



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

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



Département de Biologie

Pôle de microbiologie- Université de Tlemcen

MEMOIRE

Présenté par

BENHAMOU Djamel Eddine

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Évaluation du pouvoir antimicrobien et antibiofilm des
extraits de quelques plantes médicinales contre des
souches isolées de l'environnement de laboratoire**

Soutenu le 07 septembre 2020, devant le jury composé de :

Président	Dr. Benariba N	MCA	Université de Tlemcen
Encadreur	Dr. Malek F	MCA	Université de Tlemcen
Examineur	Dr. Kholkhal-Brahimi W	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

الملخص

إن عزل وتحديد البكتيريا من محيط مخبر التحاليل التابعة لعلوم الأحياء الدقيقة كشف عن وجود تلويث فطري و بكتيري في جميع مواقع أخذ العينات. حيث تم تحديد تواجد بكتيريا ذات صبغة غرام سالبة, العصيات الشمعية (*B. cereus*) والمكورات العنقودية الذهبية (*S. aureus*). هذه الأخيرة صُتقت على أنها مُنتج مفرط للغشاء الحيوي (البيوفيلم) مع قيمة $DO=3,2$. تم اختبار التأثير المضاد للبكتيريا والمضاد للبيوفيلم الخاص بالمستخلصات النباتية للسنوبر الحلبي (*Pinus halepensis*) ولنبات الخلة البلدية (*Ammi visnaga*) ضد أربعة سلالات معزولة من محيط المخبر وسلالة مرجعية هي *B. cereus*. حيث أظهرت النتائج المحصل عليها أن مستخلص السنوبر الحلبي أكثر فعالية ضد نمو البكتيريا مع أقل تركيز مثبط بقيمة $CMI=20\text{mg/ml}$ ضد السلالة S17, وحتى ضد تشكيل البيوفيلم مع أقل تركيز مثبط قدره $CMIB=80\text{mg/ml}$ ضد السلالة (S8) بالمقارنة مع مستخلص نبات الخلة البلدية.

الكلمات المفتاحية: مخبر التحليل. الغشاء الحيوي. مستخلصات نباتية. *B. cereus*. *S. aureus*. CMI. CMIB.

Résumé

L'isolement et l'identification des bactéries à partir de l'environnement des laboratoires d'analyse de microbiologie a révélé une contamination fongique et bactérienne dans tous les sites de prélèvement, dont les espèces bactériennes identifiées sont *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et autres bactéries à Gram négatif. La souche de *S. aureus* isolée est classée comme hyper productrice du biofilm avec une valeur de $DO=3,2$.

L'effet antibactérien et anti-biofilm des extraits végétaux d'*Ammi visnaga* et *Pinus halepensis* a été testé contre quatre souches isolées et une souche de référence *B. cereus*. Les résultats obtenus montrent que l'extrait de *P. halepensis* est plus efficace contre la croissance bactérienne avec une CMI de 20 mg/ml contre la souche S17, et même contre la formation du biofilm avec une CMIB de 80 mg/ml contre la souche (S8) que l'extrait d'*Ammi visnaga*.

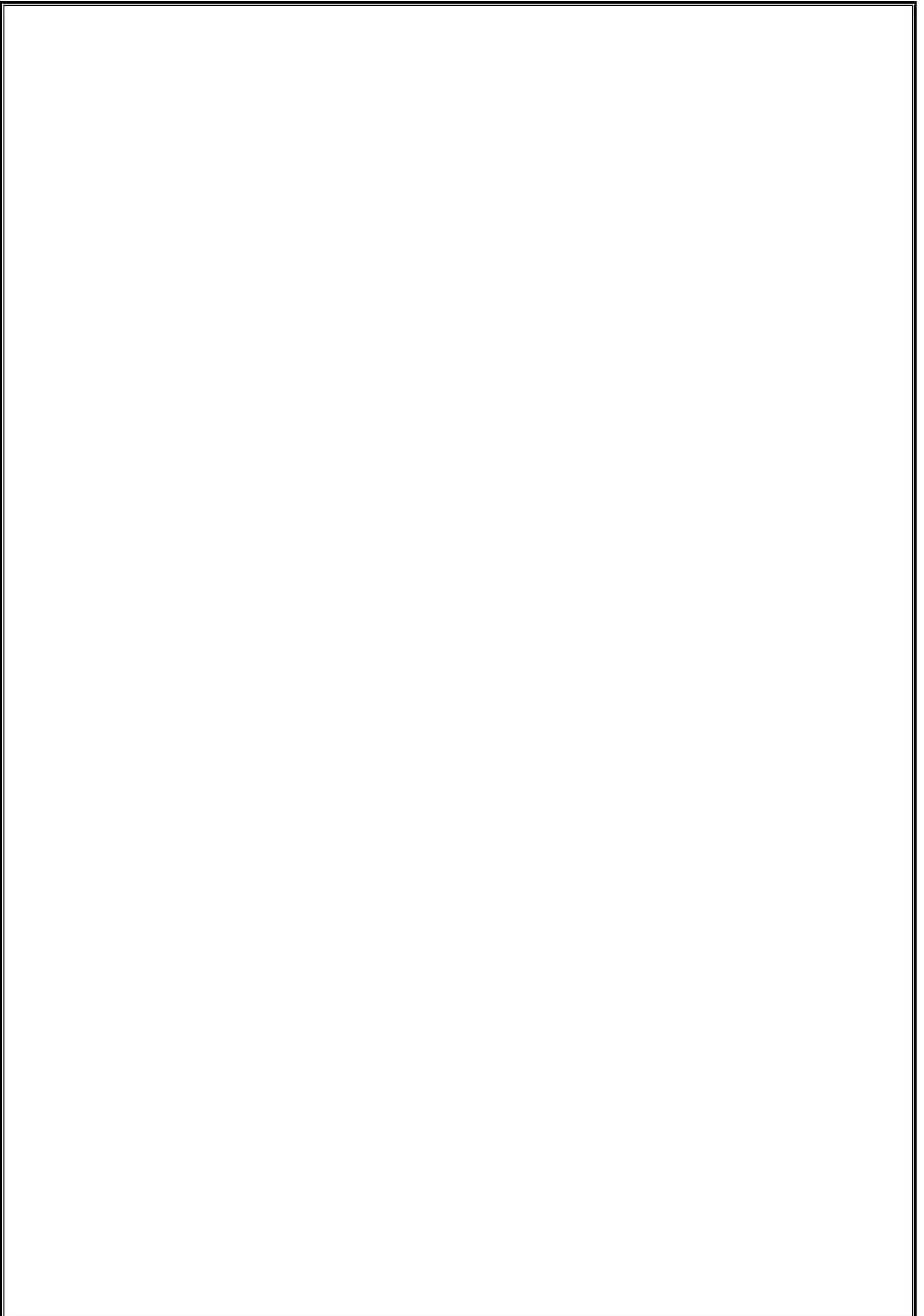
Mots clés: Laboratoires d'analyses. Biofilm. Extraits végétaux. *B. cereus*. *S. aureus*. CMI. CMIB

Abstract

Isolation and identification of bacteria from the microbiology laboratory environment revealed fungal and bacterial contamination at all sampling sites. The bacterial species identified were *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and other gram-negative bacteria. The isolated *S. aureus* strain is classified as hyper-producing biofilm with an OD value of 3.2.

The antibacterial and anti-biofilm effect of plant extracts of *Ammi visnaga* and *Pinus halepensis* was tested against four isolated strains and a reference strain *B. cereus*. The results obtained show that the *P. halepensis* extract is more effective against bacterial growth with a MIC of 20 mg/ml against the S17 strain, and even against biofilm formation with a CMIB of 80 mg/ml against the strain (S8) than the *Ammi visnaga* extract.

Key words: Analytical laboratories. Biofilm. Plant extracts. *B. cereus*. *S. aureus*. MIC. MBIC.



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Allah le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donné durant toute ces années.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme. Malek F. Maître de conférence de classe A au département de Biologie, université de Tlemcen pour avoir encadré ce travail, pour ses conseils et directives avisés et pour sa patience.

Je remercie également les membres de jury Dr. Benariba H. Maître de conférence de classe A et Dr. Zholkhal-Brahimi W. Maître de conférence de classe B au département de Biologie, université de Tlemcen d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Je tiens à remercier très respectueusement les ingénieurs de laboratoires du pôle de microbiologie département de Biologie, université de Tlemcen pour la disponibilité et l'aide.

Dédicaces

A mon cher père, à ma chère maman, qui sont la lumière qui éclaire le chemin de ma vie. Qu'Allah les garde et les protège.

A mes chers frères et sœurs, qui m'ont encouragé et m'ont entouré d'amour...

A ma tante et à toute la famille Benhamou et Touati...

A mes amis et toute personne qui me connaitre...

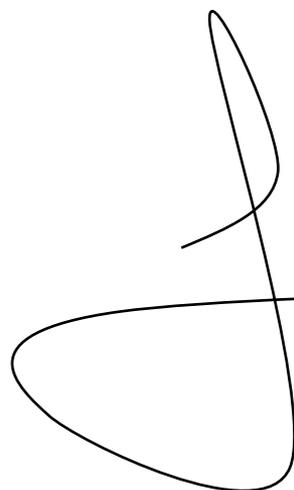
 Djamel eddine

Table des matières

Liste des figures	VIII
Liste des tableaux	VIII
Liste d'abréviations	IX
INTRODUCTION GENERALE :	1
PARTIE I :	2
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	2
CHAPITRE I : BIOFILM MICROBIEN ET HYGIENES DES SURFACES	3
I. Généralités sur les biofilm	3
I. 1. Définition du biofilm.....	3
I. 2. Les étapes de formation du biofilm.....	4
I. 2.1. L'adhérence	4
I. 2.2 Multiplication et croissance du biofilm	5
I. 2.3 Maturation du biofilm.....	5
I. 2.4 La dispersion/détachement	6
II. Stratégies de lutte contre les biofilms microbiens	8
II. 1. Stratégies à titre préventif :	9
II. 2. Stratégies curatives	9
III. Hygiène des surfaces et de l'environnement des laboratoires d'analyse.....	10
III. 1. Importance du nettoyage/désinfection.....	10
III. 2. Les agents chimiques de désinfection	10
III. 3. Biocides naturels dans le nettoyage/désinfection des surfaces :.....	11
III. 4. Amélioration du nettoyage conventionnel : cas du CIP	12
CHAPITRE II : PLANTES MEDICINALES ET POUVOIR ANTIMICROBIEN	15
I. Les plantes médicinales et aromatiques (PAM).....	15
I.1. Définition	15
I.2. Pouvoir antibiofilm des substances naturelles	15
I. 2. 1. Effet sur l'adhésion et la formation de biofilm.....	15
1.2. 2. L'effet inhibiteur du quorum-sensing	16
I. 3. Mécanismes d'action des substances naturelles.....	16
PARTIE II :	18
MATERIELS ET METHODES	18
I/Isolément des souches :	19
I.1/Prélèvement à partir de l'air ambiant :	19

I.2/Prélèvement à partir des surfaces :	19
II/Identification des isolats :	20
II.1/Critères morphologiques :	20
II.2/Critères biochimiques :	20
II.2.3/ L'identification au genre <i>Bacillus</i> :	21
II.2.4/ Identification au genre <i>Staphylococcus</i> :	21
III/ Conservation des souches :	21
IV/ Etude de la formation de biofilm :	22
IV.1/ Inoculation des microplaques	22
IV.2/ Coloration au cristal violet	22
IV.3/ Lecture des plaques	22
V/ Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits végétaux.....	23
V.1/ Préparation des solutions des extraits aqueux.....	23
V.2/ Préparation des cultures	23
VI/ Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la formation des biofilms (CMIB)	24
VII/ Détermination de la concentration minimale éradicatrice des biofilms préformés (CMEB)	24
PARTIE III	26
RESULTATS ET DISCUSSION	26
I/Les contaminants microbiens de l'air ambiant :	27
II/ Les contaminants microbiens des surfaces :	28
III/ Résultat de l'identification microscopique:	28
IV/ Résultat de l'identification biochimiques :	28
1/ Identification au groupe <i>B. cereus</i> :	29
2/ Identification au genre <i>Staphylococcus</i> :	31
V/ Activité antimicrobienne et anti-biofilm des extraits végétaux.....	31
1/ Résultats de l'évaluation du potentiel de formation de biofilm :	32
2/ Résultats de détermination de l'activité antimicrobienne et antibiofilm des extraits de plante:.....	33
CONCLUSION	38
ANNEXES	40
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	42

Liste des figures

FIGURE 1 : COMPOSITION DU BIOFILM. D'APRES LISTER ET AL., (2014).....	3
FIGURE 2 : LES ETAPES DE FORMATION DU BIOFILM BACTERIEN (GOTZE ET AL., 2016).....	4
FIGURE 3 : STRUCTURE ET ARCHITECTURE TRIDIMENSIONNELLE DES BIOFILMS (DJERIBI ET AL., 2012)	6
FIGURE 4 : DIFFERENTS STYLES DE DISPERSION DU BIOFILM DANS LES LACTODUCS. CHAQUE STYLE DE DISPERSION EST REPRESENTE PAR DES IMAGES ESEM DE BIOFILMS IN VITRO DE 20 H DE <i>B. CEREUS</i> (A ET B) OU DE BIOFILMS DE SEPT JOURS FORMES IN SITU A L'INTERIEUR DE CONDUITES DE LAIT (C ET D) (MALEK., 2018).	7
FIGURE 5 : SURVIE DE <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> APRES 5 MINUTES DE CONTACT AVEC DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE THYMOL (DUBOIS-BRISSENET ET AL., 2006).....	12
FIGURE 6 : EXEMPLE DE SURFACES MAL NETTOYEES EN INDUSTRIE LAITIERE : BIOFILMS MATURES FORMES <i>IN-SITU</i> SUR DES LAMES EN INOX PLACEES A L'INTERIEUR DE CONDUITES DE LAIT PENDANT 7 JOURS ET OBSERVEES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE ENVIRONNEMENTAL (ESEM), APRES APPLICATION DU SYSTEME DE NETTOYAGE (CIP). A GAUCHE : SEGMENT DE PRE-PASTEURISATION, A DROITE : SEGMENT DE POST-PASTEURISATION (MALEK., 2016).....	13
FIGURE 7 : SCHEMA SIMPLIFIE D'UNE PROCEDURE CIP CONVENTIONNELLE EN CINQ ETAPES ET D'UNE STRATEGIE CIP AMELIOREE EN TROIS ETAPES (MALEK., 2018).	14
FIGURE 8 : STRUCTURE CHIMIQUE DU CITRAL.	15
FIGURE 9 : STRUCTURE CHIMIQUE DU THYMOL (A) ET CARVACROL (B).....	16
FIGURE 10 : ASPECT MICROSCOPIQUE DES SOUCHES ISOLEES APRES COLORATION DE GRAM.....	29
FIGURE 11 : PHOTOS MONTRANT LA CROISSANCE DE LA SOUCHE 22 SUR GELOSE AU SANG (GAUCHE), ET SUR MILIEU MOSSEL COMPLET (DROITE).	30
FIGURE 12 : RESULTAT DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE 17 SUR MILIEU CHAPMAN.....	31
FIGURE 13 : CROISSANCE EN BIOFILM PREDITE DES SOUCHES ISOLEES DE L'ENVIRONNEMENT DES LABORATOIRES.	32

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : MECANISMES D'ACTION DE DIFFERENTES SUBSTANCES NATURELLES	17
TABLEAU 2 : PREPARATION DES SOLUTIONS DES MOLECULES ANTIMICROBIENNES D'APRES (BENKHALDI., 2017)	23
TABLEAU 3 : ORIGINES DES SOUCHES UTILISEES DANS LES DIFFERENTS TESTS D'ACTIVITES ANTIMICROBIENNES..	24
TABLEAU 4 : DENOMBREMENT ET DESCRIPTION DES CONTAMINANTS BACTERIENS DE L'AIR AMBIANT.	27
TABLEAU 5 : RESULTAT DE L'IDENTIFICATION AU GROUPE <i>B. CEREUS</i>	30
TABLEAU 6 : RESULTATS DE L'IDENTIFICATION AU GENRE <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	31
TABLEAU 7 : LE COMPORTEMENT PREDIT DES SOUCHES ISOLEES VIS-A-VIS LES EXTRAITS VEGETAUX :	34

Liste d'abréviations

EPS : substances polymères extracellulaires

QS : Quorum sensing

AI : auto-inductrices

AHL: acyl-homosérine lactone

HAQ: 4-hydroxyl 2-alkyl quinolone

CIP: cleaning in place

c-diGMP: diguanosine monophosphate cyclique

SARM : *S.aureus* résistant à la méticilline

PM : plante médicinales

PGG : 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-b-D-glucopyranose

LecA : Lectine A

TC: Trans-cinnamaldéhyde

CIP : *cleaning in place*

PAM : plantes aromatiques et médicinales

LPS : lipopolysaccharides

DO : Densité optique

UFC : Unité formatrice de colonie

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE :

Les laboratoires d'analyse microbiologiques jouent un rôle important dans le domaine médical, industriel et agro-alimentaire. Ces laboratoires constituent un environnement riche en microorganismes, qui peuvent être trouvés partout (sols, paillasses, équipements..) et peuvent contaminer même le manipulateur. Pour cela, ces surfaces doivent être nettoyées et désinfectées de manière régulière et efficace.

Un biofilm est une communauté microbienne qui se caractérise par l'adhésion à une surface solide, et qui peut coloniser les surfaces de tout l'équipement et appareillage de laboratoire. Ces structures présentent une ligne de défense et échappent aux systèmes de nettoyage et désinfection des surfaces. La diminution de l'efficacité des méthodes de nettoyage/désinfection conventionnelles à éradiquer les biofilms, a conduit vers la recherche de nouvelles méthodes plus efficaces telles que les substances produites par les plantes.

En effet, les composés actifs produits au cours du métabolisme secondaire des végétaux sont généralement responsables des propriétés biologiques, ces produits peuvent potentiellement contrôler la croissance microbienne dans diverses situations (Silva et Fernandes Júnior., 2010). De même, ils ont la capacité de pénétrer les biofilms bactériens, sont facilement biodégradables, moins nocifs pour l'environnement et sont presque non toxiques (Ling et *al.*, 2020).

L'objectif de ce travail, est d'améliorer l'hygiène des surfaces par l'utilisation des biocides naturels, via l'évaluation du pouvoir antimicrobien et antibiofilm de ces substances sur des contaminations bactériennes isolées à partir de l'environnement de laboratoires d'analyse biologique et de leurs surfaces. Le plan expérimental de ce travail est le suivant :

1. Isolement des bactéries à partir de l'air ambiant et les surfaces des laboratoires ciblés.
2. Identification phénotypique des souches isolées.
3. Détermination du potentiel des bactéries isolées à former le biofilm.
4. Evaluation de l'activité antimicrobienne et antibiofilm des extraits de quelque plantes.

PARTIE I :

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : BIOFILM MICROBIEN ET HYGIENES DES SURFACES

I. Généralités sur les biofilm

Les bactéries vivent rarement en un seul organisme dispersé, elles vivent le plus souvent en communautés et colonisent les surfaces (Hartmann et Rothballer., 2017).

Le développement d'un biofilm est très complexe et lié à plusieurs variables telles que les conditions environnementales (disponibilité des nutriments, la température, le pH, protéines/adhésines, l'hôte), les structures de surface et les facteurs microbiologiques (Gram négatif / positif, forme microbienne, structure, composition moléculaire, espèce, physico-chimie, phase de croissance, âge, présence de flagelles, pili, capsules ou substances exopolymères) (Speranza et al.,2020).

I. 1. Définition du biofilm

Un biofilm est un consortium de micro-organismes dans lesquels les cellules adhèrent les unes aux autres et souvent aussi à une surface: les cellules sont intégrées et protégées au sein d'une matrice extracellulaire composée de substances polymériques extracellulaires (EPS) produites par les mêmes micro-organismes impliqués (Speranza et al.,2020)

Au sein du biofilm les microorganismes ne représentent que 5%-35% du volume (Jamal et al.,2017), ces microorganismes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (Lister et al., 2014) comme c'est illustré dans la **figure 1**.

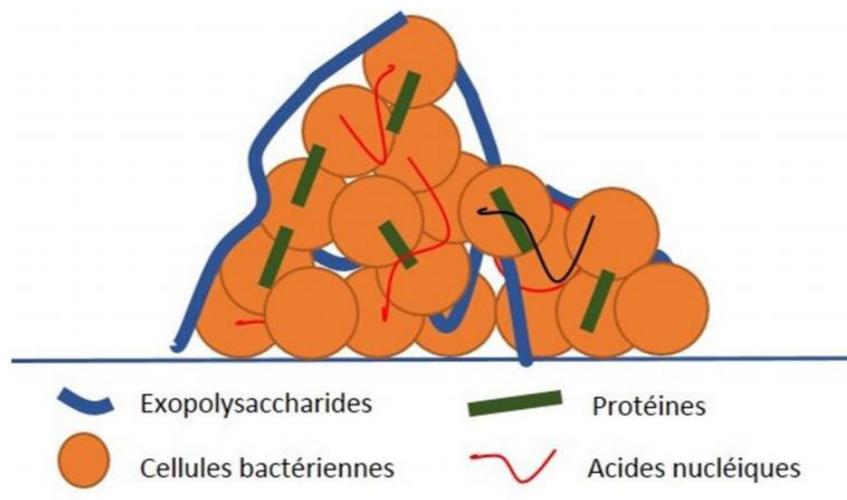


Figure 1 : Composition du biofilm. D'après Lister et al., (2014)

I. 2. Les étapes de formation du biofilm

Les étapes de formation d'un biofilm sont représentées dans la figure 2, et comprennent l'adhésion ou adhérence, la multiplication et croissance du biofilm, sa maturation et enfin la dispersion ou étape finale du cycle de vie du biofilm.

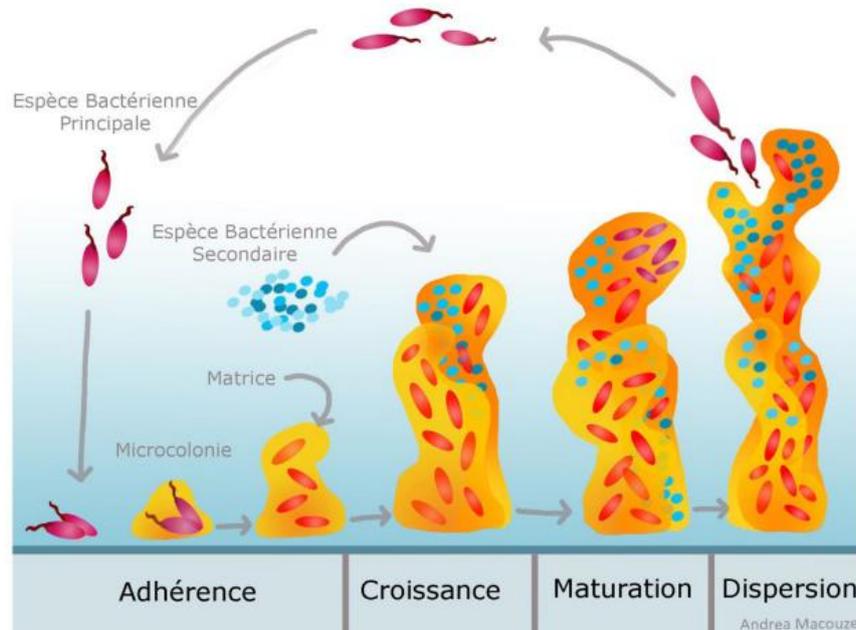


Figure 2 : Les étapes de formation du biofilm bactérien (Gotze et al., 2016).

I. 2.1. L'adhérence

Les cellules planctoniques vont venir s'agréger à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire de transport passif (ex : sédimentation) ou actif en faisant intervenir des structures spécifiques de la bactérie comme les flagelles chez *Pseudomonas aeruginosa* (Percival et al., 2011).

L'adhésion met en jeu des forces d'interaction différentes, notamment les forces de London-van der Waals, les interactions électrostatiques et les interactions de Lewis. L'ensemble est modélisé par la théorie dite XDLVO (van Oss, 1995; Wang et al., 2011). Cette phase initiale de formation du biofilm est divisée en adhésion réversible et irréversible. L'adhésion irréversible se fait au moyen de deux mécanismes principaux, d'une part la multiplication des liaisons faibles (type liaisons de van der Waals, liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes) dont le nombre compense le niveau d'énergie (Characklis et Marshall, 1990 ; Thibaut, 2014). D'autre part, il apparaît des ponts polymériques entre d'un côté les divers appendices, flagelles et pili et les EPS secrétées par la cellule, et de l'autre, le support conditionné (Thibaut, 2014). Si la cellule échappe à la barrière électrostatique répulsive,

l'adhésion deviendra irréversible et entraînera l'adhésion permanente des microorganismes à cette surface (Gotze et *al.*, 2016).

I. 2.2 Multiplication et croissance du biofilm

Les nutriments présents dans le film de conditionnement et le milieu liquide environnant aident les cellules bactériennes fixées de manière permanente à se développer et se multiplier pour former des microcolonies. Ces dernières, agrandissent et forment une couche de cellules recouvrant la surface. En ce moment, les cellules attachées produisent également un polymère (EPS) qui aide à ancrer les cellules à la surface et à stabiliser la colonie contre les fluctuations de l'environnement (Otto., 2013).

Ces EPS sont essentiellement cationiques chez les bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis* qui produisent une matrice composée d'un polymère de β -1,6-N-acétylglucosamine (Sutherland., 2001 ; Sakuragi, Kolter., 2007), alors que les EPS des bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) sont neutres ou polyanioniques dont le cellulose est le composé essentiel de leurs biofilms (Zogaj et *al.*, 2001). Chez *P. aeruginosa* les EPS sont caractérisés par la présence d'alginate, un polysaccharide linéaire constitué de L-guluronique et D-mannuronique liés par des liaisons β -1,4. Ce polysaccharide joue un rôle d'adhésine comme il participe à la structuration du biofilm (Khalilzadeh., 2009).

I. 2.3 Maturation du biofilm

Les structures 3D se développent dans lesquelles la matrice EPS fournit un échafaudage multifonctionnel et protecteur, permettant à des micro-environnements chimiques et physiques hétérogènes de se former et où des micro-organismes coexistent au sein d'interactions polymicrobiennes et sociales (compétitives et synergiques) (Hyun et *al.*, 2017). Au sein de cette communauté l'activité métabolique globale ralentie et l'architecture se modifie où des canaux aqueux se créent entre les colonies permettant une circulation des enzymes, les déchets et les nutriments (figure 3). Un gradient d'O₂ et éléments nutritifs se crée, les cellules les plus proches du support étant moins alimentées de ce fait elles entrent dans un état de dormance et donc sont les mieux protégées vis-à-vis des agressions extérieures (Khalilzadeh., 2009).

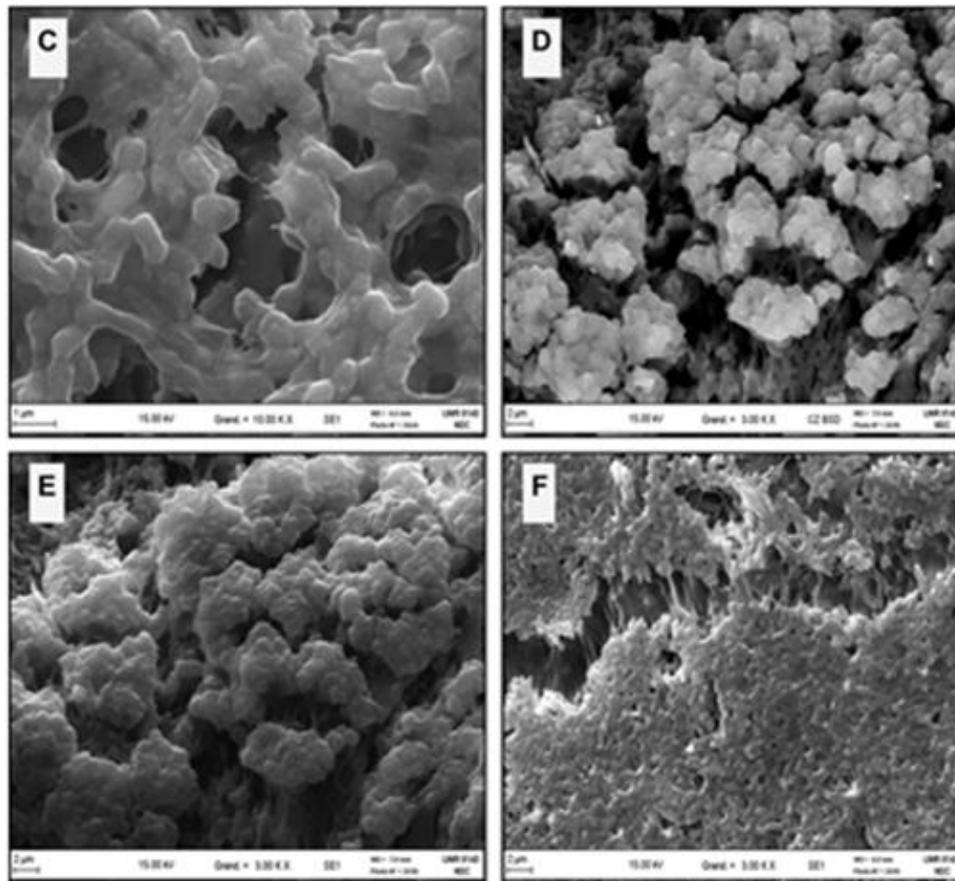


Figure 3 : Structure et architecture tridimensionnelle des biofilms (Djeribi et al., 2012)

I. 2.4 La dispersion/détachement

I. 2.4.1. Description

La dispersion ou détachement constitue la dernière étape du cycle de vie d'un biofilm et peut être active ou passive (Kaplan., 2010). Ce phénomène pourra être initié par différents facteurs tels qu'une force externe comme les forces de cisaillement qui provoquent la destruction complète ou partielle du biofilm, c'est la dispersion passive, ou en réponse à un stimulus interne ou externe tel que la diminution de la qualité des nutriments ou la libération du signal de dispersion ce qui provoque la libération des cellules planctoniques, c'est la dispersion active (Fleming et Rumbaugh ., 2017)

Chez *S.aureus* la synthèse d'enzymes et de surfactants est le mécanisme majeur utilisé afin de dégrader la matrice du biofilm sous le contrôle du système agr (le nom donné au QS chez cette espèce) (Gotze et al., 2016). L'activation de ce système induit le passage des cellules de l'état sessile à un état planctonique (Boles et Horswill., 2008 ; Lauderdale et al., 2010).

S. aureus produit 10 protéases sécrétées (Shaw et al., 2004) ce qui entraîne la dégradation d'importantes protéines de la matrice et la déstabilisation de biofilm (Zeilinska et al., 2012) On note aussi que la sérine protéase Esp produite par *S. epidermidis* disperse les biofilms de

S. aureus (Sugimoto et al., 2013), et comme molécule surfactant, le rhamnolipide produit par *P. aeruginosa* sous le contrôle du QS permet de réaliser son détachement (Davey et al., 2003).

I. 2.4.2. Exemple de la dispersion/détachement en industrie laitière :

Le détachement est une étape clé dans la transmission et la persistance des contamination dues au biofilm car ce phénomène entraîne la dissémination des cellules planctoniques qui vont coloniser d'autres surfaces (Gotze et al., 2016). Les souches de *Bacillus cereus* se caractérisent par une dispersion rapide qui se produit en moins de 20 heures (Malek ., 2016). Dans l'industrie laitière, cette dispersion est impliquée dans les problèmes des contamination croisées (Malek., 2018). La figure 4 montre les différents styles de dispersion de cet agent pathogène qui peuvent se produire dans les lactoducs.

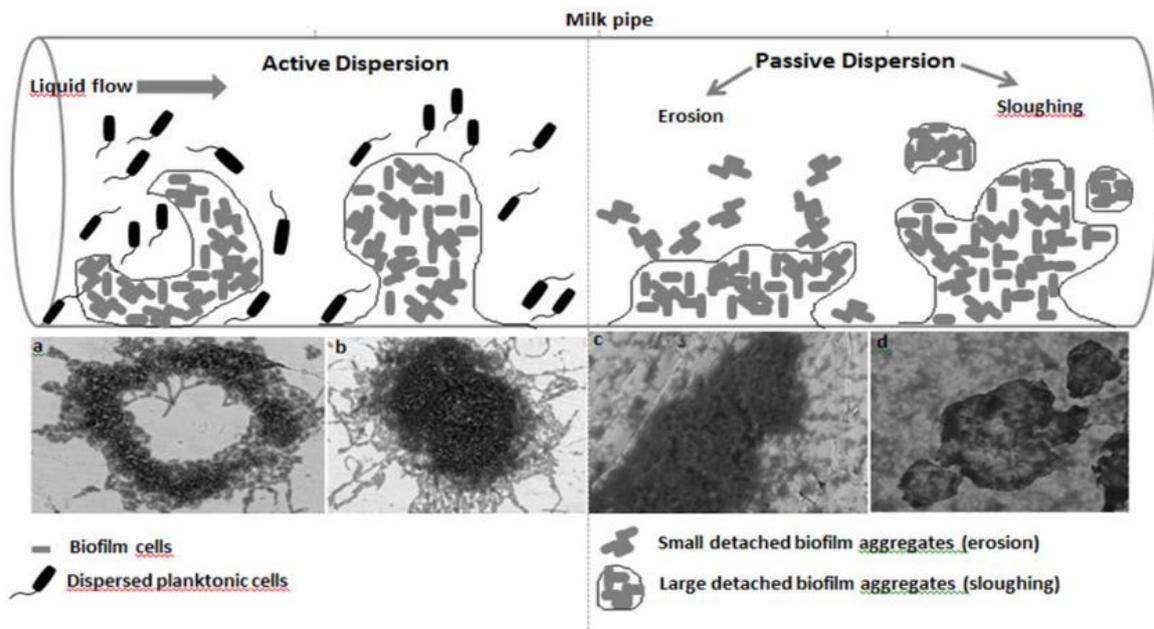


Figure 4: Différents styles de dispersion du biofilm dans les lactoducs. Chaque style de dispersion est représenté par des images ESEM de biofilms in vitro de 20 h de *B. cereus* (a et b) ou de biofilms de sept jours formés in situ à l'intérieur de conduites de lait (c et d) (Malek ., 2018).

I. 2.4.3. Application dans la lutte contre le biofilm

A partir de ces mécanismes de dispersion, plusieurs stratégies de traitements sont développées pour induire la dispersion microbienne telle que l'utilisation de la dispersine B. C'est une enzyme isolée d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* capable de disperser les biofilms de *S.epidermidis* et *S.aureus* en hydrolysant la liaison glycosidique du protéines auto-inductrices, elle dégrade également la matrice et entraîne le détachement de cellules

bactérienne du biofilm (Kaplan et *al.*, 2004). La dispersion induite pourrait entraîner des dégâts si les agents antimicrobiens ne parviennent pas à éradiquer les cellules libérées. Elle doit être associée à un traitement antibiotique (Lister et Horswill., 2014).

I. 3. Rôle du QS dans la formation du biofilm

La formation du biofilm nécessite l'établissement d'un système de communication entre les bactéries appelé le quorum sensing (QS). Le QS est un mécanisme de signalisation intercellulaire largement répandu (Galié et *al.*, 2018), il est formé via la production de molécules dites auto-inductrices (AI). La production de ces dernières dépend de la nature de bactérie (Gram négatif / Gram positif), l'état physiologique (densité cellulaire) et de la présence d'autre éléments (signaux synthèses, signaux récepteurs, gènes et signaux régulateurs) (Amara et *al.*, 2011).

Les bactéries à Gram négatif utilisent l'acyl-homosérine lactone (AHL) et occasionnellement des 4-hydroxyl 2-alkyl quinolone (HAQ) comme AI, alors que les bactéries à Gram positif utilisent principalement des oligopeptides cycliques (Hartmann., Rothballer., 2017).

Les signaux QS peuvent déclencher la dispersion en réponse aux changements environnementaux liés aux niveaux de nutrition et à l'appauvrissement en oxygène (Soto., 2011). Chez *P. aeruginosa* le QS dirige la dispersion en réduisant la biosynthèse de l'exopolysaccharide « Pel » qui est un composant structurel de la matrice du biofilm, et augmente la synthèse du rhamnolipides tensioactifs. La surproduction de ce dernier entraîne le détachement du biofilm de *P. aeruginosa* (Singh., 2018).

II. Stratégies de lutte contre les biofilms microbiens

La formation des biofilms est considérée comme une étape importante dans le cycle de vie de la plupart des espèces bactériennes, et peut être liée à des épidémies, à la résistance aux antimicrobiens ou à la contamination de produits médicaux et industriels (Caro-Astorga et *al.*, 2020). Les procédures d'assainissement conventionnelles ne sont pas totalement efficaces contre les biofilms et peuvent induire la sélection de phénotypes résistants (Ling et *al.*, 2020). Pour combattre les biofilms on peut utiliser des stratégies à titre préventif ou curatif.

II. 1. Stratégies à titre préventif :

De nombreuses approches peuvent être utilisées pour empêcher la formation de biofilms, on peut citer à titre non exhaustif :

- Inhibition de l'adhésion irréversible par interférence avec la production d'adhésines.
- Blocage de l'interaction des adhésines avec leurs récepteurs.
- Utilisation d'agents chélateurs qui inhibent le transport de métaux essentiels vers l'intérieur des cellules.
- Blocage des voies biochimiques qui sont cruciales pour la formation de biofilms, et inhibition de la biosynthèse des nucléotides de signalisation tels que le diguanosine monophosphate cyclique (c-diGMP), qui peut maintenir les bactéries à l'état planctonique (Lebeaux et al,2014).
- L'interférence avec la communication bactérienne par l'utilisation d'inhibiteurs du signal du quorum sensing (QS).
- L'utilisation de bactéries non pathogènes qui peuvent concurrencer les agents pathogènes en produisant des toxines (par exemple, des bactériocines) ou d'autres substances (Wu H et al,2015).
- Le développement des nanomatériaux et des technologies correspondantes offre une nouvelle possibilité de développer des agents antimicrobiens pour contrôler les biofilms microbiens (Rizzello et al., 2013). Les nanomatériaux tels que l'argent en nanomètres, le dioxyde de titane et l'oxyde de cuivre présentent de bonnes activités antibactériennes (Pelgrift et Freidman., 2013 ; Besinis et al., 2017)

II. 2. Stratégies curatives

Si la formation d'un biofilm ne peut être empêchée, il existe des méthodes pour le désassembler comme l'induction de la dispersion par :

- La pectine méthylestérase une enzyme capable de réduire la formation de biofilm dans les bioréacteurs (Torres et al., 2011).
- La production de D-acides aminés pendant la phase stationnaire tardive induisant la dispersion du biofilm de multiples bactéries (Kolodkin-Gal et al., 2010).
- L'application de chélateurs de métaux divalents, d'inhibiteurs du signal QS, comme on peut utiliser aussi les bactériophages ou bien on combine les antibiotiques avec du sucre ou de l'argent pour éradiquer les cellules persistantes (Kim et al, 2016).

Pour assurer la digestion de la matrice organique du biofilm des détergents à base d'enzymes (lipases, protéases...) peuvent être utilisés, comme ils sont moins nocifs pour l'environnement (Hasan et *al.*, 2010).

Cependant, la stratégie utilisée en industrie agro-alimentaire est le nettoyage/désinfection qui assure l'élimination des souillures.

III. Hygiène des surfaces et de l'environnement des laboratoires d'analyse

III. 1. Importance du nettoyage/désinfection

Dans un laboratoire d'analyse microbiologique, les microorganismes sont omniprésents, ce qui présente un danger pour le manipulateur et peut même fausser les résultats d'analyse. Pour éviter ces problèmes une procédure de nettoyage/désinfection doit être suivie.

Le nettoyage/désinfection des paillasse doit être réalisé à la fin de chaque manipulation alors que les sols sont nettoyés à la fin de la journée de travail. En outre, pour une désinfection optimale, les surfaces doivent être correctement nettoyées au moyen d'un détergent (David et Balty ., 2014). Pour détacher les salissures d'une surface et les disperser ou mettre en solution pendant le nettoyage, le détergent utilisé doit contenir un agent tensioactif qui permet à la solution de nettoyage d'entrer en contact avec la surface et décoller les souillures, ce détergent comprend aussi des agents anticorrosion, agents d'émulsion, de dispersion et de solubilisation qui permettent de retenir les salissures au sein de la solution de détergence (David et Balty., 2014).

III. 2. Les agents chimiques de désinfection

Beaucoup de produits chimiques sont utilisés dans le processus de nettoyage/désinfection. Le choix du désinfectant dépend de la nature de la souillure et celle du contaminant microbien. Les salissures sont des composés fines (poussières) et ou complexes qui se fixent sur les surfaces et renferment les microorganismes. Une souillure est caractérisée par le rapport entre son hydrosolubilité et sa liposolubilité, et c'est cette caractéristique qui devrait être prise en compte lors du choix des agents chimique de décontamination. La nature chimique des souillures peut être organique (les lipides, les protéines et les glucides), inorganiques (les oxalates, les aluminates...) ou encore les microorganismes eux-mêmes (El atyqy., 2018)

Les produits les plus couramment utilisés comprennent le chlore et ses dérivés, l'acide peracétique, les ammoniums quaternaires...(David et Balty., 2014).

III. 2. 1. Hypochlorite de sodium (Eau de Javel)

L'eau de Javel (NaOCl) possède un spectre d'activité très large et est efficace pour éradiquer les biofilms de plusieurs bactéries tels que les biofilms de *S. aureus* et *S. enterica* formés sur les surfaces en acier inoxydable et en polypropylène (Galié et al., 2018). NaOCl ne doit pas être mélangé avec des détergents ou détartrants car cela entraîne des projections et un dégagement de chlore gazeux très toxique (Anonyme., 2006)

III. 2. 2. Le dioxyde de chlore

Le dioxyde de chlore (ClO₂) aqueux est l'assainissant le plus utilisé dans l'industrie alimentaire. En effet, il a été démontré que le ClO₂ gazeux est plus efficace contre les endospores de *B. cereus* présentes dans les biofilms sur les surfaces en acier inoxydable (Nam et al., 2014). De même, cet agent chimique est plus efficace contre les biofilm d'*E. coli* que NaOCl en particulier lorsqu'une étape de séchage suivait le traitement de la surface (Galié et al., 2018).

III. 2. 3. Acide peracétique

L'eau oxygénée (H₂O₂) est un puissant désinfectant oxydant qui génère des radicaux libres en contact avec les structures du biofilm, les détruisant à des concentrations minimales sans effets secondaires toxiques (Srey et al., 2013). Sa combinaison avec l'acide acétique donne l'acide peracétique, avec un pH de 2,8. Il attaque la plupart des métaux et substances organiques comme il présente également une grande efficacité contre *S. aureus* et *Listeria monocytogenes* (Srey et al., 2013).

III. 3. Biocides naturels dans le nettoyage/désinfection des surfaces :

L'utilisation des agents chimiques dans les procédures de nettoyage/désinfection peut altérer la qualité sanitaire des produits industriels, et leurs efficacité reste toute fois variable d'une application à une autre. De ce fait, des travaux envisagent le traitement des surfaces en utilisant les biocides d'origines naturels tels que les huiles essentielles, acides, sels... (Dubois-Brissonnet et al., 2006). Le traitement des surfaces d'acier inoxydable par du chitosan et du carvacrol été efficace sur différentes microorganismes pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, et *Saccharomyces cerevisiae*) (Knowles et Roller., 2001). De plus, le traitement des suspensions bactériennes et

des bactéries adhérentes sur l'acier inoxydable par le thymol a montré que les bactéries adhérentes sont légèrement plus résistantes que les bactéries planctoniques (figure 5), alors que la réalisation de la même expérience en utilisant le carvacrol et l'eugénol, les bactéries adhérentes ne montrent pas de résistance accrue par rapport à leurs homologues planctoniques (Dubois-Brissonnet et *al.*, 2006).

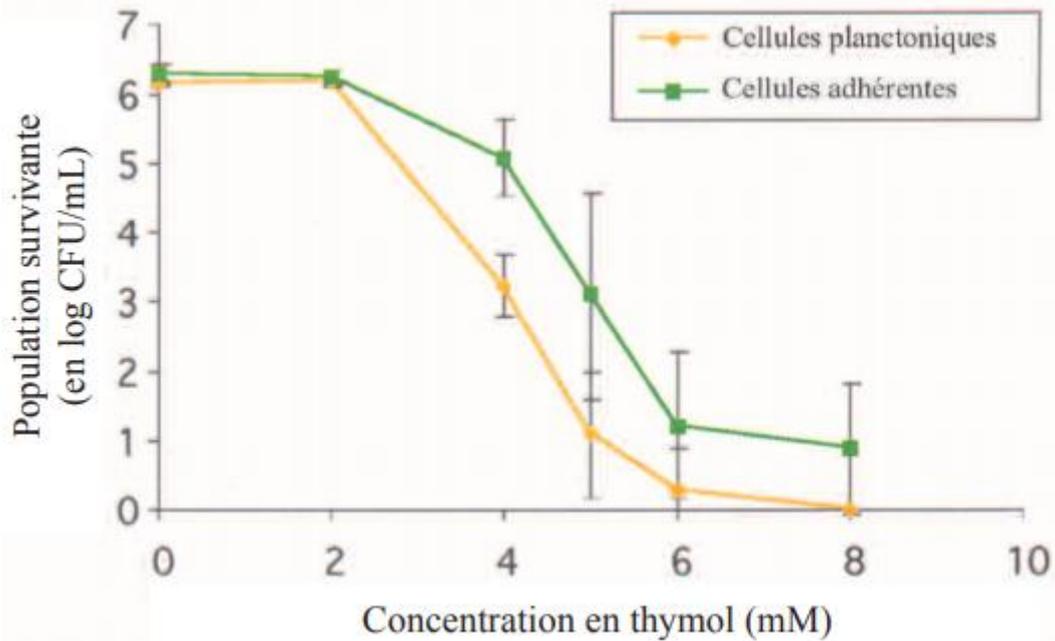


Figure 5 : Survie de *Salmonella Typhimurium* après 5 minutes de contact avec différentes concentrations de thymol (Dubois-Brissonnet et *al.*, 2006).

III. 4. Amélioration du nettoyage conventionnel : cas du CIP

III. 4. 1. Description du CIP

Pour les systèmes fermés tels que les lactoducs dans l'industrie laitière, un nettoyage acide-alcalin, le CIP (*cleaning in place*) est utilisé (Bremer et *al.*, 2006). La procédure CIP conventionnelle comprend les cinq étapes suivantes (Malek ., 2018) :

- Un pré-rinçage par l'eau froide.
- Un passage de solution alcaline (NaOH) à 2% à 80° pendant 10 minutes, permet de minéraliser les souillures organiques.
- Un rinçage intermédiaire, permet d'éliminer les souillures et la neutralisation du pH.
- Un passage de solution acide (HNO₃) 1% à 70° pendant 5 minutes, l'élimination des souillures minérales.
- Le rinçage final.

III. 4. 2. Amélioration du CIP

Lors de l'application de cette procédure conventionnelle, des recontaminations des surfaces nettoyées ont été observés, en raison du phénomène de réadhésion des spores bactériens (Le Gentil et *al.*, 2010 ; Faille et *al.*, 2013). Cependant, l'efficacité du CIP classique dans l'élimination des biofilms est limitée (Bremer et *al.*, 2006 ; Faille et *al.*, 2010). La figure 5 donne un exemple de surface mal nettoyée en industrie laitière.

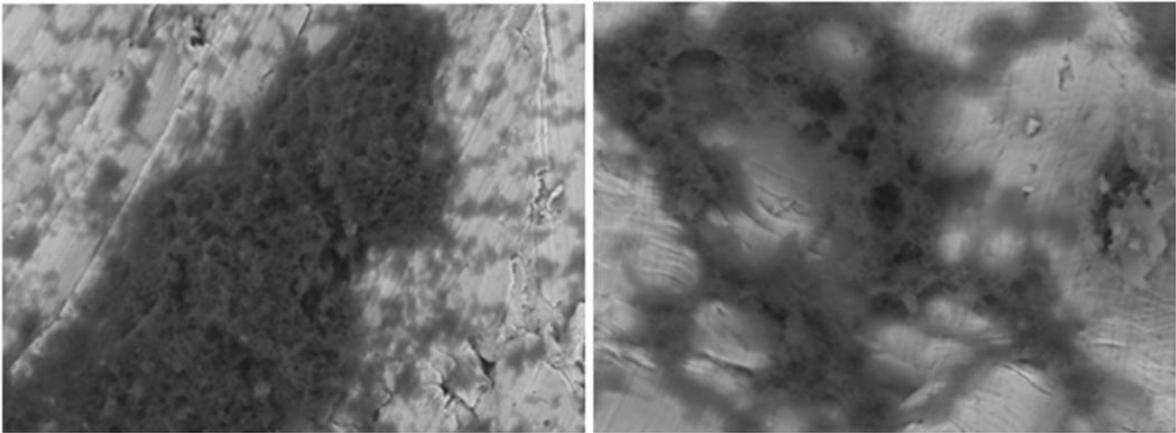


Figure 6 : Exemple de surfaces mal nettoyées en industrie laitière : biofilms matures formés *in-situ* sur des lames en inox placées à l'intérieur de conduites de lait pendant 7 jours et observées au microscope électronique à balayage environnemental (ESEM), après application du système de nettoyage (CIP). A gauche : segment de pré-pasteurisation, à droite : segment de post-pasteurisation (Malek., 2016).

L'utilisation de détergents enzymatiques et les molécules d'origine végétale en combinaison avec ce système donne de meilleurs résultats, pour cela une procédure CIP améliorée en 3 étapes est proposée (Malek .,2018) et comprend les étapes suivantes (figure 6)

- Le pré-rinçage à froid.
- Le nettoyage/assainissement combiné à l'aide de solutions désinfectantes alcalines à base de produits naturels.
- Le rinçage final.

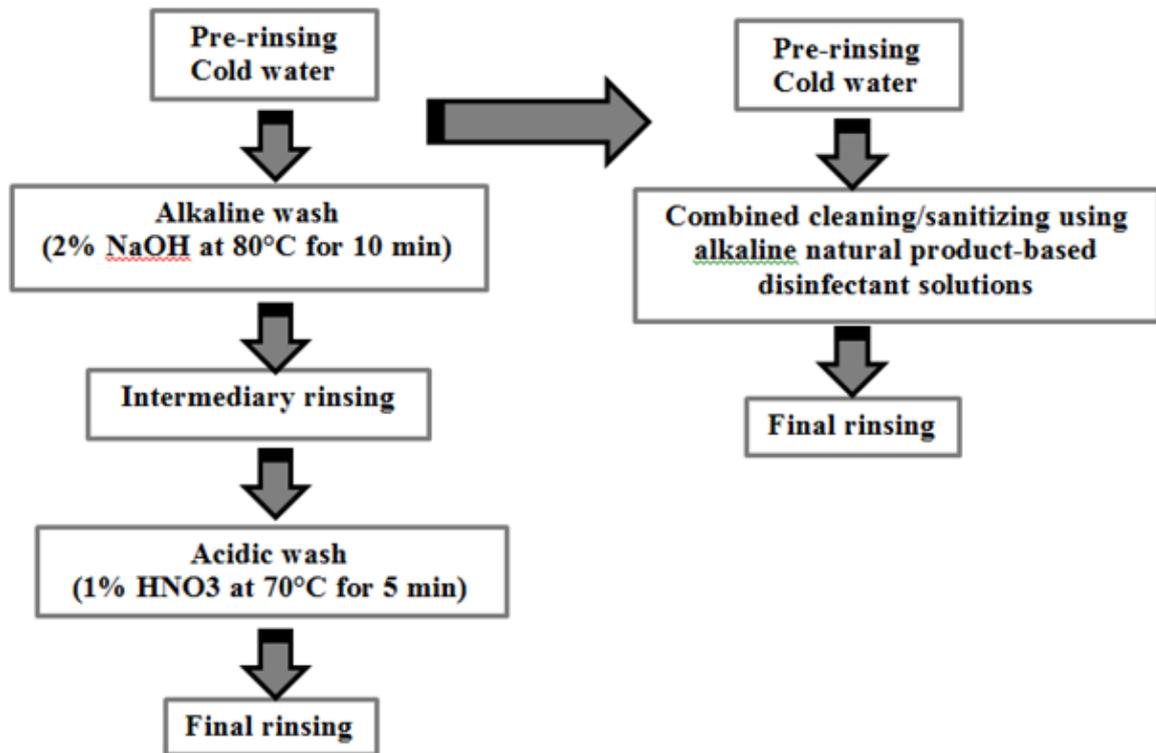


Figure 7 : Schéma simplifié d'une procédure CIP conventionnelle en cinq étapes et d'une stratégie CIP améliorée en trois étapes (Malek., 2018).

CHAPITRE II : PLANTES MEDICINALES ET POUVOIR ANTIMICROBIEN**I. Les plantes médicinales et aromatiques (PAM)****I.1. Définition**

Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle pour ses propriétés médicamenteuses. Une ou plusieurs parties de ces plante médicinales (PAM) peuvent être utilisées de différentes manières (décoction, macération ou infusion) pour bénéficier de leurs propriétés thérapeutiques qui proviennent de leurs métabolismes (Dutertre ., 2011).

Selon l'appartenance chimique des éléments actifs des PAM, ils sont classés en plusieurs grands groupes tels que les terpènes, les stéroïdes, les composés azotés, les composés phénoliques et les huiles essentielles, chacune de ces classes regroupe une grandes diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques dépendant de leur nature chimique et de leur concentrations (Hartmann ., 2007 ; Irchhaiya et *al.*, 2015)

I.2. Pouvoir antibiofilm des substances naturelles**I. 2. 1. Effet sur l'adhésion et la formation de biofilm**

Les composés naturels comme les extraits et ou les huiles essentielles de plantes sont actuellement évalués pour leur potentiel à éliminer les biofilms. Ces composés ont la capacité de pénétrer les biofilms bactériens, sont facilement dégradés dans l'environnement et sont presque non toxiques (Ling et *al.*,2020).

Les facteurs de virulence et la biosynthèse des flagelles de *Cronobacter sakazakii* ont été réduites par le citral (présent dans les huile essentielles de verveine, d'orange de citron...) (figure 7) qui a été prouvé comme un composé anti-adhésion et antibiofilm (Shi et *al.*, 2017).

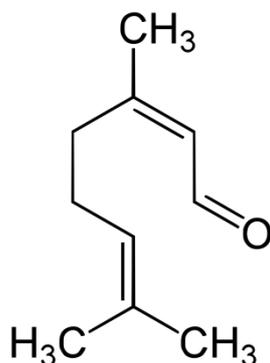


Figure 8 : Structure chimique du citral.

1.2. 2. L'effet inhibiteur du quorum-sensing

Le système de communication AHL est la cible de divers composés d'origine végétale ayant des activités inhibitrices du QS (QSI) ainsi que les furanoses halogénés de l'algue rouge *Delisea pulchra*. De même, les composés disulfure de l'ail et l'acide rosmarinique de romarin agissent comme QSI et empêchent la formation du biofilm de *P. aeruginosa* (Koh et al., 2013). En outre, les extraits de *Piper nigrum* et *Cinnamamum verum* ont montré des effets inhibiteurs importants sur la formation du biofilm de la bactérie *Cronobacter sakazakii* par inhibition du QS (Singh et al., 2016).

I. 3. Mécanismes d'action des substances naturelles

Plusieurs travaux ont été réalisés dans ce sens. L'émodine est une molécule active qu'on peut trouver dans les feuilles de *Senna occidentalis* (Niranjan et Gupta., 1973 ; Majumdar et al., 1987). Elle présente un effet inhibiteur de la formation du biofilm, elle induit aussi la protéolyse du récepteur de signal QS « TraR » d'*E. coli* comme elle augmente l'activité d'ampicilline contre *P. aeruginosa* (Kim et al., 2016). L'effet inhibiteur du QS a été révélé dans les extraits de *Cecropia pachystachya* (Branco-vanegas et al., 2014) et dans les principes actifs de l'hépatique *Lepilozia chardulfera* (Gilebert et al., 2015). La malvidine obtenue par l'extrait méthanolique de *Syzygium amini* augmente la sensibilité du biofilm de *Klebsella pneumoniae* aux antibiotiques classiques, et inhibe la synthèse des EPS (Gopu et al., 2015). Le carvacrol et le thymol, la structure du thymol est similaire à celle du carvacrol (figure 8) ; ils diffèrent toutefois quant au lieu du groupe hydroxyle dans le cycle phénolique. Ces deux substances affectent la perméabilité de la membrane et provoquent une fuite des constituants cytoplasmiques. Leur structure désintègre la membrane externe des bactéries à Gram négatif, libérant des lipopolysaccharides (LPS) et augmente la perméabilité du cytoplasme à l'ATP (Lambert et al., 2001 ; Helander et al., 1998).

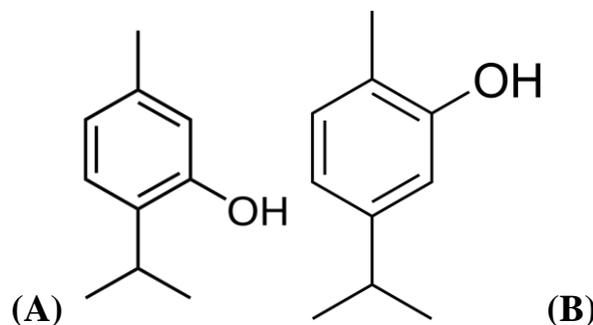


Figure 9 : Structure chimique du thymol (A) et carvacrol (B).

Les mécanismes d'action d'autres substances naturelles sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 1) :

Tableau 1 : Mécanismes d'action de différentes substances naturelles.

Substance naturelle	Mécanisme d'action	Bactérie cible	Référence
Extrait de thé (<i>Rosa rugosa</i>) polyphénols+flavonoïdes	Inhibition des mouvements en « <i>swarming</i> » et la formation de biofilm chez <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>P. aeruginosa</i>	(Zhang et al., 2014)
Hydrate de baicaline, cinnamaldéhyde et l'hamamélitannine	-Améliore la sensibilité des biofilms aux antibiotiques classiques. -Augmente la sensibilité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des biofilms des SARM à l'antibiotique vancomycine avec l'hamamélitannine.	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cenocepacia</i> , <i>S. aureus</i> (y comprise le SARM)	Brackmann et al., 2011) -(Brackmann et al., 2016 ; Kim et al., 2016)
Extrait de l'ail (<i>Allium savitum</i>)	-Augmente la sensibilité des biofilms au traitement par l'antibiotique tobramycine. -La présence d'allicine inhibe le QS.	<i>P.aeruginosa</i>	(Bjarnsholt et al., 2005)
Eugenol	-Inhibition de la production d'amylase et de protéase par <i>B.cereus</i>	<i>B.cereus</i>	(Thoroski et al., 1989)
Carvone	-Limite la croissance de <i>E. coli</i> , de <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactococcus lactis</i>	<i>E. coli</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactococcus lactis</i>	(Oosterhaven et al., 1995)

PARTIE II :

MATERIELS ET

METHODES

Notre travail a été effectué au niveau des laboratoires pédagogiques : Pôle de la microbiologie (département de biologie) Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen. Il consiste à tester l'activité antimicrobienne et antibiofilm des extraits de deux espèces végétales : *Pinus halepensis* et *Ammi visnaga* sur des bactéries isolées de l'environnement de ces laboratoires après leur identification et la caractérisation de leur potentiel de formation du biofilm.

I/Isolement des souches :

Les prélèvements sont effectués dans les 4 laboratoires du pôle de microbiologie du département de Biologie de l'université de Tlemcen, à partir de l'air ambiant et des surfaces des paillasses.

I.1/Prélèvement à partir de l'air ambiant :

Dans différents endroits de ces quatre laboratoires de microbiologie, des boîtes de Petri contenant le milieu Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA) sont déposées ouvertes à l'air libre pendant 30 minutes, puis mises à l'incubation à 30°C pendant 24h à 72h.

I.2/Prélèvement à partir des surfaces :

Afin de mettre en évidence l'efficacité des processus de nettoyage, un prélèvement à partir de la surface des paillasses est effectué au niveau des laboratoires du même pôle.

Une solution de 5mL d'eau physiologique Peptonnée (TSE) a été préparée pour chaque tube qui contient un agent neutralisant le Tween 80 à raison de 0.3%.

Après l'humidification de l'écouvillon dans la solution de dilution préparée, on racle aseptiquement une zone délimitée à l'aide d'un guide stérile de 4cm² pour garantir un prélèvement d'une superficie identique d'un point de prélèvement à un autre.

Les écouvillons sont remis dans les tubes aseptiquement. Après le vortexage, une série des dilutions décimales est réalisée à partir de la solution mère allons jusqu'à la dilution 10⁻³.

I.2.1/Ensemencement :

a/Ensemencement en surface :

Dans des boîtes de Petri qui contiennent un milieu gélose tryptone soja (TSA) on met 0.1mL de suspension microbienne de chaque tube à la surface de la gélose. La technique

d'ensemencement utilisée est l'ensemencement en surface par étalement au râteau, les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C pendant 24h à 72h.

b/Ensemencement en profondeur :

Dans des boîtes de Petri vides, on verse 1mL de la suspension microbienne, puis on coule les boîtes par la gélose TSA tiède avec des mouvements d'agitation pour homogénéiser la dispersion des microorganismes dans la gélose. Une fois le milieu est solidifié, on incube les boîtes à 30°C pendant 24h à 72h.

II/Identification des isolats :

L'identification phénotypique des souches isolées porte par l'étude d'un certain nombre de critères morphologiques, physiologiques et biochimiques :

II.1/Critères morphologiques :

II.1.1/Examen macroscopique :

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement et après 48h-72h d'incubation. L'étude consiste à l'observation directe à l'œil nu l'aspect morphologique des colonies obtenues sur le milieu de culture en tenant compte des critères suivants : La taille, la forme (bombée, plate, ombiliquée, à bords surélevés, ronde...) couleur, nombre de colonies, type de colonies...

II.1.2/Examen microscopique :

Pour les cultures jeunes, on réalise une coloration de Gram pour mettre en évidence le type de paroi ainsi que la forme, la taille et le mode de groupement.

Les cultures âgées sont conservées pour la recherche de la formation éventuelle des spores chez les cultures Gram+ en forme de bâtonnets.

Après le passage par les étapes de la coloration de Gram, les lames sont observées sous microscope optique (grossissement *100 à l'immersion)

L'examen de la spore est effectué sur des cultures âgées après coloration à la fuchsine

II.2/Critères biochimiques :

II.2.1/Test catalase :

Il sert à mettre en évidence la présence de l'enzyme catalase qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)



A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée et cotonnée on dépose l'inoculum bactérien sur une lame en verre nettoyée, dégraissée et sèche. Puis on ajoute une goutte d'eau oxygénée.

Le résultat positif se traduit par dégagement d'O₂ par effervescence visible à l'œil nu, l'absence d'effervescence est un résultat négatif. Ce test est recherché chez les bactéries Gram+.

II.2.2/Test d'oxydase :

A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée et cotonnée on dépose une colonie bactérienne pure sur un disque à l'oxydase. Le virage de couleur vers le bleu-mauve traduit un résultat positif. L'absence de coloration est un résultat négatif. Uniquement les souches Gram- sont testées.

II.2.3/ L'identification au genre *Bacillus* :

Les bâtonnés Gram positifs sont ensemencés sur milieu Mossel pour rechercher la lécithinase et fermentation de mannitol qui font partie des tests d'identification au groupe *Bacillus cereus*.

- L'apparition d'un halo de précipitation indique que les colonies sont lécithinase positives.
- L'apparition des colonies rouges signifie qu'elles sont mannitol négatives.
- L'apparition des colonies jaunes signifie qu'elles sont mannitol positives.

Les mêmes souches ensemencées sur milieu Mossel sont repiquées sur une gélose au sang. Pour la recherche d'hémolyse. Ce milieu de culture permet de déterminer les germes hémolytiques et la confirmation de l'identification au groupe *B. cereus* après incubation à 30°C pendant 24h.

II.2.4/ Identification au genre *Staphylococcus* :

Le but de cette étape est de distinguer *Staphylococcus aureus* des autres cocci. Toutes les cocci Gram (+) et catalase (+) sont repiquées sur milieu Chapman puis incubées à 37°C pendant 24h. Le virage de couleur de milieu autour des colonies signifie la présence présomptive de *S. aureus*.

III/ Conservation des souches :

La conservation des souches s'effectue dans des tubes à essai contenant de milieu (GN) Inclinée. Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par des stries et incubées à 30°C pendant 24h, puis conservées à 4°C.

IV/ Etude de la formation de biofilm :

Le potentiel de formation de biofilm chez les bactéries testées est déterminé par la méthode de cristal violet selon la technique d'Auger et *al*, (2006).

IV.1/ Inoculation des microplaques

À partir de souches repiquées sur les boîtes, nous avons préparé une préculture de 24 h dans le milieu TSB. Après 24h une dilution décimale a été préparée pour avoir une densité optique (D.O) comprise entre 0.6 à 0.8 à 595 nm. Ensuite, 100 µl de suspension bactérienne sont déposés dans chaque puits de la plaque de micro titration stérile sachant que la première rangée est laissé vide pour le contrôle du lecteur et la deuxième est remplie par le milieu non ensemencé utilisé comme un contrôle négatif. Chacune des plaques est incubée à 37°C.

IV.2/ Coloration au cristal violet

Après le temps d'incubation, les biofilms formés sur les parois des puits sont mis en évidence par coloration au cristal violet. Pour cela les plaques subissent le traitement suivant :

- Les plaques sont d'abords vidées avec la micropipette.
- Rinçage par l'eau distillée (EDS) trois fois pour éliminer les cellules non adhérees.
- Laisser sécher 10 à 15 min.
- Remplir les puits avec 100 µl de cristal de violet à 1% qui permet la coloration du biofilm.
- Le temps de coloration est environ de 10 min
- Rinçage à l' EDS 3 fois.
- Séchage des plaques en position renversée
- Lecture visuelle des plaques, appréciation de l'intensité de la coloration au cristal violet.

IV.3/ Lecture des plaques

Avant la mesure de la D.O au spectrophotomètre munis d'un lecteur de microplaque (ELISA) à 630 nm les puits sont remplis avec une solution dissolvante constituée de l'acide acétique à 33% préparé à partir de l'acide acétique glacial dilué dans l'eau distillée.

V/ Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits végétaux

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits: *d'Ammi visnaga* et *Pinus halpensis* a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose (disques et puits), pour étudier la résistance ou la sensibilité des souches à partir d'une gamme de concentrations. La détermination des concentrations minimales inhibitrice de la croissance à l'état libre (CMI) et de la formation de biofilms (CMIB) est réalisée par la technique de microplaque.

V.1/ Préparation des solutions des extraits aqueux

Les extraits de plantes *d'Ammi visnaga* et *Pinus halpensis* ont été dissouts dans l'eau distillée (EDS) stérile pour préparer des dilutions successives pour aboutir aux différentes concentrations étudiées (Tableau 2).

Tableau 2: Préparation des solutions des molécules antimicrobiennes d'après (Benkhaldi., 2017)

Vsm	V.D	V.T	C.F
30 µl	270 µl	300 µl	10 mg/ml
60 µl	240 µl	300 µl	20 mg/ml
120 µl	180 µl	300 µl	40 mg/ ml
180 µl	120 µl	300 µl	60 mg /ml
240 µl	60 µl	300 µl	80 mg/ml

Vsm : volume de la solution mère, V.D : volume de diluant, V.T : volume totale, C.F : concentration finale

V.2/ Préparation des cultures

L'activité antimicrobienne des extraits végétaux a été évaluée par la méthode de diffusion par disques sur milieu gélosé « Mueller Hinton (MH)». Le diamètre des zones d'inhibition autour les disques imprégnés des extraits détermine leur activité inhibitrice. Cinq concentrations ont été testées (10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml, 80mg/ml) sur 5 souches bactériennes qui ont été choisies : **4** souches isolées : **S17, S11, S10 et S8** et **1** souche de référence : **S_{toA}** (Tableau 3). Les boites de gélose MH de 4mm d'épaisseur ont étéensemencées par écouvillonnage avec un inoculum préparé à un DO de 0,6 pour chaque souche. Un disque de 6 mm de diamètre en papier Whatman stérile est imprégné de molécules bioactives puis déposé à la surface de la gélose MH. Pour le témoin, un disque imprégné de l'EDS est appliqué dans les boites.

Trois répétitions sont réalisées pour chaque essai. Les boîtes de Pétri sont placées à 4°C pendant 1 à 2h pour laisser les molécules bioactives diffuser puis sont incubées pendant 24 h à 37°C.

Tableau 3 : Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activités antimicrobiennes.

Souche	Gram	Origine
S10	Positif	Air ambiant de laboratoire
S11	Positif	
S17	Positif	
S8	Négatif	Surfaces des pailles
StoA	Positif	Collection (Malek., 2013)

VI/ Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la formation des biofilms (CMIB)

La CMIB des extraits végétales est testée est déterminée par la technique du cristal violet (CV) (Nostro et *al.*, 2007)

Les puits de microplaque sont remplis par l'inoculum bactérien (100 µl de 10⁷UCF d'une culture d'une nuit dans le bouillon Muller-Hinton (MH)) en présence de 100µl de différentes concentrations des extraits (de 10-80 mg/ml) ou du témoin négatif.

Après 24h d'incubation à 30°C, chaque puits a été lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile, séché, coloré pendant 5 minutes avec 1% de cristal violet (CV), lavé à nouveau à l'eau et observé à la lumière. Les puits colorés indiquent la présence de la biomasse cellulaire adhérente. La valeur CMIB représente la plus faible concentration à laquelle les bactéries sessiles ne parviennent pas à repousser.

VII/ Détermination de la concentration minimale éradicatrice des biofilms préformés (CMEB)

Au début, pour produire un biofilm, tous les isolats, à 10⁷ UFC/ml d'inoculum, ont été cultivés dans des plaques de microtitration contenant du bouillon Muller-Hinton frais. Après 24 heures d'incubation à 30°C, la phase planctonique a été doucement éliminée et les puits ont été lavés trois fois avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, 200 µl de dilutions des extraits préparés dans un bouillon MH stérile, ont été ajoutés aux puits. Différentes concentrations des extraits (allant de 10 à 80 mg/ml) ont été ajoutées aux puits portant des biofilms de 24 heures. Toutes les plaques de microtitration ont été réincubées en présence d'agents antimicrobiens pendant 20 minutes à 30°C, puis elles ont été vidées et lavées avec de l'eau distillée stérile.

Les biofilms préformés ont été récupérés en grattant la surface intérieure de chaque puits, puis étalés sur la surface des plaques de gélose LB (Luria-Bertani : trypton 10 g, extrait de levure 5g, NaCl 5g, gélose 15g/L) et incubé pendant 72 h à 30°C. La valeur CMEB a été déterminée comme étant la concentration la plus faible où aucune croissance bactérienne ne s'est produite sur la gélose LB (Kalai et *al.*, 2018).

PARTIE III

RESULTATS ET

DISCUSSION

I/Les contaminants microbiens de l'air ambiant :

Les résultats d'isolement sont représentés dans le tableau 4 :

Tableau 4 : Dénombrement et description des contaminants bactériens de l'air ambiant.

Echantillons		Nombre de bactéries en ufc	Commentaire	Aspect des colonies sur milieu gélosé
Lab1	E1	87	-Contamination hétérogène. -Dominance de colonies pigmentées dont le diamètre est de l'ordre de 1-2 mm. -Présence de contamination fongique.	
	E2	96		
Lab2	E1	53	-Contamination hétérogène. -Nombre de colonies est réduit par rapport au laboratoire 1. -Présence de contamination fongique.	
	E2	50		
Lab3	E1	38	-Contamination hétérogène avec dominance fongique, ce qui est logique parce que le laboratoire 3 c'est un laboratoire de mycologie.	
	E2	36		
Lab4	E1	52	-Contamination hétérogène avec dominance de colonies pigmentées dont le diamètre est de l'ordre de 1-3mm. -La contamination est uniforme puisque les mêmes types morphologiques se trouvent dans toutes les boîtes prélevées des différents laboratoires analysés.	
	E2	69		

II/ Les contaminants microbiens des surfaces :

Les boîtes de Petriensemencées en surface présentent des colonies hétérogènes dont la majorité est constituée de colonies bactériennes. Le laboratoire 2 présente une dominance de la contamination fongique, alors que dans le laboratoire 3, la contamination est trop dense et totalement bactérienne. On note l'apparition de nouvelles formes dans les dilutions de tous les échantillons testés, le diamètre des colonies est compris entre 1-3 mm.

D'après le dénombrement et l'observation des boîtesensemencées en profondeur, on remarque que la contamination est totalement bactérienne. Dans l'échantillon 2 du laboratoire 2, la contamination est réduite se qui traduit un bon niveau d'hygiène de cette surface.

III/ Résultat de l'identification microscopique:

L'observation microscopique après coloration de Gram a permis de révéler que les souches isolées présentent différentes formes (cocci en grappe de raisin, diplocoques, bâtonnets en chainettes, coccobacilles...) et un Gram variable (positif, négatif). Quelques souches présentent des endospores ovales, subterminales non déformantes (figure 9).

IV/ Résultat de l'identification biochimiques :

Les résultats du test de la catalase ont montré que toutes les souches isolées sont catalase positive (+), la réaction se traduit par un dégagement immédiat d'O₂ par effervescence visible.

Les résultats du test de l'oxydase montrent que toutes les souches testées sont oxydase négatives, la réaction se traduit par l'absence de virage de couleur.

1/ Identification au groupe *B. cereus*:

Les résultats de l'identification des souches testées sont représentés dans le tableau 5 et dans la figure 10 :

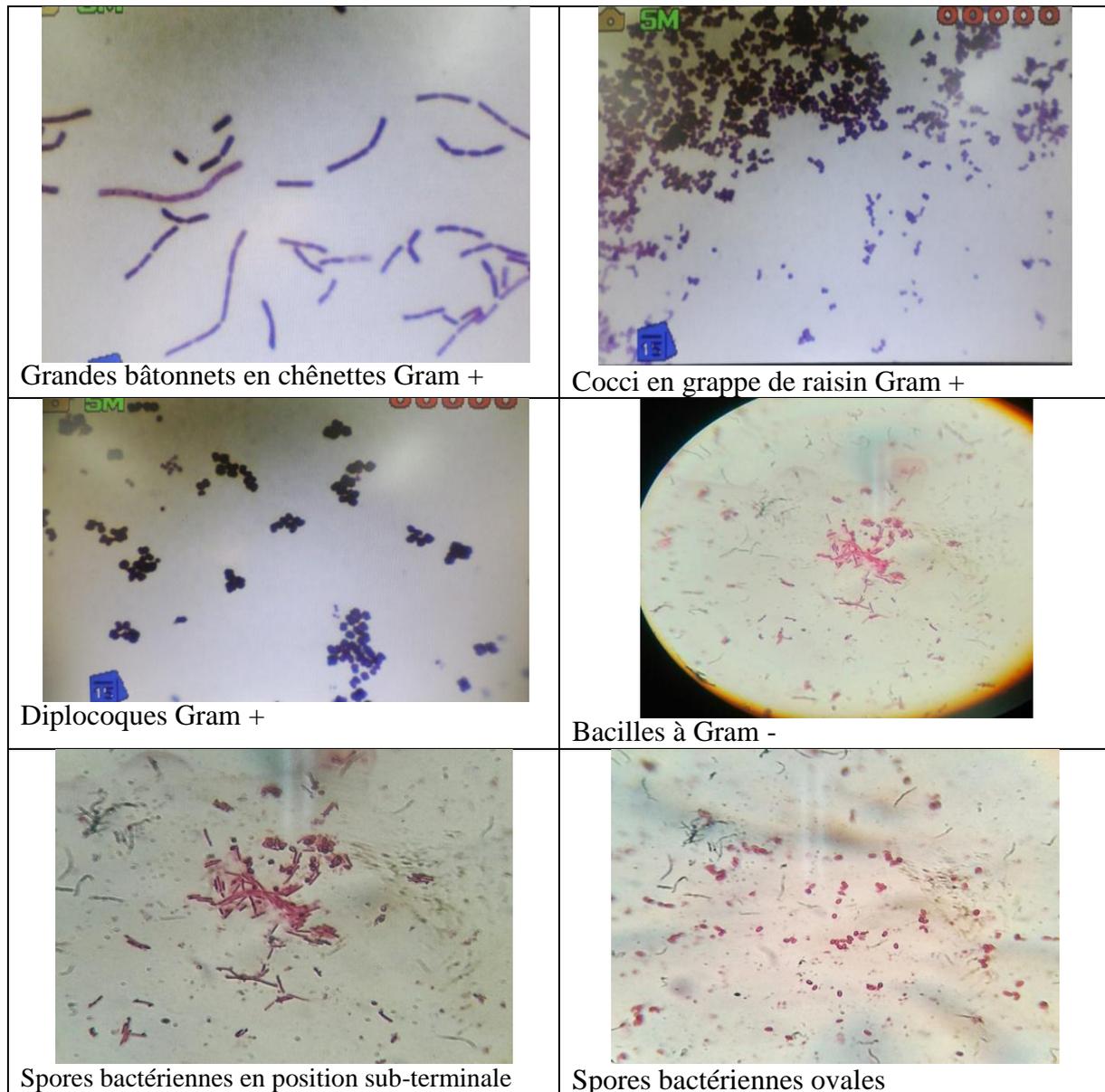


Figure 10: Aspect microscopique des souches isolées après coloration de Gram.

Tableau 5 : Résultat de l'identification au groupe *B.cereus*

Origine des souches	Code	Développement dans le milieu Mossel complet	Lécithinase	Hémolyse
Air ambiant du laboratoire	S1	+	-	-
	S2	+	-	-
	S5	+	-	-
	S6	+	-	-
	S9	+	-	-
	S10	+	+	+
	S11	+	-	+
	S13	+	-	-
	S14	+	-	+
	S16	+	-	-
	S22	+	+	+
Surfaces des paillasse	(S1)	+	-	-
	(S4)	+	-	+
	(S16)	+	-	-

En se basant sur les résultats de la coloration de Gram, test de formation de spores, la présence de la catalase, la production d'hémolysine et la zone de précipitation (lécithinase) et par comparaison aux souches *B. cereus* de collection (Malek, 2013) (S85 et StoA), les souches S10 et S22 isolées dans le présent travail peuvent être identifiées au groupe *B. cereus* (figure 10).

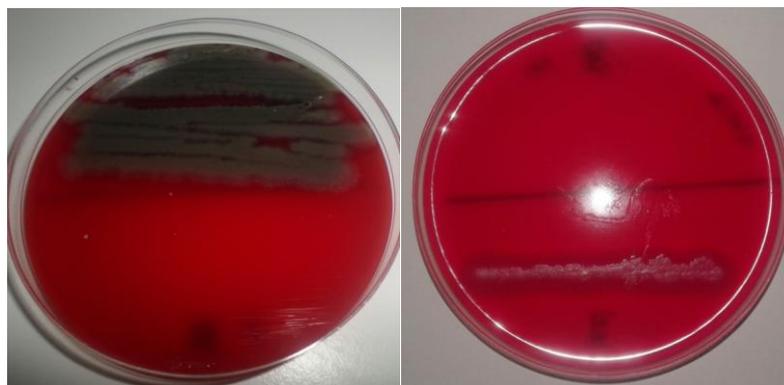


Figure 11: Photos montrant la croissance de la souche 22 sur gélose au sang (gauche), et sur milieu Mossel complet (droite).

2/ Identification au genre *Staphylococcus*:

Les résultats d'identification des souches testées sont représentés dans le tableau 6 et la figure 11 :

Tableau 6 : Résultats de l'identification au genre *Staphylococcus*.

Origine des souches	Code	Développement	Auréole jaune	Commentaire
Air ambiant du laboratoire	S3	+	-	Orientation vers le genre <i>Staphylococcus</i>
	S4	+	-	
	S7	+	-	
	S8	+	-	
	S12	+	-	
	S15	-	-	Souche inhibée par le milieu
	S17	+	+	Orientation vers l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i> .
Surfaces des paillasses	(S17)	+	-	Orientation vers le genre <i>Staphylococcus</i>

En se basant sur les résultats obtenus, la souche S17 peut être orientée vers l'identification à l'espèce *S. aureus*.

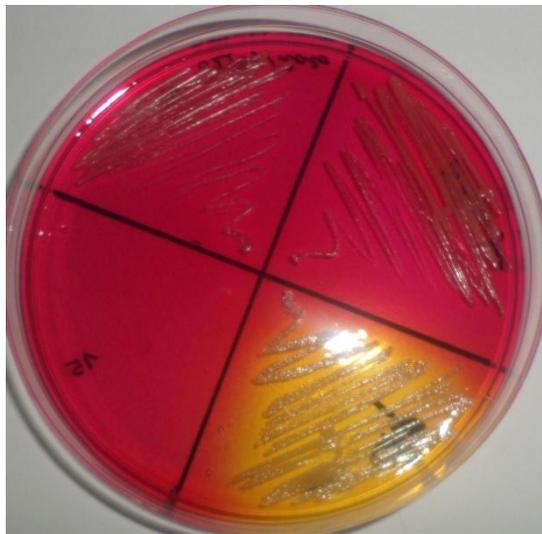


Figure 12: Résultat de la croissance de la souche 17 sur milieu chapman.

V/ Activité antimicrobienne et anti-biofilm des extraits végétaux

Tous les résultats mentionnés dans cette partie sont prédits sur la base des résultats mémoire de master réalisé par l'étudiante Benkhaldi Dounia (2017) sur les bacilles

thermophiles et mésophiles d'origine laitière et utilisant les extraits des mêmes espèces végétales que celles qui devaient être testées dans le présent travail.

1/ Résultats de l'évaluation du potentiel de formation de biofilm :

La formation de biofilm dans les microplaques de titration à 96 puits, est analysée par une simple observation à l'œil nu des puits après une coloration au cristal violet. C'est une technique indirect d'estimation de la production de biofilm sur différents substrats (Djordjevic *et al.*, 2002). La masse de biofilm est exprimée par la coloration développée, et sa solubilisation permis de la quantifier (Musk *et al.*, 2005) in Benkhaldi (2017).

D'après les résultats de Benkhaldi (2017), après 24h d'incubation à 37°C, la formation du biofilm a eu lieu préférentiellement sur les bordures des puits, par la formation d'un anneau variable d'une souche à l'autre à l'interface air –liquide. La densité du biofilm est en relation avec l'intensité de l'anneau formé (une couleur foncée indique que les souches sont fortement productrices de biofilm et vice versa).

La figure 12 représente une prédiction du potentiel de formation du biofilm après une mesure de DO à 630 nm.

Classe 1 : $DO < 0,5$: Faiblement productrice du biofilm.

Classe 2 : $0,5 < DO < 1,5$: Moyennement productrice du biofilm.

Classe 3 : $1,5 < DO < 2,5$: Fortement productrice de biofilm.

Classe 4 : $2,5 < DO$: Hyper productrice (Auger *et al.*, 2009)

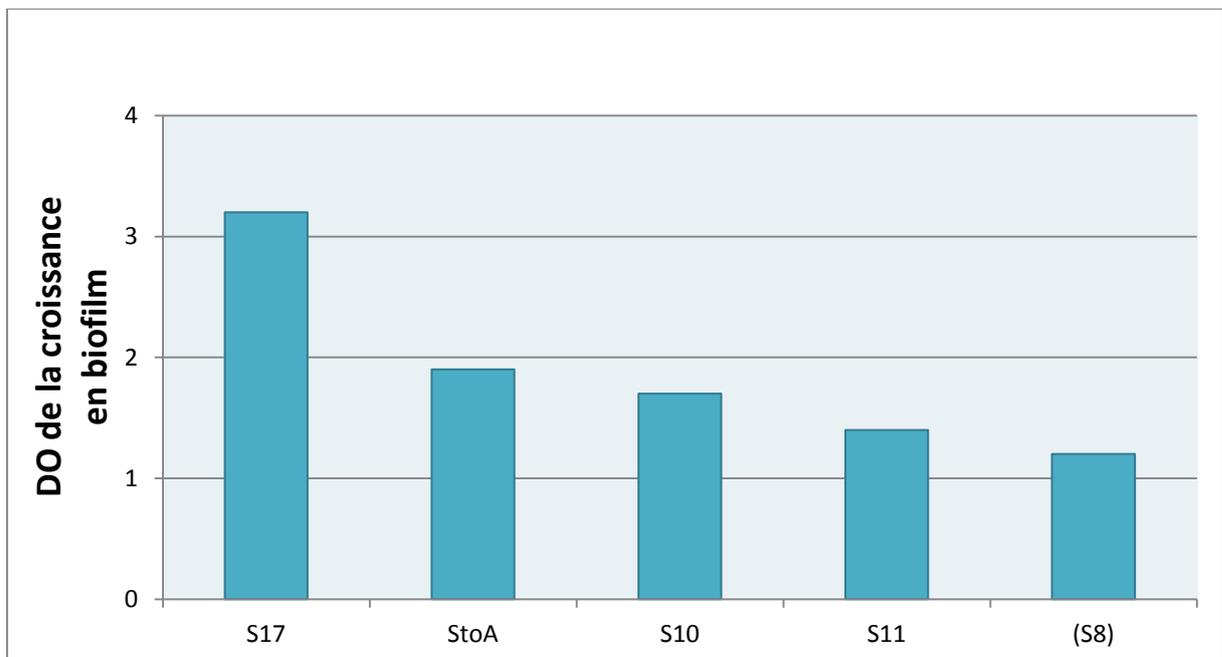


Figure 13 : Croissance en biofilm prédite des souches isolées de l'environnement des laboratoires.

D'après la figure 12 on remarque que toutes les souches testées sont capables de former le biofilm avec des potentiels variables. La souche S17 (*S. aureus*) possède le plus grand potentiel de formation du biofilm avec une valeur de DO prédite de 3,2, pouvant être classée comme une souche hyper productrice du biofilm. Boukera Abbaci et Daoudi (2019) ont trouvés que la DO de 88,7% des souches de *S. aureus* testées est plus élevée a celle du témoin ce qui signifie une capacité de formation du biofilm, et plus de 40% de ces souches ont une valeur de DO 4 fois plus élevée que celle du témoin ce qui est compatible avec nos prédictions que cette souche est hyper productrice du biofilm.

Les bacilles Gram positif StoA, S10 (*B. cereus*) et S11 (*B. spp*) sont capables de produire le biofilm avec des valeurs de DO prédites de 1,9, 1,7 et 1,4 respectivement. La souche S11 est moyennement productrice du biofilm, alors que, les souches StoA et S10 présentent une forte production du biofilm. Ces résultats prédits sont conformes à ceux trouvés par Tirloni et al (2020) qui ont remarqué que toutes les souches de *B.cereus* isolées sont capables de former le biofilm après une mesure de la DO à 590 nm. La souche (S8) (bacille Gram négatif) a une capacité moyenne de former le biofilm avec une valeur DO prédite de 1,2.

2/ Résultats de détermination de l'activité antimicrobienne et antibiofilm des extraits de plante:

2.1/ Résultats du screening par la méthode des disques :

La méthode de diffusion sur milieu gélosé ou aromatoگرامme est une méthode basée sur le principe de l'antibiogramme, la mesure de diamètre d'inhibition autour de disque imprégné des extraits végétaux détermine l'activité antimicrobienne de ces extraits (Sadou et al., 2015). La zone d'inhibition se traduit par un halo translucide autour de disque, la sensibilité ou la résistance des souches testées vis-à-vis les extraits végétaux sont expliqués par la présence ou l'absence de ce halo.

La souche est dite résistante R si le diamètre d'inhibition est inférieur de 06mm, elle est dite intermédiaire I si le diamètre d'inhibition est compris entre 06 mm et 13 mm, la souche est sensible S si la zone d'inhibition a un diamètre supérieur 13 mm (Abi-Ayad et al., 2011) in Benkhaldi (2017).

Le comportement prédit des souches a testées vis-à-vis différentes concentrations des extraits végétaux d'*Ammi visnaga* et *Pinus halepensis* est illustré dans le tableau 7.

Tableau 7 : Le comportement prédit des souches isolées vis-à-vis les extraits végétaux :

Souches	<i>Ammi visnaga</i>			<i>Pinus halepensis</i>		
	80	60	40	80	60	40
S17 (<i>S.aureus</i>)	R	R	R	S	I	I
S11 (<i>B.spp</i>)	R	R	R	R	R	R
S10 (<i>B.cereus</i>)	R	R	R	I	I	R
(S8) (<i>Bacille G-</i>)	S	I	I	I	I	I
StoA (<i>B.cereus</i>)	R	R	R	I	I	R

R : Résistante, I : Intermédiaire, S : Sensible

Selon les résultats de l'antibiogramme présentés dans le tableau 7, on remarque que les souches a Gram positif (S17, S11, S10 et StoA) sont résistantes vis-à-vis l'extrait d'*A. visnaga* a toutes les concentrations utilisées, alors que, la souche a Gram négatif (S8) semble moins résistante a une concentration de 40 mg/ml et 60 mg/ml, et sensible a la concentration de 80 mg/ml de même extrait. Ce résultat prédit semble proche de celui observé par Khalfallah et al (2011), qui ont remarqué que l'huile essentiel d'*A. visnaga* été plus efficace contre *E. coli* avec une zone d'inhibition de 25 mm de diamètre à une concentration de 128 µg/ml, alors que, *S. aureus* été moins sensible avec une zone d'inhibition de 16 mm de diamètre à la même concentration. Les travaux de Soro et al (2015) ont montré que l'huile essentielle d'*A. visnaga* été active contre *E. coli* non productrice des bêtalactamases à spectre élargie (BLSE), alors que, *E. coli* productrice BLSE est montré plus résistante vis-à-vis le même huile essentiel.

Les souches testées semblent moins résistantes vis-à-vis des extraits végétaux de *P. halepensis* sauf la souche S11 (*B. spp*) qui a développé une résistance totale à l'égard de cet extrait et à différentes concentrations. Les deux souches les moins résistantes sont (S8) (Bacille à Gram négatif) qui développe une résistance intermédiaire I à toutes les concentrations utilisées, et la souche S17 (*S. aureus*) qui a été inhibée on utilisant une concentration de 80 mg/ml. Ces résultats prédits sont en bon accord avec les conclusions de (Raho., 2014) qui a remarqué que l'huile essentiel de *P. halepensis* à inhibé *E. coli* et *S. aureus*, et cette dernière été plus sensible avec un diamètre d'inhibition de 17 mm.

2. 2/ Effet antimicrobien des extraits végétales :

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus petite valeur de concentration des extraits qui inhibe la croissance bactérienne. En se basant sur valeurs de CMI estimées par Benkhaldi (2017), les valeurs de CMI de l'extrait d'*A. visnaga* prédits contre les souches (S8), S17, S11, S10 et StoA sont de 20 mg/ml, 80 mg/ml, 80 mg/ml, 80 mg/ml et 80 mg/ml respectivement. Ces valeurs de CMI prédites montrent que la souche (S8)

est plus vulnérable à être inhibée par l'extrait d'*A. visnaga* que les autres souches ce qui est compatible avec les observations de Ghareeb et al (2011) qui ont trouvé que les extraits éthanoliques de cette plante inhibent la croissance d'*E. coli* à une valeur de CMI de 12.5 mg/ml, alors que, le même extrait inhibe la croissance de *S. aureus* à une valeur de CMI de 50 mg/ml. Les mêmes auteurs ont trouvés des résultats proches avec une action moindre en utilisant des extraits aqueux d'*A. visnaga*, les deux souches sont inhibées à une CMI de 25 mg/ml mais avec un diamètre d'inhibition différent (30 mm pour *E. coli* et 8 mm pour *S. aureus*). Selon les tests effectués par Khalfallah et al (2011), *E.coli* a été inhibée par une CMI de 16 µg/ml d'huile essentiel d'*A. visnaga*, alors que, une valeur de CMI de 32 µg/ml de la même huile essentielle a inhibée *S. aureus*.

Les valeurs de CMI prédites de l'extrait de *P. halepensis* contre les souches (S8), S17, S11, S10 et StoA sont 40 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 80 mg/ml, 60 mg/ml et 60 mg/ml respectivement. A partir de ces valeurs on remarque que l'extrait de *P. halepensis* a inhibé les souches à des valeurs de CMI variables, et la souche S17 est la plus inhibée par cet extrait. Ces résultats sont conformes à ceux trouvés par Mitić, et al (2019), qui ont observé que parmi une liste des bactéries traitées par l'huile essentielle de *P. halepensis* la plus petite valeur de CMI est remarquée chez une souche de *S. aureus* prélevée de la gorge d'une valeur de 0.19 mg/ml. En revanche, *E. coli* a enregistré une valeur de CMI de 4 mg/ml vis-à-vis le même huile essentielle. La sensibilité de *S. aureus* vis-à-vis l'extrait et l'huile essentielle de *P. halepensis* a été confirmée par le travail de Dahham et al (2015) où l'activité inhibitrice du caryophyllène (l'un des composés majeurs de l'huile essentielle de cette plante) a été évaluée contre ce germe à une concentration de 0,614 mg/ml uniquement. Au contraire, *E. coli* a été signalée plus sensible à l'égard d'huile essentielle de *P. halepensis* par Ghanmi (2007) à une concentration de 1/500 v/v, alors que, *S. aureus* n'a été pas inhibée qu' à une concentration de 1/250 v/v. Dans un autre travail, il a été documenté que les huiles essentielles de *P. halepensis* ont été inefficace contre *E. coli* et *S. aureus* (Fekih et al., 2014).

A partir de ces interprétations et résultats, on peut conclure que l'activité antibactérienne des ces antimicrobiens végétales est liée à la dose utilisée, les souches testées et composition chimique de ces extraits.

2. 3/ Effet anti-biofilm des extraits végétales :

Les concentrations minimales inhibitrices de la formation du biofilm (CMIB) prédites des extraits contre les souches à testées sont les suivantes : (S8) CMIB = 80 mg/ml pour l'extrait de *P. halepensis* et 200 mg/ml pour *A. visnaga*, S17 CMIB = 150 mg/ml et 200 mg/ml pour *P.*

halepensis et *A. visnaga* respectivement et S11 CMIB = 300 mg/ml pour *P. halepensis* et 200 mg/ml pour *A. visnaga*. A partir de ces valeurs, on observe que la souche (S8) est la plus affectée pour former son biofilm par l'extrait de *P. halepensis*, alors que, la souche S11 semble la plus résistante. Ces valeurs sont en accord à ceux trouvés par Benkhaldi (2017), où l'extrait de fruit de *P. halepensis* a inhibé la formation de biofilm d'*E. coli* à une concentration $80 \leq$ mg/ml, et l'extrait du cure dent d'*A. visnaga* a inhibé la formation du biofilm de *S. aureus* à une concentration de $200 \leq$ mg/ml. La concentration minimale éradicatrice du biofilm (CMEB) n'a pas été entamée par Benkhaldi (2017), mais Kalai et al (2018) ont testé l'effet des antimicrobiens d'origine végétale (l'huile essentiel du *Thymus ciliatus*) sur un biofilm de 24 heures de *B. cereus*, la CMEB trouvée était égale à 5 CMI, En comparant cette valeur avec les valeurs de CMEB obtenues par les acides organiques du même travail, on peut dire que l'huile essentielle utilisé est très efficace contre la croissance planctonique et le biofilm de *B. cereus*.

CONCLUSION

La richesse de l'environnement des laboratoires de microbiologie par les microorganismes rend l'hygiène des surfaces dans ces établissements un processus important.

Cette étude est basée sur deux aspects, l'un est l'isolement et l'identification des microorganismes de l'environnement de laboratoire (air ambiant et surfaces), l'autre est l'évaluation de l'activité antimicrobienne et anti-biofilm des extraits de plantes médicinales (*Ammi visnaga* et *Pinus halepensis*) contre les germes isolés de cet environnement.

La contamination dans l'environnement du laboratoire été hétérogène avec dominance de colonies pigmentées. Elle est aussi uniforme, dont les mêmes types morphologiques sont retrouvés dans toutes les boîtes prélevées des différents laboratoires. Le type des espèces bactériennes identifiées varient entre le Gram négatif et positif comme les bacilles à Gram négatif, *S. aureus*, *B. cereus*, *Bacillus. spp* et *Staphylococcus spp*, et autres formes de colonies fongiques (champignons et moisissures).

Concernant l'effet antibactérien des extraits de plantes, il est variable selon la concentration utilisée et la souche testée. L'extrait de *P. halepensis* semble plus efficace contre la croissance planctonique et même contre la formation du biofilm que celui d'*A. visnaga*. On note que la souche S11 (*B. spp*) est prédite la plus résistante vis-à-vis les extraits en sa forme planctonique et biofilm.

Nos résultats peuvent être complétés sur les aspects suivants :

- ⊗ Une identification moléculaire des souches isolées.
- ⊗ Isolement et identification des souches de l'entourage des laboratoires pour connaître l'origine de contamination.
- ⊗ Une application *in situ* des extraits végétaux sur des surfaces contaminées.
- ⊗ Evaluation de l'effet anti-biofilm de ces extraits sur des biofilms bactériens déjà formés.

ANNEXES

Composition du milieu TSE (pour 1L)

1 g peptones

8 g NaCl

Composition d'eau physiologique (pour 1L)

9 g NaCl

La gélose au sang

Le milieu de base de la gélose nutritive (GN) + 5% du sang du mouton.

Milieu Mossel

1/ Milieu de base :

1g extrait de viande

10g peptone

10g D-mannitol

10g chlorure de sodium

15g Agar-agar

0,025g Rouge de phenol

900mL eau

Ajuster le pH à 7,2

Après stérilisation du milieu de base on ajoute 10^6 UI de colestine par 1 Litre.

2/ Emulsion de jaune d'œuf :

Deux à quatre œufs frais de poule à coquille intacte, à l'aide d'un détergent liquide nettoyer les œufs avec une brosse puis rincer à l'eau courante. Faire plonger les œufs dans l'alcool à 95° pendant 30s et les sécher. Aseptiquement, casser chaque œuf et séparer les jaunes des blancs par transferts répétés d'une demi-coquille dans l'autre et récupérer les jaunes dans un Bécher stérile.

Placer les jaunes dans une éprouvette graduée stérile et ajouter quatre fois le volume d'eau stérile. Transférer de façon aseptique dans un flacon stérile et mélanger vigoureusement. Mettre le flacon dans un bain d'eau réglé 45°C pendant 2h et entreposer entre 0° et 5°C pendant 18h à 24h pour permettre au précipité de se former. Recueillir aseptiquement l'émulsion surnageant. Cette dernière peut être conservée entre 0° et 5° C au maximum pendant 72h.

Dans un flacon de 180mL de milieu de base de Mossel, ajouter 20mL d'émulsion.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

-A-

1. **Abi-Ayad, M., Abi-Ayad, F.Z., Lazzouni, H.A., Rebiahi, S.A., (2011).** Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). *J. Nat. Prod. Plant Resour.* 1 (1), 33–36.
2. **Alzoreky NS, Nakahara K. (2003).** Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int J Food Microbiol.* ;80(3):223-30.
3. **Amalaradjou MA, Kim KS, Venkitanarayanan K. (2014).** Sub-inhibitory concentrations of trans-cinnamaldehyde attenuate virulence in *Cronobacter sakazakii* in vitro. *Int J Mol Sci* ;15(5):8639–55
4. **Amalaradjou MAR, Venkitanarayanan K. (2011).** Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. *J Food Prot* ;74(2):200–8.
5. **Amara N, Krom B, Kaufmann G, Meijler M. (2011).** Macromolecular inhibition of quorum sensing: Enzymes, antibodies, and beyond. *Chem Rev* ; 111: 195-208.
6. **Anonyme. Eau et extraits de Javel. (2006).** Hypochlorite de sodium en solution. Paris, INRS, coll. Fiche toxicologique, FT 157.
7. **Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., & Gohar, M. (2006).** Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 937-941.
8. **Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., & Gohar, M. (2009).** Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Applied and environmental microbiology*, 75(20), 6616- 6618.

-B-

9. **Benkhaldi, D. (2017).** Activité antimicrobienne des extraits végétaux application à l'inhibition de biofilm des bacilles thermophiles d'origine laitière. Mémoire de fin d'étude. Université de TLEMCEM.
10. **Besinis A, Hadi SD, Le HR, Tredwin C, Handy RD. (2017).** Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings. *Nanotoxicology* ;11(3):327–38.
11. **Bjarnsholt, T.; Jensen, P.Ø.; Rasmussen, T.B.; Christophersen, L.; Calum, H.; Hentzer, M.; Hougen, H.-P.; Rygaard, J.; Moser, C.; Eberl, L.; et al. (2005).** Garlic

- blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 151, 3873–3880.
12. **Boles, B. R., and Horswill, A. R. (2008).** Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* 4:e1000052. doi: 10.1371/journal.ppat. 1000052
 13. **Borges, A., Abreu, A., Dias, C., Saavedra, M., Borges, F., Simoes, M. (2016).** New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. *Molecules (Basel, Switzerland)* 21 (7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070877> pii: E877.
 14. **Boukera Abbaci, Y., Daoudi, N. (2019).** Etude du potentiel de formation du biofilm par les Staphylocoques isolés des infections animales et humaines. Mémoire de fin d'étude. Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana. Page 53.
 15. **Bouyahya, A. Guaouguaou, F, E., Dakka, N., Bakri, Y. (2018).** Quorum Sensing: a New Anti-infectious Target of Medicinal Plants *Phytothérapie* 16:365-373
 16. **Brackman, G.; Breyne, K.; De Rycke, R.; Vermote, A.; van Nieuwerburgh, F.; Meyer, E.; Van Calenbergh, S.; Coenye, T. (2016).** The Quorum sensing inhibitor hamamelitannin increases antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms by affecting peptidoglycan biosynthesis and eDNA release. *Sci. Rep.* 6, 20321.
 17. **Brackman, G.; Cos, P.; Maes, L.; Nelis, H.J.; Coenye, T. (2011).** Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2655–2661.
 18. **Branco-Vanegas, J.; Costa, G.M.; Ortmann, C.F.; Schenkel, E.P.; Reginatto, F.H.; Ramos, F.A.; Arévalo-Ferro, C.; Castellanos, L. (2014).** Glycosylflavonoids from *Cecropia pachystachya* Trécul are quorum sensing inhibitors. *Phytomedicine*, 21, 670–675.
 19. **Bremer PJ, Fillery S, McQuillan AJ. (2006).** Laboratory scale Clean-In Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International J. Food Microbiol.* 106: 254-262.
- C-
20. **Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, et al. (2003).** Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J Ethnopharmacol.* 87(2-3):215-20.
 21. **Caro-Astorga, J., Frenzel, E., Perkins, J. R., Álvarez-Mena, A., de Vicente, A., Ranea, J. A. G., Kuipers, O. P., & Romero, D. (2020).** Biofilm formation displays

intrinsic offensive and defensive features of *Bacillus cereus*. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0112-7>

22. **Characklis W.G., Marshall K.C. (1990)**. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In : *Biofilms* (Characklis WG, Marshall KC, eds) John Wiley & Sons Inc, New York, USA, 3-15
23. **Coronel-León, J., Marqués, A. M., Bastida, J., and Manresa, A. (2016)**. Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. *J. Appl. Microbiol.* 120, 99–111. doi: 10.1111/jam.12992

-D-

24. **Dahham, S.S., Tabana, Y.M., Iqbal, M.A., Ahamed, M.B.K., Ezzat, M.O., Majid, A.S.A., Majid, A.M.S.A., (2015)**. The Anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassa*. *Molecules* 20, 11808–11829.
25. **Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A. (2003)**. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* 185(3): 1027-1036
26. **David, C., & Balty, I. (2014)**. La désinfection des surfaces en laboratoire de biologie. INRS. 40.
27. **Djeribi, R., Bouchloukh, W., Jouenne, T., & Mena, B. (2012)**. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *American Journal of Infection Control*, 40(9), 854–859.
28. **Djordjevic D., Wiedmann M. and Mclandsborough L.A. (2002)**. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied And Environmental Microbiology* ,68(6),2950– 2958
29. **Dubois-Brissonnet, F., Dietrich, C., Bellon-Fontaine, M.N. (2006)**. Resistance of planktonic and adherent-cells of *Salmonella Typhimurium* to natural antimicrobials. *Symposium Salmonella and Salmonellosis*. 10-12 may 2006. Saint-Malo (France). sous presse.
30. **Dutertre, J.M., (2011)**. Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste. Thèse doctorat d'état, Univ. Bordeaux 2-Victor Segalen U.F.R des sciences médicales, France, 33 p.

-E-

31. **El atyqy, M. (2018).** Nettoyage et désinfection dans les IAA : Aspects théoriques et pratiques. *Scientecal*. <http://www.scientecal.com/cours/nettoyage-et-d%C3%A9sinfection-dans-les-iaa-aspects-th%C3%A9oriques-et-pratiques>

-F-

32. **Faille C et al. (2013).** Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. *Food Microbiol.*, 33: 149-157
33. **Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaib, F., Merghache, D., Dib, M.A., Djabou, N., Muselli, A., Tabeti, B., Costa, J., (2014).** Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 4, 97–103.
34. **Filloux, A., & Vallet, I. (2003).** Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *médecine/sciences*, 19(1), 77-83.
35. **Fleming D, Rumbaugh K P. (2017).** Approaches to Dispersing Medical Biofilms *Microorganisms*. 5, 15; doi:10.3390/microorganisms5020015

-G-

36. **Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E.M., Villar, C.J and Lombó, F. (2018).** Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front. Microbiol.* 9:898. doi: 10.3389/fmicb.2018.00898
37. **Ghanmi, M., Satrani, B., Chaouch, A., Aafi, A., El Abid, A., Ismaili, M.R., Farah, A., (2007).** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin maritime (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) du Maroc. *Acta Bot. Gall.* 154, 293–300.
38. **Ghareeb, A. M., Zedan, T. H., & Gharb, L. A. (2011).** Antibacterial and antifungal activities of *Ammi visnaga* extracts against pathogenic microorganisms. *Iraqi J Sci*, 52(1), 30-6.
39. **Goetz, C., Dufour, S., Archambault, M., Malouin, F., & Jacques, M. (2016).** intramammaires chez la vache laitière : Une revue bibliographique. *Revue Méd. Vét.*, 14.
40. **Gopu, V.; Kothandapani, S.; Shetty, P.H. (2015).** Quorum quenching activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels and its anthocyanin malvidin against *Klebsiella pneumoniae*. *Microb. Pathog.* 79, 61–69.

-H-

41. **Hartmann, A., Rothballer, M. (2017).** Role of Quorum Sensing Signals of Rhizobacteria for Plant Growth Promotion. In: Mehnaz S. (eds) Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation. Microorganisms for Sustainability, vol 2. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4862-3_10
42. **Hartmann, T. (2007).** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, Review. *Phytochemistry*. 68:2831-2846.
43. **Hasan F., Salah, A. A, Javed, S., et Hameed, A. (2010).** Enzymes used in detergents : Lipases. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(31), pp. 4836-4844.
44. **Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, MattilaSandholm T, Pol I, Smid EJ, et al. (1998).** Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem*. 46(9):3590-5.
45. **Hyun, K., Raymond, N., Allan, Robert, P., Howlin, P.S., and Hall-Stoodley, L. (2017).** Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *NATURE REVIEWS*.

-I-

46. **Irchhaiya R, Kumar A, yadav A, Gupta N, Kumar S, Gupta N, Kumar S, Yadav V, Prakash A and Gurjar H (2015).** Metabiles in plants and its classification. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(1):287-305.

-J-

47. **Jamal M, et al. (2017).** Bacterial biofilm and associated infections, *Journal of the Chinese Medical Association*. Volume 81(1). Pp 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>.

-K-

48. **Kalai, A., Malek, F., Bousmaha-Marroki, L. (2018).** Effect of *Thymus ciliatus* oil-based disinfectant solutions against biofilms formed by *Bacillus cereus* strains isolated from pasteurized-milk processing lines in Algeria. *South Asian J Exp Biol*; 8 (1): 1-12;
49. **Kaplan J.B., Rangunath C., Velliyagounder K., Fine D.H., Ramasubbu N. (2004).** Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 2633-2336.
50. **Kaplan, J.B. (2010).** Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*; 89:205–18.
51. **Khalfallah, A., Labed, A., Semra, Z., Al kaki, B., Kabouche, A., Touzani, R., Kabouche, Z. (2001).** Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil

- of Ammi visnaga L. (Apiaceae) from Constantine, Algeria. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. Vol. 1(3), pp 302-305.
52. **Khalilzadeh, P. (2009)**. Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Chapitre I – *Pseudomonas aeruginosa*: Biofilm et Quorum Sensing. Page 61. Université de Toulouse.
53. **Kim, H., Cha, E., Kim, Y. et al. (2016)**. Raffinose, a plant galactoside, inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation via binding to LecA and decreasing cellular cyclic diguanylate levels. *Sci Rep* **6**, 25318. <https://doi.org/10.1038/srep25318>
54. **Knowles, J., & Roller, S. (2001)**. Efficacy of Chitosan, Carvacrol, and a Hydrogen Peroxide-Based Biocide against Foodborne Microorganisms in Suspension and Adhered to Stainless Steel. *Journal of Food Protection*, 64(10), 1542–1548.
55. **Koh, C.-L., Sam, C.-K., Yin, W.-F., Tan, L., Krishnan, T., Chong, Y., et al. (2013)**. Plant-Derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors* **13**, 6217–6228. doi: 10.3390/s130506217
56. **Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., and Losick, R. (2010)**. D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* **328**, 627–629. doi: 10.1126/science.1188628.
- L-
57. **Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE. (2001)**. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*. 91(3):453-62.
58. **Lauderdale, K. J., Malone, C. L., Boles, B. R., Morcuende, J., and Horswill, A. R. (2010)**. Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. *J. Orthop. Res.* **28**, 55–61. doi: 10.1002/jor.20943
59. **Le Gentil C, Sylla Y, Faille C. (2010)**. Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *J. Food Eng.* **96**: 37-42
60. **Lebeaux, D.; Ghigo, J.-M.; Beloin, C. (2014)**. Biofilm-related infections: Bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2014**, **78**, 510–543.
61. **Lin, M.H., Shu, J.C., Huang, H.Y., Cheng, Y.C. (2012)**. Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* **7**(3): e34388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034388>

62. **Ling, N., Forsythe, S., Wu, Q., et al. (2020).** Insights into Cronobacter sakazakii Biofilm Formation and Control Strategies in the Food Industry, Engineering, Volume 6, Issue 4, Pages 393-405. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.02.007>
63. **Lister J.L., Horswill A.R. (2014).** Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Front. Cell. Infect. Microbiol., 4,178.

-M-

64. **Majumdar S; Basak B; Laskar S. (1987).** “Surface hydrocarbons from the leaves of some *Cessia spp*” J Indian Chem Soc 64.(4): 259-260.
65. **Malek, F. (2013)** .le biofilm en industrie laitière : caractérisation facteur de développement et élimination cas du biofilm de Bacillus cereus dans quelques laiteries de la région de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen.
66. **Malek, F. (2016).** Evaluation of a non-submerged cultivation assay combined to ESEM imaging for analysis of biofilm formed by dairyassociated sporeforming bacteria. African journal of microbiology research. 10: 1263-1273.
67. **Malek, F. (2018).** Control of spore forming bacteria biofilms in the dairy environment. Understanding microbial pathogens: current knowledge and educational ideas on antimicrobial research 127 (Enrique Torres-Hergueta and A. Méndez-Vilas, Eds.). Formatex Research Center S.L. Pages 127-133.
68. **Mitić, Z, S., Boris, J., Snežana, Č., Jovanović , Zorica, Z. Stojanović-Radića , Mihajilov-Krsteva, T., Nikola, M., Jovanovića , Biljana, M. Nikolićd , Petar, D. Marine , Bojan, K. Zlatkovića , Gordana, S., Stojanović.** (2019). Essential oils of Pinus halepensis and P. heldreichii: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity. Industrial Crops & Products 140 (2019) 111702.
69. **Musk D.J., Banko D.A., and Hergenrother P.J. (2005).** Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of Pseudomonas aeruginosa. Chemistry & Biology; Vol. 12: 789– 796.

-N-

70. **Nam, H., Seo, H. S., Bang, J., Kim, H., Beuchat, L. R., and Ryu, J. H. (2014).** Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating Bacillus cereus spores attached to and in a biofilm on stainless steel. Int. J. Food Microbiol. 188, 122–127. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.009
71. **Niranjan G; Gupta P. (1973).** Chemical constituents of the flowers of *Cessia occidentalis*. Planta Medica 23.(3): 298-300.

-O-

72. **Oosterhaven K, Poolman B, Smid EJ. (1995).** S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Ind Crops Prod.* 4(1):23-31.
73. **Otto, M. (2013).** Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*, 64, 175-188.

-P-

74. **Pelgrift RY, Friedman AJ.(2013).** Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev* 65(13–14):1803–15.
75. **Percival S.L., Malic S., Cruz H., Williams D.W. (2011).** Introduction aux biofilms. In Percival SL (éd), Knottenbelt D.C. (éd), Cochrane C.A. (éd): *Biofilms and veterinary medicine*, Springer, Heidelberg, 41-69.

-R-

76. **Raho, G.B., (2014).** Antibacterial potential of essential oils of the needles of *Pinus halepensis* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Coast Life Med.* 2 (8), 651–655.
77. **Rizzello L, Cingolani R, Pompa PP. (2013).** Nanotechnology tools for antibacterial materials. *Nanomedicine* 8(5):807–21.

-S-

78. **Sadou, N., Seridi, R., Djahoudi, A., & Hadeff, Y. (2015).** Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 30(1), 33-39.
79. **Sadou, N., Seridi, R., Djahoudi, A., et Hadeff, Y. (2015).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. *Synthèse : Revue des sciences et de la technologie*, 30(1), 33-39.
80. **Sakuragi Y, Kolter R (2007).** Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189:5383–6
81. **Shaw, L., Golenka, E., Potempa, J., and Foster, S. J. (2004).** The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 150, 217–228. doi: 10.1099/mic.0.26634-0
82. **Shi, C., Sun, Y., Liu, Z., Guo, D., Sun, H., Sun, Z., et al. (2017).** Inhibition of *Cronobacter sakazakii* virulence factors by citral. *Sci. Rep.* 7:43243. doi: 10.1038/srep43243

83. **Silva NCC, Fernandes Júnior A. (2010)**. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 16. (3). Pages 402-413
84. **Singh N, Patil A, Prabhune A, Goel G. (2016)**. Inhibition of quorum-sensing-mediated biofilm formation in *Cronobacter sakazakii* strains. *Microbiology* 162 (9):1708–14.
85. **Singh, S. K. (2018)**. Quorum Sensing and Biofilm Disassembly Process in *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Xanthomonas campestris*. In Pallaval Veera Bramhachari (Éd.), *Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence* (p. 287-294). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2429-1_19
86. **Soro, K.N., Sabri, L., Amalich, S., Khabbal, Y., Zaïr, T. (2015)**. Composition chimique d’*Ammi visnaga* L. (Lam.) marocaine et activité antibactérienne de son huile essentielle vis-à-vis de bactéries productrices et non productrices de beta-lactamases à spectre élargi. *Phytothérapie* (2015) 13:168-175.
87. **Soto, SM., Macro, F., Guiral, E. et Vila, J. (2011)**. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with urovirulence factors and antimicrobial resistance. In *Chemical Management of Complicated Urinary Treat Infection* ed. Nikibakhsh, A., pp. 159-170. Croatia: Intech.
88. **Speranza, B., Corbo, M R., Campaniello, D., Altieri, C., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A. (2020)**. Biofilm formation by potentially probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Microbiology* 87 (2020) 103393.
89. **Srey, S., Jahid, I. K., and Ha, S. (2013)**. Bio film formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 31, 572–585. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.12.001
90. **Steinberger RE, Holden PA (2005)** Extracellular DNA in single and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol* 71:5404–10
91. **Sutherland, B.W. (2001)**. The biofilm matrix, an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9:222–7 .

-T-

92. **Thibaut, S. (2014)**. Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multi-espèces : de l’adhésion au biofilm mature. Génie des procédés. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc. Français. ffNNT : 2014MON20174ff. fftel-01810953

93. **Thoroski J, Blank G, Biliaderis C. (1989).** Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *J Food Prot.* 52(6):399-403.
94. **Tirloni, E., Stella, S., Bernardi, C., Mazzantini, D., Celandroni, F and Ghelardi, E. (2020).** Identification and Pathogenic Potential of *Bacillus cereus* Strains Isolated from a Dairy Processing Plant Producing PDO Taleggio Cheese. *Microorganisms* 2020, 8, 949; doi:10.3390/microorganisms8060949.
95. **Torres, C. E., Lenon, G., Craperi, D., Wilting, R., and Blanco, A. (2011).** Enzymatic treatment for preventing biofilm formation in the paper industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 95–103. doi: 10.1007/s00253-011-3305-4

-U-

96. **Ultee A, Bennink MHJ, Moezelaar R. (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 68(4):1561-8.

-V-

97. **Van Oss, C.J., (1995).** Hydrophobicity of biosurfaces — Origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 5, 91–110.

-W-

98. **Wang, H., Sodagari, M., Chen, Y., He, X., Newby, B.M.Z., Ju, L.K., (2011).** Initial bacterial attachment in slow flowing systems: Effects of cell and substrate surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 87, 415–22.
99. **Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. (2002).** Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295:1487
100. **Wu, H.; Moser, C.; Wang, H.Z.; Høiby, N.; Song, Z.J.(2015).** Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral Sci.* 7, 1–7.

-Z-

101. **Zhang, J.; Rui, X.; Wang, L.; Guan, Y.; Sun, X.; Dong, M. (2014).** Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Food Control* 42, 125–131.
102. **Zielinska, A. K., Beenken, K. E., Mrak, L. N., Spencer, H. J., Post, G. R., Skinner, R. A., et al. (2012).** *sarA*-mediated repression of protease production plays a key role in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* USA300 isolates. *Mol. Microbiol.* 86, 1183–1196. doi: 10.1111/mmi.12048

103. **Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M. (2001).** The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39:1452–63