

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE MOULOU MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES
FILIERE DES SCIENCES ALIMENTAIRES

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Spécialité : Agroalimentaire et contrôle de qualité

Thème :

**Evaluation de l'activité anti-biofilm et
antibactériennes des extraits des feuilles
d'olivier et des gousses d'ail**

Réalisé par :

Mlle HAMOUD Ghenima.

Mlle HAMIDCHI Lila.

Devant le jury :

Président : Mr. HOUALI K.

Professeure à l'UMMTO

Encadreur : Mr. MSELA A.

Maitre de conférence B à l'UMMTO

CO-promoteur : Mme LAHCENE S.

Maitre de conférence B à l'UMMTO

Examineur : Mr. MOUALEK I.

Maitre de conférence A à l'UMMTO

Promotion 2021 /2022

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé, le courage et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre encadreur Mr MSEL A A, maitre de conférences à la Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, pour sa patience, sa confiance, ses conseils judicieux, son suivi et ses directives qui nous ont énormément servi pour la concrétisation de ce travail.

Nous remercions également Mr HOUALI K, professeur au département de Biochimie et de Microbiologie de l'UMMTO et directeur du laboratoire LABAB pour son accueil, pour les moyens nécessaires et les conditions favorables mises à notre disposition pour le bon déroulement de notre travail, ainsi que pour l'honneur qu'il nous fait en présidant le jury de notre mémoire.

Nos remerciements également Mr. MOUAL EK I. Pour nous avoir fait l'honneur de contribué par sa participation à l'examination de ce travail.

Nos remerciements également notre Co promoteur Mme LAHCENE qui nous a dirigé durant ce travail avec une grande rigueur scientifique et

Un grand merci à toutes personnes ayant participé de près comme de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apporté leur soutien et leurs encouragements durant la réalisation de ce travail.

Dédicaces

C'est avec un énormes plaisir, un cœur ouvert et une immense joie que je dédie ce modeste travail :

A mes parents Youcef et Ferroudja, pour l'éducation, les valeurs morales et le sens de responsabilité que vous m'avez inculquée. Aucun mot ne pourrait exprimer ma profonde gratitude, le respect et la reconnaissance que j'ai pour vous. Je vous remercie énormément pour votre amour, votre soutien et tous les sacrifices que vous avez consentis pendant mes longues années d'études,

A mes chers sœurs Ouerdia et Melysa, pour leurs encouragements permanent et de m'avoir toujours épaulé,

A toute ma famille, pour leur appui et leur soutien moral,

A tous amis, pour leurs aides et les bons moments passé ensemble et ceux qui suivront,

A ma binôme Lila, je te souhaite toute la réussite et le bonheur que tu mérites,

Que Dieu, le tout puissant vous préserve et vous comble de joie, bonheur, santé et prospérité.

Ghenima

Dédicace

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

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

À ceux qui m'ont fait confiance, qui ont m'ont soutenus sans faille dans tous

mes projets et qui ont toujours accepté mes choix

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

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

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

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

À mes amies, à toute ma famille et ma belle-famille

À mon binôme Ghenima, pour les instants de joie comme de peine partagés, pour le travail

d'équipe dont on a fait preuve afin de concrétiser ce travail. Ce n'était pas facile mais

aujourd'hui on a réussi et je suis fière de nous.

À toutes les personnes qui me connaît

Et à tous la promotion agro-alimentaire et contrôle de qualité

2021/2022

À tout(e)s mes enseignant(e)s de l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou qui ont

tout donné pour transmettre leurs savoirs et qui ont contribué à ma formation.

Lila

ATB : Antibiotique

ATCC : American Type Culture Collection

BHIB : Bouillon Brain Heart Infusion Broth

GN : Gentamycine

CP : Composés Phénoliques

MS : matière sèche

DO : Densité Optique

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

MH : Muller-Hinton

NaCl : Chlorure de Sodium

PH : Potentiel d'hydrogène

UFC : Unité Formant Colonie

AI : Auto-inducteur

EPS : Exopolysaccharides.

QQ : Quorum quenching.

QS : Quorum sensing.

IQS : Inhibiteur du quorum sensing

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

E. coli : *Escherichia coli*

m : Mètre

mm : millimètre

g : Gramme

Kg : Kilogramme

mg : Milligramme

ml : Millilitre

µl : Microlitre

% : pourcentage

° : Degré

EAU : Extraction aux ultrasons

BN : Bouillon Nutritif

CV : Cristal Violet

RCA : Rouge Congo Agar (Red Congo Agar)

ED : Eau Distillé

EDS : Eau Distillé Stérile

ANOVA : Analys of varience

LABAB : Laboratoire de recherche de biochimie analytique et biotechnologie

° C : Degré Celsius

tr : Tour

h : Heure

CIP : Cleaning In Place

DMSO : Di-méthyl Self-oxyde

IAA : Industries Agro-Alimentaire

OMS : Organisation Mondial de La Santé

UE : Union Européen

PIA : Polysaccharide intercellular adhesion

Liste des figures

N° de figure	Titre	N° de page
1.1	Contamination d'un circuit agro-alimentaire (image en microscopie optique de fluorescence d'un biofilm se développant sur de l'inox,	02
1.2	Représentation des différentes étapes de la formation d'un biofilm	04
1.3	Mécanismes du quorum sensing bactérien et des différentes stratégies de quorum quenching	08
1.4	Hypothèses pour expliquer le phénomène de tolérance du biofilm vis-à-vis des biocides (antibiotiques et antiseptiques)	10
1.5	Séquences des événements dans la formation des biofilms sur les surfaces en contact avec les aliments.	11
2.1	Représentation d'olivier <i>Olea europaea</i> : (A) Arbre ;(B) feuilles ; (C) fleurs ;(D) drupes	19
2.2	Présentation d'un arbre d'olivier de Laperrine	20
2.3	Représentation de l'olivier De l'espèce <i>Olea europaea</i>	21
2.4	Distribution du complexe de l'olivier (A) et de l'olivier de Laperrine (B)	22
2.5	Effets biologiques des polyphénols	25
2.6	Structures chimiques de L'oleuropéine	27
2.7	Présentation de l'ail (<i>Allium sativum</i>)	29
2.8	Répartition mondiale de la culture d'ail en 2018 selon l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture	30
2.9	Réactions chimiques dans la gousse d'ail (<i>Allium Sativum</i>)	31
3.1	Récolte et préparation des gousses d'ail, l'olivier de Laperrine (<i>Olea laperrinei</i>) et l'olivier du nord (<i>Olea europeae</i>).	34
3.2	Séchage des feuilles d'Olivier	35
3.3	Broyage des feuilles d'Olivier	35
3.4	Broyage des gousses d'ail	36
3.5	Les étapes de l'extraction aqueuse	36
3.6	Schéma récapitulatif des différentes étapes d'extraction aqueuse et éthanolique	37
3.7	Extraction par ultrason	38
3.8	Revivification des souches conservées dans du glycérol	39

3.9	Contrôle des souches <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 et <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 7803	40
3.10	Contrôle des souches <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	41
3.11	Préparation des suspensions bactériennes	42
3.12	Préparation de l'inoculum (<i>S. aureus</i> ATCC 25923 dans du BHIB + glucose)	43
3.13	Préparation de la série de dilutions	44
3.14	Les étapes de préparation d'un aromatoگرامme (activité antibactérienne)	45
3.15	Préparation des microplaques (activités antibactériennes)	46
3.16	Les étapes de préparation d'un aromatoگرامme (activité anti-biofilm)	47
3.17	Les étapes de préparation des microplaques (activités anti-biofilm)	48
4.1	Représentation graphique de la moyenne des diamètres d'inhibition de l'activité anti-biofilm de l'extrait aqueux de l'olivier de Laperrine sur milieu solide en fonction des concentrations	50
4.2	Représentation graphique des moyennes des diamètres d'inhibition de l'activité anti-biofilm de l'extrait éthanolique de l'olivier de Laperrine sur milieu solide en fonction des concentrations	51
4.3	Représentation graphique des moyennes des diamètres d'inhibition de l'activité anti-biofilm de l'extrait éthanolique de l'olivier du nord sur milieu solide en fonction des concentrations	52
4.4	Représentation graphique des moyennes des diamètres d'inhibition de l'activité anti-biofilm de l'extrait éthanolique de l'ail sur milieu solide en fonction des concentrations.	53
4.5	Représentation graphique des moyennes d'inhibition de la formation du biofilm par l'extrait aqueux de l'olivier de Laperrine sur microplaque en fonction des concentrations	54
4.6	Représentation graphique des moyennes d'inhibition de la formation du biofilm par l'extrait éthanolique de l'olivier de Laperrine sur microplaque en fonction des concentrations	55
4.7	Représentation graphique des moyennes d'inhibition de la formation du biofilm par l'extrait éthanolique de l'olivier du nord sur microplaque en fonction des concentrations	56
4.8	Représentation graphique des moyennes d'inhibition de la formation du biofilm par l'extrait éthanolique de l'ail sur microplaque en fonction des concentrations	57
4.9	Représentation graphique des moyennes des diamètres d'inhibition de l'activité anti-biofilm des extraits bruts sur milieu solide en fonction des synergies	58
4.10	Représentation graphique des moyennes des diamètres d'inhibition de l'activité anti-biofilm des extraits bruts sur microplaque en fonction des synergies	59
4.11	Représentation graphique des moyennes des diamètres d'inhibition de	60

	l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'olivier de Laperrine sur milieux solide en fonction des souches bactériennes	
4.12	Représentation graphique des moyennes des diamètres d'inhibition de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de l'olivier de Laperrine sur milieux solide en fonction des souches bactériennes	61
4.13	Représentation graphique des moyennes des diamètres d'inhibition de l'activité antibactérienne en fonction des différents extraits et antibiotiques	63

Liste des tableaux

N° de tableau	Titre	N° de page
1.1	Facteurs et propriétés impliqués dans la formation des biofilms	06
2.1	Classification d'olivier de Laperrine	20
2.2	Classification botanique d' <i>Olea europaea</i> var <i>europaea</i>	21
2.3	Composition chimique globale des feuilles d'olivier (exprimé en g/100 g de matière fraîche).	22
2.4	Activités biologiques des feuilles de l'olivier (<i>Olea europaea</i> L.)	23
2.5	Principales méthodes d'extraction des polyphénols.	26
2.6	Effets bénéfiques de l'oleuropéine.	27
2.7	Classification botanique de l'ail	29
3.1	Concentration des différents extraits	44
4.1	Vérification de la capacité des souches à former un biofilm sur microplaque	49
4.2	Résultats de l'activité anti-biofilm de l'Olivier de Laperrine extrait aqueux sur <i>S. aureus</i> sur milieux solide	49
4.3	Résultats de l'activité anti-biofilm de l'Olivier de Laperrine extrait éthanolique sur <i>S. aureus</i> sur milieux solide	50
4.4	Résultats de l'activité anti-biofilm de l'Olivier du Nord extrait éthanolique sur <i>S. aureus</i> milieux solide	51
4.5	Résultats de l'activité anti-biofilm de l'Ail extrait éthanolique sur <i>S. aureus</i> sur milieux solide	52
4.6	Résultats de l'activité anti-biofilm de l'Olivier de Laperrine extrait aqueux sur <i>S. aureus</i> sur microplaque	53
4.7	Résultats de l'activité anti-biofilm de l'Olivier de Laperrine extrait éthanolique sur <i>S. aureus</i> sur microplaque	54

4.8	Résultats de l'activité anti-biofilm de l'Olivier du Nord sur <i>S. aureus</i> sur microplaque	55
4.9	Résultats de l'activité anti-biofilm de l'ail sur <i>S. aureus</i> sur microplaque	56
4.10	Résultats des Tests de synergies sur milieux solide	57
4.11	Tests de synergies sur microplaque	58
4.12	Résultats de l'activité antibactérienne de l'Olivier de Laperrine extrait aqueux sur trois souche bactérienne milieux solide	59
4.13	Résultats de l'activité antibactérienne de l'Olivier de Laperrine extrait éthanolique sur trois souches sur milieux solide	60
4.14	Résultats de l'activité antibactérienne de l'Olivier de Laperrine extrait aqueux et éthanolique sur trois souches sur microplaque	62
4.15	Résultats de comparaison entre les activités antibactérienne des différents extraits et antibiotiques	62

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....01

Chapitre I : Biofilms bactériens

I.1 Historique.....02

I.2 Définition.....02

I.3 Composition d'un biofilm.....03

 I.3.1 Microorganismes.....03

 I.3.2 La matrice.....03

I.4 Organisation d'un biofilm.....04

I.5 Mécanisme de formation de biofilms.....04

 I.5.1 Adhésion réversible.....04

 I.5.2 Adhésion irréversible.....05

 I.5.3 Formation des micro-colonies et Maturation du biofilm.....05

 I.5.4 Dispersion.....06

I.6 Facteurs favorisant la formation d'un biofilm.....06

I.7 Régulation de la formation des biofilms.....07

 I.7.1 Quorum sensing (QS).....07

 I.7.2 Quorum quenching (QQ).....07

I.8 Résistance aux antibiotiques.....08

 I.8.1 Définition.....08

 I.8.2 L'antibiorésistance des biofilms.....09

I.9 Les biofilms en industries agroalimentaires.....	10
I.9 .1 Impacte des biofilms sur l’industrie.....	11
I.9 .2 Risque sur la santé humaine.....	13
I.9 .3Résidus de produits chimiques dans l’aliment.....	14
I. 9. 3 .1 Résidus des produits de nettoyage et de désinfection.....	14
I. 9. 3. 2 Résidus d’antibiotiques.....	15
I. 10 Perspectives d’utilisation des extraits de plantes.....	15
I. 10.1 Dans la désinfection des industries agroalimentaires.....	15
I. 10.2 Alternative d’utilisation des antibiotiques.....	16
I.11 Caractérisation des activités anti-biofilms et antibactériens des extraits de plantes.....	17

Chapitre II : Plantes médicinales

Partie I : olivier

II.1. Historique.....	18
II.2. Caractéristiques générale sur l’olivier	18
II.3. Description de l’olivier.....	19
II.3.1. <i>Olea europaea subssp laperrinei</i>	19
II.3.1.1. Taxonomie.....	20
II.3.2. <i>Olea europaea subssp europaea (sativa)</i>	20
II.3.2.1. Taxonomie.....	21
II.4. Localisation géographique.....	21
II.5.Composition chimique des feuilles.....	22
II.6. Les principales propriétés pharmacologiques des feuilles de l’olivier.....	23
II.6.1. Propriétés antimicrobiennes.....	23

II.7. Domaines d'utilisation des feuilles d'olivier.....	24
II.7.1. Domaine pharmaceutique.....	24
II.7.2. Industries Alimentaires.....	24
II.8. Les composés phénoliques d'olivier et leur intérêt.....	24
II.8.1. Principales voies de biosynthèse des composés phénoliques.....	25
II.8.2. Techniques d'extraction des polyphénols.....	25
II.9 Composés phénoliques des feuilles d'olivier.....	26
II.9.1 Monomères phénoliques.....	27
II.9.2 Polymères phénoliques.....	27
II.9.3 L'oleuropéine.....	27

Partie 2 : L'ail

II.1 Historique.....	28
II.2 Description.....	28
II.3 Taxonomie.....	29
II.4 La répartition géographique.....	29
II.5 Composition.....	30
II.6 Principes actifs de l'ail.....	30
II.7 Effets thérapeutiques de l'ail.....	31
II.7.1 Effet antimicrobien.....	32
II.7.2. L'ail dans l'industrie agroalimentaire.....	32

Chapitre III : Matériels et méthodes

III.1. Problématique et objectifs.....	33
III.2. Matériels et méthodes.....	33
III.2.1. Réalisation des extractions.....	34
III.2.1.1 Matériel végétal.....	34
III.2.1.1.1 La récolte.....	34

III.2.1.1.2 Séchage des feuilles.....	34
III.2.1.1.3 Broyage et conservation.....	35
a. Les feuilles d'oliviers.....	35
b. L'ail.....	35
III.2.1.1.4 Méthode d'extraction des extraits bruts.....	36
a. Olivier de Laperrine.....	36
b. Olivier de nord et l'ail.....	37
III.2.1.2 Teste de l'activité antibactérienne et anti-biofilm.....	39
III.3.2 Préparation des Souches microbiennes.....	39
III.3.2.1 Revivification des souches bactériennes.....	39
III.3.2.2 Contrôle des souches microbiennes.....	40
III.3.3 Préparation des inoculas.....	42
III.3.3.1 Préparation de l'inoculum pour l'aromatogramme.....	42
III.3.3.1 Préparation de l'inoculum pour la microplaque.....	42
III.3.4 Préparation des dilutions.....	43
III.3.5 Étude de l'Activités antibactériennes des extraits bruts.....	44
III.3.5.1 Étude de l'Activités antibactériennes des extraits bruts sur gélose (Aromatogramme).....	44
III.3.5.2 Étude de l'Activités antimicrobiennes des extraits bruts sur micro- plaque.....	45
III.3.6 Activités anti-biofilm des extraits bruts.....	46
III.3.6.1 Activités anti-biofilm des extraits bruts sur gélose (aromatogramme).....	46
III.3.6.2 Activités anti-biofilm des extraits bruts sur microplaques.....	47
III.3.6.2.1 Ensemencement de la microplaque.....	47

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1 Résultat du contrôle de la capacité des souches à former un biofilm.....	49
---	----

IV.1.1 sur milieux solide (gélose).....	49
IV.1.2 Sur milieu liquide (microplaque).....	49
IV.2 Résultats du Test anti-biofilm sur milieux solide pour S. aureus.....	49
IV.2.1 Olivier de Laperrine.....	49
IV.2.1.1 Extrait aqueux.....	49
IV.2.1.2 Extrait éthanolique.....	50
IV.2.2 Olivier du nord.....	51
IV.2.3 Extrait d'ail.....	52
IV.3 Résultats du Test anti-biofilm sur microplaque.....	53
IV.3.1 Olivier de Laperrine.....	53
IV.3.1.1 Extrait aqueux.....	53
IV.3.1.2 Extrait éthanolique.....	54
IV.3.2 Olivier du Nord.....	55
IV.3.3 L'ail.....	56
IV.4 Résultats des Tests de synergies.....	57
IV.4.1 Sur milieu solide.....	57
IV.4.2 Sur microplaque.....	58
IV.5 Résultats du Test antibactérien sur trois souches bactériennes sur milieux solide.....	59
IV.5.1 Olivier de Laperrine.....	59
IV.5.1.1 Extrait aqueux.....	59
IV.5.1.2 Extrait éthanolique.....	60
IV.6 Résultats du Test antibactérien sur trois souches bactériennes sur microplaque.....	61
IV.8 Comparaison entre les différents extraits et antibiotiques.....	62
Discussion.....	64
Conclusion.....	71
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

Introduction

Introduction

Introduction :

Les plantes médicinales constituent la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire, cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive. Les plantes peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes dotées souvent d'activité biologique potentielle (Scognamiglio, 2012 ; Di Donna, 2010).

Aujourd'hui, d'une part la résistance des microorganismes aux antibiotiques est l'une des préoccupations majeures de la santé publique. A titre d'exemple *Staphylococcus aureus*, principal agent pathogène impliqué dans les infections nosocomiales, a acquis de nombreux mécanismes de résistances aux antibiotiques dès les années 1960 (Vieu, 2014).

D'autre part, la structure spécifique des biofilms fournit un haut niveau de résistance aux antibiotiques, aux désinfectants et aux détergents (Costerton et al., 1999 ; Stewart et

Closteron, 2001 ; Stewart et Franklin, 2008). Les bactéries englobées dans les biofilms sont plus résistantes à l'action des agents biocides que les bactéries planctoniques (Ceri et al., 1999).

De ce fait, la recherche de nouvelles substances ayant des effets antimicrobiens devient une nécessité majeure. Pour cela, la phytothérapie constitue une solution intéressante. Plusieurs plantes médicinales sont utilisées dans ce but (Kahlouche-Riachi, 2014).

Ces dix dernières années, le recours à la médecine traditionnelle s'est répandu partout dans le monde et a gagné une popularité importante. Non seulement les populations des pays en développement y ont accès mais aussi ceux des pays où la biomédecine occupe une grande place dans les systèmes de santé (OMS, 2003).

Dans ce contexte, notre travail a pour but l'évaluation l'activité anti-biofilm et antibactérienne de l'extrait des feuilles d'olivier de Laperrine (*Olea laperrinei*), l'olivier du nord (*Olea europaea*) et des gousses d'ail (*Allium sativum*), par deux méthodes : diffusion sur gélose et sur microplaque.

Toute en espérant que ces substances bioactives soit utilisé non seulement dans le domaine médical mais aussi dans le domaine agroalimentaire ou le problème de résidus présente un réel danger pour la santé humaine.

Chapitre I :

Biofilms bactériens

Chapitre I

I.1 Historique

Le biofilm, décrit pour la première fois en 1683 par van Leeuwenhoek, selon lequel les micro-organismes se fixent et se développent universellement sur les surfaces exposées, ce qui a conduit à des études qui ont révélé que les micro-organismes associés à des surfaces (biofilms) présentaient un phénotype distinct (**Donlan, 2002 ; Roux et Chigo, 2006**).

De plus , en **1973 Characklis** a étudié les boues microbiennes dans les systèmes d'eau industriels et a montré qu'elles étaient très tenace et très résistantes aux désinfectants tels que le chlore, puis en **1978 Costerton et al** ont présenté une théorie des biofilms qui expliquait les mécanismes par lesquels les micro-organismes adhèrent aux matériaux vivants et non vivants et les avantages accrus par cette niche écologique (**Branger et al., 2007 ; Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; Kara Terki, 2014**).

Enfin, dans les années **1980**, les travaux de **william Costerton** mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobés dans une matrice extracellulaire. Ces populations présentes dans tout les environnements et associées à des surfaces minérales végétales ou animales, sont appelées "biofilms" (**Roux et Ghigo, 2006**).

I.2 Définition d'un biofilm

Les biofilms bactériens sont ubiquitaires du fait qu'ils concernent le monde animal, végétal, humain et environnemental. Ils présentent souvent une architecture complexe, très variable d'un biofilm à l'autre selon les bactéries qui le composent et les conditions environnementales (Teneur en oxygène, nutriments, pH...) (**Roux et Ghigo, 2006**). C'est une stratégie de survie des microorganismes face aux stresses environnementaux négatifs (**Yiying, 2020**) (**Figure 1. 1**).

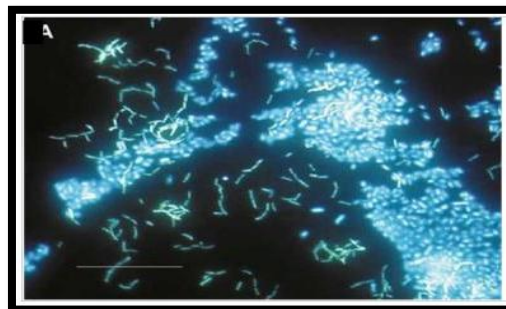


Figure 1. 1 : Contamination d'un circuit agro-alimentaire (image en microscopie optique de fluorescence d'un biofilm se développant sur de l'inox, **Murga et Donlan, 2001**)

I.3 Composition d'un biofilm

Le biofilm est constitué essentiellement de microorganismes et de la matrice que ces derniers synthétisent. Les microorganismes représentent 2 à 5 % de la matrice du biofilm selon l'espèce impliquée tandis que la matrice extracellulaire représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée du biofilm (**Bellifa, 2014**).

I.3.1. Les microorganismes

Un biofilm est composé de communautés complexes des bactéries au sein desquelles on peut trouver des multiples espèces attachées à différents matériels (**Akbas, 2015**), capables de survivre aux agressions extérieures (agents anti-infectieux, déshydratation, ...) et de maintenir ainsi des formes viables (**Ceri et al., 1999**).

Les biofilms naturels sont souvent composés de nombreux types de microorganismes : bactéries, protozoaires, algues, mycètes, chaque groupe exécutant des fonctions métaboliques spécialisées (**Branger et al., 2007 ; Alnnasouri, 2010**). Seuls quelques biofilms sont composés d'un seul type de microorganisme. Ce phénomène est lié aux conditions environnantes, plus souvent qu'à la nature même des microorganismes (**Branger et al., 2007**).

I.3.2. La matrice

La matrice est un environnement dynamique dans lequel les cellules microbiennes sont organisées, elle est composée principalement de :

- L'eau : demeure le principal composant du biofilm ;
- Des Exo polysaccharides (EPS) il représente jusqu'à 85% de la masse totale ;
- Débris cellulaires (protéines, acides nucléiques) ;
- Déchets du métabolisme cellulaire ;
- Débris issus des matières en contact avec les surfaces (**Branger et al., 2007 ; Bellifa, 2014**).

La matrice assure les interactions intracellulaires et joue un rôle majeur dans l'hydratation (**Vanzieleghem et Delmée, 2020**) et les propriétés de résistance aux biocides (**Donlan et Costerton, 2002 ; Donlan, 2002**).

I.4. Organisation d'un biofilm

Les microorganismes sont organisés à l'intérieur de la matrice sous forme de micro-colonies ; ces dernières, au sein des biofilms, elles sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm, et d'autre part d'évacuer les déchets (**Branger et al., 2007**).

Le biofilm n'est pas un environnement homogène, car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments, (qui présentent des valeurs de pH différents), les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (**Roux et Ghigo, 2006**).

I.5 Mécanisme de formation d'un biofilm bactérien

Les mécanismes employés par les différentes espèces bactériennes pour la formation des biofilms se déroulent en quatre principales étapes (**Boudarale, 2018**).

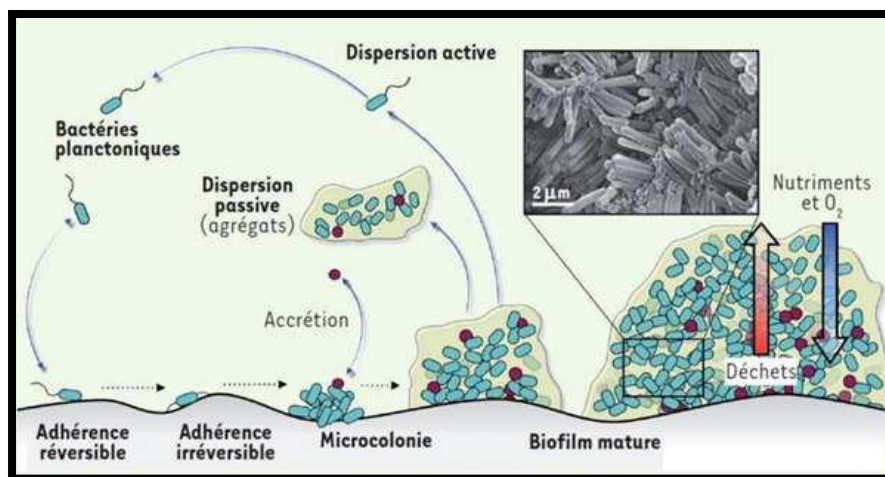


Figure 1. 2 : Représentation des différentes étapes de la formation d'un biofilm (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

I.5.1 L'adhésion réversible

L'adhésion réversible (temporaire et faible) ; initial, est l'étape d'adhésion où l'attachement des bactéries sur une surface grâce aux forces gravitationnelles, mouvement Brownien et forces hydrodynamiques qui font que les cellules grâce à leurs appendices (pilis, flagelles, fimbriae) s'attachent au support (**Goel et al., 2021**). La nature de l'attachement dépend des caractéristiques physico-chimiques du support (température, pH, disponibilité des

nutriments...) (**El-Tarabily et al., 2021**). Etant donné que les bactéries sont généralement chargées négativement, elles ont tendance à coloniser des surfaces de charges positives (**Ruhal et Kataria, 2021**). Dans cette phase d'adhésion, les bactéries peuvent être facilement éliminées, ce qui démontre que l'attachement est crucial dans le développement du biofilm (**Anand et al., 2014**).

I.5.2 L'adhésion irréversible

Dans cette étape, les interactions entre les cellules et les surfaces deviennent permanentes des gènes codant pour des protéines d'adhésion (adhésines) sont exprimés tandis que ceux qui codent pour les flagellines sont réprimés afin que les cellules deviennent immobiles et commencent donc à se multiplier et forment des petites agrégats (**Geol et al., 2021**). Avec la présence d'une matrice EPS qui lorsqu'elle atteint une certaine épaisseur solidifie le biofilm de sorte que sa destruction nécessitera un vigoureux lavage (brossage, raclage) (**Srey et al., 2013**).

Cette adhésion stable est rendue possible grâce à la sécrétion de polymères extracellulaires qui vont former des ponts de fixation entre la cellule et la surface ou entre deux cellules (**Van Houdt et al., 2005**).

Pour l'adhésion des bactéries gram négatives, seront impliqués les pilis, les curlis, les capsules et le glycocalyx. Quant à l'adhésion des bactéries gram positives ce sont les acides téichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalyx qui sont impliqués (**Van Houdt et al., 2005**).

I.5.3 Formation des micro-colonies et Maturation du biofilm

La maturation du biofilm consiste en premier lieu en la surproduction d'EPS constitués principalement d'eau avec de petites quantités de protéines, lipides, ADN, polysaccharide... dont le rôle est de protéger le biofilm de la dessiccation avec des canaux de transport d'eau et de nutriments ; en deuxième lieu en la communication entre cellules via le QS (quorum sensing) (**El-Tarabily et al., 2021**).

Le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à la formation d'un film hétérogène tridimensionnel composé de trois couches de cellules (**Alnnasouri, 2010**).

La première couche représente la structure initiale régulatrice qui couvre le support occupé par des bactéries métaboliquement peu actives en raison de l'accès difficile aux

nutriments et à l’oxygène mais se trouve davantage protégées des agressions extérieures, la deuxième couche est une couche intermédiaire et la troisième constitue les cellules planctoniques qui sont en mode de division active et accèdent plus facilement aux nutriments et à l’oxygène. Le biofilm mature est doté d’une grande pathogénicité aidant à augmenter sa résistance aux antibiotiques (Zhao et al., 2017).

I.5.4 Dispersion du biofilm

Lorsque la densité bactérienne sur une surface devient très élevée, des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant et retournent à l’état planctonique (Kaplan, 2010). La dispersion représente la dernière étape du cycle de formation d’un biofilm et elle est spontanée lorsque le support vieillit et les conditions ne sont plus favorable ou lors d’une grande prolifération microbienne (Rohatgi et Gupta, 2021).

La dispersion passe par trois phases : l’érosion du substrat, la desquamation et l’abrasion (Brindhadevi et al., 2020). Des gènes codants pour des enzymes telles que la lyse sont exprimés durant ces phases permettant ainsi aux cellules de reprendre leurs formes planctoniques et de former à nouveau des biofilms (Goel et al., 2021).

I.6 Les facteurs favorisant la formation d’un biofilm

La formation d’un biofilm est un phénomène complexe, sous l’influence de nombreux facteurs parmi lesquels : la surface, le milieu et les microorganismes (Branger et al., 2007), sont résumés dans le **tableau 1. 1**

Tableau 1.1 : Facteurs et propriétés impliqués dans la formation des biofilms (Chalvet, 2009).

Propriétés du support	Propriétés du milieu aqueux environnant	Propriétés des cellules
Texture, rugosité, présence d’aspérités	Vitesse du flux, présence d’un flux laminaire ou non	Hydrophobicité de la surface des cellules
Hydrophobicité	pH	Présence de flagelles, fimbriae, pili, ...
Présence préalable d’un film protéique recouvrant la surface	Température	
	<ul style="list-style-type: none"> • Cation (Ca²⁺ , Na²⁺ , Fe³⁺ ...) • Fer, nutriments 	Rôle de structures polymériques

	<ul style="list-style-type: none"> • Sources de carbone disponibles • Disponibilité du milieu en oxygène 	extracellulaires d'EPS
	Présence d'agents antimicrobiens	

I.7 Régulation de la formation des biofilms

I.7.1 Quorum sensing (QS)

Au début du XXI^e siècle, le quorum sensing (QS) a été identifié chez de nombreuses bactéries à gram positif et négatives comme un mode de communication et de perception fondé sur la production de petites molécules, qui peuvent se diffuser à travers la membrane ou être transportés à l'extérieur de la cellule (**Mion et al., 2019**).

Le QS, repose sur la production de petites molécules médiatrices de type hormonal appelés auto inducteur (AI), produites au cours de la croissance bactérienne. Lorsque la concentration des AI atteint un seuil critique dans le milieu, ceux-ci pénètrent dans la cellule et interagissent avec un régulateur transcriptionnel qui permet l'expression de gènes spécifiques en réponse à la forte concentration de cet AI (**Waters et Bassler, 2005 ; Czajkowski et Jafra, 2009**).

Les bactéries gram négatives pathogènes pour l'homme et les plantes, y compris les entérobactéries, *pseudomonas*, *Yersinei*, utilisent le métabolisme QS pour la régulation de la synthèse des facteurs de virulences. Tandis que les bactéries gram positives ont développées des systèmes de communications intercellulaires également. Les bactéries des genres *Bacillus* *Enterococcus*, *Staphylococcus* exploitent les QS pour développer une compétence génétique, produire des peptides antimicrobiens ou des exotoxines et former des biofilms (**Czajkowski et Jafra, 2009**).

Le mécanisme de QS bactérien est basé sur deux groupes de molécules de signalisation : les dérivés peptidiques typique des bactéries gram positives et dérivés d'acide gras exploité par les bactéries gram négatives (**Czajkowski et Jafra, 2009**) (**Figure 1. 3**).

I.7.2 Quorum quenching (QQ)

L'altération des mécanismes du QS peut aboutir à d'importantes modifications phénotypiques des micro-organismes du biofilm, par exemple une sensibilité augmentée à des antibiotiques ou à des antiseptiques, ou encore des anomalies dans le cycle de développement du biofilm, surtout lors des étapes de formation et de dispersion (**Irie, 2008**).

Le phénomène de QQ consiste en la dégradation enzymatique des molécules de signalisation du système de détection du quorum afin d'éviter leur accumulation dans l'environnement et d'inhiber la modification de l'expression génétique. Ces enzymes, grâce à l'inhibition de la production d'AI, sont capables d'empêcher la production de facteurs de virulences, notamment les biofilms produits par des bactéries résistantes aux médicaments (Paluch *et al.*, 2020).

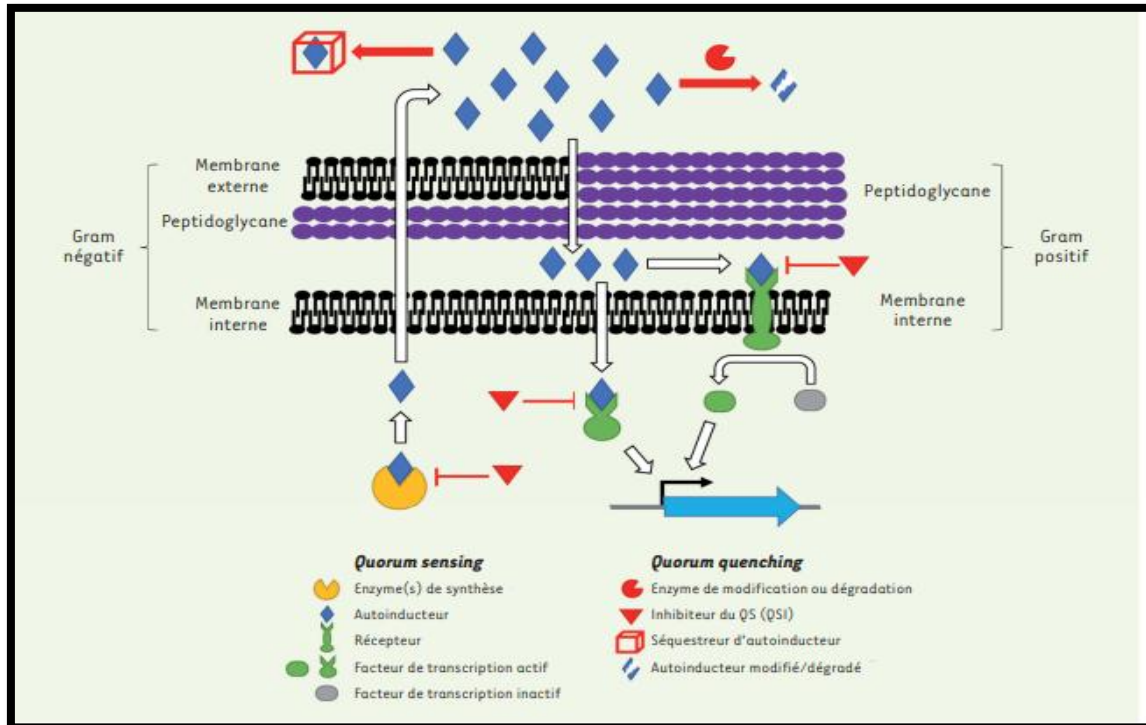


Figure 1. 3 : Mécanismes du quorum sensing bactérien et des différentes stratégies de quorum quenching. (Mion *et al.*, 2019).

I.8 Résistance aux antibiotiques

I.8.1 Définition

Une souche est dite résistante lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (Haskouri, 2002).

On distingue deux types de résistance bactérienne :

❖ Naturelle

Cette résistance est propre à un groupe bactérien. Par exemple, la résistance à la vancomycine d'*Escherichia coli* (*E.coli*). (Coyle, 2005 ; Hemaiswarya *et al.*, 2008).

❖ **Acquise**

Aujourd'hui, l'évolution de la résistance bactérienne acquise aux antibiotiques se concrétise par des taux élevés de multirésistance de certaines espèces bactériennes qui étaient sensibles à l'origine, espèces plutôt impliquées dans les infections acquises à l'hôpital comme *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) mais aussi espèces bactériennes plutôt responsables d'infections communautaires comme *Streptococcus pneumoniae* (Bingen, 2003).

I.8.2 L'antibiorésistance des biofilms

Les biofilms retrouvés dans des environnements naturels ou industriels sont résistants aux macrophages, aux antibiotiques, ainsi qu'aux biocides utilisés dans les procédés industriels (Costerton et al., 1999).

Les concentrations d'antibiotiques nécessaires pour inhiber les bactéries au sein d'un biofilm peuvent être 10 à 1000 fois plus élevées que celles utilisées pour inhiber les mêmes bactéries à l'état planctonique (Mario et al., 2013). Plusieurs facteurs peuvent expliquer la plus grande résistance (certains auteurs préfèrent parler d'une tolérance) des biofilms aux agents antimicrobiens (Hall-Stoodley et al., 2009 ; Anderson et al., 2008 ; Ceri et al., 2010).

Un de ces facteurs est la matrice polymérique qui agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens. Les charges électrostatiques à la surface de la matrice polymérique peuvent aussi lier certains agents antimicrobiens. Le métabolisme des bactéries d'un biofilm joue également un rôle très important. Étant donné que la faible concentration de certains nutriments et le gradient en oxygène, certaines cellules du biofilm seront peu actives métaboliquement et pourront être même sous forme dormante ; ces cellules bactériennes dormantes sont d'ailleurs probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms (Lewis, 2008). La proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise probablement le transfert horizontal de gènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques (Lewis, 2008).

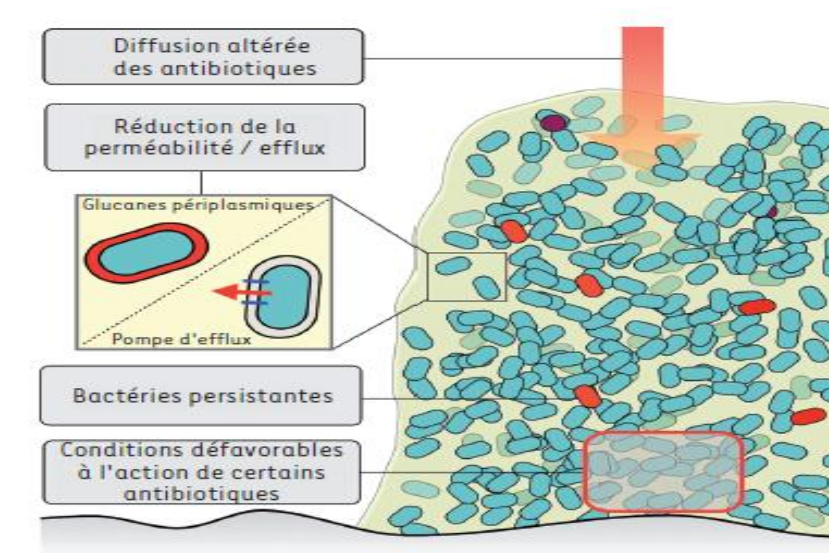


Figure 1. 4 : Hypothèses pour expliquer le phénomène de tolérance du biofilm vis-à-vis des biocides (antibiotiques et antiseptiques) (Lebeaux et Ghigo, 2012).

I.9 Les biofilms en industries agroalimentaires (IAA)

La formation d'un biofilm est un phénomène naturel, retrouvé dans d'innombrables niches écologiques. Ce phénomène va donc interférer avec de nombreuses activités humaines. La formation des biofilms peut avoir des conséquences néfastes, tant sur les activités dans le domaine industriel et la santé humaine (Srey et al., 2013).

L'étude des biofilms dans le milieu des industries agroalimentaires (IAA) relève, pour une grande part, du domaine de la sécurité sanitaire des aliments. Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, y compris les secteurs des produits laitiers sont remis en cause par le problème des biofilms (Srey et al., 2013). Ces derniers causent des pertes économiques dues à la détérioration des aliments et des équipements, la perte de la qualité organoleptique et sanitaire des produits alimentaires finaux ainsi que la diminution de leur durée de conservation, ils affectent le processus chimique impliqué dans la production (Simoes et al., 2010 ; Dzianch et al., 2019). Ils peuvent aussi induire à la corrosion des surfaces métalliques (INOX en industrie alimentaire) et réduire l'efficacité des appareils par diminution de transfert de chaleur dans les échangeurs thermique (Chmielewski et Frank, 2003 ; Simoes et al., 2010).

L'environnement agroalimentaire fournit des conditions particulières favorisant l'installation de biofilms comme l'humidité et la présence de matière organique (nutriments) (Bower et al., 1996). Parmi les agents pathogènes, *S. aureus* est le plus isolé des surfaces de l'IAA, où il peut adhérer et former des biofilms (Jeronimo et al., 2012). La persistance de ces

derniers dans le milieu agroalimentaire peut causer de graves problèmes d'intoxications dues à la présence de souches entérotoxigènes dans les aliments (Normanno *et al.*, 2007).

Les biofilms sont classés en deux catégories, biofilms de procédés qui se forment par contact directe des produits et biofilms environnementaux qui se forment dans le milieu environnant (murs, plafonds) lors de la transformation des aliments (Teh *et al.*, 2015).

Les biofilms dans les IAA constituent des modèles particuliers qui ne correspondent pas complètement aux modèles de biofilms établis sur la base des observations faites dans les écosystèmes naturels (Chmielewski *et Frank*, 2003). Ceux-ci sont reconnus se former en réponse aux stress environnementaux qui sévissent généralement dans les milieux naturels, notamment le déficit nutritionnel (Costerton *et al.*, 1999). Les principes à la base de ces biofilms ne peuvent donc pas être appliqués aux systèmes des IAA caractérisées par la richesse en nutriments. D'autant plus que l'impact des conditions des processus technologiques de transformation des aliments sur le développement des biofilms doit également être pris en considération (Chmielewski *et Frank*, 2003). Dans certains modèles développés pour les systèmes de transformation des aliments (Shi *et Zhu*, 2009), l'étape constituée par les traitements de nettoyage/désinfection est inclus dans le cycle de formation du biofilm.

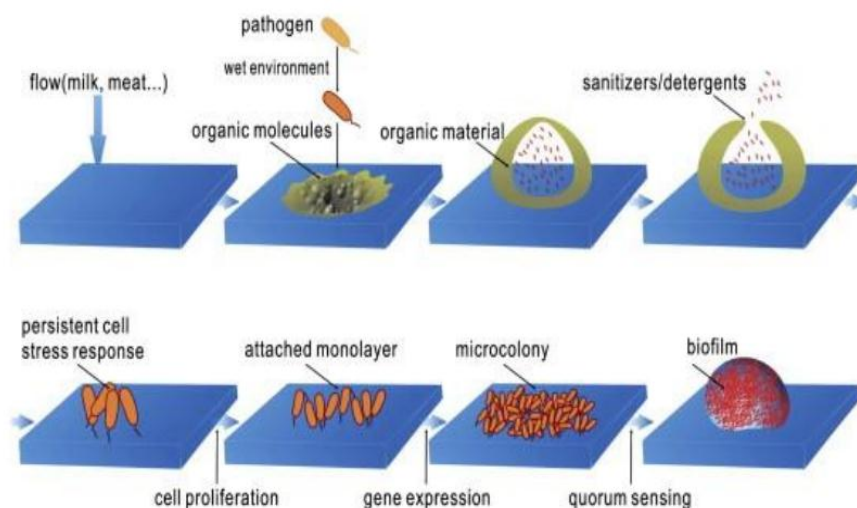


Figure 1. 5 : Séquences des événements dans la formation des biofilms sur les surfaces en contact avec les aliments. (Shi *et Zhu*, 2009).

I.9.1 Impacte des biofilms sur l'industrie

Les biofilms sont la source de nombreux problèmes dans les IAA, en termes d'hygiène et d'altération des qualités organoleptiques des produits alimentaires. Ils sont présents dans tous les secteurs : laiteries, brasseries, meuneries, sucreries, salaisonneries, etc. (Jeyasekaran *et al.*,

2000). Ils causent à l'industrie alimentaire des pertes annuelles de plusieurs millions de dollars (Brook et Flint, 2008). Des biofilms peuvent aussi se développer dans les réseaux d'alimentation en eau potable et dans les systèmes de climatisation, en particulier par la bactérie *Legionella pneumophila*, est également un problème majeur car l'ajout de chlore ne permet pas d'éliminer les bactéries fixées. La présence de biofilms dans les canalisations peut être à l'origine de la détérioration de la qualité organoleptique et microbiologique de l'eau (Paquin et al., 1992). La formation des biofilms sur les métaux peut également engendrer des problèmes de corrosion. En effet, associés à des surfaces métalliques, les biofilms de bactéries anaérobies sont à l'origine de réactions chimiques corrosives, susceptibles d'endommager, d'obturer et de contaminer durablement les systèmes de circulation de fluides (Roux et Ghigo, 2006).

De plus, le contact des communautés microbiennes avec la surface des produits alimentaires augmente la probabilité que les cellules adhèrent de manière irréversible et restent même dans les surfaces après l'assainissement. C'est l'une des principales raisons de la formation de biofilm sur les surfaces en contact avec les aliments. Par exemple en industrie laitière, les biofilms microbiens sont la principale source de contamination du lait et des produits laitiers. Le développement de biofilms sur les équipements laitiers est très rapide (8-12 h), avec un nombre souvent supérieur à 10^6 bactérie/cm² (Bremer et al., 2009) ce qui engendre de graves problèmes tels que l'entrave du flux de chaleur au travers des surfaces d'acier (zones de refroidissement par exemple), l'augmentation de la résistance par frottement du liquide à la surface (diminution de l'entrefer) ainsi que l'augmentation du taux de corrosion des surfaces conduisant à des pertes d'énergie, de production et requiert potentiellement de nouveaux investissements. L'un des groupes les plus communs de microorganismes formant des biofilms sur les équipements laitiers est la flore bactérienne aérobie sporulée thermophiles. La persistance de ce groupe de contaminants bactériens dans l'environnement laitier, est attribuée à la résistance de leurs biofilms aux agents chimiques du nettoyage / désinfection (Benkhaldi, 2017).

En raison de leur résistance au traitement thermique et aux agents antimicrobiens, les biofilms posent également des problèmes dans de nombreux secteurs industriels et plus particulièrement dans l'environnement laitier où ils sont difficiles à éliminer même avec des procédures de nettoyage et de désinfection acceptables (Bore et Langsrud, 2005 ; Bremer et al., 2006 ; Brooks et Flint, 2008). En outre il a été montré (Le Gentil et al., 2010), que la ré-adhésion des bactéries à la surface des équipements du système de canalisation du lait survient même durant le nettoyage en place (CIP : cleaning-in-place). Dans ce domaine-là, l'émergence

de la résistance des biofilms aux traitements antimicrobiens conventionnels est également soulignée (Chmielewski et Frank, 2003 ; Murthy et Venkatesan, 2008 ; Vlakova et al., 2008 ; Shi et Zhu, 2009 ; Simoes et al., 2010).

I.9.2 Risque sur la santé humaine

Les biofilms ont un impact important sur la santé. En effet, s'il est classiquement considéré que les infections aiguës sont dues au mode planctonique, les infections chroniques seraient principalement liées au mode de vie sessile (Amara et al., 2018 ; Zykwiniska et al., 2016).

L'une des principales caractéristiques des organismes en biofilm est leur faible susceptibilité face aux anti-infectieux comparé aux microorganismes en mode planctonique (Bjarnsholt, 2013). Plusieurs mécanismes permettent de l'expliquer (Tolker-Nielsen, 2014).

- Faible pénétration des molécules à l'intérieur du biofilm, liée aux propriétés physico-chimiques de la matrice extra-cellulaire
- Différents stades métaboliques à l'intérieur du biofilm, notamment métabolismes altérés
- Présence de cellules persistantes
- Surexpression de mécanismes de résistance et de gènes spécifiques
- Tolérance à la phagocytose et au système immunitaire

Les infections à biofilm posent ainsi d'importants problèmes thérapeutiques, mais également des problèmes de diagnostic, car les techniques classiques de microbiologie sont principalement adaptées au mode de vie planctonique (Bjarnsholt, 2013 ; Burmølle et al., 2010). Ces infections peuvent être de divers types et être à la base de pathologies variées, parfois graves voire mortelles.

Les infections liées à des biofilms touchent majoritairement les personnes immunodéprimées et impliquent souvent des bactéries commensales comme *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Costeron et al., 1999). La flore constitutive de biofilms en IAA peut-être variée et comprend de nombreuses espèces : *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Brucella*, *Salmonella*... (Sharma et Anand, 2002).

Plusieurs espèces et genres bactériens causant des infections chez l'animal, et ayant ou non un potentiel zoonotique, sont capables de former des biofilms. À titre d'exemple que *S. aureus* est souvent impliqué dans les cas de mammite chez la vache laitière, une maladie économiquement très importante. Il est suggéré par plusieurs chercheurs que la formation d'un

biofilm favorise la persistance dans la glande mammaire tout en diminuant l'efficacité des traitements aux antibiotiques (**Melchior, 2011**)

Plusieurs espèces bactériennes intéressent particulièrement l'IAA à cause de leur capacité à causer des infections ou des toxi-infections alimentaires chez l'homme (**Van Houdt et Michiels, 2010 ; Tremblay et al., 2014**). C'est le cas notamment des souches entérohémorragiques d'*E. coli* O157:H7 dont le bœuf est le principal réservoir. Plusieurs de ces souches sont capables de former des biofilms et le plasmide pO157 semble y jouer un rôle essentiel (**Puttamreddy et al., 2010**). De plus, des souches d'*E. coli* O157:H7 incapables de former un biofilm peuvent tout de même s'associer à un biofilm produit par une souche non pathogène d'*E. coli* et profiter ainsi de la protection fournie par le biofilm (**Uhlich et al., 2010**).

Listeria monocytogenes, agent de la listériose, est un microorganisme pouvant survivre et croître dans diverses conditions environnementales incluant la température de réfrigération, un pH acide et une haute concentration en sel (**Gandhi et Chikindas, 2007**). Il peut être isolé d'aliments crus ou transformés (lait, produits laitiers, viandes, poissons et fruits de mer). La formation d'un biofilm par *L. monocytogenes* et le fait que *L. monocytogenes* peut également se retrouver dans des biofilms multi-espèces (**Habimana et al., 2009**).

Les *Campylobacter* thermophiles, *C. jejuni* et *E. coli*, sont responsables d'un grand nombre d'infections gastro-intestinales. Ces bactéries peuvent former des biofilms et survivre sur les surfaces d'équipement des usines de transformation (**Peyrat et al., 2008**).

I.9.3 Résidus de produits chimiques dans l'aliment

I.9.3.1 Résidus de produits de nettoyage et de désinfection :

La sécurité sanitaire des aliments passe par la maîtrise des risques microbiologiques et chimiques qui constituent une préoccupation mondiale de santé publique. En effet, tout au long de la chaîne alimentaire, les denrées peuvent être la cible de différents types de contaminants biologique et chimique. Les risques liés à ces contaminants vont principalement dépendre de l'agent implique et du niveau de contamination de l'aliment (**Slimani, 2018**).

A la suite du traitement des surfaces alimentaires, il est possible que des résidus de produits biocides persistent sur les surfaces, notamment si ces résidus ne sont pas totalement éliminés lors des opérations de rinçage. Du fait de leur persistance sur les surfaces alimentaires, un transfert de résidus est possible sur ou vers les aliments, ce qui constitue une source potentielle de contamination chimique des aliments (**Slimani, 2018**).

Les procédures de nettoyage systématiques ne sont pas indiquées dans certaines pratiques industrielles. Elles sont en effet néfastes à la transformation des produits. C'est par exemple le cas des hâloirs de maturation des fromageries. La stratégie adoptée est alors ce que l'on appelle depuis plus de 20 ans l'écologie microbienne dirigées (**Carpentier et Cerf, 1993**).

Au regard du Règlement sur les Produits Biocides (RPB) (UE) No. 528/2012 (**Commission Européenne, 2012**), on entend par résidu toute « substance présente dans ou sur des produits d'origines végétal ou animal, dans les ressources en eau, dans l'eau potable, dans les denrées alimentaires, les aliments pour animaux ou ailleurs dans l'environnement, qui résultent de l'utilisation d'un produit biocide y compris les métabolites et les produits de dégradation d'une telle substance ».

I.9.3.2 Résidus d'antibiotiques :

Les résidus sont définis comme étant tous principes actifs ou leurs métabolites qui subsistent dans les viandes ou autres denrées alimentaires provenant de l'animal auquel le médicament en question a été administré (**Commission européenne, 1981**).

Le concept de résidus de traitement dans les denrées alimentaires a évolué au cours de la seconde partie du XX^e siècle pour aboutir à la démarche de fixation d'une dose sans effet, de la dose journalière admissible et des limites maximales de résidus (LMR) dans les denrées alimentaires (**Codex Alimentarius 2011**). Cette évolution a suivi le progrès des connaissances en matière d'évaluation des risques toxicologiques, ainsi que ceux des sciences analytiques et du domaine de la pharmacocinétique (**Mensah et al., 2014**).

Les facteurs favorisant la présence de résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animal sont, entre autres, le non-respect des délais d'attente après l'administration des antibiotiques, la non-consultation des vétérinaires avant l'utilisation d'antibiotiques, l'absence de formation préalable en production animal et le type d'élevage, intensif ou extensif, pratiqué par l'exploitation (**Donkor et al., 2011**).

I.10 Perspectives d'utilisation des extraits de plantes

I.10.1 Dans la désinfection des industries agroalimentaire

Les désinfectants d'usage courant en industrie agroalimentaire (hypochlorite de sodium, glutaraldéhyde) peuvent avoir plusieurs effets délétères comme une sensation de brûlure de la

bouche et de la gorge, une irritation des yeux et de la peau, un larmoiement, etc. Par conséquent, ils sont nocifs à la fois pour le personnel et pour l'environnement . Par conséquent, le besoin est de trouver une alternative biocompatible plus naturelle avec une efficacité de désinfection comparable **(Roopsi et al., 2019)**.

Les plantes médicinales sont utilisées depuis des siècles à des fins médicales et peut également être utilisé avec succès dans le domaine de l'industrie agroalimentaire. Le principal avantage de l'utilisation des extraits de plantes comme désinfectant est qu'il s'agit d'un produit naturel qui n'a pas ou peu d'effets secondaires, facilement disponible, moins cher et, surtout, qui est 100 % biodégradable et ne cause aucun dommage à l'organisme et environnement **(Roopsi et al., 2019)** .

Les extraits de plantes médicinales peuvent être utilisées dans le domaine de l'industrie agroalimentaire en tant que produits désinfectants grâce à leurs richesse en principes bioactifs dotés d'activité antimicrobienne notamment le carvacrol, le thymol , la curcumine etc...**(Vasantha et al., 2021; Ojha et al., 2017 ; Hewlings et Kalman, 2017)**.

I.10.2 Alternative d'utilisation des antibiotiques

Alors que de plus en plus d'antibiotiques sont rendus inefficaces par des bactéries multi-résistantes, l'accent doit être mis sur des thérapies alternatives pour le traitement des infections. Bien que plusieurs alternatives existent déjà dans la nature, le défi est de les mettre en œuvre. Les progrès de la biotechnologie, du génie génétique et de la chimie de synthèse ont ouvert de nouvelles voies vers la recherche de thérapies pouvant remplacer les antibiotiques **(Ghosh et al., 2019)**. De plus, l'émergence de bactéries résistantes aux agents antimicrobiens conventionnels montre clairement que de nouvelles stratégies de contrôle des biofilms sont nécessaires **(Sidhu et al., 2006 ; Simões et al., 2006)**.

Parmi ces alternatives on peut citer les bactériocines qui sont une stratégie courante de défense bactérienne contre d'autres agents bactériens, éliminer les adversaires potentiels des premiers et augmenter le nombre de nutriments disponibles dans l'environnement pour leur propre croissance. Ils peuvent être appliqués dans l'industrie alimentaire comme bio-conservateurs et comme probiotiques, ainsi que dans la lutte contre les souches bactériennes multirésistantes. L'utilisation d'anticorps antibactériens promet d'être extrêmement sûre et efficace. De plus, la vaccination apparaît comme l'une des stratégies préventives les plus prometteuses **(Rios et al., 2016)**.

En outre, les plantes médicinales sont connues pour synthétiser un large éventail de composés appelés métabolites secondaires qui les aident dans leur autodéfense et leur communication avec d'autres organismes dans leur environnement. Les extraits de plantes en tant que médicaments sont des substituts inévitables aux antibiotiques prescrits par les médecins (**Chandra et al., 2021**).

I.11 Caractérisation des activités anti-biofilms et antibactériens des extraits de plantes

Les plantes réagissent aux attaques microbiennes par un répertoire hautement coordonné de barrières défensives moléculaires, cellulaires et tissulaires contre la colonisation et l'invasion. Les métabolites secondaires des plantes, parmi lesquels de nombreux polyphénols, tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tanins, présentent des activités antibactériennes et/ou antibiofilm (**Slobodníková et al., 2016**).

Généralement, l'organe cible des composés actifs dans l'extrait végétal est la membrane cellulaire des bactéries. En fait, il a été montré que les constituants actifs pouvaient attaquer la paroi cellulaire et la membrane cellulaire, détruisant ainsi leur barrière de perméabilité et provoquant la libération de constituants intracellulaires comme le ribose et le glutamate de sodium. En outre, ils interfèrent avec le transport des électrons, l'absorption des nutriments, la synthèse des protéines et des acides nucléiques et l'activité enzymatique, entraînant l'inhibition de la croissance bactérienne (**Alharbi et al., 2021 ; Hamouda et al., 2000**).

Concernant l'activité antibiofilm, il a été montré que certains d'entre eux contiennent des composés anti-biofilm qui inhibent la croissance, interrompent le quorum sensing (QS) et/ou empêchent l'adhésion bactérienne. L'extrait de l'ail agit comme un composé interférant avec le QS dans le traitement des infections bactériennes, en raison de la production d'ajoène, une molécule riche en soufre. L'extrait de canneberge est également un agent anti-adhérent capable de prévenir les infections bactériennes (**Miquel et al., 2016**).

Chapitre II :
Plantes médicinales

PARTIE I : L'olivier**II.1. Historique :**

L'olivier est un arbre de la famille des oléacées, cultivé surtout dans le bassin méditerranéen depuis plus de 3500 ans avant notre ère. Il était dans l'antiquité grecque et romaine, un emblème de fécondité et un symbole de paix et de gloire. Le nom scientifique de l'arbre "Olea" vient d'un mot qui signifiait "huile" chez les grecques de l'antiquité (**Loussert et Brousse, 1978**).

Avant que la présence de l'olivier de Laperrine ne soit signalée par Duveyrier en 1864 dans le Hoggar, les populations locales (les Touaregs) l'appelaient déjà en Tamahaq « aléou » (terme qui se rapproche phonétiquement à *Olea*). D'après Maire (1933), les explorateurs militaires du général Laperrine récoltèrent un grand nombre d'échantillons de différentes espèces dans le Sahara central (**Baali-cherif, 2007**).

II.2. Caractéristiques générales de l'olivier :

Olea europaea L. provient d'un genre d'environ 20 à 25 espèces de la famille *Oleaceae*, l'un des premiers arbres à feuilles cultivées (**Rhizopoulou, 2007**).

L'olivier est un arbre dont la taille avoisine 10m de long. Il se reconnaît facilement à l'aspect tortueux de son tronc, à ses feuilles de forme oblongues à ovales-lancéolées et à ses fleurs regroupées en petites inflorescences en forme de grappes dressées, naissant à l'aisselle des feuilles (**Arab et al., 2013**) ; le fruit de l'olivier est une drupe sphérique qui change généralement de couleur (du vert au violet ou presque noir, lorsqu'elle est complètement mûre), dont l'huile est son composant essentiel (**Rhizopoulou, 2007 ; Chafaa, 2013**)

L'olivier est une espèce à une croissance lente, tolérante au stress de la sécheresse et à une durée de vie extrêmement longue d'environ 500 ans, persistantes dans la région méditerranéenne, où sa croissance est majoritaire dans les régions tempérées qui permettent le développement dans différentes conditions environnementales caractérisées par son tronc, par son pouvoir de développer la croissance latérale et par le fait que ses racines sont difficiles à détruire (**Rhizopoulou, 2007; Benguendouz, 2019**)

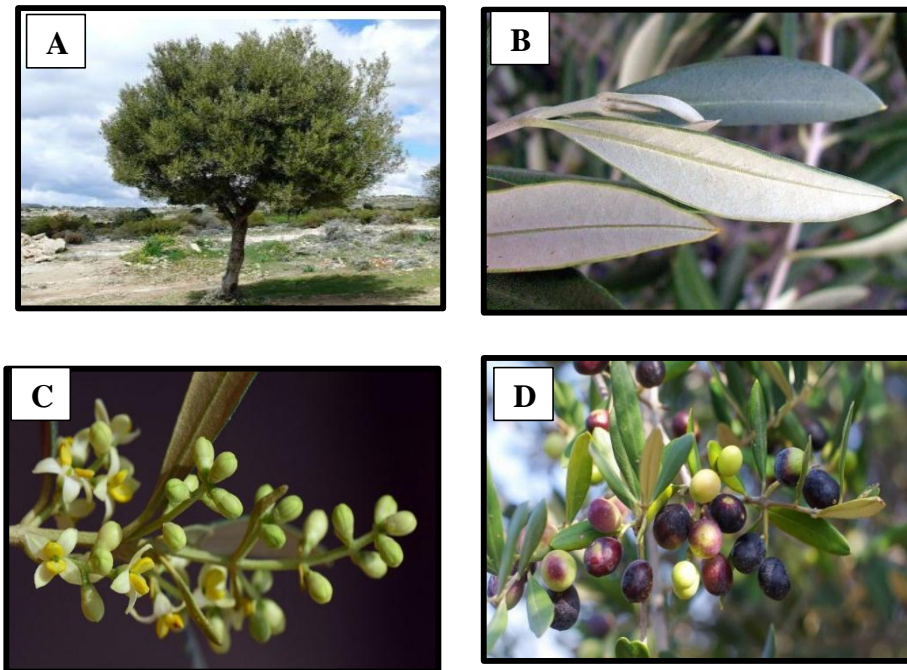


Figure 2.1 : Représentation d'olivier *Olea europaea* : (A) Arbre ;(B) feuilles ; (C) fleurs ;(D) drupes (Villa, 2003).

II.3. Description de l'olivier :

II.3.1. *Olea europaea* subsp *laperrinei* :

Olea europaea subsp. *laperrinei* (Batt.et Trab. 1912), ou olivier de Laperrine, connu aussi sous le nom de l'olivier du Sud est une sous-espèce d'olivier appartenant à la famille des *Oleaceae*. Ce taxon endémique, naturellement adapté aux zones arides est observé en Algérie uniquement dans les régions montagneuses du Sahara central depuis le sud algérien jusqu'au nord-est soudanais en passant par le Niger où les précipitations moyennes annuelles varient de 50 à 100 mm/an (Green, 2002 ; Baali-Cherif et al., 2007 ; Besnard et al., 2009).

Olivier du sud, est de taille moyenne (2 à 3 m de haut), il prend l'allure soit d'un arbuste à rameaux intriqués, soit d'un arbre au tronc noueux. Les rameaux feuillus forment un enchevêtrement serré, caractéristique des mutilations et des coupes dont il est l'objet pour procurer du fourrage aux animaux. Ses feuilles opposées, vert cendré, sont très allongées effilées à l'extrémité. Il fleurit rarement. Ses inflorescences peu fournies sont en grappes grêles à petites fleurs blanches et, par voie de conséquence, fructifie peu (Benchelah et al., 2006). Il a été observé au Sahara dans le Hoggar et l'Air. Il croit dans les montagnes du Sahara dans les milieux caillouteux, les gorges et les falaises (Breton et Berville, 2012).

Cet arbre est présent en haute altitude entre 1400 et 2700 m (**Besnard et al., 2007**) et peut se retrouver jusqu'à 2800 m (**Baali-Cherif et Besnard, 2005**). Il pousse sur des roches volcaniques ou éruptives, généralement dans les lits d'oueds et les falaises où les populations sont souvent difficiles à atteindre (**Baali-Cherif et Besnard, 2005**).

II.3.1.1 Taxonomie :

L'olivier de Laperrine est une espèce qui appartient au complexe d'*Olea europaea* ; classé selon **Siti et Kotez (2008)**, de la manière suivante :

Tableau 2.1 : Classification d'olivier de Laperrine

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotyledones
Sous-classe	Steridees
Ordre	Scrofilariales
Famille	Oleaceae
Genre	Olea
Espèce	<i>O.europaea</i>
Sous-espèce	<i>laperrinei</i> (Batt et Trab, 1912)



Figure2.2 : Présentation d'un arbre d'olivier de Laperrine (**Besnard, 2012**)

II.3.2. *Olea europaea subssp europaea (sativa)* :

Est un arbre fruitier qui produit les olives qui sont consommées sous diverses formes et dont on extrait une principale huile alimentaire, l'huile d'olive. C'est la variété domestique depuis plusieurs millénaires, cultivée principalement dans les régions à climat méditerranéen, une espèce d'arbre et d'arbuste de la famille des oléacées (**Dupont et al., 2007**).

Olea europaea sativa est constitué d'un grand nombre de variétés améliorées, ayant une diversité phénotypique importante et qui donnent une teneur en huile assez variables selon la variété considérée. Estimé actuellement à plus de 2000 variétés d'oliviers recensées dans le monde. Selon la destination des fruits de cet arbre, elles ont été classifiées en variétés : olives de table ou olives à huile ou variétés dites à deux fins (**Loussert et Brousse, 1978**).

Cet arbre est également réputé pour sa grande rusticité, lui permettant de se développer et de fructifier sous des conditions de climat subaride et sur des sols parfois très pauvres (Loussert et Brousse, 1978).

II.3.2.1. Taxonomie :

La classification botanique de l'olivier selon Conquist (1981), est la suivante :

Tableau 2.2 : classification botanique d'*Olea europaea* var *europaea*

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Scrophulariales
Famille	Oleaceae
Genre	<i>Olea</i>
Espèce	<i>Olea europaea</i>
Sous-espèces :	<i>Olea europaea</i> var <i>europaea</i>



Figure 2.3: Représentation de l'olivier De l'espèce *Olea europaea* (Villa, 2003)

II.4 Localisation géographique :

L'olivier (**figure 2.4.A**) est présent depuis l'Afrique du Sud jusqu'en Chine, en Méditerranée, en Marocaine (Canaries et Madère) et dans les montagnes sahariennes. (Lahcene, 2020)

En Algérie, l'olivier de Laperrine est présent dans quatre massifs montagneux, ce sont le Hoggar, le tassili n'Ajjer, le Tafedest et le Mouyedir (**figure 2.4.B**), au Niger, il est présent dans l'Aïr et au soudan dans le Djebel Marra et le Gorgeil (**figure B**) (Lahcene, 2020).

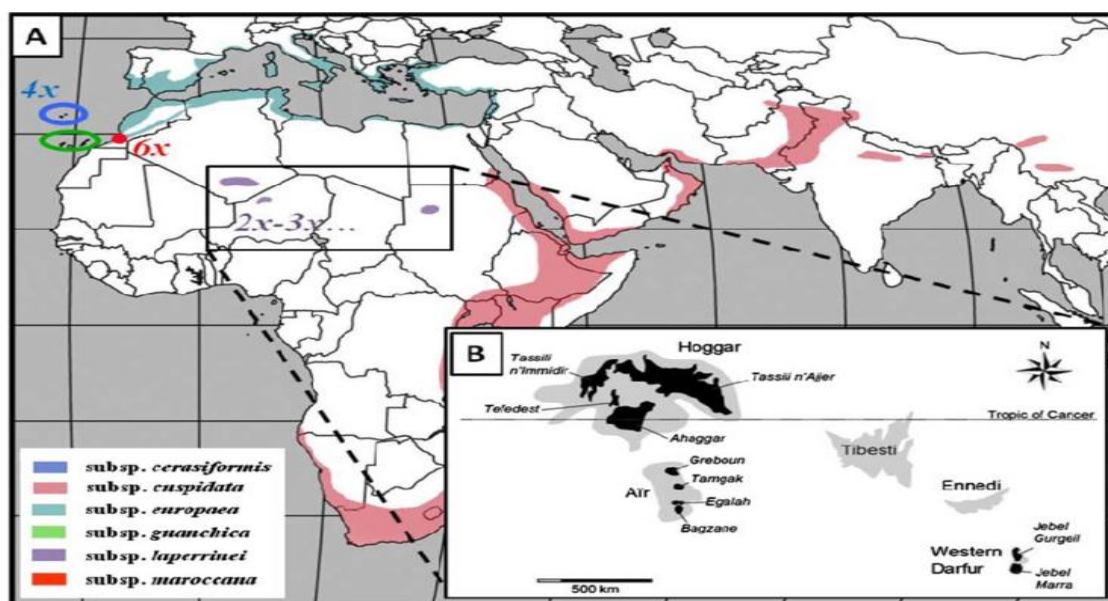


Figure 2.4 : Distribution du complexe de l'olivier (A) et de l'olivier de Laperrine(B).
(Besnard *et al.*, 2012)

II.5 Composition chimique des feuilles :

Les feuilles fraîches d'olivier sont caractérisées par une matière sèche moyenne de 50%, elles contiennent des quantités variables d'oligo-élément dont la concentration est en fonction de plusieurs facteurs : la physiologie de la plante, les conditions environnementales (principalement, les éléments disponibles dans le sol) et l'âge de la feuille (Bouabdillah, 2014).

Les feuilles sont particulièrement riches en carbohydrates. La matière organique est constituée par des protéines, des lipides, des monomères et polymères phénoliques (tels que les tannins) et principalement par des polysaccharides (tels que la cellulose, l'hémicellulose). Leur teneur en protéine est faible et la composition en acides aminées est particulièrement diversifiée. Concernant leur composition en minéraux, le fer est le plus abondant dans les feuilles avec une concentration de 273 g/kg de matière sèche (Aouidi, 2012).

Tableau2.3 : Composition chimique globale des feuilles d'olivier (exprimé en g/100 g de matière fraîche).

Composition en %	Garcia Gomez <i>et al.</i> , 2003	Martin Garcia <i>et al.</i> , 2006	Boudhrioua <i>et al.</i> , 2009	Erbay et Icier., 2009
Eau	Nd	41,4	46,2 – 49,7a	49,8a
Protéines	Nd	Nd	5,0 – 7,6a	7,0b
Lipides	6,2b	3,2b	1,0 – 1,3a	6,5a
Minéraux	26.6b	16,2b	2,8 – 4,4a	3,6b
Glucides	Nd	Nd	37,1 – 42,5a	27,5a
Fibres brutes	Nd	Nd	Nd	7,0a

Cellulose	19,03b	Nd	Nd	Nd
Hémicellulose	25,4b	Nd	nd	Nd
Lignine	30,4b	Nd	nd	Nd
Polyphénols totaux	Nd	2,5b	1,3 – 2,3b	Nd
Tannins solubles	Nd	Nd	nd	Nd
Tannins condensés	Nd	0,8b	nd	Nd

a : correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse fraîche des feuilles d'olivier.

b : correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse sèche des feuilles d'olivier.

nd : valeur non déterminée.

II.6 Les principales propriétés pharmacologiques des feuilles d'oliviers

Depuis l'antiquité, les feuilles sont employées traditionnellement pour désinfecter les blessures cutanées, l'extrait des feuilles d'olivier possède plusieurs propriétés pharmacologiques : anti-oxydantes, hypotensives, hypoglycémiantes, antimicrobiennes (Rombi et al., 2015 ; Karakaya, 2009 ; Somova et al., 2002 ; Sato et al., 2008).

II.6.1 Propriétés antimicrobiennes

L'extrait de feuilles d'olivier renforcerait le système immunitaire et permettrait de lutter contre de nombreux agents infectieux ; bactéries, parasites, virus et certains champignons. (Walker, 2000 ; Lee-Huang et al., 2003 ; Markin et al., 2003 ; Sudjana et al., 2009).

Par leurs pouvoirs antimicrobiens et antiviraux, les feuilles traitent les infections causées par ou associés à un virus, un rétrovirus, une bactérie ou un protozoaire (Lee et al., 2010 ; Micol et al., 2005). D'autres activités notables sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 2.4 : Activités biologiques des feuilles de l'olivier (*Olea europaea* L.)

Activités	Références
Activité anti-fongique	Korukluoglu et al., 2008
Activité gastro-protective	Dekanski et al., 2009
Activité anti-athérogène (prévention contre l'athérosclérose)	Somova et al., 2003
Activité hypo-lipidimique	Jemai et al., 2008
Activité anti-allergique	Masataka et al., 2007 (brevet)
Activité analgésique (activité anti-nociceptive)	Esmaeili-Mahani et al., 2010

Activité neuro-protective	Mohagheghi et al., 2011
Activité anti-cardiovasculaire	Singh et al., 2008 ; Fonolla et al., 2010 ; Scheffler et al., 2008
Activité vaso-active (contre les maladies cardiovasculaire)	Rauwald et al., 1994
Activité vasodilatateur	Zaruelo et al., 1991
Activité anti-leucémique (effet anti-prolifératif des cellules leucémiques humaines)	Abaza et al., 2007
Action anti-âge	Akemi et al., 2001 (brevet) ; Tadashi, 2006 (brevet) ; Thomas et al., 2006

II.7. Domaines d'utilisation des feuilles d'olivier :

Les feuilles d'olivier ont plusieurs pouvoirs biologiques, elles sont employées dans plusieurs domaines : dans l'alimentation animale, en thérapeutique, cosmétologique, dépollution et biochimie. (Talhoui et al., 2015).

II.7.1 Domaine pharmaceutique

La valorisation concerne l'extraction des tocophérols et de l'oleuropéine, ainsi que la production de l'hydroxytyrosol (De Lucas et al., 2002 ; Bouaziz et Sayadi, 2003). Le spectre d'action de l'hydroxytyrosol est comparable à ceux de l'ampicilline et de l'érythromycine (Bisignano et al., 1999).

II.7.2 Industries Alimentaires

Les feuilles peuvent être utilisées comme ingrédients dans la formulation d'aliments pour les hyper-glycémiques (Komaki et al., 2003). Stabilisant des huiles végétales (Farag et al., 1998 ; Bouaziz et al., 2008) ; les tocophérols protègent contre l'oxydation naturelle des acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés. Elles peuvent être aussi utilisées pour la conservation de la viande fraîche de dinde (Djenane et al., 2012).

II.8 Les composés phénoliques d'olivier et leur intérêt :

Les métabolites secondaires ne se trouvent que dans des tissus ou organes particuliers ou à des stades précis de développement (Hopkins, 2003). Ils sont synthétisés en réponse aux contraintes de l'environnement et permettent à la plante de se défendre contre les pathogènes, les prédateurs... (Morot, 2009). Les CP, métabolites secondaires, forment le groupe des composés organiques phytochimiques le plus important dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante (Beta et al., 2005). L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés à un

ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (Bruneton, 1993).

Toutes les parties de l'arbre servent à guérir : le fruit, la feuille, la fleur, l'écorce et l'huile d'olive. Cependant, seuls les extraits de feuilles d'olivier et l'huile d'olive extra vierge (acidité <1%) sont considérés comme une source importante de ces composants (Visioli et Galli, 1994). Les polyphénols de l'olivier ont une énorme capacité à piéger les radicaux libres et montrent un comportement synergique lorsqu'ils sont combinés, ce qui se déroule naturellement dans les feuilles d'olivier et donc dans leurs extraits (Polzonetti et al., 2004). Parmi ces polyphénols, l'hydroxytyrosol et tyrosol qui contribuent au goût amer, astringence et à la résistance à l'oxydation (Visioli et Galli, 1994).

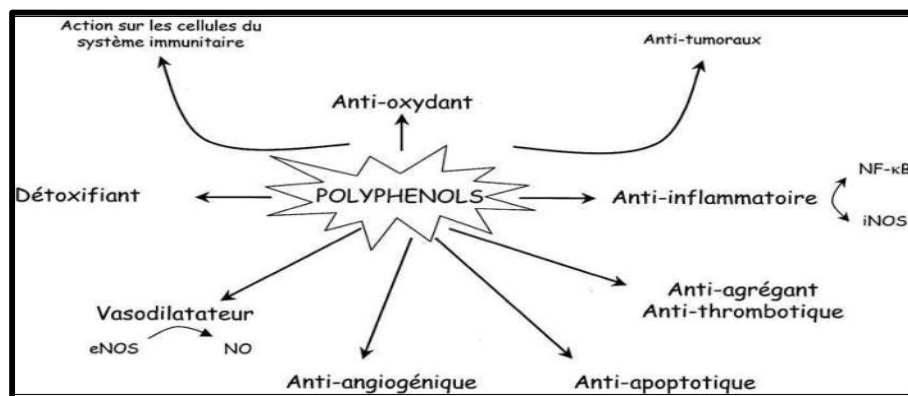


Figure 2.5 : Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002)

II.8.1 Principales voies de biosynthèse des composés phénoliques

D'après Bruneton (2009), les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse :

- **La voie de l'acide shikimique**, conduit des oses aux amino-acides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers aux acides cinnamiques et à leurs dérivés (Knaggs, 2003).
- **La voie de l'acide acétique**, conduit à des poly- β -cétoesters (polyacétates) de longueur variable, qui engendrent par cyclisation ou condensation, des composés souvent polycycliques : les flavonoïdes et les tannins condensés (Nacks et Shahidi, 2004).

II.8.2 Techniques d'extraction des polyphénols

D'après **Vercauteren et Cheze (1998)**, les solvants d'extraction jouent un rôle capital en assurant le transfert de phase du produit à extraire. Au départ, la matière première qui est un mélange hétérogène (solide végétal ou liquide de fermentation), est soumise au contact d'un solvant (liquide) afin d'obtenir un extrait primaire complexe utilisable directement. Il peut être également soumis à des échanges liquide-liquide, dans ce cas il s'agit principalement d'interactions moléculaires entre le solvant et le soluté.

L'extraction des composés phénoliques se fait selon plusieurs méthodes, les plus utilisées et employées sont résumées dans le tableau.

Tableau 2.5 : principales méthodes d'extraction des polyphénols.

Techniques	Principe	Référence
Extraction par les solvants (macération)	Le contact entre le solvant (liquide) et la matière végétale (solide) a pour but de libérer les polyphénols dans les cellules par rupture du tissu végétal et par diffusion.	(Owen et Johens, 1999)
Extraction par chromatographie sur colonne	Elle consiste à absorber sur une résine du type C18 pour les polyphénols des extraits végétaux puis à éluer sélectivement les substances polyphénoliques au moyen d'éthanol ou méthanol aqueux.	(Rouessac et Rouessac, 1997)
Extraction par ultrason (EAU)	Est basée sur le principe de la cavitation. Lorsque le solvant est sonore, les ondes ultrasons se propagent dans le milieu, ce qui entraîne des cycles alternés de compression et de décompression, qui à leur tour entraîne des changements de pression, à des pressions très faibles se forme des bulles d'air ou de vapeur de solvant, donnant lieu à un phénomène appelé cavitation.	(Ritz et al, 2002)

II.9 Composés phénoliques des feuilles d'olivier

Les feuilles d'olivier contiennent plusieurs classes de composé phénoliques comme les flavonoïdes, secoiridoïdes, hydroxytyrosol (**Talhaoui et al., 2015**). Elles présentent une teneur

en composés phénoliques variant de 2,8 mg/g MS (Altiok *et al.*, 2008) à 250 mg/g MS selon les variétés (Mylonaki *et al.*, 2008).

Les composés phénoliques dans les feuilles d'olivier sont très divers et leurs structures sont très variables :

II.9.1 Monomères phénoliques

Selon Altiok *et al.* (2008) les monomères phénoliques sont représentés par :

- Acides phénoliques : acide caféique, acide vanillique et acide syringique.
- Alcools phénoliques : tyrosol et hydroxytyrosol.
- Des flavonoïdes : apigénine, lutéoline, rutine.

II.9.2 Polymères phénoliques

Les polymères phénoliques sont représentés par :

- Les tannins : composés naturels des végétaux, ayant une capacité de se complexer fortement avec les hydrocarbures et les protéines. Les tannins sont classés en deux groupes majeurs : les tannins solubles et les tannins condensés (Garro-Galvez *et al.*, 1997).
- La lignine.

II.9.3 L'oleuropéine

L'oleuropéine ou oleuropéoside, un hétéroside sécoiridoïde, est présent dans l'olivier et ses produits dérivés (huile d'olive, margines et grignons). C'est le composé bioactif le plus abondant et majeur dans les feuilles d'olivier la teneur moyenne varie de (60-90 mg/g) (Araqas, 2013 ; Talhaoui *et al.*, 2015).

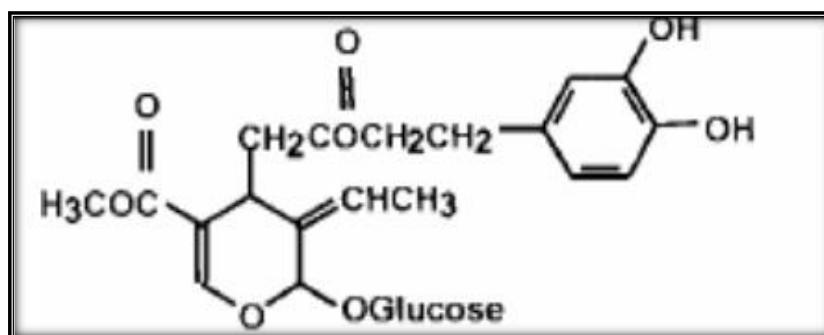


Figure 2.6: Structures chimiques de L'oleuropéine (Benavente-Garcia *et al.*, 2000)

L'oleuropéine possède de nombreux effets bénéfiques. Ces derniers sont résumés ainsi :

Tableau 2.6 : Effets bénéfiques de l'oleuropéine.

Effets bénéfiques de l'oleuropéine	Références bibliographiques
Antioxydant	Benavente-Garcia et al., 2000
Antimicrobien	Pereira et al., 2007
Antiviral	Micol et al., 2005
Anti- inflammatoire	Visioli et al., 1998
Cardioprotecteur	Andreadou et al., 2006
Neuroprotecteur	Omar S.H., 2010
Anti-tumoral	Hamdi et Castellon, 2005
Inhibe l'activité du facteur d'activation des plaquettes	Andrikopoulos et al., 2002
L'auto-défense de l'olivier	Malik et Bradford, 2006

Partie 2 : L'ail

II.1 Historique

L'ail provient à l'origine d'Asie centrale, mais ayant été introduit très tôt dans de nombreuses civilisations, beaucoup en revendiquent la paternité. Plus précisément, on suppose que son berceau serait situé dans les plaines à l'Est de la mer Caspienne (Kazakhstan, Ouzbékistan et Turkménistan), régions où il pousse encore à l'état sauvage. Il aurait été introduit en Chine par les tribus nomades et se serait propagé jusqu'en Asie du sud-est. Il y a environ 10 000 ans, il s'est répandu progressivement en Extrême-Orient, en Arabie, en Égypte et dans le Bassin méditerranéen, transporté par les marchands au gré des routes commerciales.

Ce bulbe est sans doute l'un des légumes les plus anciennement cultivés par l'homme qui l'utilisait autant pour son alimentation que pour sa santé (Geaga, 2015)

II.2 Description

L'ail cultivé ou l'ail commun est appelé en latin *Allium sativum* L. Une plante monocotylédone, herbacée, vivace, bulbeuse et à nombreuses fleurs blanches ou roses formant une inflorescence en ombelle. Le bulbe mère repose sur une structure plate appelée plateau d'où partent les racines. Il est entouré environ de 8 à 12 bulbilles ou caïeux couramment désignés sous le terme de gousses. Le bulbe et les gousses sont entourés de pellicules très fines de couleur blanche ou rose à pourpre. Il existe 700 variétés d'ail qui varient selon leur grosseur, leur saveur et leur couleur. La reproduction de l'*Allium sativum* est strictement végétative et ceci, à partir d'une gousse (Dethier, 2010).

L'ail est non seulement utilisé en cuisine comme condiment pour ses vertus aromatiques, car il relève le goût des viandes et des sauces mais utilisé en phytothérapie vue ses effets anti-tumoraux, anti-cholestérol, antifongiques, antibactériens, antiviraux, antiparasitaires, antioxydants et hypoglycémiant. Il agit aussi sur le système vasculaire (Tahri et al., 2007).

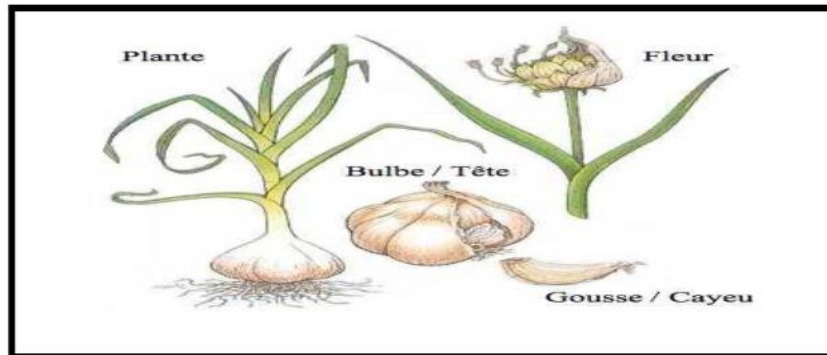


Figure 2.7 : Présentation de l'ail (*Allium sativum*) (Dethier, 2010)

II.3 Taxonomie

La classification traditionnelle de l'ail, distingue les cultivars selon des critères morpho-physiologiques en fonction de leur période de végétation et de la couleur de la tunique des bulbes et des bulbilles (Touil et al., 2015).

Tableau 2.7 : Classification botanique de l'ail

Règne	Plantae
Sous-règne	Trachéophyte
Embranchement	Spermaphytes ou Phanérogames
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotyledonae
Sous-classe	Liliidae
Ordre	Liliales
Famille	Liliaceae ou Liliacées
Genre	<i>Allium</i>
Espèce	<i>Allium sativum</i>
Nom commun	Ail

II.4 La répartition géographique

La culture d'ail est répartie dans le monde entier, cela est dû aux grands nombres de variétés adaptées à tous les climats.

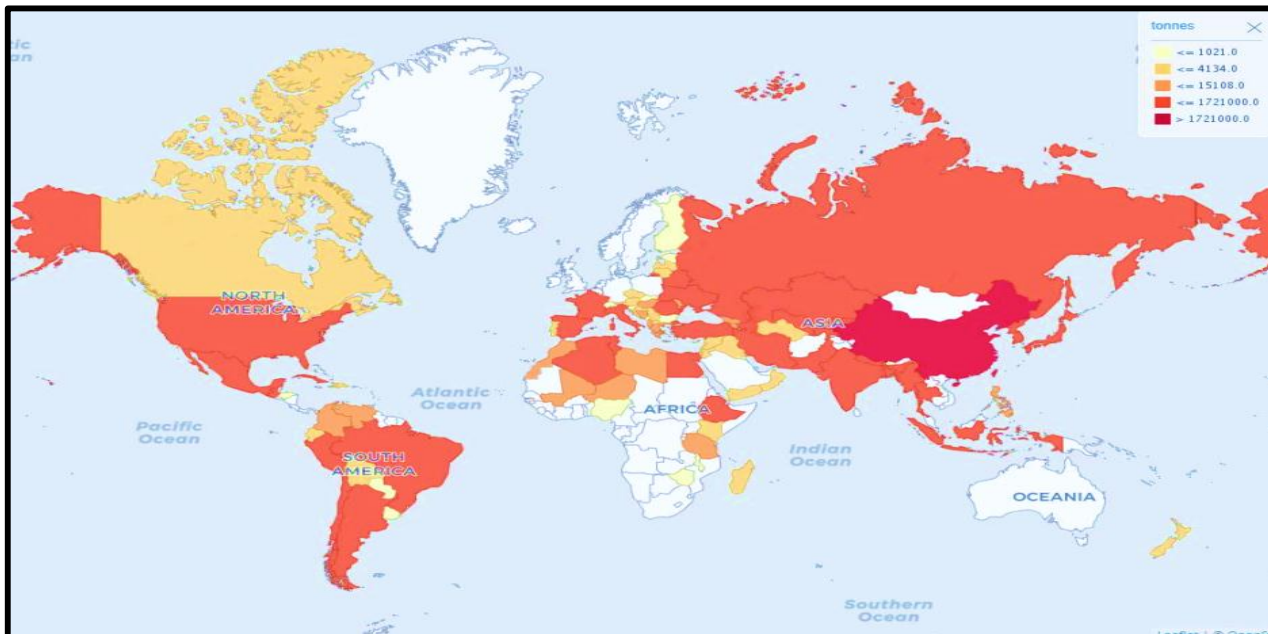


Figure 2.8 : Répartition mondiale de la culture d’ail en 2018 selon l’Organisation des Nations Unies pour l’Alimentation et l’Agriculture (**anonyme1**).

II.5 Composition des gousses de l’ail

La gousse d’ail contient 65% d’eau, 28% de polysaccharides de stockage, 2% de protéines dont essentiellement des enzymes (allinase et peroxydases...), 12% d’acides aminés libres (alanine, arginine, acide aspartique, asparagine, histidine, leucine, méthionine, proline, tryptophane, phénylalanine, sérine, thréonine et valine (**Dethier, 2010**).

L’ail est riche en calcium, en phosphore et en soufre (**Saleh et al., 2015**). On y trouve aussi du potassium, du zinc, du cuivre, du magnésium et des oligo-éléments comme, le sélénium et germanium. Cette plante renferme aussi des vitamines A, B1, B2, PP, C, les acides gras essentiels (vitamine F).

D’autres composants sont également identifiés, parmi lesquels on a les pigments phénoliques, les terpénoïdes, les saponines (β -chlorogénines) et les antibiotiques (**Agarwal, 1996 ; Medjeldi, 2012**).

II.6 Principes actifs d’ail

L’ail frais renferme des quantités importantes de γ -glutamylcystéines, composés de réserve, lesquels, par hydrolyse et oxydation peuvent former de l’alline (la cystéine sulfoxyde), molécule majoritaire (**Agarwal, 1996**), qui représente 24% du poids total du bulbe. Cette molécule présente dans les bulbes intacts, peut s’accumuler naturellement durant

la conservation de l'ail à température ambiante. Elle s'est avérée être le précurseur stable converti en allicine par l'action d'une enzyme nommée l'allinase. Cette réaction ne peut avoir lieu que si les tissus sont écrasés ou endommagés car les deux composés se trouvent dans des compartiments cellulaires différents. Les γ -glutamylcystéines donnent aussi des S-allyl-L-cystéine (Xu *et al.*, 2015).

Les principes actifs de la gousse d'ail sont séparés en deux groupes, les composés volatils et non volatils. La transformation de l'alline précurseur aromatique principale, en diverses molécules odorantes aux propriétés démontrées, est la clé de la génération de la plupart des molécules actives de l'ail. (Dethier, 2010).

L'allicine est une molécule volatile qui est miscible dans les solutés. Elle est rapidement oxydée pour donner naissance aux disulfures d'allyles qui sont les principaux constituants de l'essence d'ail. Par condensation, ces derniers donnent des composés secondaires appelés les Ajoènes, les Diallyl sulfures, les Diallyl disulfures, les Diallyltétrasulfures et autres qui sont également responsables de l'odeur de l'ail (Pittler et Ernst, 2007)

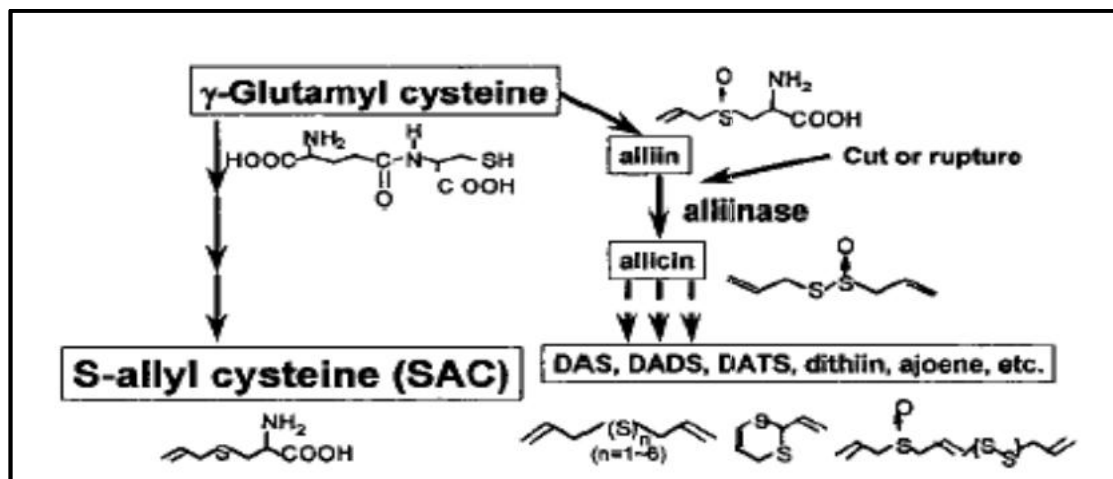


Figure 2.9: Réactions chimiques dans la gousse d'ail (*Allium Sativum*) (Meddeb, 2008)

II.7 Effets thérapeutiques de l'ail

L'ail est utilisé en cuisine pour relever le goût des aliments, mais ses nombreuses propriétés thérapeutiques en font un complément alimentaire prisé.

En effet, des qualités antimicrobiennes, antioxydants, anti-inflammatoires, anti-tumorales et de prévention du cancer lui ont été reconnues. En outre, il aurait le pouvoir d'inhiber la coagulation, de réduire l'hypercholestérolémie et le taux de lipides sanguins, ou encore de

faciliter la digestion. L'ail prévient aussi le risque de thrombose et d'athérosclérose. Enfin, il diminue l'hyperglycémie et la tension sanguine (**Dethier, 2010 ; Goetz et Ghédira, 2012**).

II.7.1 Effet antimicrobien

L'Allicine et d'autres composés soufrés sont considérés comme les principaux composés responsables de l'effet antimicrobien de l'ail. L'ail est efficace contre un certain nombre de bactéries Gram négatif, Gram positif et certains champignons (**Zhang et al., 2019**). Certaines bactéries Gram positif sont plus sensibles au jus d'ail, comme c'est le cas de *Staphylococcus aureus*, que les bactéries Gram négatif. Les germes réagissant à l'extrait d'ail sont nombreux comme *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Shigella* et *Vibrio cholerae* (**Ahsan et al., 1996**).

II.7.2. L'ail dans l'industrie agroalimentaire

L'ail est utilisé comme antioxydant dans les huiles pour les conserver longtemps. On remplace les antibiotiques par la poudre d'ail dans l'aliment de bétail, de volaille et de poisson, pour qu'il n'y ait pas de résidus d'antibiotiques dans la viande (**Saleh et al., 2015**). Dans le poisson fumé, la charcuterie et la viande fraîche conservée à 4°C, on met de l'ail pour éviter leur altération et leur rancissement (**Nurwantoro et al., 2015**).

Chapitre III :
Matériels et méthodes

III.1. Problématique et objectifs :

Le respect des modalités d'utilisation permet de garantir avec une très forte probabilité des niveaux de résidus inférieurs aux limites maximales de résidus. En revanche le non-respect de ces consignes et l'usage abusif des antibiotiques ainsi que les désinfectants chimiques fond que ces derniers peuvent se retrouver sous forme de résidus en quantités supérieur aux seuils autorisés dans les denrées alimentaires issu des animaux traiter et les traces de désinfectants dans les canalisation et tuyauterie des industries agroalimentaires. Par conséquent, ils peuvent engendrer des dangers d'ordre microbiologique, toxicologique et allergique pour le consommateur mais aussi technologique pour l'industrie agroalimentaire. En revanche l'utilisation des extraits de plantes naturelle limites le risque de contamination.

Afin de minimiser l'utilisation des antibiotiques et des produits chimiques à des doses importantes, et dans le but de réduire leurs effets secondaires liée à la persistance de ses résidus dans les aliments lors de leur utilisation à large spectre, nous avons fait recoure aux extraits des plantes médicinales dans l'objectif de remplacer ses derniers, pour cela nous avons :

Étudier l'activité antibactérienne et anti-biofilm des extraits d'origine végétale, pour cela on a procédé comme suite :

- La récolte de certaine plante rependant à la problématique posée :
 - ✓ L'olivier de Laperrine (*Olea europaea laperrinei*) récolté à Tamenrasset ;
 - ✓ L'olivier du nord de l'Algérie (*Olea europaea*) (Tizi Ouzou) récolté à Beni Douala ;
 - ✓ L'ail (*Allium sativum*) acheter au supermarché « RAHMA » de Tizi Ouzou ;
- Réalisation des extractions aqueuses et éthanoliques de l'olivier de Laperrine et des extractions éthanoliques de l'ail et olivier du nord.
- Tester l'activité antibactérienne (seul et en synergique) et anti-biofilm sur des milieux gélosés et sur microplaque.

III.2. Matériels et méthodes

Notre étude expérimentale est réalisée au sein du laboratoire de recherche de biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) du département Biochimie - Microbiologie, faculté des sciences Biologiques et des sciences Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi - Ouzou, durant la période allant du 01/03/2022 au 30/06/2022.

III.2.1. Réalisation des extractions :**III.2.1.1 Matériel végétal****III.2.1.1.1 La récolte**

Le matériel végétal utilisé durant cette expérimentation est :

Des feuilles de l'olivier de Laperrine (*Olea laperrinei*) et des feuilles de l'olivier du nord (*Olea europaea*) variété Chamelal prélevées respectivement sur des pieds mère adultes de la station de Tamanrasset en été et à Beni Douala à Tizi-Ouzou.

L'ail (*Allium sativum*), acheté frais au super marché « RAHMA » à Tizi-Ouzou durant le mois de mai 2022, (Les parties qui font l'objet de cette recherche sont les gousses de l'ail)

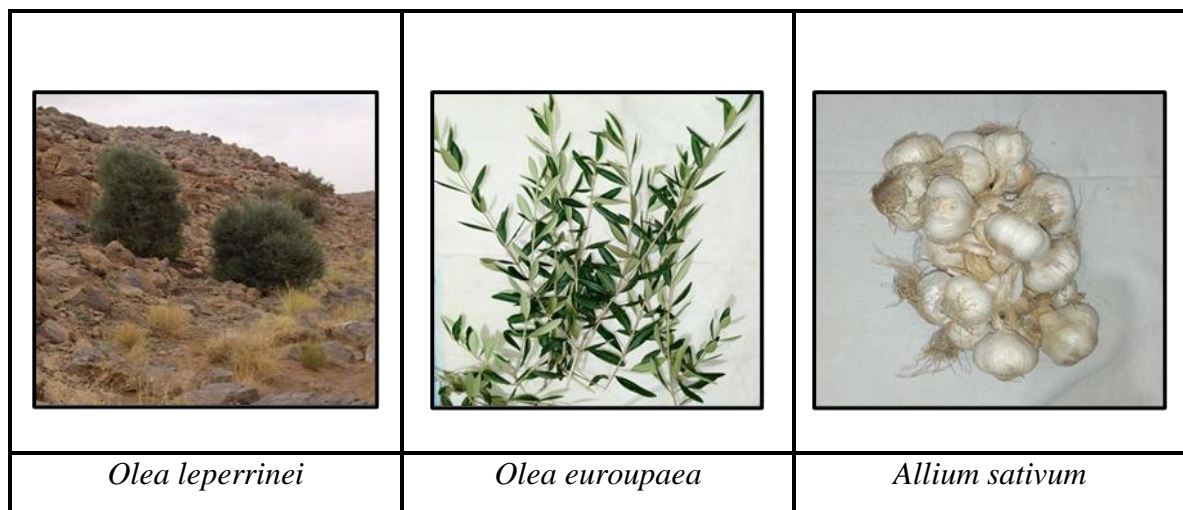


Figure 3.1: Récolte et préparation des gousses d'ail, l'olivier de Laperrine (*Olea laperrinei*) et l'olivier du nord (*Olea europaea*).

III.2.1.1.2 Séchage des feuilles

Les feuilles récoltées ont été séchées à l'air libre, à l'abri de la lumière et de l'humidité afin de préserver toutes leurs propriétés.

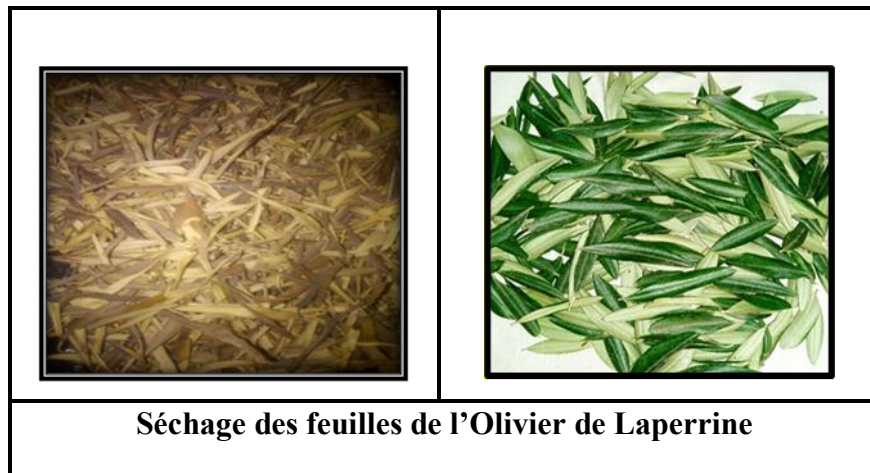


Figure 3.2 : Séchage des feuilles d'Olivier

III.2.1.1.3 Broyage et conservation

a. Les feuilles d'oliviers

Les feuilles préalablement séchées sont broyées au moulin électromécanique (**Annexe 2**) en une poudre fine, et par la suite conserver dans des boites à l'obscurité et à température ambiante.

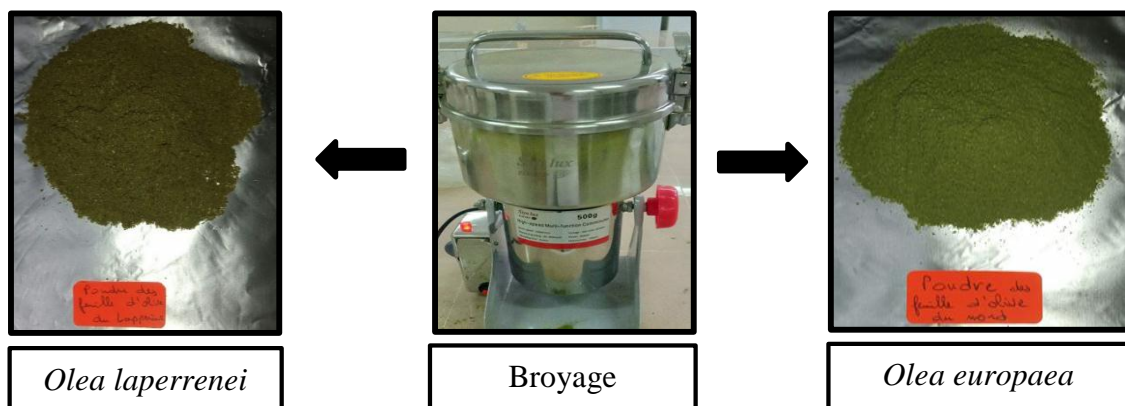


Figure 3.3: Broyage des feuilles d'Olivier

b. L'ail

Les bulbes d'ail sont nettoyés et débarrassés de toutes leurs enveloppes ensuite découpées en petit morceau, puis broyées au mixeur.

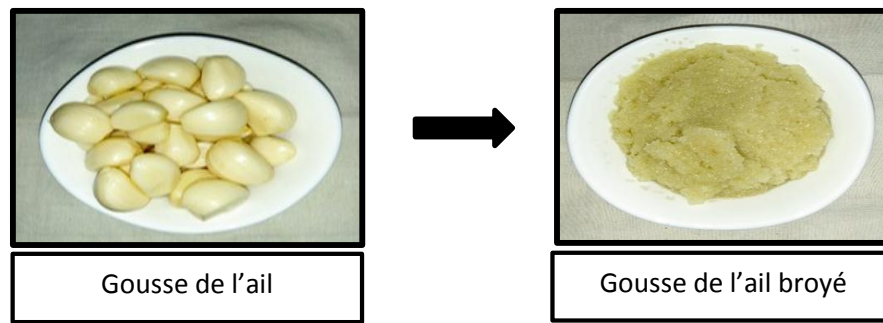


Figure 3.4: Broyage des gousses d'ail

III.2.1.1.4 Méthode d'extraction des extraits bruts

a. Olivier de Laperrine

Nous avons adopté les protocoles d'extraction par macération mis au point au laboratoire d'analyses biochimiques (LABAB) (Aiche-Iratni *et al.*, 2015 ; Moualek *et al.*, 2016).

• Extraction aqueuse

Cette extraction consiste à :

- Dissoudre 10 grammes de poudre végétale dans 100 ml d'eau distillée (ED) et agiter à l'aide d'un agitateur magnétique ;
- Laisser macérer pendant 24h à l'obscurité ;
- Filtrer la phase aqueuse du macérât est par la suite lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur.
- Conserver le lyophilisat à 4°C.

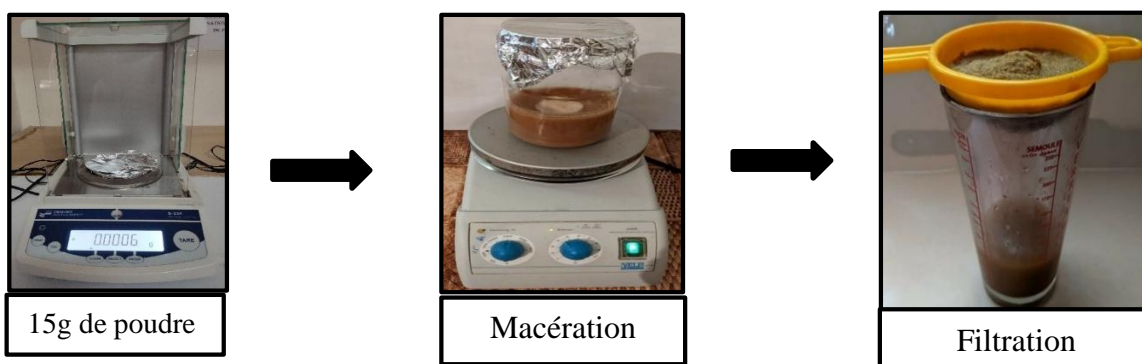


Figure 3.5 : les étapes de l'extraction aqueuse

• Extraction éthanolique

Nous procédons de la même manière que pour l'extraction aqueuse, en effet ;

- Dissoudre 10 grammes de poudre végétale dans 100 ml d'éthanol à 70% et agiter à l'aide d'un agitateur magnétique ;
- Laisser macérer pendant 24h à l'obscurité ;
- Le filtrat éthanolique obtenu est mis à évaporer à l'obscurité et à l'abri de l'humidité durant 4 à 5 jours ;
- Le résidu sec résultant est repris dans de l'ED préalablement chauffé est par la suite lyophilisé.
- Conserver le lyophilisat à 4°C.

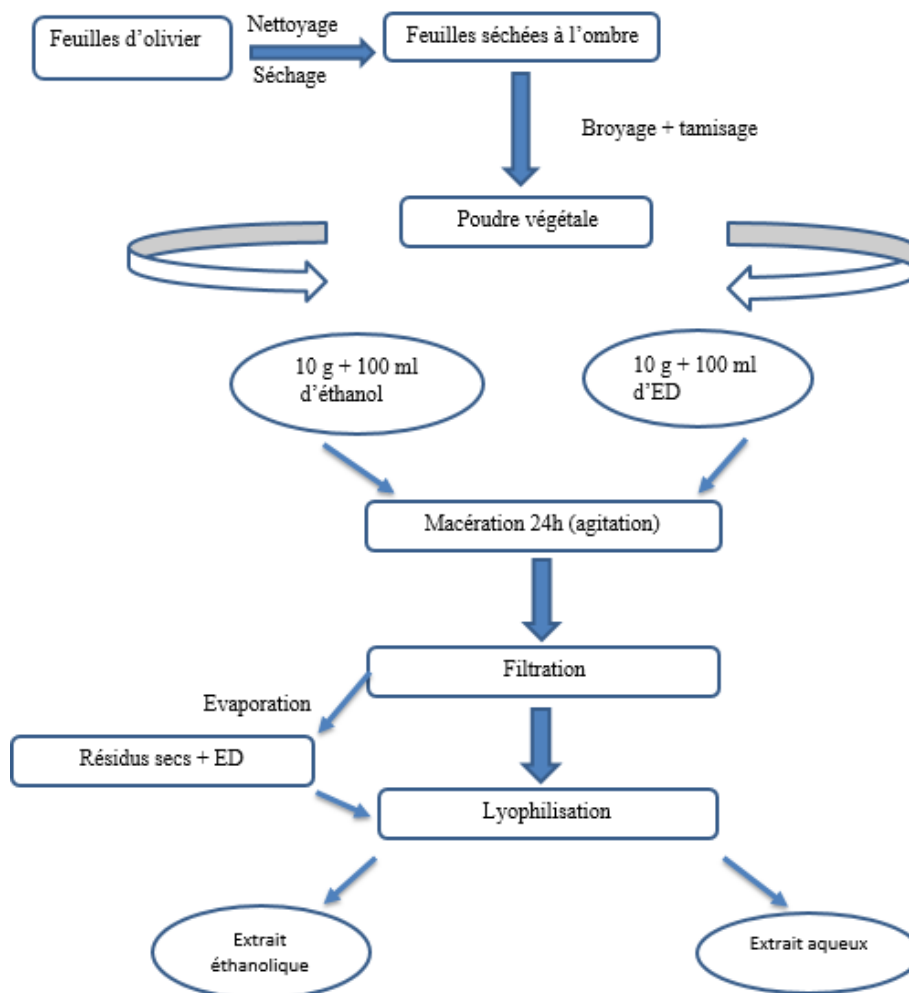


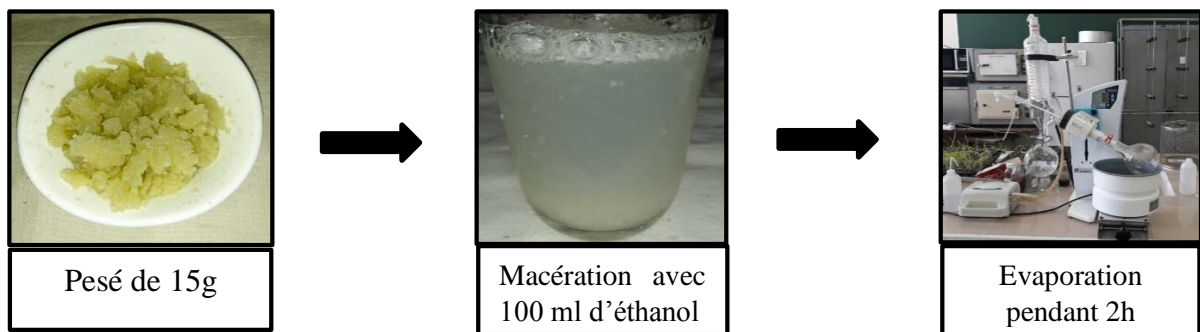
Figure 3.6: Schéma récapitulatif des différentes étapes d'extraction aqueuse et éthanolique

b. L'olivier du nord et Ail

La méthode utilisée pour l'extraction des extraits brutes de l'ail et de l'olivier du nord est l'extraction par ultrason. Et pour cela on a procédé comme suit :

- Dans un flacon stérile, mélanger 15g d'extrait sec (ail et olivier du nord) dans 100ml d'éthanol à 96 %.
- Déposer le flacon dans le bassin de sonication (**Annexe 2**) pendant 30min.
- Récupérer la solution puis Filtré et centrifugé à 6000tr/15min à 4°C.
- Récupérer le surnageant puis le mettre dans le rota-vapeur (**Annexe 2**) à 60°C. pendant 2h.
- Répartir la solution obtenue dans des cristallisoirs et les recouvrir avec du papier aluminium perforer afin d'évaporé le reste d'éthanol et cela pendant 3 jours.

Une fois que l'éthanol est bien évaporé, 1ml de DMSO est ajouté dans chaque cristallisoir pour récupérer l'extrait brut (pure). L'extrait est conservé dans des Eppendorf à -80° C.



Les étapes d'extraction éthanolique de l'ail par ultrason



Les étapes d'extraction éthanolique de l'olivier du nord





Figure 3.7 : Extraction par ultrason

III.2.1.2 Teste de l'activité antibactérienne et anti-biofilm :

III.3.2 Préparation des Souches microbiennes

Trois souches de référence ATCC (American Type Culture Collection) ont été sélectionnées pour cette étude à savoir :

- ❖ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 7803
- ❖ *Escherichia coli* ATCC 25922
- ❖ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

III.3.2.1 Revivification des souches bactériennes

La revivification des souches a été effectuée par enrichissement sur BHIB (Brain Heart Infusion Broth) (ADAM LABO). Ensuite incubés pendant 24 h à 37 °C dans une étuve (Annexe 2).



Figure 3.8 : Revivification des souches conservées dans du glycérol

III.3.2.2 Contrôle des souches microbiennes

Afin d'étudier les activités anti-biofilm et antibactériennes, il est indispensable de contrôler la pureté des souches, voir (Annexes 4 et 5).

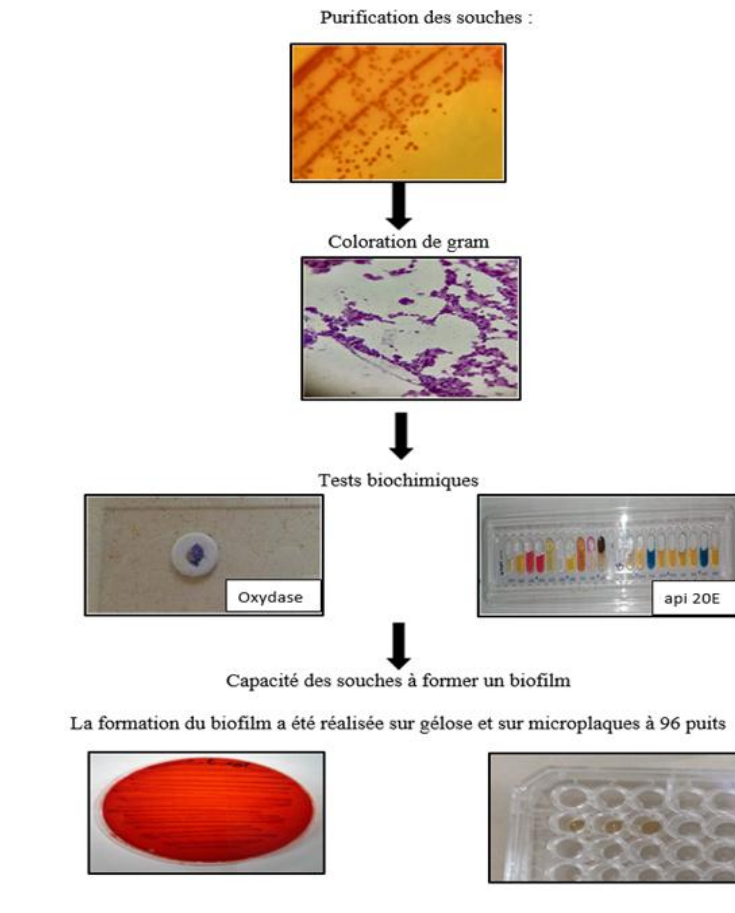
Escherichia coli ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 7803

Figure 3.9 : Contrôle des souches *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 7803

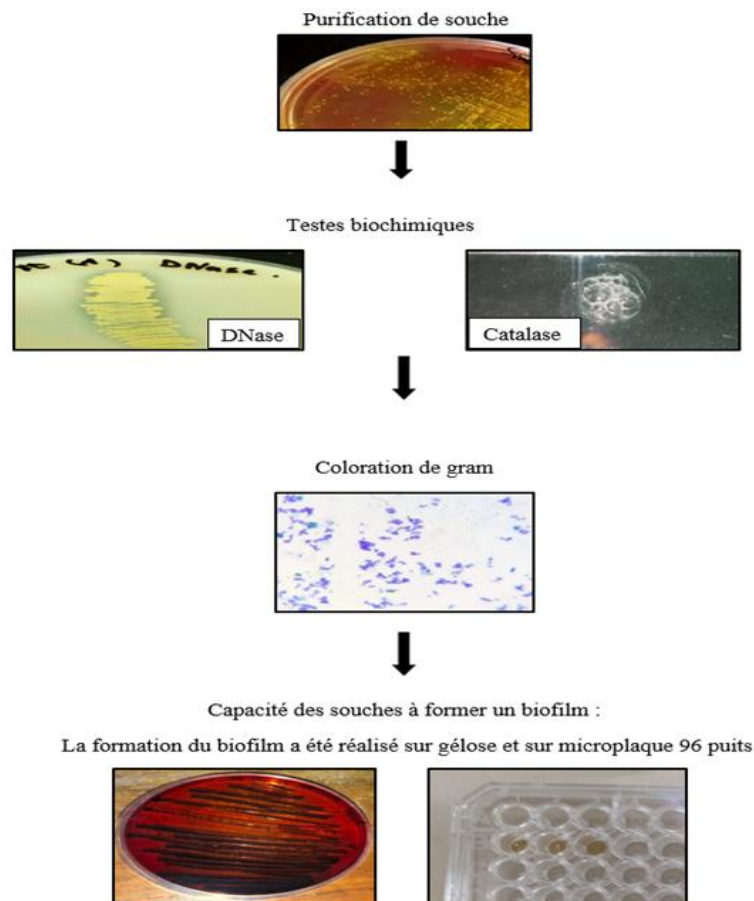
Staphylococcus aureus ATCC 25923

Figure 3.10 : Contrôle des souches *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

❖ **Vérification de la capacité des souches à former un biofilm**

- **La méthode de Rouge Congo Agar (RCA)**

Le Rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime est donnant des colonies noires sur milieu Rouge Congo Agar (RCA) (**Annexe 1**) contrairement aux colonies non productrices qui restent rouges (**Rewatkar et Wadher, 2013 ; Kara Terki, 2014**).

- **Formation de biofilms en microplaques**

L'étude de la formation de biofilms est réalisée par coloration au cristal violet (CV). Cette technique permet une évaluation quantitative de la formation de biofilms puisque la

coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé (Musk *et al.*, 2005). (Landeta *et al.*, 2013).

Le biofilm formé est coloré à l'aide d'une solution aqueuse de cristal violet (CV) à 1 % (Annexe 1) pendant 20 min à température ambiante puis solubilisé avec une solution d'éthanol absolu 96% (Annexe 3) pendant 30 min. La lecture est réalisée à l'aide d'un lecteur ELISA (Annexe 2) une longueur d'ondes de 560nm.

III.3.3 Préparation des inocula

III.3.3.1 Préparation de l'inoculum pour l'aromatogramme

Les souches de référence préalablement revivifiées *E coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* sont ensemencées dans des boîtes de pétri contenant de la géloses Mueller-Hinton (MH) puis incubées pendant 18 h à 37°C pour l'obtention des souches jeunes.

Après l'incubation, une concentration bactériennes égale à 10^8 UFC/ml correspondante à 0,5 Mc Farland été réalisé.

Cette étape est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (Annexe 2) à une longueur d'onde de 625 nm, l'absorbance doit comprise entre 0,08–0,1.

NB : L'ensemencement se fait dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum

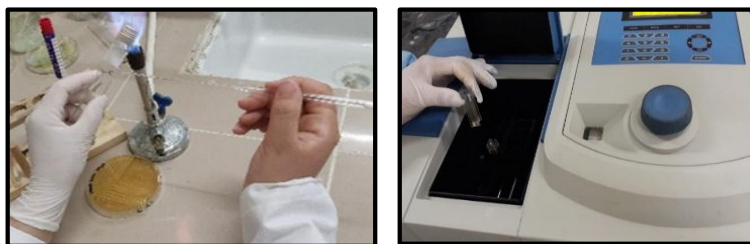


Figure 3.11 : préparation des suspensions bactériennes

III.3.3.1 Préparation de l'inoculum pour la microplaque

La souche de *S. aureus* préalablement revivifiés est ensemencé dans des tubes à centrifugation contenant du BHIB additionné de 1 % de glucose (Annexe 1) puis incubé dans une étuve à 37°C pendant 18h pour l'obtention des souches jeunes.

Après incubation le tube est centrifugé à 4000 tours par min pendant 15 min, Le surnagent contenant les déchets est par la suite éliminer et remplacer par une quantité de BHIB additionne de 1 % de glucose.

Cette suspension est ajustée à une densité optique (DO) à 625 nm de 0,08 à l'aide d'un spectrophotomètre.

NB : pour l'activité antibactérienne le BHIB sans glucose a été utilisé comme le milieu de culture.

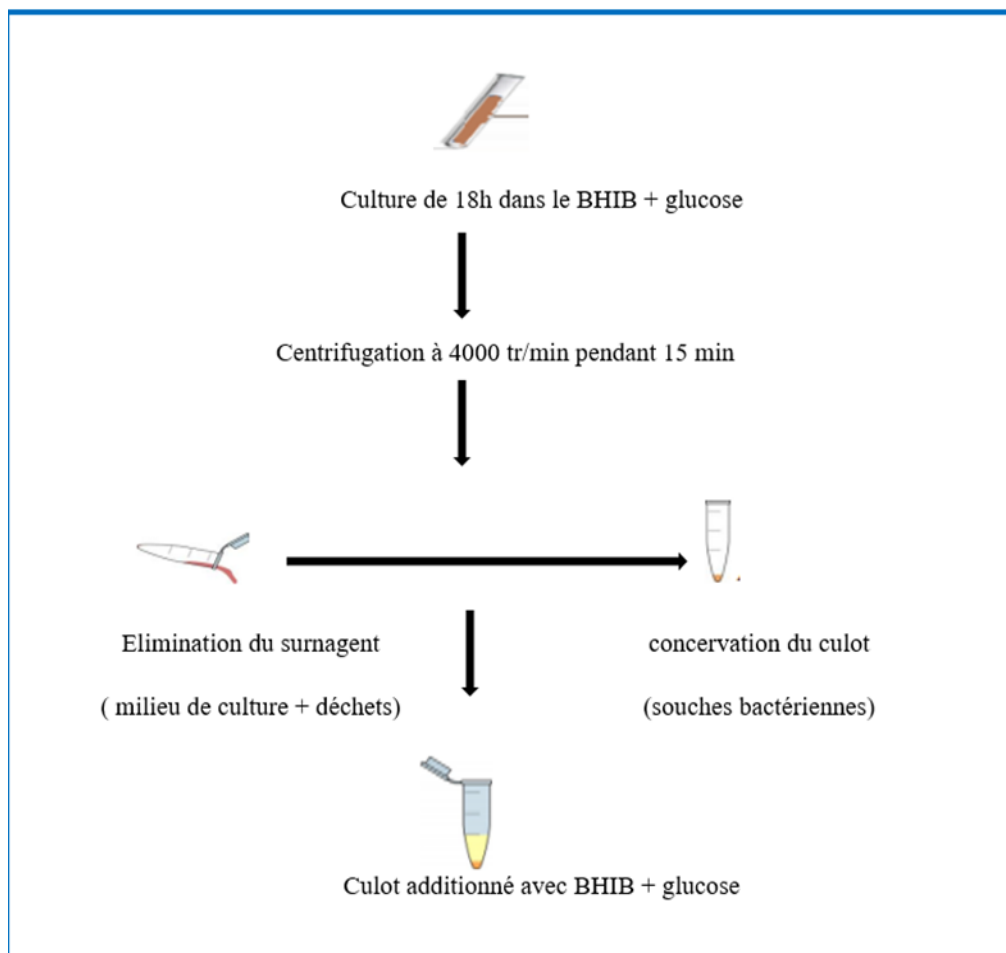


Figure 3.12 : préparation de l'inoculum (*S. aureus* ATCC 25923 dans du BHIB + glucose)

III.3.4 Préparation des dilutions

Les différents extraits aqueux et éthanoliques sont dissouts dans de l'eau distillée stérile (EDS) et une série de dilutions a été effectué comme suite :

- Solution mère : faire dissoudre 0.6 g de poudre d'extrait brute dans 1 ml d'EDS

- Réaliser une série de dilution à partir de la solution mère $1/2$, 10^{-1} , 10^{-2}

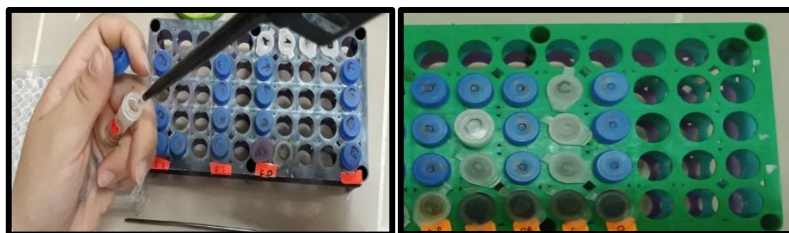


Figure 3.13: préparation de la série de dilutions

Tableau 3.1 : concentration des différents extraits

	Concentrations (g/ml)			
	Ail	Olivier du nord	E.A olivier de Laperrine	E.E olivier de Laperrine
Pure	0,312	0,830	0,6	0,6
1/2	0,156	0,402	0,3	0,3
10^{-1}	0,031	0,083	0,06	0,06
10^{-2}	0,003	0,0083	0,006	0,006

III.3.5 Étude de l'Activités antibactériennes des extraits bruts

Deux méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antimicrobien des extraits bruts de feuille de l'Olivier de Laperrine :

- la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier sur gélose
- la méthode de microplaques à 96 puits

III.3.5.1 Étude de l'Activités antibactériennes des extraits bruts sur gélose (Aromatogramme)

La méthode de diffusion à partir d'un disque solide (Sivropoulou *et al.*, 1996) a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne de ces germes vis-à-vis des extraits bruts.

Des boîtes de pétri contenant de la gélose MH sontensemencées par écouvillonnage à partir de la suspension microbienne.

Ensuite, des disques en papier wattman de 6 mm de diamètre stérile sont déposés sur la surface de la gélose préensemencé puis ajouter sur chaque disque 20 μ l d'extraits brutes a des concentrations différentes l'extrait pure (0.6 g/ml), 1/2 (0.3 g/ml), 10^{-1} (0.06g/ml), 10^{-2} (0.006 g/ml) à l'aide d'une micropipette.

Les boîtes sont mises au réfrigérateur à 4°C pendant 2h à fin d'accentuer la diffusion de l'extrait puis incubées pendant 24h à 37°C.

Les résultats sont lus après incubation par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (mm) à l'aide d'un pied à coulisse.

L'apparition d'une zone d'inhibition circulaire autour des disques dénote la sensibilité de la souche en question envers l'extrait étudiée. Plus la zone d'inhibition est large plus le germe est sensible.

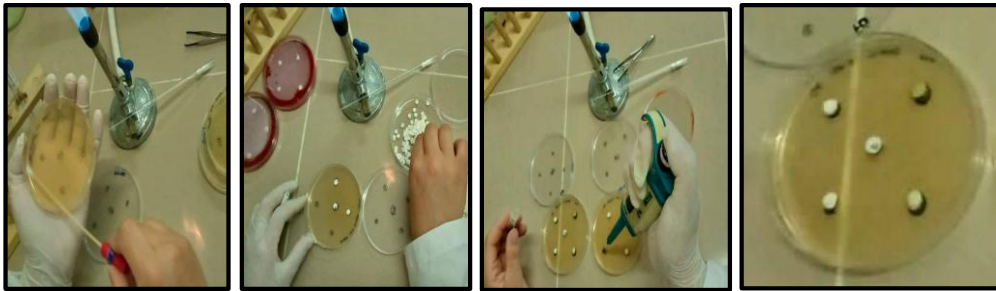


Figure 3.14 : les étapes de préparation d'un aromatochrome (activité antibactérienne)

III.3.5.2 Étude de l'Activités antimicrobiennes des extraits bruts sur micro- plaque

L'activité antibactérienne des extraits brutes des feuilles l'Olivier de Laperrine (aqueux et éthanoliques) a été déterminée vis- à-vis des souches bactériennes, en utilisant la méthode de l'indicateur coloré « résazurine » dans une microplaque à 96 puits.

La turbidité des cultures bactériennes cultivées pendant la nuit dans le milieu BHIB a été ajustée à 0.08-0.1 de DO à une longueur d'onde de 625 nm.

Dans les puits de microplaque, 50 µl de la suspension bactérienne ont été mélangés avec un volume égal de chacun des extraits ayant différentes concentrations pure (0.6 g/ml), 1/2 (0.3 g/ml), 10^{-1} (0.06 g/ml) et 10^{-2} g/ml), l'incubation est réalisée à 37 ° C pendant 24 h.

L'inoculum et le BHIB seul ont servi de contrôle positif et négatif, respectivement. Après incubation, 30 µl de la solution résazurine à 1% ($C_{12}H_6NNaO_4$) (**Annexe 1**) est ajoutée dans chacun des puits.

Ensuite, la microplaque a été incubée à 37° C pendant 2h. l'activité antibactérienne a été déterminée en fonction du changement de couleur de la résazurine qui nous renseigne sur l'état de vie des cellules par le biais de la réduction irréversible de la résazurine en résosfurine (**Chen et al., 2015**).

La réduction irréversible de la résazurine en résosufurine (indicateur coloré rose fortement fluorescent) témoin de la viabilité des cellules (Chen *et al.*, 2015).

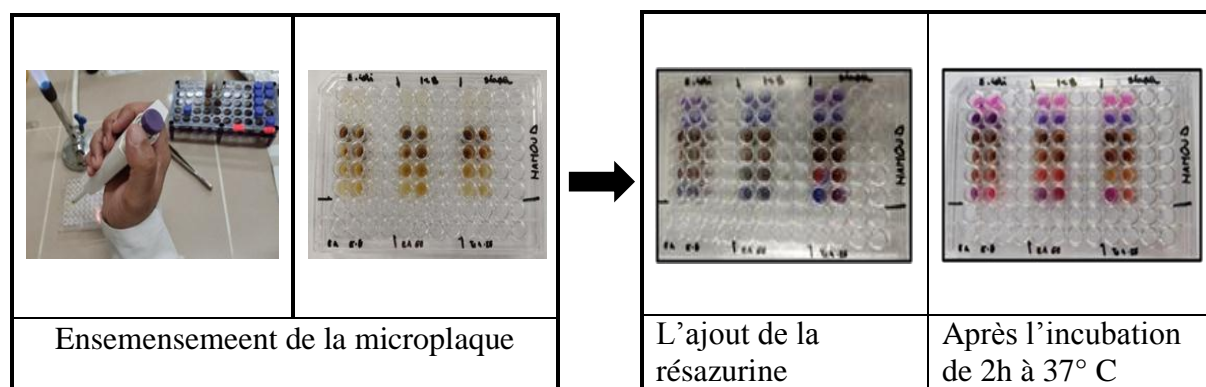


Figure 3.15 : préparation des microplaques (activités antibactériennes)

III.3.6 Activités anti-biofilm des extraits bruts

III.3.6.1 Activités anti-biofilm des extraits bruts sur gélose (aromatogramme)

L'activité anti-biofilm des extraits bruts étudiées a été évaluée par la technique de diffusion sur gélose (Sivropoulou *et al.*, 1996).

Des boîtes de pétri contenant de la gélose Rouge Congo (préparer au laboratoire) (**Annexe 1**) sont ensemencées par écouvillonnage à partir de la suspension microbienne standardisée.

Ensuite, des disques en papier wattman de 6 mm de diamètre stérile sont déposés sur la surface de la gélose pré ensemencé puis ajouter sur chaque disque 20 μ l d'extraits brute à des concentrations différentes (l'extrait pure, 1/2, 10^{-1} , 10^{-2}) à l'aide d'une micropipette.

Les boîtes sont mises au réfrigérateur à 4°C pendant 2h à fin d'accentuer la diffusion de l'extrait puis incubées pendant 24h à 37°C.

Les résultats sont lus après incubation par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (mm) à l'aide d'un pied à coulisse.

L'apparition d'une zone d'inhibition circulaire autour des disques dénote la sensibilité de la souche en question envers l'extrait étudiée. Plus la zone d'inhibition est large plus le germe est sensible.



Figure 3.16 : les étapes de préparation d'un aromatochrome (activité anti-biofilm)

III.3.6.2 Activités anti-biofilm des extraits bruts sur microplaques

Décrit à l'origine par **Christensen et al en 1985**, son principe repose sur la formation de biofilm dans les 96 puits qui composent la plaque.

Après un temps d'incubation nécessaire dans un milieu de culture adéquate, la microplaque est rincée à l'aide d'une pipette ou par immersion, afin d'éliminer les bactéries planctoniques.

Les staphylocoques forment leur biofilm au fond des puits, rendant l'utilisation des microplaques parfaitement adaptée puisqu'elles fournissent une surface importante sur laquelle les bactéries vont adhérer.

III.3.6.2.1 Ensemencement de la microplaque

L'activité anti-biofilm des extraits brutes des feuilles l'Olivier de Laperrine (aqueux et éthanoliques), feuilles l'Olivier du nord et de d'ail a été déterminée vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Cela en utilisant la méthode de de micro- plaque à 96 puits telle que décrite par **Saising et al., 2012**.

Dans les puits de microplaque, 50 μ l de la suspension bactérienne ont été mélangés avec un volume égal de chacun des extraits ayant différentes concentrations (pure, $1/2$, 10^{-1} et 10^{-2}) et incubé à 37 ° C pendant 24 h.

L'inoculum et le BHIB seul ont servi de contrôle positif et négatif, respectivement.

Après incubation, le surnageant de culture a été retiré, et les puits de microplaque ont été lavés trois fois avec de l'EDS pour éliminer les cellules non adhérentes.

Les bactéries adhérentes à la plaque ont été colorées avec 100 μ l de solution de CV à 0,1% (**Annexe 1**) pendant 15 minutes.

Ensuite, la microplaque a été lavée trois fois avec de l'EDS pour éliminer l'excès de cristal violet et séchée à température ambiante.

En suite 100 μ l d'éthanol à 95 % (v/v) ont été ajoutés à chaque puits pendant 15 minutes. L'inhibition du biofilm a été déterminée en enregistrant la densité optique (DO) à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (**Annexe 2**).

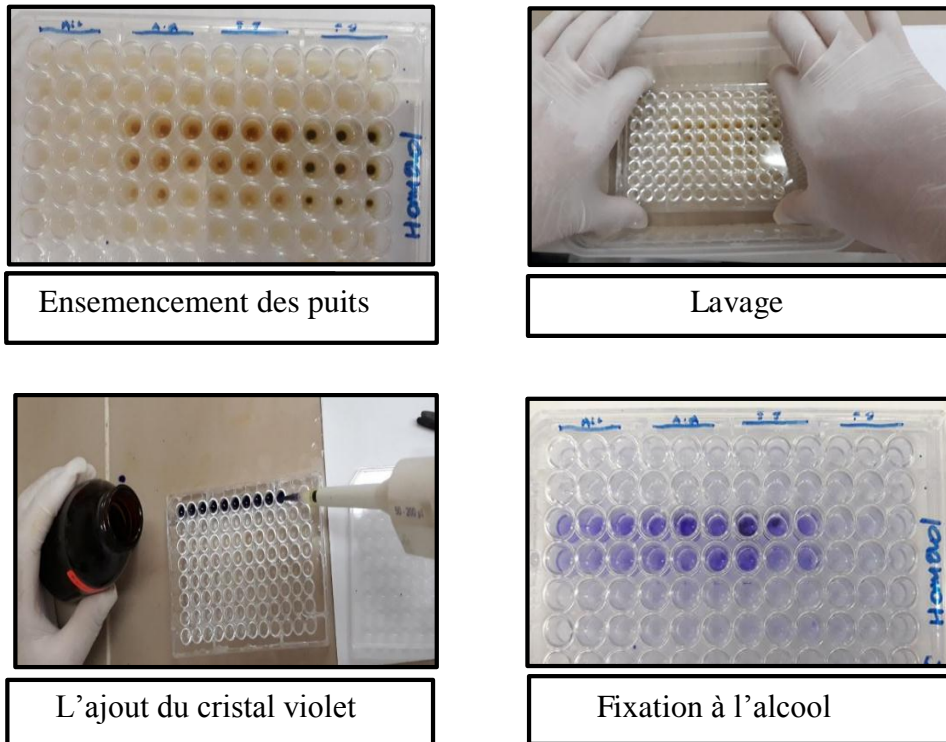


Figure 3.17 : les étapes de préparation des microplaques (activités anti-biofilm)

Remarque :

Pour chaque teste d'activité antibactérienne et anti-biofilms on a réalisé :

- **Evaluation des synergies**

Dans le but dévaluer d'éventuelle synergie entre l'antibiotique et les extraits de plante ou les plante entre eux, nous avant réaliser des associations entre extrait-ATB et extrait-extrait et cela en ajoutant a l'antibiotique un extrait de plante de concentration bien connue Ou en mélangent deux extraits.

Chapitre IV :
Résultats et
discussion

IV.1 Résultat du contrôle de la capacité des souches à former un biofilm :

IV.1.1 sur milieux solide (gélose) :

- *S. aureus* ATCC 25923 : formation de colonies de couleur noire sur la gélose rouge Congo (la souche est **formatrice de biofilm**) (Annexe 6).
- *E. coli* ATCC 25922 : formation de colonies de couleur claire sur la gélose rouge Congo (la souche est **Non formatrice de biofilm**) (Annexe 6).

IV.1.2 Sur milieu liquide (microplaque) :

Tableau 4.1 : vérification de la capacité des souches à former un biofilm sur microplaque (Landeta et al., 2013) :

<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Modérément formatrice	Faiblement formatrice	Non formatrice
0.135	2.766	2 < DO < 3	1 < DO < 2	DO < 1
0.120	2.614	2 < DO < 3	1 < DO < 2	DO < 1
0.108	2.553	2 < DO < 3	1 < DO < 2	DO < 1

La densité optique du biofilm former par *S. aureus* est d'une valeur de 2,766 ce qui nous permet de la catégoriser comme modérément formatrice de biofilm.

Tandis que densité optique de *E. coli* est d'une valeur de 0,13 ce qui permet de la catégoriser comme non formatrice de biofilm (Landeta et al., 2013).

IV.2 Résultats du Test anti-biofilm sur milieux solide pour *S. aureus* :

IV.2.1 Olivier de Laperrine :

IV.2.1.1 Extrait aqueux :

Tableau 4.2 : résultats de l'activité anti-biofilm de l'Olivier de Laperrine extrait aqueux sur *S. aureus* sur milieux solide (Annexe 8).

Concentrations	[Pur]			[1/2]			[10 ⁻¹]			[10 ⁻²]			ATB		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	31	25	25	22	23	23	21	21	20	12	11	11	21	26	21
Moyenne	27,0000			22,6667			20,6667			11,3333			22,6667		
Ecart type	3,46410			0,57735			0,57735			0,57735			2,88675		
Test ANOVA <i>P value</i>	0,000														

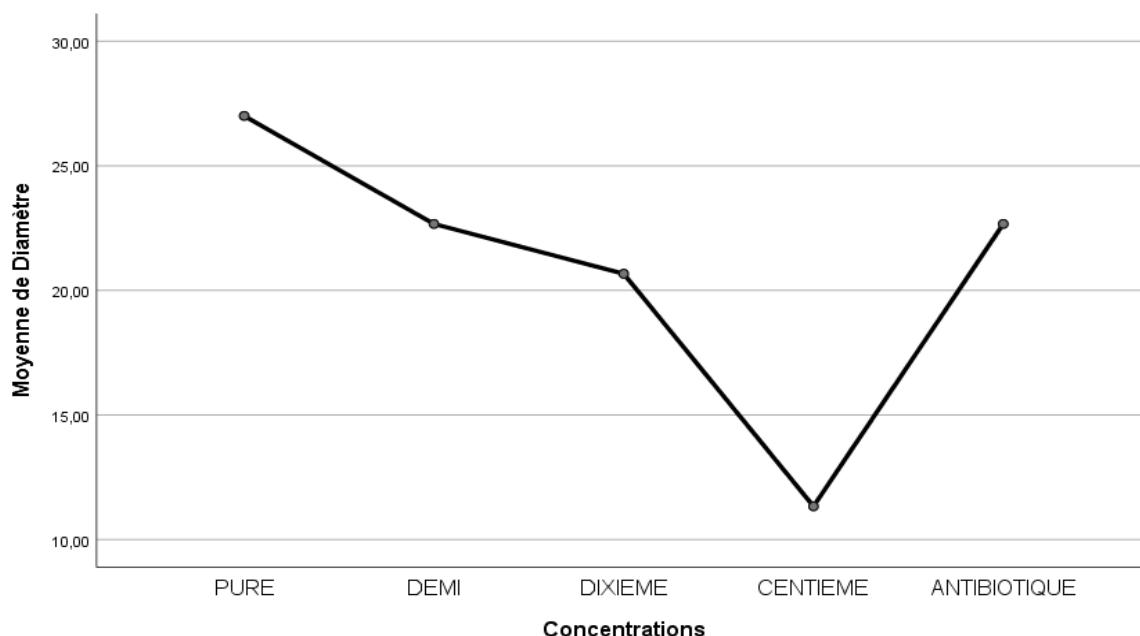


Figure 4. 1 : représentation graphique de la moyenne des diamètres d’inhibition de l’activité anti-biofilm de l’extrait aqueux de l’olivier de Laperrine sur milieu solide en fonction des concentrations

D’après le test de l’ANOVA, le P value est inférieur à 0.05, donc il y a une différence significative entre les groupes de concentrations différentes.

D’après ce dernier, la différence se situe entre les deux dernière concentration (0.06 g/ml, 0.006 g/ml) et les autres groupes, sachant que la concentrations (0.6 g/ml) de l’extrait se comporte mieux qu’un antibiotique.

IV.2.1.2 Extrait éthanolique :

Tableau 4.3 : résultats de l’activité anti-biofilm de l’Olivier de Laperrine extrait éthanolique sur *S. aureus* sur milieux solide (**Annexe 8**).

Concentrations	[Pur]			[1/2]			[10 ⁻¹]			[10 ⁻²]			ATB		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Diamètre de la zone d’inhibition (mm)	31	21	21	23	20	20	22	15	15	6	6	6	22	26	21
Moyenne	24,3333			21,0000			17,3333			6,0000			23,0000		
Ecart type	5,77350			1,73205			4,04145			0,00000			2,64575		
Test ANOVA P value	0,000														

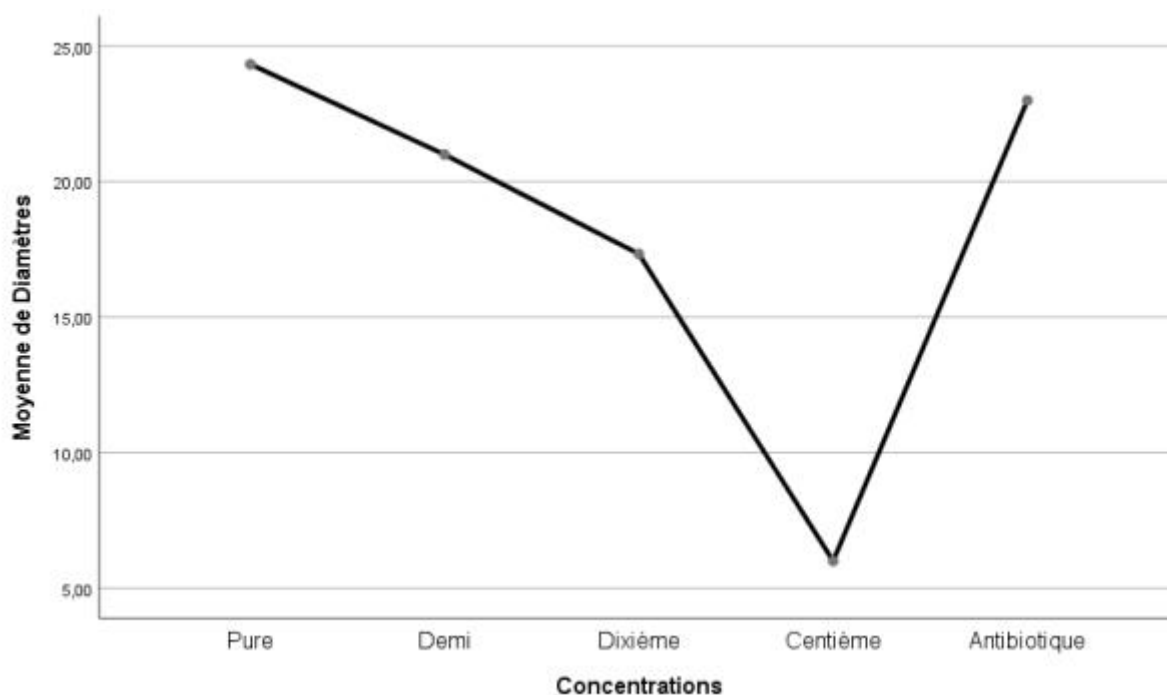


Figure 4. 2 : représentation graphique des moyennes des diamètres d’inhibition de l’activité anti-biofilm de l’extrait éthanolique de l’olivier de Laperrine sur milieux solide en fonction des concentrations

Le test ANOVA indique une P value inférieure à 0.05, il y a une différence significative entre les groupes de concentrations différentes.

Selon ce résultat la différence se situe entre les dernières concentration (0.3 g/ml, 0.06 g/ml, 0.006 g/ml) et la première concentration (0.6 g/ml), sachant que cette dernière se comporte mieux qu’un antibiotique.

IV.2.2 Olivier du nord :

Tableau 4.4 : résultats de l’activité anti-biofilm de l’Olivier du Nord extrait éthanolique sur *S. aureus* milieux solide (**Annexe 8**).

Concentrations	[Pur]			[1/2]			[10 ⁻¹]			[10 ⁻²]			ATB		
	R 1	R 2	R 3	R 1	R 2	R 3	R 1	R 2	R 3	R 1	R 2	R 3	R 1	R 2	R 3
Diamètre de la zone d’inhibition (mm)	18	22	25	16	24	22	15	17	19	6	6	6	27	27	31
Moyenne	21,6667			20,6667			17,0000			6,0000			28,3333		
Ecart type	3,51188			4,16333			2,00000			0,00000			2,30940		
Test ANOVA P value	0,000														

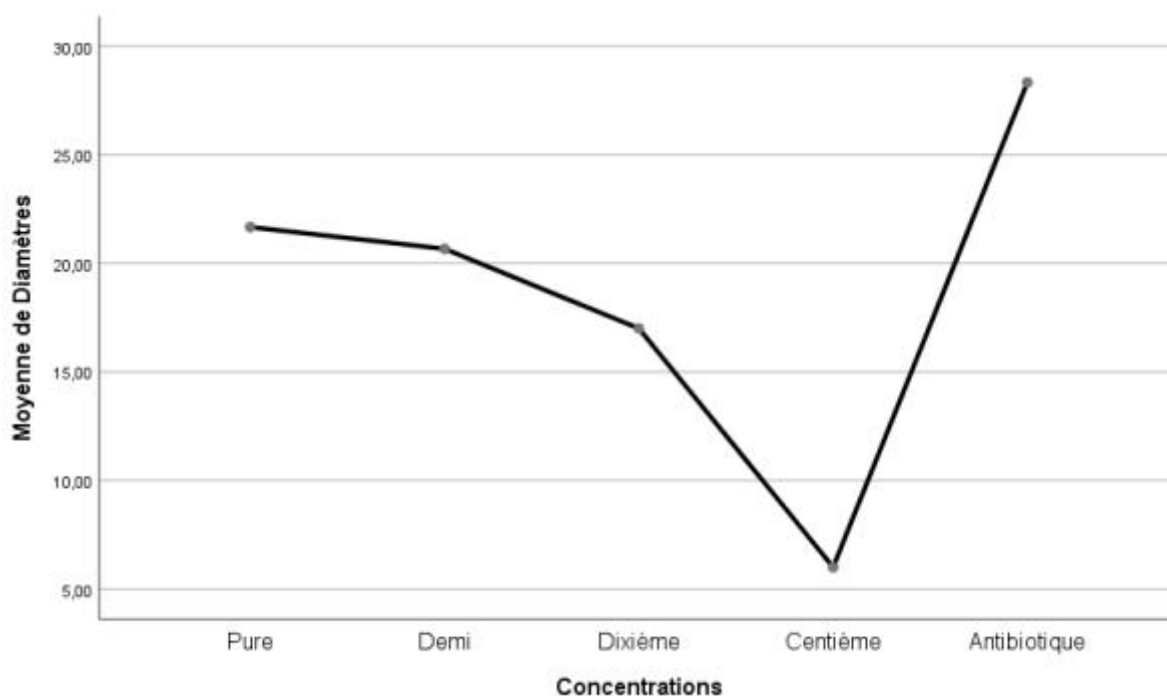


Figure 4. 3 : représentation graphique des moyennes des diamètres d’inhibition de l’activité anti-biofilm de l’extrait éthanolique de l’olivier du nord sur milieu solide en fonction des concentrations

Le P value est inférieur à 0.05, ce qui indique une différence significative entre les différents groupes de concentrations selon le test ANOVA.

La différence se situe entre la dernière concentration (0.008 g/ml) qui n’a pas réagi vis-à-vis de la souche et les autres groupes, sachant que les autres groupes de concentrations de l’extrait présente une activité faible comparé à l’antibiotique.

IV.2.3 Extrait d’ail :

Tableau 4. 5 : résultats de l’activité anti-biofilm de l’Ail extrait éthanolique sur *S. aureus* sur milieu solide (**Annexe 8**).

Concentrations	[Pur]			[1/2]			[10 ⁻¹]			[10 ⁻²]			ATB		
	R 1	R 2	R 3	R 1	R 2	R 3	R 1	R 2	R 3	R 1	R 2	R 3	R 1	R 2	R 3
Diamètre de la zone d’inhibition (mm)	44	46	41	26	40	29	16	24	18	6	6	6	27	27	31
Moyenne	43,6667			31,6667			19,3333			6,0000			28,3333		
Ecart type	2,51661			7,37111			4,16333			0,0000			2,30940		
Test ANOVA P value	0,000														

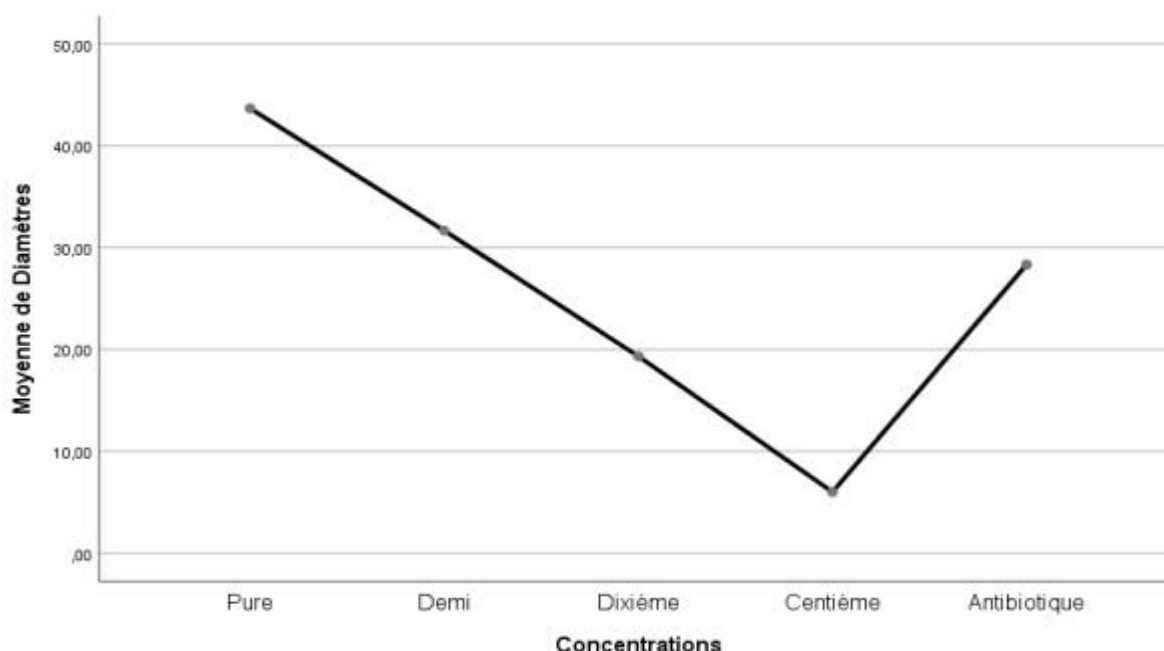


Figure 4. 4 : représentation graphique des moyennes des diamètres d'inhibition de l'activité anti-biofilm de l'extrait éthanolique de l'ail sur milieux solide en fonction des concentrations.

Il y a une différence significative entre les groupes de concentrations différentes, car le test ANOVA indique une P value inférieure à 0.05

Cette différence se situe entre la dernière (0.003 g/ml) concentration et les autres groupes, sachant que les deux concentrations de l'extrait (0.312 g/ml et 0.156 g/ml) se comportent mieux qu'un antibiotique.

IV.3 Résultats du Test anti-biofilm sur microplaque :

IV.3.1 Olivier de Laperrine :

IV.3.1.1 Extrait aqueux :

Tableau 4.6 : résultats de l'activité anti-biofilm de l'Olivier de Laperrine extrait aqueux sur *S. aureus* sur microplaque

Extrait aqueux		Concentrations				
Répétitions	Témoin +	Témoin -	Pure	[1/2]	10^{-1}	10^{-2}
R1	2,766	0,187	0,257	0,346	0,292	0,539
R2	2,614	0,168	0,365	0,354	0,606	0,545
R3	2,553	0,181	0,373	0,464	0,763	0,985
Moyenne	2,6443	0,1787	0,3317	0,3880	0,5537	0,6897
Ecart type	0,10969	0,00971	0,06479	0,06594	0,23982	0,25578
Test ANOVA P value	0,000					

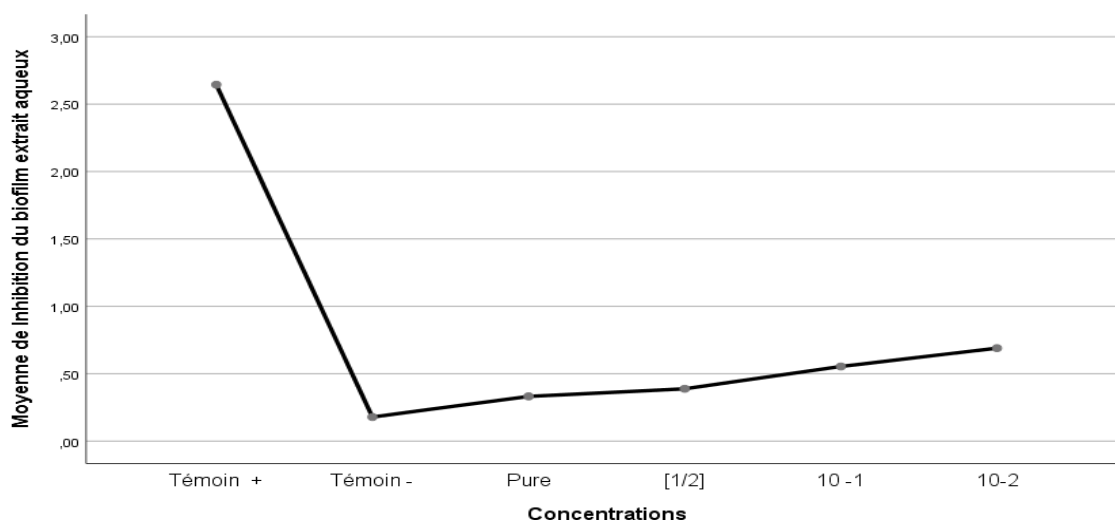


Figure 4. 5 : représentation graphique des moyennes d’inhibition de la formation du biofilm par l’extrait aqueux de l’olivier de Laperrine sur microplaque en fonction des concentrations

L’extrait aqueux de l’olivier de Laperrine élimine le biofilm comparativement au témoin positif (Test ANOVA significatif), il est presque à la hauteur du témoin négatif.

IV.3.1.2 Extrait éthanolique :

Tableau 4.7 : résultats de l’activité anti-biofilm de l’Olivier de Laperrine extrait éthanolique sur *S. aureus* sur microplaque

Extrait éthanolique		Concentrations				
Répétitions	Témoin +	Témoin -	Pure	[1/2]	10 ⁻¹	10 ⁻²
R1	2,866	0,194	0,324	0,346	0,620	0,425
R2	2,714	0,107	0,482	0,233	0,363	0,272
R3	2,653	0,125	0,338	0,541	0,492	0,486
Moyenne	2,74433	0,14200	0,38133	0,37333	0,49167	0,39433
Ecart type	0,109692	0,045924	0,087460	0,155809	0,128500	0,110247
Test ANOVA P value	0,000					

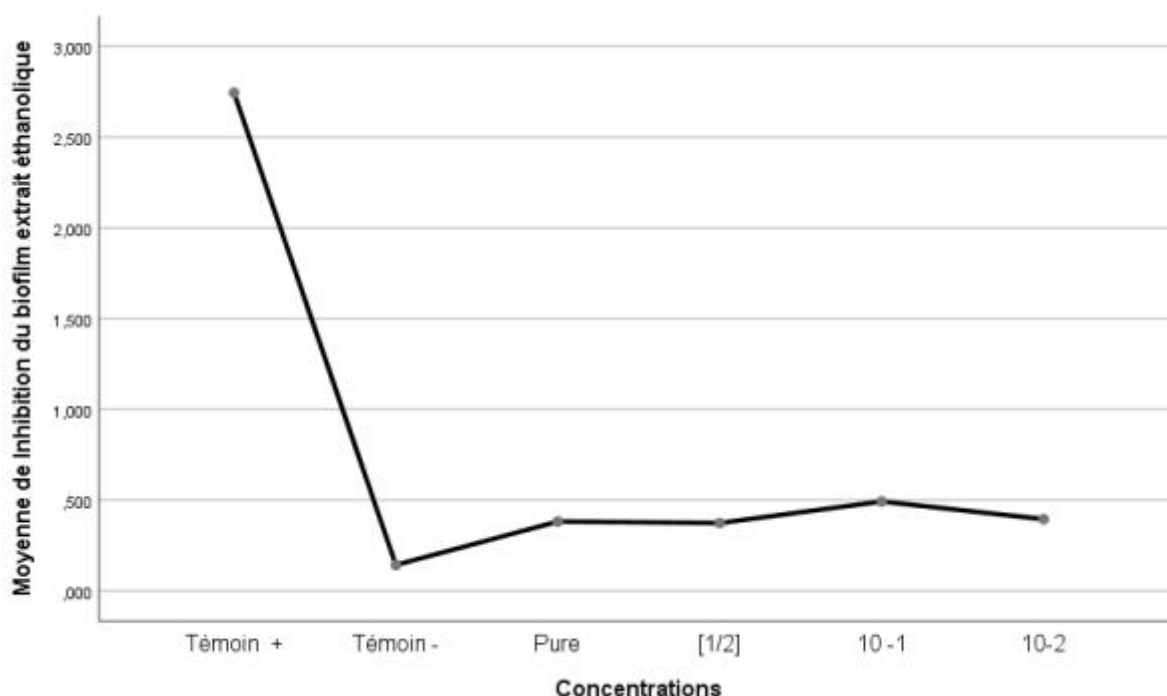


Figure 4. 6 : représentation graphique des moyennes d’inhibition de la formation du biofilm par l’extrait éthanologique de l’olivier de Laperrine sur microplaque en fonction des concentrations

Test ANOVA est significatif (P value < 0.05), l’extrait éthanologique de l’olivier de Laperrine élimine le biofilm comparativement au témoin positif, il est presque égal au témoin négatif.

IV.3.2 Olivier du Nord :

Tableau 4.8 : résultats de l’activité anti-biofilm de l’Olivier du Nord sur *S. aureus* sur microplaque

Extrait éthanologique		Concentrations				
Répétitions	Témoin +	Témoin -	Pure	[1/2]	10 ⁻¹	10 ⁻²
R1	2,956	0,224	0,155	0,194	0,204	0,190
R2	2,714	0,279	0,259	0,157	0,277	0,211
R3	2,653	0,125	0,185	0,183	0,221	0,242
Moyenne	2,77433	0,20933	0,19967	0,17800	0,23400	0,21433
Ecart type	0,160257	0,078041	0,053529	0,019000	0,038197	0,026160
Test ANOVA P value	0.000					

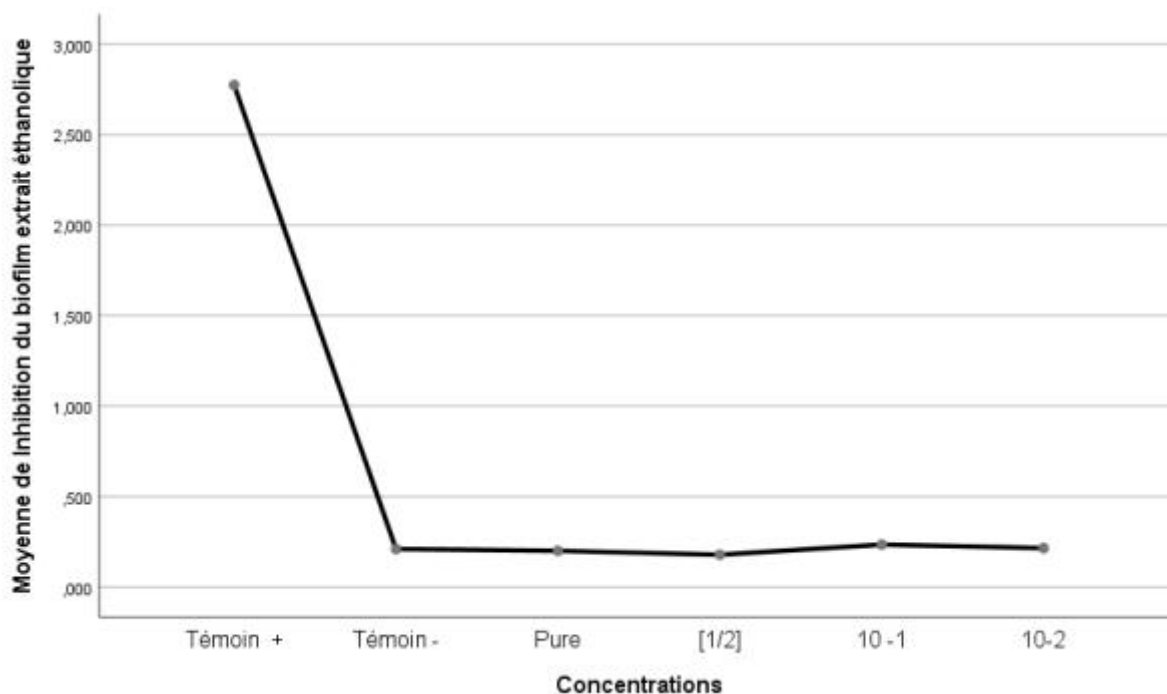


Figure 4.7 : représentation graphique des moyennes d'inhibition de la formation du biofilm par l'extrait éthanolique de l'olivier du nord sur microplaque en fonction des concentrations

Le test ANOVA est significatif, l'extrait éthanolique de l'olivier du nord est presque à la hauteur du témoin négatif, il élimine le biofilm comparativement au témoin positif.

IV.3.3 L'ail :

Tableau 4.9 : résultats de l'activité anti-biofilm de l'ail sur *S. aureus* sur microplaque

Extrait éthanolique		Concentrations				
Répétitions	Témoin +	Témoin -	Pure	[1/2]	10 ⁻¹	10 ⁻²
R1	2,814	0,123	0,178	0,450	0,828	2,661
R2	2,555	0,123	0,158	0,151	0,663	1,306
R3	2,753	0,094	0,129	0,149	0,532	0,798
Moyenne	2,77433	0,11300	0,15533	0,25000	0,67433	1,58833
Ecart type	0,034385	0,016462	0,024705	0,173208	0,148325	0,963056
Test ANOVA P value	0.000					

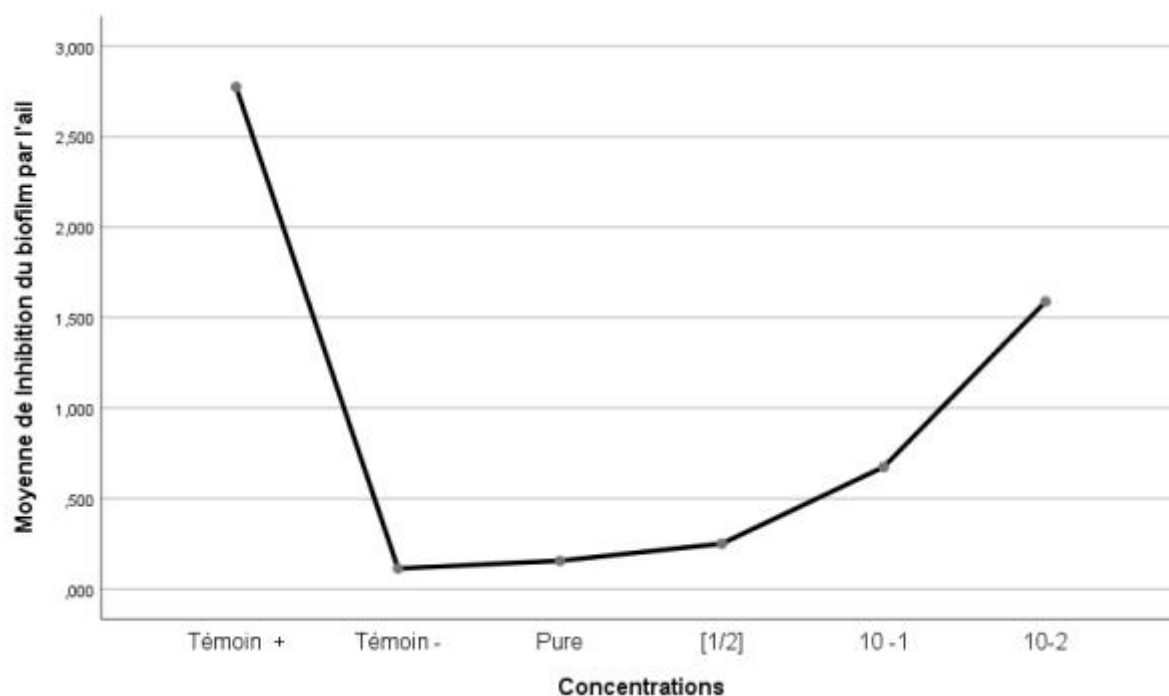


Figure 4. 8 : représentation graphique des moyennes d’inhibition de la formation du biofilm par l’extrait éthanolique de l’ail sur microplaque en fonction des concentrations

L’extrait éthanolique l’élimine le biofilm comparativement au témoin positif (Test ANOVA significatif),

D’après ce dernier, la différence se situe entre les deux dernière concentration (0.031 g/ml, 0.0031 g/ml) et les autres groupes, sachant que les concentrations (0.312 g/ml et 0.156 g/ml) de l’extrait il est presque à la hauteur du témoin négatif.

IV.4 Résultats des Tests de synergies :

IV.4.1 Sur milieu solide :

Tableau 4.10 : Résultats des Tests de synergies sur milieux solide (Annexe 9).

Concentrations	ATB			ATB + ON			ATB + ail			ON + ail		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Diamètre de la zone d’inhibition (mm)	27	27	31	20	26	30	25	25	31	28	24	31
Moyenne	28,3333			25,3333			27,0000			27,6667		
Ecart type	2,30940			5,03322			3,46410			3,51188		
Test ANOVA P value	0,783											

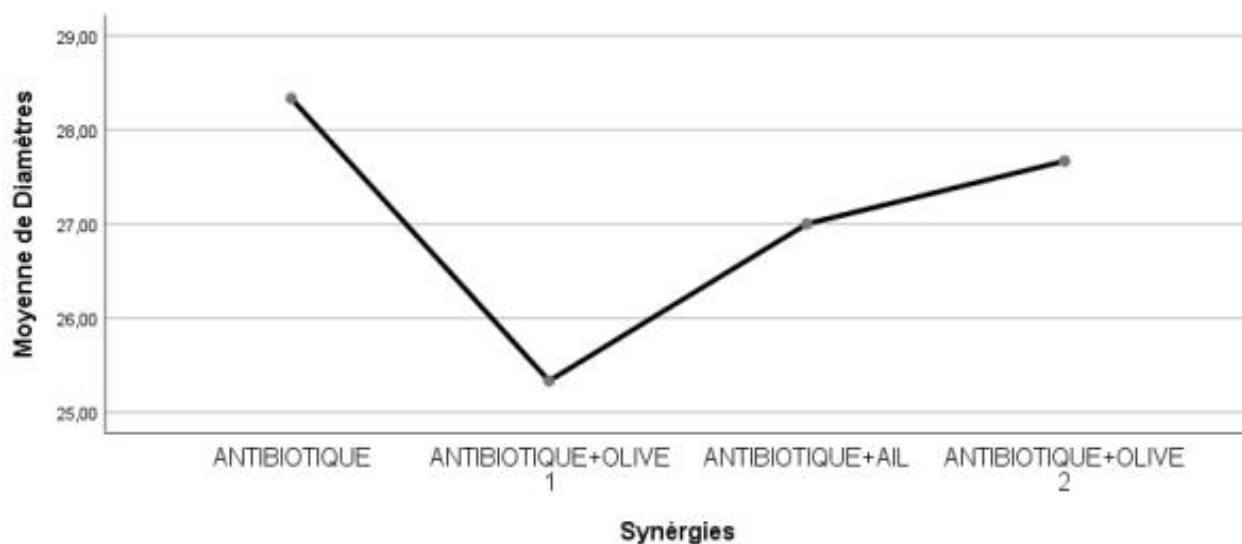


Figure 4. 9 : représentation graphique des moyennes des diamètres d'inhibition de l'activité anti-biofilm des extraits bruts sur milieu solide en fonction des synergies

Selon le test ANOVA le P value est supérieur à 0.05, ce qui indique une différence non significative entre les groupes de concentrations différentes. Donc il n'y a pas de synergie entre l'antibiotique et les autres extraits.

IV.4.2 Sur microplaque :

Tableau 4.11 : Tests de synergies sur microplaque

Tests de synergies	N	Moyenne (D.O)	Ecart type
Ail	12	0,39625	0,322297
Ail+ extrait aqueux OP	12	0,66700	0,727010
Ail+ extrait éthanolique OP	12	0,68642	0,885038
Ail + olivier nord	12	0,13750	0,049755
Test ANOVA P value		0,093	

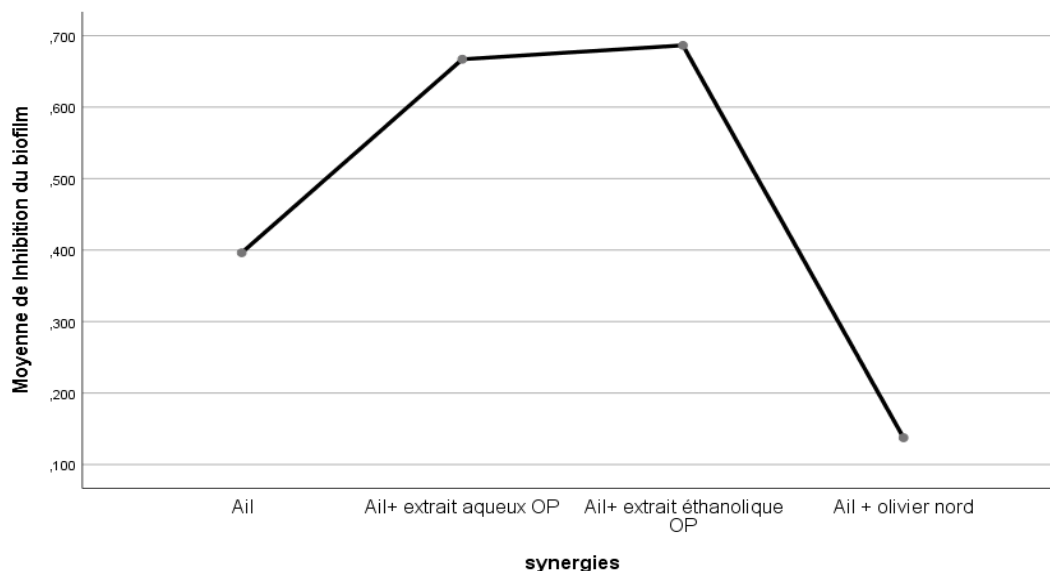


Figure 4. 10 : représentation graphique des moyennes des diamètres d’inhibition de l’activité anti-biofilm des extraits bruts sur microplaque en fonction des synergies

Le test ANOVA indique une P value supérieur à 0.05, il y a une différence non significative entre les groupes de concentrations différentes.

Cependant, On note la Présence d’une synergie entre l’ail et les extraits de l’olivier de Laperrine et Absence de synergie entre l’ail et l’extraits éthanolique de l’olivier du nord dans notre échantillon.

IV.5 Résultats du Test antibactérien sur trois souches bactériennes sur milieux solide :

IV.5.1 Olivier de Laperrine

IV.5.1.1 Extrait aqueux :

Tableau 4.12 : résultats de l’activité antibactérienne de l’Olivier de Laperrine extrait aqueux sur trois souche bactérienne milieux solide (**Annexe 7**).

Activités antibactériennes	N	Moyenne (Zone d’inhibition)	Ecart type
E. coli	12	6,2500	0,62158
S. aureus	12	10,6667	3,89249
Klebsiella	12	6,0000	0,00000
ATB	9	20,5556	6,87588
Test ANOVA P value		0,000	

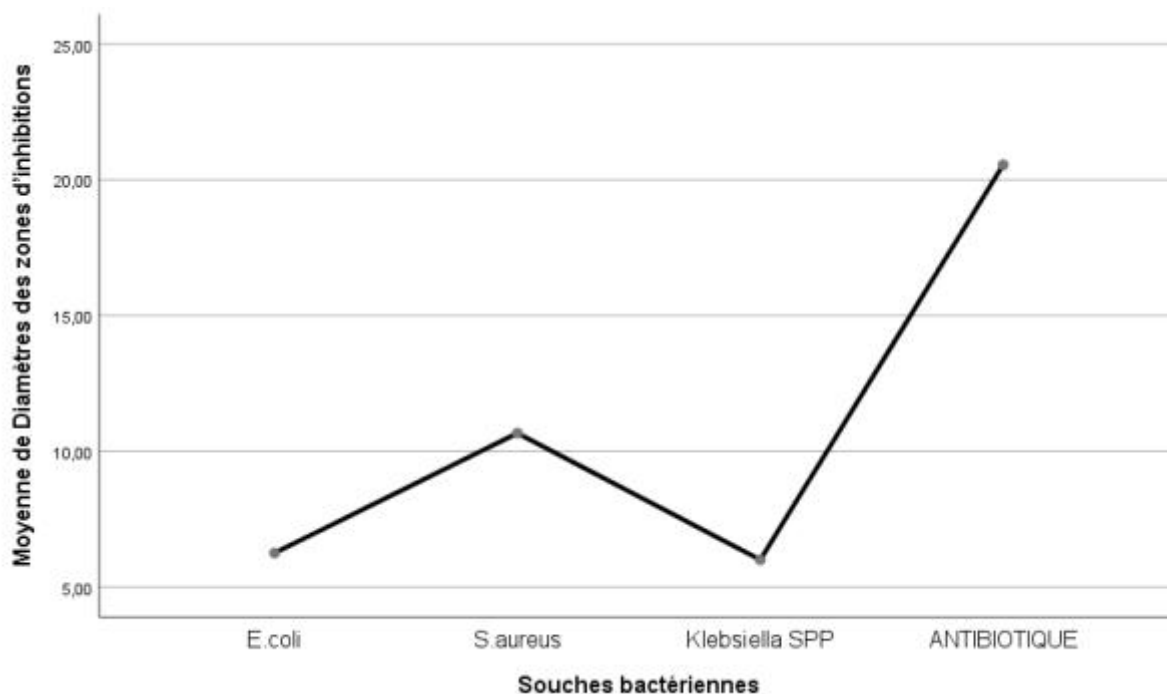


Figure 4. 11 : représentation graphique des moyennes des diamètres d'inhibition de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'olivier de Laperrine sur milieu solide en fonction des souches bactériennes

Le test ANOVA indique une P value inférieure à 0.05, il y a une différence significative entre les différentes souches bactériennes.

D'après ce dernier, la différence se situe entre les deux souches à gram négatif (*E. coli*, *Klebsiella*) et la souche à gram positif *S. aureus*, sachant que *S. aureus* présente une sensibilité vis-à-vis de l'extrait aqueux comparé à l'antibiotique.

IV.5.1.2 Extrait éthanolique :

Tableau 4.13 : résultats de l'activité antibactérienne de l'Olivier de Laperrine extrait éthanolique sur trois souches sur milieu solide (**Annexe 7**).

Activités antibactériennes	N	Moyenne (Zone d'inhibition)	Ecart type
E. coli	12	6,0000	0,00000
S. aureus	12	9,3333	1,06126
Klebsiella	12	6,0000	0,00000
ATB	9	19,6667	3,07318
Test ANOVA P value		0,000	

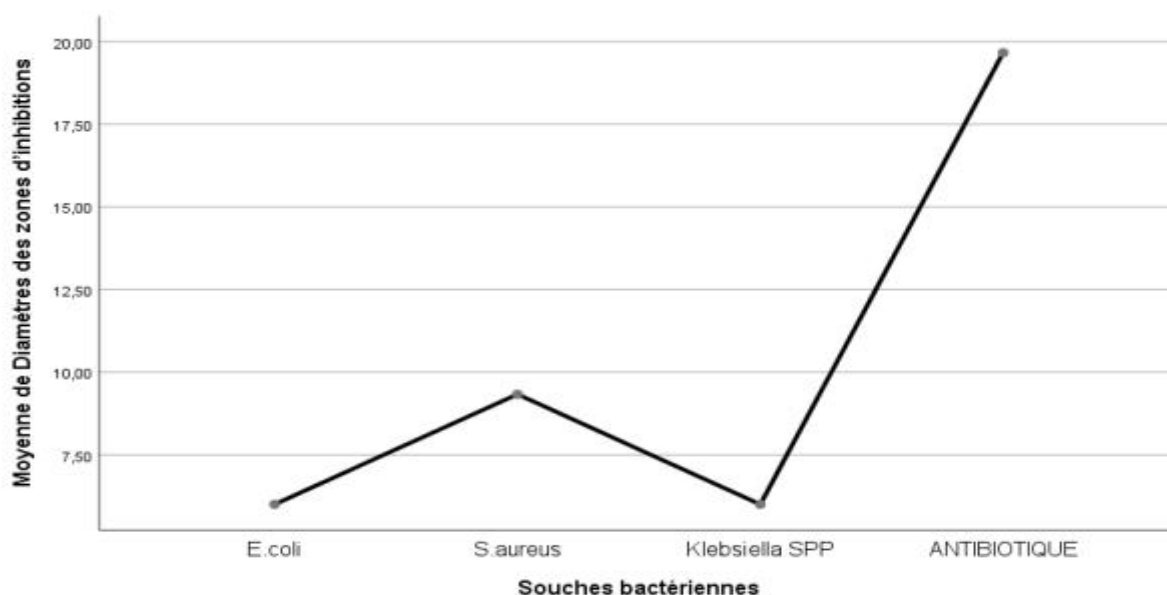


Figure 4. 12 : représentation graphique des moyennes des diamètres d’inhibition de l’activité antibactérienne de l’extrait éthanolique de l’olivier de Laperrine sur milieux solide en fonction des souches bactériennes

Le test ANOVA indique une P value inférieure à 0.05, il y a une différence significative entre les différentes souches bactériennes.

D’après la figure, la différence se situe entre les deux souches à gram négatif (*E. coli*, *Klebsiella*) qui présente une résistance vis-à-vis de l’extrait et la souche à gram positif *S. aureus*, sachant que *S. aureus* présente une sensibilité vis-à-vis de l’extrait éthanolique comparé à l’antibiotique.

IV.6 Résultats du Test antibactérien sur trois souches bactériennes sur microplaque :

Tableau 4.14 : résultats de l’activité antibactérienne de l’Olivier de Laperrine extrait aqueux et éthanolique sur trois souches sur microplaque

	<i>E. coli</i>		<i>Klebsiella</i>		<i>S. aureus</i>	
	Aqueux	Éthanolique	Aqueux	Éthanolique	Aqueux	Éthanolique
Temoin+	Rose	Rose	Rose	Rose	Rose	Rose
Temoin-	Bleu	Bleu	Bleu	Bleu	Bleu	Bleu
Pure	Bleu	Bleu	Bleu	Bleu	Bleu	Bleu
1/2	Rose	Rose	Rose	Rose	Bleu	Bleu
10 ⁻¹	Rose	Rose	Rose	Rose	Bleu	Bleu
10 ⁻²	Rose	Rose	Rose	Rose	Rose	Rose

Selon la réaction de la résazurine, les puits contenant les différentes souches ont réagi différemment avec les différentes concentrations de l'extrait aqueux et éthanolique de l'olivier de Laperrine.

Les résultats précédant indiquent que les extraits aqueux et éthanolique présentent une activité vis-à-vis des souches *E. coli* et *Klebsiella* que à une concentration de (0.6 g/ml) et vis-à-vis de *S. aureus* à des concentrations de (0.6 g/ml, 0.3 g/ml et 0.06 g/ml).

IV.8 Comparaison entre les différents extraits et antibiotiques :

Tableau 4.15 : résultats de comparaison entre les activités antibactérienne des différents extraits et antibiotiques

Comparaison des activités	N	Moyenne (D.O)	Ecart type
Olivier de Laperrine extrait aqueux	12	20,4167	6,17117
Olivier de Laperrine extrait éthanolique	12	17,1667	7,84895
Olivier du nord extrait éthanolique	12	16,3333	6,94568
Extrait éthanolique de l'ail	12	25 ,1667	15,11672
Antibiotique	12	25,5833	3,60450
Test ANOVA P value		0,030	

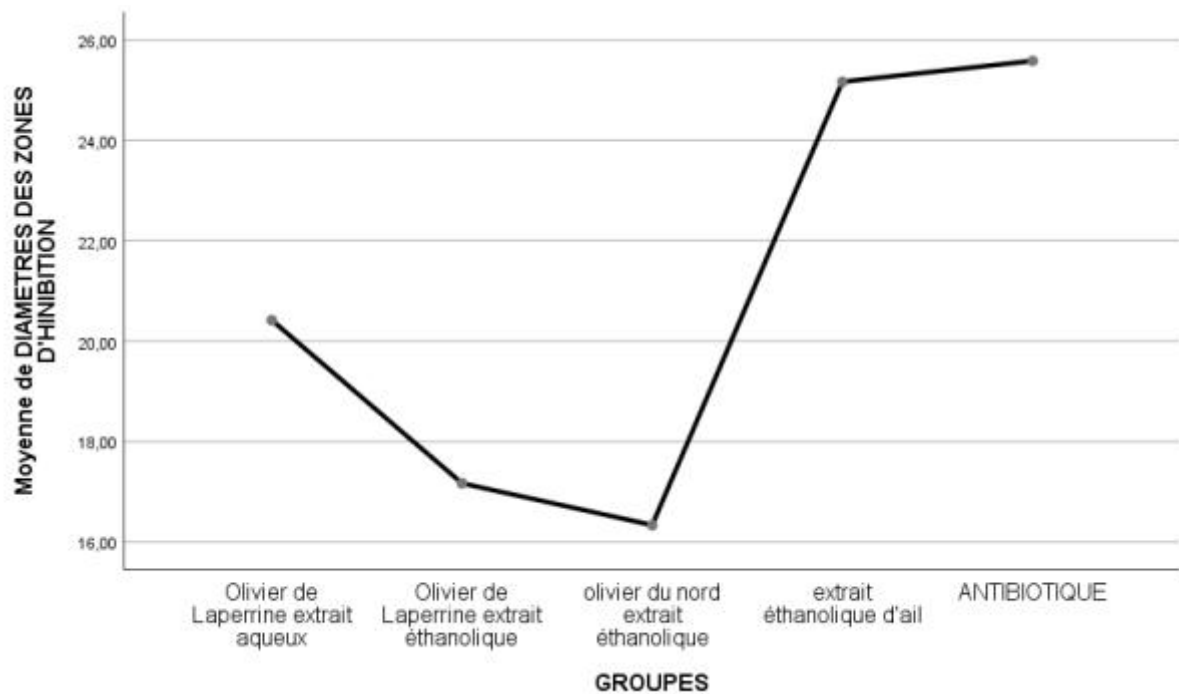


Figure 4.13 : représentation graphique des moyennes des diamètres d'inhibition de l'activité antibactérienne en fonction des différents extraits et antibiotiques

Le test ANOVA indique une P value supérieur à 0.05, il y a une différence non significative entre les groupes de concentrations différentes.

Tous les extraits s'avère active sur les souches bactériennes, mais ils réagissent différemment.

L'extrait éthanolique de l'ail et l'extrait aqueux de l'olivier de Laperrine ont une meilleure activité comparée aux autres extraits éthanoliques de l'olivier de Laperrine et l'olivier du nord.

Discussion

Discussions

❖ Capacité des souches à former un biofilm :

Selon nos résultats, la souche *S. aureus* ATCC 25923 à former des colonies noires sur la gélose rouge Congo indiquent la formation du biofilm, ce qui est en accord avec les résultats de (Merghini *et al.*, (2016), contrairement aux autres souches *E. coli* ATCC 25922 et *Klebsiella* ATCC 7803 qui ont formés des colonies claires (absence de formation de biofilm). Selon les auteurs (Freeman *et al.*, 1989 ; Mathur *et al.*, 2006), la classification des *staphylocoques* ensemencés sur milieu rouge Congo est rendue possible, en comparant la couleur des colonies.

Sur ce milieu les souches exprimant le Polysaccharide Intercellular Adhesion (PIA) donnent des colonies noires contre des colonies de couleur rouge pour les souches PIA négatives. Les souches à phénotype variable donnent des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Mathur *et al.*, 2006 ; Afreenich *et al.*, 2011 ; Rewatkar et Wadher, 2013 ; Bellifa, 2014).

Concernant la densité optique du biofilm former par *S. aureus* est d'une valeur de 2,766 ce qui nous permet de la catégoriser comme modérément formatrice de biofilm selon la méthode de (Landeta *et al.*, 2013).

La coloration au cristal violet (technique de quantification) est parmi les méthodes indirectes d'estimation de la production de biofilm sur différents types de support (Djordjevic *et al.*, 2002). La coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci (Musk *et al.*, 2005).

❖ Activité anti-biofilm sur milieux solide :

• L'Olivier de Laperrine

Les différentes concentrations de l'extrait aqueux montrent une activité vis-à-vis de *S. aureus*, cette activité augmente avec l'augmentation des différentes concentrations

Le test ANOVA indique une P value inférieure à 0.05, donc il y a une différence significative entre les groupes de concentrations différentes.

D'après ce dernier la différence se situe entre les deux dernières concentration (0.06 g/ml et 0.006 g/ml) et les autres groupes, sachant que la concentrations (0.6 g/ml) de l'extrait se comporte mieux qu'un antibiotique.

Concernant l'extrait éthanolique, il a aussi présenté une activité vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923, cette dernière augmente avec l'augmentation des différentes concentrations.

Le test ANOVA indique une P value inférieure à 0.05, donc il y a une différence significative entre les groupes de concentrations différentes.

L'analyse de ces résultats montre clairement un effet important de l'extrait de l'Olivier de Laperrine (aqueux et éthanolique) sur *S. aureus* et se révèlent très sensibles envers cette l'extrait.

Quelques soit l'extrait éthanolique ou aqueux l'olivier de Laperrine montre une activité envers *S. aureus*, cela peut être expliqué par le fait que le principe actif peut être dissous dans les deux solvants (l'éthanol ou l'eau).

Nos résultats sont similaires avec celle de (**Dominciano et al., 2016**) qui a confirmé la sensibilité de la souche *S. aureus* ATCC 25923 envers l'oleuropéine on association avec l'acide peracétique avec une zone d'inhibition de 10 mm \pm 1.6.

Selon (**Sandasi et al., 2007**) le prétraitement de la surface avec des extraits végétaux produit un film défavorable qui favorise le détachement, réduisant ainsi l'adhérence du biofilm sur la surface.

Les deux extraits aqueux (27mm) et éthanolique (24.3 mm) pure (0.6 g/ml) ont manifesté des diamètres plus importants que l'antibiotique (22.6 mm).

- **Olivier du nord**

L'extrait éthanolique présente une activité (P value inférieure à 0.05) vis à vis de *S. aureus*, cette dernière augmente avec l'augmentation des différentes concentrations.

L'analyse de ces résultats montre que la dernière concentration (0.008 g/ml) n'a pas réagi vis-à-vis de *S. aureus*, sachant que les autres groupes de concentrations de l'extrait présente une activité faible comparé à l'antibiotique.

Les deux plantes (olivier du nord et olivier de Laperrine) sont caractérisées par leurs composés phénolique l'oleuropéine.

Pour l'olivier de Laperrine nos résultats se rapproche de ceux de (**Edziri et al., 2019**) qui a étudiée l'activité de ce composé phénolique des différents types oliviers, ce dernier présente une activité inhibitrice de formation de biofilm.

L'extrait éthanolique de l'*Olea europaea* (sativa) pure (0.83 g/ml) à aussi bien réagit que le témoin positif avec des moyennes de diamètres 21.6 mm et 28.1 mm respectivement.

- **Ail**

L'extrait éthanolique montrent une très bonne activité (P value inférieure à 0.05) envers *S. aureus* ATCC 25923, cette activité augmente avec l'augmentation des différentes concentrations.

L'effet de cet extrait sur *S. aureus* se révèle très actif à une concentration de 0.312 g/ml.

L'extrait éthanolique de l'ail pure (0.312 g/ml) à mentore une activité deux fois mieux que l'antibiotique avec des diamètres moyens de 43.6 mm et 28.3 mm respectivement.

Les résultats obtenus, s'accorde avec ceux de (Mathur et al., 2013) qui ont montré que les huiles essentielles de l'*Allium sativum* peuvent réduire la formation du biofilm, et de (Mohsenipour et Hassanshahian, 2014) qui ont démontrés que les extraits d'ail sont susceptibles de provoquer divers mécanismes d'inhibition du biofilm, le principe actif de l'ail agit sur les structures du biofilm.

De plus (Sandasi, 2008) a confirmé les effets inhibiteurs des extraits d'ail contre la formation planctonique et la formation du biofilm.

On peut déduire que l'ail a un effet inhibiteur de la formation de biofilms quel que soit la technique d'extraction de ses principe actifs (extrait brut ou l'huile essentiel).

❖ **Activité anti-biofilm sur milieux liquide (microplaque) pour *S. aureus* :**

- **Olivier de Laperrine :**

La DO des puits contenant les différentes concentrations de l'extrait aqueux sont inférieures, à celle du contrôle positif, témoignant ainsi l'absence de formation du biofilm en présence de l'extrait aqueux.

Donc l'extrait aqueux de l'olivier de Laperrine élimine le biofilm comparativement au témoin positif (Test ANOVA significatif), il est presque à la hauteur du témoin négatif.

La DO des puits contenant les différentes concentrations de l'extrait éthanolique sont inférieures, à celle du contrôle positif, témoignant ainsi l'absence la formation du biofilm en présence de l'extrait éthanolique, traduisent ainsi l'élimination du biofilm qui est presque à la hauteur du témoin négatif.

Nos résultats sont en accord avec (Carraro et al., 2014) qui a démontré que l'activité anti-biofilm de l'olive pourrait être due à un effet synergique de certains phénols contenus dans les extraits d'olive, et avec (Taweechaisupapong et al., 2012) qui affirme que l'activité antibactérienne et anti-biofilm de l'oleuropéine pourrait être due aux composés phénoliques, ces derniers ont la capacité d'augmenté la perméabilité des membranes cellulaires, facilitant ainsi leur rupture.

- **Olivier du nord**

Les puits contenant les différentes concentrations de l'extrait révèlent une DO inférieure à celle du contrôle positif, témoignant ainsi l'absence de formation du biofilm (Test ANOVA significatif), l'élimination de ce dernier est presque à la hauteur du témoin négatif.

Nos résultats sont en concordance avec les résultats de (Edziri et al., 2019) et ceux de (Dominciano et al., 2016) qui a démontré l'activité de l'extrait de l'olivier dans l'élimination du biofilm.

- **Ail**

Les puits contenant les différentes concentrations de l'extrait, présentent une DO inférieure à celle du contrôle positif.

L'extrait éthanolique de l'ail élimine le biofilm comparativement au témoin positif (Test ANOVA significatif), il est presque à la hauteur du témoin négatif.

Nos résultats s'accordent avec ceux de (Zhang et al., 2019) qui a montré que l'extrait d'ail inhibe la formation du biofilm. Et (Nazzaro et al., 2022) et (Somrani et al., 2020) qui ont démontrés que l'*Allium sativum* exerce une activité inhibitrice de biofilms intéressante.

❖ Tests de synergie

- **Sur milieux solide**

Le test ANOVA indique une P value supérieur à 0.05, il y a une différence non significative. Donc il y a absence de synergie entre l'antibiotique et les autres extraits.

L'interaction avec les antibiotiques survient lorsque les composés bioactifs des plantes partagent les mêmes mécanismes pharmacocinétiques d'absorption, de distribution ou d'excrétion que les ATB. La compétition entre ces différents composés peut causer une hausse ou une baisse de la concentration de l'antibiotique sur le site d'action. (Asher et al., 2017).

- **Sur microplaques**

Présence de synergie entre l'ail et les extraits de l'olivier de Laperrine et absence de synergie entre l'ail et l'extraits éthanolique de l'olivier du nord.

Cependant le test ANOVA indique une P value supérieur à 0.05, cela ne nous permet pas de conclure à une présence de synergie il y a une différence non significative entre les groupes de concentrations différentes.

(Dominciano et al., 2016) a prouvé que la combinaison de l'oleuropéine avec le l'acide peracétique (PAA) a augmenté l'activité de ce dernier.

Selon (Taweechaisupapong et al, 2012) l'activité de l'oleuropéine pourrait être due aux composés phénoliques, ces derniers ont la capacité d'augmenté la perméabilité des membranes cellulaires, facilitant ainsi leur rupture.

Cependant, peu de travaux ont été réalisés sur l'extrait des feuilles de l'olivier ce qui rend difficile la comparaison de nos résultats avec d'autre résultats.

- ❖ **Activité antibactérienne :**

- **Olivier de Laperrine**

L'extrait aqueux (0.6g/ml) présente une activité vis-à-vis de *S. aureus* (P value inférieure à 0.05) avec une moyenne de diamètre de 10 mm, contrairement aux deux autres souches *E. coli* et *Klebsiella* qui ne présente aucune zone d'inhibition (6 mm). Ce qui a été validé par les études de **(Sweedan et al., 2019)**.

L'activité de l'extrait éthanolique est légèrement faible par rapport à celles des témoins (antibiotiques) pour la *S. aureus* qui présente une sensibilité vis-à-vis de l'extrait éthanolique avec un diamètre moyen de 9 mm. Contrairement aux deux autres souches *E. coli* et *Klebsiella* qui ne présente aucune zone d'inhibition (6 mm).

Concernant l'extrait éthanolique (0.6g/ml) des feuilles de l'olivier de Laperrine, une activité antibactérienne était détectée uniquement vis-à-vis de *S. aureus* (P value inférieure à 0.05)

Les deux extraits ont montré un effet plus important chez les bactéries à gram positif (*S. aureus*) par rapport aux bactéries gram négatif (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*).

La résistance de ces dernières (gram négatif) n'est pas surprenante ; en effet, ces bactéries possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides qui est en relation avec la

nature de leurs membranes externes composées de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes (Yakhlef et al., 2011).

Nos résultats sont presque identiques avec celle de (Sanchez-Gutiérrez et al., 2021) qui a confirmé la sensibilité de la souche *S. aureus* ATCC 25923 vis à vis de l'extrait brut des feuilles d'olive et la résistance de *E. coli* à cet extrait, et de (Djenane et al., 2012) qui a montré que l'extrait brut et l'oleuropéine présente une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* avec un diamètre moyen de 16.33 mm \pm 1.80 et 30.18 mm \pm 2.10 respectivement.

❖ **Activité antibactérienne sur microplaque :**

• **Olivier de Laperrine**

Les puits contenant les différentes souches ont réagi différemment avec les différentes concentrations de l'extrait aqueux et éthanolique de l'olivier de Laperrine.

Les résultats précédant indiquent que les extraits aqueux et éthanolique présentent une activité vis-à-vis des souches *E. coli* et *Klebsiella* que à une concentration de (0.6 g/ml) et vis-à-vis de *S. aureus* à des concentrations de (0.6 g/ml, 0.3 g/ml et 0.06 g/ml). La sensibilité de *S. aureus* envers l'extrait des feuilles d'olives a été confirmée par les travaux de (Abbasvali et al., 2015) et (Topuz et Bayram, 2021).

On remarque que dans les puits contenant l'extrait aqueux et éthanolique à une concentration de (0.6g/ml) la couleur de la rézasurine n'a pas viré du bleu au rose, tel qu'on l'observe dans les puits contenant le témoin négatif, ce qui indique la présence d'une activité de ces extraits envers toutes les souches testées.

Contrairement aux puits contenant l'extrait aqueux et éthanolique à une concentration de (0.3 g/ml, 0.06 g/ml et 0.006 g/ml) où la couleur de la rézasurine vire du bleu au rose, tel qu'on l'observe dans les puits contenant le témoin positif, ce qui indique la résistance des souches *Klebsiella* et *E. coli* à ces concentrations.

La réduction irréversible de la rézasurine en résofurine (indicateur coloré rose fortement fluorescent) témoin de la viabilité des cellules (Chen et al., 2015).

❖ Comparaison entre les différents extraits et antibiotiques :

Tous les extraits s'avèrent actifs sur les souches bactériennes, mais ils réagissent différemment.

L'extrait éthanolique de l'ail et l'extrait aqueux de l'olivier de Laperrine ont une meilleure activité anti-biofilm comparée aux autres extraits éthanoliques de l'olivier de Laperrine et l'olivier du nord.

Conclusion

Conclusion

Conclusion :

De nos jours, un grand nombre de plantes possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, en pharmacie, en industrie agroalimentaire et en agriculture, cela du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives.

Ainsi, la nécessité de développer des nouvelles stratégies et des technologies alternatives en tant qu'agents antibactériens et inhibiteurs de biofilm est devenue plus qu'essentielle, notre étude s'inscrit dans cette optique c'est à dire étudié l'activité antibiofilm et anti bactérienne de certains plantes (seule ou en synergie) et nous terminant par les conclusions suivantes :

- Parmi les souches étudiés, seule *S. aureus* c'est avéré formatrice de biofilm.
- Nous avons enregistré une activité antibiofilm des extraits de l'olivier de Laperrine (*Olea laperrinei*), et l'olivier du nord (*Olea europaea*) et les gousses d'ail (*Allium sativum*) vis à vis de *S. aureus*.
- Une activité antibactérienne de l'extrait de l'olivier de Laperrine (*Olea laperrinei*) a été enregistré uniquement sur *S. aureus* et une absence d'activité vis-à-vis de *E. coli* et *Klebsiella*, donc une activité plus importante sur les bactéries gram positives que sur les gram négatives.
- Aucune synergie n'a été démontrée entre les extraits étudiés et les ATB, cependant une synergie a été enregistré avec quelques extraits de plante (ail+ olivier de Laperrine) mais sans aucune signification statistique.

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

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

Références bibliographiques

A

- **Abascal K., Ganora L. et Yarnell E. (2005).** The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19(8): 655-660.
- **Abbasvali M., Koutamehr M.E., Moshtaghi H. et Eskandari M.H.(2015).**Effect of leaf extract of olive (*Olea europaea*) cultivars on *Staphylococcus aureus*. *Online Journal of Veterinary Research*© .Volume 19(8): 519-529, 2015.
- **Abaza L., Talorete TP., Yamada P., Kurita Y., Zarrouk M. et Isoda, H. (2007).** Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 71(5), 1306-1312.
- **Agarwal K.C. (1996).** Therapeutic action of garlic constituents. *Med. Res. Rev.*, 16 (1), 111-124.
- **Ahsan M., Chowdhury A.K.Z., Islam S.N. et Ahmed Z.U. (1996).** Garlic Extract and Allicin: Broad Spectrum Antibacterial Agents Effective Against Multiple Drug Resistant Strains of *Shigella dysenteriae* type 1 and *Shigella flexneri*, Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholera*. *Phytotherapy Research*,10, 329-331.
- **Aiche-Iratni G., Moualek I., Mestar-Guechaoui N., Mezaache-Aichour S., Zerroug M.M. et Houali K. (2015).** *In vitro* evaluation of biological activities of *Pistacia lentiscus* aqueous extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(11): 133-139.
- **Akemi M., Masamichi I., Masanori O. et Noriaki O. (2001).** Cosmetic for protecting and improving aged skin having AGEs degrading activity/Cosmetic having AGEs degrading activity and effective in protecting and improving aged skin. Patent written in Japanese. JP 99-300806 19991022, 5 pp.
- **Akbas M.Y. (2015).** Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. pp 383-394.

- **Alessandra C.R., Carla G.M., Flávio C.P., Fernando Del Fiol S., Jozala A., Chaud M., Marta Vila M.D.C., Teixeira J.A. et Balcão V.M. (2016).** Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art DOI: 10.1016/j.micres.2016.04.008.
- **Alharbi K.N., Naghmouchi S. et Al-Zaban M. (2021).** Evaluation of Antimicrobial Potential and Comparison of HPLC composition, Secondary Metabolites Count, and Antioxydant Activity of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* Extracts. DOI :10.1155/2021/9081536.
- **Aliyiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S. et Chinou I.B. (2001)** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem* 40: 4168–70.
- **Alnnasouri M. (2010).** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France *Appl. Environ. Microbiol.* 52, pp 1242-1246.
- **Altioek E., Baycin D., Bayraktar O. et Ulku S. (2008).** Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea L.*) by adsorption on silk fibroin. *Sep. Purif. Technol.* 62 (2): 342-348.
- **Al-Qarawi A.A., AL-Damegh M.A. et Elmoughy S.A. (2002).** Effect of freeze dried extract of *Olea europaea* on the pituitarythyroid axis in the rats. *Phytotherapy Research.* 16: 286-287.
- **Anand S., Singh D., Avadhanula M., Marka S. 2014.** Development and Control of Bacterial Biofilms on Dairy Processing Membranes. *Compre. Revi in Food. Science and FoodSafety.* 13, pp 18-33.
- **Anderson G.G. et O'Toole G.A. (2008).** Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*;322:85–105.
- **Andreadou I., Iliodromitis E.K., Mikros E., Constantinou M., Agalias A., Agalias A., Magiatis P., Skaltsounis A.L., Kamber E., Tsantili-kakoulidou A. et Kremastinos D.T. (2006).** The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic antioxydative and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits, *136 (8): 9-2213.*
- **Amara I., Miled W., Slama R.B. et Ladhari N. (2018).** Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* ; 57:115-30.

- **Andrikopoulos N.K., Antonopoulou S. et Kaliora A.C. (2002).** Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *Lebensm. Wiss. Technol.* 35: 479-484.
- **Aouidi F. (2012).** Etude et Valorisation des Feuilles d'Olivier *Olea Europaea* dans l'Industrie Agro-Alimentaire. Thèse de Doctorat. Université de Carthage, Tunisie : 3.
- **Araqas H. (2013).** Extraction des composés phénoliques de feuilles d'olivier et étude de leurs activités biologiques. Mémoire d'Obtention du Master CMBA. Univ Sidi Mohammed Ben Abellah, FST FES : 3-4.
- **Arab K., Bouchenak O. et Yahiaoui K.(2013).** Evaluation de l'activité des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. *Afrique SCIENCE* numéro 09(3) pp. 159-166.
- **Asher G., Corbett A. et Hawke R. (2017).** Common Herbal Dietary Supplement-Drug Interactions . *Am Fam Physician* , pp. 101-107.
- **Aziz N.H., Farag S.E., Mousa L.A et Abo-zaid M.A. (1998).** Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*, 93: 43-54.

B

- **Baali-Cherif D. et Besnard G. (2005).** High genetic diversity and clonal growth in relict 36 populations of *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Oleaceae) from Hoggar, Algeria. *Annals of Botany*, 96 (5): 823-830.
- **Baali-Cherif D., Bouguedoura N., Besnard G. et Bouhired L. (2007).** Etude des populations de l'olivier de Laperrine (*Olea europaea* subsp. *laperrinei* Batt. & Trab.) du Sahara central Algérien (Hoggare et Tassili) : aspects biologiques et caractérisation moléculaire. *Annales de l'Institut National Agronomique-El-Harrach* ; Vol.28 N° 1 et 2 ; pp : 39-65.
- **Baali-Cherif DJ. (2007).** Etude des populations d'olivier de Laperrine (*Olea europaea* subsp. *laperrinei*) du Sahara central algérien (Hoggar et Tassili) aspects biologiques et caractérisation moléculaire, Mémoire de Doctorat d'état en Sciences de la Nature Spécialité : Biologie Végétale. Université Des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene USTHB-ALGER. Pp: 17.

- **Bathala L.R., Trivedi R., Sangur R., Srivastava S., Madhav S. et Chaubey P. (2019).** Evaluation of efficacy of Aloe Vera as a Disinfectant by Immersion and Spray methods on Irreversible Hydrocolloid Impression Materiel And its Effect on the Dimensional Stability of resultant Gypsum Cast – An in Vitro Study. *Journal of Medicine and Life*, Vol. 12 , pp. 395-402.
- **Bellifa S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid, Tlemcen.
- **Belloin, J.-C., 1993.** L'hygiène dans l'industrie alimentaire, Etudes FAO Production et Santé animales.
- **Benave Nte-Grcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A. et Del J.A. (2000).** Antioxydanr activity of phenolics extracted from *Olea europaea* leaves. *Food Chem.* 68 (4): 457-462.
- **Benchelah A.C. et Bouziane H. (2006).** Arbre et Arbuste du Sahara: voyages au Cœur de leurs usages: 216-217.
- **Benguendouz A. (2019).** Caractérisation nutritionnelle, toxicologique et aptitudes technologiques de «Sardine pilchardus» pêchée dans la côte Algérienne. M. SelseletAttou Ghalem. Thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. 163 pages.
- **Benkhaldi D. (2017).** Activité antimicrobienne des extraits végétaux application à l'inhibition de biofilm des bacilles thermophiles d'origine laitière. mémoire de master en Biologie Option : Microbiologie Appliquée. UNIVERSITE de TLEMCEN Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers :p1.
- **Bennani Kabchi N., Fdhil H. et Cherrah Y. (1999).** Effets of *Olea europaea* var. oleastre leaves in hypercholesterolemic insulin-resistant sand rats. *Thérapie.* 54: 23-717.
- **Besnard G. et Baali-Cherif D. (2009).** Coexistence of diploids and triploids in a Saharan relict olive: evidence from nuclear microsatellite and flow cytometry analyses. *Comptes Rendus Biologies*, 332(12): 1115-1120.
- **Besnard G., Anthelme F. et Baali-Cherif D. (2012).** The Laperrine's olive tree (*Oleaceae*). A wild genetic resource of the cultivated olive and a model-species for studying the biogeography of the Saharan Mountains. *Acta Botanica Gallica – Botany Letters*, 159(3): 319-328.

- **Besnard G., Rubio de Casas R. et Vargas P. (2007b).** Plastid and nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea*). *Journal of Biogeography* 34, 736–752.
- **Beta T., Nam S., Dexter J.E. et Sapirstein H.D., (2005).** Phenolic Content and antioxidant activity of Pearled Wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chem.*, 82(4), 390-393.
- **Bingen E., (2003).** Etat actuel de la résistance du pneumocoque en pédiatrie. *Revue française des laboratoires ; n ° 354 :43 -48.*
- **Bisignano G., Tomaino A., LO Cascio R., Crisafi g., Uccella N. et Saija A. (1999).** On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* Vol. 51: 4-971.
- **Bjarnsholt T. (2013) .** The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS.* 121:1-58.
- **Bore E. et Langsrud S. (2005).** Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. *J. Appl. Microbiol.* 98: 96-105.
- **Bouabdallah A. (2014).** Evaluation de l'activité antioxydante des feuilles d'olivier sauvage (*Olea europaea sylvestris*). Mémoire de Master. Univ Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie.
- **Bouaziz M., Fki I., Jemai H., Ayadi M et Sayadi S. (2008).** Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108: 253-262.
- **Bouaziz M. et Sayadi S. (2003).** Hight yield extraction of oleuropein from chemlali olives and leaves and bioconversion to hydroxytyrosol. *Polyphénols actualités*, 23: 11-15.
- **Boudarel H. (2018).** Caractérisation in situ du développement d'un biofilm par suivi de microbilles à l'aide d'une méthode de corrélation d'images numériques. Thèse de Doctorat en Matériaux, Clermont auvergne, France. p: 4.
- **Boudhrioua N. Bahloul N., Ben Slimen I. et Kechaou N. (2009).** Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*, 29: 412–419.

- **Bower C. K., Guire M.C. et Daeschel M. A. (1996).** The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 152-15.
- **Branger A., Richer M.M. et Roustel S. (2007).** Quelque système microbien : les biofilms. Dans : *Microbiochimie et alimentation*. Educagri éditions, dijon. p.131-164.
- **Bremer P.J., Fillery S. et McQuillan A.J. (2006).** Laboratory scale clean in place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int. J. Food Microbial.*,106: 254-262.
- **Bremer P.J., Seale B., Flint S. et Palmer J. (2009).** Biofilms in dairy processing. In Fratamico PM, Annous BA et Gunther NW . *Biofilms in the food and beverage industries*. Oxford, Cambridge, New Delhi:Wood head. pp. 396-431.
- **Breton C. et Berville A. (2012).** Histoire de l'olivier l'arbre des temps *Editions Quae*: 48.
- **Brindhadevi K., Oscar F.L., Mylonakis E., Shanmugam S., Verma T. et Pugazendhi A. (2020).** Biofilm and quorum sensing mediated pathogenicity in *pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*. Vol 96, 49-57
- **Brooks J.D. et Flint S.H. (2008).** Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International journal of food and science technology* vol. 43 (12): 2163-2176.
- **Bruneton J. (1993).** *Pharmacognosie. Technique et documentation-Lavoisier*, Paris, p.278.
- **Bruneton J. (2009).** *Pharmacognosie : Phytochimie. Lavoisier*, 4^{eme} édition. Paris : 901-904.
- **Burmølle M., Thomsen T.R., Fazli M., Dige I., Christensen L., Homøe P., Tvede M., Nyvad B., Tolker-Nielsen T., Givskov M., Moser C., Kirketerp-Møller K., Johansen H.K., Højby N., Jensen P., Sørensen S.J. et Bjarnsholt T. (2010).** Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. ; 59 (3) : 324-36.

- **Carpentier B. et Cerf O. (1993).** Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 499-511.
- **Carroro L., Fasolato L., Montemurro F., Martino M.E., Balzan S., Servili M. et Cardazzo B. (2014).** Polyphenols from olive mill waste affect biofilm formation and motility in *Escherichia coli* K-12. *Mic . Biotech* ; vol.7 ; pp : 265-275.
- **Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D. et Burt A.(1999).** The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms Biofilm Research Group, Biological Sciences and Microbiology & Infectious Diseases. University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.
- **Ceri H., Olson M.E. et Turner R.J. (2010).** Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother*; 11:1233–1237.
- **Chafaa S. (2013).** Contribution à l'étude de l'entomofaune de l'olivier, *Olea europaea* et de la dynamique des populations de la cochenille violette *Parlatoria oleae* Colvée., 1880 (Homoptera: Diaspididae) dans la région de Batna. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique – EL- Harrach. 168 pages.
- **Chalvet de Rochemonteix A. (2009).** Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat. École Nationale Vétérinaire D'Alfort Paris.
- **Chandra N.S., Bhatia P., Sharma A., Abhilash J.G., Anvitha D., Kumar P. et Dwivedi V.P. (2021).** Antibacterial activity of medicinal plants against ESKAPE: An update. A review.
- **Characklis W.G et Marshall K.C. (1990).** Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. *Biofilms I*. New York: John Wiley & Sons. P. 3-15.
- **Chen J.L., Steele T.W.J. et Stuckey D.C. (2015).** Modeling and Application of a Rapid Fluorescence-Based Assay for Biotoxicity in Anaerobic Digestion. *Environmental Science and Technology*. Vol. 49(22)17. 13463-3471.
- **Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M. et Beachey E.H. (1985)** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* ;22(6):996–1006.

- **Chmielewski R.A.N. et Frank J.F. (2003).** Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensives review in food science and food safety*. 2: 23-32.
- **Chan K.N. et Maznah I. (2009).** Supercritical carbon dioxide fluid extraction of hibiscus *Canna bimus L.* seed oil: Apotential solvent-free and high antioxydative edible oil. *Food chem* 6: 1291-1296.
- **Commission Européenne, (2012),** Règlement (UE) n ° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des Produits biocides, *Official Journal of the European Union*, L167, 1-123.
- **Commission du Codex Alimentarius (CAC). (2011).** – Liste des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments. CAC, Rome, 36 pp.
- **Commission européenne. (1981).** – Directive 81/852/CEE. Rapprochement des législations des États membres concernant les normes et protocoles analytiques, toxico-pharmacologiques et cliniques en matière d'essais de médicaments vétérinaires. *J. off. Communautéseur.*, L 317, 0016–0028.
- **Costerton J.W., Stewart P.S. et Greenberg E.P. (1999).** Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*; 284:1318–1322.
- **Coyle M. B. (2005).** « Antimicrobial Susceptibility Testing Manual ». [En ligne]. Disponible sur : <https://www.asm.org/index.php/34-international/asm-meetings-and-conferences/274-antimicrobial-susceptibility-testing-manual>.
- **Czajkowski R. et Jafra S. (2009).** Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. University of Gdansk and Medical University of Gdansk, Gdańsk, Poland.

D

- **Dai J., Mumper R.J. (2010).** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10): 7313-7352.
- **De Lucas A., Martinez de la ossa E., Rincon J., Blanco M.A. et Gracia I. (2002).** Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*, 22 (3): 221-228.

- **Dethier B. (2010).** Contribution à l'étude de la synthèse de l'alliine de l'ail. Mémoire de Master, Université de Liege. Belgique.
- **Di Donna P, Olivotto I, Delcrè SDL, Caponi D, Scaglione M, Nault I, Gaita F. (2010)**Efficacy of catheter ablation for atrial fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy: impact of age, atrial remodelling, and disease progression. *Europace*.12 (3) : 347-355.
- **Djenane D., Yanguela J., Derriche F., Bouarab L et Roncales P. (2012).** Extrait de feuilles d'olivier ; tests in vitro vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa*; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie*: 10-18.
- **Dominciano L.C.C., Lee S.H.I., Santello J.M., De Martinis E.C.P., Corassin C.H. et Oliveira C.A.F. (2016).** Effect of oleuropein and peracetic acid on suspended cells and mono-species biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Volume 3(3) pp :314-317.
- **Donlan R.M. (2002).** Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (9), pp 881-890.
- **Donlan R.M. et Costerton J.W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiological Reviews.* 15, pp 167-193.
- **Donkor E.S., Newman M.J., Tay S.C.K., Dayie N.T.K.D., Bannerman E. et Olu-Taiwo M. (2011).** – Investigation into the risk of exposure to antibiotic residues contaminating meat and egg in Ghana. *Food Control*, **22**, 869–873.
- **Dupont F.J. et Guignard L. (2007).** Botanique systématique moléculaire. Edition Elsevier Masson. 14^{ème} édition révisée. 285 pages.
- **Dzianach P.A., Dyks G.A., Strachan N.J.C., Forbes K.J et Pérez-Reche F.J. (2019).** Challenges of biofilms control and utilization: lessons from mathematical modelling. *Journal of royal society interface.* 16.

E

- **El-Tarabily K.A., El-Saadony M.T., Alagawany M., Arif M., Batiha G.E., Khafaga A.F., Elwan H.A.M., Elnesr S.S. et El-Haca M.E. (2021).** Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. *Saudi journal of biological sciences.* Vol 28 (9), 5145-5156.

- **Erbay Z et Icier F. (2009).** Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 91: 533-541.
- **Esmaili-Mahani S., Rezaeezadeh-Roukerd M., Esmailpour K., Abbasnejad M., Rasoulia B., Sheibani V., Kaeidi A. et Hajializadeh, Z. (2010).** Olive (*Olea europaea L.*) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates Morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 200-205.
- **Edziri H., Jaziri R., Chehab H., Verschaeva L., Flamini G., Boujnah D., Hammami M., Aouini M. et Mastouri M.(2019).** A comparative study on chemical composition, antibiofilm and biological activities of leaves extracts of four Tunisian olive cultivars.

F

- **Flemming H.C. et Wingender J. (2010).** The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- **Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A. et Kjelleberg, S. (2016).** Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- **Freeman D.J., Falkiner F.R. et Keane C.T. (1989).** New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 42: 872-874
- **Fonollá J., Díaz-Ropero P., De la Fuente D.E., Quintela J.C. (2010).** MS358 one-month consumption of an olive leaf extract enhances cardiovascular status in hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis Supplements*, 11(2), 182.

G

- **Gandhi M. et Chikindas M.L.(2007).** Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol* vol. pp: 113:1–15.

- **Garcia-Gomez A., Roi G.A. et Bernal M.P. (2003).** Composition of the solid fraction of olive mill waste water with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresource Technology*, 86: 59-64.
- **Garro-Galvez J.M., Riedl B. et Conner A.H. (1997).** Analytical studies on tara tannins. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of wood*, 51: 235-243.
- **Geol N., Fatima S.W., Kumar S., Sinha R. et Khare S.K. (2021).** Antimicrobial resistance in biofilms: exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors. *Biotechnology Reports*. Vol 30, e 00613.
- **Geaga A.G. (2015).** Les Bienfaits de l'Ail sur la Santé. *HUMAN & HEALTH*. 31:46-47.
- **Ghosh C., Sarkar P., Issa R. et Haldar J. (2018).** Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. DOI: 10.1016/j.tim.2018.12.010.
- **Green P.S. (2002).** A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bulletin*, 57: 91-140.
- **Goel N., Fatima S. W., Kumar S., Sinha R. et Khare S.K. (2021)** Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors. *Biotechnology Reports*. Vol 30, e00613.

H

- **Habimana O., Meyrand M., Meylheuc T., Kulakauskas S. et Briandet R. (2009).** Genetic features of resident biofilms determine attachment of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* vol, 75 pp:7814–7821.
- **Hall-Stoodley L. et Stoodley P. (2009).** Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*;11:1034–1043.
- **Hamdi K.H et Castellon R. (2005).** Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an antitumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 769-778.
- **Handke L.D., Conlon K.M. et Slater S.R. (2004).** Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates. *journal of medical microbiology* ; 53:367-374.

- **Haskouri S. (2002).** Résistance aux antibiotiques : mécanismes et évolution. Thèse doctorat en pharmacie. Rabat : université mohammed V faculté de médecine et de pharmacie de rabat, 104p.
- **Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M. et Hamdi M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Jniperus phonicea* L. Fruit extracts. *Food Chem.* 105: 1126-1134.
- **Hemaiswarya S., Kruthiventi A.K. et Doble M. (2008).** Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases, *Phytomedicine*, vol. 15, no 8, p. 639-652.
- **Hewlings S.J. et Kalman D.S. (2017).** Curcuma : A Rview of Its' Effects on Human Health. *Foods* 2017, 6, 92 ; DOI:10.3390/foods6100092.
- **Hopkins W.G. (2003).** Physiologie végétale. Ed n° 2 De Boec 12 Université P.

I

- **Irie Y. et Parsek M.R. (2008).** Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, pp 67- 84.

J

- **Jemai H., Bouaziz M., Fki I., El Feki A. et Sayadi, S. (2008).** Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves, *Chemico-Biological Interactions* 176, pp. 88-98.
- **Jeronimo H.M.Â., Queiroga R.C.R., Costa, C.V., Barbosa I.M., Conceição M.L et Evandro L.S. (2012).** Adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food processing plants as affected by growth medium, surface type and incubation temperature. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 48: (4): 738-745.
- **Jeyasekaran G. 2000.** A Report on Diagnostics in Fish Diseases. Geelong Australia: Australian Animal Health Laboratory Commonwealth Scientific and Industrial Res Org. pp 42.

K

- **Kahlouche-riachi F. (2014).** Evaluation chimique et activite antibacterienne de quelques plantes medicinales d'algerie. doctorat, Constantine 1. Retrieved from <https://bu.umc.edu.dz/theses/veterinaire/KAH6514.pdf>
- **Kara T.I. (2014).** Caracterisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Telemcen. Thèse de doctorat. Université Abou Bakr Belkaid, Telemcen.
- **Karakaya S. (2009).** Olive tree (*Olea europaea* leaves, potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67 (11), pp: 632-638.
- **Kaplan J.B. 2010.** Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*. 89, pp 205-218.
- **Khalil M.M.H., Ismail E.H. et El-Magdoub, F. (2010).** Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract. *Arabian Journal of Chemistry*, doi:10.1016/j.arabjc.2010.11.011 (article in press).
- **Knaggs A.R. (2003).** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural product reports* 20,36-119.
- **Komaki E., Yamaguchi S., Maru I., Kinoshita M., Kakehi K., Ohta Y et Tsakada Y. (2003).** Identification of Anti-Amylase Components from Olive Leaf Extracts. *Food Science. Technology. Research*, 9(1): 35-39.
- **Korukluoglu M., Sahan Y. et Yigit A. (2008).** Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. *Journal of Food Safety*, 28 (1), 76-87.

L

- **Landeta G., Curiel J.A., Carrascosa A.V., Munoz R. et Rivas B. (2013).** Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from dry cured products. *Meat science* 93 (2013).
- **Lahcene S. (2020).** Caractérisation biochimique et activités biologiques des extraits de l'olivier de *laperrine olea europaea subsp laperrinei* (Batt. et Trab) Cifferi. Thèse doctorat. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.

- **Lebeaux D. et Ghigo J.M. (2012).** Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles?. *Medecine Sciences*. 28(8-9): 727- 739.
- **Lee-Huang S., Zhang L., Huang P;-L et Chang Y.T. (2003).** Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 307 (4): 1029-1037.
- **Lee O.H et Lee B.Y. (2010).** Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101: 3751-3754.
- **Lembré P. (2012).** Contribution à l'étude de l'organisation et des propriétés mécaniques d'exopolymères de matrices de biofilms modèles. Thèse de doctorat. Université de Cergy-Pontoise, France .
- **Le Gentil C., Sylla Y. et Faille C. (2010).** Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *Journal of food engineering* 96: 37-42.
- **Lewis K. (2008).** Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol*;322:107–131.
- **Loussert R. et Brousse G. (1978).** L'olivier, techniques agricoles et production méditerranéenne **58**, 62-77,128-136.

M

- **Malik N.S.A et Bradford J.M. (2006).** Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in “Arbequina” olives. *Sci Hort*. 110 (3): 274-278.
- **Mario J., Tremblay Y.D.N. et Poirier H.(2013).** Les biofilms un astucieux moyen de défense des bactéries contre les antibiotiques et les désinfectants. Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine et la qualité du lait. P 34-35.
- **Markin D., Duek I. et Berdicevsky I. (2003).** In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses*; 46 (3-4): 132-136.

- **Martin-Garcia A.I., Moumen A., Yanez Ruiz D.R et Molina Alcaide E. (2003).** Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive. Leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 107: 61-74.
- **Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Ann. Cardiol. Angéiol.* 51, 304-315.
- **Masataka K., Nobuhiko K. et Tadakazu H. (2007),** Antiallergic agent. Patent written in Japanese. JP 2007182403 A 20070719. 8pp.
- **Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T. et Rattan A (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* .24 (1):25-9.
- **Mathur S., Gutte M., Paul D. et Udgire M. (2013).** Study the effect of the essential oils on microbial biofilm formation by klebsiella pneumonia. *Sch Acad J Biosci.* 2013;1:78-9.
- **Meddeb V. (2008).** Etude des effets des rayonnements ionisants sur les propriétés biochimiques et biologiques de l'ail (*Allium sativum*). Mémoire de Master, université 7 novembre. Carthage.
- **Medjeldi Merzougui S. (2012).** Peroxydase d'origine végétale : Purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application dans la détermination des peroxydes au niveau des aliments conservés. Thèse de Doctorat. Biochimie appliquée. Université Badji Mokhtar Annaba. Algérie
- **Melchior M.B. (2011).** Bovine mastitis and biofilms. In: Percival SL, Knottenbelt DC, Cochrane CA, eds. *Springer Series on Biofilms*, Vol. 6 *Biofilms and Veterinary Medicine*. New York: Springer, pp:205–222.
- **Mensah. S.E.P., Koudandé O.D., Sander P., Laurentie M., Mensah G.A. et Abiola F.A. (2014).** Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique : risques de santé publique. Cet article (n° 10062014-00034-FR) ; vol 33 (3) de la Revue scientifique et technique.
- **Merghni, A., Marzouki, H., Hentati, H., Aouni, M., & Mastouri, M (2016).** Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against

Staphylococcus aureus strains associated with oral infections. *Current Research in Translational Medicine*, 64(1), 29-34.

- **Micol V., Caturla N., Perez-Fons L., Mas V. et and Estepa A.(2005).** The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Reseach.*, 66 (2-3): 129-136.
- **Mion S., Rémy B., Plener L., Chabrière E. et Daudé D. (2019).** Quorum sensing et quorum Quenching Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence. *méd/sci.* 35, pp 31-8.
- **Miljkovic D., Dekanski D., Miljkovic E., Momcilovic M. et Mostarica-Stojkovic, M. (2009).** Dry olive leaf extract ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical Nutrition*, 28,346-350.
- **Miquel S., Lagrafeuille R., Souweine B. et forestier C. (2016).** Anti-biofilm Activity as Health Issue. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 7; article 592.
- **Mohagheghi F., Bigdeli M.R., Rasoulia B., Hashemi P. et Rashidi M.P. (2011).** The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood–brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia *Phytomedicine*, 18 (2-3), 170-175.
- **Mohsenipour Z. et Hassanshahian M. (2014).** The effects of allium sativum extracts on biofilm formation and activities of six pathogenic bacteria. Department of Biology, faculty of sciences, ShahidBahonar Universty of Kerman, Krman Iran.
- **Moualek I., Iratni Aiche G., Mestar Guechaoui N., Lahcene S. et Houali K. (2016).** Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11): 937–944.
- **Murthy P.S. et Venkatesan R. (2008).** Industrial biofilm and their control. Springer series in biofilms.
- **Musk D.G., Banko D.A. et Hergenrother P.J. (2005).** Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas eurogenosa*. *Chimistry and biology* ; 12:789-796.
- **Murga R., Donlan R.M., Bell M., Toscano C.M., Carr J.H. et Novicki T.J. (2001).** Protocol for detection of biofilms on needleless connectors attached to central venous catheters. *J Clin Microbiol* .39:750–3.

- **Mylonaki S., Kiassos E., Makris D.P. et Kefalas P. (2008).** Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (5): 977-985.

N

- **Nacks M. et Shahidi F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A* 1054, 11-95.
- **Nazzaro F., Polito F., Amato G., Caputo L., Francolino R., D’Acierno A., Fratianni F., Candido V., Coppola R. et De Feo V.(2022).** Chemical Composition of Essential Oils of Bulbs and Aerial Parts of Two Cultivars of *Allium sativum* and Their Antibiofilm Activity against Food and Nosocomial Pathogens. *Antibiotics* 2022, 11, 724. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060724>.
- **Normanno G., Giovanna L.S. et Angela Dambrosio.(2007).** Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 115(3):290-6.
- **Nurwatoro., Bintoro V.P., Legowo A.M., Purnomoadi A. et Setiani B.E. (2015).** Garlic Antioxidant (*Allium sativum L.*) to Prevent Meat Rancidity. *Procedia Food Science*, 3, 137 – 141.

O

- **Ojha S.K., Nagoor Meeran M.F., Javed H., Al Tae H. et Azimullah S. (2017).** Pharmacological Properties an Molecuar Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Frontiers in Pharmacology*, vol. 8
- **Omar S.H. (2010).** Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm. Paris, Techniques et Documentation-Lavoisier. J.* 18: 111-121.

- **Owen P. et Johens T. (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *J. Ethnoph.* 64: 149-160.

P

- **Paluch E., Rewak-Soroczyńska J., Jędrusik. I., Mazurkiewicz E. et Jermakow K. (2020).** Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2020) 104:1871–1881. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10349-w>
- **Paquin J.L., Block J.C., Haudidier K., Hartemann P., Colin F., Miazga J. et Levi Y. (1992).** Effet du chlore sur la colonisation bactérienne d'un réseau expérimental de distribution d'eau. *J. Water Sci.* 5(3), pp 399-414.
- **Parkar S.G., Flint S.H. et Brooks J.D. (2004).** Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* 96: 110-116.
- **Pereira J.A., Oliveira I., Sousa A., Valentao P., Andrade P.B., Ferreira I.C.F.R., ferreres F., Bento A., Seabra R. et Estevinho L. (2007).** Walnut (*Juglans regia* L.) leaves : phenolic compounds, antimicrobial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem. Toxicol.* 45: 2287–2295.
- **Peyrat M.B., Soumet C., Maris P. et Sanders P. (2008).** Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. *Int J Food Microbiol* vol, 124 pp:188–194.
- **Pittler M.H. et Ernst E. (2007).** Clinical effectiveness of garlic (*Allium sativum*). *Mol. Nutr. Food Res.*, **51**, 1382 – 1385
- **Polzonetti V., Egidi D., Vita A., Vincenzetti S. et Natalini P. (2004).** Involvement of oleuropein in (some) digestive metabolic pathways. *Food Chem.* 88, 11–15.
- **Puttamreddy S., Cornick N.A. et Minion F.C. (2010).** Genome-wide transposon mutagenesis reveals a role for pO157 genes in biofilm development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. *Infect Immun* vol 78, pp:2377–2384.

R

- **Rauwald H.W., Brehm O. et Odenthal K.P. (1994).** Screening of nine vasoactive medicinal plants for their possible calcium antagonistic activity. Strategy of selection and isolation for the active principles of *Olea europaea* and *Peucedanum ostruthium*. *Phytotherapy Research*, 8(3), 135-40.
- **Rewatkar A.R. et Wadher B.J. (2013).** Staphylococcus *aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*- Biofilm formation Methods. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)* ; 8(5) :36-40.
- **Rhizopoulou S. (2007).** *Olea europaea L.* A botanical contribution to culture. *American-Eurasian Journal of Agricultural, Environmental Sciences*. 2: 382-387.
- **Rohatgi A. et Gupta P. (2021).** Natural and synthetic plant compounds an ant-biofilm agents against Escherchia coli O157: H7 biofilm. *Infection, Genetics and Evolution*. Vol 95, 105055.
- **Rombi M., Robert D., Guedon D., Rosier-Sala C. et Renzacci E. (2015).** Le dictionnaire des plantes medicinales. *Composition/Mode d'action. Editions Alpen*: 517-519-520 et 521.
- **Roopsi T., Sangur R., Bathala L.R., Srivastava S., Madhav S. et Chaubey P. (2019).** Evaluation of efficacy of Aloe Vera as a Disinfectant by Immersion and Spray methods on Irreversible Hydrocolloid Impression Material and its Effect on the Dimensional Stability of Resultant Gypsum Cast - An in Vitro Study. *Journal of Medicine and Life* Vol. 12, Issue 4, pp. 395–402
- **Roux A. et Ghigo J.M., (2006).** Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire*.
- **Ruhal R. et Kataria R. (2021).** Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiological Research*. Vol 251, 12682

S

- **Saising J., Dube L., Ziebandt A.K., Voravuthikunchai S.P., Nega M. et Götz, F. (2012).** Activity of gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(11): 5804-5810.
- **Saleh N.E., Michael F.R. et Toutou M.M. (2015).** Evaluation of garlic and onion powder as phyto-additives in the diet of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41, 211–217.
- **Sandasi M., Leonard C.M. et Viljoen A.M. (2007).** The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. Department of Pharmaceutical Sciences, Tshwan University of Technology.
- **Sandasi M. (2008).** The effect of plant extraction on microbial biofilm formation and development. Department of Pharmaceutical Sciences, Tshwan University of Technology.
- **Sánchez-Gutiérrez M., Bascón-Villegas I., Rodríguez A., Pérez-Rodríguez F., Fernández-Prior A., Rosal A. et Carrasco E.(2021).** Valorisation of *Olea europaea* L. Olive Leaves through the Evaluation of Their Extracts: Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Foods* 2021, 10, 966. <https://doi.org/10.3390/foods10050966>.
- **Sato H., Genet C. et Strehle A. (2007).** Antihyperglycemic activity of TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem; biophys. Res. Commun* ; 362:793-798.
- **Scheffler A., Rauwald H.W., Kampa B., Mann U., Mohr F.W. et Dhein S. (2008),** *Olea europaea* leaf extract exerts L-type Ca²⁺ channel antagonistic effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 233-240.
- **Scognamiglio B., D'Abrosca S., Pacifico V., Fiumano P.F., DeLucab P. et Monaco F. (2012).** Caractérisation des polyphénols et évaluation des antioxydants des variétés *Olea europaea* cultivées dans le parc national du Cilento (Italie) *Food Res. Int* 2012.46 (1): 294 -303.
- **Sharma M. et Anand S.K. (2002).** Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry—a case. *Food control* vol 13, pp: 469-477

- **Shi X. et Zhu X. (2009).** Biofilm formation and food safety in food industries. Trends in food science and technology 20: 407-413.
- **Sidhu T.S., Parakash S. et Agrawal R.D. (2006).** Evaluation of hot corrosion resistance of HVOF coatings on a Ni-based superalloy in molten salt environment. Materials Science and Engineering : A. Vol. 430, pp64-78.
- **Simões M., Simões L.C., Machado I., Pereira M.O. et Vieira M.J. (2006).** Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. Food and Bioproducts Processing, 84, 338–345.
- **Simões M., Simões L.C. et Vieira M.J. (2010).** A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT - Food Sci. Technol. 43, 573–583.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>
- **Singh I., Mok M., Christensen A.M., Turner A.H. et Hawley, J.A. (2008).** The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases, 18, 127-132.
- **Slimani K. (2018).** Produits biocides désinfectants dans les produits laitiers : méthodes quantitatives d'analyse des résidus et étude de l'impact des procédés de transformation du lait sur l'apparition de produits néoformés selon des approches d'analyse ciblée et non ciblée par spectrométrie de masse. Thèse de doctorat. Université Rennes 1.
- **Slobodnikova L., Fiaova S., Rendokova K., Kovac J. et Mucaji P. (2016).** Antibiofilm Activity of Polyphenols. Molecules; DOI:10.3390.
- **Somova L.I., Shode F.O., Ramnanan P., et Ndar A. (2002).** Antihypertensive antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *Africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacol*: 1-7.
- **Somova L.I., Shode F.O., Ramnanan P. et Nadar, A. (2003).** Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2-3), 299-305.
- **Somrani M., Inglés M-C., Debbabi H., Ferid Abidi F., et Palop A.(2020).** Garlic, Onion, and Cinnamon Essential Oil Anti-Biofilms' Effect against *Listeria monocytogenes*. *Foods* 2020, 9, 567; doi:10.3390/foods9050567.

- **Srey S., Jahid I.K. et Sang D.H. (2013).** Biofilm formation in food industries : a food safety concern. *Food control.* 3 (2) : 572-585.
- **Stewart P.S et Costerton J.W. (2001).** "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms." *Lancet* 358 (9276): 135-8.
- **Sudjana A.N., D'orazio C., Ryan V., Rasool N., NG J., Islam N., Rilley T.V. et Hammer K.A. (2009).** Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* leaf extract. *Int. J. Antimicrob; Agents;* 33 (5): 461-463.
- **Sweedan E.G., Al-haidari A.M.Dh., Magemand A.M. et Almohsen M.A.(2019).** Antimicrobial and antibiofilm activities of alcoholic extract of oliveleaves (*Olea europaea*) against pathogenic bacteria. *Bioscience research,* 2019 16(1) : 367-374.

T

- **Tadashi U. (2006).** Antiaging food compositions containing collagen, and their manufacture. Patent written in Japanese. Application: JP 2006191845 A 20060727, 7 pp.
- **Tahri N., Orch H. et Zidane L. (2007).** Ail et Microbes : Examen critique de la litterature, revue antibiotherapeutique. . Journée Scientifique « Ressources Naturelles et Antibiothérapie» Laboratoire de Biodiversité et Ressources Naturelles. Université Ibn Tofail, Kenitra.
- **Talhaoui N., Taamalli A., Gomez-Caravaca A.M., Fernandez Gutierrez A. Segura-Carretero A. (2015).** Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International,* 77: 92-108.
- **Tawechaisupapong S., Ngaone P., Pastuck P., Pitiphat W. et Khunkiti W. (2012).**Antibiofilm activity and post antifungal effect of lamongrass oil on clinical candida dubliniensis isolate. *S.Af . J. Bot* 78, pp : 37-43.
- **Teh K.H., Flint S., Brooks J. et Knight G. (2015).** Biofilms in the dairy industry. *Society of dairy technology.*263p.
- **Thomas D., Anemone T., Marianne W.L. et Armin W. (2006).** Cosmetic and dermatological composition for the treatment of aging or photodamaged skin. Patent written in German. EP 2005-20052 20050915, 40 pp.

- **Tolker-Nielsen T. (2014).** Pseudomonas aeruginosa biofilm infections: From molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS*. 122 : 1-51.
- **Touil A., LITAIEM J. et ZAGROUBA F. (2015).** Isothermes de sorption et propriétés thermodynamique de l'*Allium sativum*. *Journal of the Tunisian Chemical Society*,17, 105-114.
- **Topuz S. et Bayram M. (2021).** Oleuropein extraction from leaves of three varieties (*Olea europaea* L.) : Antioxydant and antimicrobial properties of purified oleuropein and oleuropein extracts. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15697>.
- **Tremblay J.E., Ardyna M.,Babin M., Gosselin M., Devred E. et Rainville L.(2014).** Recent Arctic Ocean sea ice loss triggers novel fall phytoplankton blooms.

U

- **Uhlich G.A., Rogers D.P. et Mosier D.A.(2010).** Escherichia coli serotype O157:H7 retention on solid surfaces and peroxide resistance is enhanced by dual-strain biofilm formation. *Foodborne Pathog Dis*. Vol 7, pp :935–943.

V

- **Van Houdt R. et Michiels C.W. (2010).** Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol* vol 109, pp:1117–1131.
- **Van Houdt R. et Michiels C.W. 2005.** Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. *Res Microb*.156, pp 626-633
- **Vanzielegem T. et Delmée M. (2020).** Les biofilms en milieu hospitalier : quels sont les enjeux pour l'hygiène hospitalière. *Nosoinfo*.
- **Vasantha R.H.P., Wijesundara N.M., Lee S.F., Cheng Z. et Davidson R. (2021).** Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against streptococcus pyogenes through cell membrane damage. *Scientific Reports*

- **Vercautern J. et Cheze C. (1998).** Polyphénols 96: 18th International Conference on Polyphenols. Les Colloques, N°87. *Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)*. Paris: 11-89.
- **Verginie L. (2008).** Influence du cuivre sur les biomasses microbiennes dans les canalisations d'eau. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Paris-Sud 11, France. 80p.
- **Vieu G. (2014).** Diversité génétique des isolats *de Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Etude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants. doctorat TOULOUSE III – PAUL SABATIER. Retrieved from <http://thesesante.ups-tlse.fr/556/1/2014TOU32073.pdf>.
- **Visioli F et Galli C. (1994).** Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation, *Life Sciences*, 55(24), 1965-1971.
- **Visioli F., Bellosta S et Galli C. (1998).** Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci. doi:* 10.1016/S0024-3205 (97) 01150-8. 62: 541-546.
- **Villa P., (2003) :** La culture de l'olivier, éditions De VecchiS.A.- Paris, pp 17-19-21-22-45-63 71.

W

- **Walker M. (2000).** L'extrait de feuille d'olivier pour renforcer le système immunitaire. Editions Medicis-Entrelacs.
- **Waters C.M. et Bassler B.L. (2005).** Quorum sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 21: 319- 346.

X

- **Xu X., Miao Y., Chen J.Y., Zhang Q. et Wang J. (2015).** Effective production of S-allyl-L-cysteine through a homogeneous reaction with activated endogenous

γ -glutamyltranspeptidase in garlic (*Allium Sativum*). *J. food sci. technol.*, **52**(3), 1724-1729.

Y

- **Yakhlef G., S. Laroui S., Hambaba L., Aberkane M.C. et Ayachi A. (2011)** Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie* Vol.9 pp:209-218. Springer-Verlag France. DOI 10.1007/s10298-011-0641-6.
- **Yiying H., Stev H. et Palmer J.S. (2020).** *Bacillus cereus* spores and toxins- the potential role of biofilms. *Food microbiology*. 90 : 1-7

Z

- **Zarzuelo A., Duarte J. et Jimenez J. (1991).** Vasodilatator effect of olive leaf. *Planta Med.* 57: 417-419.
- **Zhao X., Zhao F., Wang J., Zhong N., (2017).** Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv.* 7, 36670–36683. <https://doi.org/10.1039/C7RA02497E>.
- **Zhang Q.Q., Zhang Y.H., Cai F.Y., Liu X.L., Chen X.H. et Jiang M. (2019).** Comparative antibacterial and antibiofilm activities of garlic extracts, nisin, ϵ -polylysine, and citric acid on *Bacillus subtilis*. *J Food Process Preserv.* 2019;00:e14179. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14179>.
- **Zykwinska A., Marquis M., Siquin C., Cuenot S. et Collic-Jouault S. (2016).** Assembly of HE800 exopolysaccharide produced by a deep-sea hydrothermal bacterium into microgels for protein delivery applications. *vol :142: 213–221*

Webographi

- Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture 2018
<http://www.onuaa.org/ONUAAstat2018> (Anonyme 1)

Annexes

ANNEXES

Annexes 1 : Préparation de solutions et milieu de culture

❖ Solutions

- **Cristal violet (0.1%)**

Cristal violet..... 1 ml

Eau distillée..... 9 ml

- **Résazurine**

Résazurine 0.015 g

Eau distillée..... 1 ml

❖ Milieux de culture solides

- **Milieu Rouge Congo Agar (RCA)**

BHIB.....18.5 g

Saccharose.....25 g

Agar.....5 g

Rouge Congo.....0.4 g

Eau distillée50 ml

Stérilisation à l'autoclave : 121°C pendant 15 minutes

❖ Milieux de culture liquides

- **BHIB + glucose**

BHIB.....3.7 g







Glucose.....1g




Eau distillée..... 100ml

Stérilisation à l'autoclave : 121°C pendant 15 minutes

Annexes 2 : Appareils utilisé

Appareils	Photos
Autoclave	
Etuve	
Bain-marie	
Balance de précision	
Centrifugeuse	

<p>Spectrophotomètre visible</p>	 <p>A compact, white and blue laboratory instrument with a digital display and control knobs. The text on the front reads "BIOTECH ENGINEERING MANAGEMENT CO. LTD. (UK)" and "VIB 12200".</p>
<p>Bain ultrasonique</p>	 <p>A rectangular stainless steel tank with a blue control panel on the front. It contains several small glass bottles submerged in liquid.</p>
<p>Microscope</p>	 <p>A standard light microscope with a white base and black upper components, including the objective lenses and eyepiece.</p>
<p>Vortex</p>	 <p>A bright red laboratory mixer with a black top and a control panel on the front. The text "Kartell" and "TK35" is visible on the front.</p>
<p>Rota vapeur</p>	 <p>A complex piece of glass and metal laboratory equipment used for solvent evaporation, featuring a rotating flask and a condenser.</p>
<p>Lecteur ELISA</p>	 <p>A white laboratory instrument with a digital screen and a keypad. The text on the top right reads "MICRO PLATE READER" and "8500".</p>

Lyophilisateur	
Agitateur magnétique	
Moulin électromagnétique	

Annexes 3 : Matériels et produits utilisés

Ustensiles	Solvants et réactifs chimique	Antibiotique	Milieux de culture
Bec Bunsen	Ethanol 96%	Colistine (CS 10 μ g).	Bouillon BHIB
Béchers	Ethanol 70%	BACITRACINE (BA 10 μ g)	Milieu Chapman
Boites de pétri	DMSO		Milieu Hektoen
Ecouvillons	Eau distillée stérile		Gélose Muller Hinton
Eprouvette	Eau physiologique stérile		Bouillon BHIB+ glucose

Erlenmeyers	VP1		Rouge Congo
Flacons	VP2		
Micropipettes	KOVACS		
Microplaques de 96 puits	TDA		
Pipettes Pasteur	Lugol		
Tube à vis	HCl à 1N		
Eppendorf	Violet de Gentiane		
Portoirs	Fuchsine		
Spatules	Huile à émersion.		
Entonnoir	Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)		
Cristallisoir	Cristal violet		
Anse de platine.	Résazurine		
Disque de papier watman	Huile de paraffine		

Annexes 4 : contrôle des souches bactériennes

❖ Test biochimiques

- **La galerie api 20E**

La galerie api20E est la première galerie miniaturisée d'identification biochimique de bactéries, elle remplace les galeries traditionnelles en tubes, elle se fait comme suite :

- Préparation de la suspension bactérienne :

- Prélever, dans la zone stérile, une colonie bien isolée à partir de la culture bactérienne pure et jeune (18 à 24 h d'incubation) et l'ensemencé dans des tubes à vices contenant 5 ml d'eau physiologique stérile.

- Préparation de la galerie :

- Repartir un peu d'eau dans les alvéoles du fond pour crée une atmosphère humide ;

- Mentionner la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte ;
- Déposer la galerie de Façon stérile dans la boîte ;
 - Inoculation de la galerie :
 - Prélever une petite quantité de la suspension bactérienne avec une pipette pasteur ouverte stérile à l'aide d'une poire ;
 - Ensemencer la galerie en posant la pointe de la pipette sur un coté de la cupule et laisser couler délicatement la suspension bactérienne dans les cupules. Tenir la boîte légèrement inclinée pour éviter les bulles d'air ;

NB :

- ✓ Pour les caractères encadrés (CIT, VP, GEL) : remplir entièrement la cupule ; **mise en aérobiose**
- ✓ Pour les caractères soulignés encadrés (ADH, LDC, ODC, H₂S, URE) : remplir l'orifice de la cupule avec de l'huile de vaseline stérile ; **mise en anaérobiose**
- ✓ Pour les autres caractères, ne remplir que les tube
 - Incubées la boîte dans une étuve a 37°C pendant 24h

- Lecture et interprétation :

- Après incubation, la lecture de la galerie se fait en se référant au tableau de lecture
- Ajouter respectivement aux tests nécessitant l'addition de réactifs :
 - ✓ Teste TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA.
 - ✓ Teste IND : ajouter 1 goutte de réactif COVACS
 - ✓ Teste VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP1 et VP2 laisser agir 10 minutes

- **Teste oxydase**

Le test de l'oxydase est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries Gram négative qui produisent cette enzyme, elle se fait comme suite

- Placer un disque d'oxydase sur une lame porte objet à l'aide d'une pince,
- Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester.
- Prélever la colonie choisie à l'aide d'une pipette pasteur.
- Frotter doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes.

- **DNase**

Le teste désoxyribonucléase (DNase) est utilisé pour détermine la capacité à hydrolyser l'ADN comme source de carbone et d'énergie pour la croissance et principalement pour différencier le *Staphylococcus aureus* des autres *staphylocoques* ; il est réalisé comme suit :

- Prélever, dans la zone stérile, une colonie bien isolée à partir de la culture bactérienne pure et jeune (18 à 24 h d'incubation) et l'ensemencé par une seule ligne au centre de la boîte pétrie contenant une gélose DNase puis incubé à 37°C pendant 24h ;
- Inonder la boîte avec de l'acide chlorhydrique (HCL) à 1N et laisser agir pendant quelques minutes
- Décanter l'excès de l'acide chlorhydrique puis examiner la boîte immédiatement sur un fond noir

L'hydrolyse de l'ADN sera observée par une clarification de la gélose après l'ajout d'HCL (Török, Moran, & Cooke, 2017).

- **Catalase**

La détection de la présence de la catalase est essentielle pour différencier les *staphylococcaceae* et *micrococcaceae* (catalase positif) des *streptococcaceae* (catalase négatif) elle est réalisée selon les étapes suivante :

- Déposer sur une lame propre une goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) stérile ;
- Prélever, dans la zone stérile, une colonie bien isolée à partir de la culture bactérienne pure et jeune (18 à 24 h d'incubation) et l'incorporer à la goutte ;
- Observer la formation immédiate de bulles (**Delarras, 2014**).

❖ Coloration de Gram

Cette coloration permet de différencier entre les deux types de bactéries (Gram+ et Gram-), selon la capacité des différentes structures de la paroi bactérienne à retenir le colorant violet de Gentiane. D'après **Bergey et al. (1994)**, elle est réalisée selon les étapes suivantes :

La première étape consiste à préparer des frottis, comme suit :

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique stérile ;
- Prélever, dans la zone stérile, une colonie à partir de la culture bactérienne et l'incorporer à la goutte d'eau pour obtenir une suspension homogène ;
- Sécher et fixer les bactéries à la chaleur au-dessus de la flamme du bec bunsen ;

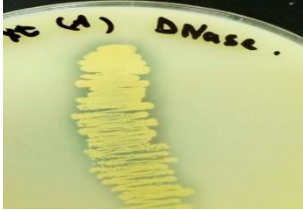



La deuxième étape est la réalisation de la coloration ; elle se fait selon les étapes suivantes :

- Recouvrir la lame avec le violet de Gentiane, laisser agir une minute puis rincer à l'eau ;
- Ajouter une solution de Lugol et laisser agir une minute puis rincer à l'eau ;
- Décolorer la lame à l'alcool pendant 30 secondes puis rincer à un filet l'eau ;
- Recouvrir avec la fuchsine et laisser agir 1 minute puis rincer à un filet l'eau ;
- Sécher la lame au-dessus de la flamme du bec bunsen et observer au microscope optique à l'objectif (GX 100) avec l'utilisation d'une goutte de l'huile à émersion.

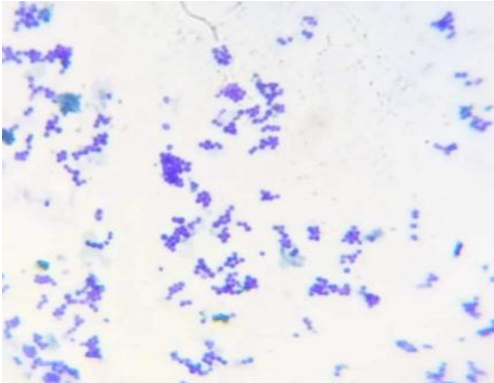
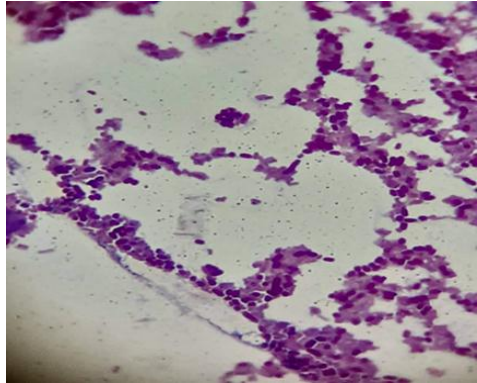
Une coloration rose indique des bactéries Gram-, tandis qu'une coloration violette indique des bactéries Gram+

Annexes 5 : Résultats du contrôle des souche bactériennes

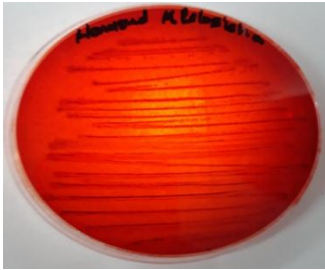
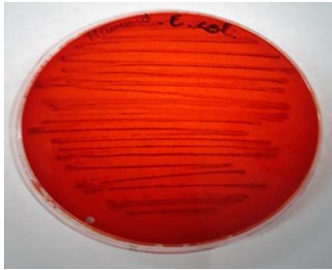

❖ Résultats des tests biochimiques

DNase	Catalase	Oxydase	Galerie api 20E
			

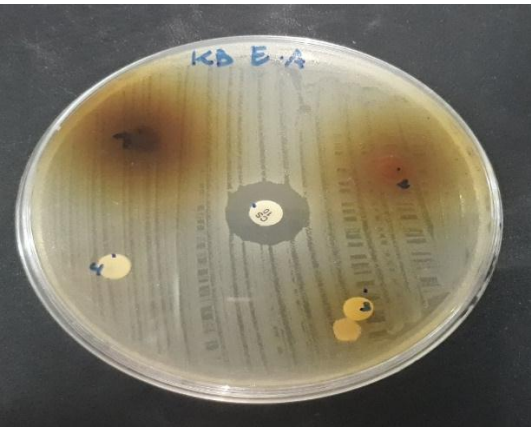
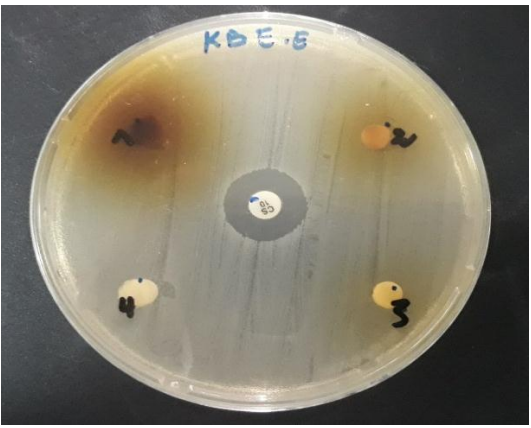
❖ Résultats de la coloration de gram

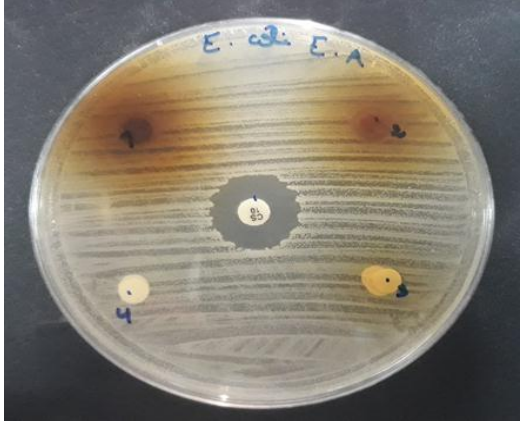
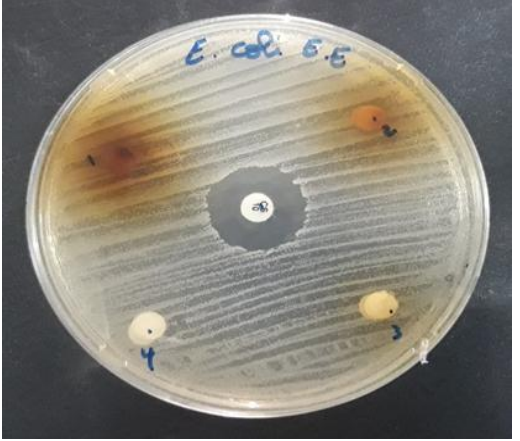
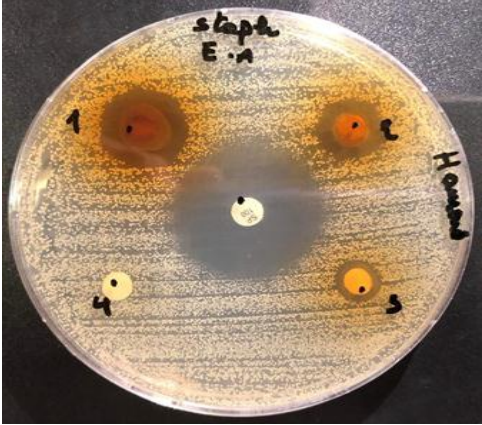

<i>s. aureus</i> ATCC25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
	

Annexes 6 : Résultats de la capacité des souches à former un biofilm

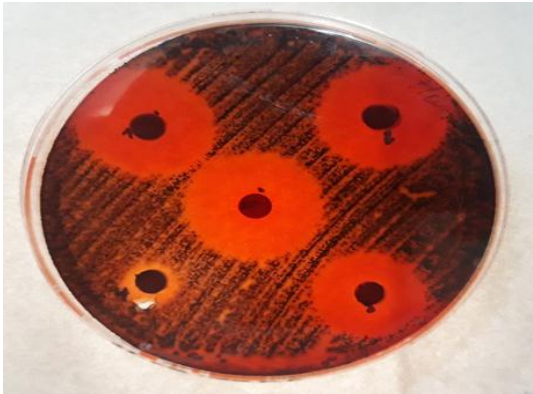
<i>Klebsiella</i> ATCC7803	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
		

Annexes 7 : Résultats des activités antibactériennes sur gélose

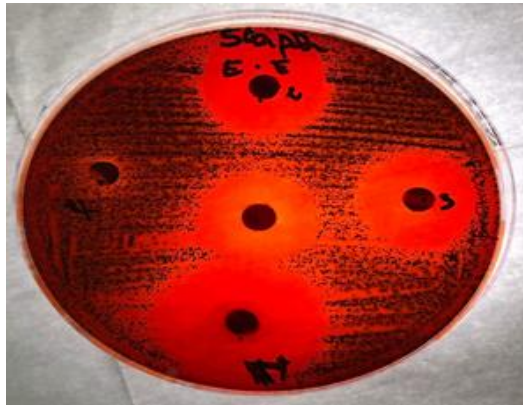
	Extrait aqueux	Extrait éthanolique
<i>Klebsiella</i> ATCC7803		

<p><i>E. coli</i> ATCC 25922</p>		
<p><i>S. aureus</i> ATCC 25923</p>		

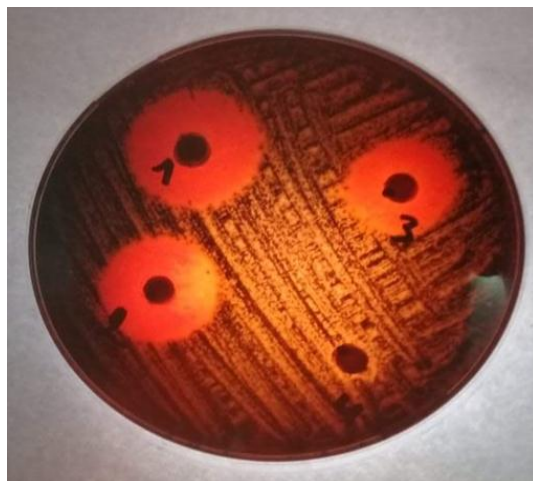
Annexes 8 : Résultats des activités anti-biofilm sur gélose

Extraits	Résultats
<p>Extrait aqueux de l'olivier de Laperrine</p>	

**Extrait éthanolique de
l'olivier de Laperrine**



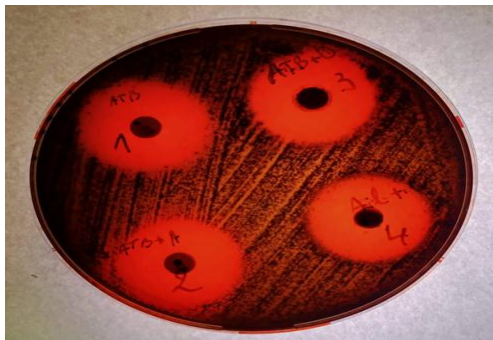
**Extrait éthanolique de
l'olivier du nord**



Extrait éthanolique de l'ail



Annexes 9 : résultats des synergies sur gélose



ATB + extraits de plantes

Résumé

Résumé

Dans le présent travail, différents aspects d'*Olea laperinei*, *Olea europaea* et d'*Allium sativum* ont été étudiés, afin d'évaluer l'activité antimicrobienne et antibiofilm des extraits bruts de ses plantes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumonia* (bactéries hautement pathogènes pour l'organisme humain).

Cette activité a été déterminée selon les deux méthodes : diffusion sur gélose et sur microplaque, et nous avons eu les résultats suivants :

Parmi les souches étudiées seule *S. aureus* s'est avéré formatrice de biofilm avec un DO de 2,766.

Les extraits de l'olivier de Laperrine (*Olea laperrinei*) aqueux et éthanolique à une concentration de 0,6 g/ ml possédaient une activité anti-biofilm vis-à-vis de *S. aureus*, cela avec des diamètres moyens de 27 mm et 24 mm respectivement.

L'olivier du nord (*Olea europaea*) (0,83 g/ml) et les gousses d'ail (*Allium sativum*) (0,312 g/ml) possédaient une activité anti-biofilm vis-à-vis de *S. aureus* avec des diamètres moyens de 21 mm et 43 mm respectivement.

L'extrait de l'olivier de Laperrine (*Olea laperrinei*) à une concentration de (0,6 g/ml) manifestait une activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* avec un diamètre moyen de 10 mm et aucune activité vis-à-vis de *E. coli* et *Klebsiella*.

Aucune synergie n'a été démontrée entre les extraits étudiés et les antibiotiques, cependant une synergie a été enregistrée avec l'association de l'extrait d'ail et d'olivier de Laperrine, mais sans aucune signification statistique

Mots clés : Activité antibactériennes, activité antibiofilm, *Olea laperrinei*, *Allium sativum*, *Olea europaea*, synergie, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella*.

Abstract:

In the present work, different aspects of *Olea laperrinei*, *Olea europaea* and *Allium sativum* were studied, in order to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of the crude extracts of its plants towards *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* (bacteria highly pathogenic to the human organism). This activity was determined by both methods:

Agar diffusion and microplate, and we had the following results: Among the strains studied only *S. aureus* was found to be biofilm forming with an OD of 2.766.

The aqueous and ethanolic extracts of the Laperrine olive tree (*Olea laperrinei*) at a concentration of 0.6 g/ml had an anti-biofilm activity towards *S. aureus*, with average diameters of 27 mm and 24 mm respectively.

Northern olive (*Olea europaea*) (0.83 g/ml) and garlic cloves (*Allium sativum*) (0.312 g/ml) had anti-biofilm activity against *S. aureus* with mean diameters of 21 mm and 43 mm respectively.

Laperrine olive extract (*Olea laperrinei*) at a concentration of (0.6 g/ml) showed antibacterial activity against *S. aureus* with an average diameter of 10 mm and no activity against *E. coli* and *Klebsiella*.

No synergy was demonstrated between the extracts studied and the antibiotics, however a synergy was recorded with the association of garlic extract and olive tree of Laperrine, but without any statistical significance

Key words: Antibacterial activity, antibiofilm activity, *Olea laperrinei*, *Allium sativum*, *Olea europaea*, synergy, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella*.

ملخص:

في العمل الحالي، تمت دراسة جوانب مختلفة من *Olea laperrinei* و *Olea europaea* و *Allium sativum* ، من أجل تقييم نشاط مضادات الميكروبات ومضادات الغشاء الحيوي للمستخلصات الخام لنباتاته ضد *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* (ضارة بجسم الإنسان). تم تحديد هذا النشاط باستخدام طريقتين: الانتشار على الأجار وعلى الصفيحة الدقيقة، وحصلنا على النتائج التالية:

من بين السلالات التي تمت دراستها، أثبتت *S. aureus* أنها تشكل غشاءً حيويًا مع OD 2.766. المستخلصات المائية والإيثانولية لشجرة زيتون لابيرين (*Olea laperrinei*) بتركيز 0.6 جم / مل تمتلك نشاطًا مضادًا للبيوفيلم ضد بكتيريا *S. aureus* ، بمتوسط أقطار 27 مم و 24 مم على التوالي.

الزيتون الشمالي (*Olea europaea*) (0.83 جم / مل) وفصوص الثوم (*Allium sativum*) (0.312 غ / مل) يمتلكان نشاطًا مضادًا للبيوفيلم ضد *S. aureus* بمتوسط أقطار 21 مم و 43 مم على التوالي.

أظهر مستخلص زيتون لابيرين (*Olea laperrinei*) بتركيز (0.6 غ / مل) نشاطًا مضادًا للبكتيريا ضد بكتيريا *S. aureus* بمتوسط قطر 10 ملم ولا يوجد نشاط ضد *E. coli* و *Klebsiella*.

لم يظهر أي تآزر بين المستخلصات المدروسة والمضادات الحيوية ، ولكن تم تسجيل تآزر مع ارتباط مستخلص الثوم والزيتون من لابيرين ، ولكن دون أي دلالة إحصائية.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضاد حيوي الغشاء ، *Olea laperrinei* ، *Allium sativum* ، *Olea europaea* ، *S. aureus* ، *E. coli* ، *Klebsiella* ، synergy