



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Sciences
Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Intitulé

**Isolement et identification de *Bacillus* sp. à partir du
lait et évaluation de leur adhésion sur des couches
minces d'oxyde de nickel**

Présenté par :

Amiri Leitycia

Sadoun Nassima

Soutenu le 07/07/2022 devant le jury composé de :

M^r Bouacem K.	MCA	Président
M^{me} Afif Chaouche T.	MCA	Promotrice
M^r Titouche Y.	MCA	Examineur

Année universitaire 2021- 2022

Remerciements

Remerciements

Nous remercions notre promotrice M^{me} Afif Chaouche T. pour le temps consacré à la supervision et l'évaluation de ce travail. Son enthousiasme, ses conseils et ses remarques pertinentes nous ont permis de gagner en autonomie et de mener à bien notre étude.

Nous remercions également M^f Bouacem K. de nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

Nos remerciements vont aussi à M^f Titouche Y. qui a accepté d'examiner ce travail. Sa serviabilité et ses conseils furent précieux.

Nous tenons également à remercier toute l'équipe du laboratoire de Microbiologie pour leur aide durant ces mois de travail.

Enfin, un grand merci s'adresse à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation du cycle primaire jusqu'en Master II.

Dédicaces

Dédicaces

À la personne que j'aime le plus au monde, et qui veille sur moi depuis là-haut, mon cher frère Ahcene, ce travail t'est dédié.

À mes chers parents,

À la prunelle de mes yeux, toi ma chère maman,

À mon ange gardien, toi mon cher papa,

Vous étiez là depuis le début, pendant et je sais jusqu'à l'infini....vous étiez mon inspiration, ma motivation et la source de tout mes succès, ce travail vous est dédié.

À mon cher et tendre mari,

Toi qui es mon monde entier, je voudrai te remercier pour ton amour et ta compréhension. Ton soutien fut une lumière. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai pour toi. Je t'aime et j'implore le tout-puissant pour qu'il nous accorde une vie longue et heureuse, ce travail t'est dédié.

À mon frère bien aimé,

À tous les moments d'enfance passés avec toi mon frère, en gage de ma profonde estime pour l'aide que tu m'as apporté, ce travail t'est dédié.

À toute ma famille et belle famille,

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragement. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle.

À celle avec laquelle j'ai partagé ce travail,

À toi Nassima je t'exprime mes vifs remerciements, partager ce travail avec toi fut un pur plaisir pour moi.

Dédicaces

Ce travail est dédié :

À la mémoire de mon grand-père ;

À mes chers parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour eux.

À mes sœurs Amira et Amel ;

À toute ma famille, mes amies, et tout ceux qui ont cru en moi ;

À ma binôme Leitycia et à toutes nos années de galère.

Nassima

Table des matières

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Bactéries et biofilms

I.1. Bactéries.....	3
I.1.1. <i>Bacillus</i> sp.....	3
I.1.2. <i>Bacillus cereus</i>	3
I.1.2.1. Pathologies liées à <i>Bacillus cereus</i>	4
I.1.2.2. Epidémiologie de <i>Bacillus cereus</i>	5
I.2. Adhésion des bactéries.....	6
I.3. Contamination du lait.....	7
I.4. Biofilms.....	7
I.4.1. Définition.....	7
I.4.2. Formation.....	8
I.4.3. Propriétés	9
I.4.4. Biofilms de <i>Bacillus cereus</i>	9
I.4.5. Problèmes liés aux biofilms dans les industries laitières.....	10
I.4.6. Techniques de mise en évidence des biofilms.....	11
I.4.6.1. Techniques de culture.....	11
I.4.6.1.1. Cellules à flux.....	11
I.4.6.1.2. Microplaques de titration.....	11
I.4.6.2. Techniques microscopiques.....	11
I.4.6.2.1. Microscopie électronique électronique à balayage (MEB).....	11
I.4.6.2.2. Microscopie électronique électronique à balayage environnementale (ESEM).....	12
I.4.6.2.3. Microscopie confocale à balayage laser (CLSM).....	12
I.4.7. Moyens de lutte.....	12
I.4.7.1 Stratégies classiques de nettoyage	12

Table des matières

I.4.7.2. Nouvelles approches.....	13
-----------------------------------	----

Chapitre II : Surfaces d'adhésion

II.1.Surfaces d'adhésion des bactéries.....	15
II.2. Couches minces.....	15
II.2.1. Définition	15
II.2.2. Généralités.....	16
II.2.3.Couches minces à bases de nanoparticules.....	16
II.2.3.1. Méthode sol-gel.....	16
II.2.3.2. Procédé de gélification	17
II.2.4. Nanoparticules d'oxyde de nickel.....	18

Chapitre III :Polyphénols

III.1. Polyphénols.....	19
III.1.1. Définition et généralités.....	19
III.1.2. Biosynthèse et structure.....	19
III.2. La roquette.....	19
III.2.1. Généralités.....	19
III.2.2. Taxonomie.....	20
III.2.3. Répartition	21
III.2.4. Description botanique.....	21
III.2.5. Utilisations médicinales.....	21
III.2.6.Propriétés antimicrobiennes.....	21
III.2.7. Composés phénoliques et leurs propriétés antioxydantes	22
III.2.8. Effets des composéé phénoliques de la roquette sur les métaux.....	22

Matériel et méthodes

I.Materiel.....	23
II. Méthode.....	23
II.1. Echantillonnage	23
II.1.1. Techniques de prélèvement et de transport.....	23
II.2. Traitement des échantillons.....	24
II.3. Isolement, purification des souches.....	24
II.4. Conservation des souches.....	24

Table des matières

II.5. Identification des souches.....	24
II.5.1. Etude macroscopique.....	24
II.5.2. Etude microscopique.....	24
II.5.3. Etude biochimique.....	25
II.5.3.1. Isolement sur milieu Mossel.....	25
II.6. Evaluation de la formation de biofilms.....	25
II.7. Préparation des échantillons à base de nanoparticules d'oxyde de nickel.....	26
II.8. Evaluation de l'activité antimicrobienne et des CMI des échantillons à base de nanoparticules d'oxyde de nickel.....	27
II.8.1. Préparation des disques.....	27
II.8.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne	27
II.8.3. Evaluation des CMI.....	28
II.9. Préparation des couches minces.....	28
II.10. Evaluation de l'adhésion bactérienne sur des couches minces d'oxyde de nickel.....	29
II.10.1. Ensemencement.....	29

Résultats et discussion

1. Isolement et purification	30
2. Caractérisation morphologique des colonies isolées	30
2.1. Examen macroscopique.....	30
2.2. Examen microscopique	30
3. Identification de <i>Bacillus cereus</i>	33
3.1 Isolement sur milieu Mossel.....	33
4. Evaluation de la formation des biofilms	36
5. Echantillons à base de NPs de NiO.....	37
6. Evaluation de l'activité antimicrobienne et des CMI des échantillons à base d'oxyde de nickel.....	38
7. Couches minces.....	41
8. Adhésion bactérienne sur couches minces.....	41

Table des matières

Conclusion	43
Références bibliographiques	43
Annexes	
Résumé	
Abstract	

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Colonies de <i>B. cereus</i> sur gélose nutritive (a) et sur milieu Mossel (b).....	4
Figure 2 : Adhésion des cellules végétatives de <i>B. cereus</i> à une surface en acier inoxydable.....	7
Figure 3 : Etapes de formation d'un biofilm bactérien.....	8
Figure 4 : Biofilm de <i>B. cereus</i> âgé de 6 jours formé sur une surface en acier inoxydable.....	10
Figure 5 : Les différentes étapes de formation du gel.....	17
Figure 6 : Partie aérienne de <i>Eruca sativa</i>	20
Figure 7 : Microplaques ELISA après ensemencement et coloration.....	26
Figure 8 : Procédé de préparation des couches minces d'oxyde de nickel.....	28
Figure 9 : Couches minces sur lame en verre au cours de préparation.....	29
Figure 10 : Aspect macroscopique des colonies isolées à partir des échantillons de lait.....	30
Figure 11 : Différentes formes de bactéries isolées.....	33
Figure 12 : Aspect macroscopique de <i>B. cereus</i> sur milieu Mossel (souche 17).....	36
Figure 13 : DO de l'évaluation de la formation de biofilms	36
Figure 14 : Echantillons à base de NPs de NiO.....	37
Figure 15 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de chaque échantillon à base de NPs de NiO.....	38
Figure 16 : Effet inhibiteur des échantillons E1, E2, E3 et E4.....	40
Figure 17 : Couche mince à base des NPs de NiO.....	41
Figure 18 : Absence de colonies de <i>B. cereus</i> sur le milieu Mossel	42

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Données épidémiologiques françaises relatives aux toxi-infections alimentaires collectives à <i>B. cereus</i> . Foyers de TIAC déclarées aux ARS et/ou aux DD(CS)PP.....	5
Tableau 2 : Aspect microscopique des différentes bactéries isolées à partir des 10 échantillons de lait.....	31
Tableau 3 : Croissance des souches isolées à partir des échantillons de lait sur milieu Mossel.....	34
Tableau 4 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) \pm l'écart type des échantillons à base de NPs de NiO.....	38
Tableau 5 : CMI des échantillons E1, E2, E3 et E4.....	40

Liste des abréviations

Liste des abréviations

- ADNe : Acide désoxyribonucléique environnementale
- BHIB: Bouillon Cœur-Cerveille
- CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
- DO : Densité Optique
- GN : Gélose Nutritive
- MH : Mueller-Hinton
- NiO : Oxyde de nickel
- NPs : Nanoparticules
- TSE : Tryptone-Sel-Eau

Introduction

Introduction

Les biofilms sont des amas structurés de cellules microbiennes, immobilisés sur une surface inerte ou vivante et enrobés d'une matrice polysaccharidique. C'est une forme de résistance des microorganismes aux conditions défavorables de l'environnement et c'est également un moyen de conquête de nouveaux milieux de vie. Le nombre des travaux de recherche sur les biofilms a augmenté ces dernières années en raison d'une prise de conscience accrue de leur omniprésence et leur impact sur les systèmes naturels et industriels, ainsi que sur la santé humaine (Cunningham *et al.*, 2008).

Ces biofilms sont des structures qui persistent sur les équipements laitiers malgré les divers procédés de nettoyage grâce à leurs différents mécanismes de résistances. Il est à noter que les spores thermorésistantes sont capables d'adhérer dans les milieux industriels aux surfaces d'acier inoxydable et forment ainsi des biofilms encore plus résistants au nettoyage. La formation des biofilms est un phénomène redouté dans tous les secteurs de l'industrie alimentaire notamment celui des produits laitiers. En effet, elle est à l'origine de la dégradation de la qualité organoleptique et sanitaire des produits finis et la diminution de leur durée de conservation causant ainsi des problèmes de santé publique et des pertes économiques aux industriels (Malek, 2019).

La flore microbienne formant les biofilms retrouvés dans l'industrie laitière est essentiellement composée de bacilles sporulés. La bactérie la plus retrouvée dans les biofilms de l'industrie laitière est l'espèce *Bacillus cereus*, dont les spores sont considérées comme le principal problème microbiologique dans l'industrie laitière (Marchand *et al.*, 2012 ; Gopal *et al.*, 2015), en raison de leurs fortes adhérences aux surfaces inertes et leur adaptation aux stress acides ou alcalins, utilisés comme moyens de désinfection (Lindsay *et al.*, 2002 ; Abee *et al.*, 2011).

Afin de remédier à ce problème, de nouvelles recherches sont dirigées vers l'élaboration de stratégies de lutte contre l'adhésion des bactéries aux surfaces, première phase de la formation des biofilms, et donc par conséquent remédier à la formation des biofilms. Parmi ces nouvelles approches, la modification des surfaces d'adhésion par des nanoparticules d'oxydes métalliques, caractérisées par leurs tailles, formes ainsi que leurs bonnes propriétés magnétiques et électriques contribuant à réduire l'adhésion bactérienne (Vahedi *et al.*, 2017).

Introduction

Dans ce contexte, le présent travail est mené sur l'étude de la capacité de *B. cereus* à former des biofilms et l'évaluation de leurs adhésion sur des couches minces de nanoparticules d'oxyde de nickel.

Ce manuscrit comporte deux parties : la première est une synthèse bibliographique qui présente dans le premier chapitre une revue générale sur l'espèce *B. cereus*, les biofilms et les différents moyens de lutte employés face à ces derniers. Le deuxième chapitre décrit les différentes surfaces d'adhésion des bactéries avec un accent sur les couches minces d'oxyde de nickel. Quant au dernier chapitre, il donne un aperçu sur les polyphénols de *Eruca sativa*, leur effet antibactérien et antioxydant.

La deuxième partie est dédiée à expérimentation ; elle présente le matériel utilisé et les méthodes de travail adoptées suivie des résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Bactéries et biofilms

I.1. Bactéries

Les bactéries sont des êtres unicellulaires microscopiques qui font partie des procaryotes. Ce sont les organismes les plus nombreux et les plus largement représentés sur terre. Elles peuvent exister à l'état planctonique ou fixées à des surfaces en formant des biofilms.

Des extensions en forme de fouet recouvrent souvent les surfaces des bactéries – les longues, appelées flagelles, ou les courtes, appelées pili – et permettent aux bactéries de se déplacer et de se fixer à un hôte ou une surface (Thanassi *et al.*, 2012).

I.1.1. *Bacillus sp.*

Le genre *Bacillus* est représenté par des bacilles à Gram positif de la famille des *Bacillaceae*. Ce sont des aérobies, aéro-anaérobies facultatifs tirant leur énergie par respiration ou fermentation. Majoritairement, les bactéries de ce groupe sporulent, c'est leur moyen de résistance aux facteurs des environnements défavorables, notamment à une température élevée, à l'absence d'éléments nutritifs ou à la dessiccation (Sidbewendé, 2013).

Ces bactéries se trouvent habituellement dans le sol, l'eau, les aliments...etc. Ainsi les aliments les plus fréquemment contaminés sont les céréales comme le riz, les légumes et les épices (ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire de France, 2011).

I.1.2 *Bacillus cereus*

B. cereus, également appelée *B. cereus sensu stricto*, fait partie d'un groupe de bactéries que l'on nomme : Groupe *B. cereus* ou *B. cereus sensu lato*. Ce groupe inclut 5 autres espèces génétiquement apparentées : *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* (ANSES, 2021).

B. cereus est un bacille de 1.4 µm de long, retrouvé en chainettes courtes ou en paires. Les souches de *B. cereus* possèdent des pili ainsi que des flagelles péritriches. Ces appendices jouent un rôle majeur par leur fonction dans la motilité. Cette dernière donne aux souches accès à des surfaces propices à la formation de biofilm, de plus, elle est nécessaire au recrutement des cellules planctoniques au sein du biofilm ainsi qu'à l'étalement de ce dernier sur des surfaces non colonisées (Houry *et al.*, 2010).

Le réservoir primaire de cette bactérie est le sol, comme elle peut contaminer plusieurs aliments qui peuvent être considérés comme son deuxième réservoir tel que le lait et les produits laitiers.

Cette espèce est capable de former des spores pour résister aux conditions défavorables de l'environnement, c'est pourquoi elle est à l'origine de plusieurs contaminations alimentaires.

B. cereus est cultivée sur GN qui favorise la pousse de la majorité des espèces bactérienne, les colonies sont blanches et granuleuses, d'un diamètre de 2-7 mm (Murray *et al.*, 2007). Elle est également isolée sur le milieu Mossel qui lui est sélectif.

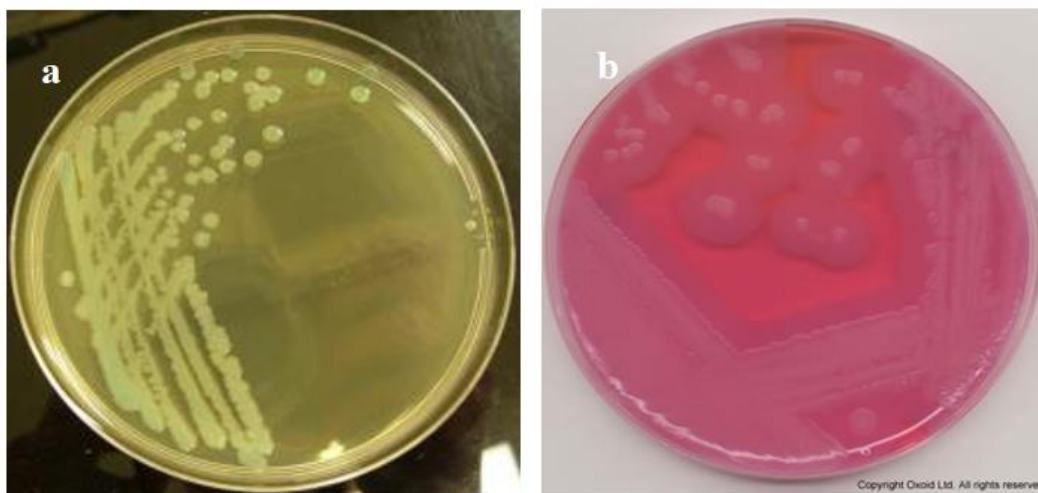


Figure 01 : Colonies de *B. cereus* sur gélose nutritive (a) et sur milieu Mossel (b) (Quintero et Vásquez, 2016)

I.1.2.1. Pathologies liées à *Bacillus cereus*

L'ingestion de *B. cereus* conduit à une intoxication alimentaire spontanément résolutive de deux formes : une forme diarrhéique dont la durée d'incubation est de 6h à 24h qui est accompagnée de douleurs abdominales, un ténesme rectal et parfois une fièvre ; et une forme émétique dont la durée d'incubation est de 1h à 5h accompagnée de vomissements et nausées. Elle peut aussi causer d'autres cas cliniques tels que l'endophtalmie, les infections des voies respiratoires et les infections similaires à la gangrène gazeuse (Tuipulotu *et al.*, 2020).

I.1.2.2. Épidémiologie de *Bacillus cereus*

Bien que des infections à *B. cereus* aient été documentées dans le monde entier, l'incidence réelle de cet agent pathogène chez l'homme est sous déclarée et sous-estimée. Ceci est dû à la légèreté

et à la courte durée des symptômes. Il est aussi dû à la nature spontanément résolutive de la plupart des infections à *B. cereus*, ce qui signifie que les individus ne consultent généralement pas un médecin. De plus, la surveillance épidémiologique est encore compliquée à cause de l'absence de tests de laboratoire pour confirmer si *B. cereus* est attribuée aux symptômes du patient ; car par exemple, une intoxication alimentaire peut être causée par des bactéries Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*, et entraîner les mêmes symptômes, à savoir des vomissements et des diarrhées. Ces infections sont en grande partie impossibles à distinguer de l'infection à *B. cereus* (Tuipulotu *et al.*, 2021).

Malgré l'absence d'estimations mondiales précises, le "Bad Bug Book" de l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments a déclaré qu'il y a, chaque année aux Etats Unis, environ 63 400 cas de maladie liée à *B. cereus*. De 2005 à 2007, il y a eu 13 épidémies confirmées et 37 épidémies suspectées impliquant plus de 1000 personnes.

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont des maladies à déclaration obligatoire en France (ANSES, 2021), Ci-dessous un tableau représentatif des données épidémiologiques françaises relatives aux toxi-infections alimentaires collectives à *B. cereus* estimées de 2012 à 2019.

Tableau 1 : Données épidémiologiques françaises relatives aux toxi-infections alimentaires collectives à *B. cereus*. Foyers de TIAC déclarées aux ARS et/ou aux DD(CS)PP (ANSES, 2021).

ARS : Agence régionale de santé

DD(CS)PP : Direction départementale (de la cohésion sociale) de la protection des populations.

Année	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
TIAC confirmées¹ à <i>B. cereus</i>								
Foyers (% ²)	20 (9,3%)	29 (15%)	23 (9%)	29 (10%)	45 (13%)	47 (16%)	57 (15%)	62 (16%)
Malades (%)	349 (14,8%)	344 (15%)	447 (15%)	545 (17%)	816 (16%)	845 (18%)	1166 (26%)	988 (22%)
Hospitalisations	11 (5,8%)	7 (4%)	18 (7%)	10 (4%)	12 (5%)	5 (2%)	43 (13%)	37 (13%)
TIAC suspectées à <i>B. cereus</i>								
Foyers (%)	198 (24,6%)	224 (25%)	241 (25%)	233 (26%)	208 (22%)	217 (28%)	283 (29%)	293 (27%)
Malades (%)	1673 (25,5%)	1902 (27%)	2031 (27%)	2085 (30%)	1656 (24%)	1652 (28%)	2047 (29%)	2155 (25%)
Hospitalisations	115 (25,7%)	67 (17%)	77 (22%)	53 (18%)	85 (26%)	87 (30%)	117 (32%)	46 (20%)

¹ Foyers dans lesquels l'agent est isolé dans un échantillon d'origine humaine et/ou dans les aliments consommés par les malades

² % par rapport au total des cas ou foyers avec des agents déterminés

Il ressort du tableau que les foyers de maladies liées à *B. cereus* ont considérablement augmenté entre 2012 et 2019. Le nombre d'hospitalisations a également augmenté pendant ces années.

I.2. Adhésion des bactéries

Les bactéries ont une capacité élevée à adhérer aux surfaces cellulaires pour s'y multiplier et former des communautés ou pour pénétrer dans la cellule hôte dans le cas des bactéries pathogènes. L'adhésion bactérienne est la première étape du mécanisme de la formation du biofilm. Elle peut être influencée par plusieurs facteurs tels que : les propriétés de la bactérie, les caractéristiques de la surface, les facteurs environnementaux...etc (Baillif *et al.*, 2010).

L'adhésion des bactéries se déroule en deux phases, une phase réversible suivie d'une phase irréversible. La phase réversible est prédominée par des interactions de faible intensité. Il s'agit des forces d'attractions de Van der Waals et des interactions électrostatiques répulsives (Malek, 2013). La Phase irréversible quant à elle, est caractérisée par des réactions spécifiquement moléculaires entre les structures de la surface des bactéries et la surface du substrat. L'adhésion de la bactérie à la surface se fait par le biais des liaisons sélectives des structures polymériques des surfaces bactériennes, telles que les capsules, les fimbriae, les pili et les EPS qui agissent en tant que colle (Katsikigiani et Missirlis, 2004).

La fixation de *B. cereus* à l'épithélium intestinal est liée à la présence des fimbriae, qui reconnaissent un site spécifique de la surface des entérocytes, elle peut être également due à la couche de surface cristalline (couche S) (Kotiranta *et al.*, 1998). Quant à l'adhésion des spores aux surfaces inertes et vivantes, elle se fait par le biais des glycoprotéines de l'exosporium (Lequette *et al.*, 2011). C'est une couche externe, lâche, hydrophobe et glycosylée (Abhyankar *et al.*, 2013) dont la BclA est la principale glycoprotéine (Lequette *et al.*, 2011). Il a été démontré que cette dernière est un facteur clé dans l'adhésion des spores de la souche ATCC 14579 de *B. cereus* sur les surfaces en acier inoxydable (Lequette *et al.*, 2011).



Figure 2 : *B. cereus* adhérents à une surface en acier inoxydable (Silva *et al.*, 2018)

I.3. Contamination du lait

Le lait est un aliment qui favorise la prolifération des bactéries en tant que milieu alimentaire entier. Dans cet environnement, *B. cereus* est une espèce peu compétitive, capable de sporuler, Elle est bien adaptée aux procédés des traitements thermiques.

Plusieurs origines sont derrière la contamination du lait par des bactéries pathogènes. Le lait peut être contaminé directement après la traite par le sol, l'air ou l'environnant. La contamination des aliments peut aussi se produire pendant leur transformation du fait de la persistance des spores sur les surfaces (équipements) et leurs propriétés de forte adhérence (formation de biofilms).

Pour *B. cereus*, la charge bactérienne tolérée généralement dans le secteur laitier est de 10^3 spores.mL⁻¹ de lait. Les aliments impliqués dans des cas de toxi-infections alimentaires à *B. cereus* contiennent au moins 10^5 bactéries/g d'aliment (Tremblay *et al.*, 2014).

I.4. Biofilms

Les bactéries présentent deux modes de vie dans l'environnement : un mode de vie libre sous forme planctonique, et dans le cas d'un épuisement de nutriments, elles présentent un autre mode de vie qui est la forme sessile et adhèrent à une surface formant alors un biofilm.

I.4.1. Définition

Un biofilm est une communauté bactérienne sous forme d'une structure tridimensionnelle complexe entourée d'une matrice d'exopolysaccharides qui assure la fixation et la protection des bactéries. Il peut se former sur des surfaces inertes comme les équipements d'industrie

alimentaire et les implants médicaux ; ainsi que sur des surfaces vivantes comme la muqueuse intestinale et la plaque dentaire (Tremblay *et al.*, 2014).

I.4.2. Formation

La formation de biofilms est un processus complexe et dynamique. Elle peut être influencée par plusieurs facteurs environnementaux tels que la disponibilité des nutriments, le temps de maturation et l'osmolarité. Ce processus peut être divisé en cinq étapes :

- Phase 1 : adhésion réversible des bactéries à la surface. Faible union des bactéries avec le substrat qui se produit en à peine une minute.
- Phase 2 : adhésion irréversible à la surface. Des liaisons irréversibles se forment durant une période allant de 20 minutes et 4 heures.
- Phase 3 : début de la croissance et la division avec production d'un exopolymère protecteur ainsi qu'un développement final de la colonie avec dispersion de cellules colonisatrices.
- Phase 4 : croissance et maturation ; les cellules bactériennes résultantes forment une micro colonie autour du site de liaison. Quand les conditions sont adéquates, une colonie organisée se développe. Le biofilm s'adapte à la présence de nutriments, à l'oxygène et aux changements de populations. Le développement de cette phase est de 2 à 4 jours.
- Phase 5 : libération d'un certain nombre de bactéries de la matrice du biofilm pour coloniser de nouvelles surfaces, c'est la dispersion du biofilm. (Tremblay *et al.*, 2014)

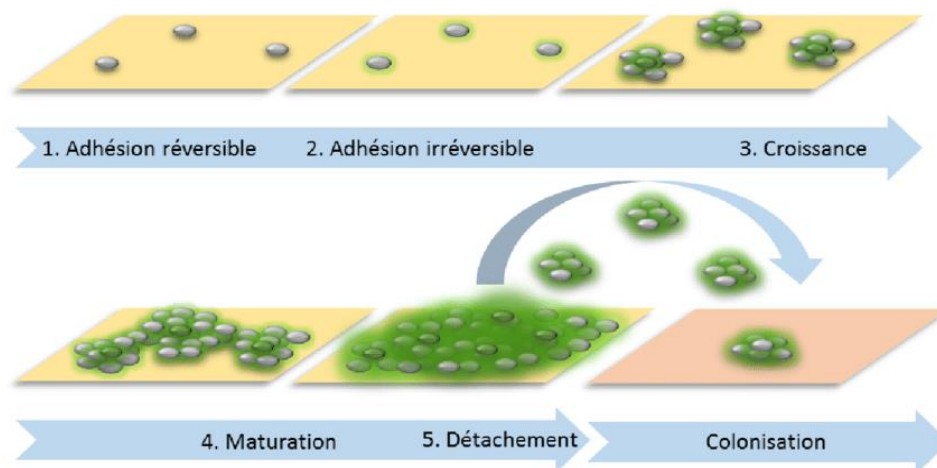


Figure 3 : Etapes de formation d'un biofilm bactérien (Bastard, 2015)

I.4.3. Propriétés

Le biofilm est formé d'une communauté de bactéries qui sont séparées par des canaux qui permettent la diffusion des nutriments et de l'oxygène de l'extérieur vers les régions internes du biofilm, ainsi que l'évacuation des déchets.

Lors du passage de l'état planctonique au biofilm, les caractéristiques phénotypiques des bactéries subissent des changements tels que la perte des flagelles et la modification de la morphologie et du comportement. Au sein d'un biofilm, les bactéries adoptent un comportement de groupe ; elles ont une activité collective, coordonnée par leurs interactions et communications. Cette communication est établie grâce à des molécules de signalisation, c'est le phénomène du Quorum sensing (Bouali, 2017).

Les biofilms retrouvés dans des environnements naturels ou industriels sont résistants aux bactériophages, aux amibes et aux biocides utilisés dans les procédés industriels ainsi qu'à la réponse immunitaire de l'hôte face aux bactéries pathogènes. Les bactéries sous forme planctonique sont généralement plus sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que les biofilms. Ces derniers sont de 10 à 1000 fois plus résistants aux agents antimicrobiens. Cette résistance peut être expliquée par plusieurs facteurs :

- La réduction de la diffusion des agents antimicrobiens par la matrice polymérique qui agit comme barrière.
- La capacité de liaison des charges électrostatiques à la surface de la matrice polymérique à certains agents antimicrobiens.
- La diminution de la concentration en nutriments permettant aux bactéries situées à l'intérieur du biofilm d'acquiescer un métabolisme et une croissance ralentis rendant les antibiotiques inefficaces.
- La favorisation du transfert horizontal de gènes de résistance (la conjugaison) et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques par la proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature (Tremblay *et al.*, 2014).

I.4.4. Biofilms de *B. cereus*

B. cereus est responsable de la formation de biofilms sur de différentes surfaces qui sont en contact avec les aliments tels que les tuyaux en acier inoxydable, les bandes transporteuses, et les réservoirs de stockage. Cette bactérie représente plus de 12% de la flore constitutive des biofilms

dans les industries laitières. Ces biofilms peuvent persister pendant de longues durées et résistent même aux procédures de désinfection (Sharma et Anand, 2002).

Les biofilms peuvent être collés sur des surfaces abiotiques immergées ou présents sur des tissus vivants. Ces communautés complexes sont susceptibles d'être un élément clé dans la capacité de *B. cereus* à coloniser différents environnements. Les biofilms de *B. cereus* sont généralement intégrés dans une matrice autoproduite dont les éléments structurels sont des exopolysaccharides, des protéines et de l'ADN. Il a été démontré que l'ADN extracellulaire contenu dans la matrice du biofilm de *B. cereus* est produit spécifiquement dans les biofilms et qu'il est nécessaire pour l'adhésion sur des surfaces en polystyrène ou en verre. La formation des spores lui confère une haute résistance aux différents stress et une grande capacité d'adhérence sur divers substrats (Majed *et al.*, 2016).

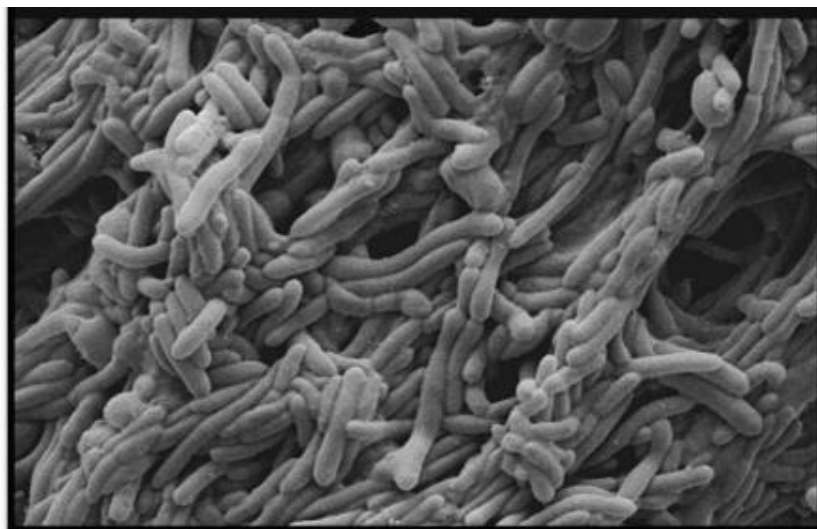


Figure 04 : Biofilm de *B. cereus* âgé de 6 jours formé sur une surface en acier inoxydable observé au microscope électronique (Habibi, 2021)

I.4.5. Problèmes liés aux biofilms dans les industries laitières

La formation de biofilm pose des problèmes dans l'industrie laitière car elle peut mener à des problèmes d'hygiène et à des pertes économiques. Les biofilms se forment principalement dans des conditions permettant aux bactéries d'adhérer facilement aux parois des canalisations, par exemple lorsque le lait se retrouve dans des canalisations de transport sans écoulement (Stoodley *et al.*, 2002). Les bactéries peuvent se détacher des biofilms et contaminer le lait lors de son

passage sur les surfaces (Austin et Bergeron, 1995). Ces structures peuvent également être responsables de la réduction de la durée de conservation des produits par la sécrétion d'enzymes de détérioration résistantes à la chaleur telles que les protéases et les lipases (Teh *et al.*, 2014).

Les micro-organismes constituant les biofilms peuvent également catalyser des réactions chimiques et biologiques causant ainsi la corrosion des canalisations et des tanks de stockage, réduire le transfert de chaleur et augmenter la résistance au frottement des fluides (Kumar et Anand, 1998 ; Gupta et Anand, 2018).

I.4.6. Techniques de mise en évidence des biofilms

I.4.6.1. Techniques de culture

I.4.6.1.1. Cellules à flux

Les cellules à flux sont de petites chambres qui permettent la formation des biofilms à l'interface solide-liquide en présence d'une force de cisaillement et d'un apport continu d'éléments nutritifs d'une manière similaire à l'environnement naturel des biofilms (Goeres *et al.*, 2009). Ces cellules sont composées de pièces de tubes capillaires en verre montés sur une base en plastique ou en métal (Stoodley *et al.*, 2001). La suspension bactérienne passe à travers des coupons ou des bouchons qui sont détachables, c'est là où les bactéries adhèrent et forment des biofilms. Après un certain temps d'incubation, les cellules bactériennes sont détachées par ultrasonication puis dénombrées sur plaque (Malek, 2013).

I.4.6.1.2. Microplaques de titration

La technique des microplaques de titration au cristal violet est une technique colorimétrique basée sur le principe que le colorant se lie de manière proportionnelle à la biomasse du biofilm (Niu et Gilbert, 2004). Elle permet donc de visualiser les cellules qui s'attachent à la surface et se colorent en pourpre avec le cristal violet, alors que les surfaces abiotiques ne sont pas colorées (Pratt et Kolter, 1998).

I.4.6.2. Techniques microscopiques

I.4.6.2.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La MEB est une technique qui permet l'étude morphologique des biofilms. La préparation du matériel biologique pour cette technique requiert des manipulations extensives telles que la

fixation et la déshydratation des échantillons suivie par un séchage, au point critique (Malek, 2013).

I.4.6.2.2. Microscopie électronique électronique à balayage environnementale (ESEM)

L'ESEM est une technique permettant l'observation des biofilms sans déshydratation et sans utilisation de métaux conducteurs. Ainsi, le glycocalyx hautement hydraté du biofilm peut être observé dans son état naturel. (Malek, 2013)

I.4.6.2.3. Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

La CLSM est une technique basée sur l'usage de colorants fluorescents excités par la lumière, qui émettent une fluorescence détectée. Elle permet une résolution similaire à celle de la microscopie électronique sans altération de la structure des microorganismes. Elle ne requiert pas de réactifs sauf des solutions aqueuses de colorants fluorescents.

L'application de la CLSM à l'étude de biofilms formés dans les chambres à flux par des bactéries génétiquement colorées à la protéine fluorescente verte permet l'observation de l'intérieur des biofilms, à des profondeurs contrôlées. Elle fournit des informations sur leur processus de développement du biofilm, les différenciations cellulaires, l'organisation spatiale ainsi que d'autres fonctions du biofilm (Malek, 2013).

I.4.7. Moyens de lutte

Les biofilms représentent un véritable problème dans le secteur de l'industrie agro-alimentaire, raison pour laquelle le contrôle du développement microbien est primordial dans ce type d'industrie.

Des procédures de nettoyage et de désinfection sont employées par les entreprises de manière très régulière afin d'assurer la sécurité sanitaire de leurs produits. Le but de l'utilisation de ces procédures est de réduire le risque de contaminations croisées des produits, notamment par des bactéries pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires.

I.4.7.1. Stratégies classiques de nettoyage

Les stratégies classiques de nettoyages permettent de prévenir la formation de biofilm et de désinfecter régulièrement les surfaces avant que le biofilm ne puisse se former.

Pour les surfaces ouvertes voire accessibles, la procédure est simple parce que le contact avec la surface est direct. Quant aux surfaces fermées, les procédures appliquées sont plus complexes, telles que le Nettoyage En Place (NEP). Ce dernier permet de préserver les équipements sans avoir à les démonter, ainsi, le nettoyage et la désinfection sont assurés par un circuit d'eau et de produits selon des cycles déterminés.

Les méthodes classiques présentent des inconvénients tels que la possibilité de présence de résidus toxiques après la désinfection. Pour cela, de nouvelles approches sont nécessaires afin de garantir des produits alimentaires sûrs pour la consommation (Barthomeuf *et al.*, 2019).

I.4.7.2. Nouvelles approches

Plusieurs approches pour lutter contre les biofilms sont en voie de développement. Il s'agit par exemple de l'utilisation de molécules inhibitrices de la formation de biofilm ou de substances dissolvant le biofilm, appelées éradicatrices de biofilm. Ces molécules interfèrent avec les voies de signalisation bactériennes chez les bactéries Gram positif et Gram négatif. Elles peuvent être des enzymes, peptides, antibiotiques, polyphénols...etc.

La modification des surfaces est la stratégie la plus étudiée récemment. L'exemple le plus répandu est l'utilisation de revêtements ou «coatings ». Cette procédure possédant une activité antibactérienne peut reposer sur différentes techniques :

- La fixation par greffage de molécules connues ayant une activité bactéricide reconnue, par exemple le triclosan, la chlorhexidine ou le chlorure de benzalkonium.
- L'utilisation de polymères avec un revêtement portant des groupes fonctionnels avec activité antibactérienne, comme les amines tertiaires ou les N-alamines.
- L'utilisation de polymères qui libèrent des oxydes nitriques ;
- L'utilisation de couches mince libérant des molécules antibactériennes comme du triclosan ou de la nisine.
- L'utilisation de revêtements possédant une activité bactéricide photo-induite. Parmi les composé étudiés, le dioxyde de titane et le dioxyde de nickel.
- La synthèse de surfaces nanostructurées ou de revêtements composés de nanoparticules (Campoccia *et al.*, 2013 ; Barthomeuf *et al.*, 2019).

Ces nanoparticules font objet de plusieurs travaux de recherche en raison de leurs caractéristiques antibactériennes et anti biofilm. L'un des avantages des NPs c'est qu'elles peuvent facilement interagir avec la cellule bactérienne en raison de leur forme, de leur petite taille, de leur charge de surface, de leur hydrophobicité et de leur rapport surface/volume élevé (Chen *et al.*, 2013 ; Mahamuni-Badiger *et al.*, 2019).

Les NPs agissent sur les biofilms par différents mécanismes :

- Inhibition du développement des EPS
- Inhibition des pompes à efflux des bactéries
- Liaison des NPs de charge positive à l'ADNe de charge négative, perturbant la formation de biofilm par leur pénétration dans la structure du biofilm
- Interaction de NPs à charge négative avec des adhésine intercellulaire polysaccharidique chargés positivement et modification de la perméabilité de la structure du biofilm ; ce qui induit la pénétration des NPs dans la matrice du biofilm, inhibant ensuite le développement du biofilm en induisant des espèces réactives de l'oxygène (Hemmati *et al.*, 2021).

Chapitre II : Surfaces d'adhésion

II.1. Surfaces d'adhésion des bactéries

Il existe différents matériaux et types de surfaces, c'est pourquoi il est nécessaire de comprendre les mécanismes d'adhésion des bactéries à ces différentes surfaces pour pouvoir contrer la croissance des biofilms. On distingue alors des surfaces ouvertes (cloisons, plafonds, sols, mobiliers, équipements...) et des surfaces fermées des machines ou du matériel.

La formation des biofilms est plus répandue sur les surfaces hydrophobes que sur les surfaces hydrophiles (Katsikogianni et Missirlis, 2004; Ploux *et al.*, 2007). Sur une surface hydrophobe, qui est inerte à l'eau, il se produit un phénomène d'attraction hydrophobe. Il faut cependant considérer ce facteur par rapport aux propriétés des bactéries elles-mêmes ainsi que celles du milieu environnant (Briandet *et al.*, 1999 ; Chae et Schraft, 2000; Allion *et al.*, 2007). À l'inverse, dans le cas des surfaces hydrophiles, des liaisons hydrogènes se forment entre les molécules d'eau du milieu et les groupements fonctionnels du support solide. Il existe alors un phénomène de répulsion hydrophile à la surface de la bactérie si celle-ci est hydrophile.

La topographie, la rugosité de surface, la nettoyabilité ainsi que la mouillabilité de la surface jouent un rôle important dans l'adhésion des bactéries. Des études ont montré que même la nature du matériau influence la formation de biofilm. En effet, la capacité de formation du biofilm de la souche *Legionella pneumophila*, par exemple, était testée par Rogers *et al.* (1994) et Meyer (2001). Ils ont montré que la croissance du biofilm était plus importante, par ordre croissant, sur du verre, de l'acier inoxydable, du polypropylène, du PVC chloré, du PVC non plastifié, l'éthylènepropylène puis sur du latex (Rogers *et al.*, 1994 ; Meyer, 2003). Cependant, les matériaux classiquement rencontrés dans les industries agro-alimentaires sont le plastique, le caoutchouc, le verre, le ciment et l'acier inoxydable (Van Houdt et Michiels, 2010).

II.2. Couches minces**II.2.1. Définition**

Une couche mince est un revêtement d'un matériau déposé sur un autre matériau dont l'épaisseur peut varier de quelques couches atomiques à une dizaine de micromètres.

II.2.2. Généralités

Les couches minces sont développées afin de conférer des propriétés particulières aux surfaces tout en bénéficiant des propriétés massives du substrat. Ces propriétés sont déterminées par la structure de la couche mince qui en résulte et sont fortement dépendantes de la méthode de dépôt sélectionnée, du matériel de couches minces et du substrat. Conformément à la large gamme d'applications de couches minces, un certain nombre de méthodes de mise en œuvre des couches minces existe, dont les plus couramment utilisées sont :

- Le dépôt chimique en phase vapeur.
- L'évaporation sous-vide.
- Pulvérisation ou spray (Jilani *et al.*, 2017).

II.2.3. Couches minces à base de NPs

Diverses méthodes sont utilisées pour la production et la synthèse de nanoparticules, telles que la méthode sol-gel, la méthode de compression en phase vapeur, la méthode d'alliage mécanique, la méthode plasma et les méthodes électrochimiques (Bokov *et al.*, 2021).

II.2.3.1. Méthode sol-gel

Le terme sol-gel correspond à l'abréviation solution-gélification c'est un procédé qui a reçu une attention particulière vu sa simplicité de dépôt, facilité de contrôle des composants chimiques et de la préparation est à faible coût. Il permet de fabriquer un matériau inorganique par des réactions chimiques simples et à une température proche de la température ambiante (20 à 150 °C). La méthode sol-gel est un procédé d'élaboration de plusieurs types d'oxyde sous différentes configurations telles que les couches minces, les poudres et les fibres. La base de la méthode sol-gel est la production d'un sol homogène à partir des précurseurs et sa transformation en gel. Le solvant dans le gel est ensuite éliminé et le gel restant est séché. Des nanoparticules sont obtenues par broyage du gel par des broyeurs spéciaux (Bokov *et al.*, 2021).

La méthode sol-gel est une très bonne approche synthétique pour préparer des nanoparticules d'oxydes métalliques de haute qualité ainsi que des composites d'oxydes mixtes. Cette méthode a un excellent contrôle sur la texture et les propriétés de surface des matériaux (Parashar *et al.*, 2020).

II.2.3.2. Procédé de gélification

Un sol est formé de particules colloïdales ou de polymères dispersées dans un solvant, elles peuvent être amorphes ou cristallines d'une taille typique de quelques nm. Des réactions de polycondensation conduisent au passage à l'état de gel.

Ce dernier est constitué d'un réseau continu tridimensionnel des particules de sol, qui renferme une phase liquide.

Il existe deux voies de synthèse sol-gel qui sont :

- Voie inorganique ou colloïdale : Elle est obtenue à partir de sels métalliques (chlorures, nitrates, oxychlorures). Le réseau est construit à partir d'une agglomération de particules colloïdales.
- Voie métallo-organique ou polymérique : Elle est obtenue à partir d'alcoxydes métalliques dans des solutions organiques. Les particules ont une sous-structure polymère constituée d'agrégats de particules sous-colloïdales (Technique, 2004).

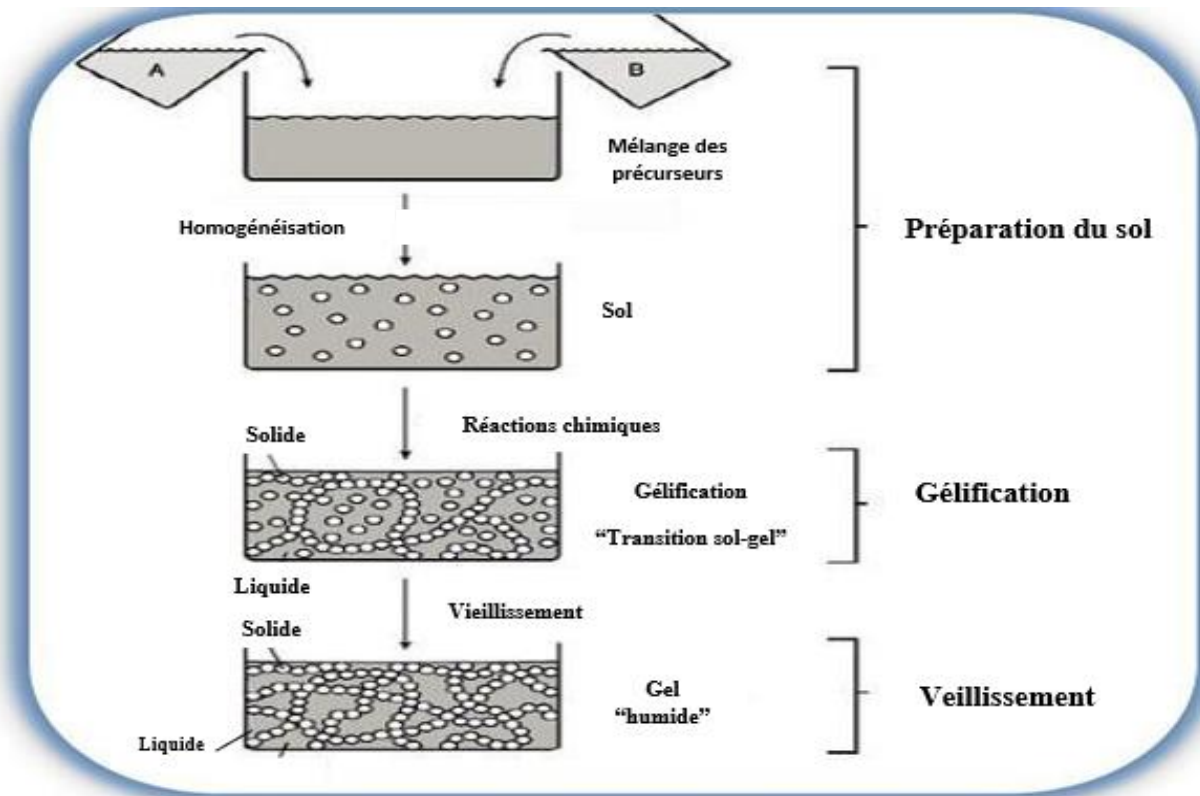


Figure 5 : Etapes de formation du gel (Aoudjit, 2009)

II.2.4. Nanoparticules d'oxyde de nickel

Les nanoparticules de NiO ont des tailles qui varient entre 1 et 100 nm, cette taille minuscule génère un rapport surface /volume important qui affecte les échanges à l'interface entre l'objet considéré et son environnement, ce large pourcentage d'atomes de surface rend les matériaux plus réactifs du point de vue chimique. Les NPs de NiO sont également dotées d'une stabilité magnétique, électrique et chimique. Elles ont néanmoins été classée parmi les NPs toxiques (Andrieux-Ledier, 2012).

Les NPs de NiO possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Le mécanisme central impliqué dans leur l'activité antibactérienne est l'interaction électrostatique entre les composants de la membrane cellulaire bactérienne chargés négativement et les nanoparticules chargées positivement (Saleem *et al.* ,2017).

Chapitre III :

Polyphénols

III.1. Polyphénols

III.1.1. Définition et généralités

Les polyphénols aussi connus sous le nom « composés phénoliques » sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, ils y sont retrouvés depuis les racines jusqu'aux fruits (Proctor *et al.*, 2005 ; Yoon et Back, 2005).

Ces composés jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, ils constituent des signaux de reconnaissance entre les plantes, et lui permettent de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes contribuant ainsi à sa survie (Hynes et O'Coinceanainn, 2004).

Les polyphénols possèdent un pouvoir antioxydant qui permet de neutraliser les radicaux libres qui se forment à la suite de divers facteurs tels que les rayonnements UV, les radiations, le tabac, la pollution atmosphérique, l'inflammation etc... ces radicaux s'accumulent dans le corps sous forme d'espèces oxygénées réactives causant des dommages au niveau des cellules ; c'est le stress oxydatif (Barrat, 2019).

III.1.2. Biosynthèse et structure

La biosynthèse des composés phénoliques des végétaux à partir des métabolites primaires suit deux grandes voies : la voie Shikimate et la voie polyacétate (Richter, 1993). Leur structure varie de molécules simples (acides phénoliques simples) vers des molécules hautement polymérisées (tanins condensés).

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ils sont communément subdivisés en flavonoïdes (flavones, flavonols, anthocyanidines, isoflavones, flavonones, catéchines) ou non-flavonoïdes (resvératrol, acides phénoliques, lignanes).

III.2. Roquette

III.2.1. Généralités

Eruca sativa, communément appelée « Roquette », est une plante comestible qui appartient à la famille des *Brassicaceae*. Cette espèce est connue depuis l'antiquité et a même été mentionnée

dans l'herboristerie grecque de Dioscoride (*Materia Medica*) qui a été écrit vers l'an 60 (Morales et Janick, 2002).

La partie aérienne de la plante est principalement consommée fraîche en salade, quant aux graines, elles sont traditionnellement utilisées en Inde pour la production d'huile savoureuse (huile de Taramira) (Khoobchandani *et al.*, 2010). La croissance de *E. sativa* est rapide et elle a la capacité de se développer dans différentes conditions climatiques (Kamran *et al.*, 2016).

III.2.2. Taxonomie

Selon Miller (1768), la position taxonomique de l'espèce *E. sativa* est comme suit :

Règne : *Plantae*

Division : *Magnoliophytes*

Classe : *Magniliopsida*

Ordre : *Brassicales*

Famille : *Brassicaceae*

Genre : *Eruca*

Espèce : *Eruca sativa* (Miller, 1768)



Figure 06 : Partie aérienne de *Eruca sativa* (Michels, 2017)

III.2.3. Répartition

E. sativa est originellement retrouvée en Europe centrale et méridionale, Asie occidentale, Afrique septentrionale. Elle est cultivée dans plusieurs pays, tels que les États-Unis, le Royaume Uni, l'Italie, l'Espagne, le Maroc, l'Inde et l'Australie.

La roquette sauvage, une espèce de la même famille, est assez commune au Sahara septentrional et central, surtout dans les emplacements fréquentés par les troupeaux (Lahmadi *et al.*, 2013).

III.2.4. Description botanique

La roquette est une plante annuelle herbacée. Sa tige est dressée, simple, parfois ramifiée de 20 à 60 cm de hauteur (Jafri, 1973). Les feuilles basales sont pétiolées, tandis que les supérieures sont sessiles. Toutes les feuilles sont épinées, avec un lobe terminal long lobé (Miyazawa *et al.*, 2002).

Le racème porte entre 15 et 50 fleurs de couleur jaune pâle ou blanchâtre et atteignent entre 1,5-2,0 cm de largeur ; elles ont quatre sépales poilus, marron et des fois violettes. Les graines sont de 1,5 à 2 mm de largeur, jaune-brun ou rouge, sphériques ou ovoïdes se posent en deux rangées dans chaque cellule (Miyazawa *et al.*, 2002).

III.2.5. Utilisations médicinales

Pendant plus de 20 siècles, la médecine traditionnelle a attribué à cette plante un certain nombre de propriétés thérapeutiques et bénéfique pour la santé. Elle est connue comme dépurative, diurétique, digestive, aphrodisiaque et rubéfiante (Yaniv *et al.*, 1998). L'huile extraite des graines d'*E. sativa* est dotée d'un potentiel antimicrobien, elle a été utilisée pour le traitement des infections cutanées, de la fièvre, des infections urinaires et de la diarrhée. De plus, les graines de cette plante ont montré un effet antioxydant important (Barillari *et al.*, 2005).

III.2.6. Propriétés antimicrobiennes

Plusieurs travaux ont montré l'activité de *E. Sativa* contre différentes espèces microbiennes. Une étude a démontré une efficacité remarquable de l'extrait de *E. sativa* contre *Staphylococcus aureus* et *B. cereus* (Nassrullah, 2015). L'extrait aqueux de la plante a montré une inhibition significative de certaines souches fongiques comme *Spadicoides stoeri* et *Paecilomyces variotii*.

L'extrait méthanolique des graines a également montré une activité antibactérienne contre *Enterobacter agglomerans*, *Hafniaalvei* et *Penicillium funiculosum* (Isirat *et al.*, 2010).

Il a été démontré que l'huile de graines d'*E. sativa* présente des activités antimicrobiennes prometteuses contre les bactéries Gram négatif et Gram positif résistantes aux antibiotiques.

III.2.7. Composés phénoliques de la roquette et propriétés antioxydantes

Les études sur la composition phytochimique des graines de *E. sativa* ont montré qu'elles sont riches en polyphénols en particulier les flavonoïdes (Michael *et al.*, 2011).

Les feuilles de la Roquette sont également riches en flavonoïdes, en particulier le kaempferole, la Quercitine et l'isorhamnetine (Alruwaih et Yaylayan, 2017). Les composés phénoliques des graines sont également représentés en grande partie par des flavonoïdes ; plus précisément le kaempferole, la quercetine et l'isorhamnetine (Michael *et al.*, 2011, Bennett *et al.*, 2006) les Benzaldehyde, 2- Phenylacetaldehyde, le Methyl salicylate et la Vanilline (Blažević et Mastelić, 2008).

Les flavonoïdes sont dotés d'un pouvoir antioxydant induit par ses groupes hydroxyles fonctionnels qui ont la capacité d'éliminer les radicaux libres (Pizzino *et al.*, 2017). Ils peuvent intervenir sur les molécules oxydantes soit par échange d'électrons ou en chélatant les métaux de transition. Ce sont donc ces polyphénols qui procurent à la plante son pouvoir antioxydant.

Une étude de Barillari *et al.*, 2005 a attribué le potentiel antioxydant d'*E. sativa* à sa teneur en glucosinolates, le métabolite secondaire bio-précurseurs des isothiocyanates (Barillari *et al.*, 2005).

III.2.8. Effet des composés phénoliques de la roquette sur les métaux

Plusieurs études ont montré que les polyphénols diminuent la toxicité des métaux tels que le nickel. Les flavonoïdes qui sont les principaux polyphénols de la roquette peuvent réduire l'adsorption des ions métalliques (Iloga *et al.*, 2017). Ils sont connus pour leur capacité à former des complexes stables avec ces ions, ils sont donc capables de limiter ainsi la production des dérivés réactifs de l'oxygène (Moridani *et al.*, 2003 ; Engelmann *et al.*, 2005).

Les atomes d'oxygène des flavonoïdes sont dotés de doublés non-liants qui leurs permettent de chélater les ions métalliques. Ces derniers sont donc piégés et inactivés et ne peuvent plus réagir avec d'autres composés (Pessel, 2014).

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie « LABAB » de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou. Le travail s'est étalé en une période de trois mois, du début du mois de mars au début du mois de juin 2022.

L'objectif principal de ce travail est de trouver des surfaces qui diminuent ou empêchent l'adhésion bactérienne et donc la formation de biofilms. L'étude s'est faite sur *B. cereus* et des couches minces d'oxyde de nickel.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans ce travail est composé de :

- Souches bactériennes des espèces de *Bacillus* sp. isolées à partir du lait cru de vache et de chèvre.
- Extrait polyphénolique de *Eruca sativa*.

I.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé est constitué de produits chimiques, milieux de culture et différents appareillages.

II. Méthodes

II.1. Echantillonnage

Les souches bactériennes ayant fait l'objet de cette étude ont été collectées de 7 échantillons de lait provenant des élevages de vaches situés à Boghni, Draa El Mizane, Mizrana (Tizi Ouzou) et Baghlia (Boumerdes) destinés à la fabrication de différents produits laitiers par la fromagerie « L'OLIVIER ». De plus, trois échantillons de lait de chèvre ont été collectés d'un élevage à domicile situé dans la région de Maatkas.

II.1.1. Techniques de prélèvement et de transport

Le prélèvement se fait manuellement, dans un flacon stérile. Les premiers jets sont éliminés de la mamelle, le flacon est ensuite rempli au 2/3 de sa capacité. Les prélèvements sont directement mis dans une glacière, transportés au laboratoire puis gardés dans un réfrigérateur

Matériel et méthodes

afin d'être analysés dans les 24h qui suivent pour que l'échantillon ne soit pas altéré lors du transport ou stockage (Hamiroune *et al.*, 2014 ; Guiraud, 2003).

II.2. Traitement des échantillons

Des solutions mères sont préparées par dilution de 1 mL de chacun des 10 des échantillons de lait dans 9 mL de TSE. Les mélanges sont ensuite bien homogénéisés à l'aide d'un Vortex. Afin de sélectionner le genre *Bacillus* et détruire toute forme végétative des bactéries, un choc thermique est requis. Il s'effectue par incubation des solutions mères à une température de 80°C pendant 15 min puis un refroidissement sous l'eau de robinet (Stoeckel *et al.*, 2015).

II.3. Isolement, purification des souches

De chaque solution mère, un volume de 500 µL estensemencé dans une boîte de Petri contenant de la gélose nutritive. Les boîtes sont ensuite incubées à 37° pendant 24h.

Les colonies obtenues sont isolées et purifiées par repiquage sur gélose nutritive avec la méthode des stries de façon à obtenir des colonies bien isolées après incubation à 37°C pendant 24h. La purification est nécessaire par le fait de la présence de certains types de cellules autres que *Bacillus* (Meddas *et al.*, 2020).

II.4. Conservation des souches

La conservation des souches s'effectue dans des cryotubes contenant 2/3 de BHIB et 1/3 de glycérol. Chaque cryotube est rempli de 1mL de BHIB puisensemencé avec l'une des souches pures précédemment obtenues. Les cryotubes sont incubés 24h à 37°C puis 500 µL de glycérol est rajouté dedans. Ils sont gardés au congélateur à 4°C (ACTIA, 2015).

II.5. Identification des souches

II.5.1. Etude macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies est observé directement sur la gélose après purification. Il permet de connaître leur taille, forme, contour, relief, couleur et opacité.

II.5.2. Etude Microscopique

L'étude microscopique permet d'examiner la forme, la taille et l'arrangement des cellules suite à la coloration de Gram où des frottis de chaque colonie bactérienne ayant poussé sur la gélose nutritive suivis de colorations sont observés au microscope optique au grossissement ×1000. Cette technique permet de distinguer deux grands groupes bactériens : les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif (Abe *et al.*, 2018).

Matériel et méthodes

II.5.3. Etude biochimique

II.5.3.1. Isolement sur milieu Mossel

Le milieu Mossel est un milieu sélectif pour *B. cereus*. Le principe de son fonctionnement est fondé sur l'absence de fermentation du mannitol par *B. cereus* ; la présence d'une lécithinase chez la majorité de ces souches ce qui dégrade la lécithine du jaune d'œuf du milieu, et enfin l'agent sélectif qui est la polymyxine B auquel *B. cereus* est résistante.

L'isolement a été effectué par repiquage des souches *Bacillus* sp. sur des boîtes de Petri contenant le milieu Mossel préalablement coulé en effectuant des stries, suivi par une incubation à 37°C pendant 24h (Abe *et al.*, 2018).

II.6. Evaluation de la formation de biofilms

L'évaluation et la quantification de la formation du biofilm par chacune des souches de *Bacillus* sp. se fait par la technique de microplaque ELISA à 96 puits. Cette technique repose sur le principe de la mesure des DO des biofilms formés à partir des cellules bactériennes précédemment ensemencées et colorées (Saleem, 2017).

Chaque puits de la microplaque est rempli de 1ml de BHIB additionné de 12% de saccharose puis ensemencé par 100 µL d'une suspension bactérienne de 10⁸ UFC/ml. La microplaque est ensuite incubée à 37°C pendant 24h.

Un témoin positif et un témoin négatif sont utilisés. Le témoin positif est la souche de référence de *B. cereus* ATCC 700603 et le témoin négatif est un puit non ensemencé par la suspension bactérienne.

Après incubation, les puits sont vidés de leur contenu et lavés deux fois avec 100 µL d'eau distillée afin d'éliminer les bactéries planctoniques.

Les cellules bactériennes ayant formé des biofilms au fond des puits sont colorées avec du violet de gentiane pendant 10 min, puis un rinçage est effectué. Les microplaques sont renversées et couvertes de papier absorbant et laissées sécher à température ambiante pendant 15 minutes. Enfin, les puits sont remplis de nouveau avec 150 µL d'éthanol pour dissoudre les biofilms.

La microplaque est ensuite posée sur un agitateur pendant 15 min pour faire dissoudre les biofilms. Une lecture des absorbances de chaque puits est effectuée avec le lecteur de microplaques ELISA à une longueur d'onde de 570 nm.

Matériel et méthodes

Nb. Réaliser 3 essais pour chaque échantillon ainsi que pour les témoins positifs et négatifs. Les souches sont classées en 3 niveaux de formation de biofilm selon les valeurs de DO obtenues :

Souches non formatrices : $DO < DO_t^-$ (témoin négatif)

Souches peu formatrices : $DO_t^- \times 2 < DO < DO_t^- \times 4$

Souches très formatrices de biofilms : $DO > DO_t^- \times 4$ (Christensen *et al.*, 1985).

DO : Densité Optique, t : témoin négatif.

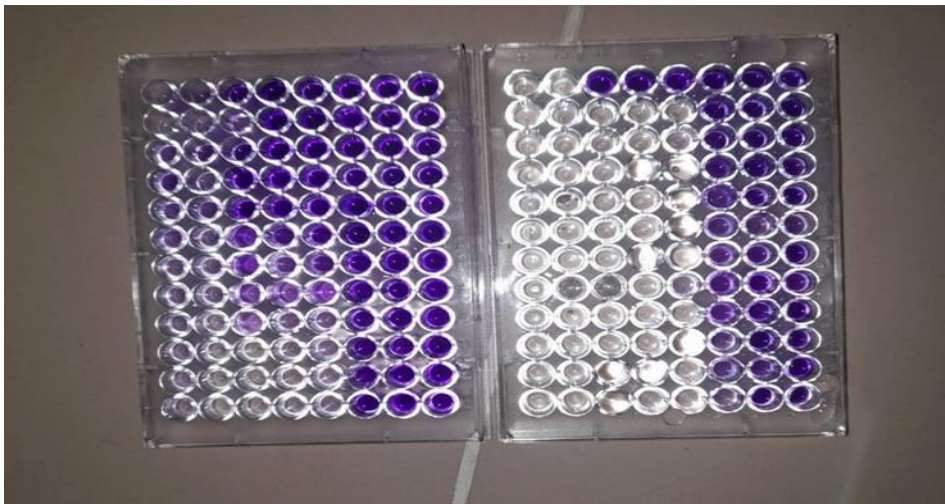


Figure 7 : Microplaques ELISA après ensemencement et coloration (photo originale)

II.7. Préparation des échantillons à base de NPs de NiO

Les échantillons à base de NPs de NiO ont été préparés au laboratoire de recherche de la faculté des hydrocarbures et de la chimie à Boumerdes selon les méthodes suivantes :

- **Echantillon 01 : NPs de NiO par la méthode Sol-Gel**

Une solution saturée est préparée par agitation de 2,54 g d'acétate de nickel $C_4H_6NiO_4$ tétra-hydraté $[Ni(OCOCH_3)_2 \cdot 4H_2O]$ dans 100mL de H_2O (0,1M) à la chaleur. Une quantité de 1mL de solution aqueuse d'acide citrique ($C_6H_8O_7$) est ajoutée à la solution ainsi que 15mL d'éthylène glycol ($C_2H_6O_2$) en petites quantités appropriées pour faciliter son intégration dans la solution. Le pH est ajusté à 8 avec du NaOH. La solution est agitée sous une température de $80^\circ C$ jusqu'à l'obtention d'un gel verdâtre (Gang *et al.*, 2010).

- **Echantillon 02 : NPs de NiO par la méthode Sol « simple »**

La solution est préparée par mélange de 1.34 g d'acétate de nickel C_4H_6Ni avec 40mL d'eau et 10mL d'éthanol (C_2H_5OH) . Le pH réajusté à 8 en ajoutant 8mL de NaOH. La solution est ensuite placée sur un agitateur à $80^\circ c$ puis dans une centrifugeuse. Le culot récupéré subi 2

Matériel et méthodes

lavages, le premier avec 40mL d'eau distillée le deuxième avec un mélange de 40mL d'eau distillée et 10mL d'éthanol (C₂H₅OH) (Gang *et al.*, 2010).

- **Echantillon 03 : NPs de NiO + polyphénols la roquette par la méthode Sol-Gel**

La solution est préparée par mélange de 3,73 g d'acétate de Nickel (CH₃CO₂)₂ et 50ml de polyphénols de la roquette puis agitation et chauffage pendant 15min. Un catalyseur est ajouté à la solution (2 ml acide citrique) (C₆H₈O₇) puis 20 mL d'éthyle glycol C₂H₆O₂ pour faciliter l'agitation. Le pH est réajusté à 8 par ajout de 8ml d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH), la solution obtenue est de couleur bleu azur. La solution est agitée sous une température de 80 °C jusqu'à obtention d'un gel verdâtre (Gang *et al.*, 2010).

- **Echantillon 04 : NPs de NiO + polyphénols de la roquette par la méthode Sol « simple »**

La solution est préparée par mélange de 3.73g d'acétate de nickel (CH₃CO₂)₂ avec 80ml d'eau et 20mL d'éthanol C₂H₅OH. Le pH réajusté à 8 en ajoutant 12mL de NaOH. La solution est ensuite placée sur un agitateur à 80°C puis dans une centrifugeuse. Le culot récupéré subit 2 lavages, le premier avec 40mL d'eau distillée le deuxième avec un mélange de 40mL d'eau distillée et 10mL d'éthanol C₂H₅OH (Gang *et al.*, 2010).

II.8. Evaluation de l'activité antimicrobienne et des CMI des échantillons à base de NPs de NiO

L'évaluation de l'activité antimicrobienne et des CMI des 4 échantillons a été réalisée en effectuant des antibiogrammes par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

II.8.1. Préparation des disques

Des disques vierges de 6 mm sont coupés à partir du papier Wattman puis autoclavés. Ils sont ensuite imbibés de 20 microlitres des 4 échantillons.

II.8.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Des suspensions bactériennes de 10⁸ UCF/mL sont préparées à partir des souches de *B. cereus*. La gélose de MH estensemencée en tapis bactérien par chacune des suspensions préparées. Après dépôt des disques remplis des échantillons, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h. Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec précision (CLSI, 2006).

Matériel et méthodes

II.8.3. Evaluation des CMI

Afin de mesurer les CMI de chacun des 4 échantillons, 3 dilutions au 1/2 ont été préparées ; Des disques d'antibiotiques vierges sont imbibés de 20 microlitres de chacune des dilutions préparées et sont ensuite posés sur des boîtes de Petri dans lesquelles le milieu MH est précédemment coulé etensemencé en tapis par des suspension bactérienne des souches de *B. cereus*.

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h. Après incubation les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec précision et les CMI sont déterminées (CLSI, 2006).

Nb : 3 essais sont effectués pour chaque dilution.

II.9. Préparation des couches minces

Les lames en verres subissent un lavage avec de l'eau distillée, ensuite avec de l'éthanol puis un dernier rinçage à l'eau distillée. Les lames sont séchées puis pulvérisées avec la solution à base de NPs de NiO préparée par la méthode Sol-Gel (échantillon E1) puis chauffée à 80°C pendant 2h.

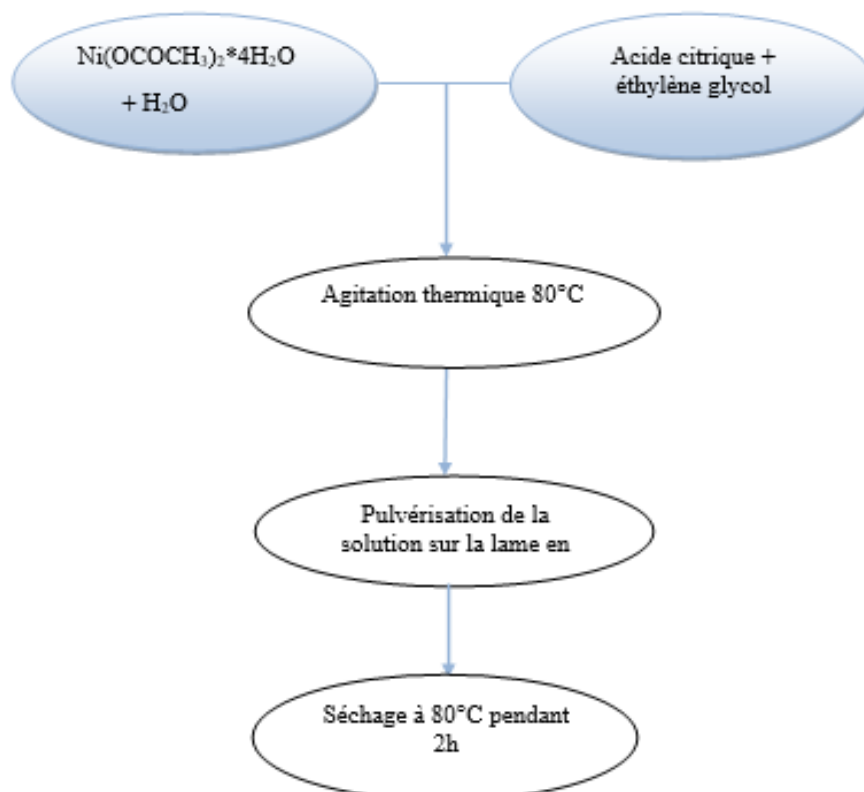


Figure 8 : Procédé de préparation des couches minces d'oxyde de nickel

Matériel et méthodes



Figure 9 : Couches minces sur lame en verre en cours de préparation (photo originale)

II.10. Evaluation de l'adhésion bactérienne sur des couches minces d'oxyde de nickel

Des couches minces à base NPs de NiO sont préparées dans le but d'évaluer l'adhésion des souches de *B. cereus* après différents temps de contact : 1h, 3h, 5h et 24h.

Un témoin positif et un témoin négatif sont utilisés. Le témoin positif est une lame en verreensemencée avec une suspension bactérienne très chargée, et le témoin négatif est une lame en verre nonensemencée.

II.10.1. Ensemencement

Afin d'évaluer la capacité des souches isolées d'adhérer sur les couches minces, ces dernières sontensemencées avec 1 ml de suspension bactérienne standardisée de *B. cereus* puis incubées à 37°C pendant des temps différents : 1h, 3h, 5h et 24h. Après incubation, les lames sont lavées à l'acétone pour éliminer les cellules non adhérentes, puis mises en contact avec le milieu Mossel pendant 5 à 10 min. Les boîtes contenant ce milieu sont à leur tour incubées à 37°C pendant 24h.

Après incubation, une étude macroscopique est effectuée afin d'évaluer la croissance bactérienne qui traduit l'adhésion des bactéries sur les couches minces suivie d'un dénombrement des colonies obtenues.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Isolement et purification

L'isolement sur GN a donné différentes formes de colonies bactériennes. La purification des colonies caractéristique sa permis d'obtenir un total de 38 souches bactériennes appartenant au genre *Bacillus* ; dont 5 isolées à partir du lait de chèvre et 33 proviennent du lait de vache destiné à l'industrie laitière. L'étude macroscopique et microscopique a montré les caractéristiques suivantes :

2. Caractérisation morphologique des colonies isolées

2.1. Examen macroscopique

Les colonies observées dans les boîtes présentent une grande similitude dans leur aspect macroscopique, à savoir la taille, la couleur, l'élévation et le contour. Elles sont blanchâtres, rondes et à bord irréguliers dans la plupart des cas.

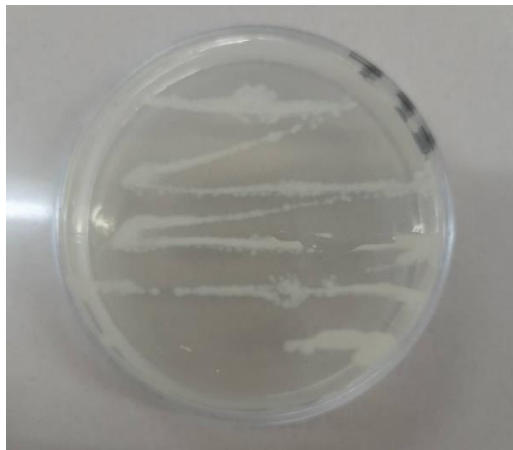


Figure 10 : Aspect macroscopique des colonies de *Bacillus sp.*

2.2. Examen microscopique

L'observation au microscope optique des frottis de l'ensemble des souches purifiées montre une variabilité de types de bactéries selon leur morphologie. La majorité sont des bacilles Gram positif dotés de spores, suspectés d'être *Bacillus sp.* Quelques Gram négatif sont aussi observés mais elles n'ont pas été documentées étant donné que l'objectif du travail se porte sur *Bacillus sp.*

L'intégralité des résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Résultats et discussion

Tableau 2 : aspect microscopique des différentes bactéries isolées à partir des 10 échantillons de lait

Souche	Gram (+/-)	Forme
S1	+	Bacilles
S2	+	Bacilles
S3	+	Bacilles
S4	+	Bacilles
S5	+	Bacilles + spores
S6	+	Début de sporulation
S7	+	Début de sporulation
S8	+	Spores
S9	+	Bacilles
S10	+	Bacilles + spores
S11	+	Début de sporulation
S12	+	Spores
S13	+	Spores
S14	+	Bacilles
S15	+	Bacilles
S16	+	Bacilles
S17	+	Bacilles
S18	+	Début de sporulation
S19	+	Bacilles
S20	+	Début de sporulation

Résultats et discussion

S21	+	Bacilles
S22	+	Bacilles + spores
S23	+	Bacilles
S24	+	Début de sporulation
S25	+	Bacilles
S26	+	Bacilles
S27	+	Bacilles + spores
S28	+	Bacilles + spores
S29	+	Bacilles + spore
S30	+	Bacilles
S31	+	Bacilles
S32	+	Bacilles
S33	+	Bacilles + spores
S34	+	Bacilles + spores
S35	+	Spores
S36	+	Spores
S37	+	Bacilles
S38	+	Bacilles

Résultats et discussion

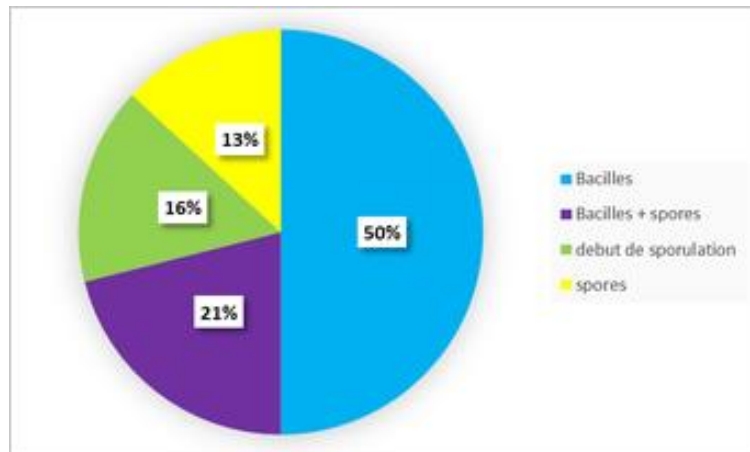


Figure 11 : Différentes formes des bactéries isolées

La majorité des souches obtenues sont des bacilles Gram positif, des spores ont également été observées, c'est la forme de résistance caractéristique des bactéries au traitement thermique subit.

3. Identification de *Bacillus cereus*

L'identification se fait à partir des colonies caractéristiques du genre *Bacillus* sp. Notons que l'espèce *B. cereus* est apparue sous plusieurs profils différents, ce qui reflète bien la diversité au sein d'une même espèce en ce qui concerne les bactéries sporulées. Ceci est confirmé par Guinebretière *et al.* ainsi que Van der Auwera *et al.* qui indiquent que *B. cereus* fait partie d'un ensemble d'espèces apparentées regroupées sous le terme *Bacillus cereus sensu lato* présentant une grande diversité phénotypique (Guinebretière *et al.*, 2008 ; Van der Auwera *et al.*, 2007).

3.1 Isolement sur milieu Mossel

Les colonies obtenues après ensemencement sur la gélose de Mossel sont grandes, plates et crémeuses à centre opaque. De plus, le virage de la couleur du milieu au jaune ou au rose est un caractère spécifique de *B. cereus* interprété comme suit :

- Les colonies roses sont mannitol⁻.
- Les colonies jaunes sont mannitol⁺.
- Les colonies entourées d'un halo de précipitation sont lécithinase⁺.

Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Résultats et discussion

Tableau 3 : Croissance des souches isolées à partir des échantillons de lait sur milieu Mossel

Souches	Croissance sur Mossel	Mannitol	Lécithinase
S1	-		
S2	-		
S3	+	+	-
S4	+	+	-
S5	+	+	-
S6	+	-	+
S7	+	+	-
S8	+	+	-
S9	+	+	-
S10	+	+	-
S11	+	+	-
S12	+	+	-
S13	+	+	-
S14	+	-	+
S15	+	-	+
S16	+	+	-
S17	+	-	+
S18	+	+	-
S19	+	+	-
S20	+	+	-

Résultats et discussion

S21	-		
S22	-		
S23	-		
S24	+	+	-
S25	-		
S26	-		
S27	-		
S28	-	-	
S29	+	-	+
S30	+	+	-
S31	+	+	-
S32	+	+	-
S33	+	+	-
S34	+	+	-
S35	+	+	-
S36	+	+	-
S37	+	-	+
S38	+	-	+

Parmi les 38 souchesensemencées, 29 ont poussé, mais seulement 7 souches sont mannitol confirmant ainsi l'identification de *B. cereus*. Les 22 souches restantes qui dégradent le mannitol appartiennent au groupe de *B. cereus*.

Résultats et discussion

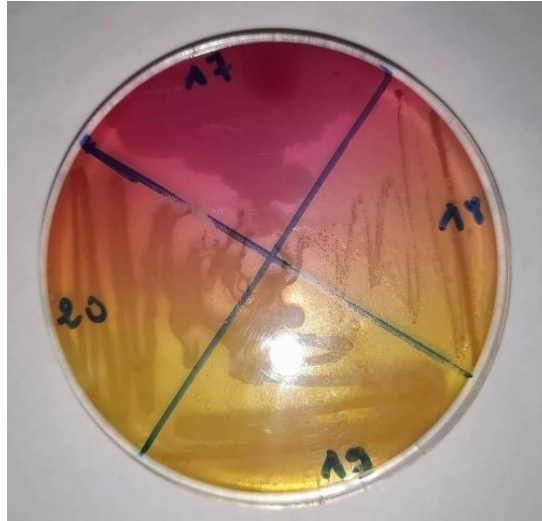


Figure 12 : Aspect macroscopique de *B. cereus* sur milieu Mossel

4. Evaluation de la formation des biofilms

L'évaluation de la formation des biofilms sur microplaque à 96 puits a été effectuée pour les 37 souches isolées à partir des 10 échantillons de lait.

Une analyse de la microplaque à l'œil nu est d'abord effectuée. L'aperçois d'un film blanchâtre au fond de certains puits indique une formation de biofilm.

Cette visualisation a montré qu'il y a des souches qui forment des biofilms importants, des souches qui forment des biofilms moyens ou faibles, d'autres ne forment aucun biofilm.

Après coloration de la microplaque et dissolution du biofilm dans de l'éthanol, une observation dans un lecteur à microplaques est effectuée. Des DO représentant la taille des biofilms sont obtenues, leurs valeurs sont représentées dans la figure 11.

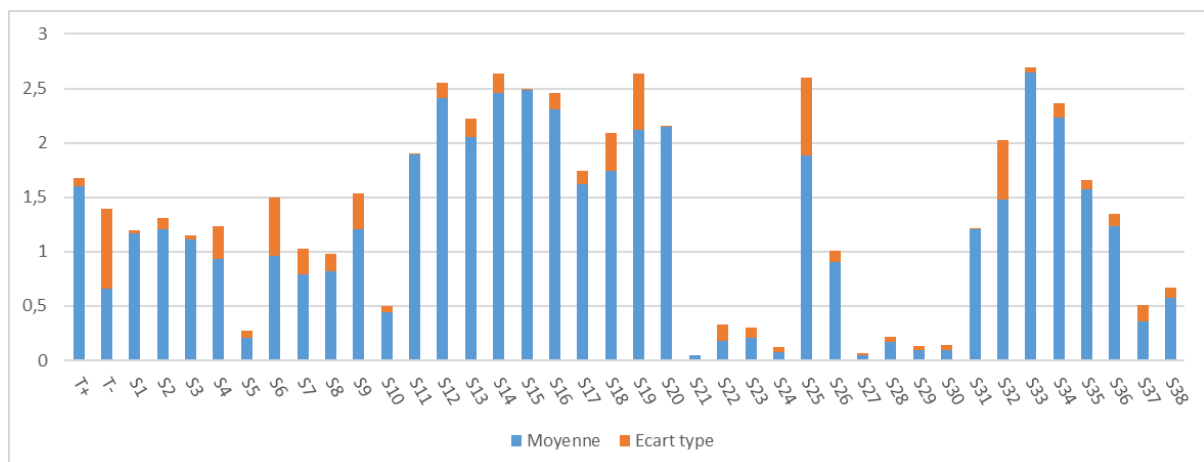


Figure 13 : DO de l'évaluation de la formation de biofilms

Résultats et discussion

On constate que la majorité des souches isolées des 10 échantillons de lait ont un potentiel de formation de biofilms comparées au témoin négatif ; 11 (28.94%) ne sont pas formatrices de biofilms, 12 (31,57%) sont peu formatrices et 15 (39.47%) sont fortement formatrices de biofilms. La souche 33 présente le meilleur potentiel de formation de biofilms.

La différence des degrés de formation des biofilms entre les souches isolées à partir du lait est liée aux conditions dans lesquelles les bactéries se sont développées. Elle peut être expliquée par les conditions d'élevages (hygiène), alimentation du bétail (prise d'antibiotiques), milieu de vie de la bactérie et sa capacité à s'adapter dans son environnement.

5. Echantillons à base de NPs de NiO

Les quatre échantillons différents dans leurs textures et couleurs selon leurs méthode de préparation et leur association à des extraits végétaux.



E1 : NPs de NiO par la méthode Sol-Gel gélation ; **E2** : NPs de NiO par la méthode Sol-Gel simple ; **E3** : NPs de NiO + extrait de la roquette par la méthode Sol-Gel gélation ; **E4** : NPs de NiO+ extrait de la roquette par la méthode Sol-Gel simple.

Figure 14 : Echantillons à base de NPs de NiO

Résultats et discussion

6. Evaluation de l'activité antimicrobienne et des CMI des échantillons à base d'oxyde de nickel

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les souches sus-citées varient de 0 à 44±1 mm selon la souche et les types d'échantillon.

Tableau 4 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) ± l'écart type des échantillons à base de NPs de NiO

Souches	E1	E2	E3	E4
S6	13 ±0.5	0	0	0
S14	15±3.6	0	40±0.6	8±2.1
S15	21±1.1	0	0	0
S29	38±2.5	19±1	18±1.5	17±2.5
S37	14±0.5	0	6±1.4	5±0.7

E1 : NPs de NiO par la méthode Sol-Gel gélation ; **E2** : NPs de NiO par la méthode Sol-Gel simple ; **E3** : NPs de NiO + extrait de la roquette par la méthode Sol-Gel gélation ; **E4** : NPs de NiO+ extrait de la roquette par la méthode Sol-Gel simple.

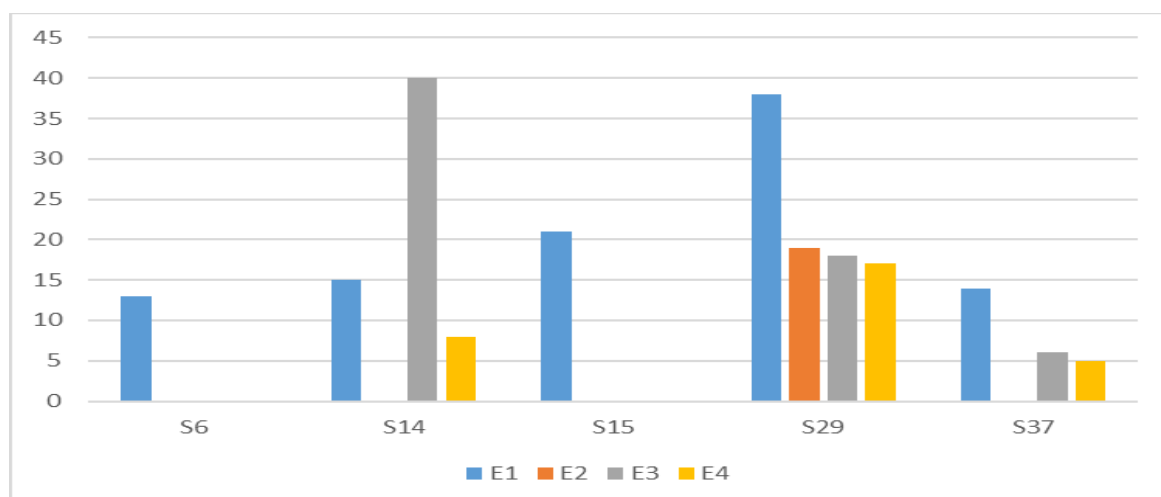


Figure 15 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de chaque échantillon à base de NPs de NiO.

D'après les résultats obtenus, les NPs de NiO possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis des souches de *B. cereus*. En effet, l'étude menée par Imran Din et Rani en 2016 confirme leur efficacité sur cette espèce ainsi que sur les espèces suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* (Imran Din et Rani, 2016).

Résultats et discussion

Saleem et son équipe ont décrit le mécanisme central impliqué dans l'activité antibactérienne des NPs de NiO comme étant des interactions électrostatiques entre les composants de la membrane cellulaire bactérienne chargés négativement et les NPs chargées positivement. Les NPs pénètrent dans la paroi cellulaire et une fois à l'intérieur de la cellule, elles peuvent endommager les protéines cellulaires, l'ADN, et perturber la chaîne de transport d'électrons, entraînant ainsi la fuite du contenu cellulaire, et éventuellement la mort des organismes (Saleem *et al.*, 2017).

Après analyse des données, il est constaté que l'échantillon E1 qui contient les nanoparticules d'oxyde de nickel préparées par la méthode Sol-Gel « gélification » est dotée de la plus forte activité antibactérienne vis-à-vis des souches de *B. cereus*.

Le pouvoir antibactérien de cet échantillon est supérieur à celui de l'échantillon E3 qui contient également les NPs de NiO associées à l'extrait de la roquette.

Cette différence de l'effet antibactérien est expliquée par certains chercheurs. Les travaux menés par Pessel en (2014) ont montré que les flavonoïdes de la roquette ont la capacité de piéger et inactiver les ions métalliques. Le NiO a été piégé, il n'est donc plus libre pour inhiber la croissance des souches bactériennes (Pessel, 2014).

Néanmoins, Amooaghaie et ses associés ont démontré que les NPs associés aux polyphénols sont moins toxiques, et ont une meilleure biocompatibilité (Amooaghaie *et al.*, 2015). Nguyen et son équipe ont également constaté qu'elles sont plus stables que les NPs non associées à des extraits polyphénoliques (Nguyen *et al.*, 2022).

Une différence dans l'effet antimicrobien est aussi constatée entre E1 et E2 malgré la non association de ce dernier à des extraits végétaux. En effet, E1 a montré une activité antimicrobienne plus prononcée sur les souches de *B. cereus*. Il est nécessaire de rappeler que les procédés de préparation de E1 et de E2 sont différents mais donnent des nanoparticules de NiO. Des scientifiques ont analysé les NPs obtenues après chaque méthode et les analyses ont montré que la méthode sol-gel gélification donne des NPs plus petites rendant l'effet antimicrobien plus important (Wang *et al.*, 2017).

Certaines souches sont résistantes aux échantillons E2, E3 et E4. Pavlic et son équipe (2021) ont rapporté que cela peut être dû au développement de certains mécanismes de tolérance par les souches, tels que la séquestration des métaux toxiques, la réduction des ions intracellulaires

Résultats et discussion

pour la détoxification et l'extrusion des ions toxiques par les systèmes d'efflux. (Pavlic *et al.*, 2021).

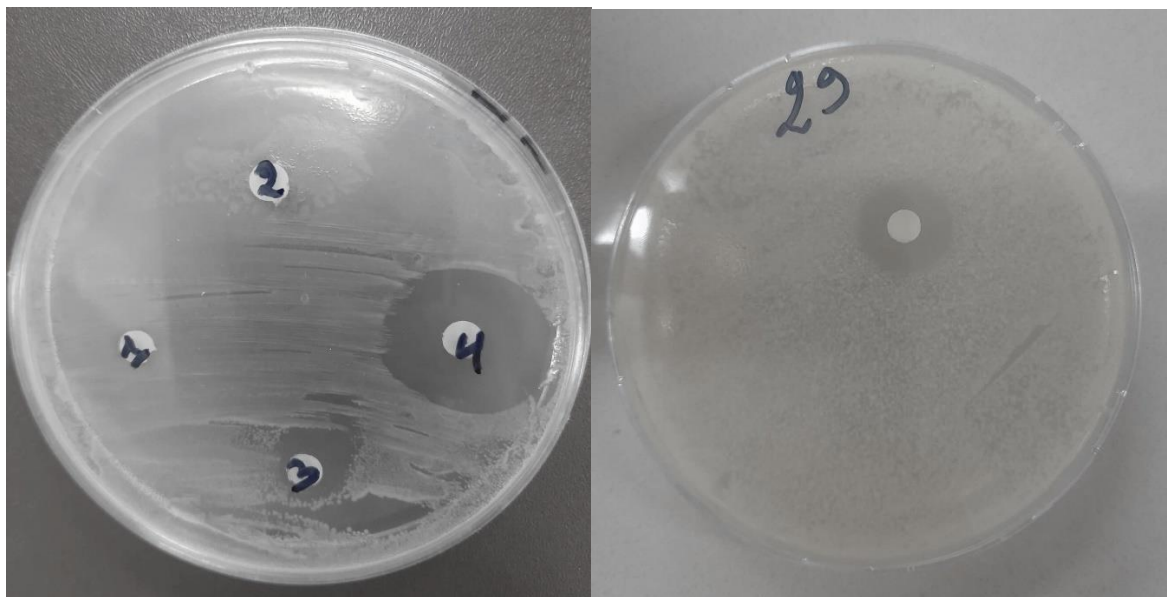


Figure 16 : Effet antibactérien des échantillons E1, E2, E3 et E4

Tableau 5 : CMI des échantillons E1, E2, E3 et E4

Souches	E1				E2				E3				E4			
	ZI (mm)			CMI (mg/ml)	ZI(mm)			CMI mg/ml	ZI(mm)			CMI	ZI (mm)			CMI (mg/ml)
	D1	D2	D3		D1	D2	D3		D1	D2	D3		D1	D2	D3	
S6	1	07	0	5.12												
S14	12	09	0	5.12	0	0	0	23.10	0	0	0	46.62	0	0	0	33.30
S15	09	06	0	5.12												
S29	12	08	0	5.12	1	0.7	0	5.77	0.8	0	0	23.31	09	0	0	16.65
S37	11	06	0	5.12	0	0	0	23.10	0	0	0	46.72	0	0	0	33.30

ZI : zone d'inhibition ; **D1** : dilution 1 ; **D2** : dilution 2 ; **D3** : dilution 3 ; **E1** : NPs de NiO par la méthode Sol-Gel gélation ; **E2** : NPs de NiO par la méthode Sol-Gel simple ; **E3** : NPs de NiO + extrait de la roquette par la méthode Sol-Gel gélation ; **E4** : NPs de NiO+ extrait de la roquette par la méthode Sol-Gel simple.

Après analyse des résultats du tableau, il est constaté qu'aucun des échantillons ne présente une activité antibactérienne au bout de la 3^{ème} dilution. De plus, les dilutions des échantillons E2, E3 et E4 ne présentent pas d'effet antibactérien vis-à-vis des souches 14, et 37.

Résultats et discussion

Il ressort de ces résultats que la plus faible CMI est obtenue avec E1 sur toutes les souches (5.12 mg/mL), tandis que les plus hautes CMI ont été obtenues avec E3 sur les souches S14 et S37 (46.62 mg/mL).

Ramasami et ses collaborateurs ont évalué la CMI des NPs de NiO vis-à-vis d'une souche de référence de *B. cereus* MTCC 2155. La valeur de la CMI obtenue est de 0.75mg/mL, la zone d'inhibition mesurée est de 13mm. La CMI obtenue avec le même extrait contre *Klebsiella aerogenes* est également 0.75mg avec une zone d'inhibition de 14mm (Ramasami *et al.*, 2015).

7. Couches minces

Les couches obtenues sont très fines et recouvrent la totalité de la surface de la lame, Elles ont une couleur verdâtre et une hétérogénéité topographique irrégulière.



Figure 17 : Couche mince à base de NPs de NiO

8. Adhésion bactérienne sur couches minces

Aucune pousse bactérienne n'a été observée sur le milieu Mossel, ce qui traduit l'absence d'adhésion bactérienne sur les couches minces que ça soit après 1h, 3h, 5h ou 24h de contact avec la suspension bactérienne. Une absence de l'adhésion bactérienne implique une absence de la formation des biofilms.

Les couches minces à base des NPs de NiO possèdent donc en plus d'une activité antibactérienne, un pouvoir antiadhésif.

Les propriétés antibiofilm des NPs de NiO ont également été étudiées contre des bactéries Gram négatif *E. coli* et *P. aeruginosa*, et des bactéries Gram positif *S. aureus* (Saleem 2017).

Des études antérieures ont déterminé que les métabolites anti-biofilm des NPs d'argent sont également efficaces contre les uropathogènes formant un biofilm de manière dépendante de la concentration. (Yu *et al.*, 2018 ; Gallón *et al.*, 2019)

Plusieurs mécanismes qui pourraient expliquer ce résultat ont été proposés. Talebian et son équipe suggèrent que l'absence d'adhésion peut être reliée au degré d'hydrophobicité et la

Résultats et discussion

rugosité de la surface de la couche mince. Ils ont a révélé que l'augmentation de l'hydrophobicité des échantillons de NiO et la diminution de la rugosité favorisent le nombre de cellules non adhérentes (Talebian *et al.*, 2013).

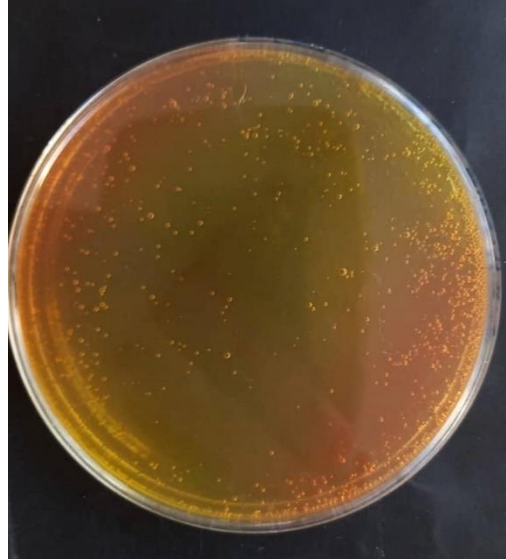


Figure 18 : Absence de la croissance de *B. cereus* sur milieu Mossel

Conclusion

Conclusion

La formation de biofilms dans les industries laitières est reconnue comme étant la source de lourds problèmes d'hygiène et de pertes économiques. Ce phénomène engendre une diminution des rendements ainsi qu'une augmentation de toxi-infections alimentaires.

Dans le cadre de cette étude, l'isolement de *B. cereus* est effectué à partir du lait de vache et de chèvre crus issus de différentes régions de Tizi Ouzou. Le potentiel de formation de biofilms de ces souches est testé au sein d'une microplaque à 96 puits. L'activité antibactérienne de différents échantillons à base de NPs de NiO vis -à-vis des souches de *B. cereus* est évaluée. De plus, des couches minces à base de ces NPs sont élaborées afin de tester leur effet antiadhésif sur l'une des souches caractéristiques de *B. cereus*.

Les résultats obtenus montrent que la majorité des souches de *B. cereus* s'avèrent formatrices de biofilm. De plus, un effet antibactérien des NPs de NiO est observé sur l'ensemble des souches testées. Quant aux couches minces, elles ont montré un effet antiadhésif très intéressant.

Ces résultats sont très encourageants, néanmoins, il est obligatoire de pousser l'étude plus loin en :

- Recherchant de molécules capables de réduire la toxicité des NPs de NiO tout en préservant leur effet antibactérien.
- Analysant la taille des NPs préparées.
- Analysant l'hydrophobicité et la rugosité des surfaces des couches minces préparées.
- Prolongeant le temps de contact suspension bactérienne – couche mince
- Faisant des observations des couches minces après un temps de contact au microscope électronique à balayage, ceci permet d'observer d'éventuelles cellules adhérentes.
- Intégrant des couches minces à base NPs de NiO comme revêtement des surfaces des équipements de l'industrie laitière.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abe A.M.K., Assanvo J. B., Sanogo M., Koffi K.M. (2018).** Caractérisation phénotypique de 52 souches des *Bacillus* isolées à partir de racines fraîches de manioc cultivées en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*.12(5) : 2284-2293.
- **Abee T., Kovács Á. T., Kuipers O. P., Van der Veen S. (2011).** Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 22(2) : 172-179.
- **Abhyankar W., Hossain A.H., Djajasaputra A., Permpoonpattana P., Ter Beek A., Dekker H.L., Cutting S.M., Brul S., De Koning L.J., De Koster C.G. (2013).** In pursuit of protein targets: Proteomic characterization of bacterial spore outer layers. *J Proteome Res*. 12: 4507-4521.
- **Alruwaih N.A., Yaylayan V.A. (2016).** Comparative evaluation of bioactive compounds in lyophilized and tray-dried rocket (*Eruca sativa*). *J. Food Process Preserv*. 41(5).
- **Andrieux-Ledier A. (2012).** Elaboration de nanoparticules d'argent par réduction de sels métallo-organiques : contrôle de taille, stabilité, organisation et propriétés physiques. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI ; 2012.
- **Anses. (2021).** Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Bacillus cereus*.
- **Aoudjit F.** Synthèse et caractérisation des catalyseurs xérogels et aérogels à base de molybdène et de tungstènes leurs applications dans l'isomérisation des paraffines C5C6. Thèse de magister ; Boumerdes ; 2008.
- **Austin J.W., Bergeron G. (1995).** Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *Journal of Dairy Research*. 62(3): 509-519.
- **Baillif S., Hartmann D., Freney J., Kodjikian L. (2010).** Intraocular lens and bacterial adhesion: influence of the environmental factors, the characteristics of the bacteria, and the target material surface. *Journal Francais d'Ophtalmologie*. 33(3): 210-221.
- **Bajilan S.I., Al-naqeeb A.A. (2011).** Effect of the aqueous extract of rocket (*Eruca sativa*) leaves on the histological structure of some organs in male mice. 17 (90): 13-20.
- **Barthomeuf M., Castel X., Le Gendre L., Loui J., Denis, M., Pissavin C. (2019).** Effect of titanium dioxide film thickness on photocatalytic and bactericidal activities against *Listeria monocytogenes*. *Photochemistry and Photobiology*. 95(4): 1035-1044

Références bibliographiques

- **Blažević I., Mastelić J. (2008).** Free and bound volatiles of rocket (*Eruca sativa Mill.*). Flavour Fragr. J. 8(23): 278–285.
- **Bokov D., Turki Jalil A., Chupradit S., Suksatan W., Javed Ansari M., Shewael I. H., Kianfar E. (2021).** Nanomaterial by sol-gel method: synthesis and application. Advances in Materials Science and Engineering, 2021.
- **Bouali W.** Contribution à l'élaboration d'un souchier bactérien et caractérisation de la flore *Bacillus cereus* dans le Sud -Ouest Algérien. Thèse de doctorat. Université Abou Bakr Belkaid – Tlemcen ; 2017.
- **Brinker C.J., Sherrer G.W. (1989).** Sol-Gel Science, the Physic and Chemistry Sol-Gel Processing, Academic Press, San Diego (1989).
- **Campoccia D., Montanar L., Arciola C. R. (2013).** A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. Biomaterials. 34(34): 8533-8554.
- **Chen M., Yu Q., Sun H. (2013).** Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. International Journal of Molecular Sciences. 14: 18488–18501.
- **Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.A., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M. (1985).** Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of Clinical Microbiology. 22: 996–1006.
- **Cunningham A. B., Lennox J. E., Ross R. J. (2008).** Introduction to Biofilms: What are their characteristics.
- **Didouh N.** Caractérisation de spores de *Bacillus cereus* isolées d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilm et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection. Thèse de doctorat. Université Abou Bakr Belkaid – Tlemcen ; 2015.
- **Gallón S. M. N., Alpaslan E., Wang M., Larese-Casanova P., Londoño M. E., Atehortúa, L., Webster T. J. (2019).** Characterization and study of the antibacterial mechanisms of silver nanoparticles prepared with microalgal exopolysaccharides. Materials Science and Engineering. 19(99) : 685-695.
- **Gang Z.Wu, Munoz M., Montero O. (2010).**The synthesis of nickel nanoparticles by hydrazine reduction. Advanced Powder Technology. 21: 165-168.

Références bibliographiques

- **Goeres D.M., Hamilton M.A., Beck N.A., Buckingham-Meyer K., Hilyard J.D., Loetterle L.R., Stewart P.S. (2009).** A method for growing a biofilm under low shear at the air–liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nature Protocols*. 4(5): 783-788.
- **Gopal N., Hill C., Ross P. R., Beresford T.P., Fenelon M. A., Cotter P. D. (2015).** The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Frontiers In Microbiology*. 6(15): 1418.
- **Guillot J. (2002).** Couches minces d'oxynitride de titane: la réactivité comme moyen original de caractérisation physico-chimique. Thèse de doctorat ; Université de Bourgogne ; 2002.
- **Guinebretière M. H., Thompson F. L., Sorokin, A., Normand P., Dawyndt P., Ehling-Schulz M., De Vos P. (2008).** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology*. 10(4) : 851-865.
- **Guiraud J. P. (2003).** Microbiologie Alimentaire. Edition Dunod. Paris, 136-139.
- **Gupta D., Singh A., Khan A.U. (2017).** Nanoparticles as efflux pump and biofilm inhibitor to rejuvenate bactericidal effect of conventional antibiotics. *Nanoscale Research Letters*. 12 : 1–6.
- **Hamiroune M., Berber, A., Boubkeur S. (2016).** Évaluation de la qualité bactériologique du lait cru bovin à divers stades de la chaîne de production laitière dans des fermes en Algérie. *Sci. Tech. OIE*. 35 : 925-946.
- **Houry A., Briandet R., Aymerlch S., Gohar M. (2010).** Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*. 156(4): 1009–1018.
- **Imran Din M., Rani A. (2016).** Recent advances in the synthesis and stabilization of nickel and nickel oxide nanoparticles: a green adeptness. *International journal of analytical chemistry*, 2016.
- **Jafri S.M.H. (1973).** Brassicaceae, In *Flora of Pakistan*. Nasir E., Ali S.I., Eds. Karachi, Pakistan: University of Karachi. 55: 127–148.
- **Kasprza M. M., Erxleben A., Ochocki J. (2015).** Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RscAdvances*. 5(57) : 45853-45877.
- **Katsikogianni M., Missiris Y. F. (2004).** Bacterial adhesion and proliferation on biomaterials. Techniques to evaluate the adhesion process. The influence of surface chemistry/topography. *European cells and Materials*. 7:38.

Références bibliographiques

- **Khoobchandani M., Ojeswi B.K., Ganesh N., Srivastava M.M., Gabbanini S., Matera R., Iori R., Valgimigli L. (2010).** Antimicrobial properties and analytical profile of traditional *Eruca sativa* seed oil: Comparison with various aerial and root plant extracts, *Food Chemistry*. 120(1): 217-224.
- **Kotiranta A., Haapasalo M., KariK., Kerosuo, E., Olsen I., Sorsa T., Meurman, J.H.,Lounatmaa K. (1998).** Surface structure, hydrophobicity, phagocytosis, and adherence to matrix proteins of *Bacillus cereus* cells with and without the crystalline surface protein layer. *Infect Immun*. 66: 4895-4902.
- **Kumar C.G., Anand S.K. (1998).** Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 42(1-2): 9-27.
- **Lahmadi S., Zeguerrou R., Guesmia H. (2013).** Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides Omar El- Barnaoui : La flore spontanée de la plaine d'El-Outaya (Ziban). 33.
- **Lequette Y., Garénaux E., Tauvero G., Dumez S., Perchat S., Slomianny C., Faille C. (2011).** Role played by exosporium glycoproteins in the surface properties of *Bacillus cereus* spores and in their adhesion to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(14): 4905-4911.
- **Lindsay D., Von Holy A. (2006).** What food safety professionals should know about bacterial biofilms. *British Food Journal*.
- **Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, p : 4-5.
- **Mahamuni-Badige P.P., Patil P.M., Badiger M.V., Patel P.R., Thorat-Gadgil B.S., Pandit A., Bohara R.A. (2019).** Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 108, 110319.
- **Majed R., Faille C., Kallassy M. Gohar M. (2016).** *Bacillus cereus* biofilms—same, only different. *Frontiers in Microbiology*. 7:1054.
- **Malek F. (2019).** Bactéries sporulées et biofilms: un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombinaison pasteurisé. *Canadian journal of microbiology*. 65(6): 405-420.

Références bibliographiques

- **Malek F.** Le biofilm en industrie laitière : caractérisation, facteurs de développement et élimination. Cas du biofilm de *Bacillus cereus* dans quelques laiteries de la région de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Abou Bakr Belkaid – Tlemcen ; 2013.
- **Malik S.N. (2015).** Antibacterial activity of olive (*Olea europaea*) leaves and arugula (*Eruca sativa*) seeds extract. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 7(2): 307-310.
- **Marchand S., Block J.D., Jonghe V.D., Coorevits A., Heyndrickx M., Herman L. (2012).** Biofilm formation in milk production and processing environments; Influence on milk quality and safety. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 11: 133–147.
- **Maruthupandy M., Rajivgandhi GN., Quero F., Li W-Jun. (2020).** Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of nickel oxide nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Environmental Chemical Engineering.
- **Meddas S. A., Oulebsir-Mohandkaci H., Hadjouti R., Reghmit N., Houas Y., Amirat D., Naitbouda L., Doumandji-Mitiche B. (2020).** Caractérisation des *Bacillus spp.* isolées du sol d'olivier et étude de leurs potentialités de biocontrol contre la mouche de l'olive *Dacus oleae* (Gmel) au nord de l'Algérie. Revue Agrobiologia (2020) 10(1): 1872-82.
- **Michael H.N., Shafik R.E., Rasmy G.E. (2011).** Studies on the chemical constituents of fresh leaf of *Eruca sativa* extract and its biological activity as anticancer agent in vitro. Journal of Medicinal Plants Research. 5(7): 1184-1191.
- Ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire de France, 2011.
- **Miyazawa M., Maehara T., Kurose K. (2002).** Composition of the essential oil from the leaves of *Eruca sativa*. Flavour Fragr J. 17(3): 187-190.
- **Morales M.R., Janick J., Whipkey A. (2002).** Arugula: A Promising Specialty Leaf Vegetable. Reprinted from: Trends in new crops and new uses.
- **Moullec M. (2002).** Les sources de contamination microbiologique du lait de bovins de la production à la consommation dans les pays du sud. Thèse de doctorat. Université Montpellier 2 ; 2002.
- **Murray KJ., Webb S. M., Bargar J. R., Tebo B. M. (2007).** Indirect oxidation of Co (II) in the presence of the marine Mn (II)-oxidizing bacterium *Bacillus sp.* strain SG-1. Applied and Environmental Microbiology. 73(21): 6905-6909.

Références bibliographiques

- **Niu C., Gilbert E.S. (2004).** Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components that Affect Biofilm Formation and Structure. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:6951–6956.
- **Parashar M., Shukla V. K., Singh R. (2020).** Metal oxides nanoparticles via sol–gel method: a review on synthesis, characterization and applications. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 31(5): 3729-3749.
- **Pavlic A., Begic G., Tota M., Abram M., Spalj S., Gobin I. (2021).** Bacterial Exposure to Nickel: Influence on Adhesion and Biofilm Formation on Orthodontic Archwires and Sensitivity to Antimicrobial Agents. *Materials*. 14 (16): 4603.
- **Peng J. S., Tsai W.C., Chou C.C. (2001).** Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*. 65: 105–111.
- **Pessel F. (2013).** Synthèse éco-compatible de flavonoïdes fonctionnalisés par le glucose comme antioxydants potentiels. Thèse de doctorat ; Université Paris Sud - Paris XI, 2013.
- **Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. (2017).** Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- **Pratt L.A., Kolter R. (1998).** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30 : 285–293.
- **Ramasami A.K., Redd M.V., Balakrishna G.R.(2015).** Combustion synthesis and characterization of NiO nanoparticles. *Materials Science in Semiconductor Processing*. 40: 194-202.
- **Rani I., Akhund S., Suhail M., Abro H. (2010).** Antimicrobial potential of seed extract of *Eruca sativa*. *Pak J Bot*. 42(4): 2949-2953.
- **Saleem S., Ahmed B., Khan M.S., Al-Shaeri M., Musarrat J. (2017).** Inhibition of growth and biofilm formation of clinical bacterial isolates by NiO nanoparticles synthesized from *Eucalyptus globulus* plants. *Microbial Pathogenesis*. (17,111): 375-387.
- **Sharma M., Anand S. K. (2002).** Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*. 19(6): 627-636.
- **StenforsArnesen L.P., Fagerlund A., Granum P.E. (2008).** From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(4): 579-606.

Références bibliographiques

- **Stoeckel M., Westermann A.C., Atamer Z., Hinrichs J. (2013).** Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores in infant formula under shear conditions. *Dairy Science & Technology*. 93(2) : 163-175.
- **Stoodley P, Hall-Stoodley L, Lappin-Scott HM. (2001).** Detachment, surface migration, and other dynamic behavior in bacterial biofilms revealed by digital time-lapse imaging. *Methods in Enzymology*. 337:306- 319.
- **Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*. 56(1): 187-209.
- **Talebian N., Doudi M., Kheiri M. (2014).** The anti-adherence and bactericidal activity of sol–gel derived nickel oxide nanostructure films: solvent effect. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 69(1): 172-182.
- **Teh K. H., Flint S., Palmer J., Andrewes P., Bremer P., Lindsay D. (2014).** Biofilm– An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products. *International Dairy Journal*. 34(1): 32-40.
- **Thanassi D.G., Bliska J.B., Christie P.J. (2012).** Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*. 36(6): 1046-1082.
- **Tremblay Y. D., Hathroubi S., Jacques M. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 78(2) : 110-116.
- **Tuipulotu D.E., Mathur A., Ngo C., Man S.M. (2021).** *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host–pathogen interactions. *Trends in Microbiology*. 29(5) : 458-471.
- **Vahedi M., Hosseini-Jazani N., Yousef S., Ghahremani M. (2017).** Evaluation of anti-bacterial effects of nickel nanoparticles on biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Iranian Journal of Microbiology*. 9(3): 160.
- **Van der Auwera G. A., Timmerly S., Hoton F., Mahillon J. (2007).** Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*. 113(2): 164-172.
- **Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. (2008).** Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 3(2): 163–175.

Références bibliographiques

- **Yu L., Shang F., Chen X., Ni J., Yu L., Zhang M., Xue T. (2018).** The anti-biofilm effect of silver-nanoparticle-decorated quercetin nanoparticles on a multi-drug resistant *Escherichia coli* strain isolated from a dairy cow with mastitis. Peer J. 18 (6): 5711.

Annexes

Annexes

Annexe I : Matériel non biologique

Tableau 1: Matériel non biologique (Milieux de culture et verrerie)

Milieux de culture	Verrerie
<ul style="list-style-type: none">- Gélose nutritive- Bouillon BHIB- Gélose Mossel- Gélose Mueller-Hinton- Bouillon TSE	<ul style="list-style-type: none">- Tubes à essai- Flacons- Béchers- Entonnoirs- Lames en verre

Tableau 2 : Matériel non biologique (Appareillage et petit matériel)

Appareillage	Petit matériel
<ul style="list-style-type: none">- Microscope optique- Agitateur magnétique- Agitateur-Vortex- Balance de précision- Plaque chauffante- Etuve- Réfrigérateur- Bain-Marie- Autoclave- Lecteur ELISA- Agitateur de plaques.	<ul style="list-style-type: none">- Bec Bunsen- Microplaques ELISA- Micropipettes- Portoirs pour tubes- Pipettes Pasteur- Anse à boucle- Tubes Eppendorf 1,5 mL- Cryotubes- Cuve- Boîtes de Petri- Ecouvillons- Pincés- Embouts Jaunes et bleus- Spatule- Barreaux magnétiques- Disques vierges de papier wattman

Annexes

Annexe II : Milieux de culture

II.1. Milieu TSE

Tryptone	0.5g
Chlorure de sodium.....	4.25g
Eau distillée	500ml

Préparation : Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 15mn.

II.2. Gélose nutritive

Peptone.....	5,00g
Extrait de viande	3,00g
Chlorure de sodium.....	5,00g
Agar	15,00g

Préparation : 28g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 15mn.

II.3. Milieu Mossel

Peptone.....	10,00g
Extrait de viande.....	1,00g
Mannitol.....	10,00g
Rouge de phénol.....	25,00mg
Chlorure de sodium.....	10,00g
Agar.....	14g
Emulsion de jaune d'œuf.....	15 ml
Sulfate de polymyxine B.....	.0.01g

Annexes

Annexe III : Coloration de Gram

III.1. Réalisation d'un frottis

- Dégraisser une lame en verre avec de l'alcool
- Déposer une goutte d'eau sur la lame
- Prélever une culture bactérienne à l'aide d'une anse à boucle et la déposer sur la goutte d'eau puis étaler pour couvrir la moitié de la surface de la lame.
- Sécher et fixer

III.2. Coloration

- Colorer au cristal violet pendant 1 min puis rincer
- Recouvrir avec du Lugol pendant 1 min puis rincer
- Décolorer à l'alcool pendant 30s puis rincer
- Contre-colorer avec de la fushine pendant 1 min puis rincer
- Sécher.

Annexes

Annexe IV : Valeurs des DO obtenues par le lecteur ELISA.

Tableau 3: Valeurs des DO obtenues par l'appareil ELISA

Souches	Essai 1	Essai 2	Moyenne	Ecart type
T+	1,548	1,651	1,5995	0,072832
T-	0,138	0,177	0,1575	0,027577
S1	1,189	1,15	1,1695	0,027577
S2	1,278	1,142	1,21	0,096167
S3	1,14	1,088	1,114	0,03677
S4	1,147	0,721	0,934	0,301227
S5	0,167	0,253	0,21	0,060811
S6	1,338	0,576	0,957	0,538815
S7	0,626	0,961	0,7935	0,236881
S8	0,931	0,707	0,819	0,158392
S9	1,44	0,977	1,2085	0,32739
S10	0,408	0,48	0,444	0,050912
S11	1,894	1,892	1,893	0,001414
S12	2,305	2,508	2,4065	0,143543
S13	2,172	1,933	2,0525	0,168999
S14	2,325	2,585	2,455	0,183848
S15	2,477	2,49	2,4835	0,009192
S16	2,195	2,412	2,3035	0,153442
S17	1,535	1,703	1,619	0,118794
S18	1,497	1,991	1,744	0,349311
S19	2,485	1,755	2,12	0,516188
S20	2,151	2,146	2,1485	0,003536
S21	0,048	0,048	0,048	0
S22	0,284	0,069	0,1765	0,152028
S23	0,273	0,137	0,205	0,096167

Annexes

Tableau 3 : Valeurs des DO obtenues par l'appareil ELISA (suite)

S24	0,106	0,046	0,076	0,042426
S25	1,379	2,387	1,883	0,712764
S26	0,976	0,841	0,9085	0,095459
S27	0,03	0,062	0,046	0,022627
S28	0,136	0,201	0,1685	0,045962
S29	0,123	0,071	0,097	0,03677
S30	0,056	0,127	0,0915	0,050205
S31	1,197	1,205	1,201	0,005657
S32	1,867	1,089	1,478	0,550129
S33	2,611	2,68	2,6455	0,04879
S34	2,138	2,327	2,2325	0,133643
S35	1,516	1,636	1,576	0,084853
S36	1,314	1,156	1,235	0,111723
S37	0,253	0,467	0,36	0,151321
S38	0,51	0,642	0,576	0,093338

Résumé

Les contaminations microbiennes causent de lourds problèmes économiques et sanitaire aux industries agroalimentaires. Parmi les micro-organismes suscitant l'appréhension de ces industries, *Bacillus cereus* qui a une capacité de croissance rapide, de sporulation et de formation de biofilms.

Plusieurs nouvelles approches de lutte contre les biofilms sont en voie de développement, parmi elles, la synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques telles que les nanoparticules d'oxyde de nickel qui présentent des effets antibactériens et antiadhésifs vis-à-vis de plusieurs espèces bactériennes.

L'objectif de ce présent travail est l'isolement des souches de *Bacillus cereus* à partir du lait de vache crus et de chèvre et l'étude de leur capacité de formation des biofilms, ainsi que l'évaluation de l'effet antibactérien et antiadhésif des nanoparticules d'oxyde de nickel vis-à-vis de ces souches.

Un total de 10 échantillons de lait collecté de différentes régions a été employé dans cette étude, dont 7 sont destinés à l'industrie laitière. Des souches de *Bacillus cereus* ont été identifiées, elles ont montré un grand potentiel de formation de biofilms. Pour ce qui est des nanoparticules de NiO, elles ont montré un effet antibactérien variable selon les différentes méthodes de préparation tandis que l'effet antiadhésif est positif.

Cette étude révèle que les revêtements des différents équipements avec des nanoparticules de NiO peuvent être efficace dans la lutte contre les biofilms formés par *Bacillus cereus* dans les industries laitières.

Mots clés : Biofilm, *Bacillus cereus*, nanoparticules, oxyde de nickel.

Abstract

Microbial contaminations cause serious economic and health problems for the food industries. Among the micro-organisms arousing the apprehension of these industries, *Bacillus cereus* which has a rapid growth capacity, sporulation and biofilm formation.

Several new approaches to fight against biofilms are being developed, among them the synthesis of metal oxide nanoparticles such as nickel oxide nanoparticles which exhibit antibacterial and anti-adhesive effects against several bacterial species.

The objective of this present work is the isolation of strains of *Bacillus cereus* from raw cow's and goat's milk and the study of their ability to form biofilms, as well as the evaluation of the antibacterial and antiadhesive effect of nickel oxide nanoparticles against these strains.

A total of 10 milk samples collected from different regions were used in this study, 7 of which are intended for the dairy industry. *Bacillus cereus* strains were identified, they showed a great potential of biofilm formation. As for the NiO nanoparticles, they showed a variable antibacterial effect according to the different preparation methods while the anti-adhesive effect is positive.

This study reveals that coatings of different equipments with NiO nanoparticles can be effective in the fight against biofilms formed by *Bacillus cereus* in the dairy industries.

Keywords: Biofilm, *Bacillus cereus*, nanoparticles, nickel oxide.