaga*:

Selon **bok benit (2011)**, l'*Ammi visnaga* appartient au :

Règne :	<i>Plantae</i>
Embranchement :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre :	<i>Apiales</i>
Famille :	<i>Apiaceae</i>
Genre :	<i>visnaga</i>

3.3.3. Répartition Géographique :

Ammi visnaga est une plante native du bassin Méditerranéen (**Ullah R et al., 2012**) indigène du Nord l'Afrique, l'Asie occidentale, qui pousse généralement dans les climats chauds (**Hashim et al., 2014**).

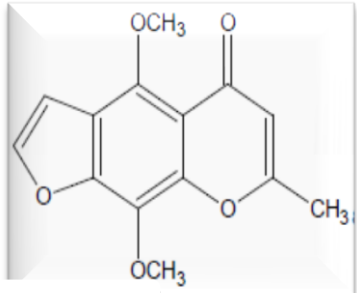
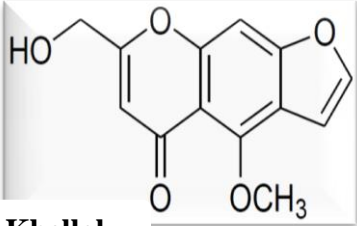
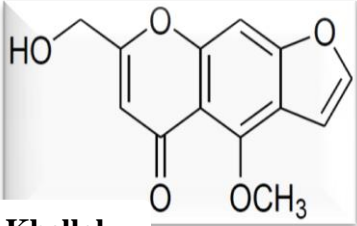
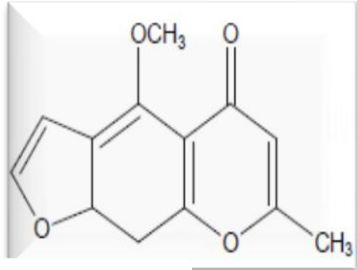
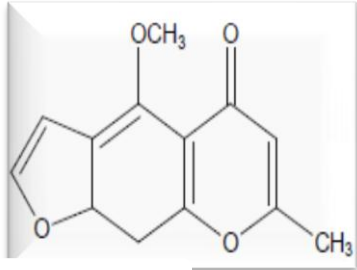
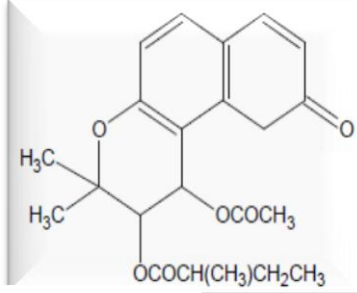
Cette Plante est également acclimatée en Australie et en Chili, Argentine, Mexique, Etats-Unis, Russie, et en Atlantique (**Kenner & Requena , 2001 ; Al –Sanfi A .I ,2013; Bishr et al., 2014**). En outre, elle est fréquente aussi en République islamique d'Iran (**Iserin, 2001**). Par ailleurs, cette espèce est distribués abondamment en Pakistan comme plante médicinale sauvage (**Ullah et al., 2012**). De même *A. visnaga* constitue des peuplements denses plus isolés dans les cultures et les landes incultes sur argile de Nord d'Afrique ou elle occupe surtout les jachères en terrain argileux (**Gattefossé , 2016**) .

3.3.4. Etude phytochimique:

Les études phytochimiques d'*Ammi visnaga* ont révélé sa richesse en différentes composants (**Khalfallah et al., 2011**) qui se résument dans le tableau suivant :

Chapitre : 03 Effets antimicrobiens des plantes médicinales

Tableau 06: Compositions chimiques d'*Ammi visnaga*

Familles	Composants	Structures de majeurs composants (Dirar et al., 2014; Hashim et al., 2014)
Furanochromones	γ-pyrones 4%., la khelline (0,3-1,2%), la visnagine (0,05 à 0,30%), khellinol, ammiol, khellol et khellinin visammiol , khellinone, visnaginone (Hashim et al.,2014)	 <p>Khelline</p>
Pyranocoumarines	0,2-0,5% comprenant: la visnadine, lasamidine et dihydrosamidine (Ghoneim et al., 2014)	 <p>Khellol</p>
Furanocomarines	xanthotoxine et d'amoidine (Jaradat et al., 2015)	 <p>Khellol</p>
Flavonoïdes	comprenant : la quercétine et l'isorhamnetine et leurs trisulfates ainsi que le kaempferol (Jaradat et al., 2015)	 <p>Khelline</p>
Volatiles	Les plus abondant :linalool and aliphatic esters (Ghoneim et al.,2014)	 <p>Visnagine</p>
Protéines	(fruits mûrs sèches) 12-16% (Bishr et al., 2014)	 <p>Visnadine</p>

3.3..5.Etude biologiques :

Ammi visnaga possèdent plusieurs propriétés biologiques (diurétique, antispasmodique, antilithiasique, antioxydant, antibactérien et fongicide). En outre, les huiles essentielles et les extraits d'*A. visnaga* sont décrits comme de puissants pesticides contre *Mayetiola destructor* et *Culex quinquefasciatus* (Brahmi et al., 2016).

3.3..5 .1.Intérêt thérapeutiques:

Dans le golf arabe et dans les pays méditerranéens les fruits de khella sont utilisés pour soulager un certain nombre d'affections (telles que la douleur aiguë) (Jaradat et al., 2015). Ils ont été utilisés dans l'Egypte ancienne comme un remède pour les coliques rénales, de même au Moyen-Orient, le thé préparé à partir des graines a été utilisées pour soulager les douleurs urinaires (associée à des calculs rénaux) et pour favoriser le l'évacuation des cailloux (Pavela , 2016).

Au Maroc les ombelles ont été aussi administrées contre la lithiase urinaire (Ghourri , 2013). Les graines d'*A. visnaga* sont utilisées pour soulager les douleurs sévères causées par une réduction de flux de sang vers le cœur (Hashim et al., 2014). Par ailleurs, en Algérie *A. visnaga* (*L*) est largement utilisé dans le traitement traditionnel des maladies digestives et culinaires (Belkacem et al., 2016).

3.3.5.2. Activité antimicrobienne :

Ammi visnaga est considéré comme une espèce ayant des activités antimicrobiennes. Généralement, ses activités ont été associées à la composition chimique de plante, précisément à la khelline et à la visnagine, deux constituants considérés comme des agents antifongiques, antibactériens et antiviraux (Hashim et al., 2014) .

L'activité antimicrobienne des extraits éthanoliques et aqueux des fruits de plantes couramment utilisées en Irak, a été évaluée contre certains microorganismes pathogènes (tableau07) utilisant une large gamme de concentrations (0,05 à 50 mg/ml) (Ghareeb et al., 2011).

Chapitre : 03 Effets antimicrobiens des plantes médicinales

Tableau 07 : Concentration minimale d'inhibition (MIC) et diamètres d'inhibition (DIZ) d'extrait bruts d'*Ammi visnaga* (Ghareeb et al., 2011).

SOUCHES	Extraits éthanoliques		Extraits aqueux	
	MIC (mg/ml)	DIZ (mm)	MIC (mg/ml)	DIZ (mm)
<i>E. coli</i>	12.5	13	25	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	15	50	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12.5	12	25	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	18	25	8
<i>Leuconostic mesontroide</i>	50	24	50	25
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	9	50	44

3.3.5.3. Activité antibiofilm:

L'extrait méthanolique d'*A. visnaga* (L) collecté au printemps dans la région de Sidi lakhdar (Mostaganem, Algérie), a un effet puissant contre la formation de biofilms de *Bacillus cereus* en raison de leur teneur en composés phénoliques totaux (Belkacem et al., 2016) .

3.4. *Citrullus colocynthis*

3.4.1. Description botanique

Citrullus colocynthis ou Coloquinte en français (Ghourri et al., 2014), une plante médicinale appartenant à la famille des cucurbitacées, s'appelle généralement « pomme amère » ou « la pastèque sauvage » (Arivoli et al., 2015), cette plante est connue par d'autre nom vernaculaire mentionner dans le tableau 08.

Chapitre : 03 Effets antimicrobiens des plantes médicinales

Tableau 08: nom vernaculaire de *Citrullus colocynthis*

pays	Nom Vernaculaire :
Le golf arabe	"Handal", "Hdejj", "Tabarka" ou "Tifersite" (Uma & Sekar ,2014 ; Ghourri et al ., 2014 ; Nessa & Khan et al., 2014)
Le Maghreb (berbère)	«Tadjellet» (Abdellah et al., 2014)
Angleterre	Bitter-Apple»,« Bitter-Cucumber»,« Colocynth», «Colocynth »
Espagne	«Alhandal», «Coloquintida» (Al-Snafi ,2016)
Inde	«Tumba», « Indrayan » (Al-Snafi ,2016; Arivoli et al. , 2016)

Citrullus colocynthis est une plante désertique, herbacée, annuelle ou éternelle (Nessa & Khan et al., 2014 ;Al-Snafi ,2016), à longues tiges rampantes qui peuvent dépasser 1 m de long d'étalement sur le sol (Figure11) (Merabti et al.2015) .De plus, elles sont angulaires, rugueuses de 3 à 7 lobes (Al-Snafi ,2016).



Figure 11: *Citrullus colocynthis* (Khattak et al., 2015).

Chapitre : 03 Effets antimicrobiens des plantes médicinales

Cette espèce possède de grandes feuilles alternées, rugueuses de 5 à 10 cm de longueur et découpées en 3 à 7 lobes et portent des fruits à un goût intensément amer, sphériques de 4 à 10 cm de diamètre, ressemblant à une petite pastèque de couleur variées (de verte vers jaune-orange) selon la maturité (Figure 12) (Nessa & Khan *et al.*, 2014 ; Idan *et al.*, 2015 ; Merabti *et al.* 2015).

Les fleurs sont monoïque, pédonculées, solitaires, axillaire, avec des corolles divisées en 5 lobes et un ovaire villeux. En outre, les graines sont en grand nombre comprimés, douce, ovoïdes de couleur variant du jaunâtre-orange au brun foncé (Figure 12) (Al-Snafi, 2016).



Figure 12 : Photographie de *Citrullus colocynthis* fruit (A) feuilles (B) racines (C) et les grains (D) (Shawkey *et al.*, 2014) .

3.4.2. Position taxonomique de *Citrullus colocynthis* :

Règne :	Végétale
Sous règne :	plantes vasculaires
Super division :	spermapytes
Division :	angiospermes
Classe :	dicotylédones
Sous classe :	dialypétales
Ordre :	violales
Famille :	cucurbitacées
Genre :	<i>Citrullus</i>
Espèce :	<i>colocynthis</i> (Azzi, 2013)

3.4.3. Répartition géographique :

Citrullus colocynthis (L). Schrad. ou "coloquinte", est une plante désertiques indigène de bassin méditerranéen et de l'Asie (Uma & Sekar ,2014), très fréquente dans les régions tropicale (Amamou, 2011).

Cette plante était exclusive des zones sèches de l'Afrique du Nord et maintenant elle est largement distribuée en :

- Afrique du Nord : l'Algérie, l'Égypte; la Libye, le Maroc, la Tunisie
- l'Afrique Tropicale du Nord-est (la Somalie..), l'Afrique Tropicale Est (le Kenya) et l'Afrique Tropicale D'ouest (le Mali)
- l'Asie : répartie généralement dans la région phytogéographique Saharo-arabe (le Koweït, l'Arabie Saoudite, l'Irak, la Jordanie, le Yémen), et dans la Syrie, le Liban, l'Afghanistan, l'Iran, la Turquie, l'Inde, le Pakistan, le Sri Lanka;
- l'Europe : la Grèce, l'Italie, l'Espagne; et l'Australie (Al-Snafi ,2016).

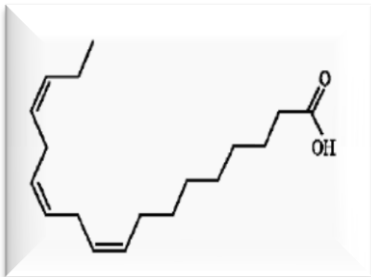
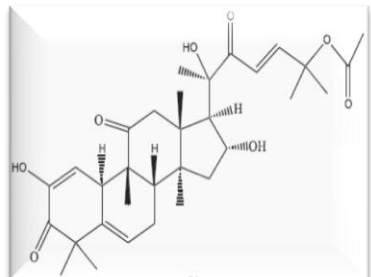
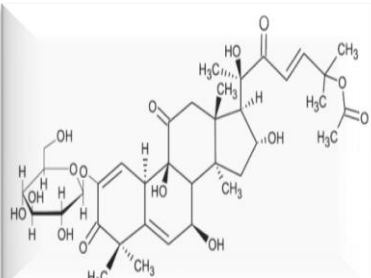
En effet, *Citrullus colocynthis* est une espèce tolérante à la sécheresse et pousse en abondance sur des sols marginaux et peut bien grandir dans l'environnement aride (Amamou, 2011).

En Algérie, elle occupe une région très vaste, qui s'étend du nord au désert chaud (UMA & Sekar ,2014).

3.4. 4.Etude Phytochimique :

Des études phytochimique faite sur *Citrullus colocynthis* ont révélé la présence de plusieurs constituants chimiques actifs, y compris des alcaloïdes, des flavonoïdes, saponins, des tanins, des glucides, des glucosides et des huiles essentielles (Tableau 09) (Idan et al., 2015) .

Tableau 09: Compositions chimiques de la coloquinte.

Partie	Composant	Structure
Graine	<ul style="list-style-type: none"> • Protéines (13.99 0.06 %±) • fibres brutes (46.73 0.15 %±) α-tocopherol (1.90 ± 0.020 g/100 g), δ-tocopherol (0.32 ± 0.020 g/100gs) et huile fixe (17-28.5 %). • Les 'acides gras non saturés (79.80%), principalement : l'acide linoléique, et acide oléique • d'acides gras saturés et totaux saturés (20.20%) • un niveau de FA polyinsaturé n-3 très bas (0.5 %). (Sen Gupta & Chakrabarty , 1964; Al-Snafi ,2016) 	<p>Acide linoléique</p>  <p>(Gurudeeban et al.,2010)</p> <p>Cucurbitacine E</p> 
Fruit : pulpe et fruit entier	<ul style="list-style-type: none"> • Cucurbitacins, Glycosides, flavonoïdes , acide phénolique : Catéchine ,Myricetine, Quercetine, Kaempferol ,acide Gallique ,p-Hydroxy, acide benzoïque ,acide Chlorogénique ,acide Caféique ,acide Vanillique ,acide p-Coumerique ,acide Sinapique ,acide Ferulique • Alkaloids: Choline • Volatiles/Terpenoïdes (Hussain et al., 2014) 	<p>colocynthoside A</p> <p>(Hussain et al., 2014)</p> 
Racine	Tannins, Saponins, Flavonoïde, stérols non saturés, Quercetine et stéroïde (Gurudeeban et al., 2010 ; Nahal Boudierba et al., 2016)	<p>(Hussain et al., 2014)</p>

3.4.5. Etude biologiques :

Les plantes telles que *C. colocynthis* produisent une énorme composition importante comme : phénols, quinones, flavones, des tanins, des coumarines, terpenoïdes, des alcaloïdes, qui ont un effet protectrice naturelle contre des micro-organismes, des insectes, des maladies et des herbivores (Ebid ,2015; Arivoli et al., 2015) .

3.4.5.1. Intérêt thérapeutiques:

C. colocynthis a beaucoup des propriétés médicinales, elle est utilisée dans le traitement de rhumatisme, la tuberculose, analgésique et stimulation de système immunitaire (Idan et al.,2015) ,comme elle possède une activité, hypoglycémiques, hypo-lipidémique , anti-inflammatoires, d'antibactérien, d'antioxydant et anticancéreux (Kumar &, Agrawal ,2015 ; Azizi ,2017)

Traditionnellement, dans les pays asiatiques et africains les fruits de *C. colocynthis* ont été utilisés pour le traitement des maladies microbiennes, l'ictère, l'ulcère, l'inflammation, diabète et pour les maladies urinaires et en tant qu'un agent insecticide.

Et dans certains des régions du Moyen--Orient l'ingestion de ses fruits aux doses plus faibles (300-800 mg) quotidiennement est prescrite pour le traitement de diabète et pour éviter les effets secondaires intestinaux (Kumar & Agrawal, 2015)

Par ailleurs, dans la médecine iranienne, elle a été traditionnellement employée en tant qu'abortif et pour traiter : l'œdème, la constipation, infections bactériennes, cancer et le diabète (Idan et al., 2015).

- La racine a été utilisée en cas d'élargissement abdominal, toux, asthme, inflammation du sein, ulcères, maladies urinaires et rhumatisme.
- l'huile des graines est employée pour les morsures toxiques, plaintes d'entrailles, épilepsie et également pour noircir les cheveux (Al-Snafi ,2016).
- Les feuilles sont diurétiques et utilisées dans le traitement de l'ictère et de l'asthme (Nessa & Khan ,2014).De plus l'effet antiprolifératif d'extraits de feuilles (cucurbitacine, glycosides) a été étudiée dans la croissance des cellules cancéreuses du sein humain. Les résultats ont révélé que les glycosides et cucurbitacine présentent des effets pléiotropiques sur les cellules provoquant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Ces

Chapitre : 03 Effets antimicrobiens des plantes médicinales

résultats suggèrent que les glycosides de cucurbitacine pourraient avoir une valeur thérapeutique contre les cellules du cancer du sein (Al-Snafi ,2016)

3.4. 5 .2 .Activité antimicrobienne :

L'activité antibactérienne d'extrait de *Citrullus colocynthis* des parties aériennes testées sur différentes souches bactériennes a donné les diamètres d'inhibition dont les valeurs sont portées au tableau 10.

Tableau 10: Activité antibactérienne de *Citrullus colocynthis* par la méthode de diffusion du disque (Nahal Boudierba et al., 2016).

Les bactéries testent	Diamètres Inhibition (mm)					
	Fruit		Feuilles		Racines	
	AQ	Hyd	AQ	Hyd	AQ	Hyd
<i>Klebsiella pneumonia</i> (ATCC4352)	9.0	9.4	10.5	10.2	10.4	11.0
<i>Listeria monocytogen</i> (ATCC19115)	9.9	10.0	10.8	11.9	11.4	10.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	9.8	10.4	10.2	10.7	11.0	10.8
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	9.2	10.0	8.9	10.9	10.4	11.1
<i>Bacillus sterothermophilus</i> (ATCC11778)	9.8	9.2	9.8	9.7	10.4	11.2
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	9.6	10.0	10.6	10.3	10.6	10.6
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC29212)	9.4	8.6	10.5	9.7	10.7	10.7

AQ: Aqueux

Hyd: Hydromethanolique



Matériels
et méthodes

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

1. Isolement des souches

1.1. Prélèvements

Le prélèvement des bactéries a été effectué à partir de différents sachets de lait recombine et de lait frais (lait de vache) avec enrichissement 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 le sachet est 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 bactéries 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 inoculum est étalé sur la gélose. Les boites seront incubées à 30°C pendant 72h.

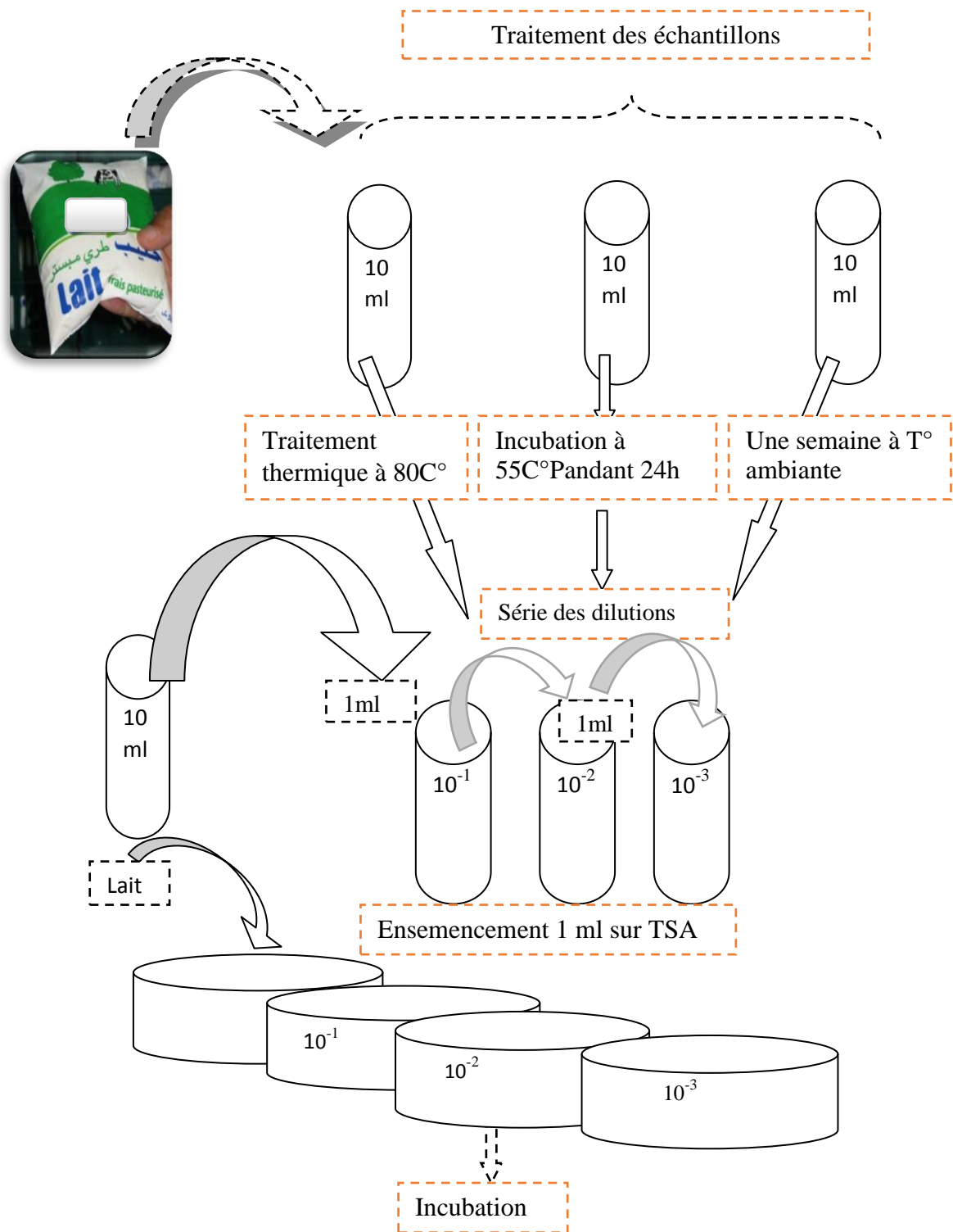


Figure 13 : le protocole de la mise en culture des bacilles mésophiles et thermophiles.

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

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) inclinée. 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 0.8 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 adhéree.
- Laisser sécher 10 à 15 min.
- Remplir les puits avec 100 µl de cristal de 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 munis 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.

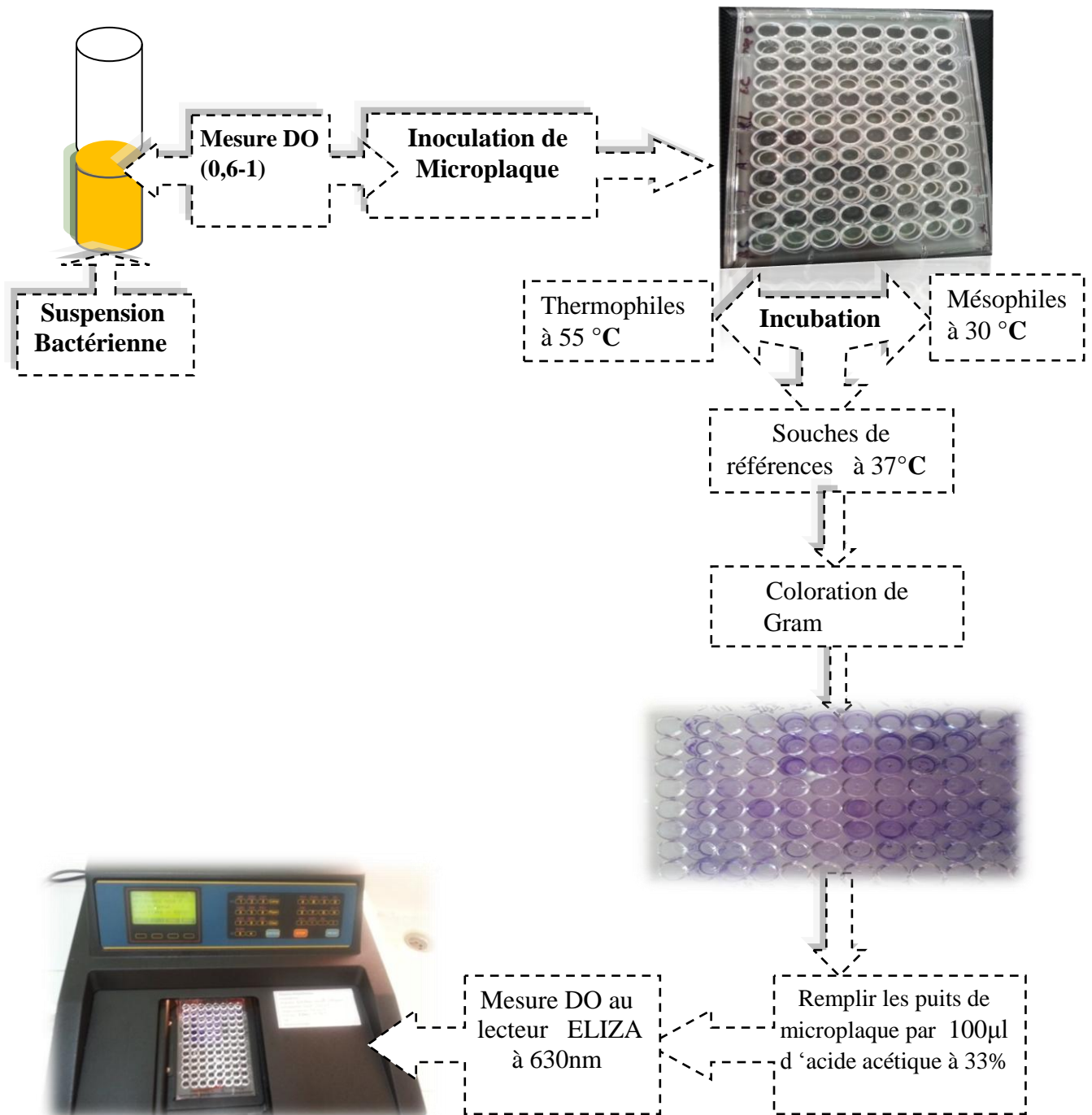


Figure 14 : Schémas représentant le protocole de formation des biofilms par la méthode au cristal violet

5. Détermination de l'activité antimicrobienne des phyto-extraits

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des phyto-extraits: d'*Ammi visnaga* (cure dent, fruit et ombelle fraîches), *Pinus halpensis* (feuille et fruit) et *Citrullus colocynthis* (grain), a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose (disques et puits), pour étudier la résistance ou la sensibilité des souches à partir d'une gamme de concentrations.

5.1. Préparation des extraits aqueux

Les extraits de plantes d'*Ammi visnaga* (cure dent, fruit et ombelle fraîches), *Pinus halpensis* (feuille et fruit) et *Citrullus colocynthis* (grain) ont été dissoutes dans l'eau distillée (EDS) stérile pour préparer des dilutions successives pour aboutir aux différentes concentrations étudiées (Tableau 11).

Tableau 11: Préparation des solutions des molécules antimicrobiennes

Vsm	V.D	C.F	V.T
30 µl	270 µl	10 mg/ml	300 µl
60 µl	240 µl	20 mg/ml	300 µl
120 µl	180 µl	40 mg/ml	300 µl
180 µl	120 µl	60 mg/ml	300 µl
240 µl	60 µl	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 phyto-extraits a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu gélosé « Mueller Hinton (MH)» utilisent les disques ou les puits, elle permet de déterminer l'activité inhibitrice des composés des extraits 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 : cinq souches isolées : Y, G', D', S et 24, et cinq souche de références : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* (Tableau12). Un disque de 6 mm de diamètre en papier Whatman stérile est imprégné de molécules bioactives été 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 un DO de de 0,6 pour chaque souche.

Un disque Imprégné avec l'EDS est appliqué dans les boites comme un témoin, trois répétitions sont réalisées pour chaque essai. Les boites 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.

Tableau12: 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) ; **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 (10 µl) avec une D.O comprise entre (0.6-1). Ensuite, les phyto-extraits sont ajoutés (90 µl) de la plus faible concentration a la concentration plus élevée selon l'extraits.

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 motionner 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.



Résultats et discussion

- **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 (13).

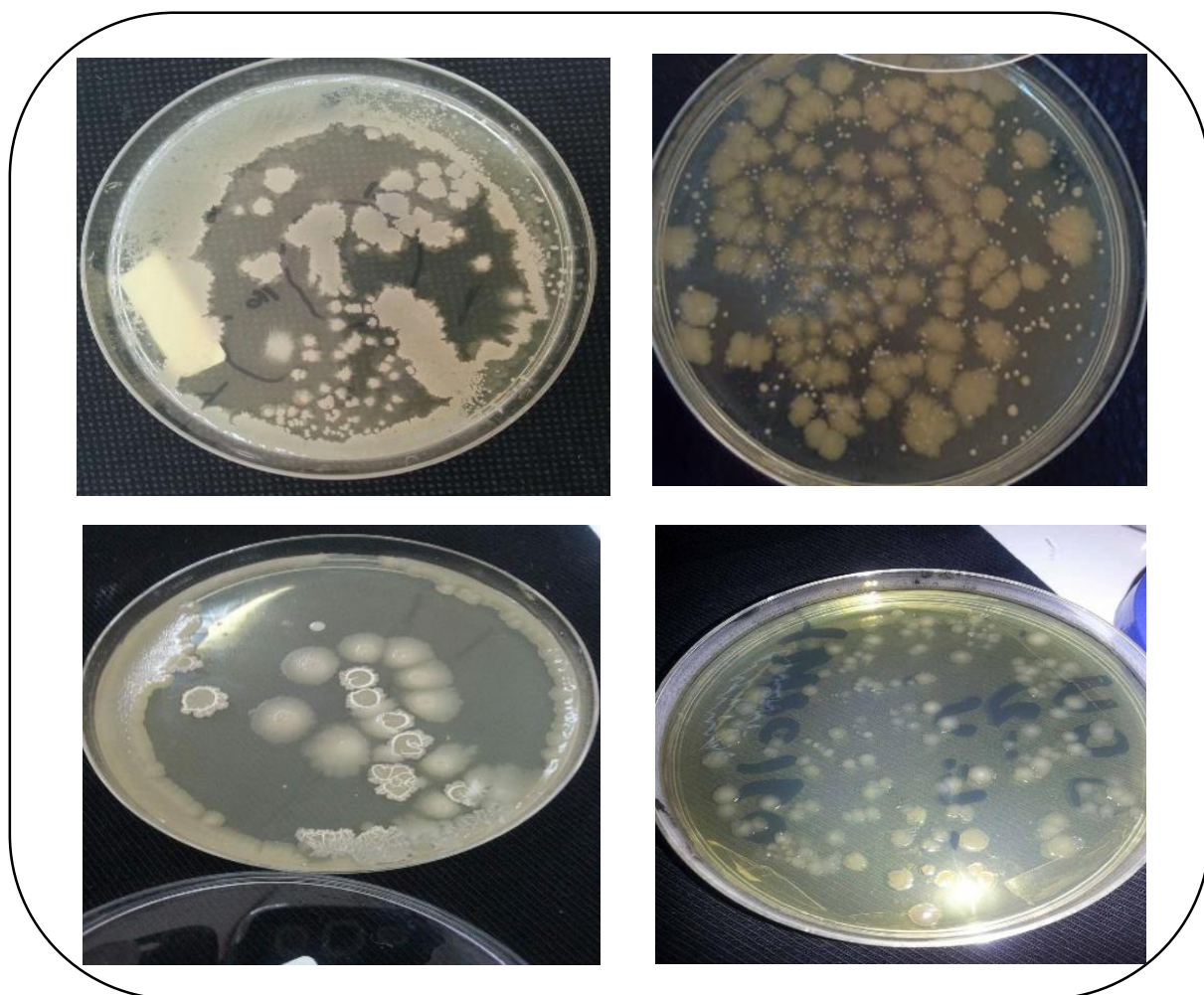


Figure 15 : Aspect morphologique des bacilles mésophiles et thermophiles obtenues sur gélose TSA.

Tableau 13 : 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 chaînettes (Figure 16), mobiles ou immobiles avec une endospore ovale centrale ou sub-terminale non déformante.

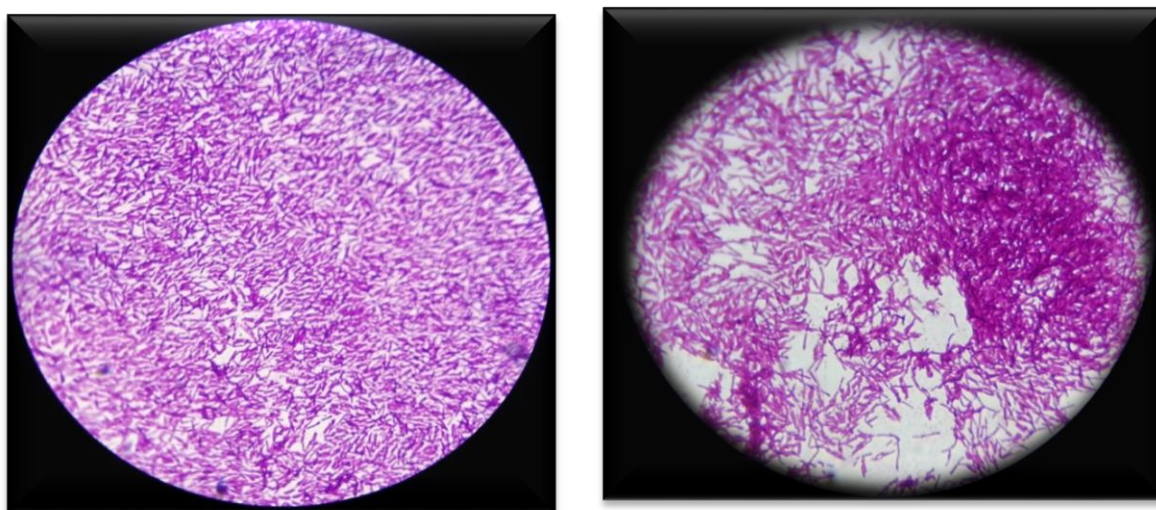


Figure 16 : Observation microscopique des bacilles thermophiles après la coloration de Gram (G x 100 a immersion).

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*.

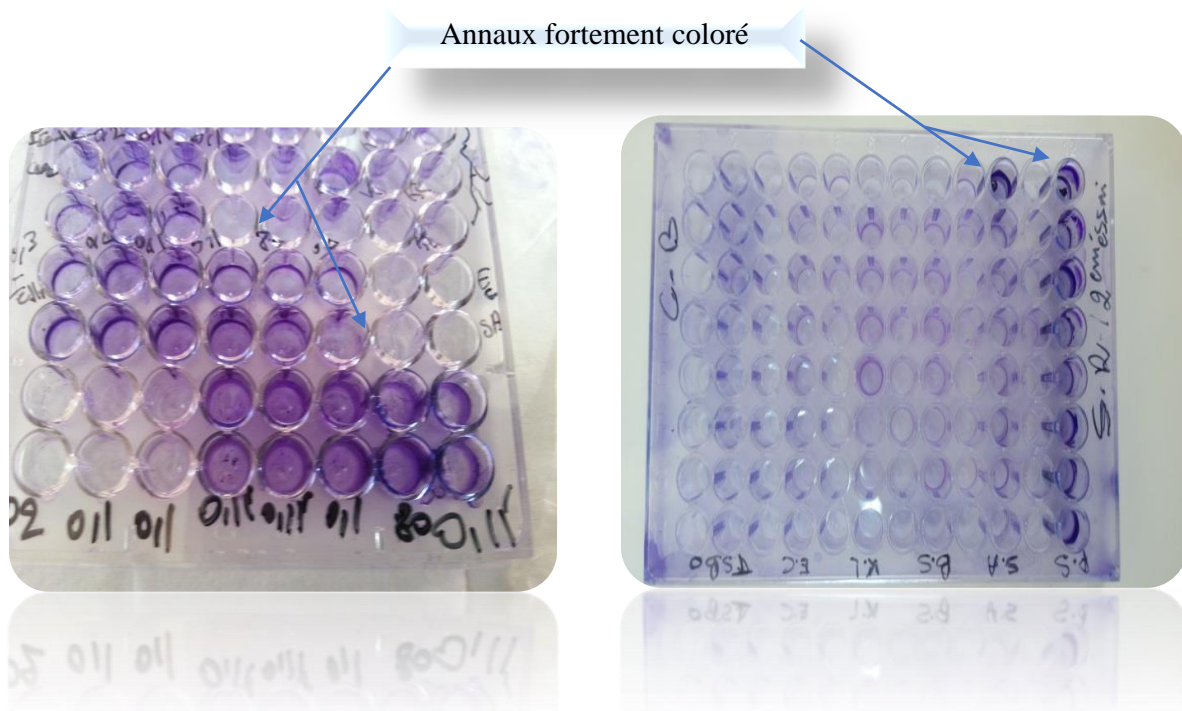


Figure 17 : Formation de biofilm dans les microplaques de titration.

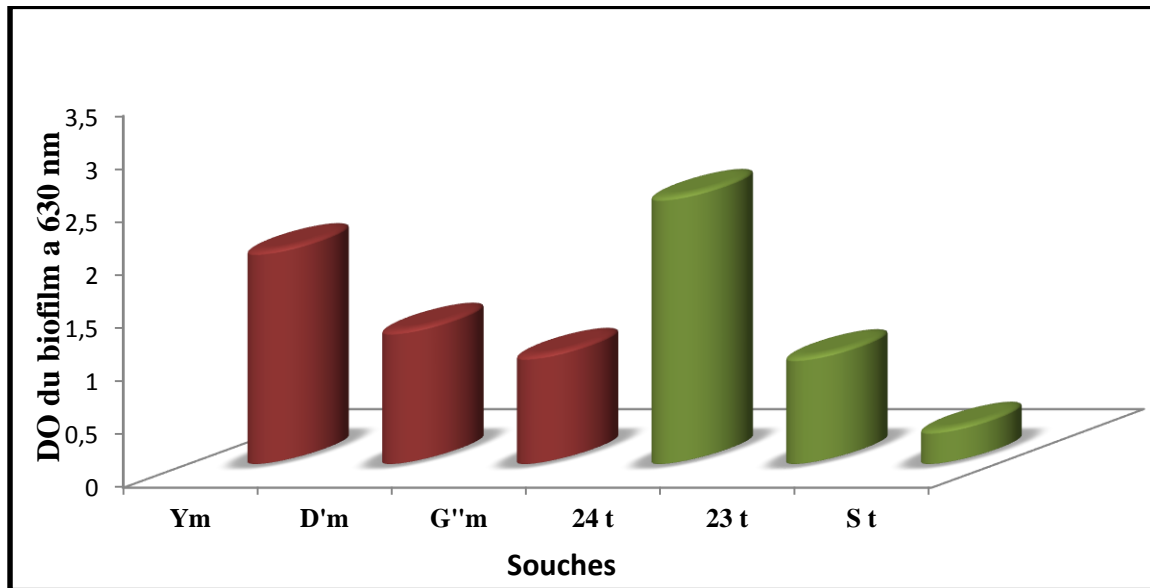
2.2. Lecture indirecte

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.

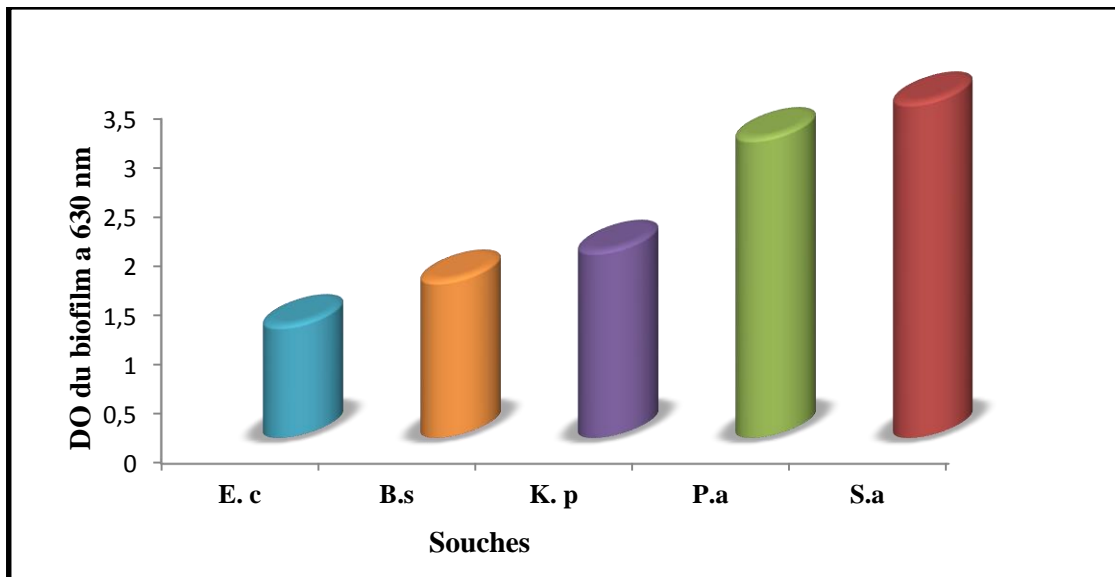
Les résultats obtenus par les souches (23) et (24) sont conformes aux données de la littérature. Selon Burgess et al., (2010), une formation importante de biofilm est obtenue aux températures élevées (40–65°C), ce qui n'est pas le cas de la souche (S). Cette différence peut être expliquée par l'effet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

2.2.1.2. 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. Détermination de l'activité antimicrobienne

3.1. Détermination des zones d'inhibition

Après avoir préparé les différentes concentrations, les extraits des plantes ont été examinés pour leur activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur milieu gélosé des disques ainsi la méthode des puis.

La diffusion sur milieu gélosé ou aromatoگرامme est une méthode inspirée de l'antibiogramme, elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'huile essentielle ou des extraits végétaux par mesure du diamètre d'inhibition, autour de disque imprégné de celle-ci (Sadou et al., 2015).

Après avoir incubé les boîtes de pétri pendant 24 h à 30 °C (les bacilles mésophiles), 37 °C (les souches de références) et 55°C (les bacilles thermophiles), la lecture s'effectue par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, qui se traduit par un halo translucide autour de chaque disque (Figure 20), la présence ou l'absence d'un halo expliquerait la sensibilité ou la résistance des germes vis-à-vis des extraits testés (tableau 16) :

- Souche résistante R: $\text{Ø} < 06\text{mm}$
- Souche intermédiaire I: $06\text{ mm} < \text{diamètre} < 13\text{ mm}$
- Souche sensible S: $\text{Ø} > 13\text{ mm}$ (Abi-Ayad et al., 2011)

L'évaluation de l'activité antibactérienne, des extraits d'*Ammi visnaga*, permet de déterminer l'efficacité ou non de celui-ci sur les dix souches testés : cinq souches des bacilles sporogènes aérobie et cinq souches de références.

Selon les résultats de l'aromatoگرامme présentés dans le tableau 14, les extraits testés ont exercé une activité antibactérienne seulement sur *E.coli* et pas sur les autres souches de références. Les zones d'inhibition varient avec l'augmentation de la concentration et l'origine d'extraits d'*Ammi visnaga* (cure dent, fruit, ombelle fraîches), la plus grande zone (16 mm) étant obtenue par l'extrait de fruit (Figure 20 :A). D'une manière générale, nous constatons une résistance totale remarquable pour tous les souches sporogènes aérobie mésophiles (D', G', Y) et thermophiles isolés (24 et S).

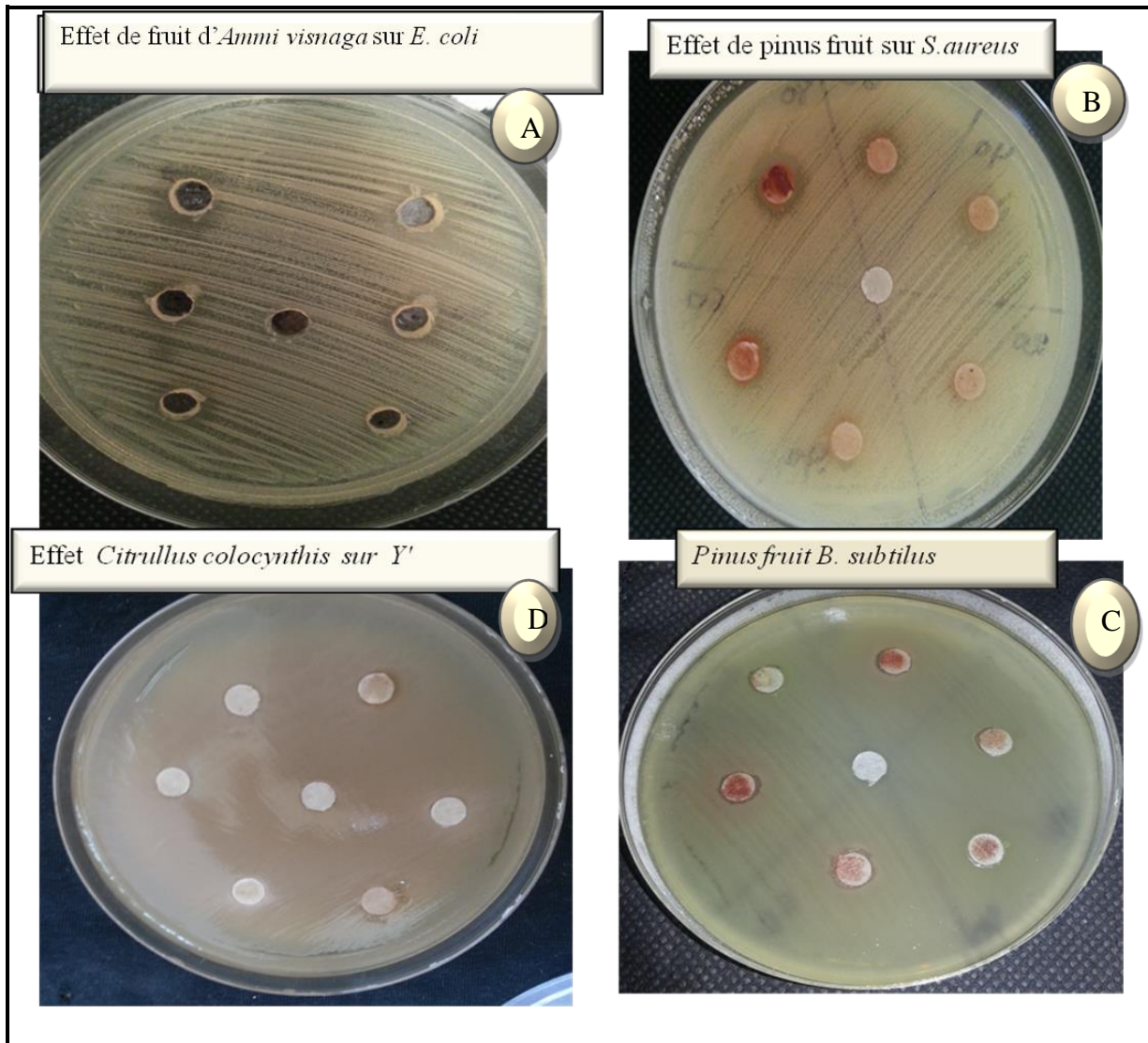


Figure 20: Evaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits par la technique de diffusion.

- (A) : L'effet de l'extrait aqueux de d'*Ammi visnaga* (fruit) sur la croissance de *E. coli* (S)
- (B) : L'effet de l'extrait aqueux de *Pinus halpensis* (fruit) sur la croissance de *S. aureus*(S)
- (C) : L'effet de l'extrait aqueux de la *Pinus halpensis* (fruit) sur la croissance de *B. subtilis*(I)
- (D) : L'effet de l'extrait aqueux de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de *Y'*(R)

Tableau 14: diamètres des zones d'inhibition de l'extrait de différentes parties d'*Ammi visnaga*.

Extrait	Fruit(F)				Cure dent(CD)				Ombelles fraiches(OF)			
	MDZI (mm)				MDZI (mm)				MDZI (mm)			
Souches	80	60	40	20	80	60	40	20	80	60	40	20
Concentration (mg/ml)												
Y	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
D'	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
G''	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>E. coli</i>	16	11	10	9	10	9	8	7,5	8	7	R	R
<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>K.pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>B. subtilus</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R : Résistante, MDZI : moyenne de diamètre de zones inhibition, CMI : concentration minimale inhibitrices

Selon les résultats de l'antibiogramme présentés dans le tableau 15, l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux du *Pinus halpensis* (fruit, feuilles) vis-à-vis des souches testées montre une augmentation relative de la zone d'inhibition avec la concentration de l'extrait déposé dans le disque de 6 mm ou du puits.

La plus grande zone d'inhibition est constatée chez *S. aureus* (Figure 20:B) à la concentration maximale 80mg /ml des extraits des : fruit et feuilles, avec des valeurs respectives de 13mm et 12,5mm. D'une manière générale, il est à noter une résistance remarquable pour tous les souches isolées de bacilles sporulés aérobies mésophiles et thermophiles, vis-à-vis des trois extraits.

Selon les mêmes résultats présentés dans le tableau 15, une résistance totale est observée à l'égard des extraits de *Citrullus colocynthis* et à différentes concentrations.

Tableau 15: les diamètres des zones d'inhibitions de l'extrait de différentes parties d'*Pinus halpensis* et de *Citrullus colocynthis* contre les microorganismes utilisés dans l'étude.

Souches	<i>Pinus halpensis</i>								<i>Citrullus colocynthis(CC)</i>			
	Feuille(Pf)				Fruit(PF)							
	MDZI (m)				MDZI (mm)				MDZI (mm)			
Concentration (mg/ml)	80	60	40	20	80	60	40	20	80	60	40	20
Y	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
D'	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
G''	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>E. coli</i>	10	8,5	R	R	11	9	8,5	8	R	R	R	R
<i>P. aeruginosa</i>	8	R	R	R	10	R	R	R	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	11	10	9	R	R	R	R	R
<i>S. aureus</i>	13	11	10	9	12,5	10,5	8	R	R	R	R	R
<i>B. subtilus</i>	R	R	R	R	8	7,5	R	R	R	R	R	R

R : Résistante, MDZI : moyen de diamètre de zones inhibition, CMI : concentration minimale inhibitrices

D'après les résultats obtenus et selon les diamètres des zones d'inhibition, les dix souches peuvent être classées comme le tableau 16 :

Tableau 16: Interprétation des diamètres des zones d'inhibition des dix souches testées.

Souches	Plantes	<i>Ammi visnaga</i>			<i>Pinus halpensis</i>		<i>Citrullus colocynthis</i>
	fruit	cure dent	ombelle fraiches	fruit	feuilles		
<i>E. coli</i>	S (16mm)	I	I	I	I	R	
<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	I	I	R	
<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	I	R	R	
<i>S. aureus</i>	R	R	R	I	S	R	
<i>B. subtilus</i>	R	R	R	I	R	R	
S	R	R	R	R	R	R	
D'	R	R	R	R	R	R	
G''	R	R	R	R	R	R	
24	R	R	R	R	R	R	
Y	R	R	R	R	R	R	

Resistant R: $\emptyset < 0.6$ cm; Intermediaries I: $1.3 \text{ cm} < \text{diameter} < 0.6$ cm; Sensible S: $\emptyset > 1.3$ cm.

D'après les résultats obtenus (tableau 16) seules 2 souches sont sensibles, *E. coli* qui a présenté une sensibilité à l'extrait d'*Ammi visnaga* (fruit) et intermédiaire aux autres composés de la plante aux extraits *Pinus halpensis*, ainsi que *S. aureus* qui a été sensible aux extraits des feuilles de *Pinus halpensis* et intermédiaire au extrait de fruit. Alors que *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* sont intermédiaires aux extraits de fruit de *Pinus halpensis* et *P. aeruginosa* est également intermédiaire aux extraits de feuille de *Pinus halpensis*. Toutes les autres souches présentent une résistance totale à tous les extraits testés.

3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Selon les résultats obtenus dans l'aromatogramme, en se basant sur l'intervalle des zones d'inhibitions, on a déduit une estimation de concentration minimale inhibitrice pour les dix souches comme le montre le tableau 17.

Tableau 17: Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Souches	<i>Ammi visnaga</i> (mg/ml)			<i>Pinus halpensis</i> (mg/ml)		<i>Citrullus colocynthis</i> (mg/ml)
	F	CD	OF	PF	Pf	
<i>E. coli</i>	20 \geq	20 \geq	40 \leq	20 \geq	40 \leq	80 \leq
<i>P. aeruginosa</i>	80 \leq	80 \leq	80 \leq	60 \leq	60 \leq	80 \leq
<i>K. pneumoniae</i>	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq
<i>S. aureus</i>	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	20 \geq	80 \leq
<i>B. subtilis</i>	80 \leq	80 \leq	80 \leq	40 \leq	80 \leq	80 \leq
S	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq
D'	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq
G''	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq
24	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq
Y	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq	80 \leq

Ammi visnaga : cure dent (CD), fruit (F), ombelle fraîches (OF), *Pinus halpensis* : fruit (PF), feuilles (Pf) et *Citrullus colocynthis* (CC)

➤ D'après les résultats obtenus on peut conclure que l'activité antimicrobienne des extraits est variable d'une souche à l'autre d'un part, et d'un extrait à l'autre d'autre part. Cette variabilité est due à la composition des plantes ainsi qu'aux souches testées.

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

Nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices de la formation du biofilms des extraits d'*Ammi visnaga* (cure dent, fruit, ombelles fraîches), de *Pinus halpensis* (fruit, feuilles) et de *Citrullus colocynthis* (grain). Les résultats obtenus (figure 21 à 25) ont permis de mettre en valeurs l'effet des extraits sur l'inhibition potentiel de la formation du biofilm des souches étudiées.

La figure 21 représente l'effet de différents extraits sur la formation de biofilm de la souche sporulée thermophile 24. On remarque que l'extrait de *Citrullus colocynthis* à 80 mg/ml et *Ammi visnaga* (fruit) à 100mg/ml inhibent fortement la formation du biofilm, comme le montrent les valeurs des DO respectives : 0,14 et 0,10, qui sont nettement inférieures à celles de *Pinus halpensis* (feuilles) à 300mg/ml (DO=0,32), d'*Ammi visnaga* :ombelle fraîches à 100mg/ml (DO=0,38) et cure dent à 200 mg/ml (DO=0,4).

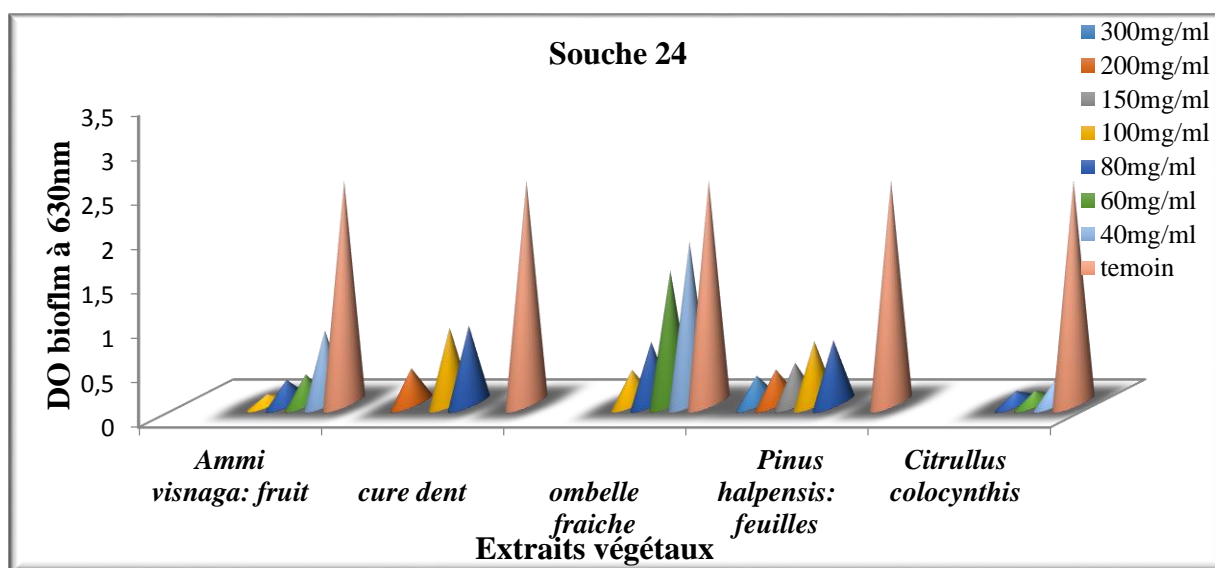


Figure 21: Effet des extraits des plantes d'*Ammi visnaga*, *Pinus halpensis* et *Citrullus colocynthis* sur la formation de biofilm de la souche 24.

D'après la figure 22, nous constatons, qu'avec l'augmentation de la concentration de l'extrait aqueux de différentes parties des plantes, une diminution relative de la formation du biofilm de la souche sporulée mésophile est enregistrée. L'effet inhibiteur le plus important est remarqué chez *Pinus halpensis* (feuilles) à une concentration maximale de 300mg/ml et une DO de 0,12, suivie par l'extrait d'*Ammi visnaga* (cure dent) à la même concentration avec une DO de 0,25, par ailleurs la plus faible inhibitrice est révélée chez l'extrait d'*Ammi visnaga* (fruit) avec une DO de 0,46 à 100mg/ml.

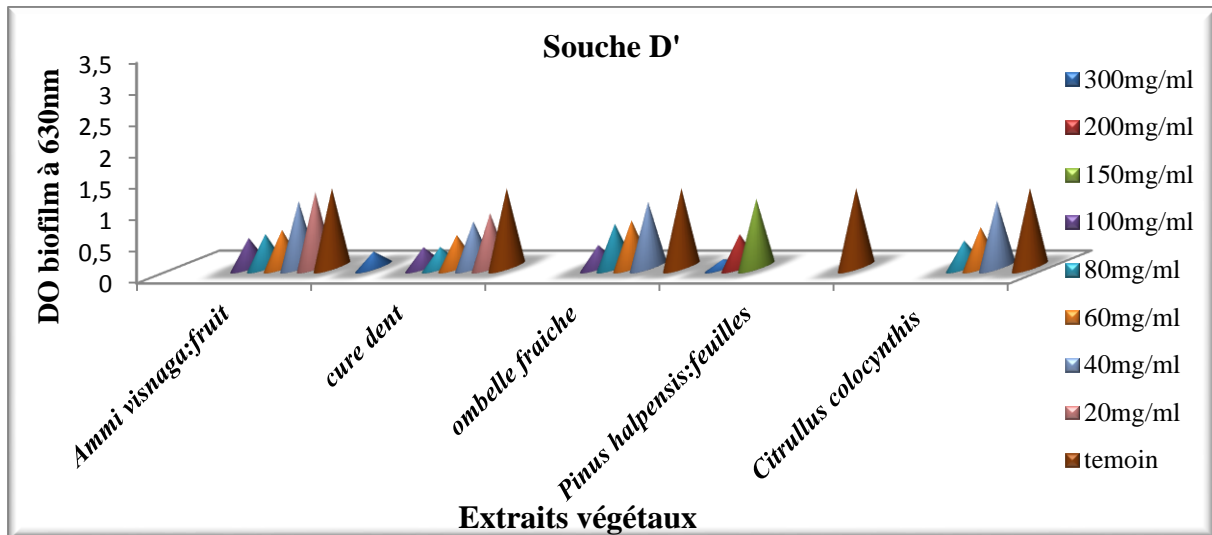


Figure 22: Effet des extrait des plantes d’*Ammi visnaga*, *Pinus halpensis* et *Citrullus colocynthis* sur la formation du biofilm de la souche D’.

Selon la figure 23, Nous observons une diminution proportionnelle de la formation de biofilm de la souche *K. pneumoniae* avec l’augmentation de la concentration de l’extrait aqueux de différentes parties des plantes. L’effet inhibiteur le plus important est remarqué chez l’extrait d’*Ammi visnaga* (ombelle fraîches) à la concentration maximale 100mg/ml avec une DO de 0,32, suivie par *Citrullus colocynthis* avec une DO de 0,4 à 80 mg/ml et la plus faible inhibition est constatée chez l’extrait *Ammi visnaga* (cure dent) à 80 mg/ml avec une DO de 1,11.

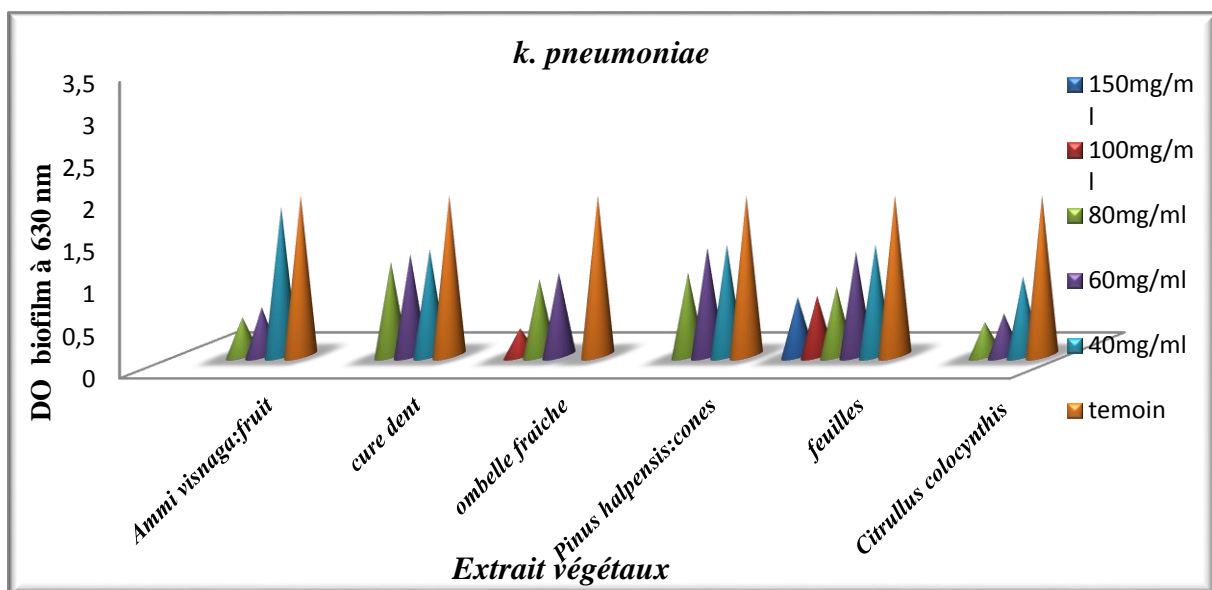


Figure 23: Effet des extrait des plantes d’*Ammi visnaga*, *Pinus halpensis* et *Citrullus colocynthis* sur la formation de biofilm du *K. pneumoniae*.

Selon la figure 24, on remarque une diminution proportionnelle de la formation de biofilm de la souche *S. aureus* avec l'augmentation de la concentration de l'extrait aqueux de différentes parties des plantes. L'effet inhibiteur le plus important est constaté chez *Pinus halpensis* (fruit) à la concentration maximale de 150 mg/ml avec une DO de 0,05, suivi par *Citrullus colocynthis* avec une DO (0,17) à la concentration maximale 80 mg/ml et par *Ammi visnaga* (cure dent) avec une DO de 0,24 à 200mg/ml. Par contre le plus faible effet d'inhibition est constaté chez *Ammi visnaga* (ombelle fraîches), *Pinus halpensis* (feuilles) et *Ammi visnaga* (fruit) avec une DO de 0,63, 0,90 et 1,67 respectivement.

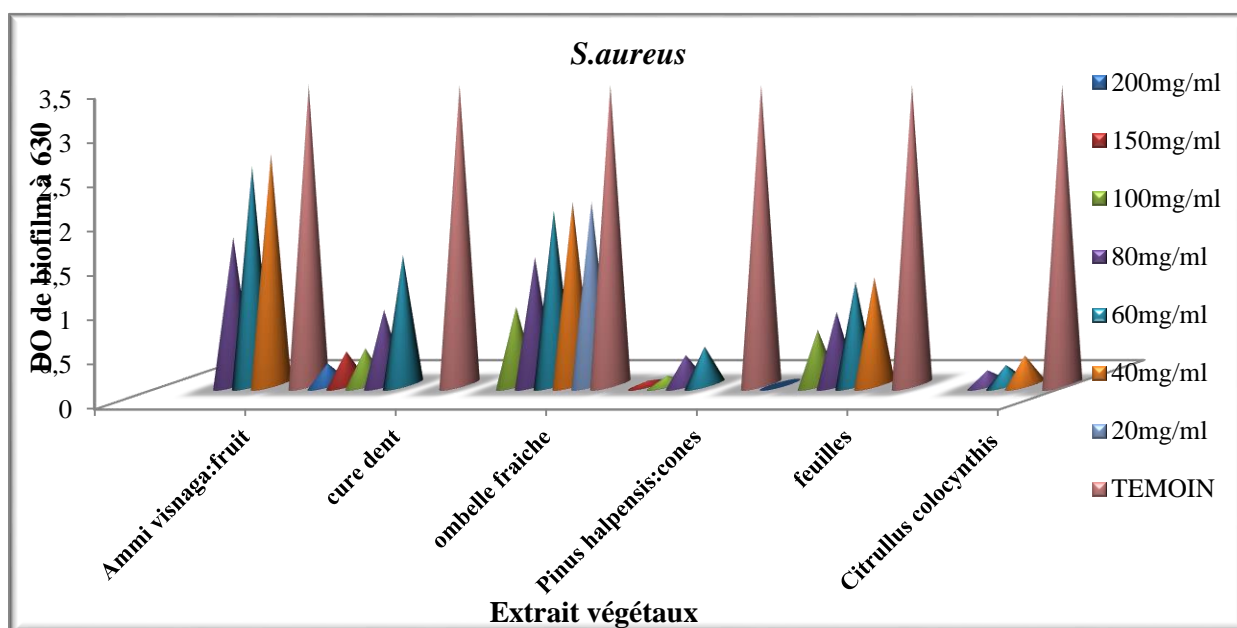


Figure 24: Détermination de CMIB des extraits des plantes d'*Ammi visnaga*, *Pinus halpensis* et *Citrullus colocynthis* sur la formation du biofilm de *S. aureus*.

Selon les résultats représentés dans la figure 25, on remarque que L'effet inhibiteur le plus important est celui de *Citrullus colocynthis* à la concentration maximale de 80 mg/ml avec une valeur de DO de 0,23 et la plus faible inhibition est constatée chez *Pinus halpensis* (feuilles) avec une valeur de DO de 0,6 à 200 mg/ml.

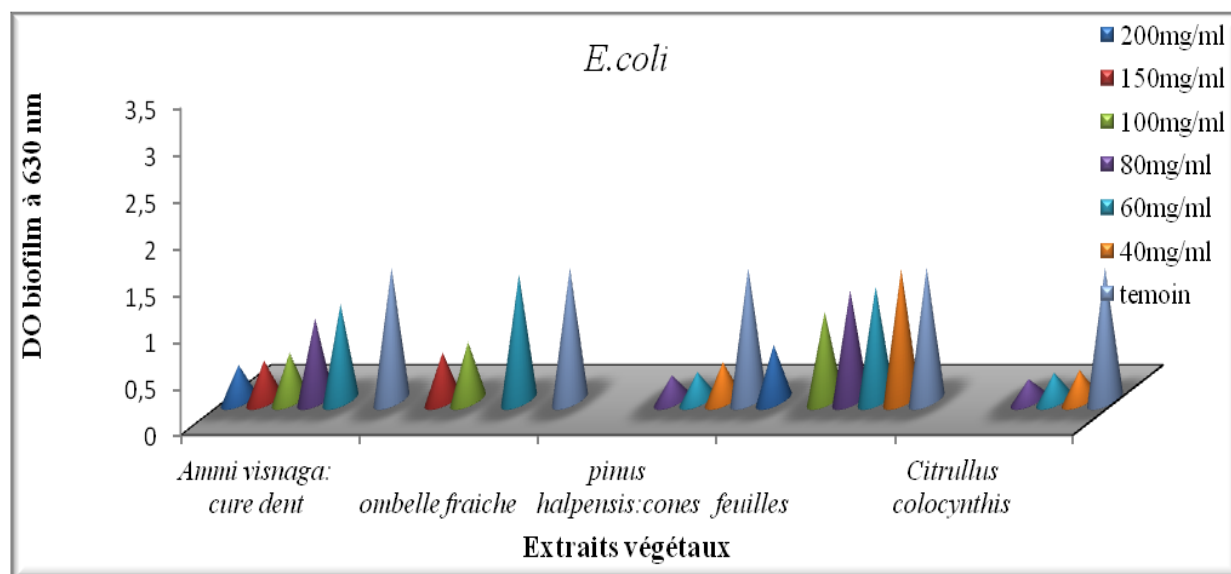


Figure 25: Effet des extraits des plantes d'*Ammi visnaga*, *Pinus halpensis* et *Citrullus colocynthis* sur la formation du biofilm d' *E. coli*.

Selon les résultats obtenus de la méthode de dilution en milieu liquide, on a déduit la concentration minimale inhibitrice de formation du biofilm (CMIB) pour les cinq souches comme le montre le tableau 18.

Tableau 18 : Estimation des concentrations minimales inhibitrices de formation du biofilm (CMIB)

Souches	<i>Ammi visnaga</i> (mg/ml)			<i>Pinus halpensis</i> (mg/ml)		<i>Citrullus colocynthis</i> (mg/ml)
	F	CD	OF	PF	Pf	
<i>E. coli</i>		200≤	150≤	80≤	200≤	80≤
<i>K. pneumoniae</i>	80≤	80≤	100≤	80≤	150≤	80≤
<i>S. aureus</i>	80≤	200≤	100≤	150≤	100≤	80≤
D'	100≤	300≤	100≤		300≤	80≤
24	100≤	200≤	100≤		300≤	80≤

Ammi visnaga : cure dent(CD), fruit (F), ombelle fraîches(OF), *Pinus halpensis* : fruit (PF), feuilles (Pf) et *Citrullus colocynthis*(CC)

Il est intéressant de remarquer les valeurs de CMIB les plus faibles (80≤ mg/ml) sont obtenus par les extraits de *Citrullus colocynthis* à l'égard de toutes les souches testées. Cette valeur de CMIB est également obtenue par les extraits d'*Ammi visnaga* (fruit) à l'égard de *S. aureus* et *K. pneumoniae* et l'extrait des cure dents d'*Ammi visnaga* à l'égard de *K. pneumoniae* ainsi ceux de *Pinus halpensis* (fruit) à l'égard de *K. pneumoniae* et *E. coli*.

➤ Discussion

Concernent l'effet des extraits de plantes testés à notre connaissance peu de travaux scientifiques sont publiés sur le pouvoir antimicrobien et antibiofilm des extraits aqueux de ces plantes : *Pinus halpensis*, *Ammi vinaga* et *Citrullus colocynthis*, la majorité des travaux concerne les huiles essentielles et leur effet antioxydant.

D'après les résultats obtenus par les tests réalisés avec les différents extraits et selon leurs efficacités vis-à-vis des microorganismes sélectionnés, on a constaté que les extraits montrent un effet inhibiteur plus important pour toutes les bactéries en utilisant la méthode de dilution en milieu liquide que celui obtenue dans l'aromatogramme. Cela pourrait être expliqué par le contact direct de la molécule active en solution avec les cellules bactériennes contrairement à la méthode des disques qui sont l'un des méthodes qui nécessite d'abord la diffusion de l'agent antimicrobien.

Il ressort de ces résultats que les bactéries Gram (+) : bacille mésophiles (D'), thermophiles (Y), et *Staphylococcus aureus* sont plus susceptibles aux extraits (beaucoup plus dans la méthode de dilution en milieu liquide) que les bactéries Gram (-). La résistance des bactéries Gram (-) a été attribuée à la présence d'une membrane externe, imperméable aux composés hydrophobes grâce à son revêtement lipopolysaccharide. L'absence de cette barrière, chez les bactéries Gram (+) permet le contact direct des constituants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, provoquant ainsi soit, une augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux, soit une déficience au niveau du système enzymatique (**Bouhekrit et al., 2016 ; Sadou et al., 2015**).

La comparaison de nos résultats avec la littérature montre une différence qualitative et quantitative qui peut être attribuée à des différences dans la composition chimique des extraits végétaux. En effet, les propriétés antibactériennes des huiles essentielles et des extraits végétaux de plusieurs plantes aromatiques et médicinales sont attribuées à leur composition chimique (**Sadou et al., 2015**).

Ces variabilités, permettent la distinction de différents chimiotypes, sont les résultats d'un processus adaptatif à des conditions écologiques particulières (régions géographiques, conditions climatiques, altitude), la période de collecte de la plante, les parties de la plante, l'état de la plante (fraîche ou sèche) et la méthode d'extraction de l'huile essentielle (**Fekih et al., 2014**), ce qui est reflète sur la composition de plantes. En 'effet, la variabilité de l'effet

inhibiteur entre les extraits des différentes parties de la même plante : d'*Ammi visnaga* (cure dent, fruit, ombelle fraîches) et *Pinus halpensis* (fruit, feuilles) , peut être expliqué par la variation de composition chimique et la teneur de certains polyphénols.

Les travaux de **Ghareeb et al., (2011)** sur l'activité antibactérienne et antifongique d'*A. visnaga* ont montré son efficacité contre *K. pneumoniae* et *E. coli* et d'autres souches ainsi que sur des espèces fongiques. Ces résultats sont comparables à ceux que nous avons obtenus concernant l'effet inhibiteur sur le biofilm, mais ne le sont pas dans le cas des résultats d'aromatogramme ou seulement *E. coli* montre une sensibilité à ces extraits.

En outre, d'après Jaradat *et al.* (2015), les extraits de plantes d'*Ammi visnaga* (L) obtenus en utilisant des solvants organiques ont une forte activité antimicrobienne que l'extrait aqueux et que les variations parmi les espèces étaient évidentes.

Les résultats obtenus dans ce travail sur l'effet inhibiteur du biofilm ainsi que pour l'activité antimicrobienne sont en accord avec ceux d'**Abi Ayad et al. (2011)** et **Sadou et al., 2015** , qui ont observé une sensibilité plus importante chez *S. aureus* que chez *E. coli* et *P. aeruginosa* vis-à-vis des huiles essentielles de *Pinus halepensis* Mill.

Concernant l'effet inhibiteur de la coloquinte, les résultats de **Shawkey et al., (2014)**, ont montré que l'extrait éthanolique des grains *C. colocynthis* ont un effet antimicrobienne favorable sur les souches testées. De ce fait nos résultats obtenus de l'effet inhibiteur sur le biofilm sont comparables avec ces résultats et on constate une différence liée à la richesse de cette plante en composés phénoliques et d'une autre part ces résultats sont incompatibles avec les résultats de l'aromatogramme, ceci est probablement dû à la faible concentration utilisées ainsi qu'au facteur de diffusion indirect d'extrait dans le milieu.

D'après **Bnyan et al., (2013)** , l'extrait aqueux de *C. colocynthis* n'a aucun effet inhibiteur comparé à l'extrait éthanolique , ce qui confirme les résultats de l'aromatogramme. Ceci est peut-être dû à la faible solubilisation de l'extrait dans l'eau distillée à un problème de diffusion en milieu aqueux, mais aussi à la nature des composés des extraits aqueux ainsi qu'à leur mécanisme d'action.

En effet, il est à noter que tous les extraits testés quelle que soit la plante ont un effet inhibiteur sur la formation de biofilm alors qu'ils sont inactifs sur la croissance planctonique.

➤ Conclusion

Ce travail a porté sur deux aspects : l'un est l'isolement des souches de bacilles thermophiles et mésophiles à partir du lait pasteurisé reconstitué et lait de vache local ainsi que la caractérisation phénotypique des souches isolées et la détermination de leur potentiel de formation des biofilms. L'autre point est la détermination du pouvoir antimicrobien et l'activité antibiofilm des phyto-extraits sur les souches isolées et les souches de références.

À la lumière des résultats obtenus, il apparaît clairement que les extraits aqueux des plantes médicinales d'*Ammi visnaga* (cure dent, fruit et ombelle fraîches), *Pinus halpensis* (fruit et feuilles) et *Citrullus colocynthis* réputées pour leurs activités biologiques intéressantes, possèdent une activité un pouvoir antibiofilm contre les microorganismes testés par la méthode des dilutions.

Les travaux effectués sur l'inhibition de la croissance microbienne décrivent, que cette dernière dépend de deux facteurs primordiaux, l'espèce bactérienne testée et la variété des extraits testés. Concernant l'effet souche, les résultats obtenus ont montré que les bactéries cibles, peuvent être classées dans l'ordre croissant de résistance comme suit : *S.aureus*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et en dernier les bacilles sporules mésophiles et thermophiles isolées qui affichent ainsi la plus grande résistance. D'autre part, cette inhibition est en relation étroite avec la variété des extraits testés, les plus actifs sont ceux obtenus de l'espèce *Pinus halpensis* (fruit, feuilles) et d'*Ammi visnaga* (fruit) sur la croissance planctonique. La mise en évidence de l'activité antibiofilm montre une efficacité remarquable sur la croissance du biofilm par tous les extraits testés comparés à la croissance planctonique. Selon leurs efficacités vis-à-vis des microorganismes testés, on peut les classer par ordre décroissant : *Citrullus colocynthis*, *Pinus halpensis* (fruit), *Ammi visnaga* (ombelle fraîches) et *Pinus halpensis* (feuilles), *Ammi visnaga* (cure dent), d'*Ammi visnaga* (fruit).

Enfin, et comme perspectives, nous souhaitons que cette investigation sera approfondie par d'autres études portant sur :

- La recherche d'autres substances antimicrobiennes, extraites des plantes
- Confirmer les résultats concernant l'importance l'effet inhibiteur de ces extraits végétaux sur la formation de biofilm
- l'exploitation des extraits de d'autres plantes médicinales en choisissant d'autres méthodes d'extraction et d'autres parties de plantes ainsi d'autres dissolvant (extrait organique et éthanolique).

Références bibliographiques

➤ A

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. **Abdellah, K. E. M. A. S. S. I., Sabrine, D. A. R. E. M., Rokaia, C. H. E. R. I. F., Zakaria, B. O. U. A. L., Eddine, S. S., Salah, A. M., ... & Didi, O. E. M. (2014)**. Recherche et identification de quelques plantes médicinales à caractère hypoglycémiant de la pharmacopée traditionnelle des communautés de la vallée du M'Zab (Sahara septentrional Est Algérien). *Journal of Advanced Research in Science and Technology*, 1(1), 1-5.
3. **Abi-Ayad, M., Abi-Ayad, F. Z., Lazzouni, H. A., Rebiahi, S. A., & Ziani_Cherif, C. (2011)**. Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 5433-5436.
4. **Abi-Ayad, M., Abi-Ayad, F. Z., Lazzouni, H. A., & Rebiahi, S. A. (2011)**. Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). *J Nat Prod Plant Resour*, 1(1), 33-36.
5. **Akbas, M. Y. (2015)**. Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. PP 383-394.
6. **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.
7. **Al-Snafi, A. E. (2013)**. Chemical constituents and pharmacological activities of Ammi majus and Ammi visnaga. A review. *International Journal of Pharmacy and Industrial Research*, 3(3), 257-265.
8. **Al-Snafi, A. E. (2016)**. Chemical constituents and pharmacological effects of *Citrullus colocynthis*-A review. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 6(3), 57-67.
9. **Amamou, F., Bouafia, M., Chabane-Sari, D., Meziane, R. K., & Nani, A. (2011)**. *Citrullus colocynthis*: a desert plant native in Algeria, effects of fixed oil on blood homeostasis in Wistar rat. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 1, 1-7.
10. **Amira, B., & Doha, B. (2015)**. Chemical composition of Ammi visnaga L. and new cytotoxic activity of its constituents khellin and visnagin. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(6), 285-291.

11. **Arivoli, S., Raveen, R., & Tennyson, S. (2016).** Larvicidal activity of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (Cucurbitaceae) isolated fractions against *Aedes aegypti* (L.), *Anopheles stephensi* Liston and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Indian Journal of Applied Research*, 5(8).
12. **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.
13. **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.
14. **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.
15. **Azizi, S., Mohamad, R., & Mahdavi Shahri, M. (2017).** Green Microwave-Assisted Combustion Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles with *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad: Characterization and Biomedical Applications. *Molecules*, 22(2), 301.
16. **AZZI, R. (2013).** Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien: enquête ethnopharmacologique; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar (Doctoral dissertation).
- **B**
17. **Belkacem, I., Rebai, O., Djibaoui, R.(2016).**Antimicrobial and antioxidant activity of *Ammi visnaga* (L) phenolic extracts and their effects on planktonic and biofilm growth of food spoilage *Bacillus cereus*,9(4),32-47.
18. **Bernard, (2009).** influence d'un traitement a ultrason sur la thermorésistance de spores de bacille sp .isolées de poudre de lait 2014.université aboubekr belkaid tlemcen.
19. **Berroukche, A., Amara, S., Halimi, S., & Benyamina, F. (2014).** Evaluation of the Leave and Bud Decoctions *Pinus Halepensis* Mill Effects on the Induced-Phenol Renal Toxicity in Wistar Rats. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 6(2), 197-207.
20. **Bishr, M. M., Desoukey, S. Y., & Magdy, M .(2014).** The effect of soil on *Ammi visnaga* (L) Lam. plant grown in several localities of Egypt and Sudan.
21. **Bnyan, I., Hasan, H., & Ewadh, M. (2013).** Antibacterial Activity of *Citrullus Colocynthis* against different types of bacteria. *Advances in Life Science andTechnology*,

- 7, 48-51.
22. **Bock B., (2011).** Base de données nomenclaturale de la flore de France, version 4.02. *Tela Botanica, Montpellier (France)*.
23. **Bodas, R., López, S., Fernandez, M., García-González, R., Rodríguez, A. B., Wallace, R. J., & González, J. S. (2008).** In vitro screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology, 145(1)*, 245-258.
24. **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.
25. **Boucekrit, M., Laouer, H., Hajji, M., Nasri, M., Haroutounian, S. A., & Akkal, S. (2016).** Essential oils from *Elaeoselinum asclepium*: Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 6(10)*, 851-857.
26. **Bouzenna, H., Samout, N., Amani, E., Mbarki, S., Tlili, Z., Rjeibi, I., ... & Hfaiedh, N. (2016).** Protective Effects of *Pinus halepensis* L. Essential Oil on Aspirin-induced Acute Liver and Kidney Damage in Female Wistar Albino Rats. *Journal of Oleo Science, 65(8)*, 701-712.
27. **Brahmi F, Chahbar N, Kebbouche G. S.(2016).** Insecticidal effect of *Ammi visnaga* L. (Apiaceae:Apial) methanolic extract against a citrus pest,*Toxoptera aurantii* (Aphididae: Homoptera) under controlled conditions.PP 230-235.
28. **Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007).** Quelque système microbien : les biofilms. Dans : *Microbiochimie et alimentation*. Educagri éditions, Dijon. p.131-164.
29. **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.
30. **Burgess,S.,Lindsay,D.,Flint,S,H.,2010.** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology 144:215-225*.
31. **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.
32. **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

- 33. 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.
- C
- 34. Chambel, M. R., Climent, J., Pichot, C., & Ducci, F. (2013).** Mediterranean pines (*Pinus halepensis* Mill. and *brutia* Ten.). In *Forest tree breeding in Europe* (pp. 229-265). Springer Netherlands.
- 35. Cheikh-Rouhou, S., Hentati, B., Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H. (2006).** Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos*, 12(5), 407-415.
- 36. Cheurfa, M. (2016).** *Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé* (Doctoral dissertation, Rachida Allem).
- 37. 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.
- 38. Costerton J.W. (1999).** Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11:217-721.
- 39. 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.
- D
- 40. Daglia, M. (2012).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
- 41. David J. Studholme.(2014).** Some (bacilli) like it hot: genomics of *Geobacillus* species. *Microbial Biotechnology*, 8, 40–48.
- 42. de Hoon, M.J.L., Eichenberger, P., Vitkup, D., (2010).** Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology* 20, R735-R745.
- 43. Dirar, A. I., Mohamed, M. A., Osman, W. J., Abdalgadir, H., & Khalid, H. S. (2014).** A Phytopharmacological review on four antitumor medicinal plants grown in sudan. *Am. J. PharmTech Res*, 4(5), 28-41.
- 44. D. J. Kent, K. Chauhan, K. J. Boor, M. Wiedmann, and N. H. Martin1 (2016).** Spore test parameters matter: Mesophilic and thermophilic spore counts detected in raw milk and dairy powders differ significantly by test method.

- 45. Djerrad, Z., Kadik, L., & Djouahri, A. (2015).** Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products*, 74, 440-449.
- 46. Djordjevic D., Wiedmann M. and Mclandsborough L.A. (2002).** Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied And Environnemental Microbiology* ,68(6),2950– 2958
- 47. Donlan, R. M. (2002).** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8(9).
- 48. 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.
- 49. Dufour, T., & Svoboda, J. M. (2005).** Pathogénie bactérienne des parodontolyses. *EMC-Odontologie*, 1(1), 46-57.
- **E**
- 50. Ebid, A. I. (2015).** Anti-bacterial Activity of Folk Medicinal Plant Extracts of Saudi Arabia on Isolated Bacteria. *Journal of Applied Life Sciences International*, 3, 49-54.
- **F**
- 51. Fady, B., Semerci, H., & Vendramin, G. G. (2003).** *EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Aleppo pine (Pinus halepensis) and Brutia pine (Pinus brutia)*. Bioversity International.
- 52. 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.
- 53. FARJON, A. (1996).** Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and palaeo-endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 121(4), 365-384.
- 54. Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., El Amine, M., ... & Costa, J. (2014).** Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2), 97-103.
- 55. Fekih , S., Fessi , D., Nasr , H.(2010).**Potentiels Anti-Oxydant Et Antitumoral D'extrait De Graines De Pind'alep (*Pinus Halepensis* Mill) .PP23

- 56. Filloux, A., & Vallet, I. (2003).** Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *médecine/sciences*, 19(1), 77-83.
- 57. Flemming, H. C. (1991).** Introduction: biofilms as a particular form of microbial Life. In *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems* (pp. 1-6). Springer Berlin Heidelberg.
- 58. 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.
- 59. 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.
- 60. François C .(2012).**la symphonie des arbres.PAGE 03
➤ **G**
- 61. García-Jiménez, R., Palmero-Iniesta, M., & Espelta, J. M. (2017).** Contrasting Effects of Fire Severity on the Regeneration of *Pinus halepensis* Mill. and Resprouter Species in Recently Thinned Thickets. *Forests*, 8(3), 55.
- 62. Gattefossé, J. (1952).** L'Ammi visnaga et la Khelline. *Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale*, 32(353), 116-123.
- 63. Ghareeb, A. M., Zedan, T. H., & Gharb, L. A. (2011).** Antibacterial and antifungal activities of Ammi visnaga extracts against pathogenic microorganisms. *Iraqi J Sci*, 52(1), 30-6.
- 64. Ghoneim, K., Mohammad, A. A., Al-Daly, A. G., Amer, M. S., Khadrawy, F., & Mahmoud, M. A. (2014).** Metabolic responsiveness of desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae) to the khella plant *Ammi visnaga* L. (Apiaceae) extracts. *Int. J. Adv. Life Sci*, 7(2), 204-216.
- 65. Ghourri, M., Zidane, L., & Douira, A. (2013).** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase rénale dans la province de Tan-Tan (Maroc saharien). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(4), 1688-1700.
- 66. Goetz, C., Dufour, S., Archambault, M., Malouin, F., & Jacques, M.(2016).** Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intramammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique. PP 215-229.

67. Gurudeeban, S., Satyavani, K., & Ramanathan, T. (2010). Bitter Apple (*Citrullus colocynthis*): An Overview of Chemical Composition and Biomedical Potentials. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9(7), 394-401.

➤ **H**

68. Hamrouni, L., Hanana, M., Amri, I., Romane, A. E., Gargouri, S., & Jamoussi, B. (2015). Allelopathic effects of essential oils of *Pinus halepensis* Miller: chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 48(2), 145-158.

69. Hashim, S., Jan, A., Marwat, K. B., & Khan, M. A. (2014). Phytochemistry and medicinal properties of *Ammi visnaga* (Apiaceae). *Pakistan Journal of Botany*, 46(3), 861-867.

70. Hilbert, D.W., Piggot, P.J., 2004. Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 234-262.

71. Hitchins, A. D. (1976). Patterns of spore locations in pairs of *Bacillus cereus* sporangia. *Journal of bacteriology*, 125(1), 366-368.

72. Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., & Gohar, M. (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*, 156(4), 1009-1018.

73. Hussain, A. I., Rathore, H. A., Sattar, M. Z., Chatha, S. A., Sarker, S. D., & Gilani, A. H. (2014). *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (bitter apple fruit): A review of its phytochemistry, pharmacology, traditional uses and nutritional potential. *Journal of ethnopharmacology*, 155(1), 54-66.

➤ **I**

74. Idan, S. A., Al-Marzoqi, A. H., & Hameed, I. H. (2015). Spectral analysis and antibacterial activity of methanolic fruit extract of *Citrullus colocynthis* using gas chromatography-mass spectrometry. *African Journal of Biotechnology*, 14(46), 3131-3158.

➤ **J**

75. Jaradat, N.A., Abualhasan, M., Al-Masri, M., Speih, R. I., Johari, M.A., Awad, M. A., (2015). Phytochemical Screening and In-vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Entire Khella Plant (*Ammi visnaga* L.). A member of Palestinian Flora. PP 137-143

76. **Jeun, J. M., Annie. F., Chrystian. J. L. (2005).** les composés phénoliques des végétaux, p203- 204.
77. **Jeeb, S. A., Mohammed, M. S., Fathelrahman, A. E., & Wadah, J. (2016).** Bioactivity-guided isolation of two sesquiterpenes with potential anti-fungal activity from *Citrullus colocynthis* L.(Schard). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(6), 422-425.
78. **Jouenne T.; Vilain S., Cosette P., Junter G-A. (2004).** Proteomics of biofilm bacteria. *Curr.Proteomics* 1, 211-219.
- **k**
79. **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.. Hada ps sur
80. **Keddad, A., Baaliouamer, A., & Hazzit, M. (2016).** Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from Umbels of Algerian Ammi visnaga (L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(5), 1243-1250.
81. **Kenner, D., & Requena, Y. (2001).** *Botanical medicine: a European professional perspective*. Paradigm Publications.
82. **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.
83. **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.
84. **Khalfallah, A., Labed, A., Semra, Z., Alkaki, B., Kabouche, A., Touzani, R., & Kabouche, Z. (2011).** Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of Ammi visnaga L.(Apiaceae) from Constantine, Algeria. *Intenational Journal of Medicine and Aromatic Plant*, 1(3), 302-305.
85. **KHATTAK, M. I., HAMEED, R. J. M., & ARFAT, Y. (2015).** A study of some heavy metals found in medicinal plants (*Euphorbia cornigera*, *Rhazya stricta* and *Citrullus colocynthis*) in Turbat region of Balochistan with reference to prevention of environmental pollution. *Pak. J. Bot*, 47(4), 1511-1516
86. **Kuisiene, N., Raugalas, J., & Chitavichius, D. (2004).** *Geobacillus lituanicus* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(6), 1991-1995.

87. Kumar, J., & Agrawal, V. (2015). Study of some economically important under-utilized crops for cultivation on wastelands and biotechnology approaches for propagation and gene cloning. *Int. J. Res. Biosci*, 4(1), 9-24.

➤ **I**

88. 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.

89. 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.

➤ **M**

90. Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.

91. 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.

92. 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.

93. 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.

94. Mauri, A., Di Leo, M., de Rigo, D., & Caudullo, G. (2016). *Pinus halepensis* and *Pinus brutia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In *European Atlas of Forest Tree Species* (p. e0166b8+). Publ. Off. EU Luxembourg. 122-123

95. Maurice N (1997). L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle. Ed. Lavoisier, Paris, p. 12-14.

96. MEDDOUR, R., MELLAL, H., MEDDOUR-SAHAR, O., & DERRIDJ, A. (2010). La flore médicinale et ses usages actuels en Kabylie (wilaya de Tizi Ouzou, Algérie): quelques résultats d'une étude ethnobotanique. *Rev. Régions Arides*. pp :181-201

- 97. Meepagala, K. M., Estep, A. S., & Becnel, J. J. (2016).** Mosquitocidal Activity of Extracts from Ammi visnaga (Apiaceae) Seeds. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 5(04), 170.
- 98. Merabti, B., Lebouz, I., Adamou, A. E., & Ouakid, M. L. (2015).** Effet toxique de l'extrait aqueux des fruits de Citrullus colocynthis (L.) Schrad sur les larves des Culicidae. *Jour*, 5(2), 120-130.
- 99. 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.
- 100. 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)).
- 101. 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).
- 102. Moir, A., (2006).** How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology* 101, 526-530.
- 103. 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.
- N
- 104. Nahal, I. (1962).** Le Pin d'Alep (Fines halepensis Mill.). Étude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole.
- 105. Nahal Boudouba, N., Kadi, H., Meddah, B., & Moussaoui, A. (2016).** The Investigation of the phytochemical compounds and the antibacterial effect of Algerian – *Citrullus colocynthis* Schard 6(6)36-40.
- 106. Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., ... & Ivanov, M. V. (2001).** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of Geobacillus subterraneus gen. nov., sp. nov. and Geobacillus uzenensis sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenuatus, Bacillus thermoleovorans, Bacillus kaustophilus, Bacillus thermodenitrificans to Geobacillus as the new combinations G. stearothermophilus, G. th. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 433-446.

107. **Nessa, F., & Khan, S. A. (2014).** Evaluation of antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of different solvent extracts of leaves of *Citrullus colocynthis*. *Pharmacognosy research*, 6(3), 218.
108. **Nicholson, W.L.,(2002).** Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell. Mol. Life Sci.*59, 410-416.
- **O**
109. **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.
110. **Otto, M. (2013).** Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*, 64, 175-188.
- **P**
111. **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.
112. **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.
113. **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.
114. **Pavela, R., Vrchotová, N., & Tríska, J. (2016).** Larvicidal activity of extracts from *Ammi visnaga* Linn.(Apiaceae) seeds against *Culex quinquefasciatus* Say.(Diptera: Culicidae). *Experimental parasitology*, 165, 51-57.
115. **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.
116. **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.

➤ **R**

117. RHATTAS, M., DOUIRA, A., & ZIDANE, L. (2016). Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif occidental du Maroc). *Journal of Applied Biosciences*, 97, 9187-9211.
118. 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.
119. ROUX, A., & GHIGO, J. M. (2006). Les biofilms bactériens 261-268.
- S
120. Sadou, N., Seridi, R., Djahoudi, A., & Hadeif, Y. (2015). Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 30(1), 33-39.
121. 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.
122. Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* 4, 219.
123. Sen Gupta, A., & Chakrabarty, M. M. (1964). The component fatty acids of *Citrullus colocynthis* seed fat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15(2), 74-77.
124. Setlow, P. (2014). Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *Journal of bacteriology*, 196(7), 12976-1305 .
125. 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 à tanins du Burkina Faso. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 15, 41-49.
126. Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514-525.
127. 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.

- 128. Shawkey, A. M., Rabeh, M. A., & Abdellatif, A. O. (2014).** Biofunctional molecules from *Citrullus colocynthis*: An HPLC/MS analysis in correlation to antimicrobial and anticancer activities. Vol. 17 pp51-1
- 129. Shawky, A. M., Abdulaal, A. K., Rabeh, M. A., & Abdellatif, A. O. (2014).** Enhanced biocidal activities of *Citrullus colocynthis* aqueous extracts by green nanotechnology. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 7(2), 1-10.
- 130. Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2013).** Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572-585.
- 131. Stickler DJ (2008)** Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters *Nat Clin Pract Urol* doi:10.1038/ncpuro1231 .
- 132. Sutherland, I. W. (2001).** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3-9.
- **T**
- 133. Taïbi, K., del Campo, A. D., Aguado, A., & Mulet, J. M. (2015).** The effect of genotype by environment interaction, phenotypic plasticity and adaptation on *Pinus halepensis* reforestation establishment under expected climate drifts. *Ecological Engineering*, 84, 218-228.
- 134. 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.
- **U**
- 135. 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.
- 136. Ullah, R., Hussain, I., Khader, J. A., AbdeIslam, N. M., & Samreen, T. (2012).** Investigation of fatty acid composition of *Ammi visnaga* seed oil by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(47), 3265-3267
- 137. Uma, C., & Sekar, K. G. (2014).** Phytochemical analysis of a folklore medicinal plant *Citrullus colocynthis* L (bitter apple). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(6).

➤ **V**

138. Vandal, J., Léo, G., Garry Ferroni, G., & Abou-Zaid, M. (2015). Activité antimicrobienne de produits naturels originaires du Nord de l'Ontario.

139. Vogel A., (2013). Encyclopédie des plantes. L'univers des plantes médicinales; Act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. *Cancer Lett.* 2000, 153 (1- 2): 1-5.

➤ **W**

140. 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.

➤ **X**

141. Xu, K. D., McFeters, G. A., & Stewart, P. S. (2000). Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology*, 146(3), 547-549.

➤ **Z**

142. Zhao, X. Y. (2014). A study of the effects of temperature cycling on thermophilic biofilms (Doctoral dissertation, Auckland University of Technology).

143. <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 dipostassique	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 bipostassique	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