



UNIVERSITE MOULOUD MAMMERRI DE TIZI-OUZOU  
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

Option : MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

# **MÉMOIRE DE FIN D'ETUDE**

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques

## **Thème**

**Étude de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux des écorces de *Juglans regia. L***

Réalisé par :

**FARAH Zahra  
SAIM Souhila  
TALBI Zohra**

Membres de jury :

**Mr. HOUALI Karim  
Mr. SEBBANE Hillal  
Mme. IRATNI Ghenima**

**Professeur  
M.C.B  
M.C.B**

**Président  
Promoteur  
Examinatrice**

Promotion: 2021-2022

# Remerciements

*Au terme de ce travail, on tient à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné, la foi, le courage, la patience et la santé pour tenir jusqu'à la fin.*

*Nous voulons ensuite exprimer nos chaleureux remerciements à notre promoteur Mr. SEBBANE Hillal, maître de conférence classe B à l'UMMTO, ainsi notre reconnaissance infinie pour ses efforts en premier lieu, pour son temps que nous a accordé, pour son savoir que nous a donné gracieusement et ses conseils judicieux et surtout pour sa patience, sa compréhension et sa gentillesse non limitée. Du fond du cœur, Merci.*

*On tient à remercier vivement Mr. HOUALI Karim qui nous a honoré de sa présence comme président de jury.*

*Nos remerciements les plus distingués à Mme. IRATNI Ghenima qui nous a donné de son précieux temps afin d'examiner cette réalisation.*

*Nous remercions également tous les enseignants du laboratoire LABAB qui n'ont pas cessé de répondre à nos questions malgré leurs occupations, bien-particulièrement Mr. TITOUCHE Yacine qui nous a fourni le plasma utilisé pour nos tests, et qui ne nous a pas lésiné sur ses connaissances et son expérience, ainsi les ingénieurs qui nous ont aidés techniquement.*

*Un profond merci à tous nos camarades avec lesquelles on a eu une expérience inoubliable et une ambiance ravissante.*

*Au final, nos remerciements les plus cardiaux et les plus chaleureux concernent nos très chères familles et nos amis pour leurs encouragements, leurs dévouements, et tout leur aide apporté avec bienveillance.*

*Comme on aimerait bien remercier toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*



# Dédicaces

*Ce travail n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes chers ~~parents~~, qui ne cessent de me donner, avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que Dieu vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur. Pour eux je dédie ce travail.*

*Je dédie, aussi ce travail à :*

*Mes très chers frères : Mohamed, Djamel, Mayas et ma très chère sœur Lina. Que Dieu les protège et leurs offres tous le bonheur du monde.*

*Mes chers amis.*

*Mes deux chères camarades avec lesquelles j'ai réalisé le présent travail et passé des merveilleux moments tout le long de cette année.*

*Zahra*



# Dédicaces

*C'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail :*

*Aux êtres les plus chers : Mes parents, qui me donnent toujours l'espoir de vivre et qui ont toujours cru en moi. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien, dévouement, votre compréhension et votre amour que vous me donnez.*

*A mes deux frères jumeaux Yabia et Abcene que j'aime sans condition*

*Aux très chères sœurs au monde « Nadia, Kahina, Samira, Lynda, Karima, Farida pour leurs amour, soutien et encouragements, leurs aide qu'ils m'ont apporté ainsi que pour tous les bons moments qu'on a vécu ensemble.*

*A cette personne qui m'a énormément soutenue merci pour ta bienveillance et ton encouragement Ramdane.*

*A ma meilleure amie Dyhia et ma cousine d'amour Cici pour leurs sincérités, amours et leur encouragement.*

*A toutes les personnes qui ont participé de loin ou de près à la réussite de mon travail*

*Souhila*



# Dédicaces

*Je tiens à dédier ce modeste travail :*

*A mes très chers parents, ma raison de vivre.*

*A mon frère bien-aimé, mes adorables sœurs et mes vrais amis.*

*A toute bonne personne que j'ai rencontrée sur le chemin de ma vie  
et auquel je n'ai pas eu l'occasion ou bien je n'ai pas su comment  
lui exprimer mes chaleureux remerciements et mon immense  
gratitude.*

*Zohra*

## Résumé

Les biofilm sont le mode de vie majoritaire pour la plupart des microorganismes. Ils entraînent une résistance accrue pour les antibiotiques, les désinfectants et même les mécanismes de défense du système immunitaire. C'est ainsi que le traitement des infections liées aux biofilms par les agents antimicrobiens classiques devient de plus en plus compliqué, ce qui représente un sérieux problème pour la santé publique. En revanche, tant d'études, ont démontré la possibilité de l'exploitation de la phytothérapie comme alternative aux antibiotiques. Pour cela, le présent travail, consiste à l'étude de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux des écorces du *Juglans regia L.* Cinq souches ont été testées pour leur aptitude à former des biofilm sur milieu solide par la méthode RCA, et sur milieu liquide par la méthode TCP. C'était avéré que, seule *S. aureus ATCC 25923* est fortement formatrice de biofilm avec une DO égale à 3.03675.

La réalisation d'un test par la méthode en tube a permis de déterminer la présence d'une activité anti-formation du biofilm et une activité dispersante à l'égard du *S. aureus ATCC 25923*.

L'activité antibiofilm de l'extrait, a été évaluée sur milieu solide par la méthode de diffusion sur gélose, et sur le milieu liquide par la méthode de la microtitration sur microplaque de 96 puits. La CMIB détectée est estimée de 52 mg / ml, et la solution mère permet une inhibition qui s'élève à 97.12 %.

**Mots clés :** *Juglans regia L.*, extrait aqueux, activité antibiofilm, *Staphylococcus aureus*, Rouge Congo, plaque de culture tissulaire.

## Abstract

Biofilms are the main mode of life for most microorganisms. They lead to increased resistance to antibiotics, disinfectants and even immune system defense mechanisms. Thus, treatment of biofilm-related infections by conventional antimicrobial agents becomes more and more complicated, which represents a serious health problem public. On the other hand, so many studies have demonstrated the possibility of using herbal medicine as an alternative to antibiotics. For this, the present work consists in the study of the antibiofilm activity of the aqueous extract of the barks of *Juglans regia L.* Five strains were tested for their ability to form biofilms on solid medium by the RCA method, and on liquid medium by the TCP method. It was proven that only *S. aureus ATCC 25923* is strongly forming biofilm with an OD equal to 3.03675.

The performance of a test by the tube method made it possible to determine the presence of an anti-biofilm formation activity and a dispersant activity of the extract against *S. aureus ATCC 25923*.

The antibiofilm activity of the extract was evaluated on a solid medium by the agar diffusion method, and on the liquid medium by the microtitration method on a 96-well microplate. The CMIB detected is estimated at 52 mg/ml, and the stock solution allows an inhibition of which amounts to 97.12%.

**Key words:** *Juglans regia L.*, aqueous extract, antibiofilm activity, *Staphylococcus aureus*, Congo Red, tissue culture plate.

# Sommaire

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction ..... 1

## La partie bibliographique

### Chapitre I : Généralités sur les noyers

1.1. Aperçu sur le noyer « <i>Juglans regia. Linn</i> ».....	3
1.2. Classification botanique .....	4
1.3. Répartition géographique et production .....	4
1.3.1. Répartition géographique .....	4
1.3.2. Production du noyer .....	5
1.4. Caractéristiques morphologiques.....	5
1.5. Usages traditionnels en médecine.....	8

### Chapitre II : Généralités sur les biofilms

2.1. Historique .....	9
2.2. Définition .....	10
2.3. Composition des biofilms .....	10
2.3.1. Microorganismes .....	11
2.3.2. Matrice extracellulaire (MEC) .....	11
2.4. Organisation des biofilms.....	12
2.5. Etapes de formation du biofilm .....	13
2.5.1. Développement de film de conditionnement et effets de substrat ..	14
2.5.2. Mouvement des microorganismes de la surface .....	14
2.5.3. Adhérence .....	14
2.5.4. Croissance et maturation du biofilm .....	14
2.5.5. Dispersion .....	15
2.6. Quorum sensing (QS) .....	15
2.6.1. Définition .....	15
2.6.2. Molécules impliquées dans le quorum sensing .....	15
2.6.3. Rôle de quorum sensing .....	16
2.7. La résistance des biofilms aux agents antimicrobiens.....	16

## **Chapitre III : Techniques d'étude des biofilms**

<b>3.1. Méthode sur plaque de culture tissulaire « Tissue Culture Plate » (TCP) ou (TCPM).....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Méthode en tube (MT).....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. Culture sur Rouge Congo Agar (RCA) .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4. Biofilm Ring test .....</b>	<b>20</b>

## **La partie expérimentale**

## **Chapitre I : Matériel et Méthodes**

<b>1.1. Matériel.....</b>	<b>22</b>
<b>1.1.1. Matériel biologique</b>	<b>22</b>
<b>1.1.2. Matériel du laboratoire .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1.2.1.Appareillage et verrerie .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1.2.2.Milieus de culture .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1.2.3.Réactifs et solvants.....</b>	<b>24</b>
<b>1.1.2.4.Antibiotiques .....</b>	<b>24</b>
<b>1.2. Méthodes</b>	<b>25</b>
<b>1.2.1. Revivification et vérification de la pureté des souches.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2.1.1.Revivification .....</b>	<b>25</b>
<b>1.2.1.2.Vérification de la pureté des souches .....</b>	<b>25</b>
<b>1.2.2. Préparation de l'extrait aqueux des écorces du noyer.....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.2.1.Récolte et broyage.....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.2.2.Macération à 10% .....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.2.3.Filtration.....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.2.4.Lyophilisation.....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.3. Détermination du seuil maximale d'hydratation.....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.4. Rendement d'extraction.....</b>	<b>30</b>
<b>1.2.5. Préparation des inoculums et standardisation des souches.....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.6. Sélection des souches formatrices des biofilms.....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.6.1.Sur milieu solide : Rouge Congo Agar (RCA) .....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.6.2.Confirmation sur milieu liquide.....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.7. Détermination de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2.8. Détermination de l'activité anti-formation et l'activité dispersante du biofilm de l'extrait aqueux.....</b>	<b>34</b>
<b>1.2.9. Antibiogramme.....</b>	<b>35</b>
<b>1.2.10. Evaluation de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux.....</b>	<b>36</b>
<b>1.2.10.1.Méthode de diffusion sur gélose.....</b>	<b>36</b>
<b>1.2.10.2.Sur milieu liquide.....</b>	<b>35</b>

## **Chapitre II : Résultats et Discussions**

<b>2.1.Rendement d'extraction .....</b>	<b>40</b>
<b>2.2.Contrôle de la pureté des souches .....</b>	<b>41</b>
<b>2.3.Sélection des souches formatrice des biofilms .....</b>	<b>41</b>

2.3.1. Sur milieu solide RCA.....	41
2.3.2. Sur milieu liquide TCP .....	43
2.4.Détermination de l'activité antibiofilm .....	44
2.5.Activité anti-formation et activité dispersante du biofilm de l'extrait aqueux .....	45
2.6.Antibiogramme.....	46
2.7.Evaluation de l'activité antibiofilm .....	47
2.7.1. Sur milieu solide (Aromatogramme) .....	47
2.7.2. Sur milieu liquide .....	47
Conclusion.....	51
Références bibliographiques	
Annexes	

## Liste des abréviations

**ATCC:** American Type Culture Collection.

**AHL:** Acylhomosérines.

**AI:** Autoinducteurs.

**BEA:** Bile Esculine Azide.

**BHIB:** Brain Heart Infusion Broth.

**CASFM:** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

**CMIB :** Concentration minimale inhibitrice du biofilm.

**CMIB50 :** Concentration minimale inhibitrice de 50 % du biofilm.

**CMIB90 :** Concentration minimale inhibitrice de 90 % du biofilm.

**CV:** Cristal violet.

**d:** Densité du filtrat.

**EMB:** Eosin Methylen Bleu.

**EPS :** Substance polymérique extracellulaire.

**GN:** Gélose nutritive.

**M:** Masse du broyat utilisée dans la macération.

**MEC :** Matrice extracellulaire.

**MMS:** Moyenne de la matière sèche dans 100 g de solution.

**MH:** Milieu Muller-Hinton

**PBS:** Phosphate-buffered-saline.

**PIA :** Polysaccharide Intercellular Adhesion.

**PVC:** Polyvinyl chloride.

**QS:** Quorum sensing.

**RCA:** Rouge Congo Agar.

**RE:** le rendement de l'extrait.

**SM :** Solution mère.

**TCP:** Tissue Culture Plate (Méthode sur plaque de culture tissulaire).

**TM:** Méthode en tube.

**WDCM:** World Data Centre for Microorganisms.

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : classification de <i>Juglans regia. L</i> .....	4
<b>Tableau II</b> : les principaux pays exportateurs de noix et leurs valeurs d'exportation.....	5
<b>Tableau III</b> : Usages de <i>Juglans regia. L</i> en médecine traditionnelle .....	7
<b>Tableau IV</b> : Composition de la matrice d'un biofilms bactériens .....	11
<b>Tableau V</b> : Matériel du laboratoire utilisé .....	23
<b>Tableau VI</b> : Les milieux de culture utilisés .....	23
<b>Tableau VII</b> : Réactifs et solvants utilisés .....	24
<b>Tableau VIII</b> : Les antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme .....	24
<b>Tableau IX</b> : Le tableau de dilutions.....	37
<b>Tableau X</b> : Le rendement d'extraction .....	40
<b>Tableau XI</b> : Les résultats de l'examen microscopique et de l'activité enzymatique .....	41
<b>Tableau XII</b> : La formation des biofilms sur milieu RCA.....	42
<b>Tableau XIII</b> : Les moyennes des densités optiques de chaque souche et leurs écarts type relatifs.....	43
<b>Tableau XIV</b> : L'importance de formation des biofilms par les cinq souches .....	44
<b>Tableau XV</b> : Le calcul de pourcentage d'inhibition.....	45
<b>Tableau XVI</b> : Les zones d'inhibition en (mm) .....	46
<b>Tableau XVII</b> : Les zones d'inhibition correspondantes à chaque disque .....	48
<b>Tableau XVIII</b> : Densités optiques des biofilms du <i>S. aureus ATCC 25923</i> à une longueur d'onde de 560 nm après 24 h d'incubation .....	49

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Arbre du <i>Juglans regia</i> (Juglandacées), Touchétie, Géorgie .....	3
<b>Figure 2 :</b> Répartition des noix dans le monde .....	4
<b>Figure 3 :</b> (a) Feuilles de <i>Juglans regia</i> , (b) Fruits de <i>Juglans regia</i> .....	6
<b>Figure 4 :</b> (C) Fleurs femelles et chatons de noyer (fleurs mâles) .....	6
<b>Figure 5 :</b> Micrographie électronique à balayage d'un biofilm sur une surface métallique d'un système d'eau industrielle .....	13
<b>Figure 6 :</b> Formation d'un biofilm bactérien.....	13
<b>Figure 7 :</b> Les molécules de signalisation impliquées dans le quorum sensing : (A) Acylhomosérines lactones (les pentagones rouges) pour les Gram négatif ; (B) les peptides autoinducteurs (Les octogones violets) pour les Gram positif.....	16
<b>Figure 8 :</b> Hypothèses expliquant le phénomène de tolérance du biofilm vis-à-vis des biocides (antibiotiques et antiseptiques).....	17
<b>Figure 9:</b> Formation du biofilm en microplaque (la méthode de TCP) .....	19
<b>Figure 10 :</b> Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM : (A) Souche formatrice du biofilm ; (B) Souche modérément formatrice du biofilm ; (C) Souche non formatrice du biofilm ; (T) Témoin.....	20
<b>Figure 11 :</b> Le principe de Biofilm Ring Test.....	21
<b>Figure 12 :</b> Zone d'échantillon : la daïra de Maatkas, wilaya Tizi-Ouzou22	
<b>Figure 13 :</b> Revivification de souches.....	25
<b>Figure 14 :</b> Coloration de la spore de <i>B. cereus</i> .....	27
<b>Figure 15 :</b> Les étapes de préparation de l'extrait aqueux des écorces du noyer.....	29
<b>Figure 16 :</b> Le dessiccateur infrarouge et la coupelle .....	30
<b>Figure 17 :</b> Inoculation de la microplaque .....	32
<b>Figure 18 :</b> Le test de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux des écorces du noyer .....	33
<b>Figure 19 :</b> Le test de l'activité antiadhésive et l'activité dispersante par la méthode en tube .....	35
<b>Figure 20 :</b> La réalisation de l'antibiogramme.....	36
<b>Figure 21 :</b> Préparation des dilutions à ½ .....	37
<b>Figure 22 :</b> L'aromatogramme .....	38
<b>Figure 23 :</b> La quantification du biofilm par la méthode de coloration au cristal violet .....	39

<b>Figure 24</b> : Résultat de production de slime : <b>(A)</b> : <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ; <b>(B)</b> : <i>B. cereus</i> ATCC 14575; <b>(C)</b> : <i>E .coli</i> ATCC 25922 ; <b>(D)</b> : <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 ; <b>(E)</b> : <i>E.faecalis</i> WDCM 00009 .....	42
<b>Figure 25</b> : Aspect de la microplaque lors de la lecture.....	43
<b>Figure 26</b> : l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux des écorces de <i>Juglans regia. L</i> sur <i>S.aureus</i> ATCC 2592.....	44
<b>Figure 27</b> : L'antibiogramme de <i>S.aureus</i> ATCC 25923 .....	47
<b>Figure 28</b> : L'effet antibiofilm de plusieurs concentrations de l'extrait aqueux vis-à-vis <i>S.aureus</i> ATCC 25923.....	47
<b>Figure 29</b> : Aspect de la microplaque après la récupération du cristal violet .....	48

# *Introduction*

---

## **Introduction**

Les microorganismes se développent selon deux modes : la forme planctonique (libre) et la forme sessile représentée par les biofilms (Bellifa, 2014).

Les biofilms sont un ensemble de microorganismes enfermés dans une couche d'exopolysaccharides (Bose et *al.*, 2009).

La communauté scientifique a étudié les stratégies employées par les microorganismes pour produire des biofilms, il a été démontré que les bactéries productrices sécrètent des substances chimiques qui les protègent contre les agents antimicrobiens et le système immunitaire de l'hôte (Saito et *al.*, 2009), ce qui a causé un problème de santé majeur vu qu'ils sont considérés comme l'une des principales causes de l'émergence des infections nosocomiales (Landini et *al.*, 2010).

Les techniques les plus utilisées pour étudier *in vitro* ce complexe mode de vie microbiens sont diverses, elles varient de plus simples : méthode de culture sur gélose Rouge Congo (RCA) (Djelloul Djaouadi, 2010), méthode sur plaque de culture tissulaire (Sultan et *al.*, 2019), méthode en tube (TM) (Bellifa, 2014) ; aux plus sophistiquées : Biofilm Ring Test (Di Domenico et *al.*, 2016).

Depuis quelques années, il est apparu qu'ils ont une importance capitale dans le milieu médical puisque 65 % des infections bactériennes chez l'homme impliquent des biofilms (Chicurel, 2000) et 80 % des infections bactériennes chroniques sont associées aux biofilms (Chalvet de Rochemonteix, 2009).

D'où l'intérêt de recherche des traitements à base de la médecine alternative par l'étude approfondie des plantes couramment utilisées en médecine traditionnelle (Almonte-Flores, 2015), surtout avec les coûts chers des traitements thérapeutiques et leur échec face aux infections dues aux bactéries résistantes (Toty et *al.*, 2013).

L'une de ces plantes c'est *Juglans regia. Linn* connue pour ses propriétés anti-infectieuses et antiparasitaires (Bussmann et *al.*, 2020).

Le noyer « *Juglans regia. L* », est une plante médicinale utilisée dans plusieurs pays et régions du monde, comme c'est le cas en Kabylie, où elle est allée au-delà de son utilisation à des fins cosmétiques jusqu'à atteindre un usage thérapeutique, notamment contre de nombreuses maladies de la cavité buccale d'origine infectieuse. Cela offre de nouvelles

perspectives dans le traitement des infections des cavités buccales dues aux bactéries résistantes ainsi une voie pour intégrer ce végétal dans les formulations pharmaceutiques comme dentifrice, bain de bouche... etc.

Dans ce contexte, le présent manuscrit a développé deux parties, dont la première est une synthèse bibliographique consacrée à la présentation de la plante *Juglans regia. L.*, à son utilisation en médecine traditionnelle et enfin sur le biofilm bactérien et les méthodes d'étude de ce dernier. Tandis que, la deuxième partie est consacrée à l'étude de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux du noyer sur les souches bactériennes de *Staphylococcus aureus ATCC 25923*.



*Partie  
Bibliographique*

*Chapitre I*  
*Généralités sur*  
*les noyers*

---

## I. Généralités sur les noyers

### 1.1. Aperçu sur le noyer « *Juglans regia*. Linn »

Les noix de *Juglans regia* sont appelées « le gland royal de Jupiter » selon les romain (Tajamul et al., 2014).

*Juglans regia* est une récolte précieuse du fait que la noix est largement utilisée et très répondeur (Stampar et al., 2006) , souvent connu sous le nom de « noyer persan » ou « noyer anglais » (Yan et al., 2019), appelé aussi : noyer blanc ou noyer commun (Taha et Al-wadaan, 2011).

Le noyer commun (Figure 1) est une espèce fruitière (Chadda ,2008) d'une grande importance pour la gestion de l'environnement en raison de son bois de haute qualité, son écorce, ses feuilles et de ses fruits nutritifs (Paÿ-Dyderska ,2021).

Les noix de cette espèce sont importantes pour la nutrition humaine car elles contiennent des vitamines, des protéines, des graisses et des minéraux (Gandev, 2007).



**Figure 1** : Arbre du *Juglans regia* (Juglandacées), Touchétie, Géorgie (Bussman et al., 2020)

## 1.2. Classification botanique

Le Noyer appartient à la famille des Juglandacées, qui inclut sept genres et environ 60 espèces d'arbres (McGranahan et Leslie ,2009). Le genre *Juglans* comprend environ 21 espèces différentes dont la plus connue est *Juglans regia* (Karimi et al., 2010 ; Vischi et al., 2017), ces espèces ont été regroupées en quatre sections: Trachycaryon, Cardiocaryon, Dioscaryon et Rhysocaryon (McGranahan et Leslie ,1991).

La classification du noyer commun est représentée par le tableau I :

**Tableau I** : classification de *Juglans regia. L* (Tajamul et al., 2014).

<b>Règne (Royaume)</b>	<b>Plantae</b>
<b>Ordre</b>	Fagales (Juglandales)
<b>Famille</b>	Juglandaceae
<b>Genre</b>	<i>Juglans</i>
<b>Espèce</b>	<i>Juglans regia. L</i>

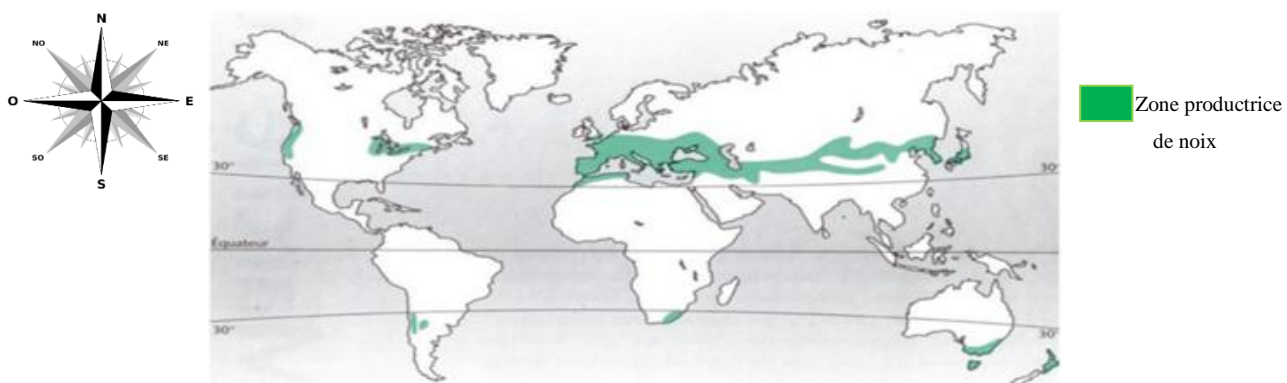
## 1.3. Répartition géographique et production

### 1.3.1. Répartition géographique

*Juglans regia* est originaire d'une région qui s'étend des moyennes montagnes d'Asie centrale (du Caucase au Turkestan), de l'Asie mineure, des Balkans et de l'Himalaya jusqu'à l'Est de la Chine (Germain, 1992).

*Juglans regia* est largement distribué dans tout le monde, il se trouve dans les régions modérées. La noix est cultivée commercialement dans diverses parties du monde : aux États-Unis, l'ouest de l'Amérique du Sud, l'Asie, le centre et le sud d'Europe (Pereira et al., 2007).

Il est actuellement cultivé de 30 à 55° de latitude dans l'hémisphère nord en Asie, Europe ainsi Amérique du Nord et de 30 à 40° dans l'hémisphère sud en Australie, Nouvelle-Zélande, Afrique du Sud, Chili et Argentine (Vahdati et al, 2019) (figure 2).



**Figure 2** : Répartition des noix dans le monde (Germain, 1999).

### 1.3.2. Production du noyer

Selon l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, 2016), la production annuelle mondiale de noix est estimée à 3,74 millions de tonnes et une valeur commerciale de 2,77 millions United States Dollar. Parmi les trois plus grand pays producteurs de noix : La Chine, les États-Unis et l'Iran. Plus de 74,7 % de cette production est assurée par les trois premiers pays producteurs.

En 2008, la production mondiale de noix est estimée d'environ  $1,5 \times 10^6$  tonnes métriques (FAO, 2008). Les principaux exportateurs sont : Les États-Unis comme le plus grand exportateur puis la France, La chine et l'inde (tableau II) (McGranahan et Leslie, 2009).

**Tableau II :** les principaux pays exportateurs de noix et leurs valeurs d'exportation (McGranahan et Leslie, 2009).

Pays exportateurs	Valeurs d'exportation en millions de tonnes (MT)
Les Etats –unis	115000
La France	23000
La Chine	22000
L'Inde	17000

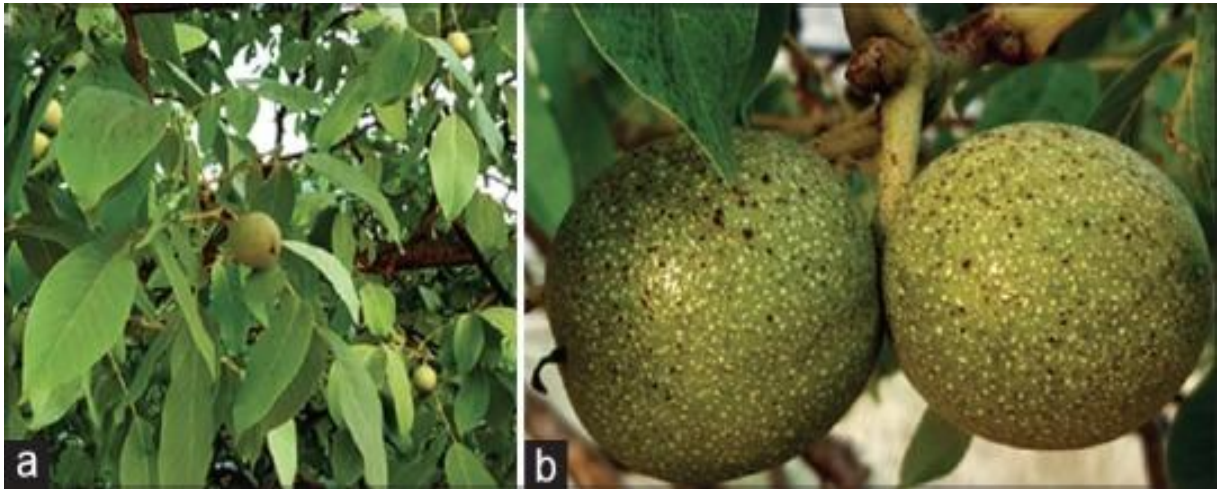
La Superficie mondiale récoltée de noix est de 1 863 991 ha. Cette dernière est réparties comme suit : la Chine, l'Iran et les États-Unis (FAO, 2016).

### 1.4. Caractéristiques morphologiques

*Juglans regia* est un arbre monoïque à feuillage caduc (Maity et al., 2019) pouvant vivre de 150 à 200 ans. Ces arbres atteignant une hauteur allant jusqu'à 25-35 m et un diamètre de tronc de 1,5–2,0 m. C'est une espèce exigeant la lumière et préfère également les sols profonds et riches. Elles nécessitent une exposition significative au soleil pour bien croître (Mohni et al., 2009).

L'écorce est blanc, argenté, mat et lisse, se crevasse avec le temps (Sabatier, 1999). Les feuilles ( figure 3a) sont imparipennées de 25 à 40 centimètres du long, déposées de façon alterne sur les rameaux, composées de 5 à 9 folioles. Les folioles terminales étant plus grandes (10–18 cm du long et 6–8 cm de large) que celle de base de la feuille (de 5–8 cm de long) qui sont plus petites.

Les fleurs mâles (figure 4C) sont de 5 à 10 cm de long, regroupées en chatons pendants, et les fleurs femelles sont portées en grappes terminales de 2 à 5.



**Figure 3 :** (a) Feuilles de *Juglans regia*, (b) Fruits de *Juglans regia* (Delaviz et al., 2017).



**Figure 4 :** (C) Fleurs femelles et chatons de noyer (fleurs mâles) (McGranahan et Leslie, 2009).

Les fruits (figure 3b) sont constitués de 2 parties : la partie externe qui est le brou verte et semi- charnue et une partie interne qui est la noix brune et ondulée. La graine est grosse et comestible, contenant une coquille mince à 2 valves (Tajamul et al., 2014).

### 1.5. Usages traditionnels en médecine

*Juglans regia*. Linn est une plante médicinale fortement utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies telles que les maladies infectieuses, les maladies endocriniennes : ( l'anorexie, les dysfonctionnements thyroïdiens...), les maladies parasitaires (les helminthiases) et ainsi d'autres maladies telles que l'arthrite, l'asthme, l'eczéma, la scrofule, les maux d'estomac et les troubles cutanés (Taha et Al-wadaan ,2011). Les multiples usages traditionnels de cette espèce sont présentés dans le tableau III.

Tableau III : Usages de *Juglans regia. L* en médecine traditionnelle.

Les différentes parties de l'espèce <i>Juglans regia. L</i>	Usages traditionnels
La plante de <i>Juglans regia. L</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utiliser comme : <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Remède topique pour l'inflammation cutanée et la transpiration excessive des mains et des pieds.</li> <li>✓ Remède maison courant pour le traitement de la scrofule et l'eczéma chronique cutanés (Voleurs et <i>al.</i>, 1999 ; Ali-Shtayeh et <i>al.</i>, 1999 ; Baytop, 1999 ; Blumenthal, 2000 ; Gruenwald et <i>al.</i>, 2001).</li> </ul> </li> </ul>
Les feuilles de <i>Juglans regia. L</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Traiter les démangeaisons du cuir chevelu et les pellicules, les coups de soleil et les brûlures superficielles ainsi comme émoulinant pour aider les troubles cutanés (Voleurs et <i>al.</i>, 1999; Ali-Shtayeh et <i>al.</i>, 1999 ; Baytop, 1999 ; Blumenthal, 2000 ; Gruenwald et <i>al.</i>, 2001).</li> <li>• Réduire la glycémie et améliorer l'état du diabète (Mohammadi et <i>al.</i>, 2011) .</li> <li>• Utiliser : (Girzu et <i>al.</i>, 1998; Mouhajir et <i>al.</i>, 2001; Vaidyaratnam, 2005). <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Comme antimicrobien contre les bactéries, antihelminthique, anti – diarrhéique, anti astringent, hypoglycémiant, kératolytique, dépuratif, tonique et carminatif.</li> <li>✓ Pour le traitement : du rhume, la sinusite et les maux d'estomac.</li> </ul> </li> <li>• Traitement de diabète, les douleurs rhumatismales et les maladies de la peau (Shah et <i>al.</i>, 2013 ; Mohammadi, 2012).</li> <li>• Traitement de l'insuffisance veineuse et des symptômes d'hémorroïdes et aussi utiliser comme purificateur sanguin et comme un médicament antidiarrhéique et antiparasitaire (Moravej et <i>al.</i>, 2016 ; Sarahroodi et <i>al.</i>, 2008) .</li> <li>• <b>En Turquie :</b> L'application des feuilles fraîches sur le corps nu ou le front afin de diminuer la fièvre ou le gonflement des articulations pour soulager les douleurs rhumatismales (Fujita et <i>al.</i>, 1995 ; Yesilada, 2002).</li> <li>• Les feuilles de noyer sont utilisées en infusion comme antidiabétique en prenant un verre trois fois par jour avant chaque repas.</li> <li>• un mélange d'une même quantité de feuilles sèches de noyer, d'olivier et d'eucalyptus comme antidiabétique à raison de prendre 3 tasses par jour, hors des repas (Benkhniq et <i>al.</i>, 2014).</li> <li>• Les feuilles sont utilisées en infusion pour traiter : la scrofule, Tuberculose, le rachitisme, le vermifuge, les maladies de la peau (usage externe) et les maladies vénériennes et les problèmes gastro-intestinaux (Batsatsashvili et <i>al.</i> 2017; Bussmann et <i>al.</i> 2014; 2016; 2018; Bussmann, 2017; Fedorov, 1984).</li> </ul>
L'écorce, les branches , l'exocarpe du fruit vert immature	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comme miswaks pour le nettoyage des dents (Ibrar et <i>al.</i>, 2007)..</li> <li>• <b>En chine :</b> pour soigner les cancers gastriques, hépatiques et pulmonaires (Liu et <i>al.</i>, 2004 ; Baytop, 1999).</li> <li>• <b>Dans les régions du nord-est du Mexique :</b> prévenir les dommages au foie (Torres-gonzalez et <i>al.</i>, 2011)..</li> <li>• <b>Au Népal :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ La pâte d'écorce pour traiter l'arthrite, les maladies de la peau, les maux de dents et la croissance des cheveux (Kunwar et Adhikari, 2005).</li> <li>✓ Les écorces pour traiter la tuberculose, les affections cutanées, les plaies et les allergies et comme anthelminthique (Kunwar et <i>al.</i>, 2006).</li> </ul> </li> <li>• <b>En Pakistan :</b> utiliser pour le nettoyage des dents (Sher et <i>al.</i>, 2016) .</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'écorce de racines est employée, en poudre, mélangée au henné, pour colorer les cheveux. (El Azzouzi et al., 2015).</li> <li>• Les écorces en infusion : Pour le traitement des Plaies, l'eczéma chronique, Dermatomycose, les Furoncles et le Lupus (Batsatsashvili et al. 2017; Bussmann et al. 2014; 2016; 2018; Bussmann 2017; Fedorov 1984).</li> </ul>
<b>Le noyau</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>En médecine iranienne</b> : traitement des maladies inflammatoires de l'intestin (Kim et al., 2006).</li> <li>• <b>En Palestine</b> : Pour le traitement <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Des troubles prostatiques et vasculaires (Spaccarotella et al., 2008) .</li> <li>✓ Du diabète et de l'asthme (Jaradat, 2005 ; Kaileh et al., 2007).</li> </ul> </li> </ul>
<b>Le tégument</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pour cicatriser les plaies (Kunwar et Adhikari, 2005).</li> </ul>
<b>La coquille</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Dans la médecine traditionnelle calabraise</b> : pour le traitement de paludisme (Tagarelli et al., 2010).</li> <li>• <b>Inde</b> : Pour serrer les dents, traiter les plaies et les coupures et la pyorrhée (Singh et al., 2017).</li> </ul>
<b>Les noix</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Dans l'Himalaya</b> : Maux de dents (Bhat et al., 2015).</li> <li>• <b>Les racines de noix</b> : Traiter le diabète (Shah et al., 2013 ; Mohammadi, 2012).</li> </ul>
<b>Les graines</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pour la stimulation de système immunitaire, la réduction du cholestérol, traitement de l'inflammation de la gorge et amélioration de la santé des os (Sher et al., 2016).</li> </ul>
<b>Les fleurs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Traitement du paludisme et les douleurs rhumatismales (Shah et al., 2013 ; Mohammadi, 2012).</li> </ul>
<b>Les fruits</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les fruits en décoction : <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Pour soulager l'hypertension artérielle et les maladies cardiaques.</li> <li>✓ Comme bain de bouche pour traiter la gingivite (Batsatsashvili et al., 2017; Bussmann et al., 2014; 2016; 2018; Bussmann 2017; Fedorov 1984).</li> </ul> </li> </ul>

*Chapitre II*  
*Généralités sur*  
*les biofilms*

---

## II. Généralités sur les biofilms

### 2.1. Historique

Au XVII<sup>ème</sup> siècle, Antonie Van Leeuwenhoek a observé pour la première fois et grâce à l'invention du microscope, les microorganismes de ses propres dents avant et même après nettoyage de ceux-ci, ces dépôts opaques sont connus aujourd'hui sous le nom de la plaque dentaire (Percival et *al.*, 2011).

Arthur Henrici, en 1933, a pu suivre l'épaississement progressif d'un dépôt de microorganisme dans son aquarium en faisant enfoncer des lames en verre dedans (Henrici, 1933).

Ensuite, en 1940, des études ont démontré que la croissance des microorganismes marins est favorisée lorsqu'ils ont attaché à une surface, un phénomène connu sous le nom de « l'effet de bouteille » (Heukelekian et Heller, 1940).

En 1943, Zobell remarqua que la biomasse bactérienne sous forme planctonique est moins importante par rapport aux bactéries attachées sur les surfaces, il a même pu mettre en évidence deux étapes d'adhésion : l'adhésion réversible puis l'adhésion irréversible (Zobell, 1943).

Cependant, il faut attendre jusqu'à 1969 pour démontrer après l'examen des filtres bactériens d'une usine de traitement des eaux usées par le microscope électronique à balayage, que les biofilms sont constitués de microorganismes hétérogènes et que la matrice dont ils sont enrobés est composée principalement de polysaccharides (Jones et *al.*, 1969)

Par la suite, en 1973, Characklis a noté la tenace et la résistance des biofilms aux effets antimicrobiens du chlore grâce à ses études sur les boues microbiennes dans l'eau industrielle (Characklis, 1973).

En 1978, plusieurs travaux ont démontré que de nombreuses bactéries passaient la plus part partie de leur existence sous forme de communautés sessiles, c'est là que la première véritable analyse des biofilms était faite ; et c'est ainsi que le terme « biofilm » est né. Puis, et suite à ses études sur la plaque dentaire et les communautés sessiles dans les ruisseaux de montagne, Costerton a pu mettre des hypothèses sur les mécanismes d'adhésions des microorganismes sur les surfaces biotiques et abiotiques (Costerton et *al.*, 1978).

Enfin en 1995, le concept « modèle biofilm » était conçu, ce dernier est basé sur le fait qu'il est composé de microorganisme sous forme de microcolonies entourées des exopolysaccharides, entre celles-ci, se localisent des canaux d'eaux dont l'intérêt c'est la favorisation de l'afflux de nutriment et l'efflux de déchet (Costerton et *al.*, 1995).

## 2.2. Définition

Le biofilm, par convention, fait référence à une communauté multicellulaire microbiennes sessile (adhérée a une surface) avec un transcriptome et un phénotype modifiés, dont les caractères communs malgré ses variétés écologiques sont : la présence d'une matrice polymérique auto secrétée et la résistance aux agents antimicrobiens et les effecteurs immunitaires (Nuta et *al.*, 2021).

Les biofilms sont des écosystèmes microbiens complexes formés de microorganismes adhérents à une surface et enrobés dans une matrice de polymères organiques d'origine microbienne constituée aussi de matériaux non cellulaires (Cristaux minéraux, des particules de corrosion, des particules d'argile ou de limon, des composants sanguins...). Ces niches écologiques peuvent être homogènes, composées d'une seule espèce de microorganismes (biofilms des dispositifs médicaux) ou hétérogènes (biofilms des systèmes d'eau) (Percival et *al.*, 2011).

Ainsi, la définition qui peut être applicable sur tous les modèles du biofilms c'est la suivante : « Le biofilm représente l'ensemble des cellules microbiennes immobilisées dans une matrice de polymère extracellulaires agissant comme un système de fonctionnement indépendant et régulé de manière homéostatique » (Percival et *al.*, 2011).

Enfin, tous les biofilm sont caractérisés par (Goller et Romeo, 2008) :

- La présence d'une matrice extracellulaire composée de polysaccharides, protéines et acides nucléiques.
- Le développement influencé par des signaux extracellulaires environnementaux et cellulaires (quorum sensing).
- Le rôle de protection des microbes qui les constituent contre les agents antimicrobiens thérapeutiques et désinfectants, le système immunitaire de l'hôte et les prédateurs.

## 2.3. Composition des biofilms

Le biofilm est composé principalement de microorganismes et de la matrice synthétisée par ces microorganismes (Costerton, 1999).

La matrice constitue 50 à 90 % de la masse organique carbonée du biofilm, et elle représente un taux de microorganismes varie de 2 à 5 % selon l'espèce impliquée (Bellifa, 2014).

### 2.3.1. Microorganismes

Cette communauté microbienne sessile, dite « biofilm », peut être composée d'une seule espèce ou de plusieurs espèces : bactériennes, fongiques, algales et protozoaires (Lock, 1993), et chaque groupe est sensé assurer des fonctions métaboliques données (Alnnasouri, 2010). Ces microorganismes ont un pouvoir d'attachement à une variété de surfaces (Akbas, 2015) comme les métaux, les plastiques, les tissus vivants (tissus humains, feuilles et racines des végétaux), les surfaces minérales (pierres, bétons). A savoir, 99 % des bactéries se développent en biofilm (Coghlan, 1996 ; Donlan et Costerton, 2002), elles présentent des caractéristiques hautement différentes par rapport à celles des bactéries libres, à titre d'exemple : les changements structurels (disparition des flagelles...) (Flemming, 1990 ; Costerton et *al.*, 1995), la faculté de production d'exopolysaccharides, la mise en place d'un système de communication chimique « quorum sensing » (Parsek et Greenberg, 2000), l'accroissement de la résistance aux agents antimicrobiens et aux stress environnementaux par la transformation de certaines cellules du biofilm en formes dormantes ayant des fonctions vitales ralenties qui leur permettent de s'échapper aux agressions extérieures (Aumeran et *al.*, 2020).

### 2.3.2. Matrice extracellulaire (MEC)

La matrice ou la substance polymérique extracellulaire (EPS) dite aussi « slime », est une caractéristique commune de tous les biofilms microbiens, elle est « la maison » où les cellules organisent leur vie (Flemming, 2011). La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (Yannick et *al.*, 2014). La matrice est constituée de polysaccharides, de protéines, des acides nucléiques, des agents tensioactifs, des lipides, des glycolipides et des cations (Tremblay et *al.*, 2014) (Tableau IV) :

**Tableau IV** : Composition de la matrice d'un biofilm bactérien (Muhsin et *al.*, 2015).

Composés	Pourcentage dans la matrice (%)
Cellules microbiennes	2-5
Protéines	1-2
Polysaccharides	< 1-2
ADN/ARN	< 1-2
Eau	> 97

La substance polymérique extracellulaire est indispensable compte tenu des rôles vitaux qu'elle joue :

- Elle assure la croissance bactérienne vu qu'elle est considérée comme réservoir de nutriment (Vanzieleghem et Delmée, 2020).
- Elle assure la communication entre les cellules du biofilm et leur maintenance (Vanzieleghem et Delmée, 2020).
- Elle assure la protection contre la dessiccation vu son pouvoir de fixation des molécules d'eau par des liaisons hydrogènes (Donlan et Costerton, 2002).
- Elle confère la résistance aux biocides par ses liaisons directes aux agents antimicrobiens et l'empêchement de leur pénétration (Donlan, 2002).

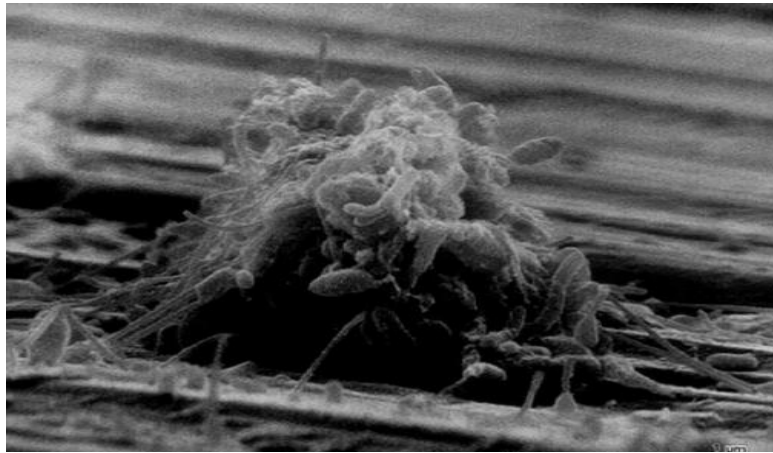
#### 2.4. Organisation des biofilms

Les biofilms considérés comme une stratégie de survie, qui permet l'installation d'un microorganisme sur un milieu et sa colonisation (Filloux et Vallet, 2003). Ils sont des communautés hautement organisées et structurées, enchevêtrées dans une matrice extracellulaire de densité et de composition variables (Branda et *al.*, 2005). Ils se forment préférentiellement dans les environnements à très fort cisaillement (milieux à écoulement rapide) (Donlan et Costerton, 2002).

Dans ce contexte, le microorganisme procède à des attachements transitoires dans le but d'évaluer les surfaces, puis une association définitive avec la surface choisie et d'autres microorganismes aura lieu pour former des micro-colonies qui vont conduire à l'élaboration d'un biofilm (Costerton et *al.*, 1999), chaque micro-colonie est une communauté en elle-même. Ces micro-colonies, d'une part sont entourées de la matrice qui les confère une grande plasticité et d'autre part elles sont séparées par des canaux aqueux permettant l'acheminement de l'oxygène et des nutriments dans les parties enfouies du biofilm ainsi l'évacuation des déchets. Cette diffusion à travers la substance polymérique extracellulaire crée un gradient de nutriment et d'oxygène, où la concentration décroît de la surface vers le fond du biofilm et ça implique la dépendance de l'état métabolique de microorganisme de la localisation de ce dernier au sein du biofilm (biofilm homogène) (Filloux et Vallet, 2003), comme il peut argumenter la coexistence organisée de plusieurs espèces microbiennes ayant des propriétés métaboliques différentes mais complémentaires (biofilm mixte) (Roux et Ghigo, 2006).

Le processus de formation des biofilms mixtes suit des conditions bien-définies (Nielsen et *al.*, 2000) telles que la fixation des cellules petites, anaérobiques à croissance lente en premier pour constituer la couche de base du biofilm, tandis que des cellules plus grandes, ayant un métabolisme aérobie et une croissance rapide se fixent tardivement formant ainsi la

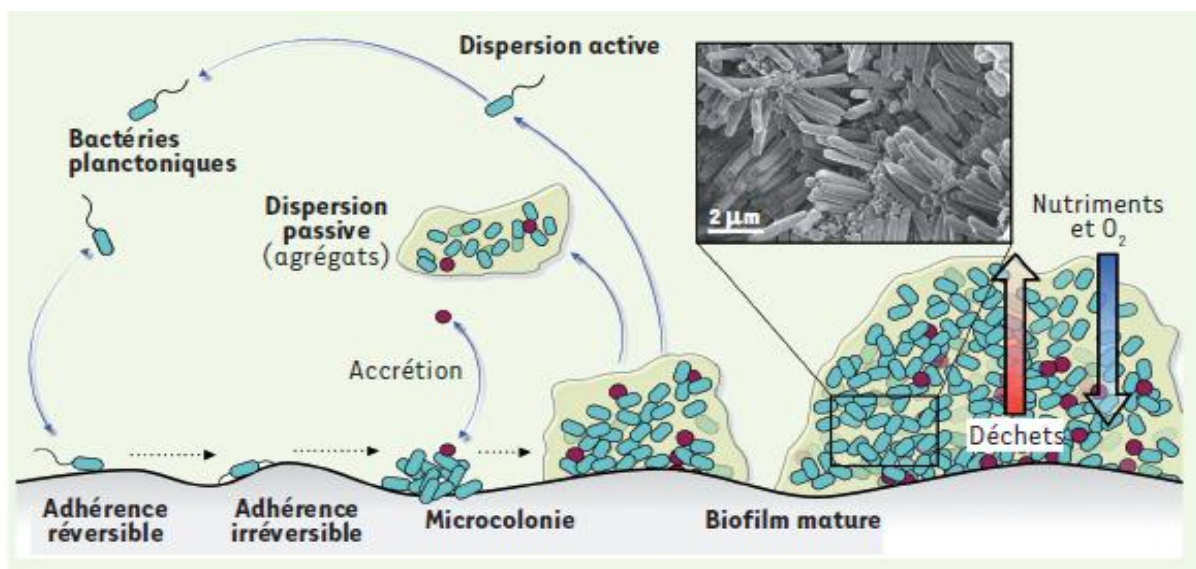
couche superficielle. Entre ces deux pellicules, se trouvent les microorganismes aéro-anaérobies facultatifs (Chalvet de Rochermonteix, 2009).



**Figure 5 :** Micrographie électronique à balayage d'un biofilm sur une surface métallique d'un système d'eau industrielle. (Donlan et Costerton, 2002).

### 2.5. Etapes de formation du biofilm

La formation des biofilms (figure 6) est stimulée par un ensemble des signaux extracellulaires provenant de divers sources externes, cette signalisation régule les voies métaboliques pour initier la création d'un biofilm (Lopez et *al.*, 2010), comme elle est dépendante de l'expression de quelques gènes spécifiques (Okada et *al.*, 2005). Ce processus de développement du biofilm est complexe mais la communauté scientifique le décrit généralement en cinq étapes (Percival et *al.*, 2011).



**Figure 6 :** Formation d'un biofilm bactérien (Lebeau et Ghigo, 2012).

### 2.5.1. Développement de film de conditionnement et effets de substrat

La mise en place d'un film conditionnant (film primaire), se fait suite à l'exposition de la surface à un milieu liquide ce qui permet l'adsorption de plusieurs molécules du faible poids moléculaire telles que les molécules hydrophobes, les polysaccharides complexes, les glycoprotéines, les lipides (Squinazi, 2013), qui sert du substrat pour les microorganismes qui vont se fixer plus tard (Branger et *al.*, 2007). La composition du film du conditionnement est complexe et entraîne une modification chimique de la surface d'origine, influençant ainsi le taux et l'étendue de l'adhésion microbienne (Percival et *al.*, 2011).

### 2.5.2. Mouvement des microorganismes de la surface

Le transport des microorganismes (et même de nutriments) à proximité de la surface est dû à la dynamique des fluides par deux types de mécanismes :

➤ **Passif** (Banks et Bryers, 1992) :

- Le transport de masse, les effets thermiques (mouvements browniens, diffusion moléculaire).

- Le transport gravitationnel (décantation différentielle, sédimentation) (Characklis, 1981 ; Walt et *al.*, 1985).

➤ **Actif** : Le déplacement par les appareils de motilité microbienne grâce aux pili et les flagelles (Bryers, 1987).

### 2.5.3. Adhérence

L'adhérence ou l'adhésion passe par deux étapes (Zobell, 1943) :

➤ **L'adhésion réversible** : fait référence à la fixation initiale et faible des cellules microbiennes à une surface (Rittman, 1989).

➤ **L'adhésion irréversible** : Suite à une liaison permanente des microorganismes à une surface par les adhésines bactériennes (Wittaker et *al.*, 1996) qui se lient aux récepteurs spécifiques sur le substrat (Marshall et *al.*, 1971).

### 2.5.4. Croissance et maturation du biofilm

Généralement, la croissance du biofilm est décrite comme une série d'étapes discrète dans un cycle de vie (Stoodley et *al.*, 2002). Elle se traduit par l'augmentation de l'épaisseur et la formation d'un film tridimensionnel (Costerton et *al.*, 1995), le biofilm grandit jusqu'il sera macroscopique en conditions optimales (Alnnasouri, 2010). Après leur adhésion irréversible, les bactéries se multiplient en utilisant les nutriments présentant dans le film de conditionnement et l'environnement liquide pour former des microcolonies (Goetez et *al.*, 2016) qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface (Bellifa, 2014).

La maturation du biofilm, est marquée par la production d'exopolymères (Alnnasouri, 2010) et la mise en place des canaux aqueux et des pores entre les microcolonies pour véhiculer l'oxygène et les nutriments indispensables pour la croissance des microorganismes ainsi l'élimination des déchets (Filloux et Vallet, 2003). Cette matrice permet l'enracinement des biofilms et sa protection contre tout type d'agressions extérieures : mécaniques, physiques, chimiques et cellulaires (Mogha et *al.*, 2014).

### 2.5.5. Dispersion

La dispersion est l'étape ultime de formation d'un biofilm (Tremblay et *al.*, 2014). Elle aura lieu quand la densité bactérienne sur la surface est très élevée (Kaplan, 2010). Ce phénomène est déclenché en réponse aux conditions défavorables du milieu (Parot, 2007).

La dispersion se fait par deux façons :

- **Détachement actif** : suite à quelques actions intrinsèques : dégradation de la matrice, modification de la surface des bactéries (Aumeran et *al.*, 2020).
- **Détachement passif** : par l'un de ses trois modes : érosion, abrasion ou desquamation (Lebeaux et Ghigo, 2012 ; Mogha et *al.*, 2014).

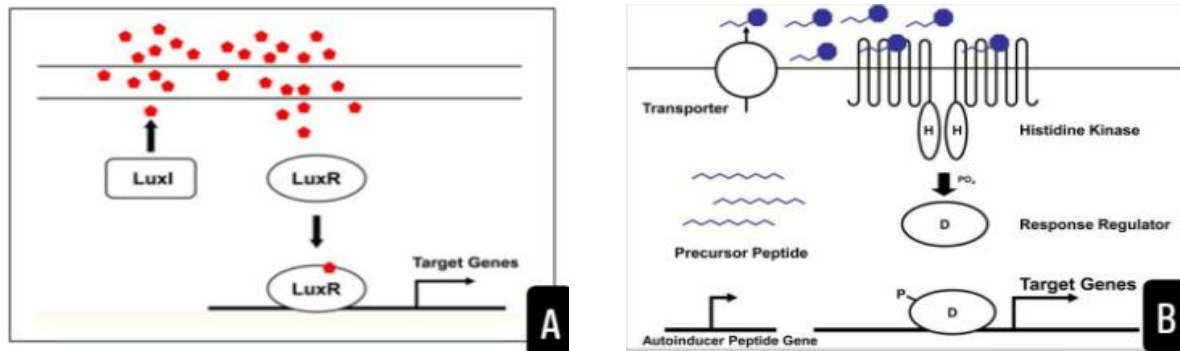
## 2.6. Quorum sensing (QS)

### 2.6.1. Définition

Le quorum sensing est un mécanisme de régulation des gènes, basé sur la densité cellulaire et l'environnement extracellulaire ; autrement dit, est un système de communication entre les bactéries. Il repose sur la sécrétion d'un peptide auto-inducteur (PAI) dans le milieu extérieur. Ce dernier s'accumulent pour atteindre une concentration seuil qui permette l'expression de certaines gènes simultanément chez toute la population bactérienne (Zimmermann-Meisse, 2016).

### 2.6.2. Molécules impliquées dans le quorum sensing

Les molécules impliquées dans le QS sont dépendante de type de bactéries présentant dans le biofilm (Irie et Parsek, 2008). Généralement, les molécules de signalisation utilisées par les Gram négatif sont les acylhomosérines lactones (AHL) (Figure 7A) (Mion et *al.*, 2019), par contre , les bactéries Gram positif utilisent des peptides autoinducteurs (AI) (Figure 7B), dont la taille se varient de 5 à 87 acides aminées. A l'intérieur du biofilm, il y a une ségrégation spatiale des molécules de QS suite à leur dégradation par des enzymes (Irie et Parsek, 2008).



**Figure 7** : Les molécules de signalisation impliquées dans le quorum sensing : (A) Acylhomosérines lactones (les pentagones rouges) pour les Gram négatif ; (B) les peptides autoinducteurs (Les octogones violets) pour les Gram positif (Wai-Leung et Bonnie, 2009).

### 2.6.3. Rôle de quorum sensing

Le quorum sensing joue des rôles capitaux dans la vie du biofilm tel que :

- La régulation de la physiologie du biofilm (modulation de la population, contrôle de l'épaississement du biofilm) par l'initiation des phénomènes de dispersion.
- La répression et expression de certains caractères : motilité, facteurs de virulence extracellulaires (Irie et Parsek, 2008).
- La protection vis-à-vis les agressions de l'environnement : les rayons ultraviolet (UV), les variations du pH et d'osmolarité, la prédation, les agents antimicrobiens (Ceri *et al.*, 1999).

D'ailleurs, l'altération du mécanisme du QS peut conduire à (Irie et Parsek, 2008) :

- Des modifications phénotypiques des microorganismes du biofilm (augmentation de sensibilité à des antibiotiques et aux antiseptiques).
- Anomalies dans le cycle du développement du biofilm (étapes de formation et de dispersion du biofilm).

### 2.7. La résistance des biofilms aux agents antimicrobiens

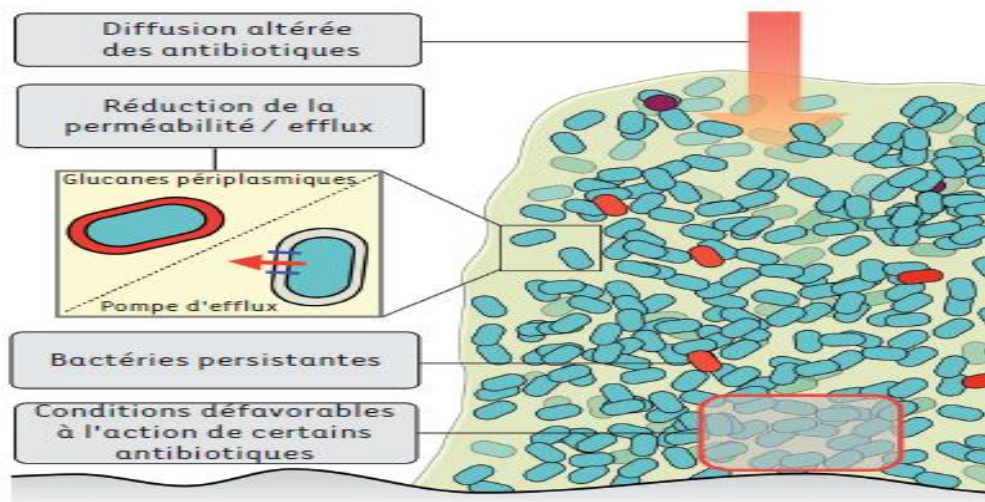
Les cellules sessiles sont 10 à 1000 fois résistantes à l'action des agents antimicrobiens par rapport aux cellules planctoniques de même espèce (Ghada, 2018), ainsi à la réponse immunitaire de l'hôte ; cette persistance se présente dans l'efficacité de la phagocytose qui diminue en présence d'un biofilm (Allison *et al.*, 2018).

La résistance des biofilms (figure 8) est liée aux :

- Propriétés physiologiques des microorganismes modifiées par les conditions de vie du biofilm comme : l'hétérogénéité et l'accès aux nutriments (Roux et Ghigo, 2006) et

l'oxygène, puisqu'il y a des antibiotiques qui exigent sa présence pour qu'ils soient actifs (Zabinski, 1995).

- Modifications des propriétés phénotypiques de quelques gènes de résistance qui s'activent en basses concentrations d'oxygène (Drenkard, 2003).
- Propriétés pharmaceutiques des agents antimicrobiens altérées en présence du biofilm et la diminution de leur efficacité (Utili, 2007).
- A la résistance acquise par une minorité des cellules formant le biofilm qui ont déjà subi l'action de l'antibiotique (Singh *et al.*, 2009).



**Figure 8 :** Hypothèses expliquant le phénomène de tolérance du biofilm vis-à-vis des biocides (antibiotiques et antiseptiques) (Lebeau et Ghigo, 2012).

La récurrence des maladies infectieuses et l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques représentent un danger pour la population mondiale (Jafri *et al.*, 2014) et compliquent de plus en plus le traitement des infections par les antibiotiques (Achmit *et al.*, 2021) ; c'est pourquoi, le développement d'un nouveau mode d'action ou une nouvelle stratégie pour combattre les infections associées aux biofilms est indispensables (Jafri *et al.*, 2014).

*Chapitre III*

*Les techniques  
d'étude des  
biofilms*

---

### III. Techniques d'étude des biofilms

La production de biofilm a été détectée par quatre méthodes différentes incluant : méthode de Plaque de culture tissulaire (TCP), méthode en Tube (TM), culture sur milieu rouge Congo (RCA) et le Biofilm Ring Test (BFRT). La méthode en tube (TM) était supérieure au CRA dans la détection des biofilms et démontre de meilleurs résultats de sensibilité et de spécificité.

#### 3.1.Méthode sur plaque de culture tissulaire « Tissue Culture Plate » (TCP) ou (TCPM)

TCP est la technique idéale utilisée pour détecter la formation du biofilm (Sultan et *al.*, 2019), décrite par Christensen et *al.* Elle permet une évaluation quantitative de la production du biofilm sur des microplaques à 96 puits par mesure de sa densité optique (figure 9). Ces microplaques sont en polystyrène (Zatout et *al.*, 2020).

A partir d'une culture de 18 à 24 h des suspensions bactériennes dans 10 ml de bouillon trypticase soja avec 1 % de glucose, remplir tous les puits par 200µL de cette suspension préparée (trois puits pour chaque isolat) à l'aide d'une micropipette. De même, des organismes témoins positive et négative ont été placés dans les puits et aussi trois puits avec du bouillon BHIB seul utilisé comme contrôle négatif puis incubation des microplaques à 37°C pendant 24 heures.

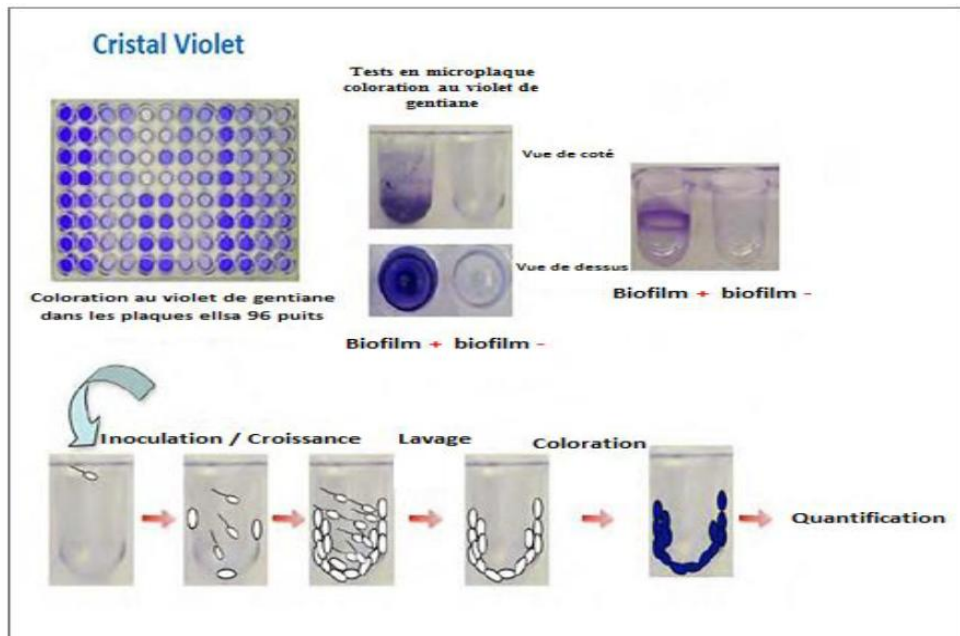
Le lendemain, la plaque a été frappée légèrement à petits coups répétés pour enlever et éliminer l'excès de tous les puits suivi d'un lavage avec 200µL du tampon phosphate salin (PBS) répété 3 fois pour retirer toute les bactéries libres et laisser sécher pendant 30minutes.

Ensuite, une coloration est faite avec du Cristel violet à 0,1 % pendant 30 minute. Après demi heure, un deuxième lavage a été réalisé avec de l'eau déminéralisée (Panda et *al.*, 2016 ; Christensen et *al.*, 1985 ; Bose et *al.*, 2009 ; Bakir et *al.*, 2016).

Enfin, ajouter 200 µl de l'éthanol à 95 % pendant 15 min (Benbrahim et *al.*, 2021), puis lire la plaque à l'aide d'un lecteur ELISA à une longueur d'onde de 570 nm dans le but de mesurer l'absorbance de chaque puits (DO) (Panda et *al.*, 2016 ; Christensen et *al.*, 1985 ; Bose et *al.*, 2009 ; Bakir et *al.*, 2016).

La formation du biofilm est estimée par la comparaison des DO par rapport à la DO du contrôle négatif (témoin), puis ils seront classés selon Vuotto et *al.*, (2017) comme suit : Non

formatrice du biofilm :  $DO < DO_C$  ; Faiblement formatrice du biofilm :  $DO_C < DO < 2 \times DO_C$  ;  
 Modérément formatrice du biofilm :  $2 \times DO_C < DO < 4 \times DO_C$  ; Fortement formatrice du biofilm  
 :  $4 \times DO_C < DO$ .



**Figure 9:** Formation du biofilm en microplaque (la méthode de TCP) (Bellifa, 2014).

### 3.2.Méthode en tube (MT)

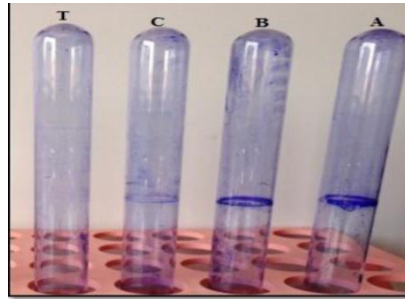
Cette méthode permet la détection de la formation du biofilm.

Des colonies bactériennes ont étéensemencées dans des tubes contenant 10 ml de bouillon trypticase soja additionné de 1 % du glucose avec un tube témoin, puis tous les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures.

Les tubes vont subir les étapes suivantes : (Ruchi et *al.*, 2015 ; Bose et *al.*, 2009 ; Christensen et *al.*, 1982 ).

- ✚ Lavage avec du Phosphate-buffered saline (PBS) trois fois et séchage.
- ✚ Coloration au Cristal violet (CV) à 0,1 %.
- ✚ Deuxième lavage avec de l'eau déminéralisée.

La formation du biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible recouvre le puits et le fond du tube et elle est qualifiée du négative s'il y a apparition d'un anneau à l'interface de l'air liquide (figure 9) (Ruchi et *al.*, 2015 ; Bose et *al.*, 2009 ; Christensen et *al.*, 1982 ).



**Figure 10 :** Evaluation de la production du biofilm par la méthode TM : (A) Souche formatrice du biofilm ; (B) Souche modérément formatrice du biofilm ; (C) Souche non formatrice du biofilm ; (T) Témoin (Bellifa, 2014).

### 3.3.Culture sur Rouge Congo Agar (RCA)

Cette culture est décrite par Freeman et *al*, elle permet la détermination qualitative de la production de biofilm (Freeman et *al* , 1989).

La gélose au rouge Congo est composée de 3,7 g/l du bouillon d'infusion cœur-cervelle (BHI), 50 g/l de saccharose, 10 g/l d'agar g/l) et 0,8 g/l de rouge Congo. Ensuite la solution du Rouge Congo préparée est autoclavée à 121°C pendant 15 minutes (Sultan et *al*, 2019). Ensemencement des cultures bactériennes sur la gélose rouge Congo par stries. La lecture des résultats est effectuée après incubation à 37°C pendant 24 heures en observant l'apparence des colonies.

La formation d'un biofilm est traduite par l'apparition des colonies noires qui indique une forte production de «slime», contrairement aux colonies rouges qui signifient une faible production de ce celui-ci et donc la non formation du biofilm (Mathur et *al*, 2006).

### 3.4.Biofilm Ring Test

La méthode du biofilm Ring Test est plus rapide et plus précise (Di Domenico et *al*, 2016).

C'est une nouvelle technique utilisée pour l'évaluation de la formation du biofilm, réalisée en microplaques à 96 puits en polystyrène (Olivaresa et *al*, 2016) , il ne nécessite pas une étape de lavage ou de coloration.

Son principe est basé sur la mesure de l'immobilisation des microbilles magnétiques ajoutées à une suspension bactérienne au fond des puits de la microplaque. Après les puits sont soumis à une aimantation (figure 11) (Chavant et *al*, 2007; Sulaeman et *al*, 2010).

La solution de toner (TON005) contient 1 à 3  $\mu\text{m}$  de billes magnétiques chargées négativement qui seront mélangée avec une suspension bactérienne (107 bactéries/mL). Ajouter 200 $\mu\text{l}$  de ce mélange dans les puits de la microplaque puis incuber à 37°C.

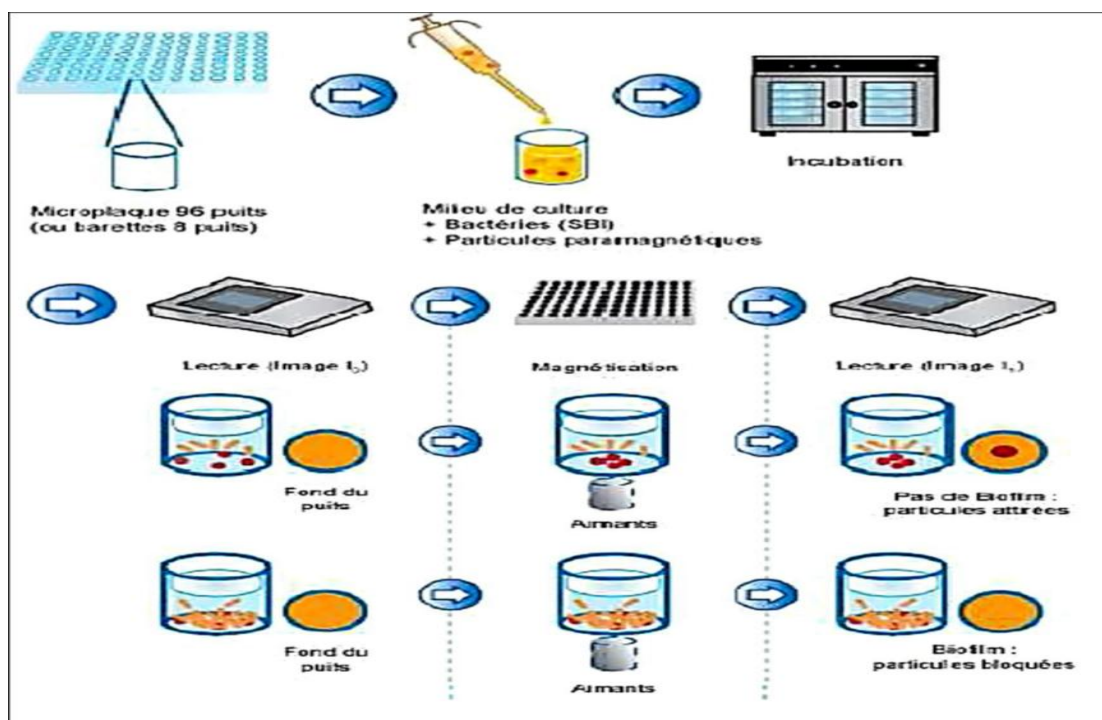
Recouvrir les puits avec quelques gouttes de l'huile opaque inerte (liquide de contraste) utilisée pour la lecture de la plaque, puis scanner avec le lecteur de plaque pour avoir une image.

Ensuite, placer la microplaque sur l'aimant pendant 1 min et scanner une deuxième fois pour avoir une image.

Expression de la capacité d'adhésion de chaque souche par le Biofilm Index (BFI) compté par le logiciel en comparant les 2 images scannées (Liesse Iyamba et *al.*, 2012).

En cas de la non formation du biofilm, il y aura apparition d'un spot visible dû à la migration des microbilles sous l'influence du champs magnétique lors de l'aimantation (Liesse Iyamba et *al.*, 2012).

En présence du biofilm, les microbilles sont piégées par les cellules et elles n'arrivent pas migrer au centre des puits lors de l'aimantation donc la formation du spot au centre des puits n'aura pas lieu (Chavant et *al.*, 2007).



**Figure 11 :** Le principe de Biofilm Ring Test (Perrin, 2009).



*Partie  
expérimentale*

*Chapitre I*  
*Matériel et*  
*méthodes*

---

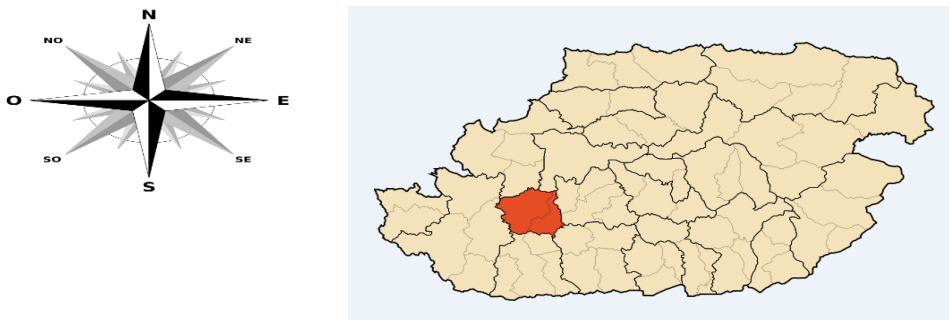
## I. Matériel et méthodes

Le stage pratique a été réalisé au laboratoire de recherche de microbiologie de la faculté des sciences biologiques et sciences agronomiques à l'université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. La présente étude a pour but l'évaluation de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux des écorces du noyer. Le travail expérimental, peut être résumé en trois grandes étapes : l'extraction puis la détermination et l'estimation de l'activité antibiofilm du produit à tester.

### 1.1. Matériel

#### 1.1.1. Matériel biologique

- **Le matériel végétal :** est représenté par les écorces de *Juglans regia*. L recueillis au mois de Mars 2022 au niveau de la daïra de Maatkas située à 20 Km de sud-ouest de Tizi-Ouzou sur 620 m d'altitude. Sa délimitation (figure 12) est faite ainsi : du nord elle est bordée par la daïra de Draâ Ben Khedda ainsi par la daïra de Tizi-Ouzou du Nord-est. A l'est, elle est entourée par la Daïra de Ouadhia, comme elle a des limites avec la daïra de Draa el Mizan (Nord-ouest, ouest et sud-ouest). Et enfin, Maatkas est limitée du sud par la daïra de Boghni.




**Figure 12 :** Zone d'échantillon : la daïra de Maatkas, wilaya Tizi-Ouzou.


- **Les souches bactériennes**


Les cinq souches utilisées appartiennent à la collection de laboratoire de Biochimie et biotechnologie analytique (LABAB) :

- ATCC (American Type Culture Collection) :

-  *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

-  *Bacillus cereus* ATCC 14575

-  *Escherichia coli* ATCC 25922

-  *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

- WDCM (World Data Centre for Microorganisms) :

-  *Enterococcus faecalis* WDCM 00009

### 1.1.2. Matériel du laboratoire

#### 1.1.2.1.Appareillage et verrerie

Le tableau suivant représente l'ensemble des appareillages, de la verrerie et d'autre matériel utilisés dans cette étude :

**Tableau V** : Matériel du laboratoire utilisé.

Appareillage	Verrerie	Autre matériel
- Broyeur	- Bécher	- Coton stérile
- Etuve	- Erlenmeyer	- Passoires
- Lyophilisateur	- Tubes	- Microfiltre
- Balance	- Flacons	- Boîtes Petri
- Agitateur magnétique	- Fiole jaugée	- Portoirs
- Vortex	- Entonnoir	- Pincés
- Autoclave	- Montre en verre	- Pipettes Pasteur
- Bain Marie	- Eprouvette	- Anse Pasteur à fil bouclé
-Spectrophotomètre		- Ecouvillons
- Réfrigérateur		- Barreau magnétique
- Dessiccateur infrarouge		- Dosettes
- Bec Bunsen		- Lames, Lamelles
- microscope optique		- Seringue
- Micropipettes		-les disques vierges
- Micropipette multiposte		- Spatule
- Lecteur ELISA		- Embouts jaunes et bleus
- Centrifugeuse		- Eppendorfs
-Distillateur		- Cryotubes
		- Cuves
		- Tubes de conservation
		- Tube Falcon
		- Microplaque
		- Pissette

#### 1.1.2.2.Milieus de culture

L'ensemble des milieux de cultures utilisés sont résumés dans le tableau suivant.

**Tableau VI** : Les milieux de culture utilisés.

Milieu de culture	Utilisation
Bouillon nutritif BHIB (Brain Heart Infusion Broth)	-Repiquage des souches.
-Gélose nutritive (GN)	-Conservations des souches
Milieu Chapman	-Vérification de la pureté de <i>S.aureus</i>
Milieu ADNase	-Test de l'ADNase
Gélose Cétrimide	-Vérification de la pureté de <i>Pseudomonas</i>
Milieu EMB (Eosin Methylen Blue)	-Vérification de la pureté d' <i>E. coli</i>
Milieu BEA (Bile Esculine Azide)	-Vérification de la pureté d' <i>Enterococcus faecalis</i>
-Gélose Rouge Congo (Annexe 1)	-Etude des Biofilms
-Milieu Muller-Hinton(MH)	-Antibiogramme
-Bouillon nutritif BHIB+ Glucose (Annexe 2)	-Repiquage des souches -Ensemencement sur microplaque
-Bouillon nutritif BHIB+Saccharose (Annexe 3)	- Méthode en tube (TM).

### 1.1.2.3.Réactifs et solvants

Les réactifs et les solvants utilisés durant cette étude sont tous cités dans ce tableau.

**Tableau VII** : Réactifs et solvants utilisés.

	Produit	Utilisation
<b>Solvants</b>	- Eau physiologique	-Standardisation des Inoculum
	-Acide chlorhydrique HCl (1N)	-Révélation de test ADNase
	- PBS (Phosphate-buffered saline) (0.25%) (Annexe 4)	-Lavage de la microplaque
	- Ethanol CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -OH (96%)	- Etude de l'activité antibiofilm
<b>Réactifs</b>	- Cristal violet (CV) (0,1% ; 1%)(Annexe 5)	-Lecture de la Microplaque - Coloration de Gram
	- Lugol	- Coloration de Gram
	-Fushine	- Coloration de Gram
	- Vert de Malachite	- Coloration de la spore
	- Bleu de Toluidine	- Révélation de test ADNase
	- Peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	- Test Catalase
<b>Sels</b>	-Chlorure du Sodium NaCl	- Préparation de l'eau physiologique - Préparation de PBS (Annexe 5)
	-Chlorure de Potassium KCl	- Préparation de PBS
	-Hydrogénophosphate dipotassique K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- Préparation de PBS
	-Phosphate de Sodium dibasique Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- Préparation de PBS

### 1.1.2.4.Antibiotiques

Afin de réaliser l'antibiogramme de *S. aureus*, les antibiotiques ont été choisis selon leur disponibilité et les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM) comme le montre le tableau ci-dessous :

**Tableau VIII** : Les antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme.

Antibiotique	Famille	Abréviation	Concentration
Cephalothin	Beta lactamine	KF	30µg
Ceftriaxone	Beta lactamine	CRO	30µg
Meropenem	Beta lactamine	MRP	10µg
Pipemidic Acid	Quinolone	PI	20µg
Pefloxacin	Quinolone	PEF	5µg

## 1.2.Méthodes

### 1.2.1. Revivification et vérification de la pureté des souches

#### 1.2.1.1.Revivification

Les souches ont été conservées à -10 °C dans des cryotubes contenant du glycérol. Leur revivification nécessite leur décongélation à température ambiante suivie d'une incubation à 37 °C pendant 3 h. Par la suite le contenu de chaque cryotube est versé dans un tube contenant 9 ml du BHIB et qui seront incubés à 37 °C pendant 18 h. Ensuite, les cinq tubes font l'objet d'un repiquage bouillon / bouillon en gardant les mêmes conditions d'incubation. Après 18 h, un deuxième repiquage BHIB/MH (1.5 % d'agar) est réalisé et l'incubation est faite à 37 °C pendant 24 H (figure 13).

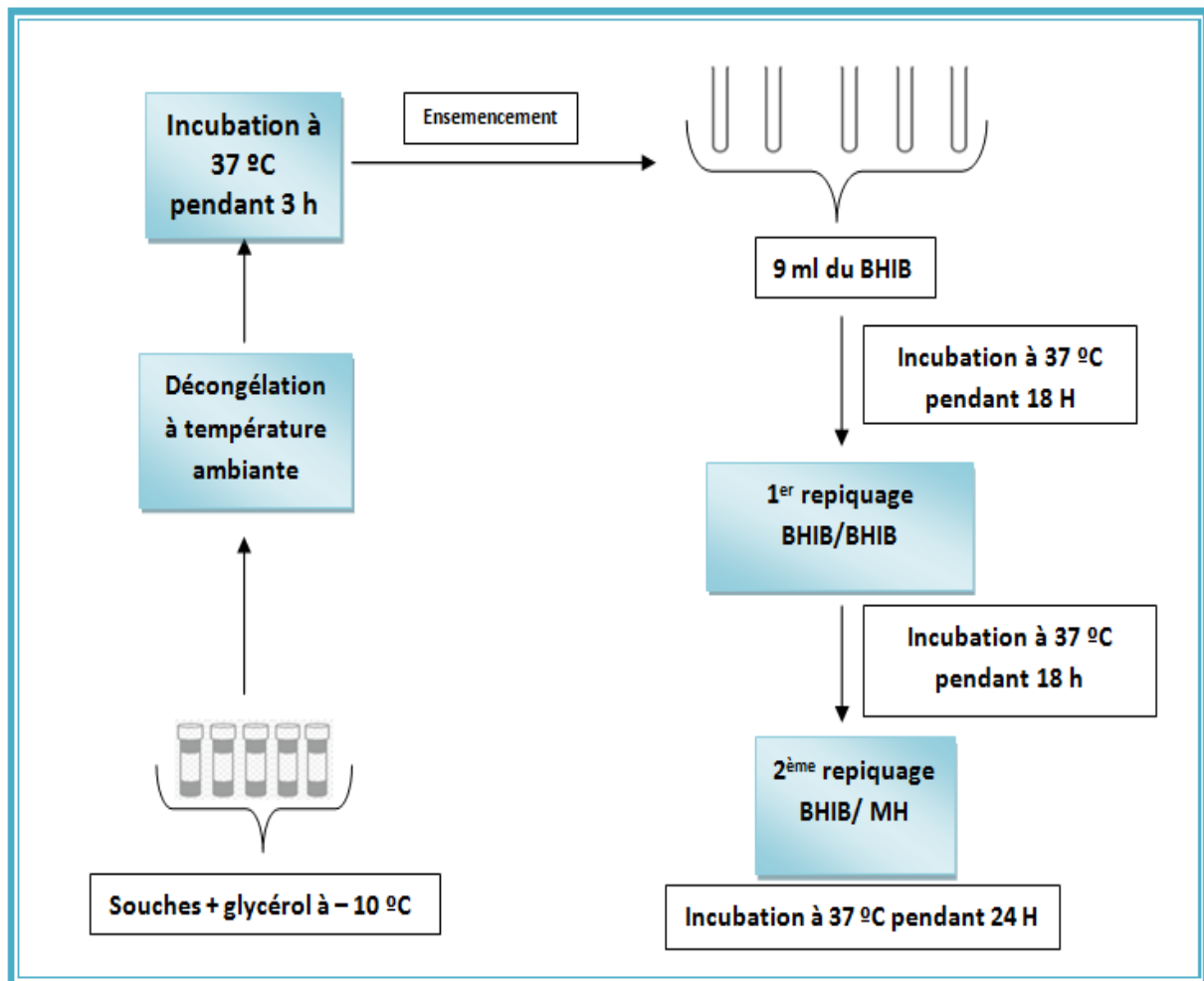


Figure 13 : Revivification de souches.

#### 1.2.1.2.Vérification de la pureté des souches

Le contrôle de la pureté des souches vise à démontrer l'absence de contamination par d'autres germes ce qui se fait conformément à la procédure suivante :

- **Isolement**

A partir des boîtes MH sur lesquelles les souches sont repiquées, des colonies ont été prélevées aseptiquement à l'aide d'un écouvillon stérile et ensemencées en tapis sur leurs milieux sélectifs :

✚ *S. aureus* sur milieu Chapman.

✚ *P. aeruginosa* sur la gélose Cétrimide.

✚ *E. coli* sur milieu EMB.

✚ *E. faecalis* sur gélose BEA.

Après incubation à 37 °C pendant 24 h, la pureté des souches sera vérifiée selon l'aspect des colonies sur leurs milieux sélectifs.

- **Examen microscopique**

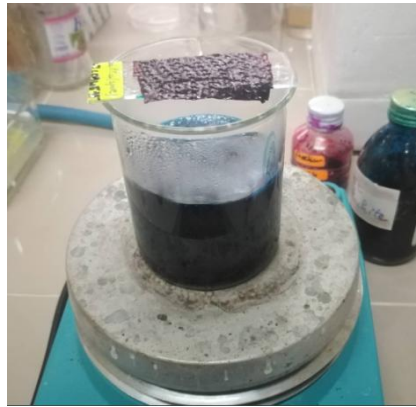
- ✚ **Coloration de Gram**

Cette technique est inventée par Hans Christian Joachin Gram en 1884, elle permet de distinguer les bactéries par leurs aptitude à fixer le cristal violet (Gram positif) ou la fushine (Gram négatif). Les bactéries appartenant aux "Gram +" prenant la couleur violette et les bactéries dites "Gram -" apparaissent roses (Delarras, 2007). Le protocole a été optimisé comme suit (Collégial des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène, 2014) (Annexe 6).

- ✚ **Coloration de la spore**

C'est une technique permettant la visualisation des spores des souches sporulées. La méthode couramment utilisée c'est celle de Schaeffer-Fulton dont le principe c'est faire tacher la spore avec le vert de Malachite qui se lie faiblement au matériel cellulaire et qui sera fixé par la spore par l'effet de chaleur (Aryal, 2022)

En vue de coloration de la spore, la lame contenant le frottis bactérien de *B. cereus* à été déposée sur un bécher contenant de l'eau distillée en ébullition puis recouverte avec un papier absorbant qui sera imbibé avec du vert de Malachite renouvelable pendant 15 minutes (figure 14). La lame doit subir un lavage avec de l'eau courante puis une contre-coloration avec de la Safranine (Fushine) pendant 30 seconde suivi d'un deuxième lavage et enfin séchage à l'air libre. L'observation se fait à l'immersion au grossissement (10 X 100) (le microscope OPTIKA).

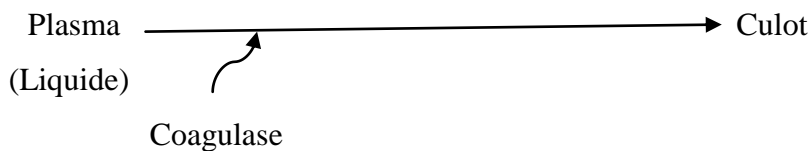


**Figure 14 :** Coloration de la spore de *B. cereus*.

- **Activité enzymatique**

- ✚ **Test de la coagulase**

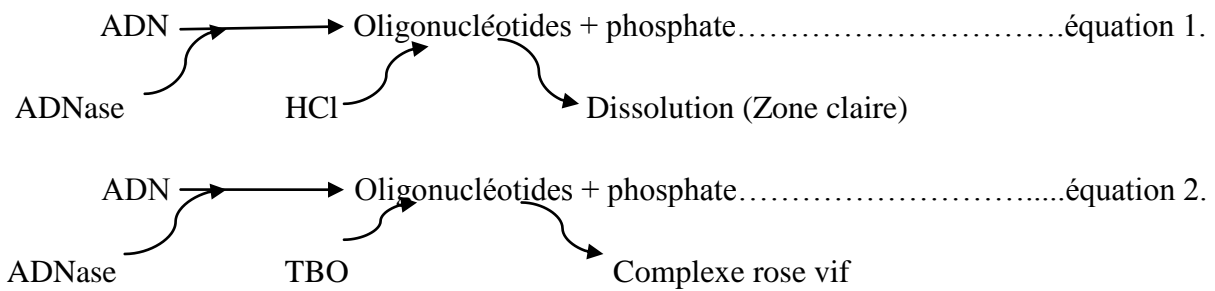
Le test de la coagulase différencie les bactéries *S.aureus* ayant la capacité de coaguler le plasma des autres espèces à coagulase négative comme il est expliqué dans l'équation de réaction ci-dessous. Pour cela, il est transvasé aseptiquement dans deux tubes stériles nommés "tube test de Coagulase" et "tube témoin" respectivement dans le premier 500 µl du plasma humain et dans le deuxième 500 µl de BHIB, puis un volume de 500 µl de la suspension bactérienne de *S. aureus* est ajouté stérilement aux deux qui seront incubés à 37 °C pendant 4 h. Le test est considéré comme positif s'il y a apparition d'un culot au fond de tube test (Sue Katz, 2010).



- ✚ **Test ADNase**

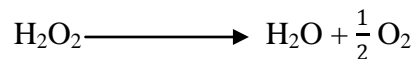
C'est un test utilisé pour indiquer l'aptitude d'un germe à hydrolyser l'ADN et l'utiliser comme source de carbone et de l'énergie pour qu'il assure sa croissance. Il permet souvent de distinguer les *S.aureus* des autres *Staphylococcus*.

Pour le réaliser, une boîte contenant la gélose ADN estensemencée de part et d'autre par écouvillonnage avec une culture de *S.aureus* en BHIB puis incubée à 37°C pendant 24h. Le lendemain une double révélation est faite avec du HCl et le bleu de Toluidine O (TBO) après un temps de réaction d'environ 5 min. Le test est considéré comme positif s'il y a dissolution des oligonucléotides issus de l'ADN par l'effet de l'ADNase formant ainsi une zone claire autour du tapis bactériens inondé par le HCl (équation 1) (Jeffries et al., 1957), et s'il y a apparition d'une zone rose autour de la nappe bactérienne inondée par le TBO suite à une liaison entre le réactif et l'ADN hydrolysé (équation 2) (Schreier, 1969).



### ✚ Test de catalase :

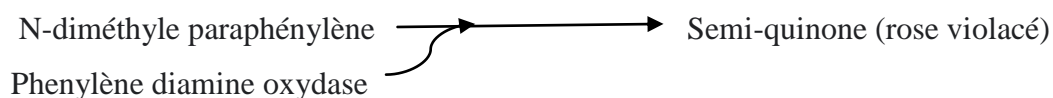
C'est un test qui permet de cerner les espèces bactériennes ayant une enzyme dite "Catalase" capable de décomposer le peroxyde d'hydrogène en H<sub>2</sub>O et en dioxygène O<sub>2</sub> selon cette équation (Taylor et Achanzar, 1972) :



Alors, sur une lame préalablement nettoyée avec de l'alcool, des colonies bactériennes ont été mises en contact avec une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le test est considéré comme positif s'il y a formation de bulles d'air.

### ✚ Test oxydase :

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore "N-diméthyle paraphénylène" (PDA) en semi-quinone (dérivé rose violacé) par l'intervention phenylène oxydase selon l'équation suivante (Steel, 1960) :



Pour cela, une colonie bien isolée à l'aide d'une anse non métallique est frottée pendant 30 secondes sur un disque du réactif déjà déposé sur une lame. Le test est considéré comme positif s'il y a apparition d'une couleur violette.

## 1.2.2. Préparation de l'extrait aqueux des écorces du noyer

L'extrait aqueux a été obtenu par macération des écorces du noyer comme le montre la figure 15.

### 1.2.2.1. Récolte et broyage

Les écorces de *Juglans regia. L* ont été recueillies, lavées avec de l'eau distillée et débarrassées de toutes impureté puis séchées à l'étuve réglée à 40°C pendant 3 jours. Après

séchage, les écorces sont isolés, et ils seront broyés jusqu'à l'obtention d'un broyat sous forme d'une poudre fine.

### 1.2.2.2. Macération à 10%

Afin d'avoir une concentration de 10% (Salhi, 2011), un volume de 100 ml de l'eau distillée a été transvasé dans un bécher déposé sur un agitateur magnétique. A l'aide d'une balance, une quantité de 20g du broyat a été pesée puis versée dans le bécher, ensuite le volume est ajusté à 200 ml par l'ajout de l'eau distillée. Enfin, une agitation *overnight* à température ambiante est appliquée à l'abri de l'air et de la lumière.

### 1.2.2.3. Filtration

L'extrait préparé doit subir plusieurs filtrations, à commencer par la filtration grossière à l'aide d'une passoire et du coton stérile, puis par centrifugation à 6000 tours pendant 15 min, et récupération du surnageant, jusqu'à une filtration microbiologique (Stérile), avec un microfiltre du diamètre de 0,22µm.

Ensuite, le filtrat obtenu est congelé dans des flacons à l'abri de l'humidité et de la lumière.

### 1.2.2.4. Lyophilisation

Le filtrat congelé est lyophilisé et le lyophilisat est conservé à l'abri de l'air et de la lumière et il sera utilisé pour la préparation de l'extrait aqueux.

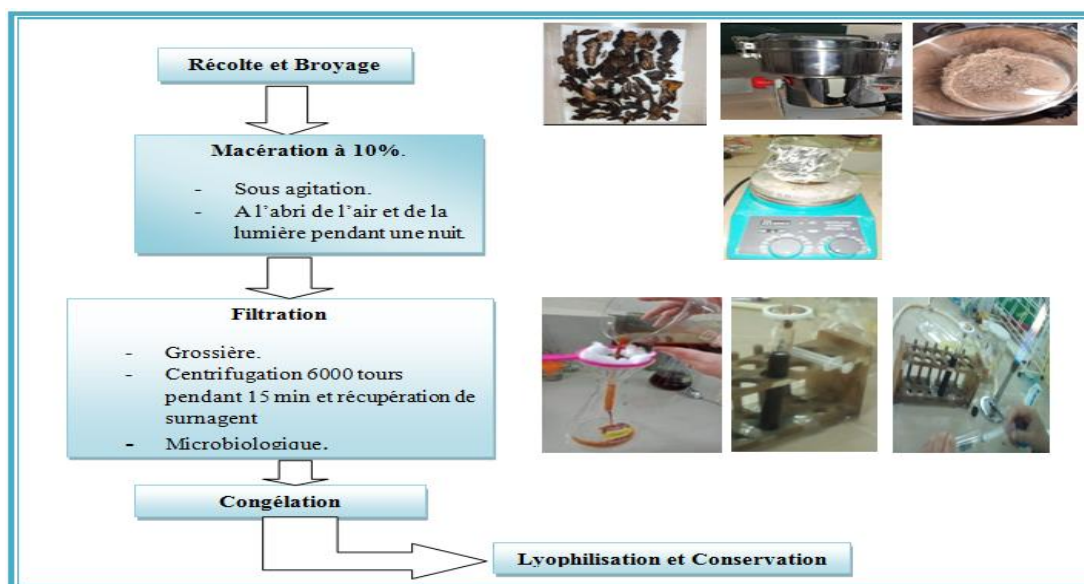


Figure 15 : Les étapes de préparation de l'extrait aqueux des écorces du noyer.

### 1.2.3. Détermination du seuil maximale d'hydratation

Des pesées de 40 mg du lyophilisat sont mélangées par plusieurs prises dans 1 ml de l'eau distillée filtrée jusqu'à avoir une solution d'un aspect pâteux.

#### 1.2.4. Rendement d'extraction

Le rendement est un facteur important à déterminer puisqu'il permet de savoir la quantité et le pourcentage de l'extrait obtenu. Pour cela, le dessiccateur infrarouge (DENVER INSTRUMENT) (Figure 16) est utilisé.

Le dessiccateur infrarouge est un instrument destiné à déterminer le taux d'humidité relative qui peut s'exprimer en pourcentage et en gramme en exposant le produit à une source de chauffage infrarouge ce qui induit une évaporation et donc une perte du poids du produit que l'appareil peut traduire en pourcentage d'humidité.



**Figure 16 :** Le dessiccateur infrarouge et la coupelle.

Pour calculer le rendement de l'extrait, trois essais sont réalisées où l'équivalent de 3g de l'extrait aqueux préparé est étalé sur une coupelle vu que la méthode suivie est optimisée par rapport à celle de lait en poudre (produit solide), puis la coupelle est déposée dans le dessiccateur réglé à 115 °C pendant 15min. Après un quart d'heure, l'appareil affiche la valeur de l'humidité en (%) où celle de la matière sèche en (g).

Enfin, le calcul du rendement est fait suivant cette équation :

$$\text{RE}(\%) = M \times \text{MMS} \times d$$

RE : Le rendement de l'extrait (%).

M : La masse du broyat dans 100 ml de l'eau distillée.

MMS : La moyenne de la matière sèche dans 100 g de solution.

d : La densité du filtrat obtenue par cette relation.

### 1.2.5. Préparation des inoculums et standardisation des souches

Les souches pures ont été conservées en culture sur GN.

#### ➤ Préparation des inoculums

Pour préparer les inoculums, des colonies de chaque souche ont été prélevées à partir des cultures jeunes de 24 h à l'aide de l'anse Pasteur à fil bouclé puis chacune a été dissoute dans un tube contenant 9 ml de l'eau physiologique stérile (9 ‰).

#### ➤ Standardisation des souches

Afin de standardiser l'inoculum à une charge bactérienne de  $10^8$  UFC/ ml, une petite quantité de chaque suspension bactérienne préparée est transvasée dans une cuve pour lire sa densité optique (DO) qui doit être comprise entre 0.08 et 0.1 à une longueur d'onde de 625 nm. Si la DO est faible, l'inoculum va être chargé en ajoutant plus de colonies, si la DO dépasse la limite supérieure, la charge sera diminuée par l'ajout de l'eau physiologique (Aboun et *al.*, 2008 ; Abi-Ayade, 2009).

### 1.2.6. Sélection des souches formatrices des biofilms

#### 1.2.6.1. Sur milieu solide : Rouge Congo Agar (RCA)

Dans le but de détecter les souches formatrices de biofilms, la méthode RCA a été utilisée.

#### ➤ Principe de la technique

Les bactéries en général résident habituellement sous forme d'un biofilm (Nagant, 2013). Certains PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesion) bactériens peuvent interagir avec le Rouge Congo pour former un slime, ce qui donne des colonies noires avec une surface rugueuse sur milieu RCA contrairement aux colonies non productrices qui apparaissent rouges et lisses (Ziebuhr et *al.*, 2001 ; Rewatkar et Wadher, 2013 ; Kara Terki, 2014 ; Bellifa et *al.*, 2016).

#### ➤ Mode opératoire

Chaque souche standardisée, estensemencée séparément et aseptiquement par écouvillonnage en surface sur une boîte du Rouge Congo, ensuite les boîtes sont placées dans l'étuve à 37 °C pendant 24 h.

#### 1.2.6.2. Confirmation sur milieu liquide

#### ➤ Principe de la technique

L'aptitude de formation d'un biofilm est liée principalement à la faculté d'adhérence du microorganisme à une surface (Costerton et *al.*, 1987). Les souches ont été testées par rapport à leur capacité de former un biofilm sur microplaque en Polyvinyl chloride (PVC).

Cette dernière est une méthode de quantification indirecte qui évalue la réponse globale du biofilm basée sur la coloration au cristal violet qui colore toute la biomasse microbienne (Burton *et al.*, 2007).

➤ **Mode opératoire**

Cinq colonnes de la microplaque de 96 puits en PVC ont été remplies aseptiquement par 100µl du BHIB glucosé puis chaque colonne à été inoculée par 40µl de l'une des suspensions bactériennes étudiées (figure 17). La microplaque est ensuite incubée à 37°C pendant 24h.



**Figure 17 :** Inoculation de la microplaque.

Le lendemain, le biofilm est quantifié par la technique du cristal violet (Djordjevic *et al.*, 2002) décrite comme suit :

Le contenu de la microplaque sera vidée et cette dernière subit un premier lavage trois fois par le PBS (0.25%) afin d'éliminer les cellules non adhérentes, après un temps d'agitation de 15min, tous les puits seront remplis par 200 µl du CV (0.1%) pendant un quart d'heure, la microplaque sera de nouveau vidée et un deuxième lavage trois fois avec du PBS aura lieu. Après 15 min, tous les puits seront remplis avec du l'éthanol absolu pour récupérer le CV lié au cellules adhérentes, la lecture se fait après 30 min par la mesure des DO au moyen d'un lecteur Elisa à une longueur d'onde de 560 nm et les résultats seront donnés selon (Vuotto *et al.*, 2017) :

- $DO \leq DO_c$  : la souche est non formatrice du biofilm.
- $DO_c < DO \leq 2 \times DO_c$  : La souche est faiblement formatrice du biofilm.
- $2 \times DO_c < DO \leq 4 \times DO_c$  : la souche est modérément formatrice du biofilm.
- $DO > 4 \times DO_c$  : la souche est fortement formatrice du biofilm.

### 1.2.7. Détermination de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux

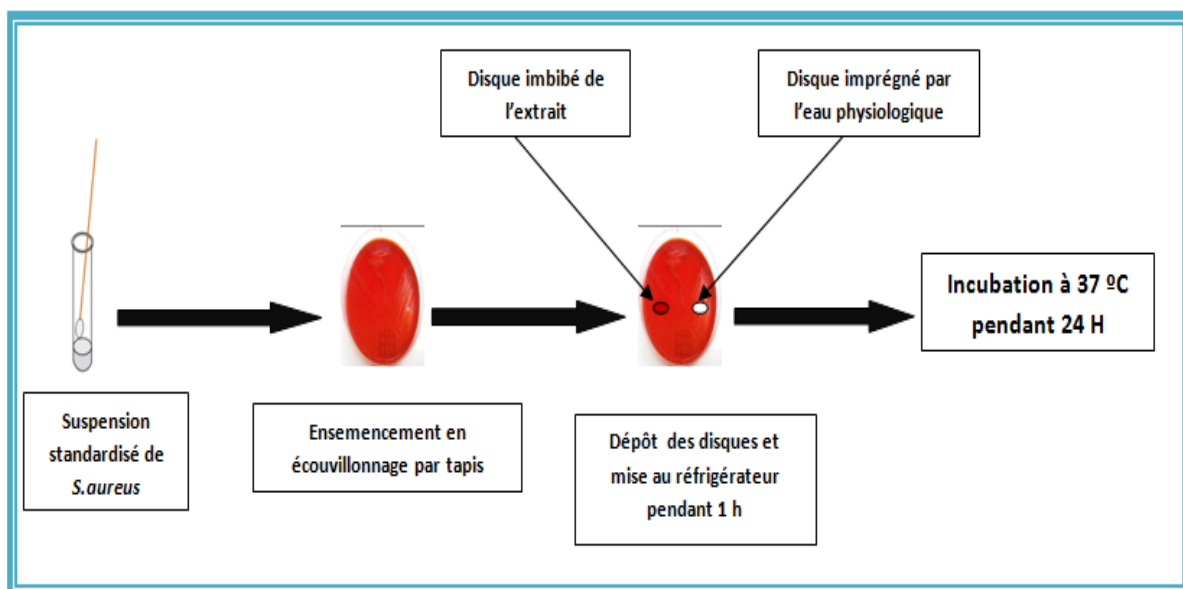
L'activité antibiofilm de l'extrait aqueux du noyer a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose (figure 18).

#### ➤ Principe de la technique

La méthode de diffusion sur gélose a été conçue essentiellement pour la réalisation des antibiogrammes, mais en remplaçant les disques d'antibiotiques par des disques imprégnés de la solution à tester (Schroeder et Messing, 1949) et la gélose MH par le milieu Rouge Congo qui permet la visualisation des biofilms, l'aromatogramme a été réalisé.

#### ➤ Mode opératoire

Une boîte contenant la gélose rouge Congo a étéensemencée en tapis par écouvillonnage avec la suspension de *S.aureus* ATCC 25923 standardisée, puis deux disques vierges ont été déposés aseptiquement de part et d'autre de la boîte, ensuite le disque test a été imprégné par l'extrait aqueux du noyer, le deuxième qui sert de témoin négatif est imbibé de l'eau physiologique. La boîte est mise dans un réfrigérateur pendant 1 h pour empêcher la croissance bactérienne le temps de fixation des disques et de diffusion des solutions, car dans la méthode de diffusion, il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit (Broadasky et al., 1976). Enfin, la boîte est incubée à 37 °C pendant 24 h. Le lendemain, l'activité antibiofilm de l'extrait est confirmée par la mesure des halos d'inhibition autour des disques.



**Figure 18** : Le test de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux des écorces du noyer.

### 1.2.8. Détermination de l'activité anti-formation et l'activité dispersante du biofilm de l'extrait aqueux

Afin de déterminer l'activité anti-formation et l'activité dispersante de biofilm du l'extrait aqueux du noyer vis-à-vis la souche de *S. aureus* ATCC 25923, la méthode du cristal violet en tube (TM) décrite par Cramton *et al.*, (1999) est utilisée avec quelques modifications.

#### ➤ Principe de la technique

C'est une méthode de quantification de la formation d'un biofilm sur un support donnée (Djordjevic *et al.*, 2002) par la mesure de la densité optique de la coloration liée aux cellules adhérentes après d'être solubilisée (Musk *et al.*, 2005).

#### ➤ Mode opératoire

Trois séries de tubes stériles ont été préparées et numérotées de 1 à 3. La première série à été remplie stérilement par 500µl du BHIB, la deuxième par 500µl de BHIB glucosé à 1 %, la troisième par le même volume du BHIB+ 1% du saccharose ; puis tous les tubes seront inoculés par 500µl de la suspension bactérienne de *S.aureus* ATCC 27923 standardisée. Chaque série comporte un tube témoin qui sera directement incubé après d'être inoculé en parallèle avec trois tubes dits curatifs chacun appartient à l'une des séries auparavant citées, auquel un volume de 500µL de l'extrait aqueux non lyophilisé est introduit après incubation puis ils vont être réincubés. Les trois tubes restants sont dits préventifs, un volume de 500µL de l'extrait est transvasé dans chacun d'eux puis ils seront incubés dans les mêmes conditions que les premiers : 37 °C pendant 24h (figure 19). Après incubation, les tubes vont être vidés et lavés trois fois avec du PBS puis séchés à température ambiante pendant 15min, chaque tube sera l'objet d'une coloration avec du Cristal Violet à 0.1% pendant un quart d'heure, ensuite le colorant sera éliminé et un deuxième lavage trois fois avec du PBS aura lieu. Enfin, chaque tube sera rempli par 1 ml de l'éthanol absolu (Djordjevic *et al.*, 2002), les DO seront obtenues au moyen du spectrophotomètre réglé à 560 nm et le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :

$$I (\%) = \frac{DO_{T\acute{e}moin} - DO_{Echantillon}}{DO_{T\acute{e}moin}} \times 100$$



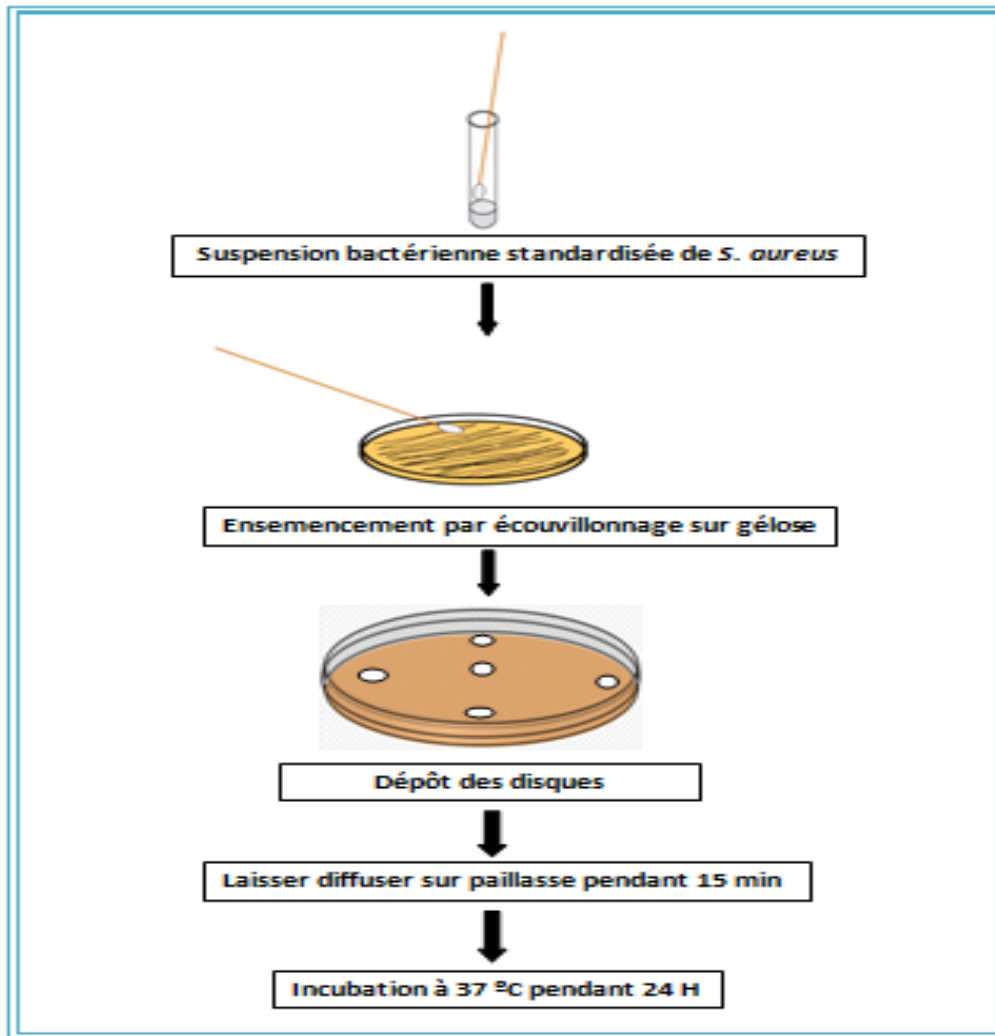


Figure 20 : La réalisation de l'antibiogramme

## 1.2.10. Evaluation de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux

### 1.2.10.1. Méthode de diffusion sur gélose

L'activité antibiofilm a été évaluée sur milieu solide par la méthode de diffusion sur gélose (Bayer *et al.*, 1966).

#### ➤ Préparation de l'extrait lyophilisé

Faire dissoudre aseptiquement 0.84 g du lyophilisat qui représente le seuil maximal d'hydratation dans 1 ml de l'eau distillée filtrée. Afin d'économiser la quantité d'extrait utilisée, une dilution à  $\frac{1}{2}$  est réalisée pour avoir une nouvelle solution dont la concentration est égale à 0.42 g/ml et qui sera considérée comme solution mère après avoir démontré par un test son pouvoir inhibiteur du biofilm. La solution mère (SM), est ensuite pipetée dans un eppendorf stérile nommé 1.

➤ Préparation des dilutions à 1/2

Préparer une série d'ependorfs numérotés de 2 à 12 contenant 500µl de l'eau distillée filtré. Prélever stérilement un volume de 500 µl de chaque eppendorf et l'introduire aseptiquement dans l'eppendorf qui le suit comme le montre la figure 21, puis homogénéiser.

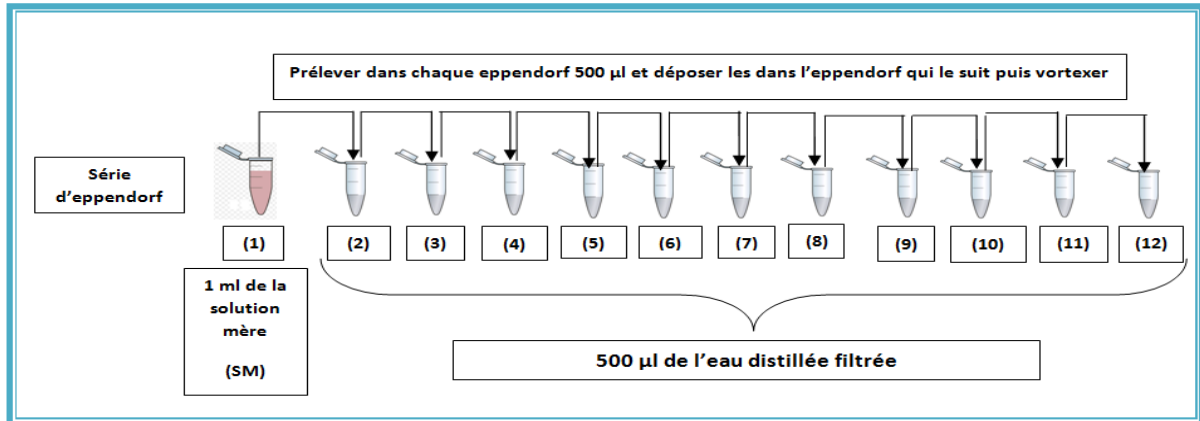


Figure 21 : Préparation des dilutions à 1/2

Les dilutions sont représentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau IX : Le tableau de dilutions.

Eppendorfs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilutions	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Concentration (g/mL)	0.42	0.21	0.10	0.052	0.02	0.01	0.006	0.003	0.001	0.0008	0.0004	0.0002

➤ Aromatogramme

Sur une boîte Rouge Congoensemencée stérilement par écouvillonnage en tapis avec la suspension de *S.aureus* ATCC 25923 standardisée, un disque vierge est déposé aseptiquement en haut de la boîte et un disque d'antibiotique CRO 30 (témoin positif) est déposé en bas. Au milieu de la boîte, et dans les mêmes conditions d'asepsie, 12 disques vierges numérotés de 1 à 12 ont été placés puis chacun est imbibé par 5 µl de la dilution de l'extrait correspondante à son numéro, par contre celui de haut est imbibé par 5 µl de l'eau physiologique (témoin négatif) (figure 22). Après avoir fixé les disques et diffusé les solutions par mise au réfrigérateur pendant 1 h et incubé à 37 °C pendant 24 h, la lecture des résultats a été faite par la mesure des zones d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle graduée (Gulluce et al., 2007).



**Figure 22** : L'aromatogramme.

### 1.2.10.2. Sur milieu liquide

La concentration minimale inhibitrice du biofilm (CMIB) est le paramètre le plus utilisé *in vitro* pour la mesure de l'activité d'un agent antimicrobien (Fauchère et Avril, 2002). Elle est définie en tant que la plus faible concentration d'un agent antimicrobiens qui empêche la formation du biofilm (Acquaviva et *al.*, 2019). Afin de la déterminer, la méthode d'évaluation en microplaque à 96 puits a été appliquée comme décrite en bas.

#### ➤ Préparation de l'inhibiteur

Transvaser aseptiquement 500 $\mu$ L de l'eau physiologique dans un eppendorf stérile contenant deux disques d'antibiotiques CRO30, puis vortexer pour avoir l'inhibiteur concentré à 120 $\mu$ g / ml.

#### ➤ Méthode d'évaluation en microplaque

La technique utilisée c'est celle décrite par Islam et *al.*, (2008) modifiée selon ce protocole :

- Remplir aseptiquement 26 puits (2 puits témoin positif, et 24 puits test) par 100  $\mu$ l du BHIB glucosé et 4 puits (2 puits témoin négatif et 2 puits de DO<sub>C</sub>) par 140  $\mu$ l du même milieu de culture.
- Introduire stérilement un volume de 40  $\mu$ l de l'inhibiteur préparé dans les 2 puits témoin positifs et 40  $\mu$ l de la solution mère ou de l'une de ses dilutions dans chaque puits test.
- Inoculer tous les puits auparavant cités par 40  $\mu$ l de la suspension bactérienne standardisée de *S. aureus* ATCC 25923 à l'exception des deux puits de DO<sub>C</sub>.
- Incuber la microplaque à 37 °C pendant 24 h.
- Le lendemain, quantifier les biofilms formés par la technique du cristal violet (Djordjevic et *al.*, 2002) décrite dans 1.2.6.2. (figure 23).

➤ **Calcul du pourcentage d'inhibition**

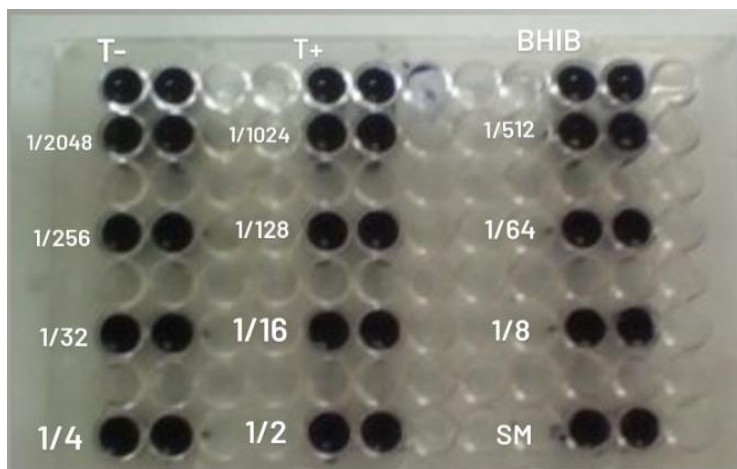
Le pourcentage d'inhibition est une mesure de l'efficacité d'un composé donné pour inhiber une fonction biologique ou biochimique spécifique. Le calcul de ce paramètre est fait selon l'équation donnée par (Merghni *et al.*, 2015) :

$$I (\%) = \frac{DO_c - DO_{ech}}{DO_c} \times 100$$

I (%) : Pourcentage d'inhibition.

DO<sub>c</sub> : la densité optique contrôle présentant l'absorbance du BHIB+ saccharose.

DO<sub>ech</sub> : la densité optique des échantillons.



**Figure 23** : La quantification du biofilm par la méthode de coloration au cristal violet.

*Chapitre II*  
*Résultats et*  
*discussions*

---

## II. Résultats et discussions

### 2.1. Rendement d'extraction

Après filtration de l'extrait aqueux des écorces de *Juglans regia. L* obtenu par macération, le volume final de celui-ci est estimé de 110 ml. Le rendement d'extraction est calculé sur la base de la formule citée dans la page 30 en exploitant les caractéristiques des filtrations obtenus. En conséquence, le rendement est égale à 44.64 %  $\pm$  1.2.

D'une part, le rendement de l'extrait de *Juglans regia. L* est étroitement dépendant de la méthode de l'extraction utilisée, car d'après Harouak et al., (2021), le rendement aqueux des écorces du noyer est estimé de 18.13 % quand l'extraction est faite par infusion, 5.63 % par la méthode de décoction et 11.25 % par la méthode de Soxhlet (Méthode d'extraction à chaud), or que le plus fort rendement est obtenu dans la présente étude ou l'extraction est faite par macération.

D'autre part, et d'après Almonte-Flores et al., (2015), le rendement est très lié au type du solvant d'extraction, il ont pu montré que l'extraction aqueuse assure un meilleur rendement par rapport à l'extraction organique vu que le rendement de l'extrait aqueux était égale à 21.40 %, par contre les rendements des extraits organiques ont été plus faibles : 6.76 % pour l'éthanol absolu, 10.54 % pour l'éthanol à 70 % et 1.05 % pour l'acétate-éthyle. Cette conclusion est confirmée par nos résultats où le rendement est beaucoup plus élevé même par rapport à l'extrait aqueux obtenu par Almonte-Flores et ses collaborateurs.

De plus, le rendement de l'extraction varie selon la partie traitée de la plante, comme exemple les extrait aqueux des feuilles obtenus par trois méthodes différentes : Infusion, décoction et la méthode de Soxhlet dont les rendements sont estimés de 21.25 %, 19.28 % et 29.38 % respectivement pour les trois méthodes sont nettement élevés par rapport aux taux des rendements des extraits aqueux des écorces obtenus par les trois méthodes ; Contrairement au rendement obtenu par la présente étude qui était élevé par rapport à celui de Harouak et al., (2021).

Pour récapituler, le rendement de présent travail était très élevé par rapport aux rendements obtenus dans la totalité des études antérieures ; Cette différence est dépendante de nombreux facteurs tels que : l'âge de la plante, la partie traitée de la plante, l'état du matériel végétal avant l'utilisation, la période de la récolte, l'origine géographique (effet du milieu), et

le mode d'extraction (Abdelmounaim, 2013). Et d'après (Bruton, 1999), les variations du rendement peuvent être attribuée non seulement à l'origine géographique de la plante, mais également aux nombreux facteurs comme : le stade de croissance, les conditions pédoclimatiques, le lieu de production, l'état de fraîcheur du végétal.

## 2.2. Contrôle de la pureté des souches

L'aspect des souches sur les milieux gélosés et les résultats microscopiques ainsi que les recherches de certains enzymes confirment leurs puretés et appartenances comme le montre le tableau XI et l'annexe 7.

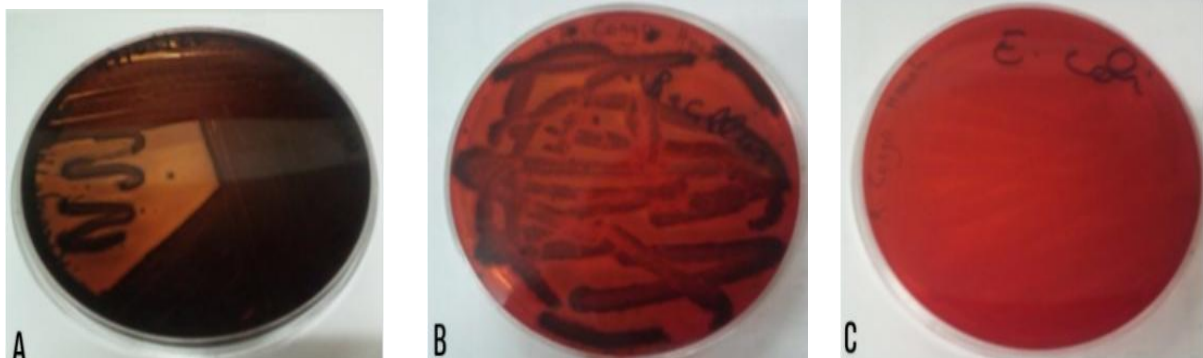
**Tableau XI :** Les résultats de l'examen microscopique et de l'activité enzymatique.

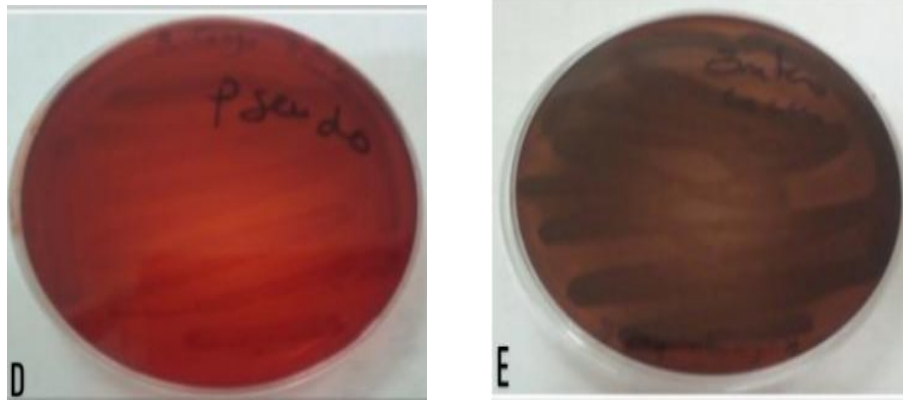
Test Souche	Aspect	Coloration de Gram (Annexe 7)	Coloration de la spore (Annexe 8)	Coagulase (Annexe 9)	ADNase		Catalase	Oxydase
					HCl	Bleu de Toluidine		
<i>S. aureus</i> ATCC 27923	Cocci (Diplocoque/am as en grappe de raisin)	+	/	+	+	+	+	/
<i>B. cereus</i> ATCC 14575	Bacilles en chainette	+	+	/	/	/	+	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Bacilles	-	/	/	/	/	-	/
<i>E. faecalis</i> WDCM 00009	Cocci en chainette	+	/	/	/	/	-	/
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Bâtonnet	-	/	/	/	/	-	+

## 2.3. Sélection des souches formatrice des biofilms

### 2.3.1. Sur milieu solide RCA

L'observation phénotypique de capacités des souches à former des biofilms à été faite par la méthode de Rouge Congo Agar décrite par Freeman et *al* (1989), qui est une technique qualitative (Mathur et *al.*, 2006) classique. Les résultats de screening visuel sont montrés par la figure 24 et résumés par le tableau XII.





**Figure 24 :** Résultat de production de slime : (A): *S. aureus* ATCC 25923 ; (B) : *B. cereus* ATCC 14575; (C) : *E. coli* ATCC 25922 ; (D) : *P. aeruginosa* ATCC 27853 ; (E) : *E. faecalis* WDCM 00009.

**Tableau XII :** La formation des biofilms sur milieu RCA.

Souche	Couleur des colonies	Production des PIA	Interprétation
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Noire foncée	+	Fortement formatrice
<i>B. cereus</i> ATCC 14575	Rouge et noir	+/-	Variablement formatrice
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Rouge	-	Non formatrice
<i>E. faecalis</i> WDCM 00009	Noirâtre	+	Variablement formatrice
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	rouge	-	Non formatrice

Chaieb et *al.*, 2005 ont dénoncé que le milieu Rouge Congo est très convenable pour la détection des souches productrices de slime, car les souches présentant le PIA développent des colonies noires avec une surface rugueuse, contrairement aux souches à PIA négatif qui donnent des colonies rouges et lisses. La couleur noire est le résultat d'une interaction entre le slime et le colorant Rouge Congo, la diminution de cette association signifie la diminution de la quantité de slime produit, ce qui donne un aspect de couleur plus claire (Fabres-klein *et al.*, 2015). Donc et après 24 h d'incubation, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 14575, *E. faecalis* WDCM 00009 ont été détectées comme souches productrices du biofilm, notant que ces deux dernières sont variablement formatrices.

La méthode RCA est basée sur l'analyse visuelle des colonies, de plus elle est moins coûteuse et sa réalisation est facile, mais elle a une faible précision (Kaiser et *al.*, 2013). Bellifa (2014) a également dénoncé que la méthode RCA semble être moins efficace pour la détection et la quantification des biofilms formés *in vitro*. Dans le même contexte, Taj et *al.*, (2012), ont montré que le dépistage par la technique de rouge Congo n'est pas recommandé pour l'étude de la formation de biofilm ; d'où l'intérêt d'une confirmation sur milieu liquide.

### 2.3.2. Sur milieu liquide TCP

Afin de déterminer dans quelle mesure les souches étudiées forment des biofilms, ces dernières sont mises à un test sur milieu liquide au moyen de la microplaque à 96 puits suivant la méthode de culture tissulaire (TCP) décrite par Christensen et *al.*, (1985).

Dans un premier temps, l'utilisation de l'éthanol absolu pour la récupération du cristal violet pénétré dans les cellules à permet la détection visuelle des biofilms formés sur les parois de la microplaque, la coloration intense des puits fait référence à la formation d'un biofilm et leur clarté signifie l'absence de ce dernier (figure 25)

Et dans un second temps, l'estimation de l'importance de cette capacité à été faite d'une part par la lecture de l'absorbance à 560 nm (tableau XIII).

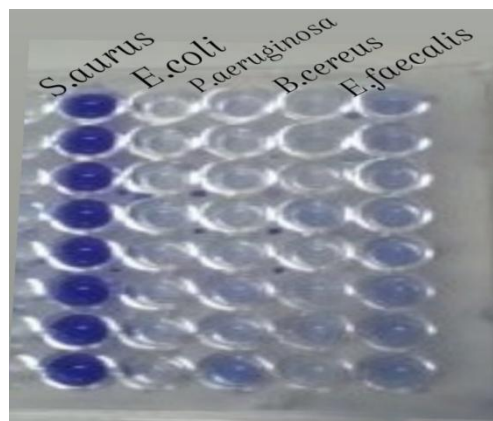


Figure 25 : Aspect de la microplaque lors de la lecture.

Tableau XIII: Les moyennes des densités optiques de chaque souche et leurs écarts type relatifs.

Colonne	Moyenne de densité optique (MDO)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3.03675± 0.144
<i>B. cereus</i> ATCC 14575	0.4715± 0.278
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.122625± 0.032
<i>E. faecalis</i> WDCM 00009	0.56275± 0.327
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.16375± 0.055

Et d'autre part, par la comparaison des moyennes des densités optiques de chaque souche avec l'absorbance de bouillon BHI stérile ( $DO_c=0.191$ ) et la classification des souches en catégories selon (Vuotto et al., 2017) comme il est détaillé dans le tableau XIV.

**Tableau XIV** : L'importance de formation des biofilms par les cinq souches.

Souche	Comparaison	Interprétation
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	$MDO > 4 \times DO_c$	Fortement formatrice
<i>E. coli</i> ATCC 25922	$MDO < DO_c$	Non formatrice
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	$MDO < DO_c$	Non formatrice
<i>B. cereus</i> ATCC 14575	$2 \times DO_c < MDO < 4 \times DO_c$	Modérément formatrice
<i>E. faecalis</i> WDCM 00009	$2 \times DO_c < MDO < 4 \times DO_c$	Modérément formatrice

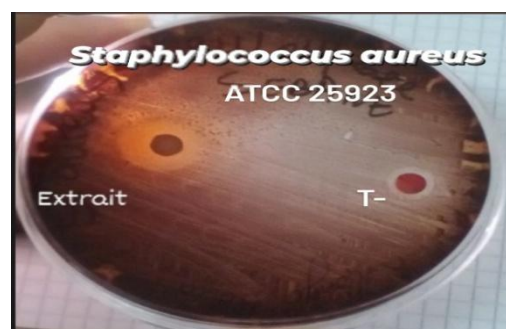
**MDO** : La moyenne des densités optiques de la souche en question.

Pour conclure, les résultats trouvés dans le test de sélection des souches formatrices des biofilms sur milieu solide sont confirmés et *S. aureus* ATCC 25923 sera retenue pour le reste de l'expérimentation puisqu'elle est la seule souche fortement formatrice.

La méthode TCP est la meilleure technique pour le dépistage de la formation du biofilm *in vitro* (Bellifa et al., 2013). D'après Racha et ses collaborateurs, cette méthode permet de tester plusieurs souches simultanément ainsi la détermination quantitative de leur capacité d'adhésion (Racha et al., 2012). En plus, c'est une technique pratique et économique pour la détermination des facteurs et des conditions de cultures optimales pour la formation du biofilm. Cependant, elle peut être moins précise pour déterminer la capacité des souches à sécréter le slime bactérien (Castro Melo et al., 2013).

#### 2.4.Détermination de l'activité antibiofilm

L'activité antibiofilm de l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Juglans regia*. L a été testée sur le milieu solide RCA. Après 24 h d'incubation, une zone d'inhibition d'environ 15 mm apparaît autour de disque imbibé d'extrait aqueux, contrairement au disque témoin imbibé de l'eau physiologique autour duquel y a apparition d'un halo d'environ 7 mm (Figure 26).



**Figure 26** : l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux des écorces de *Juglans regia*. L sur *S.aureus* ATCC 2592.

Selon Duraffourd et *al.*, (1990), une zone d'inhibition inférieure à 8 mm signifie l'absence de sensibilité ; le diamètre compris entre 8 et 14 mm fait référence à une sensibilité limitée, alors que la sensibilité est qualifiée de moyenne si le diamètre est entre 14 et 20 mm. Enfin, un diamètre supérieur ou égal à 20 mm indique une forte sensibilité.

Et ceci, confirme l'activité antibiofilm de l'extrait utilisé.

### 2.5. Activité anti-formation et activité dispersante du biofilm de l'extrait aqueux

Afin de déterminer l'activité antiadhésive et l'activité dispersante de l'extrait aqueux de *Juglans regia*. L vis-à-vis le biofilm de *S.aureus* ATCC 25923, le test a été réalisé dans trois milieux différents : BHIB, BHIB glucosé à 1%, BHIB saccharosé à 1% ; et pour chaque milieu, trois tubes ont été préparés : un tube témoin, un tube préventif et un tube curatif. Pour rappel, l'extrait utilisé pour ces tests, c'est l'extrait aqueux non lyophilisé concentré à 10 %.

L'évaluation des deux activités antiadhésive et dispersante à été faite par le calcul du pourcentage d'inhibition et les résultats sont rapportés par le tableau XV.

**Tableau XV** : Le calcul de pourcentage d'inhibition.

Série	Tube	% d'inhibition
Série 1 BHIB	Témoin 1	/
	Préventif 1	1.7
	Curatif 1	1.5
Série 2 BHIB + Glucose	Témoin 2	/
	Préventif 2	14.3
	Curatif 2	5.9
Série 3 BHIB + Saccharose	Témoin 3	/
	Préventif 3	21.6
	Curatif 3	27.9

D'après les résultats, l'extrait aqueux des écorces du noyer possède à la fois un effet anti-formateur du biofilm et une activité dispersante du biofilm après sa formation ; notant que , l'activité antiadhésive est plus importante que l'activité dispersante dans le milieu BHIB et le BHIB glucosé, ce qui semble en accord avec tant d'études antérieures, comme celle réalisée par Khalid et *al.*, (2020), qui ont trouvé que l'extrait de racines et d'écorces de *Juglans regia* dans un milieu contenant le BHIB seul, a réduit l'attachement de la souche de *S.aureus* avec environ 58 % , comme il a pu inhibé 50 % du biofilm préformé. Ainsi, d'après Chaieb et *al.*, (2013), l'importance de l'activité antiadhésive à l'égard du *S. aureus* dans un milieu glucosé à 2 % est supérieure à celle de l'activité dispersante du biofilm de la même souche dans les même conditions environnementales, avec des pourcentages d'inhibition

estimés de 6.25 % et 2.5 % pour les deux activités respectivement. Néanmoins, les pourcentages d'inhibitions indiquées par les deux études, sont largement différents par ceux obtenus par la présente étude, et cela pourrait s'expliquer par : la différence des souches utilisée, la période et la région de la cueillette de la plante, la partie du végétale utilisée, la méthode d'extraction, la concentration de l'extrait utilisée et aussi le temps d'incubation.

L'activité antibiofilm de l'extrait aqueux des écorces du noyer à pu atteindre son seuil dans le milieu saccharosé, inscrivant que, l'activité antiadhésive est clairement inférieure par rapport à l'activité dispersante, et ça indique que l'activité antibiofilm est influencée par les conditions environnementales.

La comparaison des DO des tubes témoins montre que le biofilm est mieux formé dans le tube contenant le milieu glucosé puisque sa DO estimé de 2.96 est supérieure à celles du tube contenant le BHIB seul et du tube BHIB saccharosé dont les DO sont égale à 2.909 et 2.848 respectivement.

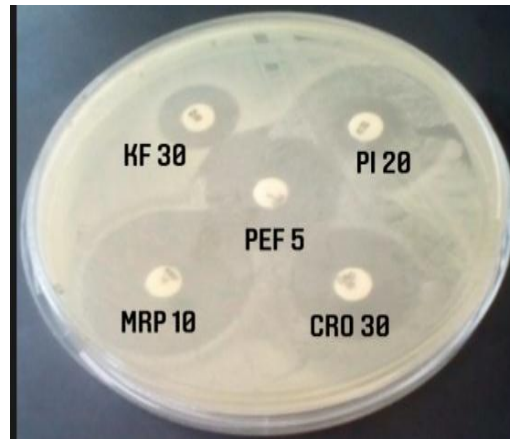
Sur ce fait, le milieu glucosé, sera retenu pour le test de détermination de la CMIB sur milieu liquide.

### 2.6. Antibiogramme

L'antibiogramme a été réalisé dans le but de sélectionner le témoin positif représenté par l'antibiotique auquel *S. aureus* ATCC 25923 est sensible et sa zone d'inhibition est moyenne d'une façon à éviter le croisement entre les halos d'inhibition dans les tests postérieurs (figure 27). Les résultats sont les suivants :

**Tableau XVI** : Les zones d'inhibition en (mm)

Souche	Antibiotique	Zone d'inhibition (mm)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	KF 30	16
	CRO 30	22
	MRP 10	29
	PI 20	29
	PEF 5	25



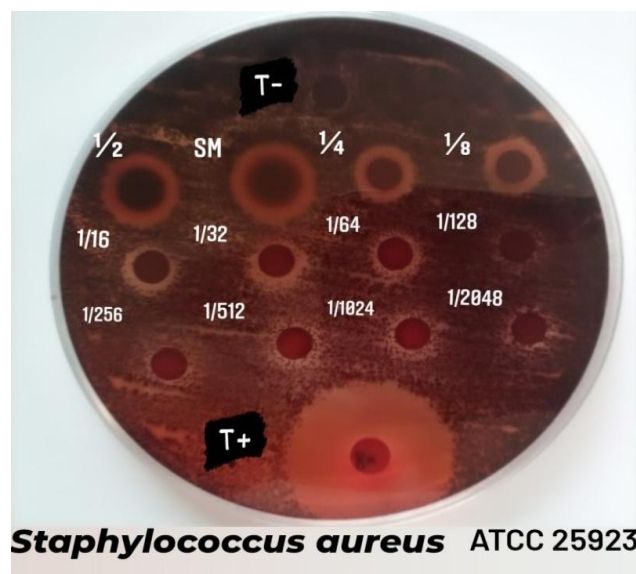
**Figure 27** : L'antibiogramme de *S.aureus* ATCC 25923.

Par conséquent, l'antibiotique Ceftriaxone (CRO 30) a été choisi pour être le témoin positif pour le reste de l'étude.

## 2.7.Evaluation de l'activité antibiofilm

### 2.7.1. Sur milieu solide (Aromatogramme)

L'aromatogramme a été fait suivant la méthode de diffusion sur gélose (Figure 28), dans le but d'évaluer l'activité antibiofilm de l'extrait vis-à-vis *S.aureus* ATCC 25923. Après 24 H d'incubation à 37 °C, les résultats sont rapportés par la mesure des zones d'inhibition comme ils sont montrés dans le tableau XVII.



**Figure 28** : L'effet antibiofilm de plusieurs concentrations de l'extrait aqueux vis-à-vis *S.aureus* ATCC 25923.

**Tableau XVII:** Les zones d'inhibition correspondantes à chaque disque.

Disque	Concentration (g/ml)	Zone d'inhibition (mm)
Témoin négatif (T-)	/	-
Témoin positif (T+) (CRO 30)	0.00003	26
SM	0.42	13
1/2	0.21	11
1/4	0.10	10
1/8	0.052	9
1/16	0.02	-
1/32	0.01	-
1/64	0.006	-
1/128	0.003	-
1/256	0.001	-
1/512	0.0008	-
1/1024	0.0004	-
1/2048	0.0002	-

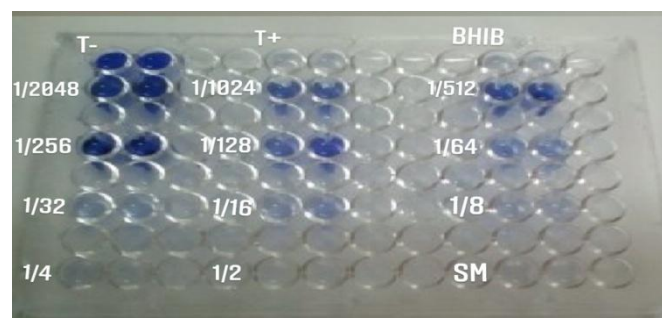
(-) : Absence de zone d'inhibition.

La lecture est faite selon Duraffourd et *al.*, (1990), par conséquent, il est constaté qu'à des concentrations d'extrait inférieures à 0.052g/ml, les souches sessiles de *S. aureus* ATCC 25923 sont résistantes puisqu'il n'y a aucun halo d'inhibition. Au-delà de cette concentration, une sensibilité limitée est constatée puisque les zones d'inhibition apparaissent sont supérieures à 8 mm, mais inférieures à 14 mm, tandis qu'elles présentent une forte sensibilité pour l'antibiotique CRO 30 vu que sa zone d'inhibition dépasse 20 mm.

Tant d'études antérieures ont signalées que la concentration d'un agent antimicrobien capable d'inhiber les cellules formant un biofilm est peut être 10 à 1000 fois plus élevées que celle nécessaire pour inhiber leurs homologues planctoniques (SFM, 2010 ; Afif Chaouche, 2018).

### 2.7.2. Sur milieu liquide

L'évaluation de l'effet antibiofilm de l'extrait aqueux des écorces de *Juglans regia*. L'vis-à-vis le biofilm de *S. aureus* ATCC 25923 a été faite suivant la méthode de microdilution en bouillon sur la microplaque de 96 puits (figure 29). La mesure de l'absorbance à 560 nm et le calcul des moyennes des DO ont permis l'obtention du tableau XVIII.



**Figure 29 :** Aspect de la microplaque après la récupération du cristal violet.

**Tableau XVIII :** Densités optiques des biofilms du *S. aureus* ATCC 25923 à une longueur d'onde de 560 nm après 24 h d'incubation.

Puits	BHIB	T+	T-	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
[ ]	/		/	0.42	0.21	0.10	0.052	0.02	0.01	0.006	0.003	0.001	0.0008	0.0004	0.0002
DO	0.191 ± 0.13	0.084 ± 0.032	2.43 ± 0.14	0.07 ± 0.01	0.1 ± 0.008	0.111 ± 0.024	0.171 ± 0.007	0.222 ± 0.009	0.28 ± 0.054	0.466 ± 0.007	0.9 ± 0.44	0.915 ± 0.009	1.680 ± 0.047	2.073 ± 0.87	2.341 ± 0.013

[ ] : La concentration en (g/ml).

La CMIB est déterminée par la comparaison des densités optiques des puits test à la densité du BHIB stérile (DO<sub>c</sub>). Elle correspond au premier puits ayant une densité inférieure à la DO<sub>c</sub> ; en conséquence, la CMIB égale à 0.052 g/ml. Le résultat confirme ceux obtenus en milieu solide.

Le calcul du pourcentage d'inhibition, indique que l'extrait concentré à 0.052 g/ml a un effet inhibiteur du biofilm d'environ 93 %, et l'extrait non dilué, concentré à 0.42 g / ml a un effet estimé de 97.12 %.

Ce qui concorde avec les résultats d'une étude menée par Chaieb et *al.*, (2013), sur l'effet antibiofilm de l'extrait d'écorces de *Juglans regia* Tunisien vis-à-vis le biofilm de *S.aureus* ATCC 25923, où ils ont déterminé une CMIB50 égale à 43 µg / ml et une CMIB90 équivalente à 202 µg / ml.

La CMIB obtenues dans la présente étude est très supérieure à celle obtenue par Chaieb et ses collaborateurs, ce qui indique que l'activité antibiofilm de l'extrait étudié est clairement faible par rapport à celle de l'extrait des écorces de *Juglan regia* Tunisien.

En revanche, le présent extrait a pu assurer une inhibition qui peut être qualifiée d'importante malgré qu'il était dilué à 1/8, contrairement à l'extrait des écorces de *Juglans regia* Tunisien dont l'inhibition est de moins en moins faible au fur et à mesure que l'extrait sera dilué. Ce qui signifie que le pouvoir inhibiteur de l'extrait aqueux étudié est plus fort que celui étudié par Chaieb et *al.*

Cette conclusion est en contradiction par rapport au résultat déjà rapporté par d'autres études telle que : Quave et *al.*, (2008) ; Acquaviva et *al.*, (2019) disant que le pouvoir inhibiteur des écorces du noyer fonctionne d'une manière dose-dépendante.

Cette contradiction, peut être justifiée par la différence de la période et de la région de la cueillette de la plante, l'âge du végétal, l'état du matériel végétal avant l'utilisation et le mode d'extraction (Abdelmounaim, 2013).

Il a également été constaté que l'extrait de pellicule du *Juglans regia L.* induit une réduction significative des biofilms des staphylocoques à coagulase négative (Acquaviva et *al.*, 2019).

Comme il a été démontré que les extraits des feuilles et des fruits de *Juglans regia* issus de cinq clones différents présentent une activité antibiofilm d'environ 95 % vis-à-vis les staphylocoques, et ils peuvent servir d'agents antimicrobiens précieux contre les infections liées aux *Staphylococcus* (Milek et *al.*, 2022).

Les composés organiques présentant dans les extraits des plantes, notamment ceux des extraits des feuilles et des fruits de *Juglans regia* peuvent modifier les caractéristiques de la surface (hydrophobicité, hydrophile et rugosité, texture) empêchant ainsi l'adhésion bactérienne et la formation du biofilm (Ghosh et *al.*, 2020).

# *Conclusion*

---

## Conclusion

Les biofilms sont des formes microbiennes très résistantes aux agents antimicrobiens et les désinfectants, alors ils posent un véritable problème de santé humaine et un défi majeur pour la communauté médicale.

C'est pourquoi, le développement des médicaments d'origine végétale est devenu une nécessité incontournable pour remédier la résistance des bactéries aux antibiotiques, en particulier, après avoir démontré scientifiquement leurs effets bénéfiques sur la santé.

Le noyer commun «*Juglans regia. L*» est largement utilisé dans le monde pour son effet antioxydant, antidiabétique, anti-inflammatoire, anti-athérogène ainsi pour ses effets protecteurs du foie, et aussi par nos aïeux, notamment pour l'hygiène de la cavité buccale en raison de ses propriétés anti-infectieuses.

Les staphylocoques à coagulase positive font partie des pathogènes humains les plus ubiquitaires et dangereux, du fait de leur virulence et de leur capacité à développer une résistance aux antibiotiques.

A base de ces données, la présente étude qui consiste au criblage de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux des écorces de *Juglans regia. L* vis-à-vis les biofilm formés par les souches de *Staphylococcus aureus ATCC 25923* était réalisée, dont l'objectif capital est de valoriser la médecine traditionnelle ainsi d'apporter des arguments scientifiques sur son effet inhibiteur du biofilms qui peuvent être exploités dans l'industrie pharmaceutique et la médecine contemporaine.

La comparaison des résultats obtenus dans le présent travail aux résultats des études antérieures peut affirmer que l'extraction aqueuse par macération permet l'acquisition d'un meilleur rendement.

L'expérimentation a pu indiquer la présence à la fois d'une activité anti-attachement ainsi d'une activité dispersante du biofilm préformé de l'extrait aqueux des écorces du noyer.

L'activité antibiofilm de l'extrait des écorces du noyer vis-à-vis les bactéries sessiles du *S. aureus ATCC 25923* s'élève à 93 % pour une CMIB égale à 52 mg / ml. Un résultat si intéressant compte tenu de l'inhibition presque totale de la formation du biofilm.

A la lumière des résultats obtenus, il semble que l'exploitation du noyer commun est prometteuse pour le traitement des infections associées aux biofilms, pour cela il est recommandé de réaliser des investigations scientifiques approfondies sur les molécules qui confèrent à cette plante son activité antibiofilm.

Il est également important que les recherches sur les thérapies anti-infectieuses basées sur les agents antibiofilm présents dans le noyer *Juglans regia L.* fassent l'objet des essais cliniques.

*Références*  
*Bibliographique*

---

-A-

**Abi-Ayad F. Z. (2009).** Analyse de l'huile essentielle de thuya de Berbérie (*Tetraclinis articulata*) de la région de Tlemcen et de son activité antimicrobienne. Mémoire de magister. Université Abou-bakr Belkaid. Tlemcen, Algérie. 104p.

**Aboun A., Ammari H., Belazouz T., Benslimani A., Rahal K. et Tali M.H. (2008).** Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle nationale. Selon les recommandations de l'OMS. Ministère de l'Agriculture et de développement rural, Ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière. 4<sup>ème</sup>Ed. Algérie. 98p.

**Abu Taha N. Et Al-wadaan M.A. (2011).**Utilité et importance du noyer, *Juglans regia* Linn : Une revue. Faculté des sciences, Université King Saud, Riyad 11415, Arabie Saoudite. Vol. 5(32) ,pp.5796-5805.

**Achmit M., Aoussar N., Mellouki F., Mhand R.A., Ibáñez, M.D., Blázquez M.A., ... & Rhallabi N. (2021).** Activité in vitro antibactérienne et inhibitrice du biofilm de l'huile essentielle de sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (vahl) contre les isolats cliniques de *Staphylococcus aureus* associés aux cathéters. *Recherches actuelles en biotechnologie*. 3, 1-5.

**Acquaviva R., D'Angeli F., Malfa G.A., Ronsisvalle S., Garozzo A., Stivala A., Ragusa S., Nicolosi D., Salmeri M. et Genovese C. (2019).** Antibacterial and anti-biofilm activities of walnut pellicle extract (*Juglans regia* L.) against coagulase-negative staphylococci. *Natural Product Research*. 35 (12): 1-19.

**Afif Chaouche T., Arab K., Laoufi R. et Malek M. (2018).** Inhibition du biofilm formé par *Klebsiella pneumoniae* responsable d'infection urinaire par l'huile essentielle et les polyphenols de *Lavandula officinalis*.

**Akbas M.Y. (2015).** Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. pp 383-394.

**Ali-Shtayeh M.S. et Abu Ghdeib, S.I. (1999).** Activité antifongique de extraits de plantes contre les dermatophytes. *Mycoses* . 42: 665-772.

**Almonte-Flores D.C., Paniagua-Castro N., Escalona-Cardoso G. et Rosales-Castro M. (2015).** Pharmacological and Genotoxic Properties of Polyphenolic Extracts of *Cedrela odorata* L. and *Juglans regia* L. Barks in Rodents. *Hindawi*.8p.

**Alnnasouri, M. (2010).** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France. *Applied and Environmental Microbiology*. 52, pp 1242-1246.

**Aryal s. (2022).** Coloration des endospores- Principe, réactifs, procédure et résultat. *Microbiology Info.com*.

**Aumeran C., Balestrino D. et Forestier C. (2020).** Biofilm bactériens et santé. *Encyclopédie de l'environnement*. pp 1-7.

-B-

**Bakir S.H. et Ali F.A. (2016).** Comparaison de différentes méthodes de détection de la production de biofilms chez les bactéries multirésistantes à l'origine d'une pharyngo amygdalite. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*.3:13-22.

**Banks KM., Bryers JD. (1992).** Deposition of bacterial cells onto glass and biofilm surfaces. *Biofouling*. 6, pp 81–86.

**Batsatsashvili K., Mehdiyeva N., Fayvush G., Kikvidze Z., Khutsishvili M., Maisaia I., Sikharulidze S., Tchelidze D., Alizade V., Aleksanyan A. Paniagua-Zambrana N.Y. et Bussmann R.W. (2017).** *Juglans regia L.* Dans : Bussmann RW, éditeur. Ethnobotanique du Caucase. Cham, Springer International Publishing.

**Bayer, A., W. Kirby., Sherris J. et Turck M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of clinical pathology*. 45 (4):493-496.

**Baytop T. (1999).** Thérapie avec des plantes médicinales en Turquie (passé et présent), 2e éd., Nobel Medicine Publisher, Turquie.

**Bellifa S., Hassaine H., M'hamedi I., Kara Terki I., Lachachi M. et Didi W. (2013).** Formation of biofilm in microfermentor by *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the university hospital of Tlemcen. 4th International Woekschop on Biotechnology.Tlemcen. Algeria.

**Bellifa S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid, Tlemcen.

**Bellifa S., Hassaine H., Kara Terki I., Didi W., M'hamedi I., Lachachi M, Benamar I., Morghad T. et Gaouar S. (2016).** Study of biofilm production and antimicrobial resistance pattern of *Klebsiella Pneumoniae* isolated from urinary catheter at the university hospital of Tlemcen. *American Journal of Microbiology and Biotechnology*. 3(2): 13-17.

**Benbrahim C., Barka M.S., Benmahdi L., Zatout A., et 1Khadir, A. (2021).** *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamase in Regional Military University Hospital of Oran, Algeria: antibiotic resistance, biofilm formation, and detection of blaCTX-M and blaTEM genes. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*.Vol.22 No.1 :28-37.

**Benkhniq O., Ben Akka F., Salhi S., Fadli M., Douira A. et Zidane L..(2014) .** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc). *Journal of Animal and Plant Sciences*.Vol 23, Issue 1: 3539-3568.

**Bhat J., Malik Z.A., Ballabha R., Bussmann R.W. et Bhatt A.B. (2015).** Plantes ethnométricales traditionnellement utilisées dans les pratiques de soins de santé par les habitants de l'ouest de l'Himalaya. *Journal of Ethnopharmacology*.172:133–44.

**Blumenthal M. (2000).** Herbal Medicine (Monographies élargies de la Commission E), Integrative Medicine Communications, Editeur, Angleterre.

**Bose S., Khodke M., Basak S. et Mallick S.K. (2009).** Detection of biofilm producing *Staphylococci*: need of the hour. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 3: 1915-1920.

**Branda S.S., Vik Å., Friedman L., et Kolter R., (2005).** Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13: 20-26.

**Bryers J.D. (1987).** Surfaces biologiquement actives; processus gouvernant la formation et la persistance de biofilms. *Biotechnologie*. 3 : 57-68.

**Branger A., Richer M-M. et Roustel S. (2007).** microbiochimie et alimentation. Ed educagri. pp 131-140.

**Broadasky, T. F., Lewis, C. et Eble, T.E. (1976).** Bioautographic thin layer chromatophic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *Journal of Chromatography*. 123, 33-44.

**Burton E., Yakandawala N., Lo Vetri K. et Madhyastha M.S. (2007).** A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *Journal Indian of microbiology and biotechnology*, 34: 1-4.

**Bussmann R.W., Batsatsashvili K., Kikvidze Z., Mubalievva S., Ghorban Ai., de Boer H. et Kool A .(2020).** *Juglans regia L. JUGLANDACEAE*. PP 433-441.

**Bussmann R.W. (ed).** Ethnobotanique du Caucase. Springer Cham, Éditeur Springer International XXVII, 2017; 746p. (ISBN 978-3-319-49411-1).

**Bussmann R.W., Paniagua Zambrana N.Y., Sikharulidze S., Kikvidze Z., Kikodze D., Tchelidze D., Khutsishvili M., Batsatsashvili K. et Hart R.E. (2016).** Une ethnobotanique comparée de **Khevsureti, Samtskhe-Javakheti, Tusheti, Svaneti et Racha-Lechkhumi**, République de Géorgie (Sakartvelo), Caucase. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 12:43. <https://doi.org/10.1186/s13002-016-0110-2>.

**Bussmann R.W., Paniagua Zambrana N.Y., Sikharulidze S., Kikvidze Z., Kikodze D., Tchelidze D., Batsatsashvili K. et Hart RE. (2018).** Frères inégaux - utilisation de plantes et de champignons à Guria et Racha, Sakartvelo (République de Géorgie), Caucase. *Indian Journal of Traditional Knowledge*.17(1):7–33.

**Bussmann R.W., Paniagua-Zambrana N.Y., Sikharulidze S., Kikvidze Z., Kikodze D., Jinjikhadze T., Shanshiashvili T., Chelidze D., Batsatsashvili K. et Bakanidze N. (2014).** Vin, bière, tabac à priser, médecine et perte de diversité - voyage ethnobotanique dans le Caucase en Géorgie . *Ethnobotany Research and Applications*. 12:237–313.

-C-

**Castro Melo P., Ferreira L .M., Filho A. N., Zafalon L. F., Godoy Vicente H .I. et de Souza V. (2013).** Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian journal of microbiology*.44 (1): 1517-8382.

**Ceri H., Olson M.E, Stremick C, Read R.R., Morck D. et Buret A. (1999).** The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 1771-1776.

**Chadda D. (2008).** Influence des matières organiques (feuilles, châtons et racines) du noyer (*Juglans regia L.*) sur le comportement de jeunes plants de pommier (*Malus domestica Borkh*) dans la région de R'haouat (Hidoussa) (Belezma), Thèse de magister; Université de Batna, Algeria, 173p.

**Chaieb K., Mandouani K. et Bakhrouf A. (2005).** Detection of *icaA* and *icaD* loci by Polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit, *Journal of Hospital Infection*, (61) 225-230.

**Chaieb K., Koouidhi B., Ben Slama R., Fdhila K., Zmantar T. et Bakhrouf A. (2013).** Cytotoxicity, Antimicrobial, Antioxydant, and Antibiofilm Properties of Tunisian *Juglans regia* bark Extract . *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 19 (2) : 168-179.

**Chalvet de Rochemonteix, A. (2009).** Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat. École Nationale Vétérinaire D'Alfort Paris.

**Characklis W.G. (1973).** Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research*. 7, pp 1249-1258.

**Characklis W. G. 1981.** Bioengineering report: fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 23(9): 1923-1960.

**Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hébraud M. et Bernardi T. (2007).** Un nouveau dispositif d'évaluation rapide du potentiel de formation de biofilm par les bactéries. *J Microbiological Methods*. 68:605–612. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2006.11.010>.

**Chicurel M. (2000).** Bacterial Biofilms and infectious. Slimbusters. *Nature*. 408 (6810): 284-6.

**Cho S., Naber K., Hacker J. et Ziebuhr W. (2002).** Detection of the *ica* *A**D**B**C* gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agent*. 19:570-575.

**Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L. et Beachey E.H. (1982).** Adhérence des souches de *Staphylococcus epidermidis* productrices de boue aux surfaces lisses. *Infection and Immunity*.37:318-26.

**Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M. et Beachey E.H. (1985).** Adhérence des staphylocoques à coagulase négative aux plaques de culture tissulaire en plastique: un modèle quantitatif pour l'adhérence des staphylocoques aux dispositifs médicaux. *Journal of Clinical Microbiology*. 22:996-1006.

**Cramton S.E., Gerke C., Schnell N.F., Nichols W.W. et Götz F. (1999).** The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection of Immunity*. 67(10):5427–5433.

**Cramton S.E., Ulrich M. et Gotz F. (2001).** Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infection Immunology*.69:4079-4085.

**Coghlan, A. (1996).** Slime city. *New Scientist*. 2045, 32-36.

**Collégial des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène. (2014).** Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie-Structure. *UMVF-Université Médicale Virtuelle Francophone* ;3-4.

**Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., et Marrie T.J. (1987).** Bacterial biofilm in nature and disease. *Annual Review of microbiology*, 41:435-464.

**Costerton J.W., Geesey G.G et Cheng, K.J. 1978.** How bacteria stick. *Scientific American*. 238:86-95.

**Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R. et Lappin-Scott H. M. (1995).** Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 49(1), pp 711-745.

**Costerton J.W. (1999).** Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11, pp 217-721.

**Costerton J.W., Stewart P.S. et Greenberg E.P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284, pp 1318-1322.

**-D-**

**Delaviz H., Mohammadi J., Ghalamfarsa G., Mohammadi B. et Farhadi N. (2017).** : A Review Study on Phytochemistry and Pharmacology Applications of Juglans Regia Plant. *Pharmacognosy Reviews*. 11 (22) :145-152.

**Di Domenico E.G., Toma L., Provot C., Ascenzioni F., Sperduti I., Prignano G., Gallo M.T., Pimpinelli F., Bordignon V., Bernardi T. et Ensoli F. (2016).** Development of an *in vitro* Assay, Based on the BioFilm Ring Test® for Rapid Profiling of Biofilm-Growing Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 7 (1429):1-14.

**Djelloul Daouadji, S. (2010).** Détection de biofilm a *staphylocoques* sur cathéters veineux. Mémoire de Magister. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.

**Djordjevic D., Wiedmann M. et Mc Landsborough LA. (2002).** Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2950-2958.

**Donlan R.M. (2002).** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*; 8, 9: 881– 890.

**Donlan R.M., et Costerton J.W., (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 67-193.

**Drenkard E. (2003).** Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection*. 5, pp 1213-1219.

**Duraffourd C., D’Hervicourt L. et Lapraz J.C., (1990).** Cahiers de phytothérapie clinique. 1.Examens de laboratoire galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2<sup>ème</sup> éd. Masson, Paris.

-E-

**El Azzouzi F. et Zidane L. (2015).** La flore médicinale traditionnelle de la région de Béni-Mellal (Maroc). *Journal of Applied Biosciences*. 91:8493 – 8502.

-F-

**FAO (2008).** Données FAOSTAT. Organisation pour l'alimentation et l'agriculture, Rome.

**FAO (2016).** Annuaire statistique de la FAO. La production agricole. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

**Fabres-Klein M.H ., Caizer Santos M.J., Contelli Klein R. de Souza G.N. et Andrea de Ribon O.B. (2015).** An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus* BMC, *Veterinary Research*, 1: 1-10.

**Fauchère J.L. et Avril J.L. 2002.** Bactériologie générale et médicale. Ellipse Editions Paris, 365p.

**Fedorov A.A. (1984).** éditeur. Ressources végétales de l'URSS : plantes à fleurs, leur composition chimique, utilisation, Familles Magnoliaceae – Limoniaceae. *Akademia Nauk : Leningrad*. Vol 1, 460 p. (en russe)

**Filloux A. et Vallet 1. (2003).** Biofilm : mise en place et organisation d'une Communauté bactérienne. *Medecine /Sciences*. 77-83.

**Flemming , H.C.(1990).** Introduction: biofilm as a particular form of microbial life. in *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Stuttgart.

**Flemming H.C. (2011).** the perfect slime. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 86(2): 251-259.

**Freeman D. J ., Falkiner F. R. et keane C.T. (1989).** Newmethod for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. *Journal of Clinical Pathology*. 42:872-874.

**Fujita T., Sezik E., Tabata M., Yesilada E., Honda G., Takeda Y., Tanaka T. et Takaishi Y. (1995).** La médecine traditionnelle en Turquie VII. Médecine populaire dans les régions du centre et de l'ouest de la mer Noire. *Botanique économique*. 49: 406-422.

-G-

**Gandev S. (2007).** Ebourgeonnement et greffage du noyer (*Juglans regia L.*) et leur efficacité en Bulgarie. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 13: 683-689.

**Germain E. (1992).** Le noyer. In: A. Gallais et H. Bannerot (Eds), Amélioration des espèces végétales cultivées, objectifs et critères de sélection, INRA, Paris, pp 620-632.

**Germain E. (1999).** Le Noyer. Centre Technique Interpr. Publication des Fruits et Légumineuses (CTIFL) 280.

**Ghosh A., Jayaraman N., et Chatterji D. (2020).** Small-Molecule Inhibition of Bacterial Biofilm. *ACS Omega*. 5(7) : 3108–3115.

**Girzu M., Carnat A., Privat A.M., Fialip J., Carnat A.P. et Lamaison J.L. (1998).** Effet sédatif de l'extrait de feuille de noyer et de la juglone, un constituant isolé. *Pharmaceutical Biology*. 36: 280-286.

**Gruenwald J. et al., (2001).** PDR pour Phytothérapie. *Médicinal Économique*.

**Goetz C., Dufour S., Archambault M., Malouin F. et 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.

**Goller C.C., Romeo T. 2008.** Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322, pp 37- 66.

**Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferara D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., et Ozkan H. (2007).** Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia L. ssp. longifolia*. *Food Chemistry*. 104: 1449-1456.

#### -H-

**Harouak H., Ibjibjen J. et Nassiri L. (2021).** Chemical profile of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, and *Juglans regia L.* and *Olea europaea L. var. Sylvestris* used against oral diseases: in vitro analysis between polyphenolic content and aqueous extraction optimization. *Heliyon*.7: 1-8.

**Henrici A.T. (1933).** Studies of freshwater bacteria. A direct microscopic technique. *Journal of Bacteriology*. 25, 277-287.

**Heukelekian H. et Heller A. (1940) .** Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology* 40:547-558.

#### -I-

**Ibrar M.F.H. et Sultan A. (2007).** Etudes ethnobotaniques sur les ressources végétales de Ranyal Hill, District Shangla, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*. 39:329-337.

**Irie Y. et Parsek M. (2008).** Quorum sensing and microbial biofilm, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322: 67-84.

**Islam B., Khan S.N., Haque I., Alam M., Mushfiq M. et Khan A. U. (2008) .** Novel antiadherence activity of mulberry leaves: inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from *Morus alba*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. vol. 62,p. 751–757.

#### -J-

**Jafri H., Husain F. M., & Ahmad I. (2014).** Antibacterial and antibiofilm activity of some essential oils and compounds against clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical and Therapeutic Sciences*, 1(1), 65-71.

**Jaradat N.A. (2005).** Plantes médicinales utilisées dans la médecine populaire palestinienne pour le traitement du diabète sucré et des maladies cardiaques. *Journal of Al-Aqsa University*. 19:1-28.

**Jeffries C. D., Holtman D. F., et Guse D. G. (1957).** Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *Journal of Bacteriology*. 73, 590–591.

**Johannes K.M., Knobloch M.A., Horstkotte H. et Dietrich M. (2002).** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*. 191: 101–106.

**Jones H.C., Roth, I.L. et Sanders W.M. (1969).** Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of Bacteriology*. 99:316-325.

-K-

**Kaileh M.b., Berghea W.V., Boonec E., Essawib T., Haegemana G. (2007).** Criblage de plantes médicinales indigènes palestiniennes pour une activité antiinflammatoire et cytotoxique potentielle. *Journal of Ethnopharmacology*. 113: 510-516.

**Kaiser TD., Pereira EM., Dos Santos KR., Maciel EL., Schuenck RP et Nunes AP. (2013).** Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 75: 235-239.

**Kaplan J.B. (2010).** Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*. 89, pp 205-218.

**Kara Terki I. (2014).** Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de *staphylocoques* isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat .Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

**Karimi R., Ershadi A., Vahdati K et al. (2010).** Caractérisation moléculaire des populations de noyers persans en Iran avec des marqueurs microsatellites. *HortScience* .45: 1403–1406.

**Khalid M., Bilal M., Munir H., Shah S.K.H., Khurshid M., El-Shazly M. et Iqbal H.M.N. (2020).** *In-vitro* Evaluation of Anti-Bacterial, Anti-biofilm and Cytotoxic Activity of Naturally Inspired *Juglans regia*, *Tamarix aphylla* L., and *Acacia modesta* with Medicinal Potentialities. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 14(2):1133-1142.

**Kim H.G., Cho J.H., Jeong E.Y., Lim J.H., Lee S.H. et Lee H.S. (2006).** Activité inhibitrice de croissance du composant actif isolé des fruits de *Terminalia chebula* contre les bactéries intestinales. *Journal of Food Protection*. 69:2205-2209.

**Kunwar R.M. et Adhikari N. (2005).** Ethnomédecine du district de Dolpa, Népal : les plantes, leurs noms vernaculaires et leurs usages. *J. Écol. App.*, 8:43-49 .

**Kuwar et al. (2006).** Ethnomédecine en Himalaya - une étude de cas de Dolpa, Humla, Jumla et Mustang districts du Népal.

**Kunwar R.M., Népal B.K., Kshetri H.B., Rai S.K. et Bussmann R.W. (2006).** Ethnomédecine dans l'Himalaya : une étude de cas des districts de Dolpa, Humla, Jumla et Mustang au Népal. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2:27.

-L-

**Labrecque, J., C. Bodet, F. Chandad, et D. Grenier. (2006).** Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58 (2):439-443.

**Landini P., Antoniani D., Burgess J.G. et Nijland R. (2010).** Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86: 813-823.

**Lebeaux D., et Ghigo J.M. (2012).** Infections associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale. *médecine/sciences*. 28(8-9): 727-39. DOI: 10.1051/medsci/2012288015.

**Liesse Iyamba J. M ., Takaisi-Kikuni N.B., Dulanto S., Dehaye J.P. (2012) :** Study of the Adhesion of Clinical Strains of *Staphylococcus aureus* on an Abiotic Surface Using the Biofilm Ring Test. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 3, 547-556.

**Liu L., Li W., Koike K., Zhang S. et Nikaido T. (2004).** Nouveaux alpha tétralonylglucosides du fruit de *Juglans mandshurica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. Tokyo 52:566-569.

**Lock M.A. (1993).** Attached microbial communities in rivers. In: *Aquatic Microbiology*, (Ed. T. E. Ford). Blackwell Scientific Publications, Cambridge. 113-138.

**Lopez D., Vlamakis H et Koller R. (2010).** Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. PP 1-11.

-M-

**Maity D., Mandal M. et Liu J. (2019).** NOMEN CLATU RE .Where does *Juglans regia* L. (Juglandaceae) grow in Sikkim and Darjeeling Himalaya? *Juglans sigillata* Dode needs attention!. *Pleione. East Himalayan Society for Spermatophyte Taxonomy*..13(2): 393 - 398.

**Marshall K.C., Stout R. et Mitchell R. (1971).** Selective sorption of bacteria from seawater. *Canadian Journal of Microbiology*. 17 (11): 1413-1416.

**Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T. et Rattan A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24: 25-29.

**McGranahan G. et Leslie C. (2009) ;SM Jain, PM Priyadarshan (Editeurs),** Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species : Breeding Walnuts (*Juglans Regia*) .page 249-273.

**McGranahan G.H. et Leslie C.A. (1991).** Noix (*Juglans*). *Acta Hort.* 290: 905–951.

**Merghni A., Marzouki H., Hentati H., Aouni M. et Mastouri M. (2015).** Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections. *Pathologie Biologie*. 3205: 1-6.

**Mion S., Rémy B., Plener L., Chabrière E. et Daudé D. (2019).** *Quorum sensing et quorum Quenching* Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence. *médecine/science*. 35, pp 31-8.

**Milek M., Ciszkowicz E., Lecka-Szlachta K., Miloś A., Zagula G., Pasternakiewicz A. et džugan m. (2022).** Mineral Composition, Antioxidant, Anti-Urease, and Antibiofilm Potential of *Juglans Regia* Leaves and Unripe Fruits. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: FOOD TECHNOLOGY*. 16 (1) :69-82.

**Mogha K. V., Shah, N. P., Prajapati, J. B., & Chaudhari, A. R. (2014).** Biofilm a threat to dairy industry. *Indian Journal of Dairy Science*.

**Mohammadi J, Mirzaei A, Azizi A, Rouzbehi A, Delaviz H. (2012).** Les effets de l'extrait hydroalcoolique de feuille de *Juglans regia* sur les modifications histologiques de l'îlot de Langerhans chez le modèle de rats diabétiques. *Iran S Med J*. 4:293-301.

**Mohammadi J., Saadipour K., Delaviz H. et Mohammadi B. (2011).** Effets antidiabétiques d'un alcoolique extrait de *Juglans regia* dans un modèle animal. *Turk J Med Sci*. 41:685-91.

**Mohni C., Pelleri F., et Hemery G.E. (2009):** The modern silviculture of *Juglans regia*: A literature review. 60 (3): 21-34.

**Moravej H., Salehi A., Razavi Z, Moein M.R., Etemadfarid H., Karami F., et al. (2016).** Chimique composition et effet de l'hydrolat de noix sur le contrôle glycémique des patients atteints de type 1 Diabète. *Int J Endocrinol Metab*.14:e34726.

**Mouhajir F, et al. (2001).** Multiples activités antivirales des plantes médicinales endémiques utilisées par les Berbères du Maroc. *Pharm. Biol*. 39: 364-374.

**Muhsin J., Ufaq T., Tahir H. et Saadia A. (2015).** Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4: 1-14.

**Musk D.J., Banko D.A., et Hergenrother P.J. (2005).** Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology*; Vol. 12: 789– 796.

-N-

**Nielsen A.T., Tolker-Nielsen T., Barken K.B. et Molin S. (2000).** Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface attached microbial consortium. *Environmental Microbiology*. 2: 59-68.

**Nuta D.C., Limban C., Chitita C., Chifiriuc M.C., Costea T., Ionita P., Nicolau I. et Zarafu I.** Contribution of Essential Oils to the Fight against Microbial Biofilms- A Review. *Processes*. 9 (3), 537.

-O-

**Okada M., Sato I., Jeong Cho S., Iwata H., Nishio T., Dubnau D et Sakagami Y. (2005).** Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX. *Nature Chemical*

*Biology*. 1: 23-24.

**Olivaresa E., Badel-Berchoux S., Provot C., Jaulhac B., Prévost G., Bernardi T., Jehl F. (2016).** L.) The BioFilm Ring Test: a Rapid Method for Routine Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation Kinetics. *journal of clinical microbiology*. 54 (3) : 657-661.

**-P-**

**Panda P.S., Chaudhary U. et Dube S.K. (2016).** Comparaison de quatre méthodes différentes de détection de la formation de biofilms par des uropathogènes. *Indian J Pathol Microbiol*. 59:177-9.

**Parot S. (2007).** Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. Thèse de doctorat. L'institut national polytechnique de Toulouse, France.

**Parsek M.R. et Greenberg E.P. (2000).** Acyl-homosérine quorum sensing chez les bactéries Gram négatives : Un mécanisme de signalisation impliquée dans les associations avec des organismes supérieurs. *Proceeding of the National Academy of science of the USA*. 97: 8789-8793.

**Paÿ-Dyderska S., M. Jagodziński A. M., Dyderski M.K. (2021).** Possible changes in spatial distribution of walnut (*Juglans regia* L.) in Europe under warming climate. *Regional Environmental Change*. 21 (18): 1-13.

**Percival S.L., Malic S., Cruz H. et Williams D.W. (2011).** Introduction to Biofilms. *Biofilms and Veterinary Medicine*. 6 : 41-68.

**Pereira J.A., Oliveira I., Sousa A., Patrícia V., Paula B., Andrade., Ferreira I., Federico F., Bento A., Seabra R. et Estevinho L.(2007).** Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. Vol 45 : 2287–2295.

**Perrin C. (2009).** Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'*Escherichia coli* K-12. L'Université Lyon I - Claude Bernard, France.

**-Q-**

**Quave C. L., Plano L.R. Pantuso T. et Bennett B.C. (2008).** Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol*. 118: 418–428.

**-R-**

**Racha A. N., Abu Shady H.M. et Hussein H.S. (2012).** Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medical Human and Genetic* .13: 269–274.

**Rewatkar A. R. et Wadher B. J. (2013).** *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*- Biofilm formation Methods. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. Volume 8, Issue 5 (Nov. – Dec. 2013), PP 36-40.

**Roux A. et Ghigo J.M. (2006).** Les biofilms bactériens. communication ; n°3, p. 261-268.

**Rittman B.E. (1989).** L'effet de la contrainte de cisaillement sur le taux de perte de biofilm. *Biotechnology Bioengineering*. 24:501–506.

**Ruchi T., Sujata B. et Anuradha D. (2015).** Comparaison des méthodes phénotypiques pour la détection de la production de biofilms chez les uro-pathogènes dans un hôpital de soins tertiaires en Inde. *Int J Curr Microbiol App Sci* .4 : 840-849.

-S-

**Sabatier S. (1999)** : Variabilité morphologique et architecturale de deux espèces de noyers : *Juglans regia* L., *Juglans nigra* L. et de deux noyers hybrides interspécifiques. Thèse de Doctorat. Université des sciences et techniques du Languedoc, Montpellier, France.

**Saito K., Inagaki S., Mituyama T., Kawamura Y., Ono Y., Sakota E., Kotani H., Asai K., Siomi H., Siomi M.C. (2009).** A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in *Drosophila*. *Nature*. 461 (7268): 1296-1299.

**Salhi N. (2011).** Allelochemicals from some medicinal and aromatic plants and their potential use bioherbicides. Université Badji-Mokhtar. Annaba, Algérie. 210p.

**Sarahroodi S., Rasekh H.R., Kamalinejad M., Mahboubi S., Shalmani S.T. et Nouri M. (2008).** Effet hypoglycémiant de l'extrait aqueux du septum de *Juglans regia* Linn. (noyer de Perse) chez des rats mâles. *Pharmacogone Mag*. 4:109-113.

**Schreier J. B. (1969).** Modification of deoxyribonuclease test medium for rapid identification of *Serratia marcescens*. *American Journal of Clinical Pathology*. 51, 711–716.

**Schrowder M.P. et Messing A.M. (1949).** Methods for comparing the antibacterial activity of essential oil and other aqueous insoluble compounds. *Bull, Nat, Formulary Comm*. 17 : 213-218.

**Shah T.I., Akthar S. et Ganesh N. (2013).** Évaluation phytochimique préliminaire et potentiel antibactérien de différents extraits de feuilles de *J. regia* : un fruit sec omniprésent du Cachemire d'Inde. *Pharm Sci Rev Res*. 19:93-96.

**Sher H., Bussmann R.W., Hart R., de Boer H.J. (2016).** Utilisation traditionnelle des plantes médicinales parmi les groupes ethniques Kalasha, Ismaeli et Sunnite dans la province de Khyber Pakhtunkhwa, au Pakistan. *J Ethnopharmacol*. 188:57–69. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.059>.

**Singh A, Nautiyal M.C., Kunwar R.M. et Bussmann R.W. (2017).** Plantes ethnométricinales utilisées par les habitants locaux de Jakholi Block, district de Rudraprayag, Himalaya occidental. *Inde. J Etnobiol Ethnômed*. 13(49). <https://doi.org/10.1186/s13002-017-0178-3>.

**Singh R., Ray P., Das A. et Sharma M. (2009).** Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *Journal of medical microbiology*. 58: 1067-1073.

**Société Française de Microbiologie, 2010-2013.**

**Spaccarotella K.J., Kris-Etherton P.M., Stone W.L., Bagshaw D.M., Fishell V.K., West S.G., Lawrence F.R. et Hartman T.J. (2008).** L'effet de la consommation de noix sur les facteurs liés à la santé prostatique et vasculaire chez les hommes âgés. *Nutr. J.* 7:13.

**Squinazi F. (2013).** Biofilm & Matériaux : des réseaux intérieurs de distribution de l'eau. pp 4-10.

**Stampar F., Solar A., Hudina M., Veberic R. et Colaric M. (2006).** Liqueur de noix traditionnelle – cocktail de composés phénoliques. *Chimie alimentaire.* 95, 627–631.

**Steel K. J. (1960).** The oxidase Reaction as a Taxonomic Tool. *Journal of General Microbiology.* 25: 297-306.

**Stoodley P., Sauer K., Davies D.G. et Costerton J.W. (2002).** Biofilm as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology.* 56(1): 187-209.

**Sultan A.M. et Nabiél Y. (2019) :** Méthode en tube et gélose au Rouge Congo versus méthode sur plaque culture tissulaire pour détection de la production de biofilm par des uropathogènes isolés de courant moyen. 20 (1) :60-66.

**Sue Katz S. (2010).** Coagulase Test Protocol. *AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY;* 8-9.

**Sulaeman S., Le Bihan G., Rossero A., Federighi M., Dé E. et Tresse O. (2010).** Comparaison entre l'initiation du biofilm des souches *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* sur une surface inerte à l'aide du BioFilm Ring Test®. *J Appl Microbiol.*108:1303–1312.

**Sultan A.M. et Nabiél Y. (2019).** Tube Method And Congo Red Agar Versus Tissue Culture Plate Method for Detection of Biofilm Production by Uropathogens Isolated from Midstream Urine which one could be Better. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology.* Vol. 20, No.1: 60-66.

-T-

**Tagarelli G., Tagarelli A., Piro A. (2010).** Médecine populaire utilisée pour soigner le paludisme en Calabre (sud de l'Italie). *J. Ethnobiol. Ethnômed.* 6:27.

**Taha N.A and Al-wadaan M. A. (2011).** Utility and importance of walnut, *Juglans regia* Linn: A review . *African Journal of Microbiology Research.* Vol. 5(32): 5796-5805.

**Taj Y., Farhan E., Aziz F. et Kazami S.U. (2012).** Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infection in Developing Countries;* 5(6): 403-409.

**Tajamul I.S., Ekta S., et Gowhar A. (2014).** *Juglans regia* Linn: A Phytopharmacological Review. *World Journal of Pharmaceutical Science.* 2(4): 357-363.

**Taylor W.I. et Achanzar D. (1972).** Catalase Test as an Aid to the Identification of *Enterobacteriaceae*. *Appleid Microbiology;* Vol.24, No.1: 58-61.

**Torres-González (2011).** Effet protecteur de quatre plantes mexicaines contre les dommages induits par CCl4 dans la cellule d'hépatome humain h7. *Annals hematology.* 10:73-79.

**Toty A.A., Guessennd N., Bahi C., Kra A.K.M., Tokore D.A. et Dosso M. (2013).** Évaluation *in-vitro* de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 82, pp 12-21.

**Tremblay Y.D., Hathroubi S. et Jacques M. (2014).** Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 78(2), pp 110-116.

-U-

**Utili R., Durante-Mangoni E. et Tripodi M.F. (2007).** Infection of intravascular prostheses: how to treat other than surgery. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30 S : S42-S50.

-V-

**Vahdati K., Arab M.M., Sarikhani S., d Sadat-Hosseini M., Leslie C.A. et Brown P.J. (2019).** Advances in Persian Walnut (*Juglans regia* L.) Breeding Strategies..page 401-472.

**Vaidyaratnam P.S.V. (2005).** Plantes médicinales indiennes un recueil de 500 espèces. Orient Longman Private Limited, Chennai. 3: 264-65.

**Vanzielegem T., Delmée M. (2020).** Les biofilm en milieu hospitalier : quels sont les enjeux pour l'hygiène hospitalière. *Nosoinfo*.

**Vischi M., Chiabà C., Raranciuc S et al. (2017)** Diversité génétique du noyer (*Juglans regia* L.) dans le Alpes italiennes orientales. *Forêts* .8(3):81.

**Voleurs J.E. et Tyler V.E. (1999).** Tyler's Herbs of Choise: L'utilisation thérapeutique des phytomédicinaux, The Havvorth Herbal Press, New York.

**Vuotto C., Longo F., Pascolini C., Donelli G., Balice M.P. Libori M.F., Tiracchia V., Salvia A. et Varaldo P.E. (2017).** Biofilm formation and antibiotic resistance in *Kleibsiella pneumonia* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*. 123 (4):1003-1018.

-W-

**Wai-Leung Ng et Bonnie L.B. (2009).** Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annual Review of Genetics*. 43: 197–222.

**Walt D.R., Smulow J.B., Turesky S.S. et Hill R.G. (1985).** The effect of gravity on initial microbial adhesion. *Journal of Colloid and Interface Science*. 107:334–336.

**Whittaker C. J., Klier C.M. et Kolenbeander P.E. (1996).** Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annual review of microbiology*. 50 : 513-553.

-Y-

**Yan F., Li H . and Zhao P. (2019).** Genome-Wide Identification and Transcriptional Expression of the PAL Gene Family in Common Walnut (*Juglans Regia* L.) .*Gènes*. 10 (46) : 1-16.

**Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78: 110-116.

**Yesilada E. (2002).** Biodiversité dans la médecine populaire turque. Dans : Sener, B. (Ed.), Biodiversité: Aspects biomoléculaires de la biodiversité et utilisation innovante. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Londres, p. 119–135.

-Z-

**Zabinski R.A., Walker K.J., Larsson A.J et al. (1995).** Effects of aerobic and anaerobic environments on antistaphylococcal activities of five fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39, pp 507-512.

**Zatout A., Djibaoui R., Kassah-Laouar, A., et Benbrahim C. (2020).** Coagulase negative staphylococci in Anti-Cancer Center, Batna, Algeria: antibiotic resistance pattern, biofilm formation, and detection of *mecA* and *icaAD* genes. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. 21 (1): 21-29.

**Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V. et Hacker J. (2001).** Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. *Methods in Enzymology*. 336: 195-203.

**Zimmermann-Meisse G. (2016).** Internalisation des leucotoxines de *S. aureus* dans les cellules cibles et conséquences cellulaires associées (Doctoral dissertation, Strasbourg).

**Zobell C.E. (1943).** The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology* 46:39-56.

# *Annexes*

---

## **Annexes**

### **Annexe 1**

#### **Préparation de la gélose Rouge Congo**

Ce milieu de culture est utilisé pour l'étude des biofilms.

- Faire bouillir 500ml de l'eau distillée dans un bécher en utilisant un agitateur magnétique.
- Faire dissoudre 18,5g de la poudre BHIB, 5g d'agar agar, 25g de saccharose, 0,4g de Rouge Congo déjà pesés sur balance dans 200ml de l'eau préalablement chauffée.
- Ajuster avec 300 ml d'eau distillée et laisser agiter et chauffer.
- Répartir dans des flacons stériles et autoclaver à 120°C pendant 45min.

### **Annexe 2**

#### **Préparation du bouillon BHIB+Glucose à 1%**

- Faire dissoudre 3,7g de la poudre de BHIB et 1g de glucose dans 100ml de l'eau distillée
- Laisser agiter quelques minutes.
- Verser dans des flacons et autoclaver à 120°C pendant 45 min.

### **Annexe 3**

#### **Préparation du bouillon BHIB+Saccharose à 1%**

- Dissoudre 3,7g de la poudre BHIB et 1g de saccharose dans 100 ml d'eau distillée.
- Laisser agiter puis répartir dans des flacons et autoclaver .

### **Annexe 4**

#### **Préparation de Phosphate-buffered saline (PBS)**

- Peser 7,6g de NaCl, 0,2g de KCl, 0,71 g de  $K_2HPO_4$ , 0,245 g de  $Na_2HPO_4$ .
- Dissoudre chaque produit déjà pesé dans 200 ml de l'eau distillée.
- Déposer le tout dans une fiole jaugée de 1L.
- Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à le trait de jauge.
- Homogénéiser et répartir dans des flacons.

### **Annexe 5**

#### **Préparation du Cristal Violet à 1 %**

- Mettre 0.50g de la poudre du Cristal Violet dans un bécher.
- Ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un volume final de 50mL.

- Couvrir le bécher avec du papier aluminium et déposer le sur l'agitateur magnétique pour une durée de quelques minutes.
- Verser la solution dans un flacon.

#### ✚ Préparation de la dilution à 0.1%

- Prélever 3mL de la solution du Cristal Violet à 1% et déposer les dans un flacon.
- Ajuster avec 27mL de l'eau distillée et homogénéiser.
- 

### Annexe 6

#### Protocole de la coloration du Gram

- Préparation du frottis :

- Etaler des colonies bactériennes sur une goutte d'H<sub>2</sub>O déjà déposée sur une lame préalablement nettoyée avec de l'alcool.
- Sécher à l'air libre et fixer par passage de la lame trois fois à travers la flamme du bec bunsen.

- Coloration :

- Recouvrir la lame avec du cristal violet pendant une minute.
- Eliminer l'excès par lavage avec de l'eau courante sur le dos de la lame pour ne pas endommager le frottis.
- Recouvrir le frottis avec de lugol pendant une minute.
- Rincer brièvement à l'H<sub>2</sub>O comme décrit précédemment.
- Décolorer avec de l'alcool pendant 5 à 10 secondes.
- Laver la lame comme il est décrit dans la deuxième étape de la coloration.

- Contre-coloration :

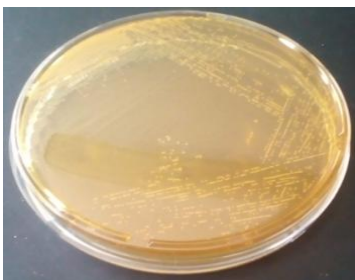
- Contre-colorer avec de la fushine pendant une minute.
- Eliminer la fushine par lavage tel qu'il est fait dans la deuxième étape de coloration.
- Sécher à l'air libre.

- Observation :

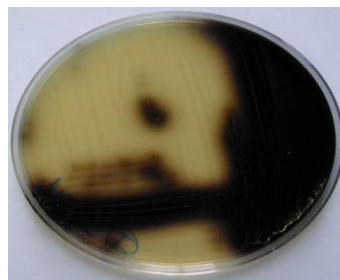
- Mettre une goutte de l'huile d'immersion sur la lame et observer au grossissement 1000 en utilisant le microscope (OPTIKA).

### Annexe 7

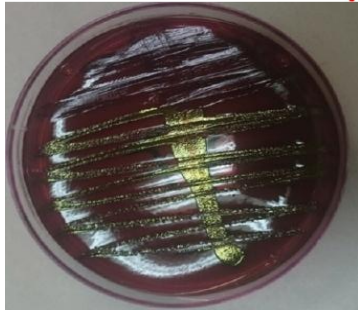
#### ✚ L'aspect des souches sur leurs milieux sélectifs



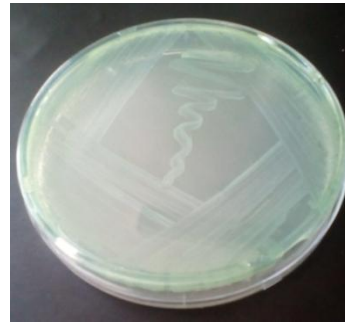
*S. aureus* ATCC 27923 sur le milieu Chapman



*E. faecalis* WDCM 00009 sur le milieu BEA

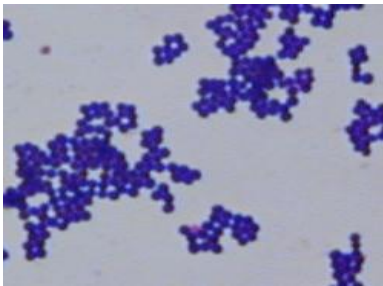


*E. coli* ATCC 25922 sur milieu EMB

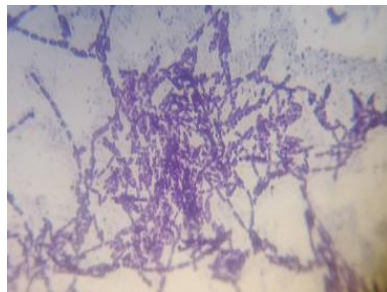


*P. aeruginosa* ATCC 27853 sur gélose Cétrimide

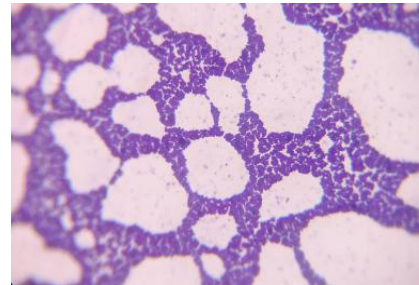
### ✚ Résultats de la coloration de Gram



*S. aureus* ATCC 25923



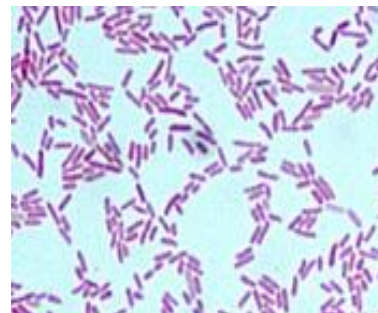
*B. cereus* ATCC 14575



*E. faecalis* WDCM 00009

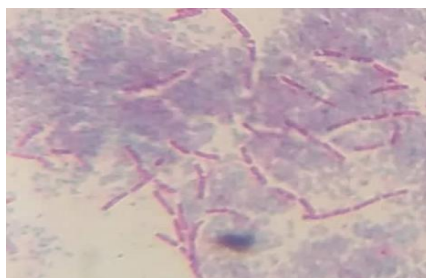


*E. coli* ATCC 25922



*P. aeruginosa* ATCC 27853

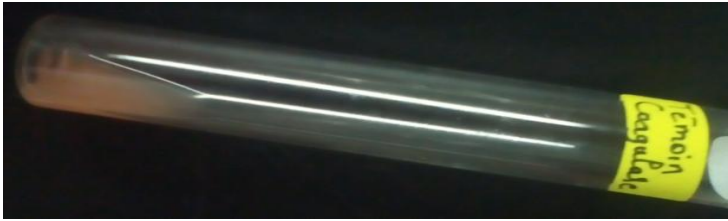
### ✚ Résultat de la coloration de la spore



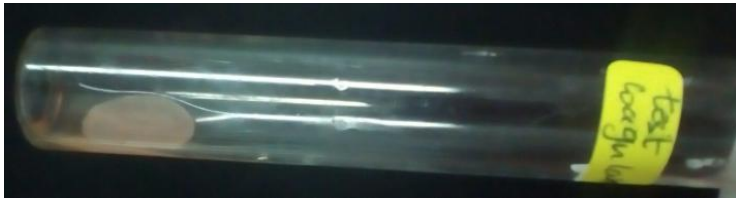
Spores exogènes de *B. cereus* ATCC 14575

## ✚ Résultats de l'activité enzymatique

### Test coagulase



(A) Tube «Témoin coagulase»



(B) Tube «Test Coagulase»

### Test ADNase

