

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



Mémoire de fin d'études

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

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Evaluation de quelques activités biologiques d'extraits
de brindilles issues de trois variétés d'olivier collectées
au niveau de Tizi-Ouzou.**

Présenté par :

M^{elle} : MEZOUED Kahina

M^{elle} : NAIB Hinda

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me} AFIF CHAOUCHE T.

Maitre de Conférences Classe A à l'UMMTO

Promotrice : M^{elle} DERMECHE S.

Maitre de Conférences Classe B à l'UMMTO

Examinatrice : M^{me} ISSELNANE S.

Maitre Assistante Classe A à l'UMMTO

Année universitaire : 2020-2021

Remerciements

Après avoir rendu grâce à DIEU, le tout puissant, de nous avoir prêté la force, la patience et la bonne volonté d'entamer et d'achever ce modeste travail. Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à toutes les personnes qui nous ont aidées et soutenues en particulier :

Notre promotrice **Mlle DERMECHE S**, en nous proposant ce sujet et en mettant à notre disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail. Qu'elle trouve ici notre reconnaissance et notre respect pour la confiance qu'elle nous a accordée, ses précieux conseils, et ses orientations tout au long de ces mois de travail.

Nos remerciements s'adressent également à **Mme AFIF-CHAOUICHE T**. Maitre de conférences classe A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider ce jury.

Nous témoignons nos sincères remerciements pour **Mme ISSELNANE S**. Maitre assistante classe A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Enfin, nous tenons à remercier **Mr TITOUCHE Y**, **Mlle OUSMER L**, **Mme GHAZI A** et **Mlle OUSSAID S** pour leurs conseils et leur aide durant la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents, aux êtres qui me sont les plus chers dans ce monde, à qui je témoigne ma reconnaissance pour leurs sacrifices, leurs soutiens et leurs encouragements tout au long de mes études. Que Dieu les garde.

A mon frère que j'aime énormément.

A la mémoire de ma très chère grand-mère, qu'elle repose en paix.

A ma binôme « Hindā » qui a toujours été à mes cotées au cours de mon cursus universitaire.

A toute ma famille, je vous aime.

Kahina

En signe de respect et de reconnaissance Je dédie ce modeste travail :

À ma famille, en particulier mes parents, à ceux à qui je dois tout, pour leurs encouragements permanents, et leur soutien inconditionnel tout au long de mon cursus scolaire et universitaire.

À mon frère et ma sœur que j'aime profondément.

À ma binôme « Kahina » grâce à qui ces durs mois de travail semblaient être de véritables moments de plaisir et de partage.

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

Hinda

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii
Résumé	
Abstract	
Introduction	1

1^{ère} partie : Etude bibliographique.

I. Plantes médicinales	3
I.1. L'olivier	3
I.1.1. Généralités	3
I.1.2. Aspect botanique.....	3
I.1.3. Secteur oléicole	4
I.1.3.1. Dans le monde.....	4
I.1.3.2. En Algérie	5
I.1.4. Produit et sous-produits de l'oléiculture et leurs composés phénoliques	6
I.1.4.1. Huile d'olive	6
I.1.4.2. Feuilles et brindilles.....	7
I.1.4.3. Grignons ou tourteaux d'olive	7
I.1.4.4. Margines	8
I.1.5. Activités antimicrobiennes.....	8
I.2. Autres plantes médicinales et leurs activités antimicrobiennes	10
I.3. Huiles essentielles	12
II. Composés phénoliques	14
II.1. Définition	14
II.2. Biosynthèse	14
II.3. Classification des polyphénols	15
II.4. Activité antioxydante des composés phénoliques	16
II.4.1. Piégeage des espèces oxygénées réactives (ERO)	16
II.4.2. Chélation des ions métalliques	16
II.4.3. Inhibition des enzymes	16
II.5. Intérêt biologique des composés phénoliques	17
II.5.1. Importance des polyphénols chez les plantes	17

II.5.2. Importance des polyphénols pour l'homme	17
III. Biofilms	18
III.1. Généralités et définitions	18
III.2. Historique et découverte	19
III.3. Distribution des biofilms dans l'environnement	20
III.4. Formation d'un biofilm bactérien	22
III.4.1. Mise en place d'un film conditionnant.....	23
III.4.2. Adhésion.....	23
III.4.2.1. Attachement initial	24
III.4.2.2. Attachement permanent.....	24
III.4.3. Formation des micro-colonies	25
III.4.4. Maturation du biofilm	25
III.4.5. Dispersion du biofilm.....	26
III.5. Facteurs influençant l'apparition des biofilms	26
III.5.1. Propriétés de la surface	26
III.5.2. Caractéristiques du milieu	27
III.5.3. Propriétés des cellules	27
III.6. Composition et organisation structurale	28
III.6.1. Composition d'un biofilm	28
III.6.1.1. Microorganismes	28
III.6.1.2. Matrice	28
III.6.2. Organisation structurale	29
III.7. Interactions au sein d'un biofilm	31
III.8. Régulation de la formation des biofilms : Notion du Quorum sensing	31
III.9. Résistance et tolérance aux agents antimicrobiens	32
III.9.1. Blocage.....	32
III.9.2. Protection mutuelle	33
III.9.3. Présence de bactéries persistantes	33
III.10. Modèles de bactéries formatrices de biofilms	33
2^{ème} partie : Etude expérimentale.	
I. Matériel et Méthodes	35
I.1. Matériel	35
I.1.1. Matériel non biologique.....	35

I.1.2. Matériel biologique	36
I.1.2.1. Matériel végétal	36
I.1.2.2. Origine des souches microbiennes	36
I.2. Méthodes.....	37
I.2.1. Préparation du matériel végétal	37
I.2.2. Extraction des polyphénols totaux	38
I.2.2.1. Choix du solvant organique	38
I.2.2.2. Extraction	39
I.2.3. Rendement d'extraction	40
I.2.4. Activité antibactérienne	40
I.2.5. Activité antibiofilm	43
I.2.6. Dosage des polyphénols totaux	45
I.2.7. Activité anti-radicalaire du (DPPH)	47
II. Résultats et Discussion	49
II.1. Rendement d'extraction.....	49
II.2. Dosage des polyphénols totaux	50
II.3. Activité antioxydante.....	52
II.4. Activité antibactérienne	54
II.4.1. Test de diffusion sur milieu gélosé.....	54
II.4.2. Test par contact direct (sans source de carbone)	59
II.5. Activité antibiofilm.....	61
II.5.1. Potentiel de formation de biofilm.....	61
II.5.2. Capacité d'inhibition des extraits	62
Conclusion et perspectives.....	70
Références bibliographiques.	
Annexes.	

Liste des abréviations

CMI	Concentration minimale inhibitrice
AI	Autoinducteur
PP	Polyphénols
ERO	Espèces oxygénées réactives
SEM	Scanning Electron Microscopy (Microscope électronique à balayage)
LPS	Lipopolysaccharides
EPS	Exopolysaccharides
PS	Polysaccharides
QS	Quorum sensing
MEC	Matrice Extra Cellulaire
ATB	Antibiotique
rpm	Rotations par minutes.
UFC	Unités formant colonies
∅	Diamètre
S	Variété sauvage
AZ	Variété <i>Azeradj</i>
C	Variété <i>Chemlal</i>
PPT	Polyphénols totaux
DO	Densité optique
[]	Concentration
EAG	Equivalent acide gallique
MS	Matière sèche
EPH	Eau physiologique
CMIB	Concentration minimale inhibitrice de biofilm

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Répartition de la culture de l'olivier dans le monde.	5
2	Structures chimiques des trois principaux composés phénoliques d'olive.	7
3	Photographie montrant quelques plantes médicinales étudiées. (A) <i>Holarrhena floribunda</i> ; (B) <i>Euphorbia hirta</i> ; (C) <i>Melia dubia</i> .	10
4	Structure du noyau phénol.	14
5	Biofilms Bactériens.	19
6	Biofilms dans l'environnement.	22
7	Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm.	23
8	Biofilm pluri-espèces.	29
9	Etablissement de gradients stables au sein d'un biofilm hétérogène.	30
10	Illustration du quorum sensing.	32
11	Carte géographique des zones d'échantillonnage.	36
12	Différentes étapes de préparation du matériel végétal.	38
13	Diagramme d'extraction des composés phénoliques.	39
14	Test du contact direct.	42
15	Photographie montrant l'étape de coloration du biofilm au cristal violet sur microplaque.	44
16	Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols par équivalence en acide gallique.	45
17	Structure de l'acide gallique.	46
18	Protocole de dosage des composés phénoliques.	46
19	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test (DPPH) entre l'espèce radicalaire (DPPH°) et un antioxydant (AH).	47
20	Rendement en matière sèche des extraits bruts des brindilles de trois variétés de l'olivier.	49
21	Rendement en polyphénols totaux extraits de brindilles en mg/g de biomasse sèche (poudre).	51
22	Concentration en polyphénols totaux des différents extraits de brindilles.	51
23	Pourcentages d'inhibition du radical libre (DPPH) en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.	53
24	Biomasse enregistrée (densité optique) pour les biofilms formés par les cinq souches testées.	62
25	Pourcentages d'inhibition exercée par les extraits de trois variétés vis-à-vis de la formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	63
26	Pourcentages d'inhibition exercée par les extraits de trois variétés de brindilles vis-à-vis de la formation de biofilm par <i>Bacillus cereus</i> (8).	64
27	Pourcentages d'inhibition exercée par les extraits de trois variétés de brindilles vis-à-vis de la formation de biofilm par <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	65
28	Pourcentages d'inhibition exercée par les extraits de trois variétés de brindilles vis-à-vis de la formation de biofilm par <i>Bacillus licheniformis</i> .	66
29	Pourcentages d'inhibition exercée par les extraits de trois variétés de brindilles vis-à-vis de la formation de biofilm par <i>Klebsiella oxytoca</i> (7).	67

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Situation botanique de l'espèce <i>Olea europaea</i> Linné.	4
II	Principales variétés d'olivier cultivées en Algérie.	6
III	Principaux composés phénoliques des olives et produits dérivés.	8
IV	Effet antimicrobien des extraits phénoliques des sous-produits de l'olivier.	9
V	Quelques extraits naturels et leurs effets sur la formation des biofilms.	10
VI	Quelques huiles essentielles et leur activité antimicrobienne.	12
VII	Principales classes des composés phénoliques.	15
VIII	Facteurs influençant la formation d'un biofilm.	27
IX	Principaux constituants de la matrice d'un biofilm.	29
X	Différents milieux de culture et produits utilisés.	35
XI	Différents appareils et matériel utilisés.	35
XII	Différentes souches bactériennes utilisées.	37
XIII	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations brutes des extraits d'acétate d'éthyle de brindilles de l'olivier.	53
XIV	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) exercés par les différents extraits bruts.	55
XV	Sensibilité des souches bactériennes aux extraits bruts des brindilles de l'olivier.	56
XVI	Sensibilité des souches bactériennes aux extraits bruts des brindilles de l'olivier après 4h.	60
XVII	Sensibilité des souches bactériennes aux extraits bruts des brindilles de l'olivier après 24h.	61
XVIII	Concentrations minimales inhibitrices de biofilms des trois extraits vis-à-vis des souches testées.	68

Résumé

L'extraction de principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la biomasse végétale suscite actuellement beaucoup d'intérêt dans plusieurs secteurs, y compris l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique, le domaine biotechnologique, ainsi que le domaine de la phytothérapie. Dans ce contexte, la présente étude porte sur l'évaluation de quelques bioactivités d'extraits organiques de brindilles d'*Olea europaea* L. issues de trois variétés oléicoles, récoltées au niveau de deux régions de la wilaya de Tizi-Ouzou (Algérie), à savoir, la variété sauvage *Olea europaea sylvestris*, *Azeradj* et *Chemlal* dont les échantillons sont notés : S1 et S2, AZ1 et AZ2, C1 et C2 respectivement pour les variétés et les deux régions. Les résultats ont montré que l'extrait AZ2 possède la teneur en polyphénols la plus élevée et que tous les extraits de brindilles présentent un pouvoir anti-radicalaire intéressant vis-à-vis du radical DPPH. Les tests antimicrobiens menés avec la méthode de diffusion à partir de disques imprégnés des extraits, révèlent que ces derniers exercent une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries Gram positif et de bactéries Gram négatif. L'extrait AZ2 possède le spectre d'action le plus large et l'activité la plus importante vis-à-vis de la totalité des bactéries. L'activité antibiofilm évaluée par la méthode sur microplaques de 96 puits s'est avérée positive contre l'adhérence des souches testées et l'épaisseur du biofilm est d'autant plus faible que la concentration des extraits est importante. L'ensemble des résultats obtenus sont encourageants et ouvrent une voie prometteuse pour l'utilisation des rameaux de l'olivier comme source d'agents antimicrobiens naturels afin de lutter contre la résistance bactérienne et la formation de biofilms.

Mots clés : Composés phénoliques, brindilles de l'olivier, activité antibactérienne, activité antibiofilm, activité antioxydante.

Abstract

The extraction of high value-added active substances from plant biomass is currently arousing growing interest in many fields of research, including the food industry, pharmaceutical, cosmetic, biotechnological, as well as the field of phytotherapy. In this context, the present study consists in the evaluation of some bioactivities of *Olea europea L.* twigs organic extracts of three olive varieties, from two regions of Tizi-Ouzou (Algeria), namely *Olea europea sylvestris*, *Azeradj* and *Chemlal*, noted: S1 and S2, AZ1 and AZ2, C1 and C2 respectively for the varieties and the two regions. According to the results, the AZ2 extract has the highest content of polyphenols and all twigs extracts have an interesting anti-radical activity against the DPPH free radical. The antimicrobial activity determined by the method of diffusion of extracts-impregnated discs, reveals that the extracts show an antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The AZ2 extract has the widest spectrum of action and the most important antibacterial activity. The results of antibiofilm activity evaluated by the 96-well microplates method reveal a positive inhibitory effect on the adhesion of the strains tested, and the biofilm thickness is all the lower the higher the concentration of the extracts. All these results are encouraging and open new prospects for the use of olive twigs as a natural source of antimicrobial agents to reduce bacterial resistance and biofilms formation.

Keywords: Phenolic compound, olive tree twigs, antibacterial activity, antibiofilm activity, antioxidant activity.

Introduction générale

L'utilisation des molécules de synthèse destinées à la protection de la santé publique est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. L'usage immodéré des antibiotiques a conduit à la création d'une pression de sélection sur les populations bactériennes, entraînant l'apparition de souches résistantes. En effet, chaque antibiotique a une durée de vie limitée au bout de laquelle les microorganismes développent des résistances. Ces dernières sont devenues préoccupantes et conduisent à une situation d'impasse thérapeutique (COWAN, 1999 ; TEIRLINCK *et al.*, 2019 ; LU *et al.*, 2019).

Bien que les bactéries résistantes soient une menace mondiale pour la santé humaine et animale, elles ne sont qu'une partie du problème de l'échec thérapeutique. Une autre stratégie bactérienne qui contribue à leur capacité à résister aux agents antimicrobiens est la formation de biofilms. Pendant longtemps les bactéries ont été considérées comme vivant préférentiellement libres en suspension, mais en réalité, plus de 90% des microorganismes vivent en communautés dans leurs environnements naturels (BRIANDET et NAITALI, 2019 ; URUEN *et al.*, 2021).

Les biofilms sont souvent dénoncés aux vues des conséquences qu'ils engendrent. Ce mode de vie original confère aux cellules bactériennes une tolérance et une résistance accrue aux influences environnementales négatives, notamment les antibiotiques. En effet, si les traitements classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils révèlent le plus souvent une efficacité très faible sur les biofilms (CHUA *et al.*, 2014 ; WU *et al.*, 2021).

Lutter contre leur développement aussi bien dans le domaine industriel, environnemental ou médical est un enjeu très important. En effet, un certain nombre de produits chimiques issus de la synthèse organique nécessite une pharmacovigilance, ainsi, une attention particulière est accordée aux produits d'origine naturelle afin de trouver d'autres options thérapeutiques alternatives. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Aujourd'hui encore, et malgré les énormes progrès, la recherche de substances naturelles bioactives issus de matière végétale ayant des propriétés potentiellement valorisables est parmi les thèmes phares des projets de recherche actuels dans le monde (SAHLI, 2017 ; ABBAS *et al.*, 2017 ; LU *et al.*, 2019).

L'olivier *Olea europaea L.* est une espèce largement cultivée dans la région méditerranéenne depuis la plus haute antiquité. Elle constitue une essence fruitière principale, tant par le nombre de variétés cultivées que par l'importance sociale et économique de sa culture et de son rôle environnemental. D'ailleurs, il n'est pas étonnant que la plupart de la superficie

mondiale dédiée à cette culture se trouve justement dans le Bassin méditerranéen. C'est dans cette région que se concentre 95% de la production mondiale, et 85% de la consommation mondiale. L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production de l'huile d'olive utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Néanmoins, l'industrie oléicole engendre également des quantités importantes de sous-produits. Selon les estimations de nombreux pays, 25 kg de feuilles et brindilles sont produites par an et par arbre, de plus, 100 kg d'olives traitées engendre 100 litres de margines (NEFZAOUI, 1991 ; MILI, 2006 ; ANGLES, 2012, AISSAOUI *et al.*, 2021).

L'olivier est considéré comme étant une plante aromatique et médicinale, réservoir de composés naturels à haute valeur ajoutée. La valorisation des sous-produits oléicoles est une approche très importante qui fait l'objet de nombreuses études. Ils sont en effet très riches en substances actives, notamment, les composés phénoliques. Ces molécules représentent une famille très large et complexe, douée de multiples propriétés biologiques et fonctionnelles. Leur rôle antioxydant et leur pouvoir antimicrobien suscitent de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement des dommages moléculaires et cellulaires causés par le stress oxydatif (DJENNANE *et al.*, 2012 ; ABBAS *et al.*, 2017 ; LAKACHE *et al.*, 2019).

Le stress oxydatif est un mécanisme ubiquitaire dans lequel de nombreuses réactions physiologiques et pathologiques mettent en évidence une composante radicalaire. Il est l'un des facteurs principaux de la genèse de maladies plurifactorielles, tels que le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (HALENG *et al.*, 2007 ; MIGDAL et SERRES, 2011).

Le présent travail a été basé sur l'étude de l'effet des composés phénoliques des brindilles issues de trois variétés de l'olivier de la région de Kabylie, leur activité antibiofilm, antimicrobienne et antioxydante, vis-à-vis des souches bactériennes formatrices de biofilms. Afin de présenter cette étude, ce manuscrit est scindé en deux parties :

- Une première partie bibliographique qui porte sur l'olivier et les différentes plantes médicinales, les composés phénoliques, ainsi qu'un chapitre sur les biofilms.
- Une deuxième partie qui rendra compte de la méthodologie, les résultats obtenus ainsi que leurs interprétations, et enfin, une conclusion et perspectives.

Première partie
Synthèse bibliographique

I. Plantes médicinales

Les plantes médicinales sont utilisées en phytothérapie comme traitement ou prévention de diverses maladies infectieuses. En effet, elles font partie de la médecine douce qui utilise des substances d'origine végétale comme alternative aux antibiotiques (LU *et al.*, 2019).

I.1. L'olivier

I.1.1. Généralités

L'homme a su depuis l'antiquité cultiver les arbres fruitiers, parmi lesquels les oliviers ont fait l'objet d'une grande importance. L'olivier est un arbre béni qui possède une très grande richesse symbolique. Il a été considéré comme symbole de la sagesse, de la paix, de la fécondité, de la richesse et de la gloire.

« Là où l'olivier renonce, finit la Méditerranée », cette citation illustre parfaitement la place remarquable qu'occupe cet arbre, en étant le meilleur marqueur de la zone climatique et de la civilisation méditerranéennes (HENRI, 2003 ; ANGLES, 2012).

Cet arbre pousse dans un climat tempéré. Il s'adapte facilement aux sols rocheux, ingrats et arides. Il supporte parfaitement les sécheresses et les fortes chaleurs, mais craint les froids trop vifs et l'humidité excessive. Il se caractérise par sa très grande longévité, on peut même le considérer comme immortel. Il se multiplie très facilement par voie végétative ou à partir des boutures. Si on le coupe, il produira spontanément un rejet qui vivra lui aussi des centaines d'années (AMORETTI et COMET, 1985 ; LABDAOUI, 2017).

I.1.2. Aspect botanique

L'olivier est une plante arborescente à fleurs, à vrai fruit, et à deux cotylédons. Comme le troène, le lilas, le jasmin et le frêne, il appartient à la famille des *Oleaceae*, qui compte parmi elle une vingtaine de genres différents. Le genre *Olea* comporte plus de 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. La seule espèce méditerranéenne représentative de ce genre est *Olea europaea* Linné (Tableau I), laquelle se divise en deux sous-espèces :

- ***Olea europaea sativa* ou l'olivier cultivé** : c'est un arbre à rameaux cylindriques, avec de grandes variations dans le feuillage, la taille des fruits ainsi que la teneur en huile suivant les variétés. C'est un arbre à croissance lente qui peut atteindre 15 mètres de hauteur selon la fertilité du sol et les conditions climatiques. Ses fleurs sont blanches et petites, et ses feuilles sont vertes tout le long de l'année et persistantes avec une durée de vie de trois ans.

• *Olea europaea sylvestris* ou l'olivier sauvage (l'oléastre) : c'est un arbrisseau, à rameaux épineux quadrangulaires, et à petites feuilles courtes. Ses fruits sont petits et nombreux, et son huile est peu abondante (AILLAUD, 1985 ; DUPONT et GUIGNARD, 2007).

Tableau I. Situation botanique de l'espèce *Olea europaea* Linné selon (HENRI, 2003).

Règne	Plantae	Ordre	Scrophulariales
Embranchement	Phanérogames	Famille	<i>Oleaceae</i>
Sous-embranchement	Angiospermes	Genre	<i>Olea</i>
Classe	Dicotylédones	Espèce	<i>Olea europaea</i> Linné
Sous-classe	Asteridae	Sous-espèces	<i>O. europea sylvestris</i> <i>O. europea sativa</i>

I.1.3. Secteur oléicole

I.1.3.1. Dans le monde

L'oléiculture est l'un des principaux secteurs stratégiques de l'économie en général et de l'agriculture en particulier. L'olivier est aujourd'hui cultivé dans toutes les régions du globe se situant entre les latitudes 30° et 45° parallèle Nord Sud (Figure 1) (CARRION *et al.*, 2010).

Le patrimoine oléicole mondial compte actuellement environ 750 millions d'oliviers cultivés sur une superficie de 9,23 millions d'hectares. Le pourtour méditerranéen compte 715 millions d'oliviers sur une superficie d'environ 8.16 millions d'hectares (YAKHLEF, 2019) avec une concentration nette de la production en Espagne suivie de l'Italie, la Grèce, le Portugal, la Turquie, la Tunisie, le Maroc, et l'Algérie. Loin de la région méditerranéenne, les États-Unis d'Amérique, Chili, Argentine, Brésil, Uruguay, et Pérou ainsi que en Australie, et depuis peu au Japon et en Chine, contribuent en production oléicole mondiale avec 3,3% (LABDAOUI, 2017).



Figure 1. Répartition de la culture de l'olivier dans le monde (LABDAOUI, 2017).

I.1.3.2. En Algérie

Le patrimoine oléicole algérien est estimé à 32 millions d'arbres, dont 80% sont destinés à la production d'huile, ce qui représente 4,26% du patrimoine mondial. Les surfaces agricoles consacrées à l'oléiculture ont atteint depuis 1999 à ce jour, près de 500,000 hectares (APS, 2018 ; YEKHLEF, 2019).

Le potentiel oléicole se répartit principalement dans trois régions : le Centre Nord (Tizi-ouzou, Bouira et Bejaia) occupe la première place avec 54,33% de la surface totale du verger oléicole national ; L'Est du pays vient en seconde position avec 28,27% ; La région Ouest qui occupe à peine 17%, et enfin, la région Sud qui occupe 0,45% du patrimoine national. En effet, les olives des régions Centre et Est sont destinées à la production de l'huile d'olive, alors que celles de l'Ouest sont pour la conserverie (LABDAOUI, 2017 ; YEKHLEF, 2019).

L'Algérie a été un relais de la diversité phylogénétique entre l'Europe, l'Est et l'Ouest de la Méditerranée. Sa position stratégique a contribué largement à la richesse de son patrimoine génétique de l'olivier. Ce dernier est caractérisé par une large gamme de variétés : les variétés à huile, les variétés à olives de table et les variétés à double aptitude (Tableau II). (MENDIL, 2009).

Tableau II. Principales variétés d'olivier cultivées en Algérie (MENDIL, 2009 ; ABDESSEMED *et al.*, 2018).

Variété	Air de culture	Maturité	Rendement	Destination
<i>Chemlal</i>	Centre Algérien Kabylie	Tardive	18 à 20%	Huile
<i>Azeradj</i>	Petite Kabylie (Seddouk)	Précoce	24 à 28%	Double aptitude
<i>Limli</i>	Petite Kabylie (Sidi-Aich)	Précoce	20 à 24%	Huile
<i>Aberkane</i>	Petite Kabylie (Akbou)	Précoce	16 à 20%	Double aptitude
<i>Sigoise</i>	Ouest du pays (Mascara)	Précoce	18 à 22%	Double aptitude
<i>Bouchouk</i>	Sétif	Précoce	22 à 26%	Double aptitude
<i>Blanquette</i>	Nord-Est (Guelma)	Tardive	18 à 22%	Huile

I.1.4. Produit, sous-produits de l'oléiculture et leurs composés phénoliques

En plus de l'huile d'olive, l'industrie oléicole engendre plusieurs sous-produits, qui regroupent toute une gamme de composés phénoliques (Tableau III) : l'un liquide (margines) et l'autre solide (les grignons). De plus, à travers la taille, l'olivier génère des feuilles, des brindilles et du gros bois (NEFZAOU, 1991 ; ROUSSAS, 2009 ; MANALLAH, 2012 ; SAHLI, 2017).

I.1.4.1. Huile d'olive

On désigne par l'huile d'olive toute huile extraite du fruit de l'olivier, uniquement par des procédés physiques et dans des conditions, notamment thermiques, n'entraînant pas d'altération de l'huile. En effet, elle ne requiert aucune étape de raffinage ni aucune transformation chimique (C.O.I, 2003 ; OLIVIER *et al.*, 2004). L'extraction de l'huile d'olive se fait soit dans

des moulins traditionnels, soit dans des moulins modernes utilisant des chaînes à extraction continue, automatisées et équipées de centrifugeuses (HENRI, 2003 ; BARDOULAT, 2005 ; YEKHLEF, 2019).

L'intérêt pour l'huile d'olive a été accru depuis la découverte de sa richesse en composés phénoliques. Ces derniers constituent comme dans le fruit un mélange complexe et variable d'une huile à une autre. Les différences dans la composition chimique entre les deux sont attribuées aux séries d'altération chimiques et enzymatiques de quelques phénols au cours de la maturation du fruit, ou lors du processus de l'extraction, entraînant ainsi la formation de composés qui contribuent aux arômes et à la saveur si particulière de l'huile (OLIVIER *et al.*, 2009).

I.1.4.2. Feuilles et brindilles

Les feuilles de l'olivier sont les parties utilisées en phytothérapie. Elles représentent une source potentielle de divers composés phénoliques (Figure 2), avec une teneur qui varie entre 2,8 mg/g et 44,3 mg/g de matière sèche. Elle peut même dépasser les 250 mg/g de matière sèche. Leur concentration dépend de la qualité, l'origine et de la variété des oliviers (BENAVENTE-GARCIA, 2000 ; MYLONAKI *et al.*, 2008; DJENNANE *et al.*, 2012 ; LAKACHE *et al.*, 2019 ; PIMIANTA *et al.*, 2020).

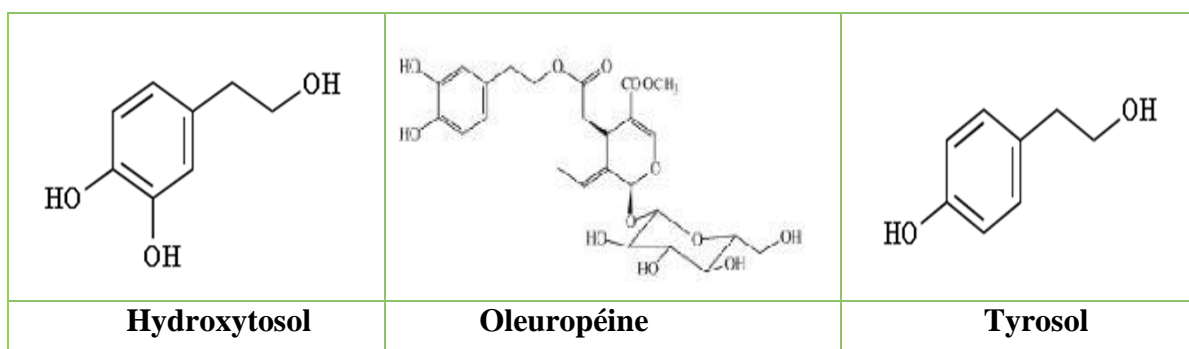


Figure 2. Structures chimiques des trois principaux composés phénoliques d'olive (fruit et feuilles) (DJENNANE *et al.*, 2012 ; AOUIDI, 2012).

I.1.4.3. Grignons ou tourteaux d'olive

Les grignons sont les résidus solides formés de la pulpe et des noyaux d'olives. Ils représentent environ un tiers du poids des olives fraîches triturées. Ce sous-produit est une source non négligeable de composés phénoliques. Il peut être valorisé en tant qu'aliment pour les bétails, comme fertilisant des terres agricoles, ou subir une extraction chimique afin de

produire de l'huile de grignon d'olive, utilisée pour la consommation humaine, et en industrie pour la fabrication de savon (NEFZAOU, 1991 ; AOUIDI *et al.*, 2009 ; YEKHLEF, 2019).

I.1.4.4. Margines

Les margines sont des eaux usées qui sont générées lors d'extraction de l'huile d'olive. Ils sont composé de l'eau de végétation qui provient du fruit, et de l'eau de fabrication ajoutée lors du processus de trituration (YAAKOUBI *et al.*, 2009).

Les margines présentent une quantité très appréciable de polyphénols totaux (PPT). En effet, 53% des composés phénoliques originaires des olives sont transférés aux margines (NEFZAOU, 1991 ; SAHLI, 2017). Leur teneur varie qualitativement et quantitativement selon le processus d'extraction d'huile d'olive. Elle est également influencée par les conditions climatiques, la situation géographique, la variété d'olives, la saison de récolte, le taux de maturation des fruits, la quantité d'eau utilisée lors de l'extraction et le temps de stockage des olives avant leur trituration (LABDAOUI, 2017 ; SAHLI, 2017 ; SENANI-OULARBI, 2018).

Tableau III. Principaux composés phénoliques des olives et produits dérivés.

Huile d'olive	Feuilles et brindilles	Grignons	Margines
<ul style="list-style-type: none"> - Acides phénoliques - Alcools phénoliques (notamment le tyrosol et l'hydroxytyrosol). - Sécoiridoïdes - Lignanes - Flavonoïdes 	<ul style="list-style-type: none"> - Oleuropéine, - Hydroxytyrosol - Tyrosol - Catéchine - Acide caféique - Acide vanillique - Vanilline - Rutine -Lutéolin-7-glucoside - Verbascoside - Apigenin-7-glucoside - Diosmetin-7-glucoside - Lutéoléine. 	<ul style="list-style-type: none"> - Hydroxytyrosol - Tyrosol - Acide caféique - Acide benzoïque - Rutine - Acides galliques - Acides protocatéchiques - Acides p-hydroxybenzoïques - Acides vanilliques et féruliques, - Lignine. 	<ul style="list-style-type: none"> -Acides phénoliques (vanillique, gallique, caféique). - Hydroxytyrosol - Flavonoïdes. - Glucosides phénoliques - Tannins, les anthocyanines et les catéchines.

I.1.5. Activités antimicrobiennes

Olea europaea L. est l'une des plantes médicinales les plus utilisées en médecine traditionnelle. En effet, les composés phénoliques des sous-produits oléicoles, notamment, l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol, ont été évalués contre plusieurs microorganismes pathogènes, où ils ont montré une efficacité très significative concernant la guérison de

nombreux troubles infectieux d'origine bactérienne, fongique et virale (Tableau IV) (PEREIRA *et al.*, 2007 ; ESMAIL *et al.*, 2015 ; YAKHLEF, 2019 ; PIMIANTA *et al.*, 2020).

Le mécanisme de l'effet antimicrobien des PP est très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on cite : l'inhibition de la synthèse d'acides nucléiques, l'inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique, l'inhibition du métabolisme énergétique microbien et l'inhibition des enzymes hydrolytiques (COWAN, 1999 ; YAKHLEF, 2019).

Plusieurs études ont démontré l'activité des PP contre les virus, notamment le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (LEE HUANGGET *et al.*, 2003), ou encore, le virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV), où le composé phénolique principal des feuilles « l'oleuropéine » a inhibé l'infectiosité de ce dernier *in vitro* (MICOL *et al.*, 2005).

Tableau IV. Effet antimicrobien des extraits phénoliques des sous-produits de l'olivier.

	Microorganismes	Références
Feuilles	<i>Bacillus cereus</i> ; <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Listeria monocytogenes</i> ; <i>Bacillus cereus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> ; <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	(KO <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	(DJENNANE <i>et al.</i> , 2012)
Brindilles	-Activité Anti-VIH. -L'extrait d'hexane a montré une activité anti-coxsackievirus B-3 (CVB-3).	(LEE HUANGGET <i>et al.</i> , 2003 ; ABAZA <i>et al.</i> , 2019)
Margines	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Escherichia coli</i> <i>Acinetobacter sp</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> .	(ESMAIL <i>et al.</i> , 2015)

I.2. Autres plantes médicinales et leurs activités antimicrobiennes

Une variété de molécules dérivées d'extraits naturels de plantes ou d'herbes médicinales ayant des propriétés anti QS, antiseptiques et anti-virulence, a été identifiée (Tableau V). Ces dernières peuvent facilement inhiber la formation des biofilms microbiens ainsi que perturber leur structure mature (TARASZKIEWICZ *et al.*, 2013 ; LU *et al.*, 2019). Prenant l'exemple de la canneberge qui est un fruit très nutritif et riche en une variété de composés bioactifs. Connue pour sa forte concentration en PPT, elle est reconnue comme un excellent antioxydant pour lutter contre les infections bactériennes. Certains composants de ce fruit, sont capables de perturber la MEC de plusieurs bactéries (KUANG *et al.*, 2018).



Figure 3. Photographie montrant quelques plantes médicinales étudiées. (A) *Holarrhena floribunda* (AMPOFO *et al.*, 2020); (B) *Euphorbia hirta* (ROKO, 2020); (C) *Melia dubia* (GOPAL *et al.*, 2015).

Tableau V. Quelques extraits naturels et leurs effets sur la formation des biofilms.

Composé/plante	Effet sur les biofilms	Références
Extraits d'écorce de <i>Melia dubia</i>	Réduction de la formation du biofilm d' <i>Escherichia coli</i> de 84%, et inhibition de facteurs de virulence.	(TARASZKIEWICZ <i>et al.</i> , 2013).
Le cinnamaldéhyde (la cannelle)	Interférence avec les molécules du QS chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et les espèces du genre <i>Vibrio</i> .	(YAN <i>et al.</i> , 2019)

Les catéchines (le thé vert)	Inhibition du biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthiciline (SARM).	(ZHAO <i>et al.</i> , 2021)
Les alcaloïdes stéroïdiens (<i>Holarrhena floribunda</i>)	La fraction méthanolique inhibe la formation du biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> avec une CMI de 0.0625mg/ml.	(AMPOFO <i>et al.</i> , 2020).
Les furo-coumarines (pamplemousse)	Inhibition d'AI-1 et AI-2 du QS chez <i>Escherichia coli</i> et divers agents pathogènes.	(YAN <i>et al.</i> , 2019)
La propolis	Les extraits éthanoliques de propolis, ont montré un effet inhibiteur contre la croissance et l'adhérence de <i>Streptococcus mutans</i> .	(KUANG <i>et al.</i> , 2018)
<i>Allium sativum</i> (extrait d'ail frais)	Diminuer les facteurs de virulence et interrompre la signalisation du QS chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	(LU <i>et al.</i> , 2019)
La phlorétine (Pomme)	Réduction de la formation du biofilm et la production des fimbriae chez <i>Escherichia coli</i> O157 :H7.	(LU <i>et al.</i> , 2019)
Epigallocatechin gallate du thé vert	Inhibition de l'expression de gènes de virulence et la formation de biofilm chez <i>Enterococcus faecalis</i> .	(KUANG <i>et al.</i> , 2018)
Feuilles de <i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	L'extrait éthanoliques inhibe la formation des biofilms staphylococciques et élimine les biofilms matures.	(LU <i>et al.</i> , 2019)

<i>Euphorbia hirta</i>	L'extrait éthanolique inhibe la formation du biofilm de <i>Shigella flexneri</i> de (81%).	(ROKO, 2020)
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	L'extrait méthanolique réduit la production de facteurs de virulence à detection QS chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> avec CMI (100 µg / ml).	(COMPAORE <i>et al.</i> , 2021)

I.3. Huiles essentielles

Les huiles essentielles végétales sont des liquides huileux aromatiques, qui sont obtenus à partir de diverses parties de plantes (Tableau VI). Elles sont largement utilisées dans de multiples domaines, notamment pour le traitement de certaines maladies internes et externes, due à leur richesse en composés phytochimiques (COWAN, 1999 ; SADOU *et al.*, 2015 ; REYES *et al.*, 2020). Concernant l'inactivation microbienne, il a été rapporté qu'elles affectent principalement la membrane cellulaire. Cela conduit à la perturbation des processus cellulaires vitaux, notamment le transport membranaire, la régulation métabolique et la production d'énergie (GRIGORE-GURGU *et al.*, 2019).

Tableau VI. Quelques huiles essentielles et leur activité antimicrobienne.

La plante	La cible	Références
<i>Thym</i>	Inhibe de manière significative le biofilm formé par <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i>	(GRIGORE-GURGU <i>et al.</i> , 2019).
Origan mexicain <i>Lippia berlandieri</i> <i>Schauer</i>	Inhibe le biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Salmonella Thyphimurium</i> .	(REYES <i>et al.</i> , 2020)

<i>Syzygium aromaticum</i> (Clou de girofle) <i>Mentha spicata</i> (Menthe verte)	Activité antifongique. Inhibition de la croissance du biofilm listériel.	(GRIGORE-GURGU <i>et al.</i> , 2019 ; ALQAHTANI, 2019)
<i>Pinus halepensis</i> (pin d'Alep)	Bactéries Gram positif	(SADOU <i>et al.</i> , 2015)
<i>Aeollanthus</i> <i>heliotropioides</i>	Réduction du biofilm d' <i>Escherichia coli</i> avec une CMI de 2,1 mg/ml.	(NGUIMATSIA <i>et al.</i> , 2021)
<i>Nigella sativa</i>	Elimination du biofilm de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	(DIDI, 2021)
<i>Cocos nucifera</i> (noix de coco)	Activités antimicrobiennes, antivirales et anti-protozoaires.	(ALQAHTANI, 2019)

II. Composés phénoliques

II.1. Définition

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. Les polyphénols (PP), dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules organiques naturelles synthétisées exclusivement par les plantes, aussi bien au cours du développement normal que dans les conditions de stress. C'est un très vaste groupe de substances avec plus de 8000 structures phénoliques connues. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau aromatique (Figure 4) auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH), libre ou engagé dans une autre fonction chimique (MACHEIX *et al.*, 2005 ; SAHLI, 2017 ; SENANI-OULARBI, 2018 ; KUANG *et al.*, 2018 ; SINGLA *et al.*, 2019).

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois. Leur répartition quantitative et qualitative est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006, AOUIDI *et al.*, 2009).

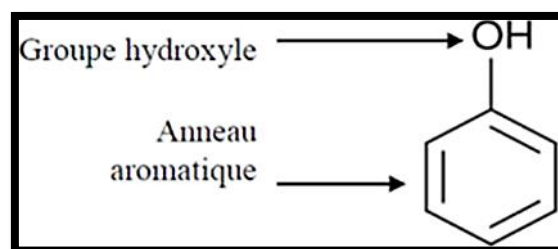


Figure 4. Structure du noyau phénol (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

II.2. Biosynthèse

Du point de vue biosynthétique, les composés phénoliques des végétaux peuvent être engendrés par deux grandes voies métaboliques : la voie de l'acide shikimique et la voie acétate (ACHAT, 2013 ; SAHLI, 2017).

- La voie du shikimate : c'est une voie aboutissant à la biosynthèse de certains acides aminés aromatiques, puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples. Elle est présente chez les bactéries, les champignons et les plantes, mais est absente chez les animaux, ceci ayant pour conséquence que les acides aminés aromatiques doivent faire partie intégrante de leur alimentation (SAHLI, 2017 ; SENANI-OULARBI, 2018).

- **La voie d'acétate** : Elle consiste en la condensation de plusieurs unités acétates formant ainsi des polyacétates de longueur variables, menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les quinones (MANALLAH, 2012 ; ACHAT, 2013).

En effet, la combinaison de ces deux voies métaboliques, conduit à l'élaboration des composés phénoliques d'origine mixte : les flavonoïdes (SAHLI, 2017).

II.3. Classification des polyphénols

Les composés phénoliques peuvent fondamentalement être regroupés en de nombreuses classes (Tableau VII) (MANALLAH, 2012 ; SAHLI, 2017) qui se différencient par la complexité de leur squelette, par le degré de sa modification, ainsi que par les liaisons des molécules de base avec d'autres molécules glucidiques, lipidiques, protéiques, ou encore les autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques (SENANI-OULARBI, 2018 ; SINGLA *et al.*, 2019).

Tableau VII. Principales classes des composés phénoliques (GOODWIN et MERCER, 1983 ; MACHEIX *et al.*, 2005 ; BALASUNDRAM *et al.*, 2006)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simples, benzoquinones	Catéchol	Pomme
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	Acide gallique	Epices
C6-C2	Acétophénones	3-acétyl-6-méthoxybenzaldéhyde	Saule
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques coumarines	Acide caféique Scopolétine	Pomme de terre Citrus
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C6-C1-C6	Xanthones	Bellidifoline	Racine de gentiane
C6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine Rétinoïde	Légumes, fleurs Camomille
(C6-C3) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin

(C6-C3-C6) ₂	Bi flavonoides	Amentoflavone	Garcinia
(C6-C3) _n	Lignines		Noyau des fruits
(C6-C3-C ₆) _n	Tanins		Raisin rouge

II.4. Activité antioxydante des composés phénoliques

L'intervention des composés phénoliques se fait via plusieurs mécanismes d'action :

II.4.1. Piégeage des espèces oxygénées réactives (ERO)

Les ERO sont des espèces chimiques, possédant un électron célibataire sur leur couche périphérique, ce qui leur confère un fort degré de réactivité (MIGDAL et SERRES, 2011). Elles peuvent être d'origine exogène, produites par des rayonnements ionisants par exemple, ou bien endogène, apparaissant comme sous-produits du métabolisme normal de l'oxygène.

Leur concentration dans la cellule est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants (HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1989). Cependant, un excès de production peut déborder les systèmes de défense antioxydant et provoquer la modification des protéines, de l'ADN et les lipides de la membrane cellulaire (MIGDAL et SERRES, 2011). En effet, les polyphénols sont capables de réduire rapidement les radicaux libres oxydants, via le transfert d'un atome d'hydrogène, et le convertir ainsi en un composé stable non radicalaire (ACHAT, 2013).

II.4.2. Chélation des ions métalliques

La chélation est un processus au cours duquel est constitué un complexe entre un ligand dit agent chélateur, et un cation métallique. Certains composés phénoliques contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition, tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^{+}). En effet, les PP peuvent limiter la croissance des bactéries grâce à cette capacité à chélater le fer. Ce dernier joue un rôle fondamental dans plusieurs fonctions y compris sa nécessité pour la respiration et pour la synthèse de l'ADN (MEKHOUKHE, 2008 ; ACHAT, 2013 ; SENANI-OULARBI, 2018).

II.4.3. Inhibition des enzymes

Les polyphénols possèdent une affinité pour une grande variété de protéines. Ils sont capables de se complexer avec les enzymes génératrices de radicaux libres, et par voie de conséquence bloquer les sites actifs, inhibant ainsi leur activité. En effet, les flavonoïdes sont

les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet (COWAN, 1999 ; MEKHOUKHE, 2008 ; ACHAT, 2013).

II.5. Intérêt biologique des composés phénoliques

II.5.1. Importance des polyphénols chez les plantes

Les composés phénoliques sont associés à de nombreux processus vitaux, tels que la croissance cellulaire, l'organogénèse, la germination, et la maturation des fruits (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006). Ils sont aussi responsables des propriétés sensorielles notamment la pigmentation, permettant d'attirer les insectes qui apportent le pollen, et déclenchant ainsi la fécondation et la reproduction (COWAN, 1999). De plus, certains PP servent de mécanismes de défense contre les attaques des agents pathogènes tels que les insectes, les champignons et les bactéries. D'autres encore, ils participent à la protection des végétaux contre le rayonnement solaire, en raison de leur localisation superficielle dans les tissus (AOUIDI, 2012 ; SAHLI, 2017).

II.5.2. Importance des polyphénols pour l'homme

Beaucoup d'études ont mis en avant leurs avantages potentiels pour la santé, où on leur reconnaît des activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, anticancéreuses et antimicrobiennes (AOUIDI, 2012 ; MANALLAH, 2012 ; LAKACHE *et al.*, 2019 ; PIMIANTA *et al.*, 2020 ; AISSAOUI *et al.*, 2021).

Contrairement aux antioxydants synthétiques, ils n'ont aucun effet nuisible sur la santé humaine. Ils sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique. Leur nature chimique fait de ces composés des agents réducteurs, ainsi, ils protégeraient les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres, qui contribuent aux lésions oxydatives des tissus dans le corps (BENAVENTE-GARCIA, 2000).

III. Biofilms

III.1. Généralités et définitions

La définition du terme « Biofilm » a évolué avec le développement de nouvelles techniques d'examen direct et l'avancement des différents travaux réalisés au cours des dernières décennies. Le biofilm est une pellicule hétérogène, complexe, organisée et constituée d'un ensemble de cellules microbiennes pouvant contenir jusqu'à 100 millions à 10 milliards de cellules par gramme de matière déshydratée (AUMERAN *et al.*, 2020 ; ZHANG *et al.*, 2020). Il peut être formé par des populations mono ou polymicrobiennes (Figure 5) vivant en symbiose, associées entre elles et encapsulées dans une matrice extracellulaire adhésive, protectrice et autoproduite aussi appelée « couche muqueuse ». L'ensemble ainsi formé étant lui-même attaché de manière irréversible à une surface non toxique, en créant des communautés « sessiles » phénotypiquement différentes des cellules à l'état libre dit « planctonique ». Ces surfaces qui servent de support peuvent être biotiques : la peau, les muqueuses, le tube digestif et les racines des plantes, ou abiotiques : appareillage médical, les roches, le bois, les canalisations, les surfaces présentes au niveau de l'abattoir, les coques de navires etc... (CARPENTIER, 2014 ; FLEMMING *et al.*, 2016 ; ABEBE, 2020).

Les microorganismes forment des biofilms différents selon les espèces présentes dans la structure, en revanche, ils partagent toujours quelques propriétés communes (YANNICK *et al.*, 2014 ; MITROFANOVA *et al.*, 2017) :

- Les cellules microbiennes présentes dans le biofilm sont enrobées d'une matrice polymérique fortement hydratée et composée d'exo-polysaccharides (EPS), de protéines et d'acides nucléiques. Cependant, leur répartition est en fonction de l'espèce concernée (GOETZ *et al.*, 2016) ;
- Un ensemble de signaux extracellulaires et intracellulaires, présents dans l'environnement ou produits par les cellules bactériennes, influencent le développement des différents biofilms ;
- Les biofilms partagent les mêmes stades du développement quel que soit l'environnement colonisé ;
- Le biofilm représente une véritable stratégie qui permet aux microorganismes de s'adapter aux variétés de stress, permettant ainsi la colonisation d'une large gamme de niches écologiques très diverses et survivre aux agressions extérieures telles que le système immunitaire de l'hôte, la dessiccation ou encore les biocides (YANNICK *et al.*, 2014).

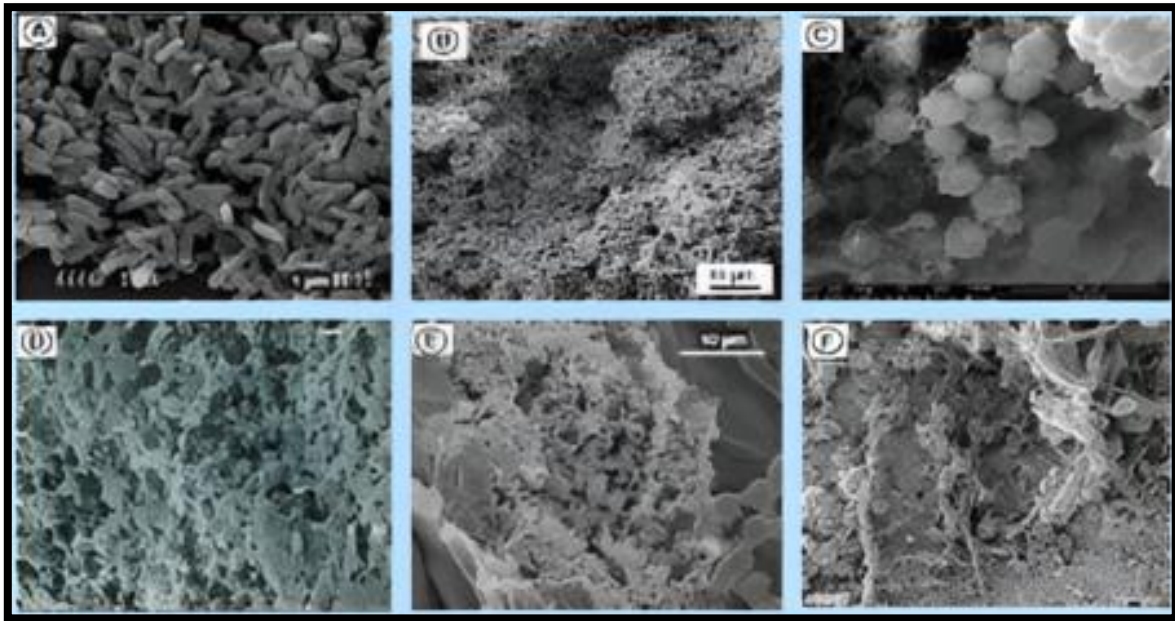


Figure 5. Biofilms bactériens. (A) Image (SEM) de *Pseudomonas aeruginosa* fixés à des surfaces en verre ; (B) Biofilm d'*Escherichia coli* sur une surface de l'oxyde de titane ; (C) Biofilm de *Staphylococcus aureus* associée au cathéter in vivo ; (D) *Staphylococcus epidermidis* sur un cathéter en téflon ; (E) Biofilm de *Salmonella enterica* à l'intérieur d'un filet de cantaloup inoculé ; (F) Biofilms mixtes matures formés sur des disques d'hydroxyapatite par *Streptococcus mutans* et *Candida albicans* (RABIN *et al.*, 2015).

III.2. Historique et découverte

Les microorganismes ont été la première forme de vie sur notre planète, soit bien avant l'apparition de l'homme lui-même. En revanche, en étant invisibles à l'œil nu, leur existence n'était pas soupçonnée jusqu'au XVII^e siècle, lorsque le scientifique néerlandais « Antonie van Leeuwenhoek » (1632-1723) a développé le premier microscope.

« Van Leeuwenhoek » n'avait pas de formation technique, mais sa curiosité scientifique lui a permis de découvrir un monde totalement inconnu. En effet, il a réussi à observer et à décrire pour la première fois des organismes microscopiques à partir d'un échantillon de grattage de sa propre surface dentaire, à qui il donne le nom des « animalcules » (ANDROUTROS, 2004 ; HØIBY, 2014). Il publia alors les premières descriptions de bactéries agrégées, faisant référence à la formation de la plaque dentaire où il a souligné la vaste accumulation de microorganismes qu'il a pu observer : "Le nombre de ces animalcules dans la gale des dents d'un homme dépassent le nombre d'hommes dans un royaume." (LANE, 2015).

Durant les années 1800, « Robert Koch » (1843-1910) a mis en place un milieu nutritif, afin d'isoler et d'identifier les microorganismes vivants en tant que cause de maladie. Néanmoins, cette approche a conduit les microbiologistes à avoir une vue partielle des modes de vie microbienne dans la nature (MUNCH, 2003 ; HØIBY, 2014).

En 1933, « Arthur T. Henrici » (1889-1943) remarqua la formation d'un dépôt de microorganismes qui s'épaissit progressivement, fixé à la surface des lames en verre plongées dans un aquarium. Il a constaté alors que les microorganismes en milieux aqueux vivent en communautés adhérees à des surfaces et non pas à l'état libre. Plus tard, en 1940, « Heukalikian & Heller » ont constaté que ces surfaces favorisent leur croissance et augmentent leur activité métabolique. En 1943, « Claude E. Zobell » (1904-1989) a constaté que les nutriments organiques sont plus concentrés sur les surfaces que dans le fluide, permettant ainsi l'attachement des cellules (DONLAN, 2002 ; ROUX et GHIGO, 2006 ; LANE, 2015 ; LAGRAFEUILLE, 2016).

Les études de « Jones » en 1969 ont confirmé non seulement l'existence des biofilms hétérogènes fixés sur les filtres de stations d'épuration, mais aussi, la présence d'une matrice polysaccharidique, à l'aide d'un microscope électronique à transmission et à balayage. En 1973, « William G. Characklis » a démontré que ces dépôts microbiens étaient non seulement tenaces mais aussi résistants aux désinfectants grâce aux matrices d'exopolymères (DONLAN, 2002 ; LAGRAFEUILLE, 2016).

La notion de « Biofilm » a été proposée pour la première fois par le microbiologiste canadien « J.W Costerton » (1934-2012), en 1978, pour désigner le mode de vie naturel et principal de plusieurs microorganismes. L'historique des biofilms est marqué par leur passage au domaine médical. En 1985, « Costerton » a introduit pour la première fois la croissance du biofilm en microbiologie médicale, en faisant le lien entre la chronicité de certaines infections bactériennes et la formation d'un biofilm. Durant les années 1990, notamment avec les progrès rapides de la technologie, les scientifiques ont commencé à comprendre la complexité de la structure, et depuis, les études consacrées aux biofilms et le nombre de publications scientifiques ne cessent de croître (ROUX et GHIGO, 2006 ; LAGRAFEUILLE, 2016).

III.3. Distribution des biofilms dans l'environnement

Les biofilms sont présents dans toutes les niches de la biosphère. Ils colonisent toute surface, qu'elle soit naturelle ou artificielle. Dans la nature, il est commun de les retrouver dans les eaux, les marais et les lagunes hypersalines, dans les puits et les grottes, sur les racines et

feuilles de plantes, adhérents aux surfaces rocheuses et les sédiments, ainsi que dans le sol et les nappes d'eau souterraine (ROUX et GHIGO, 2006 ; MONMEYRAN, 2019).

Bien qu'ils colonisent souvent les interfaces solide-liquide, ils sont aussi capables de coloniser l'interface air-liquide pour former des films flottants, ou encore l'interface air-air, formant ainsi des biofilms à bulles (MOSHYNETS et SPIERS, 2016 ; SJOBERG *et al.*, 2020). Ils sont également présents sur les tissus humains : la peau, le tractus gastro-intestinal, le tractus urogénital, le tractus respiratoire haut, le tympan ainsi que les surfaces dentaires (BRIANDET *et al.*, 2012).

Les biofilms peuvent être aussi formés sur tous les types de matériaux tels que le plastique, le verre, le métal et le bois, notamment en industrie agroalimentaire, dans les équipements fermés, sur les ustensiles, les murs, jusqu'aux produits alimentaires, ainsi qu'au niveau des hôpitaux sur les différents dispositifs médicaux (GRIGORE-GURGU *et al.*, 2019).

L'environnement domestique fourmille également des biofilms. Les claviers d'ordinateurs, les téléphones, les télécommandes, les éponges, les planches à découper, les torchons, les pièces de monnaie, les siphons, les serviettes et les rideaux de douche, le porte-savon, et les robinets, sont tous des nids de microorganismes (BRIANDET *et al.*, 2012).

La figure ci-dessous, représente une variété de biofilms, à savoir : Un biofilm flottant de *Bacillus subtilis* formé sur une surface air-liquide (Figure 6A); Le fleuve sauvage du Tagliamento en Italie, qui est un bel exemple de colonisation dans la nature; Un biofilm qui se forme d'une manière continue sur la surface des dents; Un biofilm à bulles attaché aux murs formé dans un tunnel en Suède, où on peut observer la différence de transparence qui reflète le niveau de maturité du biofilm (Figure 6E), et enfin un biofilm extrêmement dense de moisissures dans un canard de bain (NADELL *et al.*, 2009 ; DORING et UEHLINGER, 2009 ; BRIANDET *et al.*, 2012 ; ANTEZACK, 2017 ; SJOBERG *et al.*, 2020).

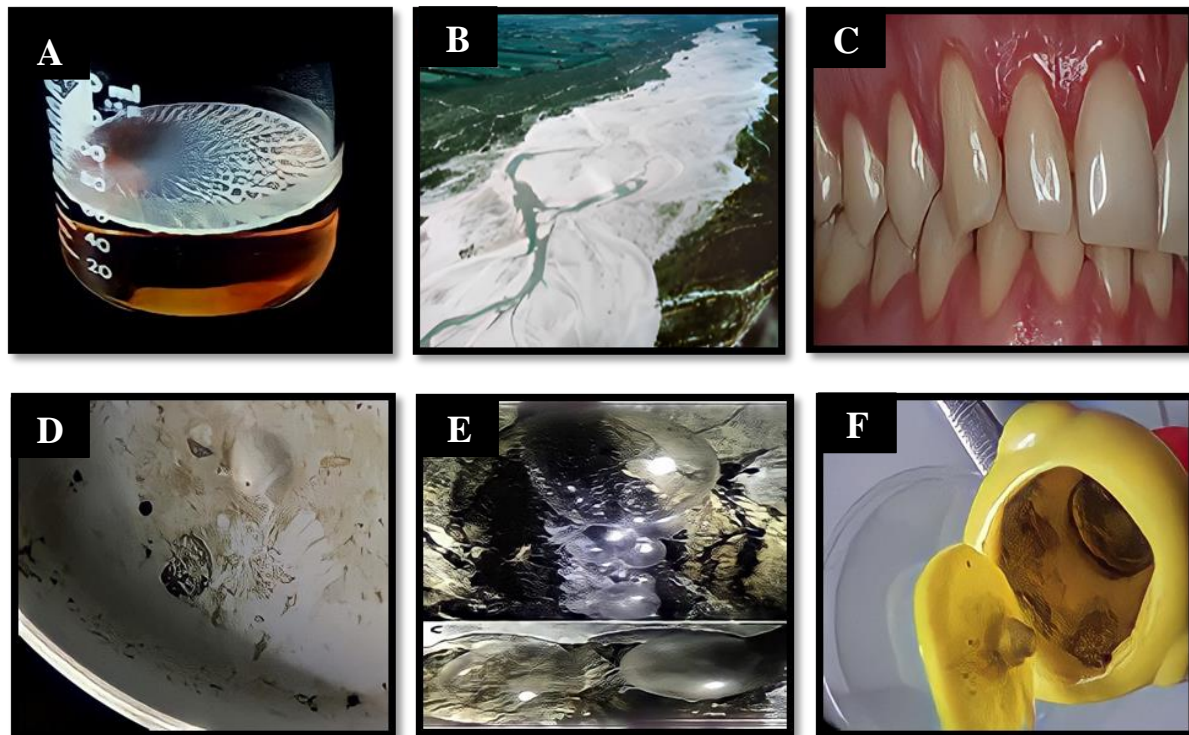


Figure 6. Biofilms dans l'environnement. (A) Un biofilm de *Bacillus subtilis* (NADELL *et al.*, 2009) ; (B) Le fleuve du Tagliamento (DORING et UEHLINGER, 2009) ; (C) Biofilm de la plaque dentaire (ANTEZACK, 2017) ; (D) Formation d'un biofilm dans un lavabo (BRIANDET *et al.*, 2012) ; (E) Un biofilm à bulles (SJOBERG *et al.*, 2020) ; (F) Biofilm à l'intérieur d'un canard de bain (BRIANDET *et al.*, 2012).

III.4. Formation d'un biofilm bactérien

Le biofilm bactérien est le résultat d'une évolution qui tend à favoriser les modes de vies résilients, résistants à de fortes pressions de l'environnement. Les bactéries peuvent basculer d'un mode de vie individuel libre, à un mode de vie communautaire et sessile tridimensionnel (CHUA *et al.*, 2014). Ce phénomène ne représente pas un simple assemblage de cellules, mais un changement radical du mode de vie des microorganismes qui le constituent, grâce à un processus dynamique et complexe caractérisé par une modification de l'expression génétique et par un changement de phénotype des différentes cellules concernées (ZHANG *et al.*, 2020). Quel que soit l'environnement colonisé, les biofilms se forment de la même manière en une série d'étapes séquentielles (VERDEROSA *et al.*, 2019 ; URUEN *et al.*, 2021) représentées dans la figure 7.

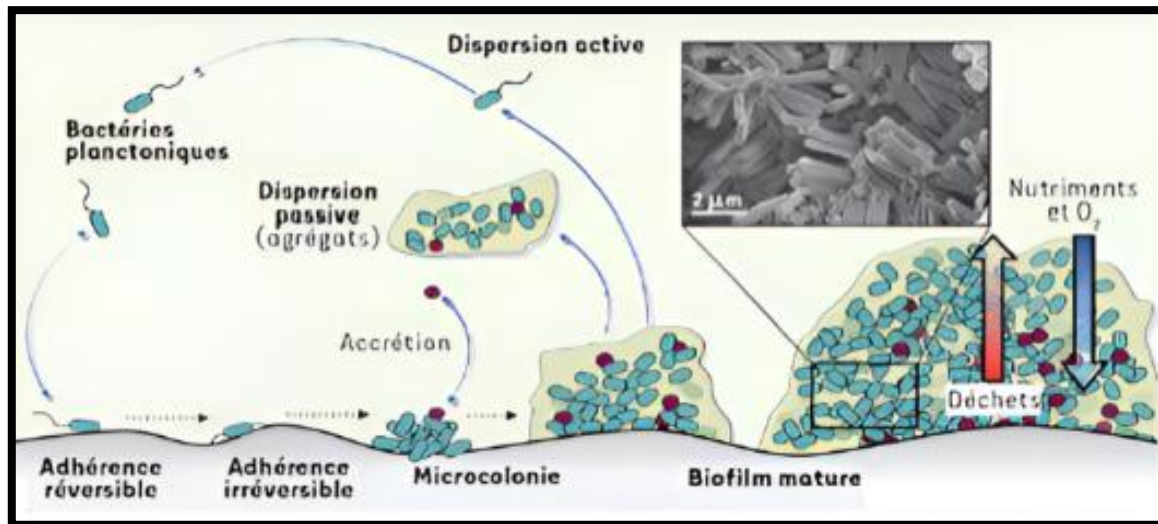


Figure 7. Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm (LEBEAUX et GHIGO, 2012).

III.4.1. Mise en place d'un film conditionnant

La surface est considérée comme étant le siège d'une adsorption irréversible de macromolécules. Lors de son immersion dans un milieu aqueux, les molécules organiques et inorganiques présentes se déposent spontanément sur la surface (DONLAN, 2001).

Cette accumulation de molécules à l'interface solide-liquide conduit à la formation rapide d'un « film conditionnant » appelé ainsi, car il peut modifier les propriétés physicochimiques initiales de la surface, soit en neutralisant les charges excessives et l'énergie libre qui préviennent l'établissement d'une proximité bactéries-surface, ou au contraire, diminuer le nombre de sites d'attachement disponibles pour les bactéries par les protéines déposées sur la surface. Les constituants de ce film vont servir de substrat aux microorganismes fixés. Il joue ainsi un rôle important dans l'adhésion et le maintien des bactéries sur les différentes surfaces. (STOODLEY *et al.*, 2002 ; BOAKYE *et al.*, 2019 ; CHOUDHARY *et al.*, 2020).

III.4.2. Adhésion

L'adhésion des cellules bactériennes aux surfaces est un phénomène très important car il représente un tournant entre la vie planctonique et le mode biofilm (TOYOFUKU *et al.*, 2015). L'interface solide-liquide entre la surface et le milieu aqueux fournit un environnement idéal pour la fixation ainsi que pour la croissance des cellules adhérentes (DONLAN, 2002).

III.4.2.1. Attachement initial

C'est l'étape préliminaire de la formation d'un biofilm et le résultat de l'interaction entre les bactéries et le substrat. En premier lieu, cela se fait de manière réversible, de sorte que les cellules s'adsorbent à la surface pendant un certain temps, mais peuvent se détacher et revenir au mode de vie planctonique si les conditions deviennent défavorables (STOODLEY *et al.*, 2002 ; NADELL *et al.*, 2009 ; ABEBE, 2020 ; CHOUDHARY *et al.*, 2020).

Les bactéries peuvent soit provenir du milieu planctonique aqueux dans lequel baigne la surface, comme elles peuvent être le résultat de la dispersion d'un biofilm présent dans l'environnement. Pour atteindre le support, elles doivent d'abord se déplacer, soit par un transport passif, qui dépend des caractéristiques du milieu, ou par une migration active (TARASZKIEWICZ *et al.*, 2013) qui nécessite la présence des appendices bactériens, tels que les flagelles et les cils, impliqués dans le mécanisme de mobilité cellulaire. La motilité de nage est considérée comme permettant aux microorganismes de surmonter les forces répulsives entre leur surface cellulaire et le support. Ainsi, les cellules s'adsorbent sur la surface conditionnée grâce aux mécanismes dits non spécifiques comme les forces électrostatiques, les interactions hydrophobes et les liaisons de Van der Waals. Ainsi, elles restent attachées jusqu'à ce que des mécanismes de fixation plus permanents soient en place (DONLAN, 2001 ; LAGRAFEUILLE, 2016 ; MONMEYRAN, 2019).

III.4.2.2. Attachement permanent

C'est un phénomène spécifique et actif qui nécessite une reconnaissance entre les bactéries et le support. Lorsque les forces d'attraction sont supérieures à la répulsion, un certain nombre de cellules adsorbées de manière réversible, restent immobilisées et la fixation devient irréversible grâce à des structures exposées à la surface cellulaire qui sont appelées «Les adhésines» (BOAKYE *et al.*, 2019). Ces dernières vont être soit portées par des structures filamenteuses (les fimbriae), soit directement sur la surface des bactéries (protéines, glycoprotéines, polysaccharides (PS), lipopolysaccharides (LPS)). Les molécules du film conditionnant présentent des récepteurs spécifiques de nature glucidique ou protéique reconnues par les adhésines bactériennes. Une fois la fixation est établie, le taux d'attachement augmente et le lien devient beaucoup plus stable (NADELL, 2009; LECHANTRE, 2019 ; ABEBE, 2020).

Cette adhésion implique des mécanismes variés selon le type bactérien. Chez les bactéries Gram négatives, il s'agit des pili, des fimbriae, des curli, des capsules et du glycocalix, quant

aux bactéries Gram positives, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. Ces molécules d'adhésion permettent d'établir des contacts cellule-cellule et des contacts cellule-surface (GEDIF, 2020).

III.4.3. Formation des micro-colonies

L'accumulation et la multiplication simultanées des bactéries conduisent à la formation des micro-colonies au cours de plusieurs cycles de division cellulaire, qui vont recouvrir totalement ou partiellement la surface (STOODLEY *et al.*, 2002 ; LECHANTRE, 2019). Les bactéries se multiplient lentement et consolident leur fixation en produisant des EPS (TARASZKIEWICZ *et al.*, 2013), renforçant ainsi le lien entre les cellules et le substrat et formant une matrice stabilisatrice et protectrice pour les micro-colonies. Des études d'espèces bactériennes dans des systèmes naturels ont montré qu'en raison de la communication de cellule à cellule quorum sensing (QS), l'accumulation peut impliquer un recrutement de cellules planctoniques à partir du milieu environnant (SREY *et al.*, 2013 ; VERDEROSA *et al.*, 2019).

III.4.4. Maturation du biofilm

Il s'agit d'une étape clé dans la formation d'un biofilm. Elle se caractérise par la poursuite de la sécrétion des EPS et d'autres composants de la matrice extracellulaire, et par le regroupement des micro-colonies individuelles, formant ainsi un tapis microbien plus ou moins épais (YAN *et al.*, 2019).

En fonction de la source de nutriments sur laquelle s'appuie le biofilm, il se développe en une structure organisée qui peut être plate ou complexe bien agencée dans l'espace telle que la structure en forme « Champignon » (GEDIF, 2020).

La maturation se déroule en deux phases. La première est caractérisée par des régulations génétiques engendrant un phénotype complètement différent par rapport aux cellules sous forme libre, notamment les gènes codant pour les protéines du métabolisme anaérobie. Ainsi, les bactéries s'adaptent aux conditions changeantes, en passant de la respiration à la fermentation en cas de limitation d'oxygène. La seconde phase est marquée par des synthèses polymériques importantes (KLEIN, 2011 ; LECHANTRE, 2019). Le biofilm pleinement mature atteint sa densité cellulaire maximale, des canaux de diffusion complexes se créent pour transporter les nutriments et les autres composantes nécessaires à la croissance bactérienne et pour se débarrasser des déchets et les cellules mortes (CHOUDHARY, 2020).

III.4.5. Dispersion du biofilm

À partir d'un certain stade de maturité, le biofilm entre dans une phase de détachement. Elle peut avoir lieu, soit par une lyse cellulaire soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement.

Les bactéries peuvent se détacher seules, par amas ou fragments selon les mécanismes impliqués (STOODLEY *et al.*, 2002 ; LECHANTRE, 2019 ; ABEBE, 2020). Il est considéré comme un phénomène passif lorsque des cellules individuelles ou de petits agrégats se détachent par érosion d'une façon continue, par un relargage massif et rapide de quantités importantes de bactéries, ou par abrasion lors de la collision des particules. Cependant, le détachement peut aussi être une stratégie active : par une mobilité bactérienne, une dégradation de la matrice ou encore par la communication cellulaire QS (LAGRAFEUILLE, 2016). Ce processus est initié par les bactéries elles-mêmes, menant à des changements dans l'expression de certains gènes spécifiques (KLEIN, 2011), leur permettant ainsi de migrer et coloniser de nouvelles surfaces afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement, et renouveler le cycle de formation (GEDIF, 2020).

III.5. Facteurs influençant l'apparition des biofilms

Selon DONLAN, (2002), l'attachement des cellules bactériennes à une surface va dépendre de différents facteurs (Tableau VIII). Une image claire de la fixation ne peut être obtenue sans tenir compte des propriétés de la surface sur laquelle les bactéries vont se fixer, des caractéristiques du milieu et des propriétés de la surface cellulaire. La variété de ces trois éléments est à l'origine de la diversité ainsi que de la prévalence des biofilms, les rendant spécifiques aux conditions dans lesquelles ils apparaissent.

III.5.1. Propriétés de la surface

L'étendue de la colonisation bactérienne semble augmenter à mesure que la rugosité de la surface augmente. Néanmoins, des études ultérieures ont montré que les surfaces lisses sont colonisées aussi facilement que les surfaces rugueuses (DONLAN et COSTERTON, 2002).

Les bactéries ont tendance à s'attacher plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le plastique plutôt qu'aux surfaces ayant des propriétés hydrophiles tel que le verre. Elles sont capables de surmonter les forces répulsives que peuvent exercer sur elles le substrat, via l'action de liaisons hydrophobes (CHALVET, 2009 ; CHOUDHARY, 2020).

De plus, la présence d'un film primaire organique sur la surface influence directement le mécanisme d'adhérence, en augmentant le taux d'attachement cellulaire (DONLAN, 2002; CHOUDHARY *et al.*, 2020).

Tableau VIII. Facteurs influençant la formation d'un biofilm (DONLAN, 2002).

Propriétés du substrat	Caractéristiques du milieu	Propriétés des cellules
<ul style="list-style-type: none"> - Texture. - Rugosité. - Hydrophobicité. - Présence préalable d'un film conditionnant. 	<ul style="list-style-type: none"> - La température. - Le pH. - Les cations (Ca^{2+}, Na^{2+}, Fe_3^+...). - La concentration en fer. - La concentration en nutriments. - Sources de carbone disponibles. - Disponibilité du milieu en oxygène. - La vitesse du flux. - La présence d'agents antimicrobiens. 	<ul style="list-style-type: none"> -Hydrophobicité de la surface. - Substances polymères extracellulaires. - Présence de flagelles. - Présence de fimbriae.

III.5.2. Caractéristiques du milieu

Les facteurs environnementaux conditionnent également l'implantation des biofilms. Le processus de leur formation, nécessite la présence des équipements enzymatiques et des entités structurales particulières dont l'activation dépend totalement des caractéristiques du milieu (DONLAN, 2002 ; KLEIN, 2011).

Ainsi, leur fixation va être favorisée lors de l'augmentation de la vitesse du flux, de la température, la concentration en oxygène, la disponibilité des nutriments et de certains cations, à condition que ces facteurs n'excèdent pas une valeur critique (DONLAN, 2002 ; GRIGORE-GURGU *et al.*, 2019).

III.5.3. Propriétés des cellules

L'hydrophobicité de la surface cellulaire, les appendices protéiques et la production des EPS influencent à la fois la vitesse et l'importance de l'adhésion bactérienne.

La plupart des fimbriae qui ont été examinées, contiennent une forte proportion de résidus d'acides aminés hydrophobes, ce qui favorise l'hydrophobicité et l'attachement de la surface

cellulaire. En effet, les EPS et les LPS sont plus importants dans l'attachement aux matériaux hydrophiles (DONLAN, 2002 ; CHOUDHARY *et al.*, 2020).

III.6. Composition et organisation structurale

III.6.1. Composition d'un biofilm

Les biofilms sont composés principalement de microorganismes et de la matrice qu'ils synthétisent. Les microorganismes ne constituent qu'une petite partie avec environ 2 à 15% du matériel du biofilm, selon l'espèce impliquée, alors que la matrice extracellulaire représente 50 à 90% de la masse organique totale du biofilm (KLEIN, 2011).

III.6.1.1. Microorganismes

Les biofilms peuvent être formés par une ou plusieurs espèces de microorganismes : on parle respectivement de biofilms homogènes ou de biofilms hétérogènes. La présence d'une espèce ou d'une autre est liée aux conditions environnementales. Par exemple, les biofilms formés en présence de la lumière du soleil sont constitués majoritairement de microorganismes phototrophes capables de synthétiser leur biomasse à partir du carbone minéral tels que les cyanobactéries, alors que les biofilms formés en absence de la lumière sont composés essentiellement de bactéries hétérotrophes. Une grande majorité de ce qui est connu sur les biofilms provient d'études réalisées en laboratoire sur des systèmes simples, mono-espèce. Néanmoins, dans la nature, les biofilms sont rarement trouvés sous forme homogène, ils sont souvent formés par des populations multiples de microorganismes (SUTHERLAND, 2001 ; CHALVET, 2009).

III.6.1.2. Matrice

La matrice du biofilm est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97% d'eau. Son contenu varie en fonction des espèces bactériennes qui composent le biofilm ainsi que les conditions de croissance. Elle peut être constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, de lipides, de glycolipides et de cations (Tableau IX). Chacun de ces composants participe à, et influe sur, l'architecture, la densité, la porosité et la stabilité mécanique de la matrice extracellulaire (MEC) (YANNICK *et al.*, 2014 ; FLEMMING *et al.*, 2016 ; VERDEROSA *et al.*, 2019 ; ZEA *et al.*, 2020).

Tableau IX. Principaux constituants de la matrice d'un biofilm (SUTHERLAND, 2001).

Composés	Pourcentage (%)
Eau	Jusqu'à 97%
Cellules microbiennes	2-5% (Beaucoup d'espèces).
Polysaccharides (homo et hétéro-polysaccharides).	1-2% (Neutre et poly-anionique).
Protéines (extracellulaires et issues de la lyse). ADN et ARN	<1-2% (beaucoup y compris les enzymes). <1-2% (à partir de cellules lysées).
Ions	Liés et libres

III.6.2. Organisation structurale

Les biofilms ne sont pas un dépôt de surface monocouche continu, mais plutôt une communauté bien organisée avec de nombreuses configurations spécialisées. Ils sont composés de microcolonies enfermées dans une matrice et séparées par des espaces libres, dépourvus de bactéries et parcourus par des courants aqueux (Figure 8). L'écoulement du liquide dans ces canaux permet à la fois la diffusion des nutriments aux bactéries et l'élimination de leurs produits de dégradation (DAVEY et O'TOOLE, 2000 ; ROUX et GHIGO, 2006).

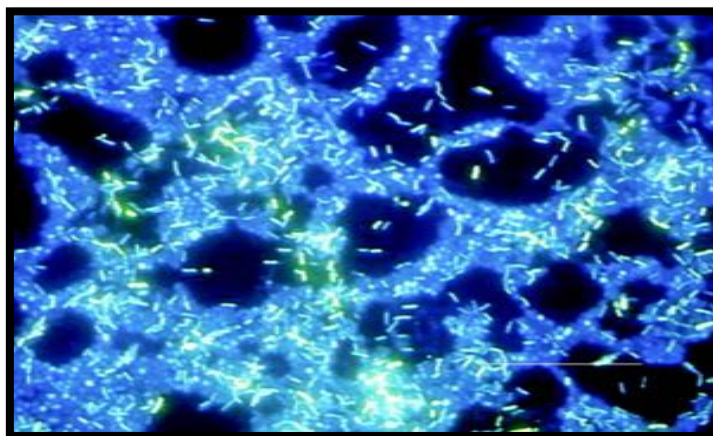


Figure 8. Biofilm pluri-espèces formé par *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Flavobacterium spp* examiné par microscopie à épifluorescence (DONLAN, 2002).

Les biofilms sont très hétérogènes, formés par plusieurs espèces bactériennes, avec des architectures et des épaisseurs très différentes. Néanmoins, ils possèdent généralement une structure stratifiée particulière, composée d'une fine monocouche de cellules, fixée à la surface du substrat, suivie de plusieurs couches épaisses qui se superposent. L'organisation en strates s'explique par l'existence de gradients physico-chimiques stables (nutriments, oxygène, pH) (CHALVET, 2009).

Les couches les plus profondes sont constituées par des petites cellules anaérobies à croissance lente, tandis que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont de grandes cellules aérobies et à croissance rapide. En effet, plus on avance vers les couches profondes, plus la diffusion en nutriments et la concentration en oxygène sont faibles, ce qui explique la présence de zones de croissance différentes localisées à petite échelle (Figure 9). Le gradient de pH est produit par le métabolisme hétérotrophe, tandis que le gradient de la concentration de molécules de signalisation QS varie en fonction de la distance entre les cellules productrices. Les biofilms récemment formés sont souvent monocouches, à l'inverse des biofilms plus anciens qui sont beaucoup plus stratifiés. Après la mort ou la lyse cellulaire, les microorganismes sont réutilisés comme nutriments : on parle de cannibalisme (CHALVET, 2009 ; KLEIN, 2011 ; FLEMMING *et al.*, 2016).

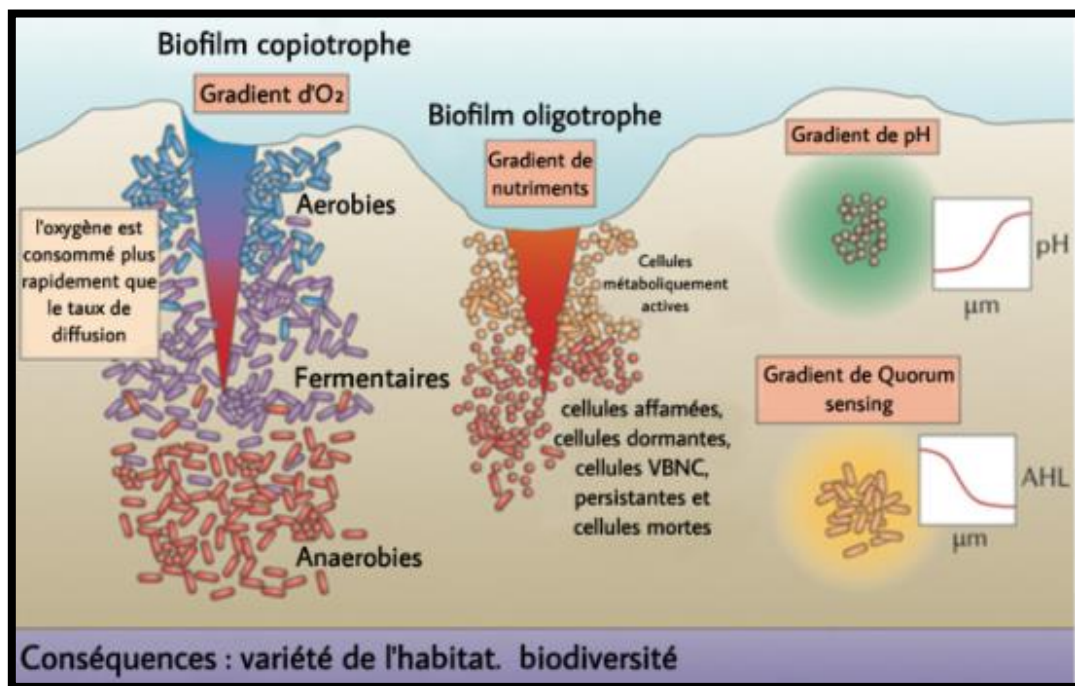


Figure 9. Etablissement de gradients stables au sein d'un biofilm hétérogène (FLEMMING *et al.*, 2016).

III.7. Interactions au sein d'un biofilm

La coexistence de multiples communautés microbiennes au sein du même biofilm, engendre des interactions intra et inter-espèces, qui peuvent avoir des effets positifs ou négatifs pour les cellules, et ce à travers des phénomènes de coopération ou de compétition.

On peut citer comme exemple bénéfique, la capacité de certaines espèces bactériennes à modifier leur microenvironnement, rendant ce dernier plus favorable pour la croissance des autres microorganismes présents, en modulant le pH du milieu, la concentration en oxygène ou encore en produisant des métabolites pouvant servir de nutriments aux espèces voisines (STEWART et FRANKLIN, 2008 ; GOLLER et ROMEO, 2008 ; MONMEYRAN, 2019).

A l'opposé, les différentes colonies de microorganismes occupant une même niche écologique entrent en compétition, soit par une exploitation compétitive, c'est-à-dire un ensemble d'interactions indirectes pour l'utilisation de ressources présentes en quantités limitées, ou par une interférence compétitive qui implique des interactions directes conduisant à l'altération de la survie et l'accès des compétiteurs aux niches ainsi qu'aux ressources nutritives (LAGRAFEUILLE, 2016 ; FLEMMING *et al.*, 2016).

III.8. Régulation de la formation des biofilms : Notion du Quorum sensing.

La formation d'un biofilm est un processus énergivore qui nécessite un système de régulation hautement perfectionné. Un ensemble de signaux est perçus par ces systèmes de régulation et influencent les différentes étapes de formation de biofilm. Le QS est un mode de signalisation bactérien qui repose sur la production, la sécrétion et la détection, par les bactéries, de petites molécules médiatrices appelées «autoinducteurs» (AI) qui diffèrent selon le type bactérien, et dont la concentration dans le milieu extracellulaire est proportionnelle au nombre de cellules présentes (Figure 10) (FLEMMING *et al.*, 2016).

Une fois la concentration d'une molécule signal atteint un niveau seuil, une réponse cellulaire est enclenchée par l'activation et la répression de gènes spécifiques, efficaces seulement lorsque la densité cellulaire est importante (VERDEROSA *et al.*, 2019 ; MION *et al.*, 2019).

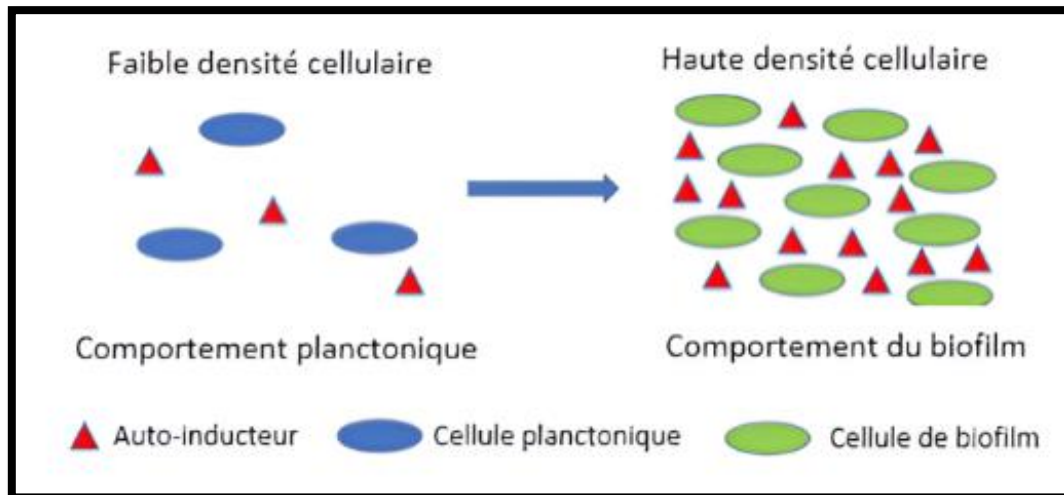


Figure 10. Illustration du Quorum sensing (VERDEROSA *et al.*, 2019).

Le QS joue un rôle très important dans la régulation de la physiologie d'un biofilm, en modulant la taille de sa population ainsi que l'orchestration des comportements de groupe. Il aurait aussi un rôle dans la détermination de son épaisseur, et l'initiation du phénomène de dispersion. Il peut également réprimer ou stimuler l'expression de certains gènes particuliers comme par exemple la motilité, la sporulation et les facteurs de virulence (CHALVET, 2009 ; MION *et al.*, 2019).

III.9. Résistance et tolérance aux agents antimicrobiens

La formation de biofilm apporte aux microorganismes la capacité de résister de 10 à 1000 fois plus à l'action d'un agent antimicrobien. La résistance est considérée comme étant la capacité des cellules à se multiplier en présence d'un biocide (antibiotiques ou antiseptiques). C'est un mécanisme génétiquement codé, c'est-à-dire transmis d'une génération à une autre. Ils peuvent aussi présenter une tolérance, ainsi, ils sont capables de survivre à des concentrations très élevés mais avec une multiplication cellulaire interrompue. Cette caractéristique est phénotypique transitoire et non héréditaire. (YANNICK *et al.*, 2014 ; FLEMMING *et al.*, 2016 ; GEDIF, 2020 ; ABEBE, 2020).

III.9.1. Blocage

Les EPS jouent un rôle de barrière filtrante, en empêchant les grosses molécules (par exemple les anticorps) et les cellules inflammatoires de pénétrer profondément dans la matrice du biofilm. Il peut également agir comme une barrière de diffusion même pour les petites molécules comme les agents antimicrobiens. La matrice extracellulaire protège également les cellules de la dérive en les empêchant d'être emportées par le courant (MAH et O'TOOLE,

2001 ; TARASZKIEWICZ *et al.*, 2013; GEDIF, 2020 ; ZEA *et al.*, 2020 ; URUEN *et al.*, 2021).

III.9.2. Protection mutuelle

Par exemple, les bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent sécréter des enzymes protectrices ou des protéines de liaison qui peuvent protéger les bactéries voisines non résistantes aux antibiotiques. Elles peuvent également favoriser le contact entre elles pour transférer les gènes de résistance par transmission horizontale (DAVEY et O'TOOLE, 2000 STEWART et FRANKLIN, 2008 ; PHILLIPS *et al.*, 2010 ; MONMEYRAN, 2019).

III.9.3. Présence de bactéries persistantes

C'est une stratégie de survie, qui consiste à ce qu'une sous-population devienne métaboliquement inactive, c'est-à-dire en dormance. Comme elles doivent être actives pour que les antibiotiques agissent, les bactéries en hibernation appelées « Persisters » jouent un rôle important dans la tolérance du biofilm aux antibiotiques (ATB). L'accès limité aux nutriments, la faible concentration en oxygène et le pH élevé des couches profondes du biofilm entraînent un ralentissement de la croissance cellulaire, ce qui pourrait réduire l'activité des agents antibactériens (LEBEAUX et GHIGO, 2012 ; YAN *et al.*, 2019 ; ZHANG *et al.*, 2020).

III.10. Modèles de bactéries formatrices de biofilms

a) *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, groupés en amas, d'où l'origine de leur nom « staphyle » qui désigne la grappe de raisin en grec. *Staphylococcus aureus* est un germe aéro-anaérobie facultatif, immobile, non sporulé, catalase et coagulase positives et oxydase négative. Elle est capable de croître sur une large gamme de milieux de culture : sélectifs par exemple, les géloses Chapman, et Baird Parker, ou non sélectifs, tels que les milieux gélosés enrichis en sang ou encore une gélose nutritive. Elle est signalée parmi les microorganismes les plus fréquemment isolés à partir des surfaces et des produits alimentaires (OUCHAR *et al.*, 2013 ; PARASTAN *et al.*, 2020).

b) *Enterococcus faecalis*

Ce sont des cocci à Gram positif, anaérobies mais aérobie tolérants, catalase négative, immobiles, se présentant sous forme de paires ou de courtes chaînettes. Elles sont présentes dans une variété d'habitats, tels que le sol, les plantes, l'eau, le tube digestif humain et animal. *Enterococcus faecalis* est capable de croître aussi bien sur des milieux sélectifs comme la gélose

Bile Esculin sodium Azide (BEA), que non sélectifs tel que la gélose nutritive (MANTION, 2015 ; BENMOUNA, 2019).

c) *Escherichia coli*

Escherichia coli est un hôte normal du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. C'est un coccobacille, Gram négatif, non sporulé, mobile grâce à une ciliature péritriche, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est une bactérie mésophile, aéro- anaérobie facultative, catalase positive et oxydase négative. Elle fermente le glucose et le lactose avec production de gaz. Elle est une indicatrice de contamination fécale des eaux potables et des aliments (BOUCHOUKA, 2016).

d) *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida*

C'est un bacille ubiquitaire à Gram négatif, non sporulé et mobile par ciliature polaire. Elle est aérobie stricte, catalase et oxydase positives, incapable de fermenter le glucose (IRVING *et al.*, 2005). Le genre *Pseudomonas* comprend une soixantaine d'espèces dont *Pseudomonas putida*, une bactérie saprotrophique du sol, et l'espèce type qui est *Pseudomonas aeruginosa*. Cette dernière peut produire deux pigments : la pyocyanine, de couleur bleue verdâtre, et la pyoverdine, de couleur jaune verdâtre (KAYSER *et al.*, 2005).

e) *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca*

Les espèces du genre *Klebsiella* sont des bacilles qui font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives à Gram négatif, catalase positive, oxydase négative, toujours immobiles et généralement entourées d'une capsule polysaccharidique. Ce genre comporte 5 espèces différentes. L'espèce type est *Klebsiella pneumoniae* connue pour sa capacité à former des biofilms (TOWNSEND *et al.*, 2020). Elle est d'ailleurs la plus fréquemment retrouvée en clinique humaine que *Klebsiella oxytoca* (NIRWATI *et al.*, 2019).

f) *Bacillus cereus* et *Bacillus licheniformis*

Le genre *Bacillus* est un vaste groupe de bactéries aéro-anaérobies facultatives appartenant à la famille des *Bacillaceae*, phylum des firmicutes, ayant en commun la faculté de produire des spores. *Bacillus cereus* est une bactérie Gram positif, oxydase négative et catalase positive. Son habitat primaire est le sol, mais grâce à l'extrême résistance de ses spores, elle est ubiquiste. *Bacillus licheniformis* est une source majeure de contamination microbienne pour l'industrie laitière à cause de sa capacité à former des biofilms (MAJED *et al.*, 2016 ; WANG *et al.*, 2020).

Deuxième partie
Etude expérimentale

I. Matériel et méthodes

L'étude expérimentale est réalisée au sein du Laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel non biologique

La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation du matériel et des produits représentés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau X. Milieux de culture et produits utilisés.

Milieux de culture	Produits et réactifs	Solvants
<ul style="list-style-type: none"> - Bouillon cœur de cerveau (BHIB) (CONDA). - Bouillon tryptone soja (TSB). - Gélose nutritive (MMDEC). - Gélose Mueller Hinton (BIOLIFE). 	<ul style="list-style-type: none"> - Carbonate de sodium (Na_2CO_3). - Réactif de Folin-Ciocalteu (SIGMA) - 2,2-Diphényl-1 Picrylhydrazyl (DPPH) (SIGMA) - Glycérol à 30% - Tampon PBS - Eau physiologique 0,9% - Eau distillée - Acide gallique - Cristal violet - Disques d'antibiotique. 	<ul style="list-style-type: none"> - Acétate d'éthyle 99,5% - Ethanol 96% - DMSO (Diméthylsulfoxyde)

Tableau XI. Différents appareils et matériel utilisés.

Appareillage	Petit matériel
<ul style="list-style-type: none"> - Autoclave (WISD) ; - Etuve bactériologique 37°C (MEMMERT) ; - Bain-Marie (WiseBath, WISD) ; - Micro-centrifugeuse à eppendorfs (SANYO MSE, Microcenter, UK) ; - Agitateurs variés (agitateur magnétique HEIDOLPH, CIMAREC i poly15, vortex VELP scientifica ZX3) ; 	<ul style="list-style-type: none"> - Microplaques de 96 puits - Tubes en verre - Pipettes Pasteur et pipettes graduées. - Flacons et béchers - Fiole jaugée. - Entonnoir et éprouvettes. - Anse à boucle.

<ul style="list-style-type: none"> - Lecteur ELISA (Micro ELISA Reader (BIOTEK EL 311) ; - Balance de précision 0,01 mg (SARTORIUS) ; - Balance numérique (DENVER INSTRUMENTS MXX-612, capacité (g) : 610g) ; - Evaporateur rotatif (HAHN SHIN) ; - Spectrophotomètre visible (VIS-7220G) ; - Broyeur électrique (SELECLINE) ; - Réfrigérateur, congélateur (ENIEM). 	<ul style="list-style-type: none"> - Pince et Spatules. - Micropipettes 20-200 µl et 1000µl. - Ecouvillons. - Boîtes de Pétri (en plastique et en verre) - Bec Bunsen. - Tamiseur à mains - Barreau magnétique. - Embouts. - Cryotubes et Eppendorfs - Papier Wattman
---	---

I.1.2. Matériel biologique

I.1.2.1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur les brindilles de trois variétés principales d'oliviers dans la région de Kabylie, au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou, à savoir la variété *Chemlal*, *Azeradj* et l'olivier sauvage *Olea europaea sylvestris*. Les échantillons ayant fait l'objet de ce travail ont été récoltés sur deux sites différents (Figure 11) durant le mois d'avril 2021.



Figure 11. Carte géographique des zones d'échantillonnage (Google MAPS 2021).

I.1.2.2. Origine des souches microbiennes

Les germes utilisés dans ce travail sont des souches bactériennes (Tableau XII), d'origine alimentaire, identifiées par la méthode MALDI-TOF, isolées à partir des échantillons du lait de

chèvre, à l'exception de *Bacillus licheniformis* qui est isolée à partir du lait de vache, ainsi que des souches de référence obtenues au sein du laboratoire de recherche LABAB de l'université Mouloud MAMMERY de Tizi Ouzou.

Tableau XII. Différentes souches bactériennes utilisées.

Sources	Souches
Souches de référence	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 0009 -<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 -<i>Staphylococcus aureus</i> MU 50 -<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 -<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 -<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 -<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603
Souches d'origine alimentaire	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Pseudomonas putida</i> (13B) -<i>Klebsiella oxytoca</i> souche (7) -<i>Bacillus licheniformis</i> -<i>Bacillus cereus</i> souche (8) -<i>Bacillus cereus</i> souche (4)

I.2. Méthodes

I.2.1. Préparation du matériel végétal

1. Echantillonnage

Les échantillons ont été collectés dans leur habitat naturel loin de la pollution. Ensuite, ils ont été immédiatement transportés dans des sacs en papier à l'abri de la lumière. Aussitôt que la collecte, les brindilles ont été débarrassées des feuilles, lavées plusieurs fois avec de l'eau pour enlever la poussière et les autres impuretés, puis découpées en petits morceaux à l'aide de ciseaux (Figure 12).

2. Séchage

Une fois découpées, elles sont étalées sur du papier et séchées à l'air libre, à l'obscurité et à une température ambiante pendant 15 jours.

3. Broyage

La réalisation de cette étape doit être non dénaturante pour les échantillons. Les petits morceaux ainsi séchés sont ensuite broyés à l'aide d'un broyeur électrique.

4. Tamisage

Le broyat obtenu est tamisé à l'aide d'un tamiseur à mains, jusqu'à obtention d'une poudre fine, dans le but d'augmenter la surface d'échange entre le solide et le solvant d'extraction.

5. Conservation

La poudre résultante est conservée à l'obscurité dans des flacons stériles en verre et recouverts avec du papier aluminium, afin de préserver le maximum de molécules bioactives, jusqu'à son utilisation.



Figure 12. Différentes étapes de préparation du matériel végétal.

I.2.2. Extraction des polyphénols totaux

I.2.2.1. Choix du solvant organique

Le choix d'un solvant est primordial lorsqu'il s'agit d'une extraction des molécules bioactives. En effet, il est fondé sur plusieurs paramètres, à savoir : la nature des composés à extraire, leurs polarités, leurs solubilités dans le solvant ainsi que la nature du matériel végétal.

L'acétate d'éthyle est connu pour être un solvant convenable pour l'extraction des composés phénoliques (JONES et KINGHORN, 2005 ; HANDA *et al.*, 2008).

I.2.2.2. Méthode d'extraction

L'extraction solide-liquide par macération à froid est une opération simple et moins coûteuse qui permet le transfert de matière entre une phase « solide » qui contient la matière à extraire, et un solvant d'extraction « liquide ». En effet, elle consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec le solvant pour en extraire les principes actifs. Cette technique limite la libération des espèces chimiques volatiles dans l'air, comme elle permet d'éviter l'altération des substances thermosensibles qui peuvent, à température plus élevée, réagir et se dégrader (TAHOOU, 2016).

- **Mode opératoire**

Dans notre étude, il s'agit d'extraire les composés phénoliques présents dans la poudre des brindilles sèches de trois variétés d'oliviers, en utilisant un solvant polaire, l'acétate d'éthyle à 99,5%, suivant le protocole de TURKMEN *et al.*, (2006) avec quelques modifications. Ce procédé est décrit par le schéma représenté dans la figure ci-dessous :

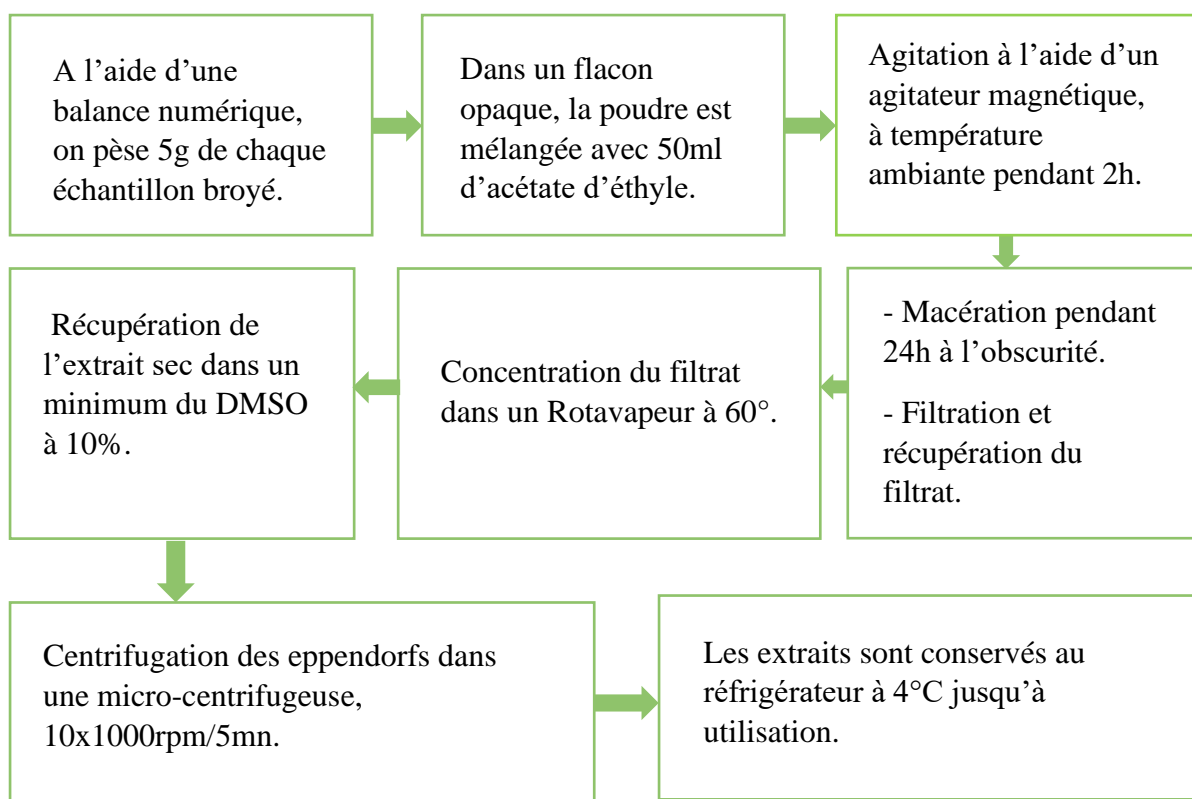


Figure 13. Diagramme d'extraction des composés phénoliques (TURKMEN *et al.*, 2006).

I.2.3. Rendement d'extraction

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = (M/M_0) \times 100$$

- Rdt (%) : Rendement exprimé en %.

- M : Masse en gramme de l'extrait sec récupéré.

- M₀ : Masse initiale en gramme du matériel végétal à traiter (MANALLAH, 2012).

I.2.4. Activité antibactérienne

Une fois que toutes les souches bactériennes sont identifiées, elles sont conservées à – 20°C dans des cryotubes contenant du BHIB additionné de glycérol (30%). Le glycérol est un agent conservateur et protecteur qui permet d'éviter la formation des cristaux dans le BHIB ensemencé par la souche, une fois retrouvé dans le congélateur.

Dans cette étude, les techniques utilisées afin d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits bruts de brindilles de l'olivier sont celles de la diffusion sur gélose, contact direct dans un milieu liquide et contact direct sans milieu de culture.

1. Revivification et enrichissement

A partir des milieux de conservation des souches, un enrichissement est réalisé en ensemencant chaque souche dans un tube contenant 9 ml de BHIB. Ensuite, les tubes sont incubés dans l'étuve pendant 24 h à 37°C.

2. Préparation des pré-cultures

Des repiquages successifs sont réalisés sur des boîtes de Pétri préalablement coulées de gélose nutritive (GN). En effet, après enrichissement, chaque souche est repiquée en strie sur GN, puis incubée à 37°C pendant 18h afin d'obtenir des cultures jeunes.

3. Préparation de la suspension bactérienne

A partir d'une culture bactérienne pure de 18h, quelques colonies sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur, et remises en suspensions dans des tubes contenant 9 ml de l'eau physiologique stérile. Une agitation avec vortex est effectuée pour quelques secondes afin d'assurer une bonne homogénéisation.

La standardisation de la suspension est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre visible réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. L'inoculum bactérien doit être ajusté jusqu'à l'obtention d'une opacité de Mac Ferland 0,5, c'est-à-dire, une densité optique comprise entre 0,08-0,1 soit environ 10^7 - 10^8 UFC/ml.

4. Diffusion sur milieu gélosé

- **Principe**

Dans ce test, l'activité antimicrobienne des extraits bruts est évaluée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé « aromagramme ». Elle repose sur le principe de la compétition entre la croissance de la souche bactérienne et la diffusion du principe actif dans un milieu solide à partir d'un support en papier pré-imprégné (BALOUIRI *et al.*, 2016).

- **Mode opératoire**

Des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre contenant environ 15 ml du milieu Mueller Hinton en surfusion ont été préparées et laissées se solidifier pendant 10mn. A l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne standardisée, les géloses Mueller-Hinton (MH) ont étéensemencées par la méthode d'écouvillonnage. L'excès d'inoculum est éliminé en pressant fermement l'écouvillon sur la paroi interne du tube. Ainsi, l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosé, de haut en bas en stries serrées, en tournant la boîte trois fois de 60°. L'ensemencement fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Des disques stériles en papier Wattman ($\emptyset = 6$ mm) sont disposés délicatement avec une pince stérile, à distance égale les uns des autres, de telle façon à éviter le chevauchement des zones d'inhibition sur la gélose. Une légère pression est exercée sur chaque disque afin d'obtenir une bonne adhérence. Six extraits bruts ont été testés : c'est-à-dire, trois extraits correspondent aux trois variétés collectées dans le site (1), et trois autres extraits obtenus à partir des échantillons des mêmes variétés mais collectées au niveau du site (2).

Chaque disque est imprégné de 20 μ l de chaque extrait à l'aide d'une micropipette 20-200 μ l. Un antibiotique de référence, la néomycine (N) (30 μ g/disque), est utilisé comme témoin positif, tandis qu'un traitement avec du DMSO (10%) est utilisé comme témoin négatif. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 1 h afin de permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des bactéries cibles. Elles sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 h.

- **Lecture des résultats**

L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm) formées autour des disques. Chaque essai est répété deux fois, et les valeurs ont été exprimées sous forme de moyenne \pm l'écart type. La sensibilité des bactéries cibles envers les différents extraits est classée selon les diamètres des halos d'inhibition :

$\emptyset < 8$ mm : bactérie non sensible ;

$9 < \emptyset < 14$ mm : bactérie sensible ;

$15 < \emptyset < 19$ mm : bactérie très sensible ;

$\emptyset > 20$ mm : bactérie extrêmement sensible (MOREIRA *et al.*, 2005 ; DJENNANE *et al.*, 2012).

5. Contact direct sans milieu de culture

- **Principe**

Ce test repose sur le contact direct entre l'extrait brut des brindilles de chaque variété, avec la souche bactérienne (Figure 14), dans le but de voir l'effet exercé, dans le cas d'absence d'un milieu de culture qui favorise la croissance bactérienne.

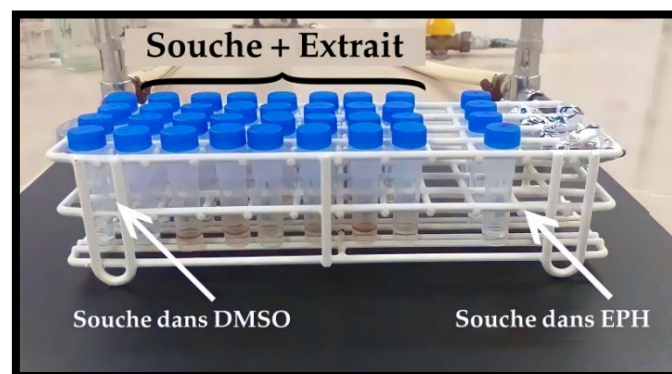


Figure 14. Test antibactérien par contact direct.

EPH : eau physiologique **DMSO** : diméthyle sulfoxyde

- **Souches testées**

Les souches utilisées dans ce test sont : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MU 50, *Klebsiella oxytoca* souche (7), *Bacillus cereus* souche (8) et *Bacillus licheniformis*.

- **Mode opératoire**

Dans des cryotubes stériles, un volume de chaque suspension bactérienne standardisée est mis en contact avec les différents extraits bruts. Un témoin positif est réalisé avec la souche bactérienne dans uniquement de l'eau physiologique, ainsi qu'un autre dans le DMSO (10%), dont les extraits sont récupérés.

- **Lecture**

Les souches sont ensuite incubées pendant 4h puis 24h à 37°C. Des ensemencements sur gélose nutritive sont réalisés à chaque fois, puis les boîtes sont incubées pendant 24h à 37°C, afin de visualiser les résultats.

I.2.5. Activité anti-biofilm

- **Souche testées**

Afin d'évaluer l'activité antibiofilm des extraits, cinq souches bactériennes ont été sélectionnées d'après leur sensibilité dans le test de l'activité antibactérienne :

- Trois souches de référence à savoir : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus cereus* ATCC 14579.
- Deux souches d'origine alimentaire : *Klebsiella oxytoca* souche (7) et *Bacillus licheniformis*.

- **Extraits testés**

Pour ce test, trois extraits ont été sélectionnés. Le choix est porté sur les extraits ayant exprimé de meilleures zones d'inhibition, à savoir : l'extrait C1, S2 et AZ2.

- **Principe**

L'évaluation de l'activité antibiofilm a été faite suivant un protocole en microplaque de 96 puits suivi d'une coloration au cristal violet : une souche bactérienne est cultivée de façon à former un biofilm dans un puit en présence ou non du composé bioactif, puis les bactéries ayant formé le biofilm sont quantifiées par la fixation de cristal violet (Figure 15). Ce colorant est ensuite solubilisé par de l'alcool et la quantité de colorant est déterminée par un lecteur ELISA.

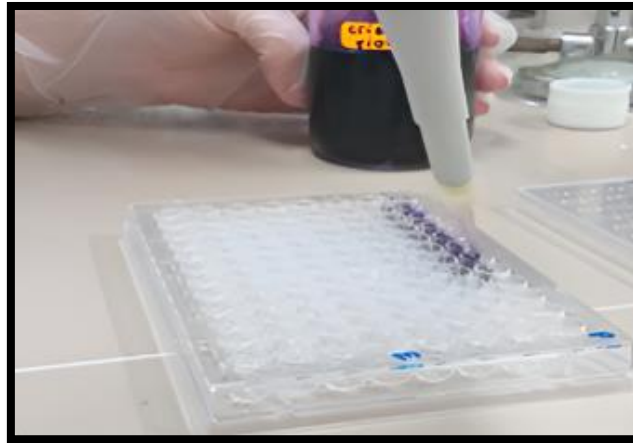


Figure 15. Photographie montrant l'étape de coloration du biofilm au cristal violet sur microplaque.

- **Procédure expérimentale**

Des cultures pures et jeunes de 18hensemencées préalablement sur gélose nutritive ont été préparées et incubées à 37°C. Les souches bactériennes ont été standardisées dans le milieu TSB au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm afin d'ajuster la charge de l'inoculum et obtenir une DO entre 0,08 et 0,1. Une série de dilutions ont été préparées à partir des trois extraits bruts.

Ainsi, les puits stériles de la microplaque est rempli avec le milieu TSB contenant la souche bactérienne et les différents extraits, un puit pour l'extrait brut et trois puits pour les trois dilutions respectivement. Cette opération est répétée trois fois pour chaque concentration. Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 48h. Après incubation, le milieu résiduaire a été inspiré doucement et les cellules non adhérentes ont été éliminées en lavant les biofilms trois fois avec du tampon PBS (pH= 7,15).

Afin de colorer les cellules adhérentes aux parois internes, du cristal violet (0,1%) est rajoutée pour chaque puit. Après 15mn, la solution du cristal violet est éliminée, et les puits sont lavés trois fois consécutives avec du tampon PBS pour éliminer toute trace de colorant non fixé. Les microplaques renversées sont laissées sécher à température ambiante pendant 15mn sur papier absorbant. Les puits sont remplis de nouveau avec de l'éthanol absolu (96%) afin de décolorer les cellules.

Des puits remplis avec du milieu TSBensemencé par la souche bactérienne sont utilisés comme témoins positifs, tandis que des puits remplis uniquement avec le milieu TSB ont servi de témoins négatifs. Les densités optiques des puits sont déterminées par l'intermédiaire d'un lecteur ELISA.

- **Concentration minimale inhibitrice des biofilms (CMIB)**

La CMIB a été déterminée avec trois extraits de trois variétés de l'olivier : l'extrait C1, S2 et AZ2. Elle a été déterminée comme la concentration la plus faible des extraits qui a entraîné une inhibition de l'attachement visible dans le test au cristal violet (méthode semi-quantitative) (LU *et al.*, 2019 ; HU *et al.*, 2020).

I.2.6. Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

L'estimation de la teneur en composés phénoliques a été réalisée selon la méthode colorimétrique de Folin ciocalteu décrite par SINGLETON et ROSSI, (1965). Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange de deux acides : l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange stable d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Cette coloration bleuâtre produite, dont l'absorption maximale est au voisinage de 760nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

La quantification des PPT a été faite à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire ($Y = ax$) dont (Y) correspond à la (DO) de l'extrait, tandis que (x) correspond à sa concentration (figure 16).

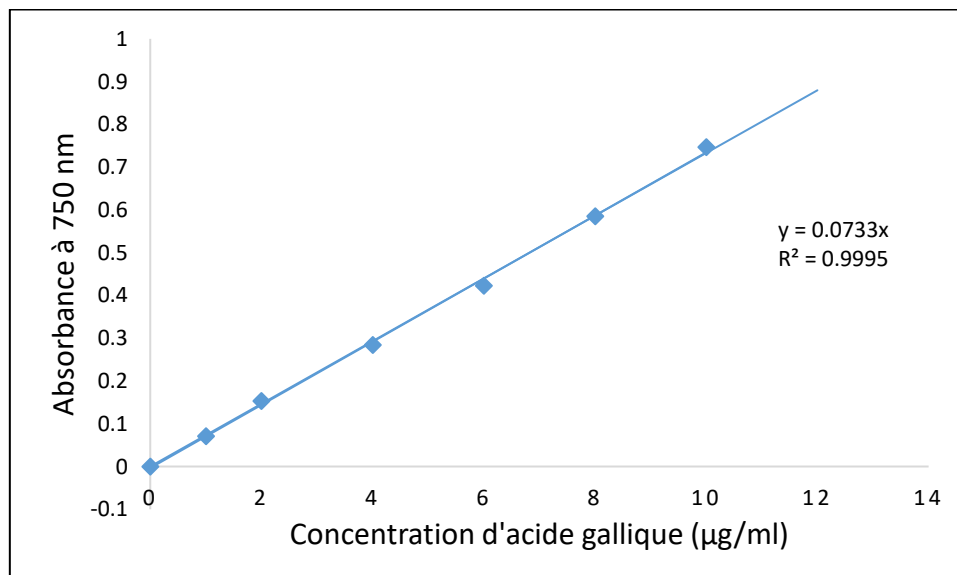


Figure 16. Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols par équivalence en acide gallique.

La courbe est réalisée dans les mêmes conditions que celles de l'échantillon, en utilisant l'acide gallique comme standard (Figure 17). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme de matière végétale sèche en poudre (mg EAG/g MS).

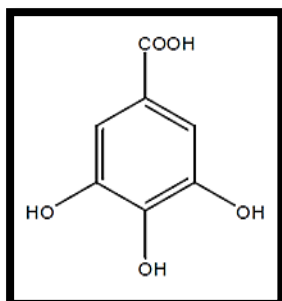


Figure 17. Structure de l'acide gallique (BRUNETON, 2008).

- **Protocole**

Le dosage des PPT de la poudre des brindilles, illustré dans la figure ci-dessous, est déterminé par la technique de Folin-Ciocalteu rapportée par MACHEIX *et al.*, (1990) avec quelques modifications.

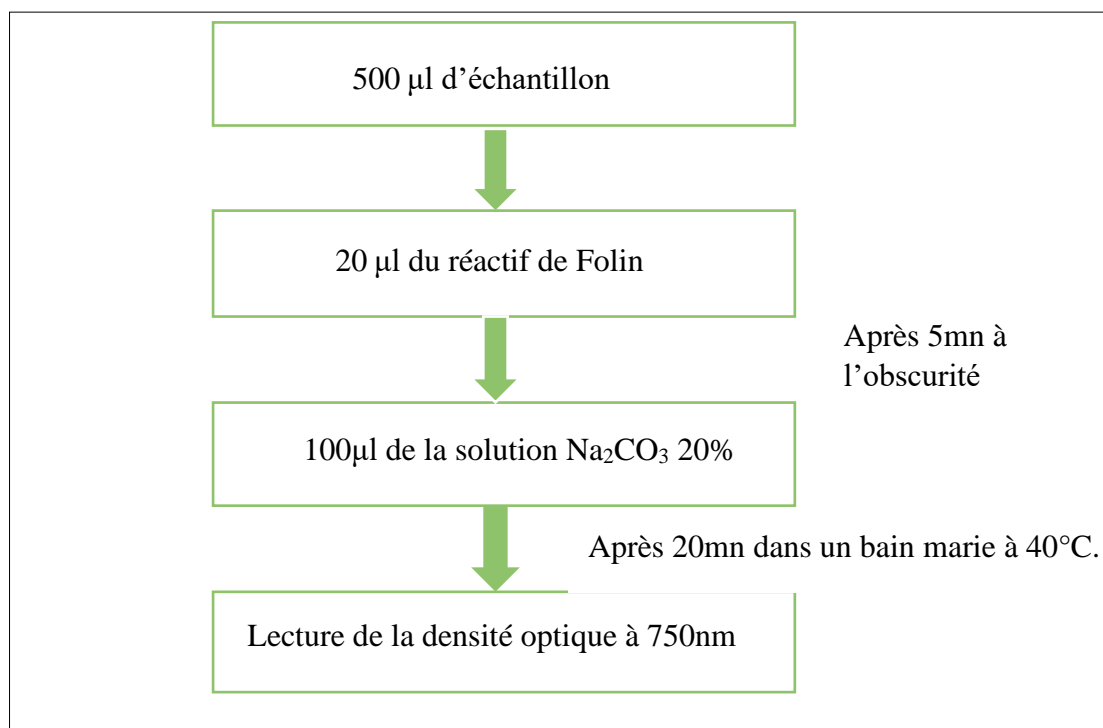


Figure 18. Protocole de dosage des composés phénoliques. (MACHEIX *et al.*, 1990).

I.2.7. Activité anti-radicalaire du (DPPH)

- **Principe**

La technique au DPPH est largement employée pour évaluer l'activité antioxydante. Elle est rapide et facile à mettre en œuvre comparée à d'autres méthodes, car elle s'effectue à température ambiante, ce qui permet de préserver les molécules testées de l'éventuelle dégradation thermique.

C'est une méthode qui est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH). La molécule de DPPH est un radical libre stable non biologique, dont la solution est caractérisée par une coloration violette (pourpre) et une absorption à 517nm. Une fois la solution de DPPH est mélangée avec une substance antioxydante, cette dernière agit en transférant un atome d'hydrogène, ce qui conduit à la réduction du DPPH à la forme d'hydrazine (non radical). Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune pâle (Figure 19). Plus la perte de couleur est élevée plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort.

Ce passage, de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance qui peut exprimer le pourcentage de réduction de DPPH (ARAB *et al.*, 2013; ADDAB *et al.*, 2020 ; ANTUNES *et al.*, 2020).

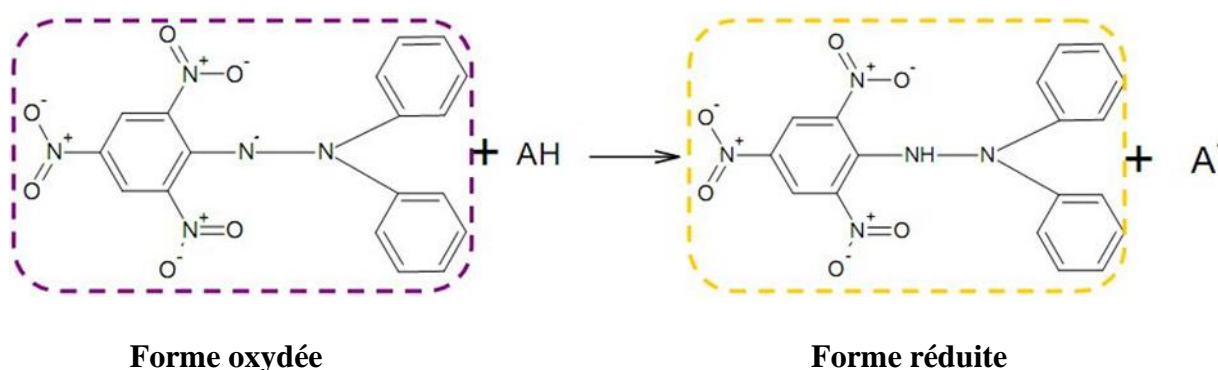


Figure 19. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test (DPPH) entre l'espèce radicalaire (DPPH°) et un antioxydant (AH).

- **Protocole**

L'activité anti-radicalaire du DPPH des extraits phénoliques est déterminée selon la méthode décrite par BRAND-WILLIAMS *et al.*,(1995) avec quelques modifications. La solution de (DPPH) est fraîchement préparée à raison de 0.1mM dans l'éthanol (Annexe B). Pour les tests, 1mL de la solution du DPPH reçoit un volume de chaque extrait puis homogénéisée à l'aide d'un vortex. Le milieu réactionnel est ainsi incubé à l'obscurité pendant

30 mn. La décoloration par rapport au témoin, contenant le DPPH et le solvant, est mesurée au spectrophotomètre à 517nm. L'activité antioxydante est évaluée en triplicata, et est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical selon la formule ci-après :

$$(\%) \text{ d'inhibition du (DPPH)} = (A_0 - A / A_0) \times 100$$

- A₀ : Absorbance du blanc.

- A : Absorbance de l'échantillon

II. Résultats et Discussion

II.1. Rendement d'extraction

Le rendement exprimé en (%) désigne la masse de l'extrait obtenu après évaporation du solvant, par rapport à la masse initiale de la matière végétale traitée (ROKO, 2020). Le poids en extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (LAKACHE *et al.*, 2019). Le rendement d'extraction des broyats des brindilles séchées issues de trois variétés de l'olivier et collectées au niveau de deux sites différents dans la wilaya de Tizi-Ouzou, sont reportés dans la figure ci-dessous.

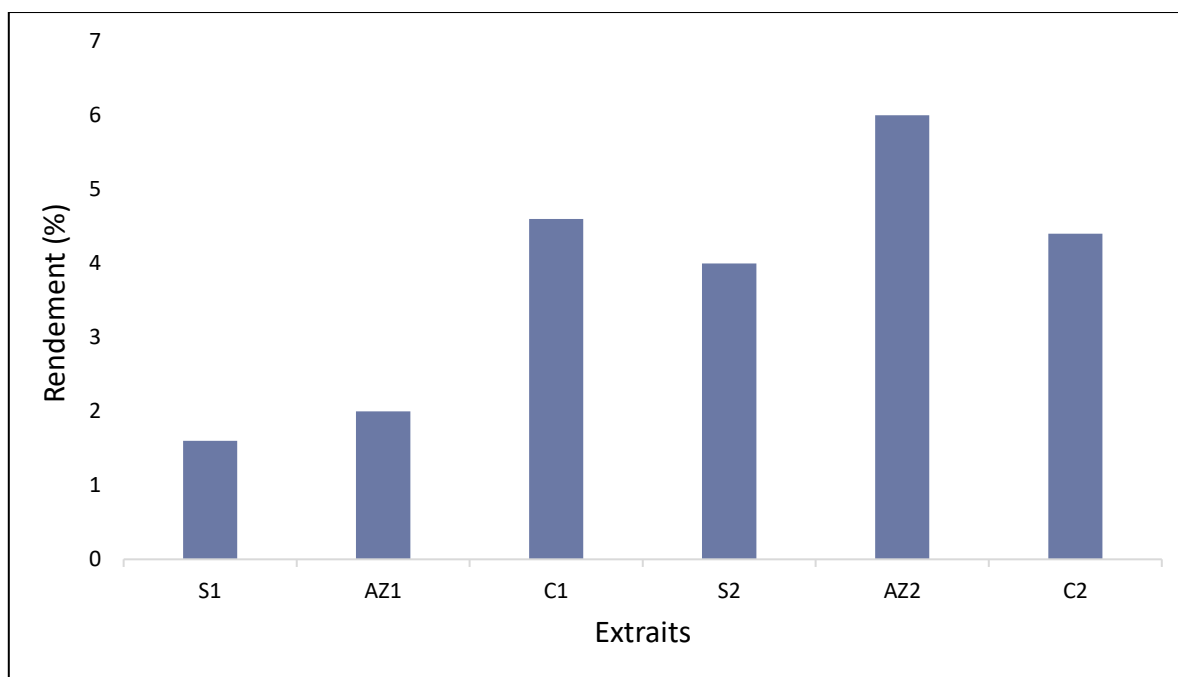


Figure 20. Rendement en matière sèche des extraits bruts des brindilles de trois variétés de l'olivier.

S : Variété Sauvage ; **AZ :** Variété *Azeradj* ; **C :** Variété *Chemlal* ; **1 :** Site 1 ; **2 :** Site 2

Les rendements de l'extraction varient considérablement en fonction de la variété et de la région d'échantillonnage. Les pourcentages enregistrés sont compris entre 1,6 et 6 %. La variété *Azeradj* du site (2) donne clairement le rendement le plus élevé (6%) suivie de la variété *Chemlal* du site (1) avec 4,6%. Le rendement le plus faible est celui de la variété sauvage *Olea europaea sylvestris* du site (1), avec un ordre de 1,6 %.

Les résultats obtenus révèlent que les rendements en PPT de la variété Sauvage *Olea europaea sylvestris* (4%) et la variété *Azeradj* (6%) du site (2) sont nettement supérieurs à ceux des extraits du site (1) des mêmes variétés, avec (1,6%) et (2%) respectivement. Tandis que le

rendement de la variété *Chemlal* des deux sites est très proche, avec 4,6% pour l'extrait C1 et 4,4% pour le C2.

Le rendement est tributaire de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques. En effet, les différences des conditions environnementales (le climat et la qualité du sol), la période de la récolte, le degré de maturité, l'organe de la plante ainsi que la taille de particules constituant la poudre, influencent directement le rendement d'extraction, et par conséquent, la composition et les activités biologiques des extraits (KORUKLUOGLU *et al.*, 2010 ; DJENNANE *et al.*, 2012 ; TESLA *et al.*, 2019 ; NGUIMATSIA *et al.*, 2021).

La figure 20 montre une différence dans les rendements des variétés issues de la même zone de collecte, même s'il s'agit du même solvant d'extraction. Cette différence est probablement liée aux caractéristiques génétiques de chaque variété, puisque leur croissance se fait dans les mêmes conditions climatiques et géographiques (HIMOUR *et al.*, 2017).

De plus, le rendement final est conditionné par la méthode d'extraction (AISSAOUI *et al.*, 2021). Dans la présente étude, la macération a été utilisée, c'est une technique à rendement souvent médiocre. Pour être efficace, elle peut durer de 4 à 10 jours environ, avec un renouvellement du solvant pour extraire le maximum de substances bioactives. En effet, les quantités de substances extraites sont en fonction du temps de séjour du matériel au sein du solvant, le degré d'agitation et la composition de l'échantillon (GROUBERT 1984 ; LEYBROS et FREMEAUX 1990 ; BEN AMOR, 2008 ; LAKACHE *et al.*, 2019).

Le rendement en polyphénols dépend aussi du solvant d'extraction (TEASIOLA-MARGARI et OKOGERI, 2001). Bien que les rendements des extraits de feuilles de l'olivier sont plus élevés par rapport aux rendements des extraits de brindilles (ARAB *et al.*, 2013 ; HIMOUR *et al.*, 2017 ; LAKACHE *et al.*, 2019 ; AISSAOUI *et al.*, 2021), la majorité des auteurs s'accordent que les hauts rendements sont généralement obtenus avec le méthanol, l'éthanol et leur mélange avec l'eau, et ceci indépendamment des organes étudiés et de leur degré de maturité (SUN *et al.*, 2007 ; AOUIDI *et al.*, 2009 ; ARAB *et al.*, 2013 ; AL KHAFAJI, 2018 ; ADDAB *et al.*, 2020).

II.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage colorimétrique par le réactif Folin-Ciocalteu est une méthode simple qui nécessite peu de réactifs, ce qui est appropriée pour l'estimation de la teneur en PPT présents dans les extraits de plantes. L'intensité de la coloration bleue est proportionnelle à la quantité

des composés phénoliques présents dans l'échantillon. Des mesures de densité optique pour chaque extrait sont réalisées à 750 nm. Toutes les déterminations ont été effectuées trois fois.

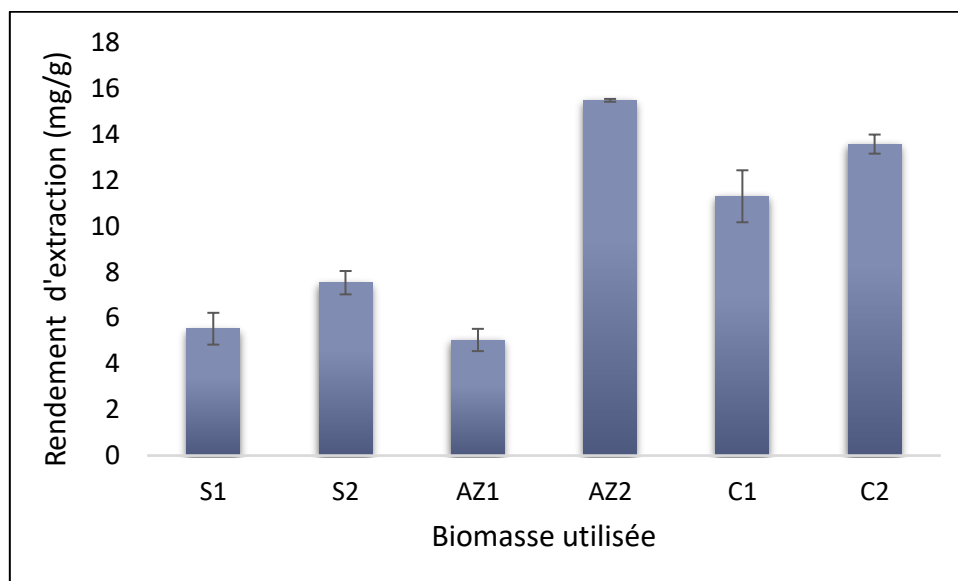


Figure 21. Rendement en polyphénols totaux extraits de brindilles en mg/g de biomasse sèche (poudre).

S : variété sauvage ; **AZ** : variété *Azeradj* ; **C** : variété *Chemlal* ; **1** : site 1 ; **2** : site 2

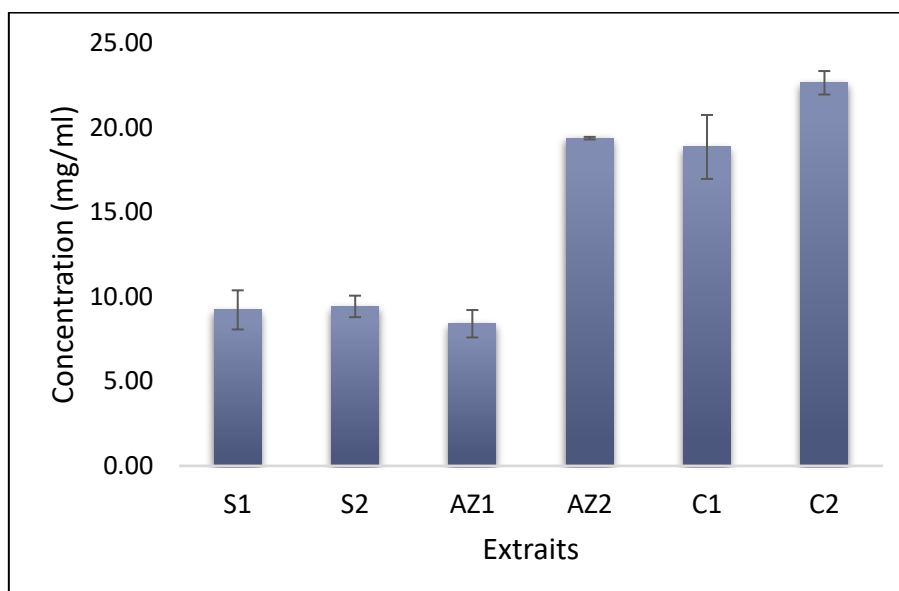


Figure 22. Concentration en polyphénols totaux des différents extraits de brindilles.

S : variété sauvage ; **AZ** : variété *Azeradj* ; **C** : variété *Chemlal* ; **1** : site 1 ; **2** : site 2

L'estimation quantitative des PPT révèle que l'extrait AZ2 possède la teneur la plus élevée, avec une valeur de 15,50 mg EAG/g de matière végétale sèche, suivi de l'extrait C2

avec 13,59mg EAG/g MS, puis de l'extrait C1 (11,31 mg EAG /g MS), et enfin de l'extrait S2 (7,54 mg EAG/g MS). La plus faible teneur a été enregistrée pour l'extrait AZ1 (5,04 mg EAG/g MS) suivi de S1 avec 5,53mg EAG/g MS (Figure 21).

Les résultats obtenus montrent que les rendements en PPT varient considérablement entre les différents extraits de brindilles utilisées. En comparant les résultats de la présente étude à ceux obtenus par AOUIDI *et al.*, (2009), la teneur enregistrée pour l'extrait de rameaux de l'olivier d'une variété française, collectées en fin novembre, était de l'ordre de 24,27 mg EAG/g MS pour l'extrait éthanolique, et de 24,77 mg EAG/g MS pour l'extrait méthanolique. Cette teneur est supérieure à celles obtenues dans cette étude.

Cette différence de teneurs entre les extraits étudiés et ceux de AOUIDI *et al.*, (2009), pourrait être due aux conditions de l'extraction : quantité de poudre utilisée, le volume et le type du solvant, le temps et la température ainsi que le degré d'agitation. D'ailleurs, les extraits éthanoliques et méthanolique présentent des teneurs élevées par rapport aux teneurs des extraits d'acétate d'éthyle.

On signale également que la variation quantitative des PPT, peut être aussi attribuée à la variété, la saison de culture et de récolte, ainsi que les différentes maladies qui peuvent affecter l'arbre. La distribution des principes actifs peut être changée pendant le cycle de vie de l'olivier. Ce processus dépend des conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse et salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires notamment les polyphénols (DEBIB *et al.*, 2017 ; EDZIRI *et al.*, 2019 ; ADDAB *et al.*, 2020).

II.3. Activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de brindilles a été réalisée en utilisant la technique du piégeage du radical stable 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre à 517nm, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire (ANTUNES *et al.*, 2020).

L'acide ascorbique a été utilisé comme un antioxydant standard à des concentrations allant de 20 à 160 µg/ml (Figure 23). L'inhibition du radical DPPH est représentée en pourcentage (%), calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{DO témoin} - \text{DO échantillon})}{\text{DO témoin}} \times 100$$

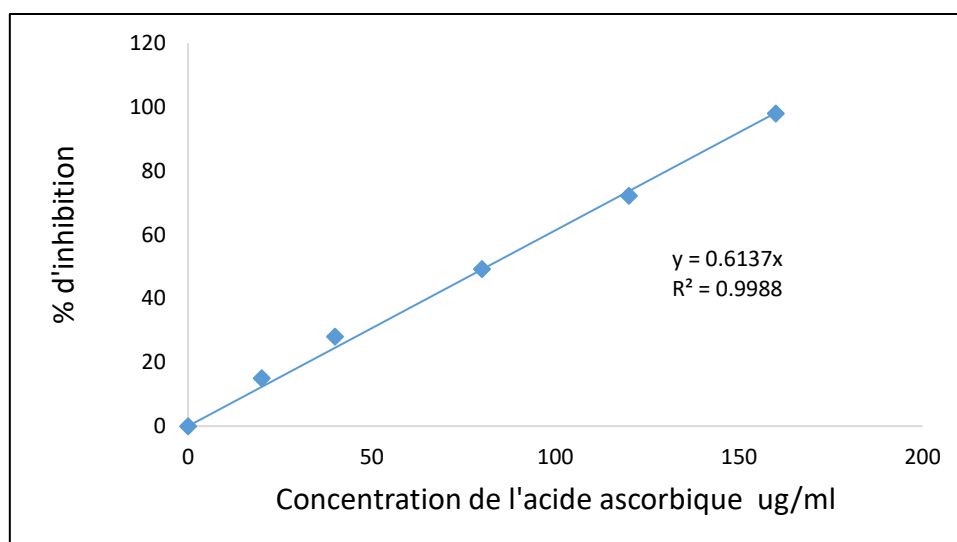


Figure 23. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.

Tableau XIII. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations brutes des extraits d'acétate d'éthyle de brindilles de l'olivier.

Extraits	S1	AZ1	C1	S2	AZ2	C2
[] (mg/ml)	9,22	8,40	18,85	9,43	19,37	22,65
%d'inhibition	80,80	79,06	87,36	82,69	84,79	87,83

S : variété sauvage ; **AZ** : variété *Azeradj* ; **C** : variété *Chemlal* ; **1** : site 1 **2** : site 2

Les résultats, confiés dans le tableau XIII, révèlent que tous les extraits présentent une activité anti-radicalaire intéressante, ils sont ainsi capables de piéger le radical libre DPPH. Le pouvoir antioxydant varie entre 79,06% et 87,8 %. Les extraits C1 et C2 possèdent le pouvoir inhibiteur le plus élevé par rapport aux autres extraits étudiés. Les effets scavenger observés se classent donc dans l'ordre décroissant suivant : C2 > C1 > AZ2 > S2 > S1 > AZ1.

Ce pouvoir réducteur est dû à la présence de composés phénoliques, qui sont considérés comme des donneurs efficaces d'atome d'hydrogène au radical DPPH, conduisant ainsi à sa réduction (ADDAB *et al.*, 2020 ; DIDI et DIDI, 2021). D'après les résultats obtenus, l'activité anti-radicalaire est affectée par la concentration des différents extraits. Plus la concentration augmente, plus cette activité s'élève.

Néanmoins, l'extrait C1 possède un potentiel réducteur plus important alors qu'il ne représente pas un taux plus accru en PPT par rapport à AZ2 qui en contrepartie dispose d'une teneur plus élevée mais d'un pouvoir d'inhibition un peu plus faible. En effet, ce n'est pas forcément l'extrait qui dispose d'une quantité importante en PPT qui détient le pouvoir antioxydant le plus fort. L'explication la plus rationnelle est la différence du profil phénolique, c'est-à-dire, chaque extrait possède des molécules appartenant à des classes de polyphénols différentes. Ces dernières possèdent probablement des forces antioxydantes variables, ainsi qu'un effet synergique entre les différents composants présents dans l'extrait pouvant contribuer à cette activité (MUCHEWUTI *et al.*, 2006 ; EDZIRI *et al.*, 2019 ; ANTUNES *et al.*, 2020).

Des études ont rapporté que l'activité antioxydante dépend généralement du nombre et de la position des groupements hydroxyles par rapport aux groupements carboxyles fonctionnels au sein des noyaux aromatiques. L'oleuropéine et l'hydroxytyrosol sont les composés actifs principaux de feuilles et de brindilles de l'olivier. Ils sont riches en groupements hydroxyles, d'où leur capacité élevée à stabiliser les radicaux libres. Ainsi, l'activité anti-radicalaire d'un extrait ne peut être prévue uniquement sur la base de sa teneur phénolique totale, mais aussi, tous dépend de la formation structurale ou la qualité des différents composés présents dans l'extrait (HAYES *et al.*, 2011 ; DEBIB *et al.*, 2017 ; ADDAB *et al.*, 2020 ; PIMIANTA *et al.*, 2020).

II.4. Activité antibactérienne

II.4.1. Activité antibactérienne par le test de diffusion sur milieu gélosé

Plusieurs techniques peuvent être employées afin d'évaluer *in-vitro* l'activité antibactérienne. Dans cette étude la méthode utilisée est celle de la diffusion sur gélose. Cette technique est caractérisée par la diffusion de différents extraits à partir des disques, permettant ainsi de tester plusieurs composés à la fois contre une seule souche bactérienne. La présence d'un halo au tour des disques reflète le degré d'inhibition, plus la zone d'inhibition est grande plus la sensibilité des souches est élevée (BOUGUERRA *et al.*, 2014 ; PIMIANTA *et al.*, 2020). Ce test a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des extraits bruts des brindilles de l'olivier, vis-à-vis d'un ensemble de souches de références, ainsi que des souches d'origine alimentaire (Tableau XIV). Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures données en annexe C. Le diamètre (6 mm) du disque est inclus dans les calculs. Le diméthyle sulfoxyde (DMSO) (10%) qui a servi de contrôle n'a montré aucune activité contre les souches bactériennes testées (contrôle négatif).

Tableau XIV. Diamètres des zones d'inhibition en (mm) exercés par les différents extraits bruts.

Souches testées	Extraits bruts						Témoin (+)	Témoin (-)
	S1	AZ1	C1	S2	AZ2	C2	N (30 µg/disque)	DMSO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	7,5 ±0,71	7,4±0,85	8,5 ±0,71	8,25±1,06	9,5±0,71	8,25 ±0,35	30 ±1,41	6
<i>Bacillus cereus</i> souche (4)	7,05±0,071	6,9±0,14	7,5±0,71	8,05±0,35	9,1±0,28	8,5±0,71	29,75±1,06	6
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00009	12,5±0,71	19,5±0,71	25,5±0,71	24,5±0,71	25,9±0,14	22,5±0,71	7±0,28	6
<i>Pseudomonas putida</i> (13B)	6,9±0,14	7,1±0,14	8,75±0,35	8,88±0,18	10,5±0,71	8,5±0,71	18,5±0,71	6
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	7,75±0,35	6,9±0,14	6,75±0,35	7,75±1,06	8,5±0,71	8±0,00	30,5±0,71	6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6±0,0	6±0,0	6±0,0	6±0,0	6,9±0,14	6±0,0	21,0±1,41	6
<i>Klebsiella oxytoca</i> souche (7)	8,1±0,71	7,05±0,71	8±1,41	8±0,14	9,25±2,33	7,5±0,71	15,5±0,71	6
<i>Bacillus cereus</i> souche (8)	7,05±0,071	6,9±0,14	7,5±0,71	8,1±0,14	9±1,41	7,5±0,71	13,5±2,12	6
<i>Staphylococcus aureus</i> MU50	6,9±0,14	6,75±0,35	7,5±0,71	8,5±0,71	8,75±0,35	8,25±0,35	14,5±0,71	6
<i>Bacillus licheniformis</i>	7,95±0,071	8,5±0,71	8,5±0,71	7,75±0,35	8,5±0,71	7,5±0,71	32±1,41	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	6±0,0	6±0,0	6±0,0	6±0,0	6,5±0,07	6±0,0	16,5±0,71	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8±1,41	9,5±0,71	10,5±0,71	10,25±0,35	14,5±0,71	11,5±0,71	20,5±0,71	6

S : variété Sauvage AZ : variété Azeradj C: variété Chemlal 1: Site 1 2 : Site 2 N : néomycine

Selon les résultats représentés dans le tableau XV, les extraits organiques bruts des brindilles de l'olivier présentent une activité antibactérienne. Il est constaté que le pouvoir antibactérien diffère d'une souche à une autre et d'un extrait à un autre, sachant que les mêmes concentrations des extraits ont été appliquées pour les douze souches testées. Concernant les souches de référence, les zones d'inhibitions varient entre $6\pm 0,0$ mm et $25,9\pm 0,14$ mm, tandis que pour les souches d'origine alimentaire, elles sont entre $6,9\pm 0,14$ mm et $10,5\pm 0,71$ mm.

Tableau XV. Sensibilité des souches bactériennes aux extraits bruts des brindilles de l'olivier.

Souches bactériennes	Extraits bruts					
	S1	AZ1	C1	S2	AZ2	C2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i> souche (4)	-	-	-	-	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00009	+	++	+++	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas putida</i> (13B)	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> souche (7)	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i> souche (8)	-	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> MU50	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	+	+	++	+

S : variété Sauvage AZ : variété Azeradj C : variété Chemlal 1 : Site 1 2 : Site 2

Les résultats obtenus révèlent qu'il n'y a pas de sélectivité entre les bactéries : les extraits ont une activité vis-à-vis des bactéries Gram positif ainsi que les bactéries Gram négatif. Ils

présentent notamment une bonne activité contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Elle est sensible aux extraits AZ1, C1, S1 et C2 avec des diamètres de $9,5\pm 0,71$ mm, $10,5\pm 0,71$ mm, $10,25\pm 0,35$ mm et $11,5\pm 0,71$ mm respectivement, et très sensible vis-à-vis de l'extrait AZ2 avec un halo de $14,5\pm 0,71$ mm. Tandis qu'elle est moins sensible à l'extrait S1 avec $8\pm 1,41$ mm. Cette activité est très intéressante étant donné qu'elle est considérée comme étant une bactérie virulente naturellement résistante aux antibiotiques. De plus, elle est rarement inhibée par les extraits de plantes ou les huiles essentielles (OWLIA *et al.*, 2010).

Selon LEE et LEE, (2010), l'efficacité et le spectre d'activité antimicrobienne varient en fonction des extraits et le type de Gram bactérien. Dans la présente étude, l'extrait AZ2 qui correspond à la variété *Azeradj* du site (2) possède le plus large spectre d'action avec l'activité antibactérienne la plus élevée vis-à-vis de la totalité des souches testées, ce qui est en corrélation positive avec sa teneur en PPT.

Selon MOREIRA *et al.*, (2005), les résultats obtenus dans ce test ont permis de classer les bactéries comme suit :

- $\emptyset < 8$ mm : bactérie non sensible -
- $9 < \emptyset < 14$ mm : bactérie sensible +
- $15 < \emptyset < 19$ mm : bactérie très sensible ++
- $\emptyset > 20$ mm : bactérie extrêmement sensible +++

Au vu des résultats, la souche *Enterococcus faecalis* WDCM 00009 présente une sensibilité vis-à-vis de tous les extraits bruts. Elle est sensible à l'extrait S1, très sensible à AZ1, et extrêmement sensible aux extraits C1, S2, AZ2 et C2, avec des diamètres compris entre $12,5\pm 0,71$ mm et $25,9\pm 0,14$ mm. Les résultats obtenus pour ces composés sont supérieurs à ceux du témoin positif (Néomycine) $7\pm 0,28$ mm, appartenant à la famille des aminosides, et dont *Enterococcus faecalis* WDCM 00009 présente une résistance naturelle (CASFM, 2020).

Bacillus cereus ATCC 14579 ; *Escherichia coli* ATCC 25922 ; *Staphylococcus aureus* MU50 ; *Bacillus licheniformis* et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 présentent des résistances à la totalité des extraits. Tandis que, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; *Bacillus cereus* souche (4) ; *Pseudomonas putida* (13B) ; *Klebsiella oxytoca* ; *Bacillus cereus* souche (8) sont résistantes à tous les extraits à l'exception de l'extrait AZ2.

Les résultats révèlent également que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; *Bacillus cereus* souche (4) ; *Pseudomonas putida* (13B) ; *Klebsiella oxytoca* ; *Bacillus cereus* souche (8) sont sensibles à l'extrait AZ2 mais pas à l'extrait AZ1, et que *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853 est sensible vis-à-vis de l'extrait S2 mais pas à l'extrait S1 même s'il s'agit des mêmes variétés.

Aucune inhibition des bactéries à Gram négatif, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Escherichia coli* ATCC 25922, n'a été enregistrée avec tous les extraits bruts à l'exception de l'extrait AZ2 qui a montré une légère activité avec un diamètre de zone d'inhibition de $6,5 \pm 0,07$ mm et $6,9 \pm 0,14$ mm respectivement. Ceci pourrait être expliqué par la présence d'un taux élevé de phospholipides dans la paroi et de molécules polysaccharidiques dans la membrane externe des Gram négatif, ce qui leur confère une imperméabilité aux agents antibiotiques et les composés lipophiles, dont les polyphénols font partie (ATHAMENA *et al.*, 2010 ; BOUDERBA *et al.*, 2012 ; NASRULLAH-MALIK, 2015).

En effet, la taille des zones d'inhibitions dépend essentiellement de la capacité de diffusion des différents composés contenus dans les extraits bruts. Cette capacité est associée à la polarité des substances diffusibles. Il est clair que l'activité antibactérienne des extraits testés est inférieure à celle de l'antibiotique de référence : la néomycine (N30 μ g/disque). Cependant, ces extraits exercent une activité dans la mesure où ils ne sont pas des produits purs mais des extraits bruts (CARNEIRO *et al.*, 2008, BOUCHOUKA, 2016).

La sensibilité des différentes bactéries testées vis-à-vis des extraits bruts de brindilles de l'olivier utilisées dans cette étude varie selon plusieurs facteurs : la bactérie utilisée, la variété de l'extrait testé et la région d'échantillonnage.

Beaucoup de travaux ont démontré les activités biologiques des produits dérivés de l'olivier. Cependant, les travaux concernant les rameaux sont très limités malgré la richesse de ces tissus en composés phénoliques, notamment, l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol, et le tyrosol, et malgré leurs abondances comme matière première (AOUIDI *et al.*, 2009 ; ABAZA *et al.*, 2019 ; PIMIANTA *et al.*, 2020 ; YUAN *et al.*, 2021). D'après la recherche bibliographique, il n'y a aucun travail portant sur l'activité antibactérienne des extraits de brindilles.

Plusieurs travaux portant sur les feuilles de l'olivier ont été menés dans les différents pays du monde afin d'évaluer leur potentiel antimicrobien : (DJENNANE *et al.*, 2012) en Algérie, (LAHDIBI-SAHRAOUI *et al.*, 2017) au Maroc, (NASRULLAH-MALIK, 2015 ; AL-KHAFAJI, 2018 ; IBRAHIM *et al.*, 2020) en Iraq, (GHALANDARI *et al.*, 2018) en Italie, (ANTUNES *et al.*, 2020) au Brésil, (SANCHEZ-GUTIERREZ *et al.*, 2021) en Espagne, et (BARAKAT *et al.*, 2018) en Egypte, ont tous démontré l'effet inhibiteur des extraits de feuilles sur la croissance de *Staphylococcus aureus*. D'autres études affirment la capacité

antimicrobienne des extraits de feuilles contre *Bacillus cereus* (PEREIRA *et al.*, 2007 ; KO *et al.*, 2009 ; GOKMEN *et al.*, 2014 ; NASRULLAH-MALIK, 2015), ainsi que vis-à-vis de *Pseudomonas putida* avec une zone de $13\pm 0,90$ mm (TESLA *et al.* 2019).

Les souches de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus cereus* utilisées se sont avérées résistantes à la totalité des extraits, à l'exception de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* souche (4), *Bacillus cereus* souche (8) vis-à-vis de l'extrait de brindilles de la variété Azeradj AZ2, avec des halos de $9,5\pm 0,71$ mm, $9,1\pm 0,28$ mm et $9\pm 1,41$ mm respectivement. *Pseudomonas putida* est également sensible uniquement à ce même extrait avec $10,5\pm 0,71$ mm.

La différence des résultats est principalement liée à la différence de l'organe utilisé dans l'étude, ainsi que la localisation, la variété et le solvant d'extraction (KORUKLUOGLU *et al.*, 2010 ; ALIBADI *et al.*, 2012 ; DEBIB et BOUKHATEM, 2017).

D'autres encore ont démontré que *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* étaient les microorganismes les plus résistants aux extraits de feuilles (DEBIB et BOUKHATEM, 2017 ; COSANSU et KIYMETLI, 2021). Dans le présent travail, ces deux bactéries sont également résistantes aux extraits de brindilles.

II.4.2. Test par contact direct (sans source de carbone)

Le but de ce test est d'évaluer l'effet direct des extraits bruts vis-à-vis des différentes souches bactériennes, pour avoir une idée concernant leur pouvoir antimicrobien en absence d'un milieu de culture comme la gélose (MH). Rappelons qu'un témoin positif est préparé uniquement avec la souche dans de l'eau physiologique, ainsi qu'un autre contenant la souche dans du DMSO à 10%, dont les extraits ont été récupérés.

Selon les résultats obtenus après 4 heures de contact direct entre la souche bactérienne et les différents extraits (Tableau XVI), et en comparant avec le témoin positif, les bactéries *Staphylococcus aureus* MU50, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Klebsiella oxytoca* (7) et *Bacillus licheniformis*, sont inhibées par la totalité des extraits. Par contre, la souche *Bacillus cereus* ATCC 14579 est résistante à tous les extraits.

Tableau XVI. Sensibilité des souches bactériennes aux extraits bruts des brindilles de l'olivier après 4h.

Souches bactériennes	Extraits bruts						Témoins	
	S1	AZ1	C1	S2	AZ2	C2	EPH	DMSO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (7)	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Bacillus cereus</i> souche (8)	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> MU50	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	+	+	+	+	-	-

S : variété Sauvage AZ : variété Azeradj C : variété Chemlal 1 : Site 1 2 : Site 2

EPH : eau physiologique + : Sensible. - : Résistante.

D'après ce test, la bactérie *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 qui a présenté une résistance totale dans le test sur milieu gélosé, est inhibée par tous les extraits, en étant directement en contact et sans source nutritive.

Il est constaté également que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est inhibé par la majorité des extraits à l'exception de l'extrait S1. Ce résultat confirme celui du test de diffusion sur gélose, où cette bactérie présente une résistance uniquement à ce même extrait.

Les bactéries *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Bacillus cereus* souche (8) sont sensibles aux extraits à l'exception de AZ2 et C2 ; S1 et C2 ; S1, S2 et AZ2 respectivement.

La différence de sensibilité des souches testées aux différents extraits pourrait être attribuée à des variations des taux de pénétration des constituants des extraits à travers la paroi et la membrane cellulaire.

Les résultats ont également montré la croissance des souches en présence du DMSO 10% uniquement. Cela confirme qu'il n'exerce aucune activité antibactérienne. Les souches qui ont présenté des résistances vis-à-vis de certains extraits, ont été mises en contact pendant 24h. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau XVII. Sensibilité des souches bactériennes aux extraits bruts des brindilles de l'olivier après 24h.

Souches bactériennes	Extraits bruts						Témoins	
	S1	AZ1	C1	S2	AZ2	C2	EPH	DMSO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Bacillus cereus</i> souche (8)	+	+	+	+	-	+	-	-

S : variété Sauvage AZ : variété Azeradj C : variété Chemlal 1 : Site 1 2 : Site 2

EPH : eau physiologique + : Sensible. - : Résistante.

Les résultats du tableau XVII révèlent que *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont totalement inhibées par tous les extraits après un contact pendant 24h, cependant, *Bacillus cereus* ATCC 14579 reste toujours résistante. Sa résistance est principalement liée à sa capacité à produire des spores en conditions de stress. Ces dernières résistent à de nombreuses agressions environnementales, notamment les agents antimicrobiens, dont les polyphénols (CEUPPENS *et al.*, 2012 HASMIK-HAYRAPETYAN, 2017 ; VIDIC *et al.*, 2020). En effet, les résultats de ce test peuvent être intéressants notamment en ce qui concerne la désinfection des surfaces.

II.5. Activité antibiofilm

II.5.1. Potentiel de formation de biofilm

La formation de biofilm dans les microplaques à 96 puits est analysée par la mesure de la DO à 590nm, après une coloration au cristal violet.

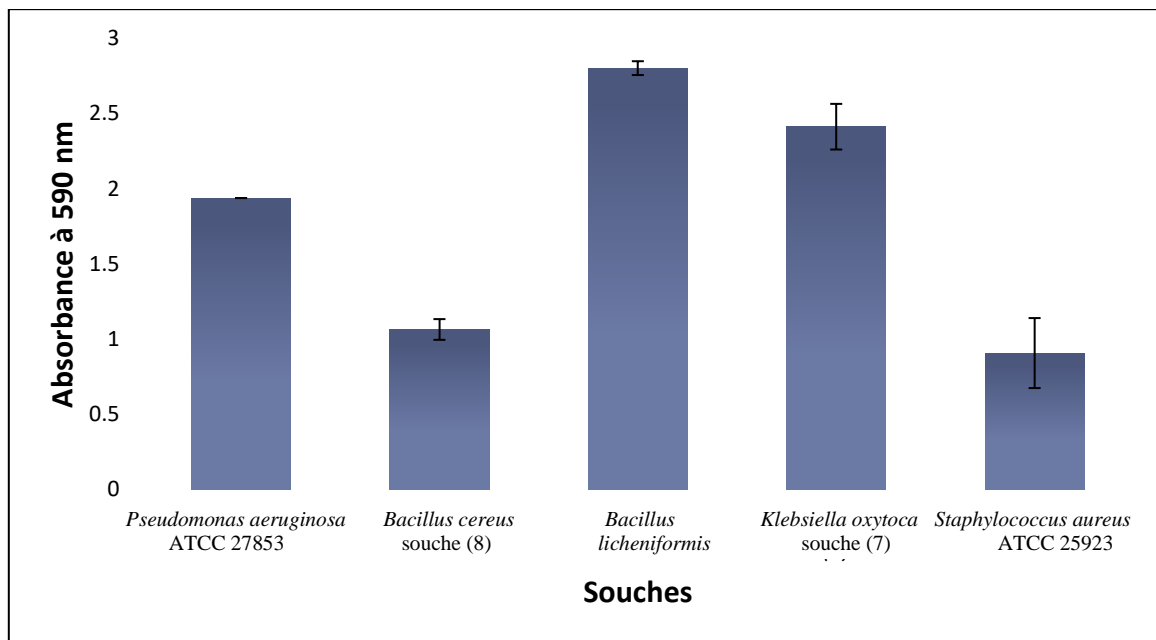


Figure 24. Biomasse enregistrée (densité optique) pour les biofilms formés par les cinq souches testées.

D'après les résultats de la figure 24, toutes les souches utilisées sont fortement formatrices de biofilms. Néanmoins le potentiel de formation varie d'une espèce à une autre. Signalons que *Bacillus licheniformis* montre la plus grande valeur avec une DO égale à (2,8), suivie de *Klebsiella oxytoca* souche (7), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* souche (8) et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec des DO de (2,42), (1,94), (1,06) et (0,90) respectivement.

Les résultats sont conformes à la littérature concernant *Pseudomonas aeruginosa* (ROUX et GHIGO, 2006), *Bacillus licheniformis* (WANG *et al.*, 2020), *Klebsiella oxytoca* (TOWNSEND *et al.*, 2020), *Staphylococcus aureus* (PARASTAN *et al.*, 2020) et *Bacillus cereus* (HASMİK-HARRAPETYAN, 2017) qui sont considérés comme des organismes modèles de formation de biofilms.

II.5.2. Capacité d'inhibition des extraits

Après une incubation pendant 48h à 37°C, les densités optiques de la totalité des puits des microplaques sont déterminées à l'aide d'un lecteur ELISA. Le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant la formule suivante :

% d'inhibition = [(la DO du contrôle à 590 nm – la DO du puit traité à 590 nm) / la DO du contrôle à 590 nm] × 100 (VALLIAMMAI *et al.*, 2020).

Les résultats illustrés dans les figures 24 à 29 ont permis de mettre en évidence l'effet des extraits de brindilles de trois variétés oléicoles sur l'inhibition de cinq souches bactériennes fortement formatrices de biofilms.

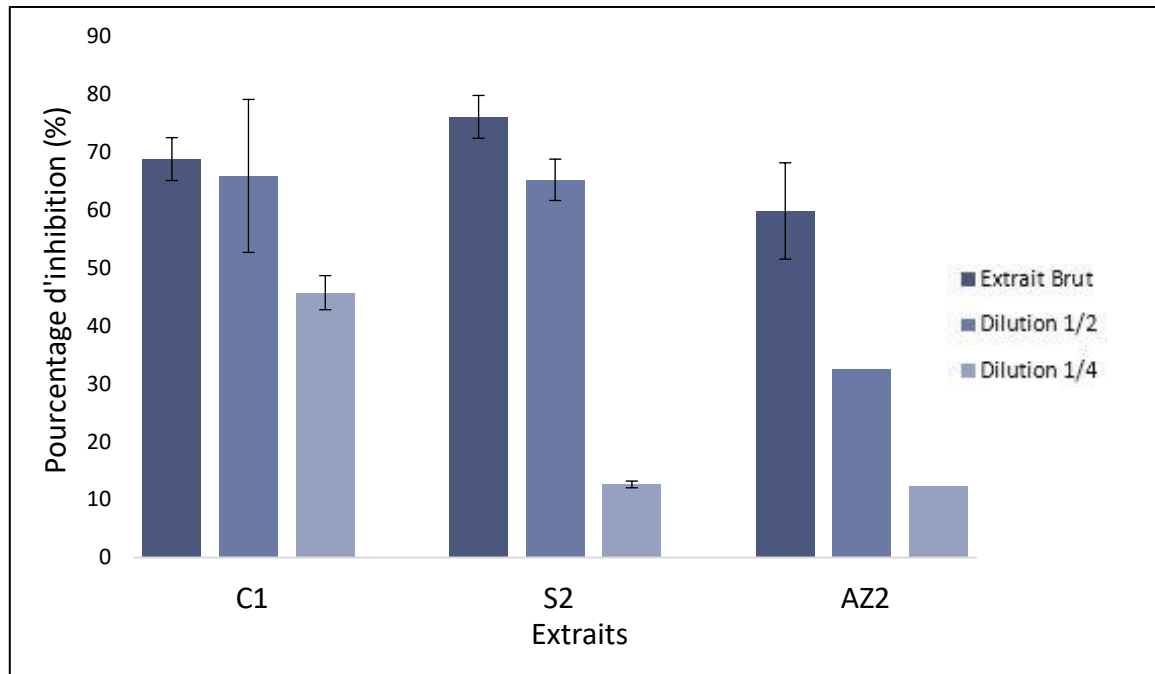


Figure 25. Pourcentages d'inhibition exercée par les extraits de trois variétés vis-à-vis de la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

S : variété sauvage **AZ** : variété Azeradj **C** : variété Chemlal **1** : Site 1 **2** : Site 2

La figure 25 représente l'effet inhibiteur des trois extraits sur la formation de biofilm de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Il est noté qu'à la concentration maximale, l'extrait C1, S2 et AZ2, inhibent la formation de biofilm avec 68,8%, 76,1% et 59,8% respectivement. La dilution 1/2 des trois extraits a inhibé le biofilm avec des pourcentages 65,9%, 65,2% et 32,6%, tandis que la dilution 1/4 avec 45,7%, 12,6% et 12,4% respectivement.

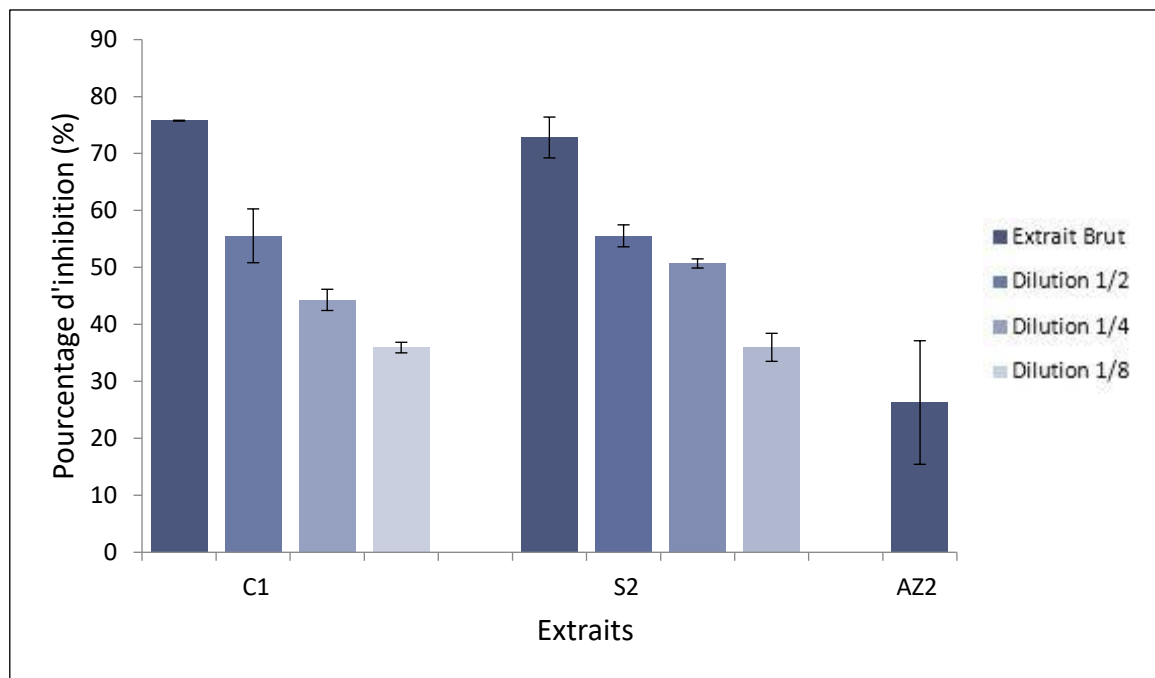


Figure 26. Pourcentages d'inhibition exercée par les extraits de trois variétés de brindilles vis-à-vis de la formation de biofilm par de *Bacillus cereus* (8).

S : variété sauvage **AZ** : variété *Azeradj* **C** : variété *Chemlal* **1** : Site 1 **2** : Site 2

Selon les résultats de la figure 26, les extraits bruts des trois variétés ont inhibé le biofilm de *Bacillus cereus* souche (8) avec 75,8%, 72,8% et 26,3% pour l'extrait C1, S2 et AZ2 respectivement. La dilution $\frac{1}{2}$ des deux extraits C1 et S2 ont inhibé l'adhérence cellulaire avec 55,6%, tandis que la dilution $\frac{1}{4}$ avec 44,3% et 50,7%, et la dilution $\frac{1}{8}$ avec 35,9% et 36% pour les deux extraits respectivement. Cependant, l'extrait AZ2 a montré une activité antibiofilm uniquement à sa concentration maximale.

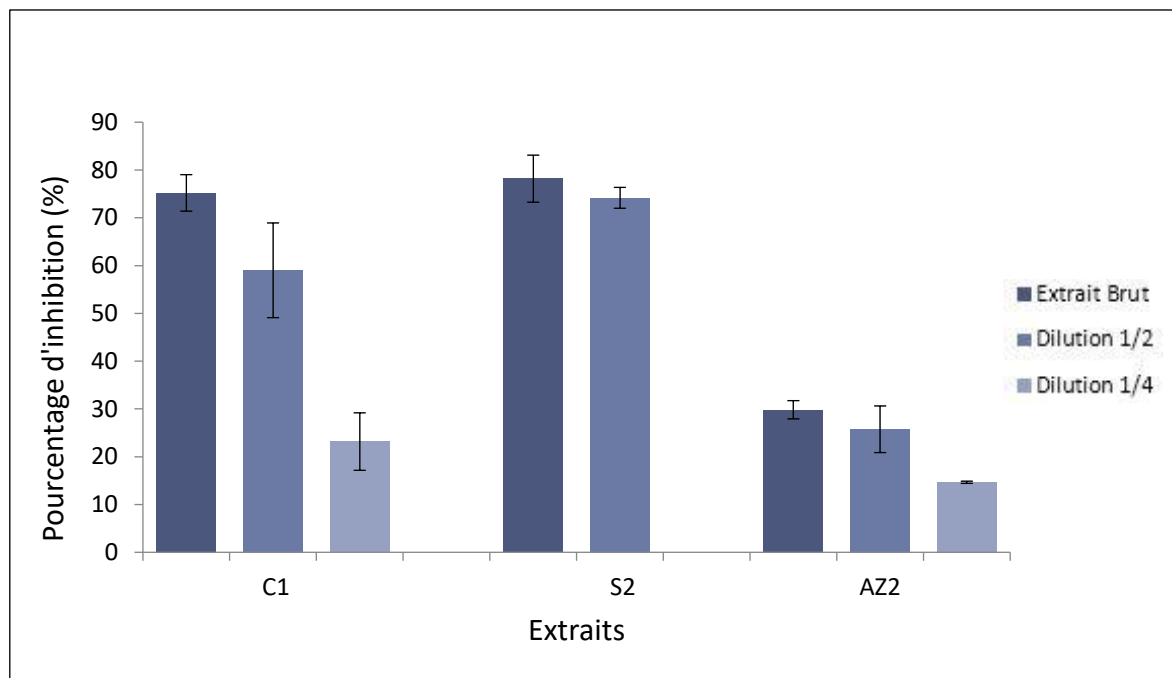


Figure 27. Pourcentages d'inhibition exercée par les extraits de trois variétés de brindilles vis-à-vis de la formation de biofilm par *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

S : variété sauvage **AZ** : variété *Azeradj* **C** : variété *Chemlal* **1** : Site 1 **2** : Site 2

Concernant la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, elle est inhibée par les trois extraits bruts avec un ordre de 75,2%, 78,2%, 29,8% pour l'extrait C1, S2 et AZ2. La dilution $\frac{1}{2}$ a montré une activité anti-biofilm avec des pourcentages 59%, 74,2% et 25,7% pour les mêmes extraits respectivement. La dilution $\frac{1}{4}$ des deux extraits C1 et AZ2 a inhibé la formation du biofilm staphylococcique avec 23,2% et 14,7% respectivement.

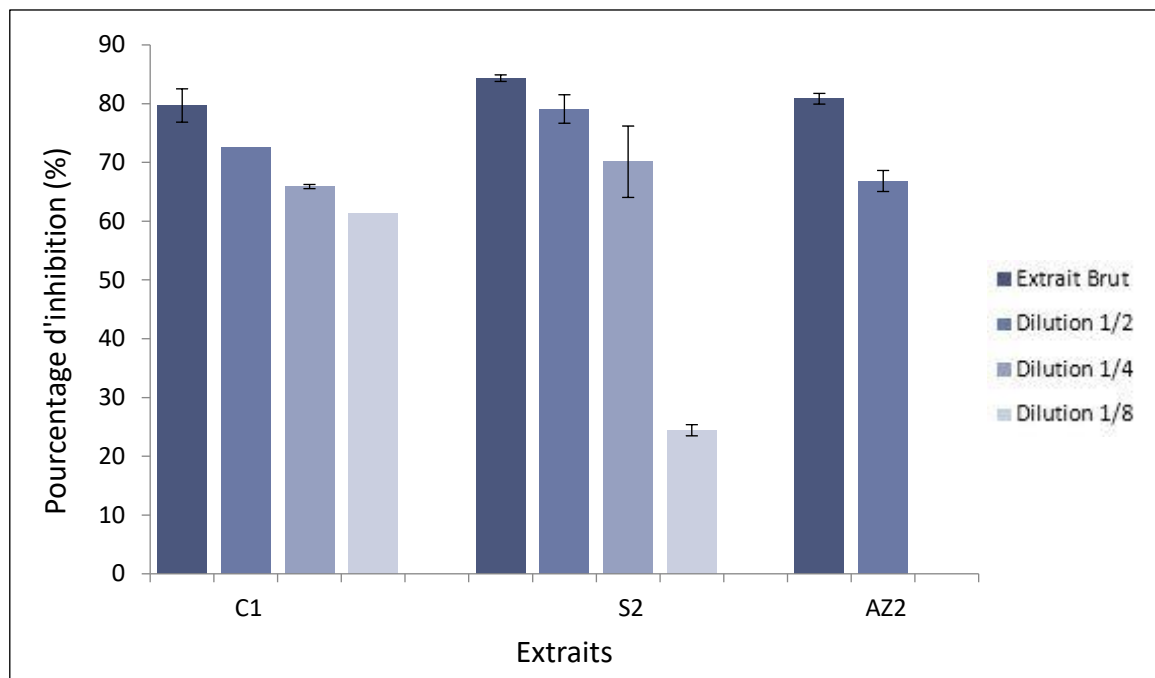


Figure 28. Pourcentages d'inhibition exercée par les extraits de trois variétés de brindilles vis-à-vis de la formation de biofilm par *Bacillus licheniformis*.

S : variété sauvage **AZ** : variété Azeradj **C** : variété Chemlal **1** : Site 1 **2** : Site 2

Les résultats présentés par la figure 28 révèlent que le biofilm de *Bacillus licheniformis* est inhibé par les extraits C1, S2 et AZ2 à leur concentration maximale avec 79,7%, 84,3% et 80,8%, tandis que la dilution 1/2 avec 72,5%, 79,1% et 66,8% respectivement. 65,9%, 70,1% et 22,6%, sont les pourcentages enregistrés pour la dilution 1/4 des trois mêmes extraits. On remarque également que la dilution 1/8 des extraits C1 et S2 inhibe le biofilm avec un ordre de 61,4% et 22,6% respectivement.

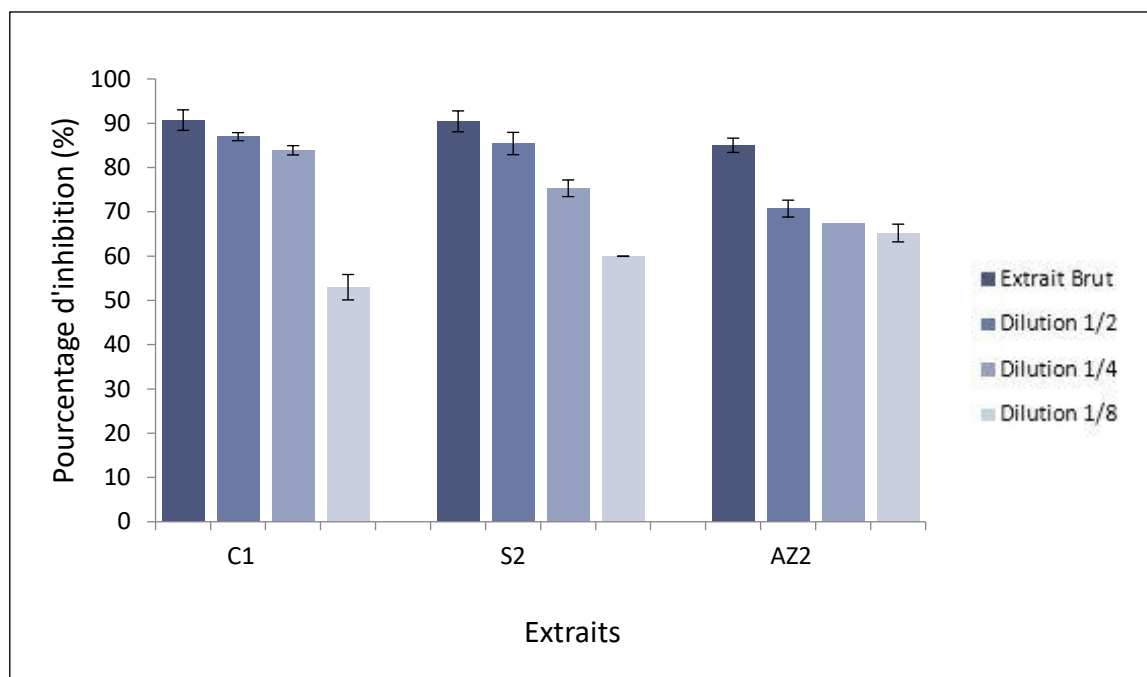


Figure 29. Pourcentages d'inhibition exercée par les extraits vis-à-vis de trois variétés de brindilles de la formation de biofilm par *Klebsiella oxytoca* (7).

S : variété sauvage **AZ :** variété Azeradj **C :** variété Chemlal **1 :** Site 1 **2 :** Site 2

Les extraits bruts C1, S2 et AZ2 ont inhibé la formation du biofilm de *Klebsiella oxytoca* d'un ordre de 90,7%, 90,4% et 85% respectivement. La dilution 1/2 des mêmes extraits a enregistré des pourcentages de 87%, 85,4% et 70,7%, la dilution 1/4 avec 83,9%, 75,3% et 67,30%, tandis que la dilution 1/8 avec 53%, 59,9% et 65,2% respectivement.

D'après les figures 25 à 29, l'augmentation des concentrations des trois extraits C1, S2 et AZ2, diminue de la formation de biofilms de la totalité des bactéries testées.

Les trois extraits bruts ont montré des effets variables sur la formation des différents biofilms. L'extrait S2 qui correspond à la variété sauvage *Olea europaea sylvestris* du site (2) a montré une meilleure activité antibiofilm contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus licheniformis*, et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec un ordre de 76,1%, 84,3% et 78,2% respectivement. Tandis que l'extrait de la variété Chemlal C1 a exercé un effet inhibiteur plus élevé vis-à-vis de *Bacillus cereus* souche (8) avec 75,8% et *Klebsiella oxytoca* avec 90,7%.

L'effet inhibiteur le plus important est remarqué pour l'extrait brut de la variété Chemlal C1 contre la souche *Klebsiella oxytoca* avec 90,7%. Le pourcentage le plus faible est enregistré pour l'extrait brut de la variété Azeradj AZ2 vis-à-vis de *Bacillus cereus* souche (8) avec 26,3%.

On signale également que les trois extraits utilisés à savoir C1, S2 et AZ2, exercent une activité antibiofilm la plus importante vis-à-vis de la souche *Klebsiella oxytoca*, et cela, à différentes concentrations.

L'activité antibiofilm observée est généralement attribuée aux concentrations élevées de composés phénoliques présents notamment l'oleuropéine, ou encore à un effet synergique de certains phénols contenus dans les extraits. L'effet des polyphénols sur l'inhibition de la formation du biofilm est un mécanisme qui n'est pas complètement compris. Cependant, les PP ont une capacité de réduire les ligands d'adhésion, de neutraliser les toxines bactériennes, et d'augmentation de la perméabilité membranaire, facilitant ainsi leur rupture (DAGLIA, 2012 ; EDZIRI *et al.*, 2019).

A notre connaissance, aucun travail scientifique concernant les extraits d'acétate d'éthyle de brindilles d'olivier issues de ces trois variétés n'est publié sur le pouvoir antimicrobien et antibiofilm vis-à-vis des souches sélectionnées. Ainsi, les résultats obtenus ont permis de conclure que les extraits de brindilles des trois variétés oléicoles locales à savoir *Chemlal*, *Azeradj* et la variété sauvage *Olea europaea sylvestris*, présentent un effet inhibiteur important sur la formation de biofilms avec des pourcentages différents, et cela, en fonction de la variété, la concentration de l'extrait ainsi que de la souche bactérienne testée.

- **Concentration minimale inhibitrice de biofilm (CMIB)**

La concentration la plus faible qui présente une inhibition visible du biofilm est définie comme la concentration minimale inhibitrice (CMIB) (VALLLIAMMAI *et al.*, 2020).

Tableau XVIII. Concentrations minimales inhibitrices de biofilms des trois extraits vis-à-vis des souches testées.

Souches bactériennes	(CMIB) des extraits		
	C1	S2	AZ2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Dilution 1/4	Dilution 1/4	Dilution 1/4
<i>Bacillus cereus</i> Souche (8)	Dilution 1/8	Dilution 1/8	Extrait brut
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Dilution 1/4	Dilution 1/2	Dilution 1/4
<i>Bacillus licheniformis</i>	Dilution 1/8	Dilution 1/8	Dilution 1/2
<i>Klebsiella oxytoca</i> (7)	Dilution 1/8	Dilution 1/8	Dilution 1/8

S : variété sauvage AZ : variété *Azeradj* C : variété *Chemlal* 1 : site 1 2 : site2

D'après les résultats du tableau XVIII, on remarque que la CMIB des trois variétés vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est la dilution $\frac{1}{4}$, avec 1,18 mg/ml, 0,59 mg/ml et 1,21 mg/ml, correspondants aux pourcentages d'inhibitions 45,7%, 12,6% et 12,4% pour les extraits C1, S2 et AZ2 respectivement.

Les résultats révèlent que la dilution $\frac{1}{8}$ des extraits C1 et S2 représente la CMIB vis-à-vis de *Bacillus cereus* souche (8), avec 0,59mg/ml et 0,29 mg/ml pour des inhibitions d'un ordre de 35,9% et 36% respectivement. Tandis que celle de l'extrait AZ2 est sa concentration maximale 4,84 mg/ml avec 26,3%.

Pour la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la dilution $\frac{1}{4}$ de C1 et AZ2 est la CMIB avec 1,18 mg/ml pour 23,2% et 1,21 mg/ml pour 14,7% respectivement. Tandis que la dilution $\frac{1}{2}$ est la CMIB de S2 avec 1,17mg/ml pour un ordre de 25,7%.

Selon les résultats obtenus, la CMIB de C1 et S2 vis-à-vis de la souche *Bacillus licheniformis* est la dilution $\frac{1}{8}$ avec 0,59 mg/ml et 0,29 mg/ml pour des inhibitions de 64,4% et 22,6%. Cependant, la CMIB de AZ2 est la dilution $\frac{1}{2}$ avec 2,42 mg/ml pour une inhibition de 66,8%.

Concernant la souche *Klebsiella oxytoca* souche (7), la CMIB des trois extraits est la dilution $\frac{1}{8}$ avec 0,59 mg/ml, 0,29mg/ml et 0,6 mg/ml, correspondants aux ordres d'inhibitions 53%, 59,9% et 65,2% pour C1, S2 et AZ2 respectivement.

La totalité des extraits testés, C1, S2 et AZ2, à leur concentrations minimales 0,59mg/ml, 0,29 mg/ml et 0,6 mg/ml respectivement, présentent l'effet inhibiteur le plus élevé vis-à-vis de *Klebsiella oxytoca* souche (7) avec des pourcentages plus importants (>50%) par rapport aux autres souches.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Depuis plusieurs années, la médecine traditionnelle basée sur l'utilisation des préparations à base de plantes connaît un succès croissant. De nos jours, un grand nombre de plantes médicinales avec des propriétés biologiques très intéressantes trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacologie, cosmétologie et en agriculture. Les plantes médicinales sont une source inépuisable d'une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées, utilisés non seulement comme des agents chimiques contre les herbivores et les prédateurs, mais aussi pour leurs véritables vertus thérapeutiques.

La région méditerranéenne est très riche en espèces végétales, notamment, l'*Olea europaea L.* qui est l'une des premières cultures arboricoles agricoles cultivée principalement pour l'huile comestible et les olives de table. En plus des olives, l'olivier génère également des quantités importantes de coproduits oléicoles, dont les feuilles et les brindilles. Ces dernières sont un réservoir de composés phénoliques, connus pour leurs activités biologiques qui sont en relation directe avec la santé humaine.

En effet, la recherche de nouvelles substances alternatives, plus efficaces et plus durables, douées de pouvoirs antioxydants et antimicrobiens est un thème d'actualité dont l'importance est justifiée par l'émergence de la résistance aux agents antimicrobiens, en particulier les antibiotiques. L'organisation des cellules en structure complexes appelées « biofilms », complique les problèmes de résistance et accroît la virulence des germes, par conséquent, la génération d'une nouvelle diversité moléculaire à partir de sources naturelles semble être une option prometteuse pour surmonter le défis de la résistance microbienne et la formation de biofilms.

La présente étude s'est intéressée à la valorisation des brindilles de trois variétés de l'olivier, à savoir, la variété *Azeradj*, *Chemlal* et la variété sauvage *Olea europaea sylvestris*. Différents aspects ont été étudiés : l'activité antimicrobienne et antibiofilm, la teneur en PPT et le pouvoir antioxydant.

La caractérisation quantitative des extraits d'acétate d'éthyle de brindilles de l'olivier a été faite pour déterminer leurs contenus en PPT. L'extrait AZ2 de la variété *Azeradj* s'est révélé le plus riche en composés phénoliques par rapport aux autres extraits, avec une valeur de 15,50 mg EAG/ g MS. Le test antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, a montré que tous les extraits bruts possèdent un pouvoir anti-radicalaire intéressant qui varie de 79,06% à 87,83 %.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur douze souches bactériennes. Deux méthodes ont été employées : un test de contact par la méthode de diffusion sur milieu gélosé, ainsi qu'un contact direct en absence d'un milieu de culture. Les résultats obtenus indiquent que les extraits bruts possèdent une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches Gram positif ainsi que les Gram négatif. L'extrait de la variété *Azeradj* a représenté l'effet antimicrobien le plus important avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 25,9 mm. Tandis qu'au contact direct sans milieu de culture, toutes les souches ont été inhibées à l'exception de *Bacillus cereus* ATCC 14579, qui présente une résistance due à sa capacité de former des spores.

L'évaluation de l'activité antibiofilm a permis de constater que les extraits de brindilles possèdent un pouvoir antibiofilm, notamment vis-à-vis de *Klebsiella oxytoca* souche (7), avec des pourcentages d'inhibition allant jusqu'à 90,7% pour l'extrait brut de la variété *Chemlal*. Il est constaté que la totalité des extraits testés, C1, S2 et AZ2, à leur concentrations minimales (0,59 mg/ml), (0,29 mg/ml) et (0,6 mg/ml) respectivement, présentent l'effet inhibiteur le plus élevé vis-à-vis de cette même souche avec des pourcentages plus importants (>50%) par rapport aux autres souches testées.

Peu d'études ont été menées sur les brindilles de l'olivier malgré leur richesse en composés bioactifs. L'ensemble des résultats obtenus ne constituent qu'une première étape dans la valorisation des sous-produits oléicoles, notamment, les rameaux. Des travaux complémentaires plus approfondies qui s'intéressent à l'exploitation de ces tissus sont alors nécessaires. A l'issue de la présente étude, plusieurs perspectives peuvent être envisagées :

- Etendre cette étude vers de meilleurs procédés d'extraction pour un meilleur rendement. On propose également d'opter pour la diversification des extraits à base de différents solvants organiques.
- Déterminer la composition chimique de chaque extrait de brindilles des trois variétés (*Olea europaea sylvestris*, *Azeradj* et *Chemlal*).
- Isoler, purifier et identifier avec certitude les composés bioactifs présents et responsables de ces activités testées. Il serait intéressant d'évaluer leurs activités séparément et combinées pour faire ressortir l'effet synergique entre ces molécules, dans le but de rechercher des substances à large spectre d'action, qui réduisent la résistance aux antibiotiques.
- Caractérisation quantitative des composés phénoliques par des techniques de séparation performantes (méthodes chromatographiques).

- Elargir le panel des activités antibactériennes et antioxydantes *in vitro* et *in vivo*.
- Tester l'effet de ces mêmes extraits sur l'inhibition de la formation de biofilms formés par d'autres bactéries.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abaza L., Bouzlama L., Benzekri R., Trabelsi N., Ameni T., Selim J et Zarrouk M. (2019).** Isolation of an antiviral compound from Tunisian olive twig cultivars. *Microbial Pathogenesis.*, vol 128, 245–249.
- Abdessemed A., Boudchicha R.H., Benbouza H. (2018).** Caractérisation et identification de quelques écotypes d'olivier *Olea europaea L* en Algérie. *Biannual journal, Ferhat ABBAS University, Sétif1.*, vol 8(2): 26-43.
- Abebe G.M. (2020).** The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *International Journal of Microbiology.*, vol 2020, article ID 1705814, 10p.
- Achat S. (2013).** Polyphénols de l'alimentation : Extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse Pour l'obtention du grade de Docteur en sciences. Université Abderrahmane MIRA, Bejaïa.
- Addab N., Fetni S., Hamlaoui F., Zerguine A., Mahloul K. (2020).** Evaluation comparative de l'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques des feuilles d'*Olea europaea L.* de l'Est Algérien. *J Fac Med Or.*, vol 4, numéro 2 (9), 579-586.
- Aillaud G.J. (1985).** L'olivier et l'huile d'olive, le point de vue des botanistes In : L'huile d'olive en Méditerranée : Histoire, anthropologie, économie de l'Antiquité à nos jours. Institut de recherches et d'études sur les mondes arabes et musulmans.
- Aissaoui Y., Boukhari Y., Mahi M.A. (2021).** The Anti-inflammatory Effect of Polyphenolics Olive Leaf Extracts *Olea europaea L.* phyto-2021-0251, 6 p.
- Aliabadi M.A., Darsanaki R.K., Rokhi M.L., Nourbakhsh M., Raeisi G. (2012).** Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. *Annals of Biological Research.*, vol 3 (8):4189-4191.
- Al-Khafaji A.N. (2018).** Comparison of Antimicrobial Activity of Olive Leaves Extracts and Apple Cider Vinegar against Bacterial isolates Obtained from Otitis Media. *Journal University of Kerbala.*, vol 16 No.3 Scientific.
- Alqahtani M.S.M.A. (2019).** Antimicrobial activity of olive oil against microbial infections. *Journal of medical & pharmaceutical Sciences.*, vol 3(3): 30, 45 – 81.

Références bibliographiques

Amoretti M.C., Comet G. (1985). Le livre de l'olivier. EDISUD, 191p.

Ampofo E.K., Amponsah I.K., Asante-Kwatia E., Armah F.A., Atchoglo P.K and Mensah A.Y. (2020). Indigenous Medicinal Plants as Biofilm Inhibitors for the Mitigation of Antimicrobial Resistance. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences.*, vol 2020, article ID 8821905, 10p.

Androutros G. (2004). Anton Leewenhoek (1632-1723) and the first description of spermatozoon. *L'histoire de l'Andrologie.*, vol 14, N°3. 336-342.

Angles S. (2012). L'olivier et les territoires méditerranéens. *L'histoire de l'olivier.* Université Paris Diderot – Paris 7, UMR 7533 LADYSS.

Antezack A. (2017). Importance du contrôle de plaque dentaire individuel en phase thérapeutique et en phase de maintenance chez l'adulte et l'adolescent. Thèse pour obtenir le diplôme d'Etat de docteur en chirurgie dentaire. Académie d'Aix-Marseille, France.

Antunes B.F., Otero D.M., Oliveira F.M., Jacques A.C., Gandra E.A., Zambiasi R.C. (2020). Antioxidant and antimicrobial activity of olive trees cultivated in the Campanha Gaúcha region. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba., vol 6 (4),21791-21805.

Aouidi F. (2012). Etude et valorisation des feuilles d'olivier *Olea europea* dans l'industrie agro-alimentaire. Thèse de Doctorat en génie biologique. Université de Carthage, Tunisie.

Aouidi F., Perraud-Gaime I., Roussos S., Hamdi M. (2009). Etude de la répartition quantitative des phénols totaux dans l'olivier en fonction des organes et leur degré de maturité. Sfax : Institut de l'Olivier, 376-379.

APS (Algérie presse service). (2018). Les surfaces agricoles consacrées à l'oléiculture.

Arab K., Bouchenak O., Yahiaoui K. (2013). Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. *Afrique SCIENCE.*, vol 09(3), 159 – 166.

Athamena S., Chalghem1 I., Kassah-Laouar, A., Khebri, S et Laroui, S. (2010). Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum*. *Lebanese Science Journal.*, vol 11-13.

Aumeran C., Balestrino D., Forestier C. (2020). Biofilms bactériens et santé. *Encyclopédie de l'Environnement.*

Références bibliographiques

Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Analytical Nutritional and Clinical Methods. Food Chemistry.*, vol 99, 191–203.

Balouiri M., Sadiki M., Koraichi-Ibnsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis.*, vol 6 (2), 71–79.

Bardoulat M. (2005). L'olivier, trésor de santé : un arbre, un fruit, une huile aux vertus millénaires. Editions ALPEN. 95p.

Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A., Del Rio J.A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L.* leaves, *Food Chemistry* 2000., vol 68, 457-462.

Benmouna Z. (2019). Etude de bactériocines de bactéries lactiques et leurs effets sur les bactéries pathogènes et/ou d'altération. Thèse de Doctorat en Sciences. Université Oran 1 Ahmed BEN BELLA.

Boakye Y.D., Osafo N., Amaning-Danquah C., Adu F and Agyare C. (2019). Antimicrobial Agents: Antibacterial Agents, Anti-biofilm Agents, Antibacterial Natural Compounds, and Antibacterial Chemicals, Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods. Sahra Kirmusaoglu, Intech Open.

Boizot N., et Charpentier J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cahier des Techniques de l'INRA-Amélioration, génétique et physiologie forestières, laboratoire d'analyses biochimiques ., pp 79-82.

Bouchouka E. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. Thèse pour l'obtention d'un diplôme de Doctorat en sciences. Université BADJI Mokhtar, Annaba.

Bouderba N., Kadi H., Moghtet S., Meddah B and Moussaoui A. (2012). Antibacterial Activity and Phytochemical Screening of *Olea Europaea* Leaves from Algeria. The Open Conference. *Proceedings Journal.*, vol 3, 66-69.

Bouguerra A., Himed L., Barkat M. (2014). Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata*. *Nutrition & Santé.*, vol 03 (1), 32-39.

Références bibliographiques

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., & Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology.*, vol 28(1), 25–30.

Briandet R., Naïtali M. (2019). Biofilms : La vie des microbes en société. Éditions Quæ. RD 1078026 Versailles Cedex. 120p.

Briandet R., Naitali M., Dreanno C. (2012). Biofilms : Quand les microbes s'organisent. Editions Quæ, 180p.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Technique et Documentation. 3^{ème} Editions, Paris. France, 1120 p.

Bruneton J. (2008). Acides phénols : Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Editions Tec et Doc, Lavoisier, Paris., pp 198-260.

Carneiro A.L.B., Teixeira M.F.S., Oliveira V.M.A.D., Fernandes O.C.C., Cauper G.S. D.B., Pohlit A.M. (2008). Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity., vol 103(1), 31-38.

Carpentier, B. (2014). Biofilms. *Encyclopedia of food Microbiology*, 259-265.

Carrion Y., Ntinou M., Badal E. (2010). *Olea europea L.* in the North Mediterranean Basin during the pleniglacial and the Early-Middle Holocene. *Quaternary Science Reviews.*, vol 29, 952-968.

Ceuppens S., Uyttendaele M., Drieskens K., Rajkovic A., Boon N and Van De Wiele T. (2012). Survival of *Bacillus cereus* Vegetative Cells and Spores during In Vitro Simulation of Gastric Passage. *Journal of Food Protection.*, vol 75 (4), 690-694.

Chalvet R.A. (2009). Les biofilms et la peau. Thèse pour obtenir le Doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire d'ALFORT, France.

Choudhary P., Singh S., and Agarwal V. (2020). Microbial Biofilms, Bacterial Biofilms, Sadik Dincer, Melis Sumengen Ozdenefe and Afet Arkut, Intech Open.

Chua S.L., Liu Y., Yam J.K.H., Chen Y., Vejborg R.M., Tan B.G.C., Kjelleberg S., Tolker-Nielsen T., Givskov M., and Yang L. (2014). Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nature Communications.*, vol 5(1), 12p.

Références bibliographiques

Compaore E., Compaore M., Ouedraogo V., Rouamba A., Kiendrebeogo M. (2021). Anti-quorum Sensing Potential of *Ageratum Conyzoides L.* (Asteraceae) Extracts.,14p.

Conseil Oléicole International (C.O.I) (2003). Classification des huiles d'olive. Normes internationales applicables à l'huile d'olive et à l'huile de grignon d'olive.

Coşansu S et Kıymetli O. (2021). Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract on Selected Foodborne Pathogens and its Effect on Thermal Resistance of *Listeria monocytogenes* in Sous Vide Ground Beef. International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences., vol 5(2), 236-242.

Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, Oct. 1999., vol 12(4), 564–582.

Daglia M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. Current opinion in biotechnology., vol 23 (2), 174-181.

Davey M.E and O'toole G.A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews., vol 64 (4), 847–867.

Debib A et Boukhatem M.N. (2017). Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of “*Chemlali*” Olive Leaf (*Olea europaea L.*), vol 6, 38–46.

Didi A et Didi M.A. (2021). Extraction of *Nigella Sativa* Seeds at a Pilot Scale and Their Effects on the Formation of *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms., vol 22 (2), 141 – 158

Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L., Roncales P. (2012). Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens : Application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. Revue « Nature & Technologie ». N° 07, P5361.

Donlan R.M and Costerton J.W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews., vol 15 (2), 167–193.

Donlan R.M (2001). Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process., vol 33:1387–92, 1387-1392.

Donlan R.M (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases., vol 8, No. 9, 881-890.

Döring, M et Uehlinger, U. (2006). Les biofilms du Tagliamento. Eawag News. 11p.

Dupont, F.J., Guignard, L. (2007). Botanique systématique moléculaire. Editions Elsevier Masson. 14 éditions révisées, 285p.

Edziri H., Jaziri R., Chehab H., Verschaeve L., Flamini G., Boujnah D., Hammami M., Aouni M., Mastouri M. (2019). A comparative study on chemical composition, antibiofilm and biological activities of leaves extracts of four Tunisian olive cultivars., vol 5, e01604.

Esmail A., Chahboun Z., Mennane Z., Amiyare R et al. (2015). Etude de l'activité antimicrobienne des margines issues de Fès Boulman vis-à-vis des souches pathogènes. Journal of Materials and Environmental Science., vol 6(3), 869-876.

EUCAST. Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie. Recommandations (2020)., vol 1(1).

Fazeli-Nasab B., Valizadeh M., Hassanzadeh M.A., and Beigomi M. (2021). Evaluation of the Antimicrobial Activity of Olive and Rosemary Leave Extracts Prepared with Different Solvents Against Antibiotic-Resistant *Escherichia coli*. International Journal of Infection., vol 8(3):e114498, 6p.

Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice A.S and Kjelleberg S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology., vol 14, 563-575.

Gedif M.A. (2020). The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. International Journal of Microbiology., vol 15, pp 1-10.

Ghalandari M., Naghmachi M., Oliverio M., Nardi M., Ghafarian Shirazi H.R. (2018). Antimicrobial effect of Hydroxytyrosol, Hydroxytyrosol Acetate and Hydroxytyrosol Oleate on *Staphylococcus Aureus* and *Staphylococcus Epidermidis*. Owrang Eilami., vol 15(4).

Gill J.J., Hyman P. (2010). Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. Current Pharmaceutical Biotechnology., vol 11(1), 2–14.

Goetz, C., Dufour, S., Archambault, M., Malouin, F., Jacques M. (2016). Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière. Médecine vétérinaire., vol 167, 215-229.

Références bibliographiques

- Gökmen M., Kara R., Akkaya L., Torlak E and Önen A. (2014).** Evaluation of Antimicrobial Activity in Olive (*Olea Europaea*) Leaf Extract. American Journal of Microbiology., vol 5 (2), 37-40.
- Goller C.C, Romeo T. (2008).** Environmental Influences on Biofilm Development. Bacterial Biofilms, Current Topics in Microbiology and Immunology., vol 322, 37-66.
- Goodwin T.W et Mercer E.I. (1983).** Introduction à la biochimie végétale, 2ème éditions, Presse Pergame, 677p.
- Gopal V., Prakash Yoganandam G and Manju P. (2015).** A Concise Review on Melia Dubia Cav. (Meliaceae). European Journal of Ecology., vol 2 (2), 57-60.
- Grigore-Gurgu L., Ionela Bucur F., Borda D., Alexa E. A., Neagu C and Nicolau A. L. (2019).** Biofilms Formed by Pathogens in Food and Food Processing Environnements, Bacterial Biofilms, Sadik Dincer, Melis Sumengen Ozdenefe and Afet Arkut. Intech Open, 32p.
- Groubert A. (1984).** Techniques d'extraction végétale. Pharmacie., Vol 1, 88p. Montpellier, France.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C., & Chapelle J.P. (2007).** Le stress oxydant. Revue Médicale de Liège., vol 62 (10), 628-38.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989).** Free radicals in biology and medicine. 2nd Edition, Oxford Science Publications, UK, Clarendon.
- Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., and Rakesh D.D. (2008).** Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology.
- Hasmik-Hayrapetyan. (2017).** *Bacillus cereus* growth and biofilm formation: the impact of substratum, iron sources, and transcriptional regulator Sigma 54. Thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands, 182p.
- Hayes J.E., Allen P., Brunton N., O'Grady M.N., & Kerry J.P., (2011).** Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea L.*), lutein, sesamol and ellagic acid. Food Chemistry., 126, 948-955.

Références bibliographiques

Henri S. (2003). L'huile d'olive, son intérêt nutritionnel, ses utilisations en pharmacie et en cosmétique. Thèse pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, France.

Høiby N. (2014). Une histoire personnelle de recherche sur les biofilms microbiens et les infections à biofilms. *Pathogens and Disease.*, vol 70 (3), 205–211.

Hu W.S., Nam D.M., Kim J. S., & Koo, O. K. (2020). Synergistic anti-biofilm effects of Brassicaceae plant extracts in combination with proteinase K against *Escherichia coli* O157:H7. 10:21090.

Ibrahim N.H., Turkey A.M., Abd-al-Rahman J. (2020). Study the effect of olive extract or refined oligonucleus on *Staphylococcus aureus* isolated from different clinical cases, *Ann Trop Med & Public Health, Annals of Tropical Medicine & Public Health.*, vol 23(S9): SP23923.

Irving W., Ala'Aldeen D., et Boswell T. (2005). *Medical Microbiology.* Collection Instant Notes. Taylor et Francis. 350p.

Jones W.P., and Kinghorn A.D. (2005). Extraction of plant secondary metabolites. In: *Methods in Biotechnology, natural products isolation.* Sarker S.D., Latif Z., and Gray A.I (editions)., vol 20, 2nd editions . Humana Press, Totowa, New Jersey, 323-351.

Karamodini M. K., Fazli-Bazzaz B.S., Emamipour F., Sabouri-Ghannad M., et al. (2011). Bacteriophages against Resistant *Klebsiella* Species. *The Scientific World Journal.*, vol 11, 1332–1340.

Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., and Zinkernagel R.M. (2005). *Medical Microbiology.* Edition Thieme. 698p.

Klein G. (2011). Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université de Bretagne Occidentale, France.

Klein G., Dufour A et Compère C. (2010). De nouvelles voies d'inhibition des biofilms Des micro-organismes producteurs de nouvelles molécules actives. *Matériaux et techniques* N° 1.

Références bibliographiques

Ko K-W., Kang H.J., Lee B.Y. (2009). Antioxidant, Antimicrobial, and Antiproliferative activities of olive (*Olea europaea* L) Leaf extracts. Food Science and Biotechnology., vol 18, 818-821.

Korukluoglu M., Sahan Y., Yigit A., Ozer E.T., Gucer S. (2010). Journal of Food Processing and Preservation., vol 34, 383-396.

Kuang X., Chen V and Xu X. (2018). Novel Approaches to the Control of Oral Microbial Biofilms. BioMed Research International., vol 2018, article ID 6498932, 13p.

Labdaoui D. (2017). Impact socio-économique et environnemental du modèle d'extraction des huiles d'olives à deux phases et possibilités de sa diffusion dans la région de Bouira (Algérie). Thèse de Doctorat. Université Abdelhamid IBN BADIS, Mostaganam. 143p.

Lagrafeuille R. (2016). Activités anti-biofilm de *Lactobacillus* vis-à-vis de *Klebsiella Pneumoniae*. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I.

Lahdibi-Sahraoui H., El Berny H., El Karkour M, Quasmaoui H, Charof R, Mennane Z. (2017). Antibacterial Activity of Aqueous and Methanolic Extracts of Olive (*Olea europaea* L.) Leaves Collected from Different Regions in Morocco., vol 9(13), 118-124.

Lakache Z., Tigrine C., Aliboudhar H., Kameli A. (2019). Composition chimique, activités anti-inflammatoire, antalgique et cytotoxique *in vivo* de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea*. Phytothérapie., vol 19, pp 83-92.

Lane N. (2015). The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) "Concerning little animals." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences., vol 370(1666), 20140344–20140344.

Lebeaux D., Ghigo J.M. (2012). Infections associées aux biofilms : Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale. Review médecine/sciences., vol 28, P 727-39. m/s n° 8-9.

Lechantre R. (2019). Les biofilms en milieu hospitalier : Quels sont les enjeux pour l'hygiène hospitalière ?. 08:01:36. 10p.

Lee O.H., Lee B.Y. (2010). Activités antioxydantes et antimicrobiennes des composés phénoliques individuels et combinés dans l'extrait de feuille d'*Olea europea*. Bio ressources Technologie.

Références bibliographiques

Lee-Hyang S., Zhang L., P.L., Chang Y.T and Huang P.L. (2003). Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, vol 307(4), 1029-1037.

Leybros J and Frémeaux P. (1990). "Extraction solide-liquide, aspects théoriques." *Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés J1 077 06.*

Lu I., Cokcetin N.N., Burke C.M., Turnbull L., Liu M., Carter D.A., Whitchurch C.B & Harry E.J. (2019). Honey can inhibit and eliminate biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*, *Scientific Reports.*, vol 9:18160.

Lu L., Hu W., Tian Z., Yuan D., Yi G., Zhou Y., Cheng Q., Zhu J and Li M. (2019). Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine Review.*, vol 14 (11), 17p.

Macheix J-J., Fleuriet A., Christian J.A. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Collection Biologie. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.*192p.

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

Majed R., Faille C., Kallassy M and Gohar M. (2016). *Bacillus cereus* Biofilms-same, only Different. *Front. Microbiol.*, vol 7:1054.

Manallah A. (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europea L.* Mémoire pour obtenir le diplôme de Magister en biochimie. Université Ferhat ABBAS, Sétif.

Mantion B. (2015). *Entérocoques* résistants à la vancomycine (ERV) : De grandes épidémies vers une gestion routine. Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université Toulouse III Paul Sabatier.

Mekhokhe A. (2008). Etude de certaines activités biologiques des composés phénoliques extraits de cinq plantes médicinales de la région de Bejaia. Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires. Université Abderrahmane MIRA, Bejaia.

Références bibliographiques

Mendil M. (2009). « Situation mondiale de l'oléiculture », Le premier forum méditerranéen de l'oléiculture, Alger, Doc n°4. 23p.

Micol V., Caturla N., Pérez-Fons L., Mas V., Pérez L et Estepa A. (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Research.*, vol 66(23), 129-36.

Migdal C., Serres M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Revue médecine/sciences.*, vol 27, 405-12.

Mili S. (2006). « Olive oil marketing on non-traditional markets: prospects and strategies ». *New Medit.*, vol 5(1), 27-37.

Mion S., Rémy B., Plener L., Chabrière E., Daudé D. (2019). Quorum sensing et quorum quenching Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence?., *Medicine Sciences.*, vol 35, 31-8.

Mitrofanova O., Mardanova A., Evtugyn V., Bogomolnaya L and Sharipova M. (2017). Effects of *Bacillus* Serine Proteases on the Bacterial Biofilms., vol 2017, article ID 8525912, 10p.

Mohamed S.H., Mahmoud S.M., Khalil S.M.M., Mohamed W.S., Mabrouk M.I. (2018). Antibiofilm activity of papain enzyme against pathogenic *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.*, vol 8(06), 163-168.

Monmeyran A. (2019). Étude expérimentale d'un modèle de biofilm bactérien multi-espèces en vidéo-microscopie : cinétique de formation et interactions entre espèces. Biophysique. Sorbonne Université.

Moreira M.R., Ponce A.G., Del Valle C.E., Roura S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen, 565-570.

Moshynets O.V and Spiers A.J. (2016). Viewing Biofilms within the Larger Context of Bacterial Aggregations. Chapter 1 From the Edited volume, *Microbial Biofilms: Importance and applications.*

Muchuweti M., Nyamukonda L., Chagonda L. S., Ndhlala A. R., Mupure C., Benhura M. 2006. Total phenolic content and antioxidant activity in selected medicinal plants of Zimbabwe. *International Journal of Food Science and Technology.*, vol 41(33), 28-33.

Références bibliographiques

Munch, R., Koch, R. (2003). *Microbes Infect.*, vol 5, 69-74.

Mylonaki S., Kiassos E., Makris D.P., Kefalas P., (2008). Optimization of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.*, vol 392(5), 977-985.

Nadell C. D., Joao B.X., & Foster K.R. (2009). The sociobiology of biofilms. *Microbiology Reviews.*, vol 33(1), 206–224.

Nassrullah-Malik S. (2015). Antibacterial Activity of Olive (*Olea europaea*) Leaves and Arugula (*Eruca sativa*) Seeds Extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research.*, vol 7(2) , 307-310.

Nefzaoui A. (1991). Valorisation des sous-produits de l'olivier. In: Tisserand J.-L. Alibés X. (Editions). Fourrages et sous-produits méditerranéens, 101-108 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens ; n. 16).

Nguimatsia F., Kenmogne S.B., Ngo-Mback M.N.L., Kenmogne S.B., Kouamouo J., Tchuitio L.L.N., Melogmo D.Y.K., and Ngo-Mback M.N.L. (2021). Antibacterial activities of the essential oil and hydroethanolic extract from *Aeollanthus heliotropioides* Oliv. *Mediterranean Journal of Chemistry.*, vol 11(1), 95-103.

Nirwati H., Sinanjung K., Fahrnunissa F., Wijaya F., Napitupulu S et al. (2019). Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proceedings.*, vol 13(11), 20.

Olivier D., Boubault E., Pinatel C., Souillol S., Guerere M., Artaud J. (2004). Analyse de la fraction phénolique des huiles d'olive vierges. *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique*, 2ème Semestre, N°965, 169-196.

Ouchar O.M., Tidjani A., Savadogo A., Mahamat A.A., Somda M.K. ; Traore A.S. (2013). Isolement et caractérisation des bactéries productrices des biofilms issues des produits alimentaires. *Revue de microbiologie industrielle, sanitaire, et environnementale.*, vol 7(2), 187-210.

Owlia P., Saderi H., Rasooli I., Sefidkon F. (2010). Antimicrobial characteristics of some herbal Oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 107-114.

Références bibliographiques

- Parastan R., Kafilzadeh F., Kargar M., Solhjoo K. (2020).** Biofilms de *Staphylococcus aureus* : structures, résistance aux antibiotiques, inhibition et vaccins., vol 20, 100739.
- Pasandideh N., and Anvari, M. (2018).** Study on antimicrobial effects of *Olea europaea* (Olive) and olive leaf extracts on pathogenic bacteria using Taguchi methodology. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology., vol 8(2), 1039-1047.
- Pereira A.P., Ferreira I.C.F.R., Marcelino, F., Valentão P et al. (2007).** Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea L.*) leaves., vol 12, 1153-1162.
- Phillips P.L, Wolcott R.D., Fletcher J., Shultz G.S. (2010).** Biofilms Made Easy. Wounds International., vol 1(3).
- Pimienta-R J., Martín-V D., Ramírez R.J. (2020).** Delgado-A. Pro-/antioxidant and antibacterial activity of olive leaf extracts according to bioavailability of phenolic compounds. Emirates Journal of Food and Agriculture., vol 32(6), 479-487.
- Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., & Sintim H. O. (2015).** Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Medicinal Chemistry., vol 7(4), 493–512.
- Reyes-J F., Munguía-Pérez R, Cid-Pérez T.S, Hernández-Carranza P, Ochoa-Velasco CE and Avila-Sosa R. (2020).** Inhibitory Effect of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) Essential Oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Thyphimurium* Biofilm Formation, Frontiers in Sustainable Food Systems., vol4:36.
- Roko O.G.Y. (2020).** Phytochimie et activités biologiques de *Euphorbia hirta*, *Citrus aurantifolia* et *Heterotis rotundifolia* : trois plantes de la médecine traditionnelle béninoise. Thèse de doctorat en sciences biologiques. Université d'ABOMEY- CALAVI, Bénin.
- Roussas S., Perraud-Gaime I., Lakhtar H., Aouidi F., Labrousse Y., Belkacem N., Macarie H., Artaud J. (2009).** Valorisation biotechnologique des sous-produits de l'olivier par Fermentation en Milieu Solide, 293-300.
- Roux A et Ghigo J.M. (2006).** Les biofilms bactériens. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France., vol 159 - N°3, 261-268.

Références bibliographiques

Sadou N., Seridi R., Djahoudi A., & Hadeif Y. (2015). Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis Mill.* Du Nord est Algérien. Synthèse : Revue des Sciences et de la Technologie., vol 30(1), 33-39.

Sahli R. (2017). Etude phytochimique de quelques plantes extremophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques. Thèse de Doctorat en "Sciences du médicament et des autres produits de santé". Université de Carthage, Tunisie.

Saleemi A.M., Palanisamy N.K and Wong E.H. (2019). Alternative Approaches to Combat Medicinally Important Biofilm-Forming Pathogens, Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods, Sahra Kirmusaoglu. Intech Open, 21p.

Sánchez-Gutiérrez M., Bascón-Villegas I., Rodríguez A., Pérez-Rodríguez F., Fernández-Prior Á., Rosal A., Carrasco E. (2021). Valorization of *Olea europaea L.* Olive Leaves through the Evaluation of Their Extracts: Antioxidant and Antimicrobial Activity. Foods., vol 10, 966p.

Sarni-Manchado P et Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Editions Tec et Doc, Lavoisier., pp 02-11.

Senani-Oularbi N. (2018). Etude des activités antioxydante, antifongique et hypoglycémiantes des marges d'olives et de leur extrait phénolique. Applications sur matrice alimentaire et sur modèle murin et cellulaire. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences biologiques. Université Mouloud MAMMERI, Tizi-Ouzou.

Singh R., Paul D., Jain R.K. (2006). Biofilms: Implications in biomeditation. Trends Microbiol., vol 14, 389-397.

Singla R.K., Dubey A.k., Garg A., Sharma R.K., Fiorino M., Ameen S., Haddad M.D., Al-Hiary M. (2019). Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures., vol 102, no. 5, 2019, 1397-1400.

Sjoberg S., Stairs C., Allard B., Hallberg R., Homa F., Martin T., Thijs J.G.E., Dupraz, C. (2020). Bubble biofilm: Bacterial colonization of air-air interface., vol 2, 100030.

Srey S., Jahid I.K., Ha S.D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food Control., vol 31(2), 572-585.

Références bibliographiques

Stewart, P., Franklin, M. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 6, P 199-210.

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

Sun T., Powers J.R., Tang J. (2007). Evaluation of the antioxidant activity of *asparagus broccoli* and their juices. *Food Chemistry.*, vol 105, 101-106.

Sutherland I.W. (2001). The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology.*, vol 9, 222-227.

Tahouo S.F. (2016). Procédures d'extraction globale des composés phytochimiques pour l'évaluation analytique des médicaments à base de plantes. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat en pharmacie, République de Côte d'Ivoire.

Taraszkiewicz A., Fila G., Grinholc M and Nakonieczna J. (2013). Innovative strategies to overcome biofilm resistance. Review article Publishing Corporation BioMed Research International., vol 2013, article ID 150653, 13p.

Tassou C.C. & Nychas G.J.E. (1994). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by olive phenolic in broth and in food model system. *Journal of Food Protection.*, vol 57, 120-124-132.

Teasiola-Margari and Okogeri. (2001). Simultaneous determination of phenolic. Compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and U.V detection. *Food chemistry*, 144-151.

Teirlinck E., Fraire J.C., Van Acker H., Wille J et al. (2019). Laser-induced vapor nanobubbles improve diffusion in biofilms of antimicrobial agents for wound care. *Biofilm 1* , 100004.

Tesla B., Lombardi S.J., Macciola E., Succi M., Tremonte P., Iorizzo, M. (2019). Efficacy of olive leaf extract (*Olea europaea L.*) in marinated anchovies (*Engraulis encrasicolus, L.*) process., vol 5(5), e01727.

Townsend M.E., Moat J., Jameson E. (2020). CAUTI's next top model – Model dependent *Klebsiella* biofilm inhibition by bacteriophages and antimicrobials. *Biofilm2*, 100038.

Références bibliographiques

- Toyofuku M., Inaba T., Kiyokawa T., Obana N., Yawata Y., Nomura N. (2015).** Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.*, vol 80(1), 7–12.
- Turkmen N., Sari F., Velioglu Y.S. (2006).** Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food chemistry.*, vol 99(4), 835-841.
- Uruén C., Chopo-Escuin G., Tommassen J., Mainar-Jaime R.C., Arenas J. (2021).** Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics* 2021., vol 10, 36p.
- Valliammai A, Selvaraj A, Yuvashree U, Aravindraja C and Karutha Pandian S. (2020).** SarA-Dependent Antibiofilm Activity of Thymol Enhances the Antibacterial Efficacy of Rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.*, vol 11:1744.
- Verderosa A.D., Totsika M and Fairfull-Smith K.E. (2019).** Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry.*, vol 7:824, 17p.
- Vidic J., Chaix C., Manzano M and Heyndrickx M. (2020).** Food Sensing: Detection of *Bacillus cereus* Spores in Dairy Products. *Biosensors* 2020., vol 10(3), 15.
- Wang N., Gao J., Yuan L., Jin Y., He G. (2020).** Metabolomics profiling during biofilm development of *Bacillus Licheniformis* isolated from milk powder. *International Journal of food Microbiology.*, vol 337, 108939.
- Wu B., Haney E.F., Akhoundsadegh N., Pletzer D., Trimble M.J., Adriaans A.E., Nibbering P.H And Hancock R.E.W. (2021).** Human organoid biofilm model for assessing antibiofilm activity of novel agents. *npj Biofilms and Microbiomes.*, vol 7:8.
- Yaakoubi A., Chahlaoui A., Rahmani M., Elyachioui M., Oulhote Y. (2009).** Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol, *Agrosolutions.*, vol 20 (1), 35-43.
- Yakhlef W. (2019).** Caractérisation des profils phénoliques et évaluation de l'activité antibactérienne du contenu phénolique des margines monovariétales. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences. Université Larbi BEN M'HIDI Oum El-Bouaghi.
- Yan Z., Huang M., Melander C and Kjellerup B.V. (2019).** Dispersal and inhibition of biofilms associated with infections. *Journal of Applied Microbiology.*, vol 128, 1279-1288.

Références bibliographiques

Yang D., Zhang Z. (2008). Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum β -lactamases. *Journal of Hospital Infection.*, vol 68, 369-71.

Yannick D.N. T., Hathroubi S., Mario J. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique., vol 78, 110-116.

Zea L., Mclean R.J.C., Rook T.A., Angle G., Carter D.L., Delegard A., Denvir A et Al. (2020). Potential biofilm control strategies for extended spaceflight missions. *Biofilm 2*, 100026, 20p.

Zhang K., Yu L. X C and Wang Y. (2020). Promising Therapeutic Strategies against Microbial Biofilm Challenges. *Front. Cell. Infection. Microbiol.*, vol 10:359.

Zhao Y., Qu Y., Tang J., Chen J and Liu J. (2021). Tea Catechin Inhibits Biofilm Formation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Quality.*, vol 2021, article ID 8873091, 7p.

Annexes

Annexe A : Milieux de culture.

Milieu de culture	Composition	Préparation (1 litre)
Bouillon cœur-cervele (BHIB)	-Extrait cœur-cervele 17,5g. -Peptone pancréatique de gélatine..... 10,0g. -Chlorure de sodium..... 5,0g. -Phosphate disodique 2,5g. -Glucose 2,0g. pH=7,4 +/- 0,2	-Mettre en suspension 37,0g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée. -Agitation à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à dissolution complète. -Répartir dans des tubes et stériliser à l'autoclave à 121°C/15mn.
Bouillon tryptone soja (TSB) additionné de glucose.	-Hydrolysate tryptique de caséine 17,0g. -Peptone de soja 3,0g. -Chlorure de sodium..... 5,0g. -Phosphate dipotassique 2,5g. -Glucose 2,5g. pH=7,3 +/- 0,2	-Dissoudre 36,0g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée. -Rajouter 10g de glucose. -Bien homogénéiser et répartir en tubes, puis stériliser.
Gélose Mueller-Hinton (MH)	-Infusion de viande..... 2,0g. -Hydrolysate acide de caséine..... 17,5g. -Amidon 1,5g. -Agar 17,0g. pH=7,3 +/- 0,1	-Dissoudre 38,0g de poudre dans 1 litre d'eau distillée, puis agiter. -Mettre le flacon dans un bain marie pour bien homogénéiser. -Répartir dans des flacons de 250ml, puis stériliser.
Gélose nutritive (GN)	-Peptone..... 10,0g. -Extrait de viande 3,0g. -Extrait de levure..... 3,0g. -Chlorure de sodium..... 5,0g. -Agar bactériologique..... 18,0g. pH=7,2 +/- 0,2	-Mettre en suspension 28,0g de la poudre dans 1 litre d'eau distillée. -Bien agiter, puis homogénéiser dans un bain marie. -Répartir en petits flacons de 250ml. -Stériliser à l'autoclave.

Annexe B : Solutions et réactifs utilisés.

Eau physiologique 0,9 %

Chlorure de sodium (SCHARLAU)	9g
Eau distillée	1000mL

DMSO à 10%

DMSO pure	10mL
Eau distillée	90mL

Cristal violet (0,1%)

Cristal violet (en poudre)	0,1g
Eau distillée	100mL

Tampon PBS

Chlorure de sodium (NaCl)	4g
Chlorure de potassium (KCl)	0,1g
Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4)	0,72g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	0,12g

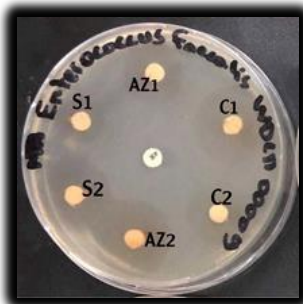
Na_2CO_3 à 20%

Carbonate de sodium (poudre)	20g
Eau distillée	100mL

DPPH

DPPH (poudre)	4mg
Ethanol pure (96%)	100mL

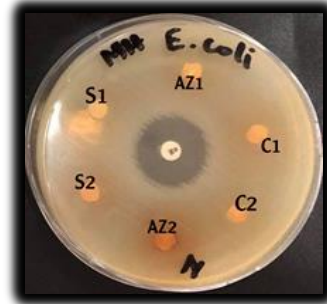
Annexe C : Activité antimicrobienne exercée par les différents extraits bruts de brindilles de l'olivier.



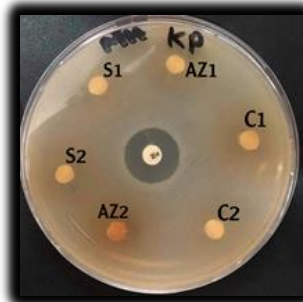
Enterococcus faecalis
WDCM 00009



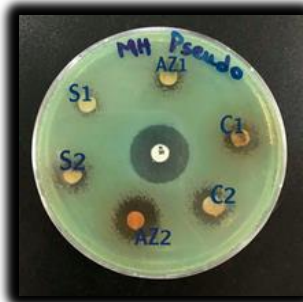
Staphylococcus aureus
ATCC 25923



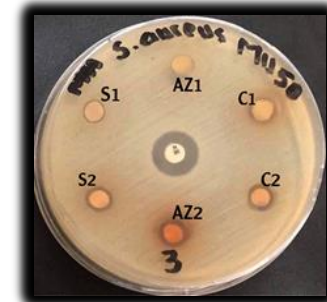
Escherichia coli
ATCC 25922



Klebsiella pneumoniae
ATCC 700603



Pseudomonas aeruginosa
ATCC 27853



Staphylococcus aureus
MU 50



Bacillus cereus (4)



Bacillus licheniformis



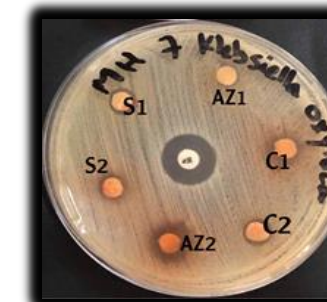
Pseudomonas putida (13B)



Bacillus cereus ATCC 14579



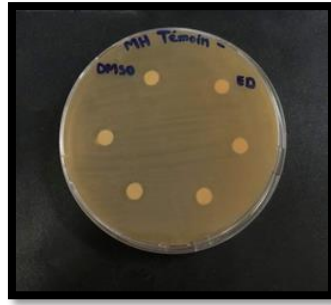
Bacillus cereus (8)



Klebsiella oxytoca (7)

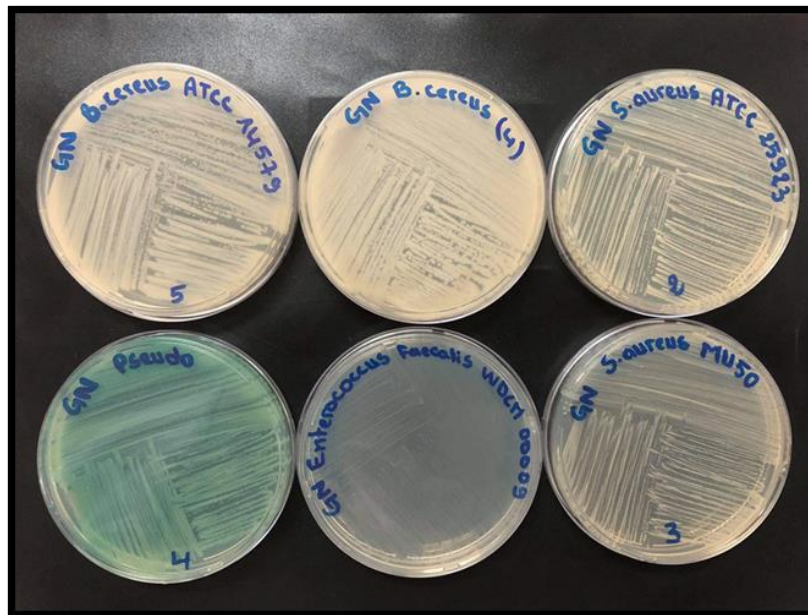
Photographie montrant les zones d'inhibitions exercées par les différents extraits bruts des brindilles de trois variétés de l'olivier vis-à-vis des douze souches testées.

S : variété sauvage AZ : variété Azeradj C : variété Chemlal 1 : site 1 2 : site 2



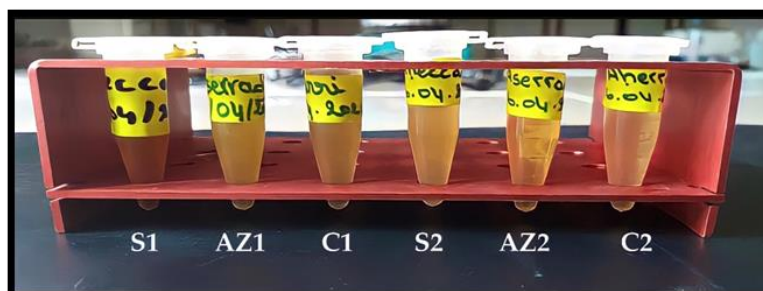
Boite témoin négatif.

Annexe D : Aspect de quelques souches utilisées sur gélose nutritive.



Photographie montrant l'aspect de *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* souche (4), *Enterococcus faecalis* WDCM 00009, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* MU50 sur gélose nutritive après repiquage.

Annexe E : Les différents extraits bruts de brindilles de trois variétés d'olivier.



Photographie montrant l'aspect des extraits bruts.

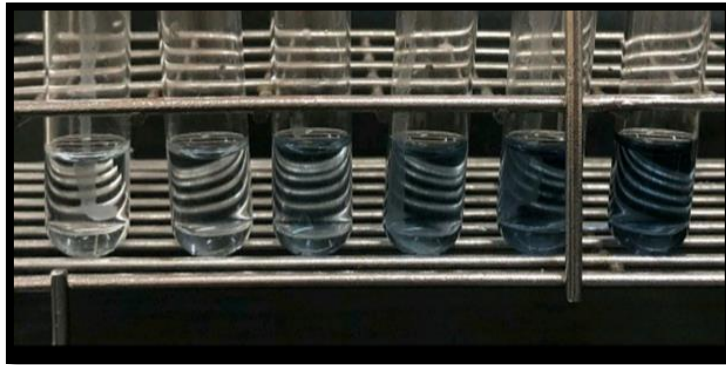
S : variété sauvage **AZ** : variété Azeradj **C** : variété Chemlal **1** : site 1 **2** : site 2

Annexe F : Préparation de la solution d'acide gallique.

Une quantité de 100 mg d'acide gallique pesée à l'aide d'une balance de précision est dissoute dans 100 mL d'eau distillée.

Dans un tube à essai :

- 9 mL d'eau distillée + 1 mL de la solution préparée.
- Homogénéiser à l'aide d'un vortex.

-Préparation de la gamme étalon :

Gamme étalon de l'acide gallique

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution fille (1/20) μ l	0	20	40	60	80	100
E.D. μ l	1000	980	960	920	880	840
Correspondance en mg/L (μ g/ml).	0	1	2	4	6	8