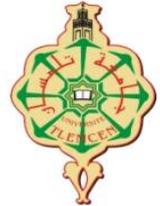




République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE de TLEMCEM

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

Département de Biologie

*Le Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire
au biomédical et à l'environnement (LAMAABE)*

MEMOIRE

Présenté par

M^{elle} BERRAHAL Rachida

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER en Biologie

Option : Microbiologie et contrôle de qualité

Thème

**Effet antimicrobien et antibiofilm de divers extraits végétaux
sur des bactéries de l'environnement**

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

Présidente	Dr. BENARIBA N.	Maitre de conférences classe A	Tlemcen
Encadreur	Dr. MALEK F.	Maitre de conférences classe A	Tlemcen
Examinatrice	Dr. Kholkhal-Brahimi W.	Maitre de conférences classe B	Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

المخلص: التأثير المضاد للميكروبات والمضاد للبيوفيلم للمستخلصات النباتية على البكتيريا البيئية

تهدف هذه الدراسة إلى تحسين مستوى النظافة في المختبرات التابعة لكليتنا من خلال تحليل التلوث الجرثومي لبيئة المختبر وكذلك دراسة سلوك البكتيريا المعزولة فيما يتعلق بالمستخلصات النباتية المختلفة. تم تعداد الاحياء الدقيقة الموجودة في الهواء بطريقة الترسيب السلبي ولاحظنا وجود تلوث متجانس نوعياً وكمياً في المختبرات التي تم تحليلها ومعاينتها. العينات التي تم أخذها من على سطح عمل المختبر سمحت لنا بملاحظة عدة أنواع من الجراثيم و بأن المختبر رقم 3 يعتبر الأكثر تلوثاً بعدد $10^3 \times 22.5$ و.م.م/ملل/سم². التنظيف والتعقيم للسطح ربما كان غير كافٍ أو لم يتم إجراؤه في المكان الذي تم أخذ العينة منه. أظهر عزل وتحديد السلالات البكتيرية تلوث بيئة المختبر ببكتيريا من أصل بيئي مثل *Bacillus cereus* وغيرها من أصل بشري مثل *Staphylococcus aureus* و *Enterobacteriaceae*. أظهرت العديد من الدراسات أن المستخلصات النباتية فعالة جداً كمضادات للميكروبات وللبيوفيلم تجاه العديد من الكائنات الحية الدقيقة. يعتمد هذا النشاط على السلالة البكتيرية والعضو النباتي وحالة نضوجه وطبيعة الاستخراج. تمت دراسة مستخلصات النباتات العطرية كمضادات طبيعية ضد البيوفيلم. وقد لوحظت نتائج واعدة في نظافة الأسطح الصناعية الزراعية.

الكلمات المفتاحية: نظافة الأسطح، المستخلصات النباتية، مضادات الميكروبات، مضادات البيوفيلم، استراتيجيات المحاربة

Résumé : Effet antimicrobien et antibiofilm de divers extraits végétaux sur des bactéries de l'environnement.

Le travail que nous avons entrepris avait pour but d'améliorer l'hygiène de laboratoire de notre faculté en analysant la contamination microbienne de l'environnement des laboratoires de pôle de microbiologie et l'étude du comportement des bactéries isolées à l'égard de différents extraits végétaux de *Berberis vulgaris* et *Citrullus colocynthis*.

Le dénombrement de la microflore totale de l'air a été effectué par méthode passive de décantation, et une contamination homogène qualitativement et quantitativement a été observée dans les laboratoires analysés. Le prélèvement de la surface des paillasse par écouvillonnage a permis de constater que la flore est riche et que le laboratoire N° 03 présente une contamination plus importante avec 22.5×10^3 UFC/mL/cm². Le nettoyage et la désinfection de la surface sont insuffisants ou non réalisés à l'endroit où ce prélèvement a été fait.

L'isolement et l'identification des souches bactériennes ont montré une contamination de l'environnement des laboratoires par des bactéries d'origine environnementale telles que *Bacillus cereus* et d'autres d'origine humaine tel que des entérobactéries et des *Staphylococcus aureus*.

De nombreuses études ont montré que les extraits végétaux présentent un pouvoir antimicrobien et antibiofilm très important vis-à-vis de multiples micro-organismes. Cette activité dépendait de la souche bactérienne, de l'organe végétal, de son état de maturation et de la nature de l'extraction.

Les extraits de plantes aromatiques sont actuellement étudiés en tant qu'agents naturels pour lutter contre les biofilms bactériens. Des effets prometteurs ont été observés dans l'hygiène des surfaces agro-industrielles.

Mots clés : hygiène des surfaces, extraits végétaux, antimicrobien, antibiofilm, stratégies de lutte.

Abstract: Antimicrobial and antibiofilm effect of various plant extracts on environmental bacteria.

This study aims to improve the laboratory hygiene of our faculty by analyzing the microbial contamination of the laboratories environment and studying the behavior of bacteria isolated against plants extracts of *Berberis vulgaris* and *Citrullus colocynthis*.

The count of the total air microflora was made by passive settling method we observed a qualitatively and quantitatively homogeneous contamination in the laboratories analyzed. The sampling of the surface of the benches by swabbing showed that the flora is rich and that laboratory N° 03 has higher contamination with 22.5×10^3 UFC/mL/cm². The cleaning and disinfection of the surface are insufficient or not carried out at the place where the sample was taken.

The isolation and identification of bacterial strains indicated that the laboratory environment was contaminated with bacteria of environmental origin such as *Bacillus cereus* and others of human origin such as *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus aureus*.

Many studies have shown that plant extracts have a very important antimicrobial and antibiofilm activity against multiple microorganisms. This activity depended on the bacterial strain, the plant organ, their state of maturation, and the nature of the extraction.

Extracts from aromatic plants are being investigated as natural agents against bacterial biofilms. Promising effects have been observed in agro-industrial surface hygiene.

Key words: surface hygiene, plant extracts, antimicrobial, antibiofilm, control strategies

Dédicaces

Grâce à Dieu j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à

Mes parents, les êtres les plus chers au monde pour l'amour qu'ils m'ont porté, pour leurs sacrifices, leurs encouragements et leur soutien moral tout au long de mes études, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments d'amour et de reconnaissances. Que Dieu leur préserve longue vie et bonne santé.

*Mes sœurs **RABIAÀ** et **FATIMA - ZOHRA***

*Mon frère **YOUCEF***

*La joie de notre maison **YAHIA ZAKARIA***

Toute ma famille, spécialement mon grand père et mes tantes que je remercie profondément.

Enfin, à toutes mes amis les plus fidèle, ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant et le miséricordieux de m'avoir donné la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

J'exprime mes profondes gratitude à Mme. MALEK F. maître de conférences de classe A au département de biologie, université de Tlemcen d'avoir accepté de diriger ce travail. Je la remercie profondément pour sa constante disponibilité, ses pertinents conseils et son sens aigu de responsabilité. Son soutien et son encouragement jusqu'au bout de ce mémoire m'ont permis de finaliser cette expérience et de me préparer à mon future carrière d'étude. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon respect.

Je tiens à remercier très vivement Melle. BENARIBA N. maître de conférences de classe A au département de biologie de l'université de Tlemcen pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury.

Mes chaleureux remerciements s'adressent également à Mme. Kholkhal-Brahimi W. maître de conférences de classe B au département de biologie d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je tiens à témoigner mes sincères remerciements et gratitude à tous les membres des laboratoires du pôle de microbiologie qui m'ont facilité le travail au laboratoire et m'ont trop aidé pour la réalisation de ce modeste travail spécialement Mr. Yazid Amine ingénieur de laboratoire de microbiologie au département de Biologie de l'Université de Tlemcen

Enfin, mes remerciements vont également à mon collègue BENHAMOU Djamel Eddine et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Table des matières

Introduction.....	1
1. Généralités sur le biofilm	3
1.1. Définition	3
1.2. Composition	3
1.3. Les étapes de formation du biofilm	4
1.3.1. La fixation initiale ou adhésion réversible	4
1.3.2. Fixation irréversible	5
1.3.3. Formation de microcolonies	6
1.3.4. Maturation	6
1.3.5. Dispersion et détachement	7
1.4. Le quorum sensing et sa relation aux biofilms	9
1.4.1. Définition	9
1.4.2. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif.....	10
1.4.3. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram positif.....	11
1.5. Résistance des biofilms aux agents antimicrobiens	11
1.6. Stratégies de lutte contre le biofilm	12
1.6.1. Traitement curatifs des biofilms	12
1.6.1.1. Nettoyage et désinfection	13
1.6.1.2. Détergents enzymatiques	13
1.6.1.3. Approches physiques	14
1.6.2. Les approches préventives de la formation du biofilm	14
1.6.2.1. Caractéristiques hygiénique des matériaux	14
1.6.2.3. Les biofilms positifs.....	15
1.6.3. Autres approches	16
1.6.3.1. Bactériophage	16
1.6.3.2. Bactériocines	16
1.6.3.3. Inhibiteurs du Quorum Sensing.....	16
2. Hygiène des surfaces.....	18
2.6. Nettoyage et désinfection des surfaces hospitalières	19

2.7.	Nettoyage des équipements en industries agro-alimentaires.....	20
2.8.	La désinfection des surfaces en laboratoire de biologie	22
3.	Agents antimicrobiens d'origine végétale.....	22
3.6.	Principaux groupes de composés antimicrobiens d'origine végétale.....	22
3.6.3.	Les composés phénoliques	23
3.6.4.	Les terpénoïdes et les huiles essentielles	24
3.6.5.	Les alcaloïdes	25
3.6.6.	Autres antimicrobiens d'origine végétale.....	25
3.7.	Mode d'action des agents antimicrobiens d'origine végétale	26
3.7.3.	Activité antibactérienne	26
3.7.4.	Activité antifongique	27
3.7.5.	Activité antivirale	27
3.8.	Effet antibiofilm des biocides naturels.....	28
	Matériels et méthodes.....	29
1.	Isolement et dénombrement de la flore de contamination de l'environnement des laboratoires.....	29
1.1.	Prélèvement de l'air ambiant.....	29
1.2.	Prélèvement de la surface des paillasses.....	30
1.2.1.	Echantillonnage par écouvillonnage	30
1.2.2.	Isolement sur milieu solide par ensemencement en surface	30
1.2.3.	Isolement sur milieu solide par ensemencement en profondeur	31
1.3.	Dénombrement des bactéries.....	32
1.4.	Purification et conservation des souches.....	32
2.	Identification des souches purifiées.....	32
2.1.	Caractères cultureux.....	33
2.2.	Caractères morphologiques	33
2.2.1.	Coloration de GRAM.....	33
2.2.2.	Observation de la spore.....	34
2.3.	Caractères biochimiques	34
2.3.1.	Recherche de la catalase.....	34
2.3.2.	Recherche de l'oxydase.....	34
2.3.3.	Galeries d'identification (Système API) Galerie API 20E	35
2.3.4.	Identification au genre <i>Staphylococcus</i>	35
2.3.5.	Identification au groupe <i>Bacillus cereus</i>	36

Table des matières

2.3.5.1.	Croissance sur milieu Mossel complet	36
2.3.5.2.	Croissance sur gélose au sang	36
3.	Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits végétaux	37
3.1.	Préparation des solutions des extraits	37
3.2.	Stérilisation et conservation des solutions	37
3.3.	Préparation des suspensions bactériennes de l'inoculum	37
3.4.	La méthode de diffusion des disques	37
3.5.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI des extraits.....	38
3.6.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice du biofilm CMIB.....	39
3.7.	Détermination de la concentration minimale éradicatrice du biofilm (CMEB).....	40
Résultats et discussion		41
1.	Résultats de l'isolement et du dénombrement de la flore de contamination de l'environnement des laboratoires	41
1.1.	Evaluation de la contamination de l'air	41
1.2.	Dénombrement des contaminants de la surface des paillasse.....	42
2.	Résultats de l'identification des isolats.....	44
2.1.	Résultats de l'identification macroscopique	45
2.2.	Résultats de l'identification microscopique	45
2.3.	Résultats de l'identification biochimique.....	47
2.3.1.	Résultats de l'identification des Staphylocoques	47
2.3.2.	Résultats de l'identification du genre <i>Bacillus</i>	49
2.3.3.	Résultats de l'identification des bactéries à Gram négatif.....	51
3.	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits végétaux.....	52
3.1.	L'activité antimicrobienne des extraits par la méthode de diffusion des disques ..	52
3.2.	La concentration minimale inhibitrice (CMI)	52
3.3.	La concentration minimale inhibitrice de la formation du biofilm (CMIB)	53
Conclusion.....		57
• Bhunia A.K. (2018). <i>Staphylococcus aureus</i> . in Foodborne Microbial Pathogens : Mechanisms and Pathogenesis (New York, NY Springer). Pp.181-192		59
• Denis F., Bingen E., Martin C. Ploy M-C, et Quentin R.(2011). Bactériologie médicale : Techniques usuelles. 2 ^{ème} Edition. Elsevier Masson. Les Molineaux Cedex.		64
Références bibliographiques.....		58
Annexe		84

Liste des abréviations

% :	Pourcentage
°C :	Degré Celsius
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
CLSI :	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI:	Concentration Minimale Inhibitrice
CMIB :	La concentration minimale inhibitrice de la formation du biofilm
CMEB :	La concentration minimale éradicatrice du biofilm
CV :	Cristal violet
DMSO :	Diméthyl Sulfoxyde
Do :	Densité Optique
EPS :	substances exopolymère
h :	heure
HE :	Huile essentielle
H₂O :	monoxyde de dihydrogène
H₂O₂:	Peroxyde d'hydrogène
ISO :	Organisation internationale de normalisation
LPS :	Lipopolysaccharides
NaCl :	Chlorure de sodium
O₂ :	Oxygène moléculaire
pH :	potentiel hydrogène
QS :	Quorum-Sensing
TSA :	Trypticase Soja Agar
TSB:	Trypticase Soja Broth
UFC :	Unité Formant Colonie
µl :	microlitre

Liste des figures

Figure 01 : Les étapes du processus de formation d'un biofilm bactérien.....	4
Figure 02 : Représentations schématiques de la dispersion passive et active du biofilm.....	7
Figure 03 : Mécanisme de Quorum Sensing chez les microorganismes	9
Figure 04 : Structure du 3-oxo-C12-HSL et C4-HSL.....	10
Figure 05 : Images électroniques montrant (de gauche à droite) des spores de <i>B. cereus</i> adhérentes à des surfaces en inox altérées, et un biofilm réfugié dans une crevasse.....	14
Figure 06 : Contrôle du biofilm par des enzymes, des phages et des bactériocines.....	16
Figure 07 : Schéma simplifié d'une procédure CIP conventionnelle en cinq étapes et d'une stratégie CIP améliorée en trois étapes.....	20
Figure 08 : principaux terpénoïdes antimicrobiens.....	23
Figure 09 : Principaux alcaloïdes antimicrobiens.....	24
Figure 10 : Schéma du protocole de préparation de dilutions et d'ensemencements.....	30
Figure 11 : Photos représentant la flore de contamination de l'air ambiant des laboratoires analysés.....	40
Figure 12 : Photos représentant la flore de contamination de la surface des paillasses du laboratoire N°03.....	42
Figure 13 : Photos représentant la flore de contamination de la surface des paillasses du laboratoire N°02.....	42
Figure 14 : Observation microscopique des isolats après coloration de Gram.....	45
Figure 15 : observation microscopique des spores après coloration à la fuchsine.....	46
Figure 16 : Test de catalase positive.....	47
Figure 17 : Colonies de <i>Staphylococcus</i> sur milieu Chapman.....	47
Figure 18 : Aspect des colonies sur milieu Mossel après 24h d'incubation à 30°C.....	49
Figure 19 : Aspect des colonies sur milieu gélose au sang après 24h d'incubation à 30°C	49
Figure 19 : Résultat de la croissance des colonies sur milieu Mac Conkey	50

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les sites de prélèvement à partir de l'air ambiant des laboratoires.....	28
Tableau 2 : Les sites de prélèvement à partir de la surface des paillasses.....	29
Tableau 3 : Description des caractères cultureux des isolats	44

INTRODUCTION

Introduction

Les milieux de l'environnement (air, surfaces, eau) présentent une contamination microbiologique permanente mais variable dans le temps et dans l'espace. Les micro-organismes présents sont des saprophytes de l'environnement mais aussi des commensaux ou des pathogènes d'origine humaine. Vecteurs de la contamination, les milieux de l'environnement disséminent les micro-organismes et contribuent insidieusement à la contamination progressive des divers supports inertes de l'environnement. Certains de ces micro-organismes sont à l'origine de l'altération des produits dans diverses industries et d'infections associées aux soins chez les patients vulnérables dans les établissements de santé, ces micro-organismes qui sont présents dans l'environnement représentent un facteur de risque invisible mais dangereux (Albertini et al., 2020; Squinazi, 2017).

Certains micro-organismes peuvent se développer sous deux formes: une forme libre ou planctonique, et une forme sessile ou attachée en biofilm qui constitue le mode de vie privilégié des bactéries dans la nature, alors que la phase planctonique ne serait qu'un passage permettant la dissémination vers de nouvelles surfaces. Les transitions entre ces modes de vie mettent en jeu des processus dynamiques et complexes (Roux et Ghigo, 2006 ; Le Gallou et Lepelletier, 2017). Un biofilm peut être défini comme une communauté microbienne caractérisée par son adhésion à une surface solide et par la production d'une matrice de polymère extracellulaire dans laquelle les micro-organismes associés sont incorporés (Alvarez-Ordóñez et al., 2019).

Les biofilms rendent les bactéries plus résistantes aux désinfectants et aux différents agents antimicrobiens. Ils sont considérés comme un gros problème d'hygiène dans l'environnement, dans l'industrie alimentaire et restent une menace mondiale pour la santé en raison de sa grande résistance aux traitements, à la réponse immunitaire de l'hôte et de sa capacité à aggraver les infections nosocomiales. La recherche de nouvelles molécules efficaces pour s'attaquer à ce problème est donc une priorité (Jamal et al., 2018; Famuyide et al., 2019).

Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme une des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives (Koudokpon et al., 2017). Les plantes médicinales, notamment celles utilisées de façon traditionnelle, constituent une source potentielle de ce

type de composés. Ils ont montré un large éventail d'activités pharmacologiques, y compris des effets antimicrobiens (**Bouharb et al., 2014; Aljabry et al., 2019**).

L'objectif de ce travail est d'améliorer l'hygiène de laboratoire de notre faculté en analysant la contamination microbienne de l'environnement des laboratoires de pôle de microbiologie et de tester le pouvoir antimicrobien et antibiofilm des extraits de deux plantes médicinales : *Berberis vulgaris* et *Citrullus colocynthis*. Dans ce but on a adopté le plan expérimental suivant :

- Isolement et dénombrement de la flore de contamination des laboratoires du pôle de microbiologie.
- Identification des isolats
- Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des disques
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la formation du biofilm (CMIB)
- Détermination de la concentration minimale d'éradication du biofilm (CMEB).

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur le biofilm

1.1. Définition

Le terme biofilm a été proposé pour la première fois par John William Costerton (1978), qui l'avait défini comme étant des populations de microorganismes adhérentes entre elles à des surfaces biotiques comme les (cellules de la muqueuse) ou abiotiques telles que planchers ou équipements industriels, formant des structures complexes. Au sein du biofilm les cellules sont encapsulées dans une matrice adhésive et protectrice de substances exopolymères autoproduites (EPS) (**Hurlow et al., 2015**).

Les biofilms dans la nature et, en fait, dans l'industrie alimentaire sont généralement constitués de plusieurs espèces bactériennes, par opposition aux biofilms mono-espèce habituellement cultivés dans le cadre d'études en laboratoire (**Yang et al., 2011**). La vie dans un biofilm multi-espèces est avantageuse, car elle offre un meilleur abri et une plus grande résistance aux antimicrobiens que les biofilms d'une seule espèce correspondants (**Burmølle et al., 2006**).

1.2. Composition

Dans la plupart des biofilms, les microorganismes représentent moins de 10 % de la masse sèche, alors que la matrice peut représenter plus de 90% (**Flemming et Wingender, 2010**). La matrice du biofilm est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97 % d'eau. Elle est principalement constituée de polysaccharides, mais d'autres biomolécules comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques sont également présentes dans la matrice (**Cortes et al. 2011**). Les polymères comme les glycopeptides, les lipides et les lipopolysaccharides forment un réseau et maintiennent le biofilm ensemble (**Flemming et Wingender, 2010**). Sa composition varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance.

Au sein du biofilm les microcolonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part, d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm, et, d'autre part, d'évacuer les déchets (**Filloux et Vallet, 2003**).

Plusieurs fonctions de l'EPS ont été déterminées, démontrant un large éventail d'avantages pour le mode de vie du biofilm. Les molécules d'EPS interviennent dans la formation de l'architecture du biofilm, qui est un processus continu et dynamique produisant une organisation spatiale dans laquelle les cellules du biofilm se regroupent en microcolonies (Neu et Lawrence, 2014). Elles permettant de s'ancrer (se fixer) aux surfaces biotiques et abiotiques (Characklis et Marshall, 1990), de concentrer les nutriments du milieu environnant au sein du biofilm facilitant le piégeage des nutriments, de limiter l'accès des agents antimicrobiens (contribuant à la résistance) et de prévenir la dessiccation du biofilm (Carpentier et Cerf, 1993).

1.3. Les étapes de formation du biofilm

Le biofilm microbien se développe en cinq étapes consécutives (Figure 01) : la fixation initiale ou adhésion réversible, la fixation ou adhésion irréversible, adhésion de cellule à cellule ; formation de microcolonies, la maturation et la dispersion (Sauer et al. 2002 ; Stoodley et al. 2002).

Certaines bactéries commencent la formation d'un biofilm sans fixation à une surface par l'agrégation de cellules planctoniques. La fixation ultérieure de ces agrégats préformés sur une surface solide entraîne la formation d'un véritable biofilm (Melaugh et al., 2016).

La réussite de la fixation sur des surfaces solides est conditionnée par une série de facteurs concernant à la fois la cellule bactérienne et la surface (Chmielewski et Frank, 2003; Persat et al., 2015).

1.3.1. La fixation initiale ou adhésion réversible

Avant que les bactéries ne viennent au contact du support, un mélange complexe, composé de protéines, de glycoprotéines et de nutriments organiques, forme un film chimique, dit « de conditionnement », sur la surface. Ce film, riche en nutriments, va favoriser l'adhésion et la croissance bactérienne (Squinazi, 2017).

Dans un premier temps, les cellules microbiennes planctoniques adhèrent à la surface soit par des forces physiques comprenant les forces de Van der Waals, forces électrostatiques, interactions hydrophobes (Garrett et al., 2008), soit par des appendices bactériens tels que les Pili ou les flagelles (Maric et Vranes 2007) et les curli (Cookson et

al., 2002). Les appendices de la bactérie permettent à la cellule de surmonter les forces répulsives associées à la surface cellulaire.

Lors de la fixation réversible, les bactéries présentent encore un mouvement brownien et sont facilement déplacées par l'application d'une force de cisaillement légère (**Gupta et al.**, 2015)

L'adhésion à un substrat peut être active ou passive selon la motilité des cellules. L'attachement passif est déterminé par la gravité (par sédimentation), la diffusion et la dynamique des fluides. En adhérence active, la surface de la cellule bactérienne facilite la fixation initiale. Les propriétés de la surface cellulaire telles que les flagelles, les pili, les protéines telles que les adhésines, les capsules et la charge de surface influencent l'attachement (**Kumar et Anand**, 1998).

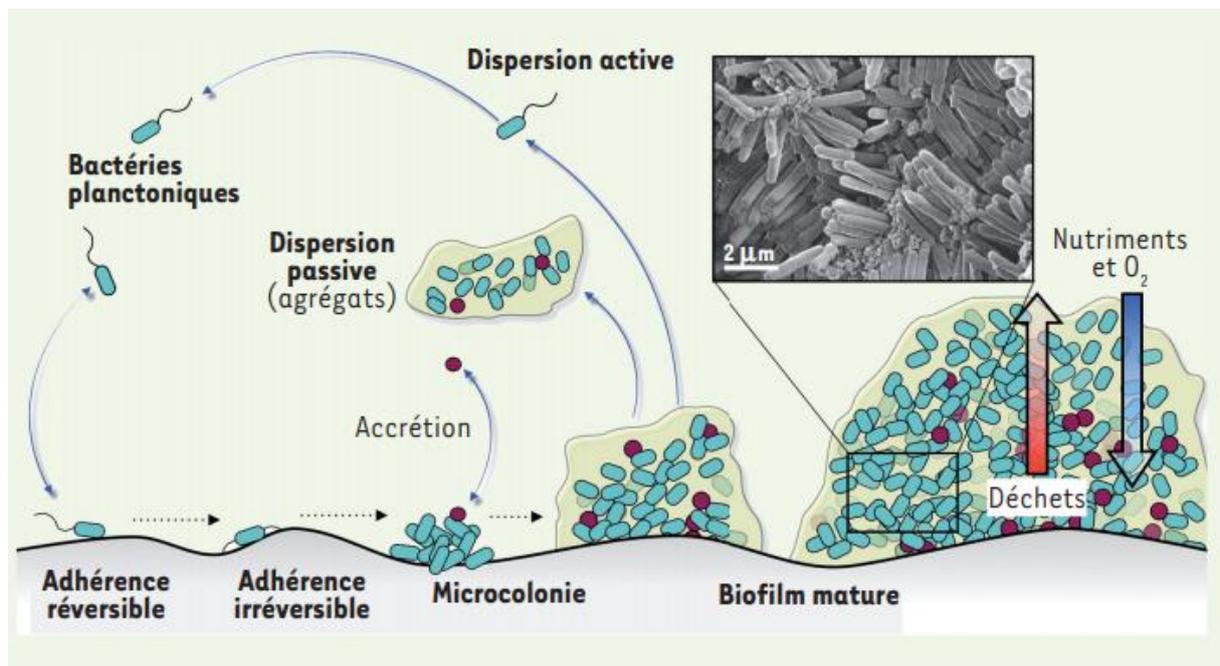


Figure 01 : Les étapes du processus de formation d'un biofilm bactérien (**Lebeaux et Ghigo**, 2012).

1.3.2. Fixation irréversible

L'adhésion irréversible intervient lorsque la barrière énergétique est franchie. Une fixation forte entre le microorganisme et le support est alors possible.

Le franchissement de la barrière énergétique et l'installation d'une adhésion irréversible se fait au moyen de deux mécanismes principaux. On observe 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. 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. Ainsi les microorganismes sont capables de se fixer de manière ferme et durable sur le support **(Characklis et Marshall, 1990)**.

1.3.3. Formation de microcolonies

Après l'attachement, les bactéries se multiplient en formant des agrégats cellulaires appelés microcolonies. Dans des conditions environnementales favorables, les microcolonies forment des structures dynamiques bidimensionnelles à mesure que le nombre de cellules augmente, ce qui constitue la première étape vers l'organisation structurelle sur la surface choisie **(Pilchová et al., 2014)**.

Au cours de cette phase, les cellules microbiennes commencent à communiquer entre elles par la production de signaux auto-inducteurs qui vont entraîner l'expression des gènes spécifiques au biofilm **(Davies et al., 1998 ; Vasudevan, 2014)**. Dans cette phase, le microorganisme sécrète une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) pour stabiliser le réseau du biofilm **(Rasamiravaka et al., 2015)**.

1.3.4. Maturation

Les microcolonies dans le biofilm sont souvent constituées de communautés microbiennes diverses. Ces micro-consortiums multi-espèces fonctionnent de manière relativement complexe et coordonnée. Leur étroite proximité favorise l'échange de substrats, la distribution des produits métaboliques et l'élimination des produits finaux toxiques **(Davey et O'toole, 2000)**.

La maturation, entraîne la génération d'une architecture tridimensionnelles complexe, multicouche sous forme de champignon (mushroom-like), et contenant des canaux aqueux, qui permettent l'acheminement d'oxygène et de nutriments dans les parties enfouies du biofilm, ainsi que l'évacuation des déchets **(Stoodley et al., 2002)**. Au cours de cette étape de maturation, le biofilm s'adapte aux conditions extérieures en modifiant sa structure, sa physiologie et son métabolisme **(Gupta et al., 2015)**.

Contrairement aux cultures classiques réalisées en milieux liquides agités, le biofilm n'est pas un environnement homogène car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments, qui présentent des valeurs de pH différentes. Les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (**Costerton et al., 1994**).

1.3.5. Dispersion et détachement

La dernière étape du cycle de vie d'un biofilm implique le retour d'un certain nombre de cellules adhérentes dans le milieu environnant où elles peuvent s'adsorber sur des surfaces et former des biofilms dans des nouvelles niches environnementales. Cette étape est importante pour la propagation et l'auto-renouvellement de la communauté (**Hall-Stoodley et al., 2004 ; Renner et Weibel, 2011**).

Le détachement des cellules peut être initié par différents facteurs : des perturbations mécaniques (exp. force de cisaillement, abrasion), la dégradation enzymatique de la matrice polymérique, la dégradation enzymatique du substrat sur lequel le biofilm est attaché, l'induction de la motilité, la production d'agents tensioactifs et le relâchement de la matrice extracellulaire (**Tremblay et al., 2014**).

Le détachement d'un biofilm peut s'effectuer selon deux modes : passif et actif (**Figure 02**). Dans le cas d'un détachement actif, les cellules reviennent à leur état planctonique et quittent le biofilm en réponse à des signaux cellulaires régulés par le quorum sensing (QS) (ce qui les encourage à rechercher un site d'attache supplémentaire lorsque les conditions sont favorables). Le détachement passif est induit par une force externe, comme les forces de cisaillement, qui provoque la destruction totale ou partielle du biofilm. (**Hall-Stoodley et al., 2004 ; Kaplan, 2010**).

Le détachement de biofilm a été divisé en trois processus : érosion, abrasion et sloughing :

- L'érosion : se réfère au détachement continu de cellules individuelles ou de petits groupes de cellules de la surface du biofilm et c'est le résultat des forces de cisaillement exercées par le fluide en contact avec la surface du biofilm.
- Sloughing : Correspond à la perte instantanée des grandes parties du biofilm et c'est un processus discret apparemment aléatoire.

- L'abrasion est causée par des collisions de particules solides avec le biofilm (Nicoletta et al., 1997).

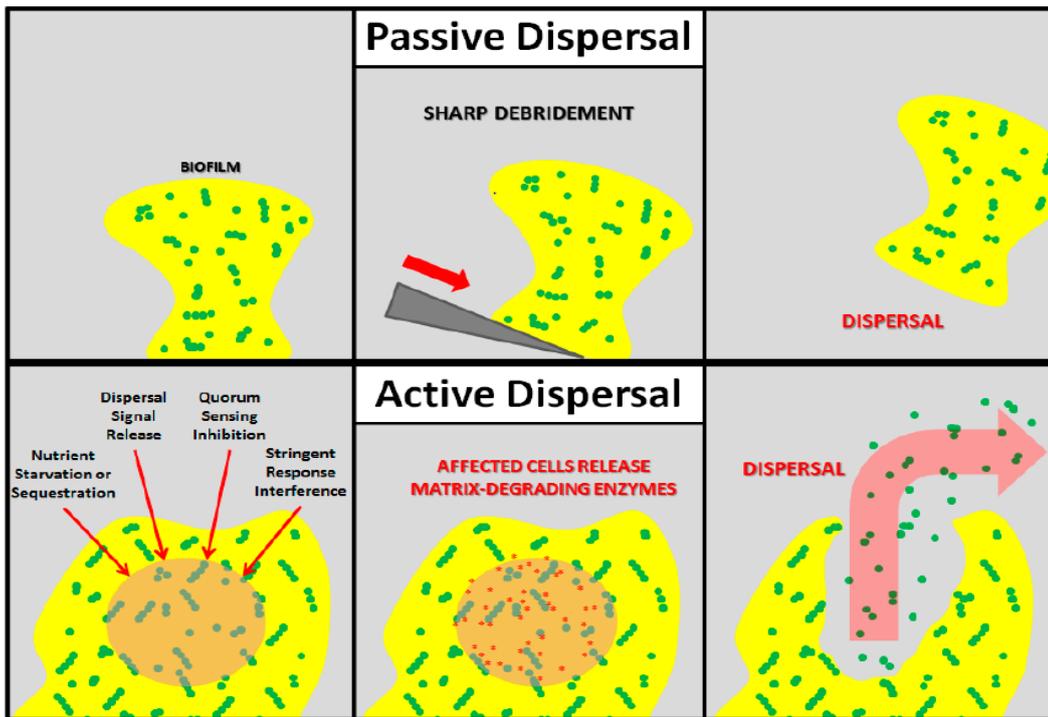


Figure 02: Représentations schématiques de la dispersion passive et active du biofilm (Fleming et Rumbaugh, 2017).

En dispersion passive, une force externe (force de cisaillement, débridement brutal) provoque la destruction complète ou partielle du biofilm. En dispersion active, les microorganismes du biofilm répondent à un stimulant antibiofilm (la carence nutritionnelle, libération du signal de dispersion, inhibition du QS) en dégradant activement la matrice, libérant ainsi des cellules planctoniques.

La dispersion du biofilm a une signification cruciale en ce qui concerne la contamination croisée et la transmission des maladies (Malek et al., 2013).

❖ Dispersion et contamination croisée

La contamination croisée désigne le transfert des bactéries détachées du biofilm à l'aliment transformé, et constitue la principale source de contamination du produit fini et affecte ainsi sa qualité hygiénique et sanitaire. Ceci constitue un gros problème économique et sanitaire dans les industries agro-alimentaire (Malek, 2019).

De même, l'importance du détachement du biofilm pour l'infection réside dans la dissémination de l'infection de la surface d'un dispositif médical vers d'autres sites *via* la lymphe et la circulation sanguine. Les bactéries du biofilm détaché peuvent établir des

infections secondaires éventuellement avec une intensité accrue, comme par exemple l'endocardite. De plus, les bactéries détachées peuvent provoquer des infections aiguës telles que la septicémie (Otto, 2013).

1.4. Le quorum sensing et sa relation aux biofilms

Il est bien connu que les bactéries réagissent à de multiples signaux environnementaux tels que la concentration d'éléments nutritifs ainsi qu'à la densité de cellules bactériennes, phénomène mieux connu sous le nom de quorum sensing (QS), et que ceci aura une influence sur les différentes étapes de la formation du biofilm (Tremblay et al., 2014).

1.4.1. Définition

Le QS est un mécanisme par lequel les bactéries peuvent coordonner l'expression des gènes et coopérer entre elles (Waters et Bassler 2005). Dans ce système, les bactéries peuvent évaluer leur densité de population *via* la synthèse et la diffusion de molécules « signal », appelées auto-inducteurs (AI). Ces molécules peuvent diffuser à travers la membrane bactérienne ou être transportés à l'extérieur de la cellule (Mion et al., 2019). Lorsque leur concentration atteint un certain seuil (Figure 03), les auto-inducteurs se lient à leur protéine régulatrice apparentée (R). La formation des complexes (AI/R- protéine) induit la transcription de gène cible (de Kievit et Iglewski, 2003). Les phénotypes régulés par le QS comprennent la production d'exopolysaccharides nécessaires à l'adhésion et à la formation de biofilms, la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires et la production de composés antibiotiques. Ces phénotypes contribuent à la colonisation, à l'acquisition de nutriments et à la défense collective (Badri et al. 2009 ; Jefferson, 2004 ; Mion et al., 2019).

Les molécules « signal » du QS diffèrent suivant que les bactéries soient de type Gram négatif ou de type Gram positif. Les bactéries à Gram négatif synthétisent ces auto-inducteurs à partir d'un précurseur cytoplasmique appelé N-acylhomosérine lactone (AHL), alors que les bactéries à Gram positif produisent, quant à elles, des auto-inducteurs de nature peptidique (AIPs), la structure chimique des AIPs est très variée et comprend plusieurs types, tels que les petits oligopeptides et les peptides cycliques de lactone/thiolactone (Singh et al., 2016; Bouyahya et al., 2017). Un troisième système appelé autoinducteur 2 (AI-2) a été proposé comme étant un système de signalisation commun à toutes les bactéries (Seghir et al., 2017).

Les gènes impliqués dans la voie de la signalisation du QS ont été identifiés chez de nombreuses bactéries responsables d'infections opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Hmelo, 2017).

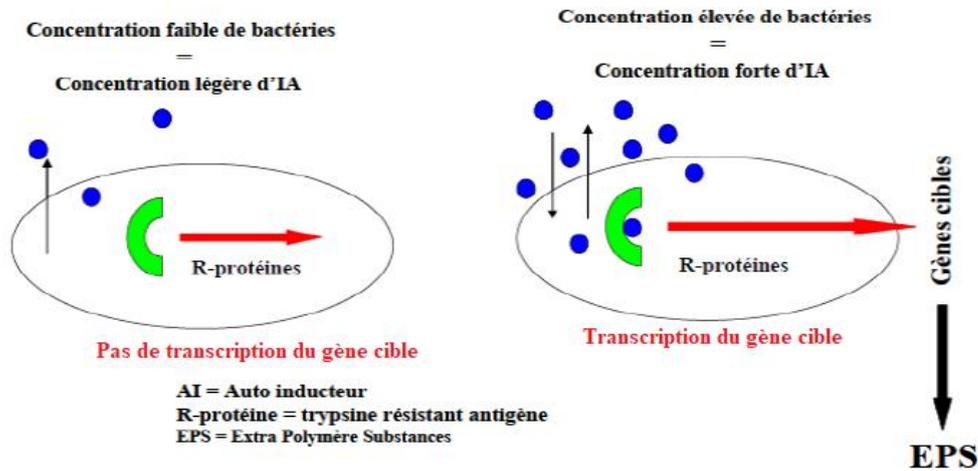


Figure 03 : Mécanisme de Quorum Sensing chez les microorganismes (de Kievit et Iglewski, 2003).

1.4.2. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif

Deux systèmes de détection du quorum de *P. aeruginosa* ont été caractérisés. Le système *las*, premier système à avoir été décrit il est nommé ainsi car il régule en particulier l'expression de l'élastase LasB (Gambello et Iglewski, 1991). Il comprend le gène *lasR*, codant pour la protéine régulatrice LasR, et le gène *lasI*, codant pour une enzyme auto-inducteur synthase LasI. Cette enzyme est nécessaire à la synthèse d'un type d'AHL : la *N*-(3-oxododécanoyl)-L-homosérine (3-oxo-C12-HSL). Lorsque la concentration en 3-oxo-C12-HSL atteint un seuil critique, une molécule d'AHL se lie à deux protéines LasR, pour constituer un complexe (LasR-AHL) activateur de la transcription de plusieurs gènes.

Le deuxième système de QS découvert chez *P. aeruginosa*, est nommé *rhl* car il régule la production de rhamnolipides. Il comprend le gène *rhlR*, codant pour la protéine régulatrice RhlR et le gène *rhlI*, codant pour une enzyme auto-inducteur synthase, RhlI nécessaire à la synthèse d'un second type d'AHL : la *N*-butyryl-L-homosérine lactone (C4-HSL) (Le Berre et al., 2006).

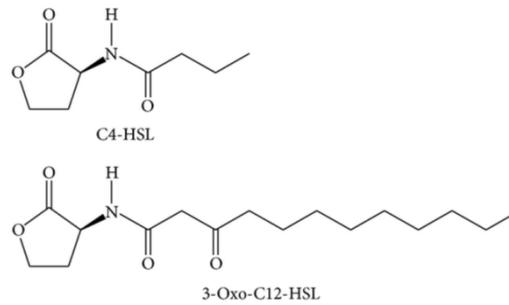


Figure 04 : Structure du 3-oxo-C12-HSL et C4-HSL (Rasamiravaka et al., 2015).

1.4.3. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram positif

Chez *S. aureus*, le système du quorum sensing est appelé *agr* (accessory gene regulator). Le système *agr* est constitué de deux unités de transcription divergentes, l'ARNII et l'ARNIII, dont la transcription est pilotée par les promoteurs P2 et P3, respectivement. Le locus ARNII contient quatre gènes, *agrB*, *agrD*, *agrC* et *agrA* codant les quatre protéines du système *agr* lui-même, responsable d'un rétrocontrôle positif (Le et Otto, 2015).

Le système *agr* utilise une phéromone peptidique (peptide autoinducteur, AIP) secrétés sous la forme de thiolactones cycliques dans le milieu extracellulaire. Lorsque le seuil d'une certaine densité bactérienne est atteint, l'AIP se lie à une histidine kinase membranaire, nommée AgrC. L'AgrC active à son tour une protéine régulatrice, l'AgrA. C'est ce qu'on appelle un système à deux composants. L'AgrA en se liant aux deux promoteurs, active la transcription de l'opéron *Agr* lui-même (auto-feedback) et celle de l'ARNIII, l'effecteur intracellulaire du système. L'expression de l'ARNIII se traduit par l'activation des facteurs de virulence, comme les protéases, les toxines et les lipases (Novick et Geisinger, 2008; Otto, 2013).

1.5. Résistance des biofilms aux agents antimicrobiens

Les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que ces mêmes bactéries sous forme planctonique. En fait, les bactéries d'un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens (Ceri et al., 2010).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la plus grande résistance des biofilms aux agents antimicrobiens (**Anderson et O'Toole , 2008**).

- la matrice polymérique qui agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens soit en les ralentissant physiquement soit en réagissant chimiquement avec eux (**Walters et al., 2003**).
- Le métabolisme des bactéries d'un biofilm joue également un rôle très important. En raison de la faible concentration de certains nutriments et le gradient en oxygène, certaines cellules du biofilm seront peu actives métaboliquement et pourront même être sous forme dormante ce qui réduit leur sensibilité aux antimicrobiens. Ces cellules bactériennes dormantes ou cellules persistantes (persister cells) sont considérées comme responsables d'une grande partie de la résistance des biofilms (**Lewis, 2008**).
- Selon certains auteurs la proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise le transfert horizontal de gènes et l'augmentation de la résistance aux antimicrobiens (**Ghigo, 2001**), ainsi que l'expression de gènes spécifiques, réprimés à l'état planctonique (**Donlan et Costerton 2002**).

En résumé, c'est tout le phénotype biofilm qui est impliqué dans le phénomène de résistance microbienne (**Malek, 2019**).

1.6. Stratégies de lutte contre le biofilm

Les stratégies de lutte contre les biofilms sont essentiellement basées sur l'action des agents antimicrobiens, antibiotiques ou biocides, et se heurtent toujours au problème crucial de la résistance sessile (**Malek, 2019**).

La meilleure stratégie pour éradiquer les biofilms bactériens est d'empêcher leur formation. Cela peut être réalisé en empêchant la présence de bactéries formant un biofilm dans des zones critiques, et améliorer ainsi le statut hygiénique des surfaces, notamment celles qui sont en contact avec les aliments.

1.6.1. Traitement curatifs des biofilms

Le meilleur moyen pour éliminer un biofilm déjà formé est d'appliquer une procédure efficace de nettoyage et de désinfection (**Chmielewski et Frank, 2003**).

1.6.1.1. Nettoyage et désinfection

Des processus quotidiens de nettoyage et de désinfection sont effectués dans chaque usine de fabrication de produits alimentaires afin d'éliminer les microbes qui s'y sont introduits et de prévenir la colonisation ou la persistance. Les mesures concernées comprennent des processus mécaniques, chimiques et thermiques pour empêcher la formation d'un biofilm aussi efficacement que possible (**Coughlan et al., 2016**).

Il existe des procédures de nettoyage documentées et validées, et leur mise en œuvre est légalement contrôlée par des organismes de réglementation. Une procédure générale de nettoyage des zones de transformation et de production des aliments comporte six étapes séquentielles nécessaires : pré-nettoyage (physique), lavage (détergents), rinçage, désinfection, rinçage final et séchage (**Safefood, 2012**).

Pour les circuits fermés (canalisation, tubulures ...) un protocole de contrôle connu sous le nom de Clean-In-Place (CIP) est mis en œuvre pour éliminer les souillures et réduire la charge microbienne en général (**Bremer et al., 2006**). Le CIP est un cycle programmé semi-ou entièrement automatisé de rinçage et de nettoyage. Toutefois, l'élimination du biofilm est difficile même avec un CIP acceptable (**Bremer et al., 2006 ; Faille et al., 2010**). IL a été suggéré récemment que l'approche CIP améliorée par des biocides naturels ou chimiques reste la meilleure stratégie pour éliminer le biofilm (**Gopal et al., 2015 ; Malek, 2019**).

1.6.1.2. Détergents enzymatiques

Les solutions de nettoyage industriel classiques ne sont pas satisfaisantes, car elles ne permettent ni de prévenir ni d'éliminer les biofilms des canalisations agro-alimentaires notamment. Par ailleurs, les options de nettoyage et de désinfection classiques (soude, peroxy, chlore...) contribuent à l'apparition et à la propagation de résistances des microorganismes à ces agents de nettoyage (par mutation ou sélection). Vers la fin des années 2000, une nouvelle génération de stratégies « vertes » de lutte contre les biofilms, a été mise au point: la détergence enzymatique (**Coughlan et al., 2016**).

En raison de leur capacité à dégrader les substances polymériques qui forment la matrice extracellulaire du biofilm (**Figure 6A**), les enzymes sont considérées comme une stratégie écologique et innovante pour éliminer les biofilms, et les détergents enzymatiques sont ainsi proposés comme des outils utiles dans ce but. Ces derniers, en hydrolysant la matrice du

biofilm, permettent aux désinfectants d'atteindre plus facilement leurs cibles (**Alvarez-Ordóñez et al., 2019**).

1.6.1.3. Approches physiques

Les ultrasons se sont avérés efficaces pour l'élimination des biofilms lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec d'autres agents anti-biofilms tels que les antibiotiques (**Peterson et Pitt, 2000**), l'ozone (**Baumann et al., 2009**) et l'agent chélatant acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) (**Oulahal et al., 2007**).

De nouvelles technologies d'inactivation physique des microbes sont également proposées comme technologies vertes alternatives pour le contrôle des biofilms dans les industries alimentaires. Parmi celles-ci, les plasmas atmosphériques non thermiques ont fait l'objet d'une grande attention, car ils ont démontré une grande capacité de désinfection contre les biofilms d'un large spectre de micro-organismes et offrent une série d'avantages, comme le fait d'être sans contact et sans eau, par rapport à la désinfection chimique classique (**Puligundla et Mok, 2017**). En effet, les plasmas froids ont été testés avec succès contre les biofilms formés par *Salmonella* sur des lames de verre (**Niemira et al. 2014**).

1.6.2. Les approches préventives de la formation du biofilm

Une des meilleures solutions « anti-biofilms » est la prévention, consistant à limiter les capacités des matériaux à être colonisés par les micro-organismes. La façon la plus simple d'inhiber le développement d'un biofilm est d'empêcher sa formation et cela notamment en perturbant l'attachement des bactéries sous forme planctonique à une surface biotique ou abiotique (**Donlan, 2002**).

1.6.2.1. Caractéristiques hygiénique des matériaux

Les matériaux des équipements sont sélectionnés sur la base d'un nombre de facteurs, dont le plus important est la facilité de nettoyage pour la réduction de la contamination et des risques associés. Les matériaux doivent également être raisonnablement résistant à la corrosion chimique et à la corrosion liée à l'âge : l'usure pour l'entretien d'une surface lisse et facile à nettoyer et pour prévenir les risques de contamination et les temps d'arrêt liés au remplacement fréquent des équipements endommagés/corrodés. Comme le montre la figure 05, la topographie de la surface est aussi importante car les micro-

organismes peuvent s'y attacher dans les fissures, les éraflures et les coins où ils sont extrêmement difficiles à éliminer (**Bremer et al., 2006**).

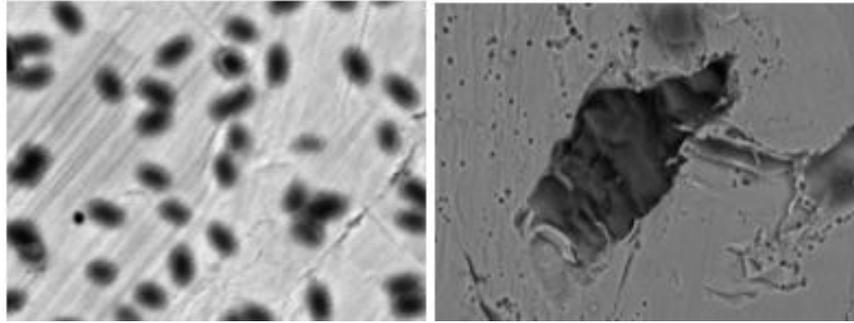


Figure 05 : Images électroniques montrant (de gauche à droite) des spores de *B. cereus* adhérentes à des surfaces en inox altérées, et un biofilm réfugié dans une crevasse (**Malek, 2019**).

1.6.2.2. Les revêtements antimicrobiens des surfaces

Comme la topographie de la surface et les caractéristiques physico-chimiques ont un effet important sur les premières étapes de la formation du biofilm, plusieurs initiatives de recherche ont été lancées ces dernières années pour mettre au point des revêtements qui modifient ces propriétés de surface, réduisant ainsi l'attachement bactérien et la formation du biofilm et améliorant l'efficacité des programmes de nettoyage et de désinfection (**Alvarez-Ordóñez et al., 2019**).

Il a également été démontré que les revêtements de surface incorporant des composés antimicrobiens, tels que les nanoparticules d'argent (**Fialho et al., 2018**) ou recouverts de molécules contrôlant le quorum sensing (**Kim et al., 2017**), empêchent la formation d'un biofilm par divers agents pathogènes.

1.6.2.3. Les biofilms positifs

L'utilisation de biofilms positifs est envisagée pour limiter l'implantation des flores pathogènes dans les ateliers de fabrication agro-alimentaire. Il s'agit d'entretenir la colonisation des surfaces grâce à une microflore naturelle compétitive s'opposant à l'adhésion ou à la croissance des germes indésirables. Cette stratégie n'est envisageable que sur les produits possédant une flore naturelle déjà abondante tels que le lait. La méthode utilisée doit être spécifique du produit. La flore implantée ne devrait pas nuire aux qualités organoleptiques de ce dernier (**Branger et al., 2007**).

1.6.3. Autres approches

1.6.3.1. Bactériophage

Les bactériophages sont les ennemis naturels des bactéries et peuvent être utilisés contre les bactéries pathogènes et d'altération des aliments (**Endersen et al., 2014**). Les phages sont particulièrement utiles pour éradiquer les biofilms car ils sont capables de pénétrer dans la matrice et de diffuser à travers le biofilm mature et, une fois à l'intérieur, d'exprimer leurs propriétés antibactériennes (**Briandet et al., 2008 ; Donlan, 2009**), comme le montre la figure 6B. En raison de leur activité inhibitrice très spécifique, les bactériophages ont été reconnus comme des outils adéquats pour cibler les biofilms formés par des micro-organismes de détérioration ou pathogènes (**Gutiérrez et al. 2016**).

En outre, certaines enzymes lytiques dérivées de phages, telles que les endolysines, ont également démontré une activité contre les biofilms bactériens (**Gutiérrez et al. 2014**).

1.6.3.2 Bactériocines

Des peptides antimicrobiens synthétisés par les ribosomes et sécrétés par les bactéries, appelés bactériocines, ou les souches productrices de bactériocines elles-mêmes, peuvent être ajoutés aux milieux de culture pour empêcher l'adhésion cellulaire initiale et la formation d'un biofilm de certaines bactéries sensibles (**da Silva et De Martinis, 2013**), comme l'illustre la figure 6C.

1.6.3.3. Inhibiteurs du Quorum Sensing

Aujourd'hui, il est montré que le QS est fortement associé au développement de la résistance aux antimicrobiens via l'induction de la formation des biofilms. D'où la nécessité de cribler des molécules qui pourraient avoir un effet anti-QS (**Bouyahya et al., 2017**).

Les stratégies qui ciblent le quorum sensing et, par conséquent, la formation d'un biofilm (et d'autres facteurs de virulence), par opposition aux stratégies bactéricides, exercent une pression de sélection moindre pour développer une résistance à l'agent inhibiteur. Dans ces cas, les bactéries peuvent être "contrôlées" au lieu d'être tuées (**Coughlan et al., 2016**). Ces stratégies sont basées sur l'inhibition de la communication de cellule à cellule, qui peut être exécutée de plusieurs façons, notamment l'inhibition de la biosynthèse des molécules de signalisation (les auto-inducteurs), de la dégradation de ces derniers ou la prévention de la liaison auto-inducteur/protéine R (**Brackman et Coenye, 2015**).

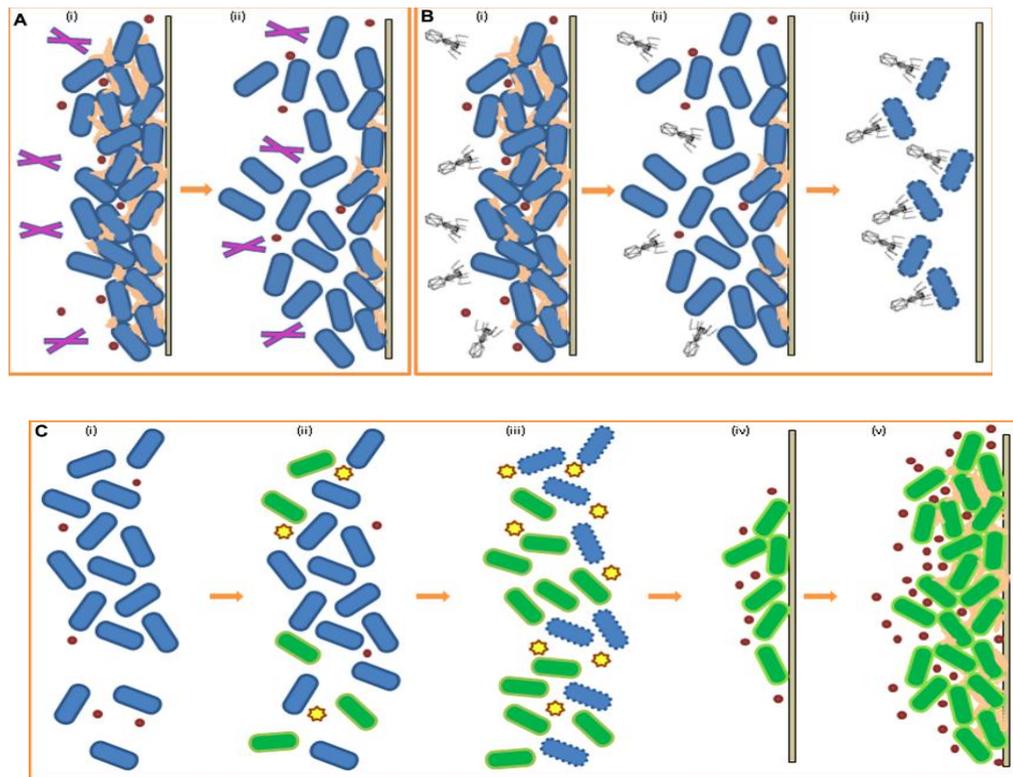


Figure 06: Contrôle du biofilm par des enzymes, des phages et des bactériocines
(Coughlan *et al.*, 2016).

(A). Effet des enzymes sur le biofilm préexistant (i) biofilm formé, production de EPS, ajout d'enzymes (ii) dégradation de l'EPS et réduction du biofilm par action enzymatique.

(B). Effet du bactériophage sur le biofilm préexistant (i) biofilm formé, production de EPS, ajout de phage (ii) dégradation du EPS par le phage, réduction du biofilm (iii) cellules bactériennes du biofilm ciblées par le phage pour l'infection.

(C) Effet des bactériocines et exclusion compétitive sur les cellules formant un biofilm (i) cellules planctoniques de l'espèce A (bleu) (ii) ajout d'une espèce B productrice de bactériocines (vert) (iii) ciblage de l'espèce A par les bactériocines, augmentation du nombre de cellules de l'espèce B (iv) augmentation de la concentration de molécules QS pour l'espèce B, fixation à la surface du solide (v) formation d'un biofilm de l'espèce B à la place de l'espèce A.

Plusieurs stratégies ont été développées pour bloquer la communication cellulaire bactérienne. Certaines d'entre elles, comme le « quorum quenching », se basent sur la recherche d'enzymes capables de bloquer les molécules « signal » du QS : les auto-inducteurs. Une N-acyl homosérine lactonase, qui dégrade le noyau lactone des AHLs, a ainsi été découverte chez *Bacillus sp* (Dong et Zang, 2005). Ces molécules peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. L'algue *Delisea pulchra* bloque les gènes de virulence de *Serratia liquefaciens* par la production de furanones halogénées, qui agissent en tant qu'inhibiteurs

compétitifs des AHLs (**Rasmussen et al., 2000**). La potentialisation de cette activité inhibitrice a été obtenue par la synthèse de la furanone C-30. En plus de bloquer les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, ce composé inhibe ses propriétés d'adhésion, facilitant ainsi l'élimination des biofilms formés par le pathogène (**Christensen et al., 2007 ; Guinoiseau, 2010**).

D'autres inhibiteurs, qui interfèrent avec l'expression de la protéine régulatrice LasR (**Müh et al., 2006**) ou qui limitent les interactions entre LasR et l'auto-inducteur LasI (**Smith et al., 2003**), ont été synthétisés. Leur utilisation *in vitro* a permis de réduire considérablement la pathogénicité de *P. aeruginosa*. Des inhibiteurs du système *agr*, impliqué dans la régulation des facteurs de virulence des bactéries à Gram positif, comme *S. aureus*, ont également été identifiés. Ce sont, pour la plupart, des antagonistes des protéines auto-inductrices (AIPs). En se fixant sur l'histidine kinase Agr C, récepteur spécifique des AIPs, ils bloquent l'activation de l'opéron *agr* entraînant ainsi l'inhibition des facteurs de virulence (**George et al., 2008 ; Guinoiseau, 2010**).

Des études récentes ont montré des propriétés anti-QS des extraits organiques et des huiles essentielles de plusieurs plantes médicinales. Un ester de coumarate isolé de l'extrait d'écorce de *Dalbergia trichocarpa*, une espèce endémique malgache, interfère avec les systèmes QS de *P. aeruginosa* (las et rhl), inhibe la formation du biofilm et augmente l'efficacité de l'antibiotique tobramycine à tuer le biofilm de *P. aeruginosa* (**Rasamiravaka et al., 2013**). **Aliyu et al. (2016)** ont montré que le sesquiterpène lactone ; dispose d'une grande capacité à perturber la communication entre les cellules bactériennes *via* des effets antagonistes sur les récepteurs de LuxR chez *Chromobacterium violaceum*. Le composé phénolique curcumine, un constituant majeur des racines de curcuma (*Curcuma longa L.*) inhibe l'adhésion de *P. aeruginosa* (PAO1) aux surfaces de polypropylène. Ceci a été corrélé avec une diminution de la production de 3-oxo-C12-HSL (**Rudrappa et Bais, 2008**).

2. Hygiène des surfaces

La pandémie COVID-19 (coronavirus disease 2019) est apparue en décembre 2019 dans la ville chinoise de Wuhan, et s'est propagée à grande échelle dans le monde entier. Malgré des mesures de quarantaine et de confinement rigoureuses, l'incidence de COVID-19 continue de grimper en flèche (**Oyeniran et Chia, 2020**).

Actuellement, il n'existe ni vaccin ni médicament homologué, la prévention reste le seul moyen pour se protéger et éviter la propagation de ce nouveau virus (**Organisation Mondiale de la Santé, 2020**). Plusieurs mesures à but de limiter la propagation du virus ont été mises en œuvre telles que le nettoyage et la désinfection régulière des locaux, du sol et des surfaces fréquemment touchées, l'hygiène des mains, le respect des règles d'hygiène en cas de toux ou d'éternuement, la distanciation physique... (**Hamadouche, 2020**). Les experts s'accordent à dire que la meilleure protection contre le virus est l'hygiène.

2.6. Nettoyage et désinfection des surfaces hospitalières

L'hygiène de l'environnement hospitalier nécessite la mise en place de moyens de nettoyage et de désinfection visant à limiter la transmission des microorganismes liés aux locaux et à leurs surfaces pouvant être à la source d'infections nosocomiales. De façon temporaire, la désinfection permet de tuer les microorganismes sur les surfaces (mobilier, lavabos, sanitaires, sols, carrelages...).

Pour éliminer le maximum de produits organiques, de poussières et de salissures, il est nécessaire de nettoyer les surfaces (propreté visuelle ou macroscopique), afin de les désinfecter de manière efficace. La désinfection permet de rompre la chaîne de contamination entre les patients et leur environnement. Des locaux et surfaces nettoyés protègent les patients et le personnel (**Dancer, 2009**).

Le nettoyage des locaux s'effectue dans quatre zones hiérarchisées selon leur risque contaminant:

- Zone 1 : hall d'accueil, services administratifs, bureaux... Nécessitant un nettoyage domestique quotidien.
- Zone 2: couloirs, escaliers, ascenseurs, consultations...
- Zone 3: chambres de patients, laboratoires, pharmacie, salles d'exams, postes de soins, offices alimentaires, locaux communs.
- Zone 4: les blocs opératoires, services de réanimation, d'oncologie, d'hématologie, chambre de patients immunodéprimés, service de greffes... Nécessitant un nettoyage avec des produits nettoyants-désinfectants (**Hallouët et al., 2008**).

Le nettoyage standard est microbiologiquement insuffisant. Son amélioration est primordiale pour le contrôle des endémies et des épidémies bactériennes. C'est pourquoi des systèmes automatisés de désinfection des surfaces par voie aérienne (DSVA) à base de

peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sont de plus en plus utilisés. Son but est de disperser dans l'atmosphère un produit biocide afin que ce dernier puisse entrer en contact avec les surfaces à désinfecter.

Un cycle de désinfection comprend toujours trois ou quatre étapes :

- étape 1 (optionnelle), le préconditionnement : adaptation de la température et de l'hygrométrie du local assurant des conditions optimales d'efficacité du procédé ;
- étape 2, la phase de dispersion du produit : diffusion du produit dans le local permettant le contact du biocide avec les surfaces à décontaminer ;
- étape 3, la phase de contact : temps nécessaire pour atteindre le niveau d'efficacité attendu du biocide ;
- étape 4, la phase d'aération : temps nécessaire à l'élimination du biocide.

Les biocides utilisés par les DSVA étant en général toxiques pour l'être humain, le local désinfecté est donc indisponible durant toute la durée du cycle de désinfection (**Blazejewski et al., 2014**). D'où l'intérêt d'utiliser des produits inoffensifs comme les produits naturels.

2.7. Nettoyage des équipements en industries agro-alimentaires

La présence de souillures ou plus spécifiquement d'encrassant microbien sur les surfaces des équipements dans les industries de transformation alimentaires doit être évité. Ainsi les risques qui en découlent concernent à la fois la qualité du produit final et la santé du consommateur.

Le nettoyage et la désinfection impliquent généralement l'utilisation de différents agents chimiques et de différentes procédures d'application, et ils ont des rôles distincts (**Featherstone, 2015**).

Historiquement, les équipements destinés à la transformation des aliments étaient ouverts et nettoyés individuellement. La production à grande échelle a conduit à la nécessité pour les industriels la mise en place de systèmes de Nettoyage-En-Place (Clean In Place CIP). Ces processus très développés sont automatisés, mais sont rarement efficaces s'ils ne sont pas optimisés (**Ryther, 2014**).

Voici un exemple classique d'un cycle de nettoyage:

- pousse à l'eau ou à l'air pour récupérer le produit alimentaire encore présent dans les installations et les éliminer des surfaces.
- pré rinçage : circulation d'eau chaude ou de l'eau froide (alors combinés à la pousse à l'eau) pour éliminer les substances faiblement liées à la surface. ;

- phase de détergence : action chimique du nettoyage (acide ou alcalin) ayant pour but d’agir sur le dépôt de façon à favoriser son éliminer de la surface ;
- post-rinçage : on parle aussi de rinçage final ou de rinçage intermédiaire avant désinfection dans lequel les dépôts et résidus chimiques sont éliminés par circulation d'eau;
- une possible désinfection ;
- rinçage final par circulation d'eau avant une nouvelle transformation des produits (Ashurst et Hargitt, 2009).

A titre d’exemple, un CIP standard comprend : un rinçage à l’eau froide, un traitement avec la soude caustique (NaOH) 1% à 65°C pendant 10 min, un rinçage intermédiaire, un traitement avec l’acide nitrique HNO₃ 1% à 65°C pendant 10 min et un rinçage final (In Malek, 2019). Il peut être amélioré par l’incorporation d’une étape de désinfection selon le schéma représenté dans la figure N°07.

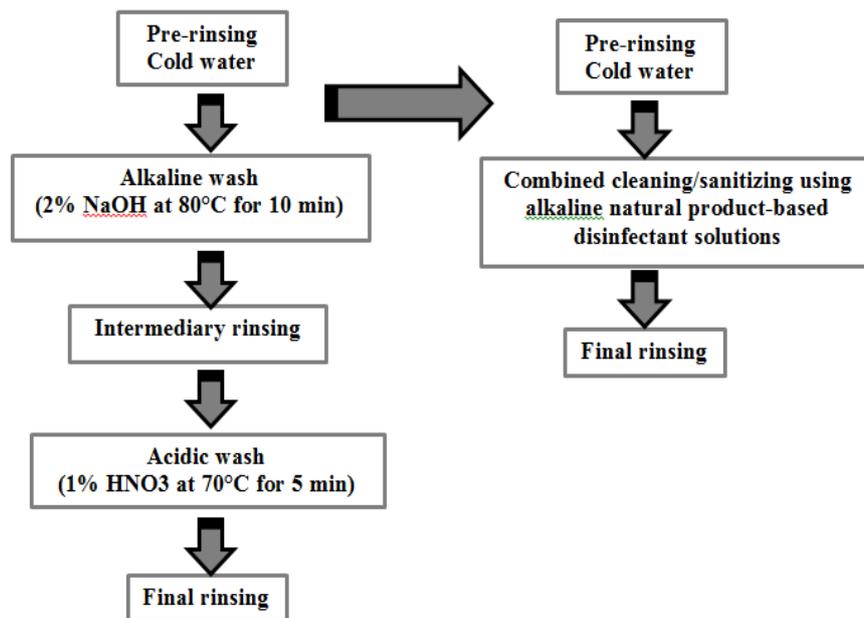


Figure 07 : Schéma simplifié d'une procédure CIP conventionnelle en cinq étapes et d'une stratégie CIP améliorée en trois étapes (Malek, 2018).

Pour réaliser un bon nettoyage, il faut tenir compte de quatre paramètres qui sont représentés dans un cercle appelé Cercle de Sinner : temps, température, forces mécaniques et chimiques appliquées. Ces paramètres sont affectés l’un par l’autre, par exemple l’augmentation de la concentration d’un agent de nettoyage réduira le temps d’application nécessaire (Hilaire et al., 2007).

2.8. La désinfection des surfaces en laboratoire de biologie

Des micro-organismes ou des échantillons sont manipulés dans les laboratoires de recherche biologique, de biotechnologie, d'analyses médicales ou vétérinaires ainsi que dans les laboratoires d'anatomie et cytologie pathologiques et les salles d'autopsie. Ces micro-organismes peuvent contaminer les surfaces (paillasse, équipements, sols...) et les opérateurs. Il est donc nécessaire de mettre en place des procédures de nettoyage et de désinfection des surfaces (**Klein, 2012**).

Le nettoyage et la désinfection des paillasse doivent s'effectuer au moins une fois par jour, avant de quitter le local, mais peuvent être également réalisés à la fin de chaque manipulation. Il est également recommandé de nettoyer ou nettoyer/désinfecter les sols à la fin de la journée de travail. La surface des appareils est traitée en fonction de la nature et du danger des microorganismes manipulés (**Pelner et al., 1999**).

Il existe des règles de base qui doivent être respectées pour toutes les opérations de nettoyage et de désinfection :

- aller de la zone la plus propre vers la zone la plus sale, c'est ce qu'on appelle la marche en avant
- éviter de repasser sur des zones déjà traitées,
- ne pas retremper une bande, une chiffonnette déjà utilisée dans le produit propre afin de ne pas le salir,
- décrire des « 8 » ou des bandes parallèles se chevauchant afin de n'oublier aucune surface.

Le nettoyage des murs se fait du haut vers le bas, le nettoyage du sol se fait du fond de la pièce vers la sortie, le nettoyage des surfaces horizontales se fait en partant de la zone la plus éloignée vers la zone la plus proche (pour éviter tout contact du corps sur une zone déjà nettoyée) (**David et Balty, 2014**).

3. Agents antimicrobiens d'origine végétale

3.6. Principaux groupes de composés antimicrobiens d'origine végétale

Les plantes synthétisent un large éventail de métabolites secondaires au cours de leur croissance. Bien que les rôles exacts de ces composés non essentiels dans la croissance et le développement des plantes ne soient pas totalement connus, ils possèdent diverses fonctions biologiques, notamment des activités antimicrobiennes et antioxydantes (**Lin et Tsao, 2019**).

Les composés phytochimiques antimicrobiens utiles peuvent être divisés en différentes catégories : les composés phénoliques, les terpènes, les alcaloïdes ...

3.6.3. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des groupes de molécules de structures variées (**Richter, 1993**). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzéique auquel est directement lié un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton, 1999**). Les composés phénoliques sont issus de deux voies de biosynthèse différentes :

- Voie de l'acide shikimique : acide cinnamique, acide benzéique, coumarines, lignanes...
- Voie de l'acide acétique (polyacétate): chromones, quinones...(**Lugasi et al, 2003**).

Ils sont généralement divisés en flavonoïdes et non flavonoïdes.

• Les flavonoïdes

Les flavonoïdes ont un squelette de base formé par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne linéaire à trois carbones qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C) les flavonoïdes peuvent être subdivisés en de nombreuses sous-classes : flavonols, flavones, flavanones, anthocyanidines, flavanols, et aussi isoflavones (**Tapas et al., 2008**).

• Les non flavonoïdes

Les principaux groupes de non flavonoïdes sont les acides phénoliques et les stilbènes. Les acides phénoliques peuvent être subdivisés en dérivés de l'acide benzéique, tels que l'acide gallique et l'acide protocatéchoïque, et en dérivés de l'acide cinnamique, qui consistent principalement en acide coumarique, caféique et férulique (**Daglia, 2012**).

Les polyphénols peuvent être présents dans les tissus végétaux sous forme de molécules polymérisées complexes à poids moléculaire élevé, comme les tanins qui peuvent se combiner aux protéines ce qui explique leur pouvoir tannant : tanner la peau, c'est-à-dire la rendre imputrescible (**Quideau et al., 2011 ; D'Archivio et al., 2007**).

Les composés phénoliques des extraits de fleurs de baie de goji (*Lycium barbarum*) se sont révélés avoir des activités antimicrobiennes potentielles contre la plupart des agents

pathogènes d'origine alimentaire, y compris *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* (Mocan et al., 2015).

3.6.4. Les terpénoïdes et les huiles essentielles

Les terpénoïdes sont une classe d'hydrocarbures dont l'unité de base est l'isoprène à cinq atomes de carbone. Selon le nombre d'unités d'isoprène, les terpénoïdes sont classés en hémiterpènes (C5) ; monoterpènes (C10) ; sesquiterpènes (C15) ; diterpènes (C20) ; sesterpènes (C25) ; triterpènes (C30) ; tétraterpènes (C40). Environ 40 000 terpénoïdes et leurs dérivés ont été identifiés (Lu et al., 2016). Certains terpénoïdes volatils sont directement libérés dans l'environnement après avoir été synthétisés, et d'autres sont modifiés par oxydation, réduction, méthylation et stockés dans des plantes.

Les huiles essentielles végétales sont des mélanges de différents terpénoïdes, en particulier de monoterpènes (C10) et de sesquiterpènes (C15) et d'une variété d'hydrocarbures aliphatiques de faible poids moléculaire, d'acides, d'alcools, d'aldéhydes et de composés phénoliques (Figure 08). Les monoterpénoïdes sont particulièrement connus pour l'activité antibactérienne, antifongique et antioxydante des huiles essentielles (Pandey et al., 2016 ; Greay et Hammer, 2015)

Les huiles essentielles d'eucalyptus ont montré des effets inhibiteurs sur la croissance de pathogènes d'origine alimentaire, notamment les bactéries à Gram positif (*Bacillus spizizenii* et *S. aureus*), et les bactéries à Gram négatif (*Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, et *Klebsiella pneumoniae*) à des concentrations comprises entre 8 et 250 mg/mL (Siddique et al., 2018).

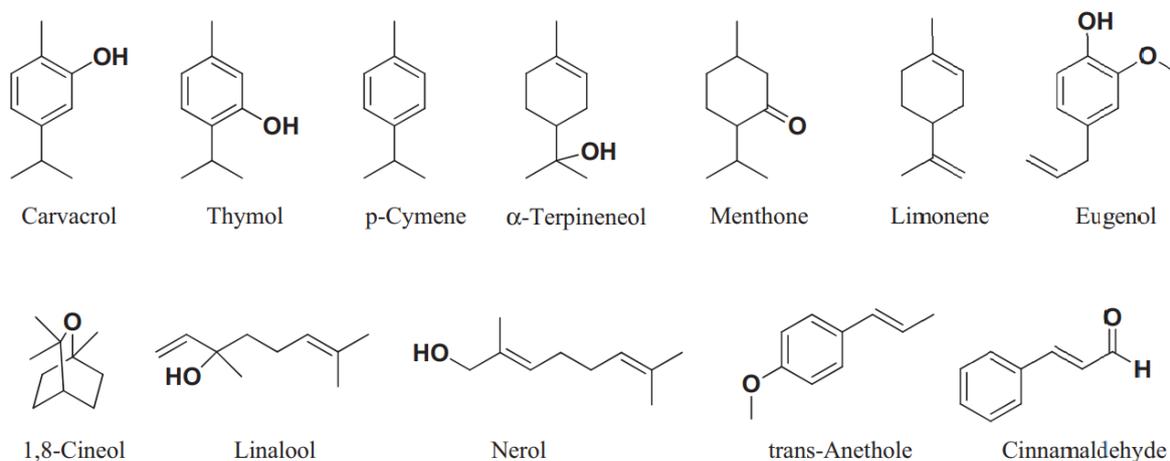


Figure 08 : principaux terpénoïdes antimicrobiens (Lin et Tsao, 2019).

3.6.5. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes d'origine végétale sont dérivés d'acides aminés et contiennent souvent un ou plusieurs cycles hétérocycliques contenant des atomes d'azote. Le premier exemple d'alcaloïde médicalement utile est la morphine, isolée en 1805 à partir du pavot à opium *Papaver somniferum* (Fessenden et Fessenden, 1982 ; Compean et Ynalvez, 2014).

Ces composés sont regroupés en trois classes:

- Les alcaloïdes vrais : qui sont dérivés d'acides aminés dont l'azote est inclus dans un cycle hétérocyclique.
- Les pseudo-alcaloïdes : qui présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ils ne sont pas dérivés d'acides aminés.
- Les proto-alcaloïdes : qui sont des dérivés d'acides aminés dont l'azote n'est pas inclus dans un noyau hétérocyclique (Compean et Ynalvez, 2014).

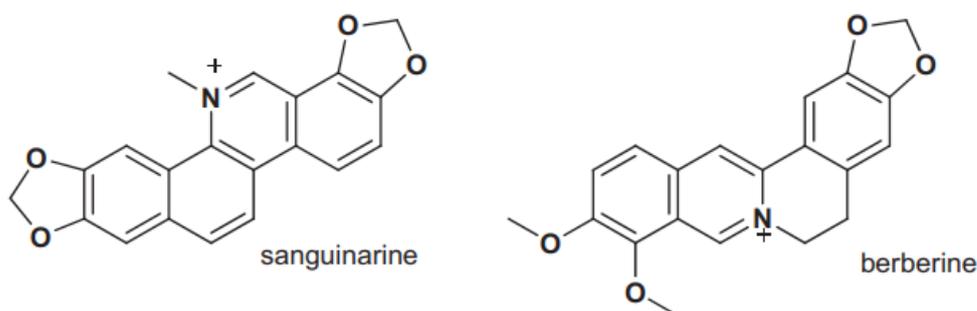


Figure 09 : Principaux alcaloïdes antimicrobiens (Lin et Tsao, 2019).

Les alcaloïdes constituent un groupe très diversifié de substances phytochimiques. Par exemple, les molécules telles que l'isoquinoline, pyridine, indole, pervenche et respérine se sont avérées actives contre les micro-organismes d'origine alimentaire (Sibi et al., 2014).

3.6.6. Autres antimicrobiens d'origine végétale

Les peptides sont de courtes chaînes d'acides aminés (2 à 100 acides aminés) liées par des liaisons peptidiques, remplissant divers rôles dans la croissance des plantes, le développement, la reproduction, les interactions symbiotiques et les réactions au stress. Les peptides sont produits dans différentes parties des plantes y compris les racines, les graines,

les fleurs, les tiges et les feuilles comme défense chimique contre les micro-organismes envahissants, et possèdent des propriétés microbicide, en plus d'être impliqués dans la signalisation cellulaire (Nawrot *et al.*, 2014 ; Tam *et al.*, 2015).

3.7. Mode d'action des agents antimicrobiens d'origine végétale

Le mode d'action antimicrobienne exercé par les substances phytochimiques peut être différent en raison de la diversité des classes chimiques auxquelles elles appartiennent. L'activité antimicrobienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Omojate *et al.*, 2014).

3.7.3. Activité antibactérienne

Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes a été décrit dans la littérature. En effet, le caractère lipophile des molécules constituant les huiles essentielles et d'autres métabolites secondaires les rend capables de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane cellulaire et de s'accumuler entre les phospholipides, entraînant des changements de conformation et éventuellement un manque de régulation de la membrane cellulaire, ce qui perturbe ainsi le transport membranaire des substances nutritives. Le transport membranaire peut aussi être affecté *via* la perturbation du gradient ionique des deux côtés de la membrane cytoplasmique (Cox *et al.*, 2001 ; Alvesalo *et al.*, 2006). La modification dans la membrane cellulaire affecte légèrement le processus du couplage énergétique conduisant à une perturbation entre l'équilibre du pool d'ATP intra- et extracellulaire *via* la perturbation de la chaîne respiratoire au niveau membranaire (Caillet et Lacroix, 2006 ; Turgis *et al.*, 2009).

Le principal mécanisme d'action des saponines qui sont des triterpénoïdes glycosylés dont le nom provient de leur capacité à former des mousses semblables à du savon semble impliquer une perturbation de la membrane conduisant à une augmentation de la perméabilité (Coleman *et al.*, 2010; Augustin *et al.*, 2011 ; Sampedro et Valdivia, 2014).

Un mécanisme proposé qui pourrait expliquer la toxicité des flavonoïdes est une inhibition directe de l'ATP synthase, car les flavonoïdes peuvent se lier à la sous-unité γ et bloquer sa rotation (Gledhill *et al.*, 2007 ; Dadi *et al.*, 2009). En raison de leur richesse en groupes phénoliques, les flavonoïdes sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes modifiant ainsi les équilibres enzymatiques. Plusieurs études indiquent également que les

flavonoïdes pourraient réduire la pathogénicité des bactéries en interférant avec les mécanismes du quorum sensing (Vandeputte et al., 2011 ; Cushnie et Lambn, 2011).

L'activité des gallotannins est due à leur forte affinité pour le fer et elle est également liée à l'inactivation des protéines membranaires (Daglia, 2012).

Il a également été constaté que l'ester d'acide cinnamique, l'acide 3-p-trans-coumaroyl-2-hydroxyquinique (ACHQ) réduisait la synthèse de l'ADN de la bactérie et interagissait directement avec l'ADN par le biais du mode de liaison des sillons (groove binding mode) entraînant un dysfonctionnement cellulaire et même la mort des bactéries (Wu et al., 2018).

3.7.4. Activité antifongique

Les mécanismes fongicides peuvent impliquer la destruction des mycéliums existants, ainsi que l'inhibition du développement de nouveaux mycéliums (Sharma et Tripathi, 2008).

En outre, les huiles essentielles ont été trouvées capables d'inhiber la formation de spores (Sant'Anna et al., 2009). Les huiles essentielles du romarin, de la menthe et du thym ont démontré des activités antifongiques contre *Aspergillus flavus* et inhibé la production d'aflatoxine B1 *in vitro* (El-Habib 2012).

Les peptides antimicrobiens hispidalines purifiés à partir des graines de *Benincasa hispida*, une plante médicinale de la famille des Cucurbitacées ont montré des activités antifongiques contre les champignons pathogènes et d'altération des aliments : *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium Solani*, et *Curvularia geniculata* (Sharma et al., 2014).

3.7.5. Activité antivirale

L'utilisation des huiles essentielles dans le traitement des maladies virales a été confirmée par de nombreuses études au cours des dernières décennies. L'activité antivirale a été étudiée dans différentes fractions d'extraits de romarin. L'extrait d'hexane a montré une activité contre le virus de l'herpès simplex (HSV-2) propagé dans des cultures de cellules de fibroblastes pulmonaires d'embryons humains (Böhme et al., 2014).

Une autre étude *in vitro* a montré l'effet antiviral de l'HE d'origan et du girofle sur le virus Type 1 de l'herpès simplex ainsi que sur le virus de la maladie de Newcastle (Siddiqui et al.,

1996 ; Rhayour, 2002). Le β -pinene et le limonene ayant montré des propriétés antivirales contre le virus Herpes simplex de type 1 (**Soualeh et Soulimani, 2016**).

Une activité antivirale de l'épigallocatechine gallate (EGCG) a également été découverte dans les années 1990. Il a été montré que le EGCG prévenait l'infection causée par le virus de la grippe en se liant à l'hémagglutinine virale, empêchant ainsi la fixation des particules virales aux cellules réceptrices cibles (**Nakayama et al., 1993**).

3.8. Effet antibiofilm des biocides naturels

Ces dernières années en particulier, un grand nombre d'études ont évalué l'efficacité de composés d'origine naturelle, y compris des huiles essentielles ou des extraits obtenus à partir des plantes, pour inhiber la formation de biofilms ou éliminer les biofilms existants (**Coughlan et al. 2016**).

Certains de ces nouveaux composés et extraits exercent un effet bactéricide direct sur les microbes liés au biofilm, tandis qu'à d'autres occasions, ils présentent des activités indirectes d'inhibition du biofilm, principalement l'inhibition du quorum sensing et de leurs phénotypes régulés (**Alvarez-Ordóñez et al., 2019**).

Les extraits de plantes aromatiques sont étudiés en tant qu'agents naturels contre les biofilms bactériens (**Bridier et al., 2015**). Ils sont généralement reconnus inoffensifs (generally recognized as safe : GRAS) et sont donc compatibles avec les réglementations actuelles concernant la production alimentaire. Parmi les exemples, on peut citer : l'huile d'origan, le thymol et le carvacrol, efficaces contre les biofilms de *Staphylococcus* (**Nostro et al., 2007**).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels et méthodes

La partie expérimentale de ce travail a été réalisée au sein du laboratoire N° 03 du pôle de Microbiologie du département de biologie, Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen. Elle consiste en l'analyse de la contamination microbienne de l'environnement des laboratoires de ce pôle et de l'étude du comportement des bactéries isolées à l'égard de différents extraits végétaux.

1. Isolement et dénombrement de la flore de contamination de l'environnement des laboratoires

1.1. Prélèvement de l'air ambiant

Pour effectuer ce prélèvement, une boîte de Pétri, remplie d'un milieu gélosé nutritif TGEA (Tryptone Glucose Extrait de levure Agar) est laissée ouverte pendant 30 minutes. Ainsi par gravité les microorganismes vont se déposer sur la boîte. Elle est placée ensuite à incuber à 30°C pendant 24 à 72 h, il est important d'avoir une boîte Pétri contenant un volume important de gélose pour éviter le dessèchement et le durcissement de la gélose. Il reste à dénombrer et identifier les colonies qui apparaissent à la surface du milieu.

La matinée du 18 février 2020, 11 boîtes de Pétri sont réparties dans différents endroits dans les 4 laboratoires du pôle de microbiologie, tel que présenté dans le tableau 1.

Tableau 1 : Les sites de prélèvement à partir de l'air ambiant des laboratoires:

Laboratoire	Sites de prélèvement	
Labo 1	1	Sur l'étuve
	2	A côté du poste de coloration du Gram
Labo 2	1	Sur le congélateur
	2	A côté du poste de lavage
	3	Sur la table du centre
Labo 3	1	A côté de la porte
	2	A côté de l'étuve
	3	Sur la grande étuve
	4	A côté du poste de lavage
Labo 4	1	A côté de la porte
	2	A côté de l'étuve

1.2. Prélèvement de la surface des pailles

1.2.1. Echantillonnage par écouvillonnage

Sortir un écouvillon de son emballage stérile, humidifier l'extrémité en le plongeant dans un tube contenant le diluant tryptone-sel-eau TSE+0.3% Tween 80, éliminer l'excès de diluant en le pressant contre la paroi du tube. A l'aide de l'extrémité de l'écouvillon, tracer des stries sur une surface estimée de 4 cm² délimitée par un gabarit en papier aluminium stérile, en faisant tourner l'écouvillon entre le pouce et l'index. Replacer l'écouvillon dans le tube avec le diluant et couper le bâtonnet, c'est la solution mère à partir de laquelle des séries de dilution décimale sont réalisées jusqu'à la dilution 10⁻³ en conditions d'asepsie (1 mL de la solution mère est mise dans 9 mL du diluant TSE jusqu'à la dilution 10⁻³). Ce prélèvement a été effectué le 20 février 2020 l'après-midi et les sites de prélèvement à partir de la surface des pailles sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2 : Les sites de prélèvement à partir de la surface des pailles:

Laboratoire	Sites de prélèvements	
Labo 2	1	A côté de l'autoclave
	2	A côté de l'étuve
	3	A côté de la porte
Labo 3	1	A côté de la porte
	2	A côté de l'étuve
	3	A côté du poste de lavage

1.2.2. Isolement sur milieu solide par ensemencement en surface

Après avoir préparé les dilutions décimales, 0.1 mL de la solution mère et de chaque dilution est prélevé à l'aide d'une micropipette et est ensemencé par étalement sur les boîtes de Pétri contenant du milieu Tryptone-Soja (TSA) à l'aide d'une pipette Pasteur en râteau de telle sorte à assurer une distribution homogène des germes. L'incubation des boîtes se fait à 30°C pendant 24h à 48h.

Ce travail est répété pour tous les sites choisis.

1.2.3. Isolement sur milieu solide par ensemencement en profondeur

Un volume de 1 mL de la solution mère ainsi que de chaque dilution est prélevé et déposé sur des boîtes de Pétri vide, ensuite 14 mL de milieu gélosé TSA maintenu en surfusion mais légèrement refroidie (environ 45 °C) sont coulés. Homogénéiser par des mouvements circulaires sur paillasse et en gardant à la boîte de Pétri fermée. Laisser refroidir la gélose sans la bouger. Ensuite mettre les boîtes à l'incubateur à 30°C pendant 24 à 48h. La figure 10 représente le schéma du protocole de préparation de dilutions et d'ensemencements.

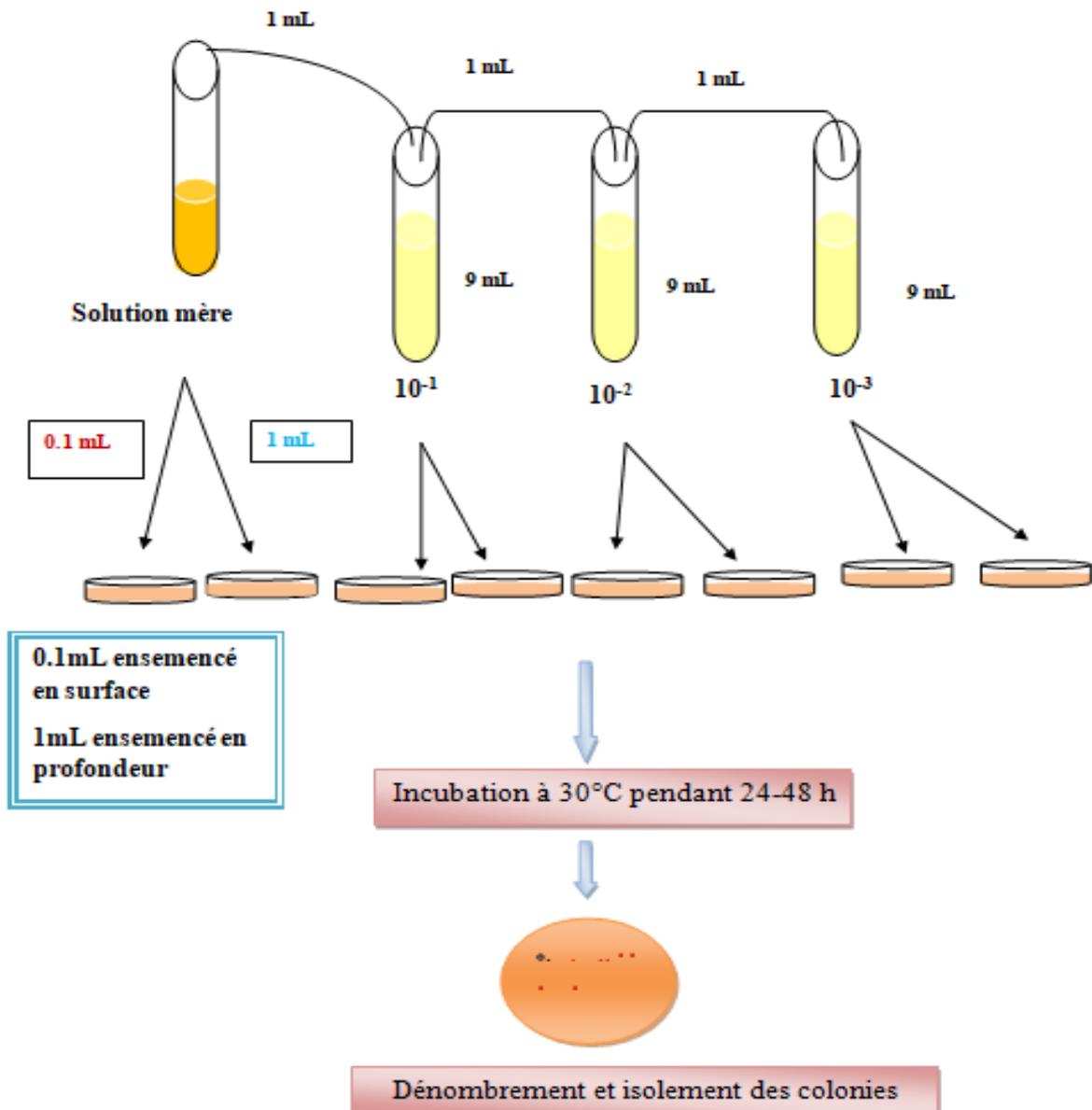


Figure 10 : Schéma du protocole de préparation de dilutions et d'ensemencements

1.3. Dénombrement des bactéries

Le dénombrement après culture concerne, les cellules viables de l'échantillon. Autrement dit, les cellules capables de croître. Il est basé sur l'aptitude de chaque bactérie, fixée par la solidification du milieu gélosé, à former une colonie visible à l'œil nu. Après 24h d'incubation à 30°C, les colonies développées sont dénombrées et les résultats exprimés en UFC (Unité Formant une Colonie).

Le nombre de germes est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution, selon la formule (**Marchal et Bourdon, 1982**):

$$N = n / d \cdot v$$

Où :

N : nombre des microorganismes en UFC/ ml.

n: nombre des colonies dénombrées.

v: Volume prélevé.

d: Dilution.

1.4. Purification et conservation des souches

Les colonies différant morphologiquement ont été isolées et purifiées par repiquages successifs selon la méthode en stries (**Martineau, 1996**).

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu solide gélose nutritive (GN) inclinée, les souches sont ensemencées sur la pente des tubes. Après croissance à température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les quatre semaines (**Badis et al., 2005**).

2. Identification des souches purifiées

L'identification comporte une série d'étape, se succédant le plus souvent dans un ordre déterminé : les souches isolées ont été identifiées d'abord par l'observation de l'aspect cultural des colonies sur les milieux sélectifs, l'observation microscopique des souches à l'état frais, après coloration de Gram, puis par des tests biochimiques ; test catalase, test d'oxydase, API Staph (BioMérieux) pour *S.aureus* et API 20E, test hémolyse....

Les résultats obtenus au cours de chaque étape permettent l'orientation des démarches ultérieures.

2.1. Caractères culturels

L'observation macroscopique des colonies ou l'étude des caractères visibles à l'œil nu permet d'effectuer une première caractérisation (aspect des colonies et de leur revers, la taille et la couleur. D'après **Joffin et Leyral (2006)**, les éléments d'identifications macroscopiques sont:

- La forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre : petite, moyenne, grande.
- couleur et/ou pigment de la colonie.
- L'élévation: colonies bombées ou plates.
- L'opacité: opaque, translucide ou transparente.
- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.

2.2. Caractères morphologiques

L'examen microscopique permet de déterminer la morphologie des bactéries : la forme, la taille, leur mode de regroupement, le type de Gram, la mobilité, vérifier la pureté des isolats ainsi que la présence ou l'absence de spores.

2.2.1. Coloration de GRAM

L'examen microscopique des colorations de Gram demeure la première analyse diagnostique dans le traitement des échantillons en microbiologie.

Cette coloration est réalisée systématiquement sur les différentes colonies purifiées pour préciser le caractère Gram (+) ou Gram(-). Avec cette coloration double, les bactéries à Gram positive apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries à Gram négatives sont colorées en rose ou en rouge.

Des frottis sont préparés à partir des cultures jeunes, après avoir réalisé toutes les étapes de la coloration de Gram comme décrit par **Murray et al., (1994)**, les lames sont observées au microscope optique à immersion.

2.2.2. Observation de la spore

La mise en évidence des spores a été effectuée sur des cultures âgées de 5 à 7 jours après une simple coloration à la Fuchsine. Sur un frottis bactérien séché et fixé sur lame quelques gouttes de la Fuchsine sont versées sur la lame, laisser agir une minute, ensuite rincer à l'eau distillée, sécher et observer au microscope optique.

2.3. Caractères biochimiques

Cette approche nous oriente vers le métabolisme suivi par ces microorganismes et les enzymes qu'ils possèdent. Ces tests ont été réalisés en utilisant quelques tests classiques et les galeries biochimiques.

2.3.1. Recherche de la catalase

Ce test standardisé pour les identifications bactériologiques (**Prescott et al., 2007**), a été réalisé sur des colonies pures et bien isolées.

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H_2O et $\frac{1}{2} O_2$.



Une réaction positive de la présence de la catalase se manifeste immédiatement par la production des bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé, après le mélange d'une culture bactérienne avec quelques gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes.

2.3.2. Recherche de l'oxydase

Comme pour la recherche de la catalase, ce test est standardisé pour les identifications bactériologiques (**Prescott et al., 2007**).

Le cytochrome oxydase ou oxydase est une enzyme de la chaîne respiratoire bactérienne qui catalyse des réactions d'oxydation du cytochrome C.

La présence du cytochrome C dans la chaîne respiratoire de la bactérie testée permet d'oxyder un réactif : le N tétraméthyl-paraphénylène diamine (TMPD) qui forme un complexe violet au contact de cette enzyme. Ce réactif peut se trouver sous forme d'un disque pré-imprégné par ce dernier (**Denis et al., 2011**).

Avec une pipette Pasteur frotter doucement une colonie bien isolée sur le disque d'oxydase et observer la réaction qui se traduit par l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes :

Oxydase + : couleur mauve, (le TMPD est oxydé grâce à la présence du cytochrome C)

Oxydase - : incolore. (Le TMPD réduit a gardé ses électrons car le cytochrome C est absent)

2.3.3. Galeries d'identification (Système API) Galerie API 20E

Les souches à Gram (-), oxydase (-) sont ensemencées sur des plaques API 20E.

La galerie API 20E associant 20 tests enzymatiques et de fermentation des sucres, permet l'identification des bacilles à Gram négatif oxydase négative de type entérobactéries (**Holmes et al., 1978**) et de bacilles à Gram positifs du genre *Bacillus*.

La galerie API 20E (BioMérieux) composée de 20 microtubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée est utilisée selon les recommandations décrites par le fabricant. Les microtubes de la galerie API 20E sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubés à une température de 30 °C pendant 24h à 48 h. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (**Emanuel et Lorrence, 2009**). Ensuite la lecture des réactions se fait en se référant au tableau de lecture fourni par le fabricant (BioMérieux), on additionne les chiffres selon les résultats obtenus et on vérifie le code dans le livre de référence.

2.3.4. Identification au genre *Staphylococcus*

Les isolats en forme de cocci à Gram (+) regroupés en grappe de raisin sont repiqués sur le milieu Chapman qui est un milieu sélectif. Ce milieu contient un inhibiteur : fortes concentrations en chlorure de sodium (75 g/L), ce qui permet un isolement sélectif de *Staphylococcus* tolérant les fortes concentrations en NaCl. (**Hennekinne et Le Loir, 2014**). Ce milieu permet la mise en évidence de l'utilisation du mannitol grâce à la présence du rouge de phénol. L'utilisation du mannitol se traduira par une acidification du milieu,

provoquant le virage au jaune de l'indicateur de pH. Après 24 à 48h d'incubation à 37°C, les colonies mannitol positif sont entourées d'une auréole jaune.

- *Staphylococcus aureus* : petites colonies mannitol positif
- Autres espèces de *Staphylococcus* : colonies en général plus petites, mannitol positif ou négatif.
- **Galerie API Staph**

Le principe de la galerie API Staph, la préparation et l'ensemencement de la galerie est le même que celui de la galerie API 20E, mais la préparation de l'inoculum ou la suspension bactérienne est réalisée dans API Staph Medium.

2.3.5. Identification au groupe *Bacillus cereus*

Les bacilles à Gram positif, catalase positive et sporulés sont ensemencés sur milieu Mossel et sur gélose au sang pour l'identification du groupe *B. cereus*

2.3.5.1. Croissance sur milieu Mossel complet

Pour la détection et le dénombrement des formes végétatives et des spores de *B. cereus*, le milieu Mossel complet est conforme aux recommandations de l'**ISO 7932 (2004)**. Il permet l'identification de *B. cereus* sur la base de la résistance à la polymyxine, de la capacité à fermenter le mannitol et de la production de lécithinase. La formulation de Mossel rend ce milieu suffisamment sélectif pour détecter même un petit nombre de cellules et de spores de *B. cereus*.

2.3.5.2. Croissance sur gélose au sang

Les souches à tester ont été ensemencées par stries sur la gélose au sang à 5% dans le but de la recherche de l'activité hémolytique et la confirmation de *B. cereus* produisant des exotoxines appelées hémolysines capables de détruire les globules rouges et l'hémoglobine ce qui se traduit après 24h d'incubation à 30°C par une zone claire autour des colonies.

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits végétaux

En se basant sur le mémoire de **Latti (2018)**, l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits végétaux de *Citrullus colocynthis* et *Berberis vulgaris* a été réalisée par deux techniques pour étudier la résistance ou la sensibilité des souches bactérienne:

- Technique de diffusion sur gélose (méthode de disques) ;
- Technique de microdilution en milieu liquide (concentration minimale inhibitrice ou CMI).

3.1. Préparation des solutions des extraits

Les extraits végétaux secs ont été dissouts dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour obtenir une solution mère à 10 %. Préparer des dilutions successives pour obtenir différentes concentrations (**Teanpaisan et al., 2014**).

3.2. Stérilisation et conservation des solutions

Les solutions des extraits végétaux préalablement préparées vont être stérilisées par microfiltration puis mises dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'utilisation.

3.3. Préparation des suspensions bactériennes de l'inoculum

Les tests antibactériens sont effectués à partir de colonies jeunes de 18 à 24 h en phase de croissance exponentielle. Une suspension bactérienne est réalisée dans des tubes à essai contenant 5mL du bouillon Tryptone-soja (TSB) pour chaque souche et standardisée à une densité optique de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/mL (**Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015**).

3.4. La méthode de diffusion des disques

La méthode de diffusion en milieu gélosé encore appelée méthode des disques consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes soumis au contact du produit. L'effet du produit antimicrobien est apprécié par la mesure du diamètre d'une zone

d'inhibition, et en fonction de ce diamètre la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante (Selka et al., 2016).

Cette technique est réalisée selon le protocole adapté (Chaouche et al., 2016). L'ensemencement des boîtes contenant le milieu Muller-Hinton se fait par écouvillonnage de l'inoculum sur la gélose grâce à des stries serrées. Ensuite, des disques stériles en papier-filtre Wattman de 6 mm de diamètre imprégnés par 10 µl des extraits à tester sont déposés dans les boîtes sur la gélose préalablement ensemencée. Les boîtes de Pétri ont été conservés à 4 °C pendant 2 h. Après diffusion de l'agent antimicrobien, les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Des disques imprégnés d'eau distillée stérile et d'autres imprégnés de DMSO serviront de contrôle négatif et différents disques d'antibiotiques standards ont également été utilisés comme contrôle positif.

Les diamètres des zones d'inhibition (mm) ont été mesurés, y compris le diamètre des disques.

3.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI des extraits

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est considérée comme étant la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 h (Teresa Fera et al., 1998). La détermination de la CMI a été réalisée par la technique de microdilution en milieu liquide tel que décrit par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012 in Mezouar, 2014).

Dans chaque ligne de la microplaque, est déposé 100 µl du bouillon Mueller Hinton. Ensuite, 100 µl de l'extrait à tester sont introduites dans le 1^{ier} puits. Après avoir bien homogénéisé le contenu du 1^{ier} puits une série de dilution est réalisée où 100 µl sont prélevés, puis déposé dans le 2^{ème} puits, et ainsi de suite jusqu'au 10^{ème} puits où 100 µl restantes sont éliminés. Par conséquent, nous obtenons une dilution ½ entre chaque puits. Le puits n°11 contient uniquement le bouillon Mueller Hinton et le puits n°12 contient le milieu de culture et l'inoculum représentent des témoins négatif et positif respectivement. Enfin, 100 µl de l'inoculum (10⁶ UFC/mL) sont ajoutés dans chaque puits. Les microplaques sont scellées et incubées à 30°C pendant 24h.

Après incubation des plaques à 30°C pendant 24 h, les CMI sont déterminées en tant que la plus faible concentration de l'extrait qui a complètement inhibé la croissance par rapport à celle des contrôles. La concentration minimale bactéricide CMB a été défini comme la plus faible concentration qui ne permettait pas une croissance visible lorsque 10 mL du contenu du puits a été ensemencé sur agar et cultivé à 37 C dans des conditions appropriées (Teanpaisan et al., 2017).

3.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du biofilm CMIB

Les CMI de la formation de biofilm ont été déterminées par la technique des microplaques à 96 puits selon des protocoles adaptés (in Kalai et al., 2018).

Une série de concentrations a été préparée à partir de chaque extrait.

Les solutions ont été réparties dans chaque puits comme suit :

- 100 µl de suspension bactérienne de chaque isolat de 10^7 ufc/mL d'une culture jeune dans un bouillon Mueller Hinton.
- 100 µl de chaque extrait de plante des différentes concentrations (*B. vulgaris* et *C.colocynthis*).
- des puits contenant 100 µl d'eau distillée et 100 µl d'extrait végétal sans culture bactérienne sont considérés comme témoin négatif.
- des puits contenant 100 µl d'eau distillée et 100 µl de culture bactérienne sans extrait végétal sont considérés comme témoin positif.

Après une incubation de 24 heures à 30°C, chaque puits a été lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les cellules microbiennes flottantes, séché, coloré pendant 5 minutes avec une solution du cristal violet (CV) à 1 %, lavé à nouveau avec de l'eau et observé à la lumière.

Les puits colorés indiquent la présence de biomasse cellulaire adhérente. La concentration minimale qui inhibe la formation d'un biofilm (CMIB) a été déterminée comme étant la plus faible concentration des extraits végétaux où aucune coloration n'est visible sur les puits, par rapport au contrôle positif.

3.7. Détermination de la concentration minimale éradicatrice du biofilm (CMEB)

La détermination de la concentration minimale d'éradication du biofilm a été faite selon les protocoles décrits in **Kalai et al. (2018)**

- **Formation de biofilm**

Au début, pour produire un biofilm, tous les isolats, à un taux d'inoculum de 10^7 ufc/mL ont été cultivés dans des microplaques à 96 puits contenant du bouillon Muller-Hinton frais puis incubées pendant 24h à 30°C.

- **Traitement de biofilm par l'extrait végétal**

Après 24h d'incubation, les microplaques ont aseptiquement subi un rinçage doux à l'eau distillée trois fois. Le milieu a été renouvelé dans les microplaques contenant de biofilm, en lui ajoutant de l'extrait végétal de *B. vulgaris* à des concentrations croissantes (CMI, 2CMI, 3CMI, 4CMI, 5CMI) tel que décrit dans **Latti, (2018)**. Les microplaques ont été incubées une deuxième fois 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 ils ont été étalés sur la surface des boîtes contenant de gélose LB (Luria-Bertani) et incubés pendant 72 h à 30°C, selon le protocole décrit in **Kalai et al. (2018)**.

La concentration minimale d'éradication du biofilm (CMEB) a été déterminée comme étant la concentration la plus faible qui ne permettait pas la croissance visible à la surface d'une gélose LB (**Teanpaisan et al., 2017**).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion

1. Résultats de l'isolement et du dénombrement de la flore de contamination de l'environnement des laboratoires

1.1. Evaluation de la contamination de l'air

Le dénombrement de la microflore totale a été effectué sur le milieu TGEA (Tryptone Glucose Extrait de levure Agar), afin de vérifier la charge microbienne totale qui renseigne sur l'hygiène des laboratoires. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure N°11. Il est possible d'observer une contamination homogène qualitativement et quantitativement dans les quatre laboratoires.

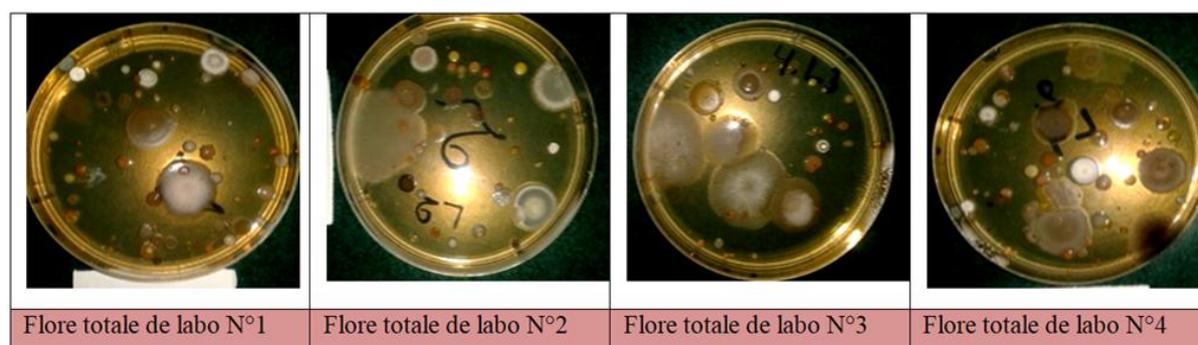


Figure 11 : Photos représentant la flore de contamination de l'air ambiant des laboratoires analysés.

Le volume d'air par boîte de Pétri est inconnu pour calculer le nombre d'ufc par rapport à un volume donné car une bonne démarche de dénombrement nécessite la connaissance du volume d'air. Ce prélèvement a été alors effectué pour avoir une indication sur le niveau d'hygiène et l'état de propreté des laboratoires et pour l'isolement des micro-organismes qui vont être utilisés dans les tests qui vont suivre.

Le dénombrement des micro-organismes présents dans l'air n'est pas une tâche facile. De nombreuses méthodes sont utilisées telles que le comptage des unités formant des colonies par mètre cube d'air (ufc/m³), le dénombrement des ufc sur des plaques de décantation (boîtes de Pétri), la mesure d'un composant chimique des cellules microbiennes/m³ de l'air (ATP, ADN, enzymes) et le comptage au microscope ou par compteurs automatiques en fluorescence (cytométrie en flux ou hybridation fluorescente *in situ*). Le dénombrement d'ufc est le paramètre le plus important, car il mesure les micro-organismes vivants qui peuvent se

multiplier. Les échantillons d'air peuvent être collectés de deux manières : par des échantillonneurs d'air actifs ou par des échantillonneurs d'air passifs (les plaques de décantation). Les deux méthodes sont largement utilisées (**Pasquarella et al., 2000**).

Les plaques de sédimentation donnent la mesure de la partie nocive de la population aéroportée qui tombe sur une surface critique en un temps donné. Les plaques de décantation permettent d'évaluer la contamination de surface provenant de l'air. La principale limite de la méthode passive est qu'elle fournit un résultat qualitatif de la contamination de l'air, qui pourrait être faiblement corrélé avec le degré réel de contamination de l'environnement testé. De plus, cette méthode est facilement influencée par le flux d'air présent à proximité de la plaque, ce qui fait que les résultats varient en fonction de l'emplacement de la plaque. Elle peut être insensible dans les cas où la charge bactérienne est faible. Les méthodes passives nécessitent également des périodes d'échantillonnage plus longues par rapport aux méthodes actives, d'au moins 1 h (**Pasquarella et al., 2000; Shimose et al., 2018**).

L'évaluation du niveau de contamination microbienne de l'air dans les lieux à risque est considérée comme une étape fondamentale pour vérifier l'efficacité des procédures de nettoyage et de désinfection et pour orienter les mesures préventives. Cependant, il reste des problèmes à résoudre concernant la méthodologie, la surveillance, l'interprétation des données et les niveaux maximums acceptables de contamination (**Pasquarella et al., 2000 ; Albertini et al., 2020**).

1.2. Dénombrement des contaminants de la surface des pailles

Après 24h d'incubation à 30°C, les colonies développées sont dénombrées. Le nombre de germes par 4cm² est déterminé en calculant la moyenne Arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution, selon la formule (**Marchal et Bourdon ,1982**). Comme le montre les figures N°12 et 13, dans le laboratoire N°3 on a trouvé 22.5×10³UFC/mL/cm², alors que dans le laboratoire N°2 on a trouvé 9×10³UFC/mL/cm².

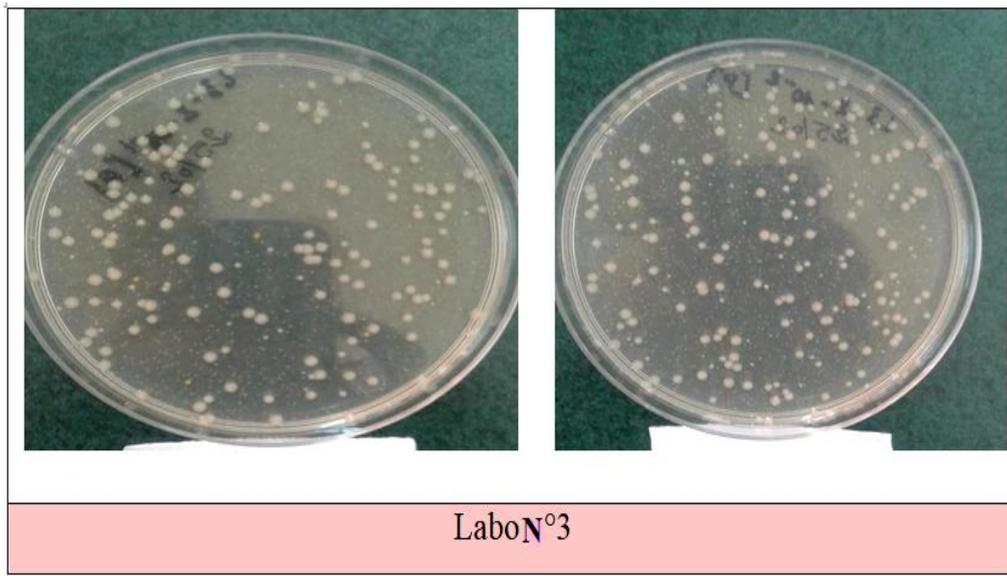


Figure 12 : Photos représentant la flore de contamination de la surface des paillasses du laboratoire N°03.

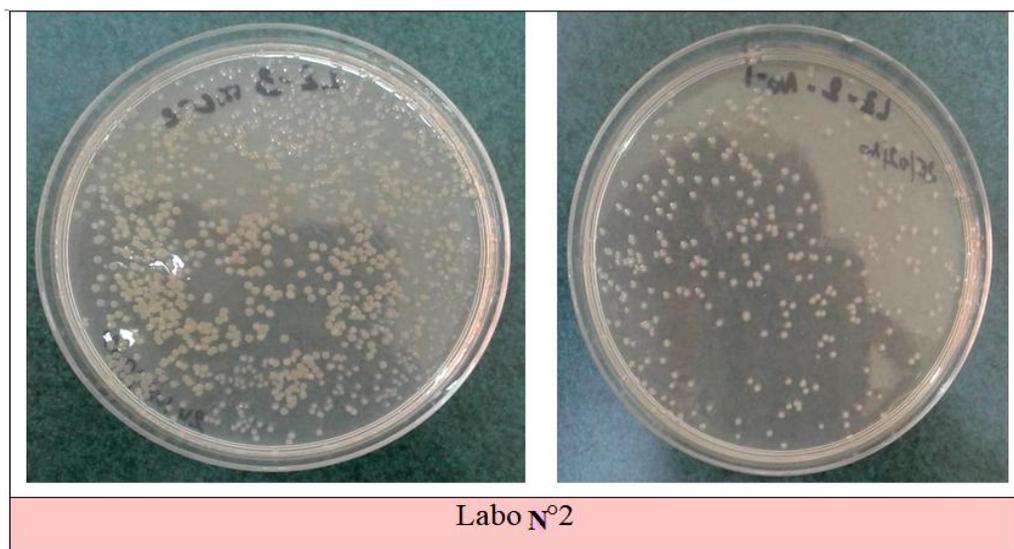


Figure13 : Photos représentant la flore de contamination de la surface des paillasses du laboratoire N°02.

Selon les résultats obtenus on peut conclure que la charge microbienne est importante et la flore est riche. Le nettoyage et la désinfection de la surface sont insuffisants ou non réalisés à cet endroit où on a fait le prélèvement.

Les surfaces constituent un support pouvant recevoir et héberger à la fois des salissures et des micro-organismes. La contamination des surfaces par des micro-organismes peut jouer un rôle important dans la transmission des infections associées aux soins et dans les difficultés

rencontrées au cours de certains processus industriels, en particulier dans l'industrie agroalimentaire.

La colonisation de la surface sera fonction de l'aptitude des micro-organismes à se développer ou à survivre, ce qui va dépendre des conditions écologiques locales (humidité, température, nature de la surface, présence de substances protectrices, nutritives ou inhibitrices cumulée à des facteurs biologiques, etc.). Va également intervenir à ce stade la forme de la surface (fissure, craquelure, etc.) qui jouera un rôle dans la possibilité de « nidification » des germes à l'abri d'une action mécanique voire des détergents ou des désinfectants (**Hartemann, 2019**).

La colonisation de la surface sur plusieurs couches constituera le biofilm au sein duquel les micro-organismes situés au plus près de la surface ne seront pas atteints par les désinfectants ni les méthodes de prélèvement (**Espinal et al., 2012**).

La contamination des surfaces se fait par contact direct (mains) ou indirect (objets souillés) avec l'homme, par dissémination d'eau (milieu de vie de nombreux micro-organismes saprophytes), et par sédimentation des particules de l'air. Cette interaction est continue puisque la remise en suspension (mouvements, techniques d'entretien inadaptées) de particules déposées sur les surfaces et chargées de micro-organismes peut contaminer l'air (**Paton et al., 2015 In Le Gallou et Lepelletier, 2017**).

La possibilité de la transmission d'infections par la contamination de l'air ou des surfaces impose la mise en place de mesures ciblées de maîtrise de celle-ci, après analyse des facteurs de risque d'exposition (pathogénicité du micro-organisme, mode de contamination, existence d'une porte d'entrée, réceptivité de l'hôte) (**Le Gallou et Lepelletier, 2017**).

2. Résultats de l'identification des isolats

Cette partie de l'étude a concerné les colonies que nous avons isolées suite aux résultats de la première partie du l'isolement et le dénombrement des contaminants de l'air et des surfaces. Dix souches ont été isolées : 4 souches à partir de l'air (A8, A14, A17 et A22) et 6 souches à partir des surfaces des pailles (S4, S7, S9, S14, S15 et S16).

2.1. Résultats de l'identification macroscopique

L'observation macroscopique des colonies a permis d'étudier l'aspect macroscopique des colonies tel que le diamètre, la couleur, la forme...., les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3. L'étude des caractères cultureux montre des colonies bien séparées avec des caractères spécifiques qui différencient les isolats.

Tableau 3 : Description des caractères cultureux des isolats

Isolats	Taille (mm)	Couleur	opacité	Aspect	Forme	Elévation
A8	2	Orange	+	Lisse	circulaire	Bombée
A14	2	Blanche	+	Rugueux	irrégulier	Plate
A17	1	Blanche	+	Lisse	circulaire	Demi bombée
A22	3	Blanche	+	Rugueux	Rhizoïde	Plate
S4	2	beige	+	Lisse	Irrégulier	Bombée
S7	2	Jaune	+	Lisse	circulaire	Bombée
S9	2	blanche	+	Lisse	irrégulier	Bombée
S14	2	blanche	+	Lisse	circulaire	Bombée
S15	1	blanche	+	Lisse	Ronde	Bombée
S16	1	transparente	-	Lisse	circulaire	Bombée

2.2. Résultats de l'identification microscopique

L'observation microscopique a été réalisée suivant 2 étapes : coloration de Gram, recherche et coloration de spores.

L'observation des frottis colorés sous microscope optique nous permet de distinguer les formes cellulaires bactériennes de nos isolats. La coloration de Gram révèle quatre groupes de bactérie :

- des bâtonnets à Gram positif isolés, en chainettes ou en diplobacilles et la présence de spores (Figure 14 A, B et E), pour les souches A14, S4, S16 et S22.
- des cocci à Gram positif asporulés regroupés en forme de grappe de raisin (Figure 14C) pour les souches S7, A8 et A17.
- des cocobacilles à Gram négatif : la souche S14 (figure 14 D)
- des petits bacilles à Gram négatif : les souches S9 et S15.

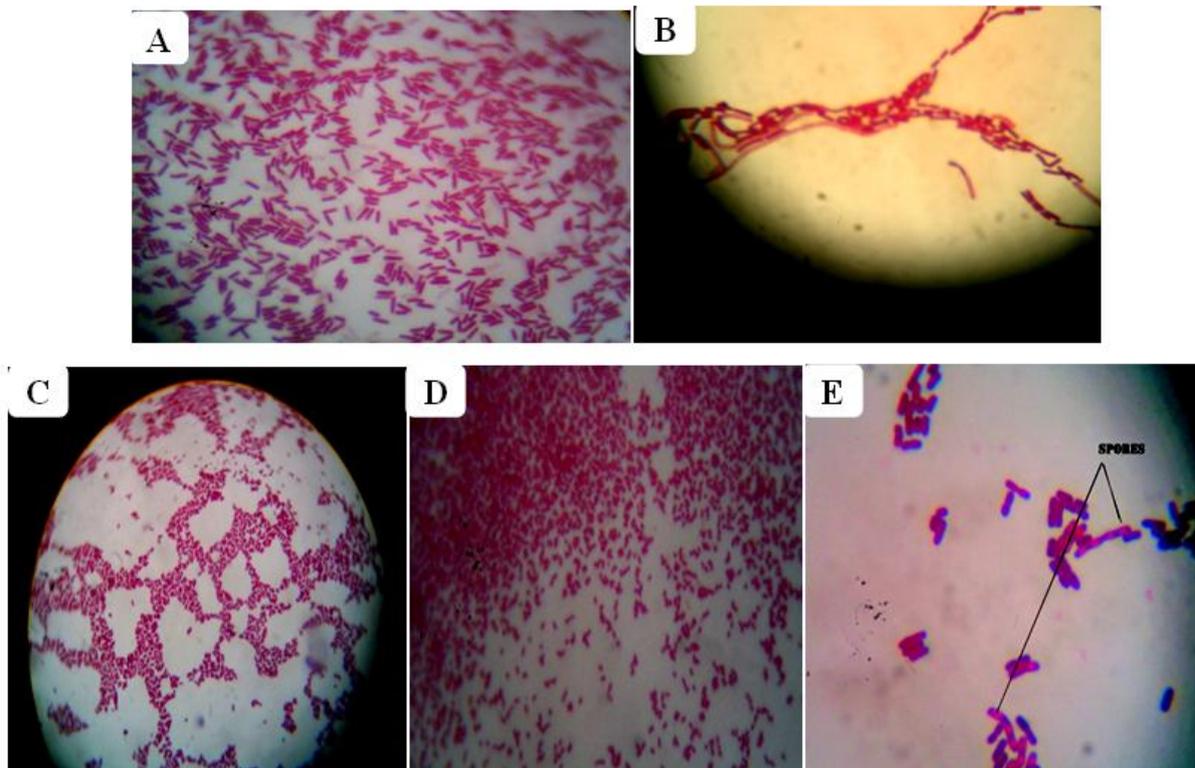


Figure 14 : Observation microscopique des isolats après coloration de Gram (G x 100 à immersion).

Dans la coloration à la fuchsine réalisée sur des cultures âgées des souches bâtonnets à Gram positif, on voit que les cellules sont dans le dernier stade de sporulation beaucoup de spores sont à l'état de spores libres (**figure15**). La coloration de Gram a permis la mise en évidence des spores situées en position centrale comme le montre la figure (14 E).

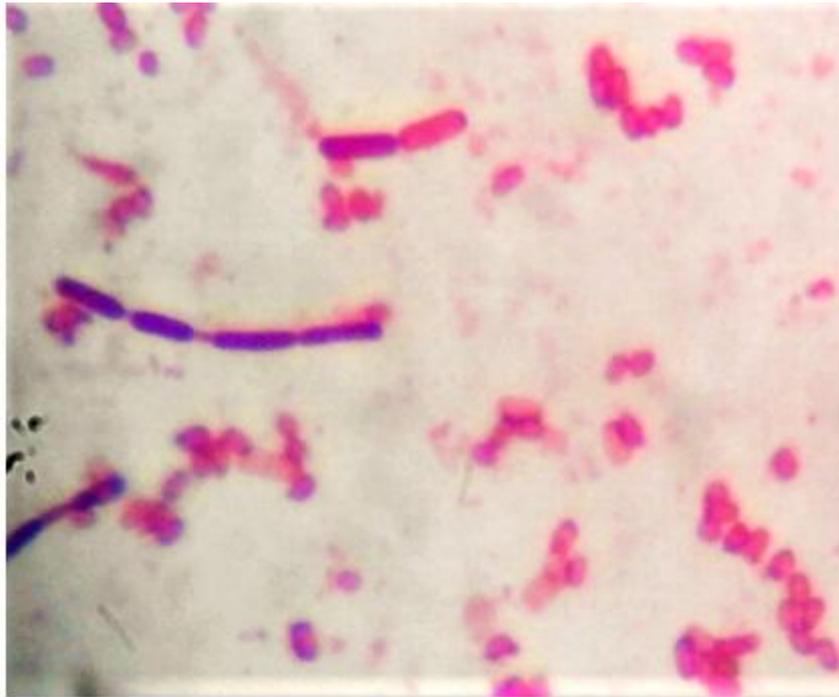


Figure 15 : observation microscopique des spores après coloration à la fuchsine (G x 100 à immersion).

Les caractères morphologiques et le type de Gram ont permis d'orienter l'identification microscopique des souches S7, A8 et A17 vers le genre *Staphylococcus* constitué de cocci à Gram positif, asporulés et regroupés en grappe de raisin (Bhunja, 2018), et les souches A14, S4, S16 et S22 sont orientées vers le genre *Bacillus* constitué de bâtonnets à Gram positif produisant des spores centrales ou terminales (Granum et Lindbäck, 2013).

2.3. Résultats de l'identification biochimique

2.3.1. Résultats de l'identification des Staphylocoques

Les critères biochimiques étudiés comprennent la recherche de la catalase et la fermentation du mannitol.

Les résultats du test de la catalase ont montré que les souches S7, A8 et A17 sont catalase positive et la réaction se traduit par le dégagement immédiat des bulles d'oxygène (Figure16).

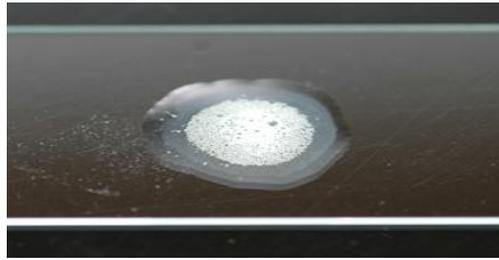


Figure 16 : Test de catalase positive

Les enzymes produites par les staphylocoques incluent la catalase qui réduit l' H_2O_2 en H_2O et $\frac{1}{2} O_2$ et rend les bactéries plus résistantes aux attaques des neutrophiles (**Gordon et Parry, 2013**).

Concernant la fermentation du mannitol, le jaunissement du milieu Chapman indique que la souche A17 est mannitol positive et halotolérante (**Figure 17.A**), et les souches S7 et A8 sont mannitol négative et halotolérantes (**Figure 17.B, C**). Le milieu de Chapman ne laisse croître au bout de 24 à 48 heures que les staphylocoques, germes halophiles qui tolèrent des concentrations élevées de NaCl jusqu'à 7,5% qui inhibent pour cette raison, la plupart des autres germes (**Kloos et Veron, 1990**).

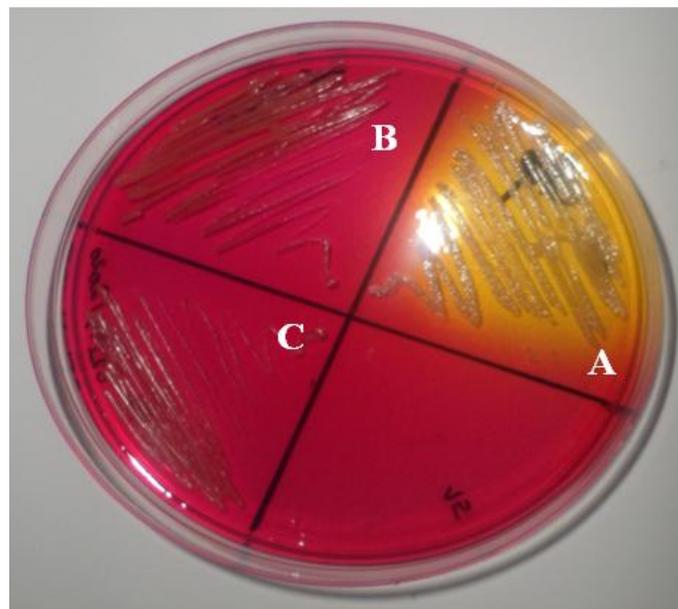


Figure 17 : Colonies de *Staphylococcus* sur milieu Chapman.

La souche A17 mannitol positive peut être identifiée à *S. aureus*, alors que les souches A7 et A8, mannitol négative peuvent être identifiées aux autres espèces du genre *Staphylococcus*.

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques (cocci) à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative (**Willcox, 2007**). Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires présentes sur la peau, les muqueuses et la sphère rhinopharyngée chez les animaux à sang chaud (mammifères, oiseaux) et en particulier chez l'Homme. Ces bactéries sont également isolées de l'environnement naturel (sol, eau douce et eau de mer, poussière, air), de l'environnement domestique de l'Homme (cuisine, réfrigérateur), de l'environnement hospitalier et des ateliers de préparation alimentaire ainsi qu'à partir de denrées alimentaires. La peau et les muqueuses de l'Homme et des animaux constituant l'habitat de *S. aureus* avec 10 à 40% d'individus porteurs de façon permanente (porteur sain) et environ 60% qui hébergent *S. aureus* de façon intermittente. La présence de ce microorganisme dans l'environnement est due à une contamination par l'Homme ou les animaux, éliminé dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement (**Foster, 2004 ; Sung et al., 2008**).

2.3.2. Résultats de l'identification du genre *Bacillus*

Les souches bâtonnets à Gram positif (A14, S4, S16 et S22) sont catalase positives.

Les caractéristiques utilisées pour le diagnostic sur la gélose Mossel (**ISO 7932, 2004**) sont : l'aspect des colonies, la précipitation de la lécithine hydrolysée et l'absence d'utilisation du mannitol par *B. cereus*. Les colonies caractéristiques de *B. cereus* présentant une couleur caractéristique rose, entourées d'un précipité de jaune d'œuf de couleur identique. Ces critères distinguent *B. cereus* des autres espèces du genre *Bacillus*.

Les colonies développées après 24h d'incubation à 30°C sont de couleur rose indiquant l'absence de la fermentation du mannitol et elles sont entourées d'un halo de précipitation (souche S22), les souches A14, S4, S16 n'ont pas poussé sur le milieu Mossel (**Figure18**).

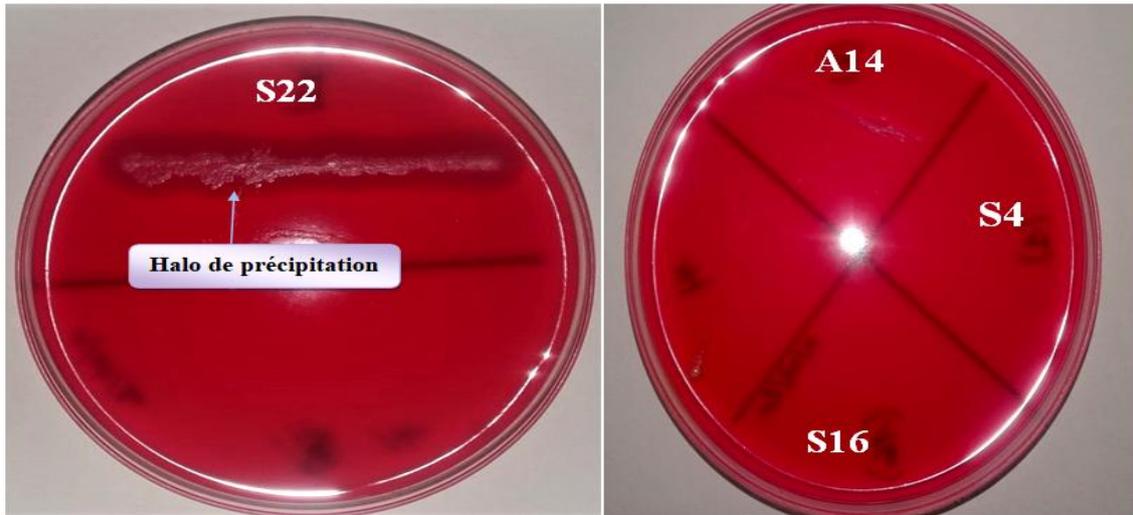


Figure18 : Aspect des colonies sur milieu Mossel après 24h d'incubation à 30°C.

B. cereus est catalase (+), mannitol (-), lécithinase (+) et hémolysine (+). (La souche S22)

Concernant la recherche de l'hémolysine, après 24h d'incubation à 30°C les souches ensemencées sur gélose au sang ont donné les résultats représentés dans la figure19

- Des colonies grises, opaques et absence de toute zone d'hémolyse : souche S16.
- Zone floue verdâtre représente l'hémolyse α : les souches A14, S4 et S22.

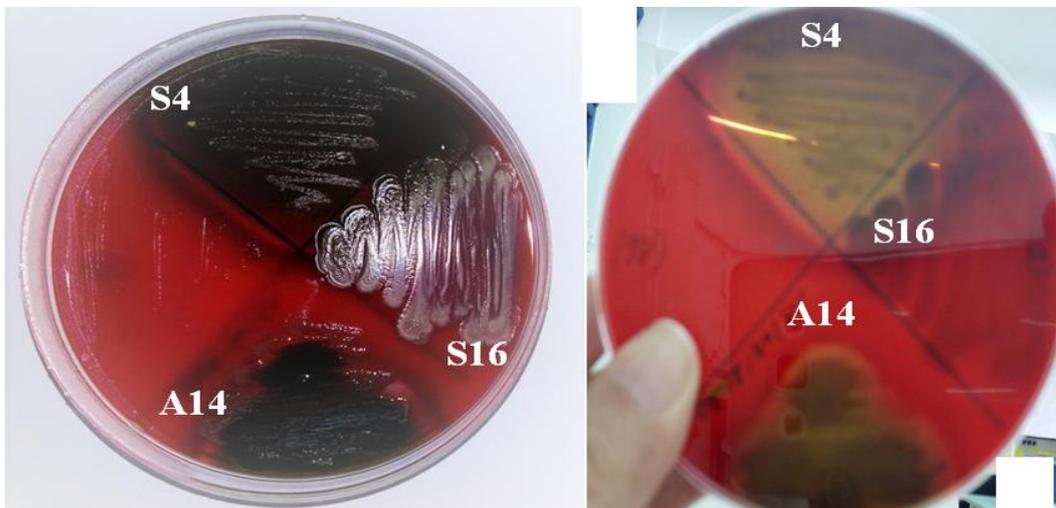


Figure 19 : Aspect des colonies sur milieu gélose au sang après 24h d'incubation à 30°C

La souche S22 est catalase (+), mannitol (-), lécithinase (+) et hémolysine (+), elle peut être identifiée à *B. cereus*.

Les souches A14 et S4 sont catalase (+), lécithinase (-) et hémolysine (+). La souche S16 est catalase (+), lécithinase (-) et hémolysine (-).

De ce fait les souches A14, S4 et S16 peuvent être identifiées au genre *Bacillus spp.*

B. cereus est largement distribué dans l'environnement et possède plusieurs habitats. Le sol a été longtemps considéré comme réservoir primaire et l'habitat naturel de cette espèce mais on peut l'isoler également de l'environnement de production alimentaire, des aliments et du tractus intestinal des insectes et des mammifères (Christiansson et al., 1999 ; Lepsanovic et al., 2018). *B. cereus* se comporte comme un pathogène opportuniste et cette espèce est également responsable de toxi-infections alimentaires (Lesley et al., 2017). Sa capacité à former des endospores permet à *B. cereus* de persister dans des conditions environnementales difficiles telles que des températures élevées, la déshydratation et la carence nutritionnelle ce qui pose de sérieux problèmes dans les industries agroalimentaires notamment les industries laitières (Lepsanovic et al., 2018; Malek, 2019). Ainsi que son pouvoir à s'adhérer aux surfaces en acier inoxydable et à former un biofilm rend *B. cereus* plus résistant aux antimicrobiens et aux désinfectants (Kumari et Sarkar, 2016).

Cette bactérie peut survivre dans l'environnement sous forme de spores ce qui explique qu'on a pu l'isoler à partir de l'air ambiant et les surfaces des laboratoires.

2.3.3. Résultats de l'identification des bactéries à Gram négatif

Les bactéries à Gram (-) sont réensemencées sur milieu Mac Conkey qui est un milieu sélectif pour l'isolement des entérobactéries (Figure 20). En effet, il contient des agents sélectifs qui freinent le développement des bactéries à Gram positif: cristal violet et sels biliaires.

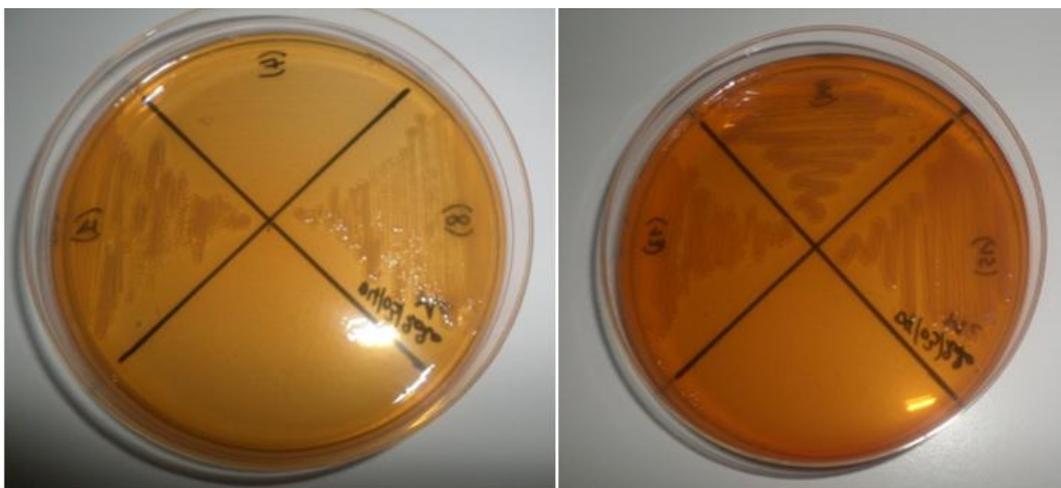


Figure 19 : Résultat de la croissance des colonies sur milieu Mac Conkey

Après avoir déposé les colonies des souches S9, S14 et S15 sur les disques d'oxydase on a observé une absence de la couleur mauve donc ces souches sont Oxydase (-).

3. Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits végétaux

3.1. L'activité antimicrobienne des extraits par la méthode de diffusion des disques

L'activité inhibitrice des extraits végétaux par la méthode de diffusion des disques est montrée par l'apparition des zones d'inhibition tout autour des disques imprégnés.

D'après les résultats obtenus par **Latti, (2018)** l'extrait de *B.vulgaris* s'avère plus efficace, les diamètres des zones d'inhibition varient de 22-33 mm pour *B.cereus*, de 18-20 mm pour *S.aureus* et *Staphylococcus spp.* **Benkhaldi, (2017)** a observé une résistance totale à l'égard des extraits de *Citrullus colocynthis* sur les souches de *Bacillus subtilis*, *S.aureus*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* et à différentes concentrations (20, 40, 60 mg/mL).

Selon les travaux de **Bnyan et al., (2013)** l'extrait éthanolique du *C. colocynthis* a montré une inhibition maximale contre *Escherichia coli* (20 cm), suivi par *Proteus mirabilis* (16 cm) et *Staphylococcus aureus* (12 cm), il n'y a eu aucun effet sur *Streptococcus pneumoniae* et *K. pneumoniae*. Les extraits aqueux n'ont présenté aucun effet chez toutes les espèces bactériennes.

3.2. La concentration minimale inhibitrice (CMI)

Selon **Sharma et al., (2010) in Hussain et al., (2014)**, l'activité antibactérienne des extraits du *Citrullus colocynthis* préparés dans divers solvants a été étudiée sur certaines bactéries pathogènes à savoir *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *E.coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* et *Staphylococcus epidermidis*. La plupart des extraits présentaient une concentration minimale inhibitrice (CMI) modérée compris entre 20 et 100 µg/mL contre tous les agents bactériens pathogènes.

D'après les résultats de **Mojaddar Langroodi et al., (2018)**, la CMI des extraits aqueux et éthanoliques de *B.vulgaris* était de 6,25 - 25 mg/mL et de 3,125 - 12,5 mg/mL respectivement. Les bactéries à Gram positif étaient plus sensibles que les bactéries à Gram négatif pour les deux extraits.

D'après les résultats de **Riazi et al., (2015)**, la CMI de l'extrait de *B.vulgaris* sur *S.aureus* et *E.coli* était de 3 et 4 (mg/mL), respectivement.

D'après **Ebrahimi et al., (2017)**, les extraits hydro-alcooliques et de chloroforme de la racine de *B. vulgaris* étaient capables d'inhiber la croissance de toutes les bactéries étudiées dans une gamme de concentration de 25 à 75 et de 1,562 à 6,250 mg/mL, respectivement. L'extrait de chloroforme étudié présentait une plus grande activité

L'activité antimicrobienne des extraits dépendait de la souche bactérienne testée, de la composition de l'organe végétal, son état de maturation ainsi qu'à la nature de l'extraction (**Alshammary et Ibrahim, 2014**).

3.3. La concentration minimale inhibitrice de la formation du biofilm (CMIB)

D'après les résultats de **Latti, (2018)** l'ajout de l'extrait de *B. vulgaris* a empêché la formation du biofilm en présence des concentrations décroissantes en extrait allant jusqu'à $6,25 \cdot 10^{-4}$ g/mL qui représente la CMIB. L'effet de l'extrait de *B.vulgaris* 10% sur l'adhésion de *S. aureus* et *B. subtilis* a montré une diminution du nombre de cellules adhérees aux lames en verre. Les résultats montrent clairement que l'extrait a empêché l'adhésion bactérienne au verre. L'interférence avec l'adhésion aux surfaces inertes est un mécanisme d'action qui a été décrit pour les huiles essentielles (**Ultee et al., 2002**) et les extraits végétaux (**Kouidhi et al., 2015**).

D'après **Benkhaldi, (2017)** des valeurs de CMIB ≤ 80 mg/mL ont été obtenus par l'extrait de *Citrullus colocynthis* à l'égard des souches testées (*E.coli*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*).

Les résultats de l'étude d'**Aljabry et al., (2019)** ont montré que les extraits de *C. colocynthis* ont une activité antibactérienne contre les micro-organismes testés (*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*) ainsi que des propriétés antifongiques contre *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. Cette activité se retrouve dans les deux extraits des graines et des fruits. Par contre **Shaikh et al., (2016)** ont trouvé que l'extrait méthanolique de pulpe de fruit de *C.colocynthis* n'a présenté aucune activité contre toutes les bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *S. epidermidis* et *B. cereus*), à Gram négatif (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *S.typhi*) et des champignons étudiés (*C. albicans*, *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.*).

D'après une étude réalisée par **Eidi et al., (2015)**, l'activité antifongique de *C. colocynthis* est élevée par rapport à l'amphotéricine B, le médicament antifongique standard. Cette action inhibitrice pourrait être attribuée à la présence de composés actifs, notamment des glucosides et des résines qui inhibent l'activité enzymatique dans la membrane cytoplasmique, de la colocynthidine et des alcaloïdes de colocynthine qui peuvent perturber la membrane cytoplasmique des micro-organismes par leur action sur les lipides et les protéines (**Eidi et al., 2015**). De plus, ces composés peuvent pénétrer la membrane cytoplasmique et entrer en compétition pour les sites actifs de certaines enzymes qui sont essentielles à la multiplication des microorganismes à l'intérieur de la cellule (**Tarraf et al., 2019**).

L'étude phytochimique qualitative menée sur *C. colocynthis* a montré qu'elle est constituée de métabolites secondaires tels que les saponines, les tanins, les alcaloïdes, les glycosides et les flavonoïdes. Il a été signalé que les tanins empêchent le développement des micro-organismes en précipitant les protéines microbiennes et en rendant les protéines nutritionnelles indisponibles pour eux (**in Bnyan et al., 2013**). En outre, il a été montré que le mécanisme de toxicité des flavonoïdes vis-à-vis des micro-organismes se fait soit par privation des ions métalliques tels que le fer, soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires des micro-organismes (les adhésines) ou encore les enzymes (**in Basli et al., 2012**).

Les extraits éthanoliques de fruits, feuilles, tiges et racines de *C. colocynthis* se sont avérés actifs contre les bacilles à Gram positif, à savoir *Bacillus pumilus* et *S. aureus* tandis que l'activité à l'égard des bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) était faible (**Alshammary et Ibrahim, 2014**).

Les bactéries à Gram négatif ont généralement une plus grande résistance aux extraits de plantes que les bactéries à Gram positif. Cela peut être attribué à la caractéristique distincte de la morphologie des parois cellulaires des bactéries à Gram négatif qui, contrairement à celles des bactéries à Gram positif, comportent une membrane externe composée de lipopolysaccharides (LPS) qui constitue une barrière efficace réduisant la diffusion et les effets des molécules antimicrobiennes, ainsi que la présence de certaines enzymes dans l'espace périplasmique qui décomposent les molécules antibactériennes (**Famuyide et al., 2019**). Le LPS, grâce à ses charges négatives de surface, empêche la diffusion des molécules hydrophobes, et les protéines excluant le passage des molécules hydrophiles de poids moléculaire élevé (**Basli et al., 2012**).

D'après une étude de **Eroğlu et al., (2020)**, les extraits de fruits de *B. vulgaris* ont montré une activité antimicrobienne contre *B. cereus*, *S. typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* et *S. aureus*..

B. vulgaris est principalement composée de l'alkaloïde d'isoquinoléine : la berbérine qui est connu pour ses propriétés antimicrobiennes à l'égard de divers micro-organismes, notamment les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus (**Dinesh et Rasool, 2019 ; Kocić et al., 2019**). L'étude phytochimique des racines de *B. vulgaris* a également révélé la présence de flavonoïdes, de saponine, de composés phénoliques, de terpénoïdes et de glycosides cardiaques (**Ebrahimi et al., 2017**).

L'étude des mécanismes de l'activité bactéricide de la berbérine a montré qu'elle altère la membrane, inhibe la synthèse de l'ADN, des protéines et l'activité de l'arylamine-N-acétyltransférase chez *Salmonella Typhi*. De plus, la berbérine bloque l'adhésion de *Streptococcus pyogenes* aux cellules épithéliales de l'hôte première étape de l'infection (**Wu et al. 2005 in Peng et al., 2015**). La berbérine est également un excellent intercalant d'ADN et il est donc peu probable qu'une résistance due à la modification de la cible se développe contre elle (**In Malik et al., 2017**). En outre, les composés phénoliques ont un effet antimicrobien par divers mécanismes, notamment le changement de la perméabilité de la cellule microbienne, l'inhibition de l'activité enzymatique, de la synthèse des protéines et des acides nucléiques, ainsi que l'interaction avec les protéines membranaires par des liaisons hydrogènes et hydrophobe qui modifie leur structure et leur fonction (**Riazi et al., 2015; Olszewska et al., 2020**).

La berbérine a montré un excellent effet antibiofilm contre des souches de *S. aureus* et un effet inhibiteur sur un grand nombre de micro-organismes (**Tan et al., 2019**). Les composés polyphénoliques inhibent souvent l'adhésion aux surfaces. Ces composés végétaux sont efficaces pour réduire la colonisation microbienne (**Muthusamy et Shanmugam, 2020**).

Dernièrement plusieurs études ont été menées sur l'évaluation des effets des huiles essentielles vis-à-vis les biofilms, visant leur utilisation comme désinfectants surtout dans l'industrie agroalimentaire. Ces études ont révélé la capacité de plusieurs huiles essentielles à dégrader et/ou éliminer les biofilms (**Barchan et al., 2016**). **Miladi et al. (2017)** ont montré que des composés naturels tels que l'eugénol, le thymol et le carvacol ont inhibé la formation de biofilm de *S. typhimurium* de plus de 50%.

La formulation du désinfectant à base de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* a permis une réduction significative des populations résiduelles adhérentes aux surfaces, aboutissant dans certains cas à l'élimination totale du biofilm (Kalai et al., 2018).

L'excellente capacité des extraits de plantes à interférer avec le stade initial de la formation du biofilm bactériens peut être attribuée à la perturbation des forces telles que les forces de Van der Waals et d'interaction électrostatique qui favorisent la déposition et l'adhésion des bactéries aux surfaces (Famuyide et al., 2019).

Les substances phytochimiques présentes dans les HE leur confèrent des propriétés antimicrobiennes et des propriétés antioxydantes qui les rendent utiles comme conservateurs alimentaires (Salehi et al., 2019). Bien que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de plantes soit largement signalée, leur application dans les produits frais reste difficile en raison de leur nature hydrophobe et leur effet sur la qualité organoleptique qui limite leur utilisation. Ces inconvénients ont récemment été atténués par l'encapsulation, en particulier grâce à la technique de nanoémulsion. La nanoémulsion est incolore et plus stable que les émulsions conventionnelles, elle s'est avérée avoir une meilleure activité (Lin et Tsao, 2019). Par ailleurs les interactions synergiques entre les différentes huiles essentielles peuvent également diminuer leurs effets organoleptiques négatifs en les rendant efficaces même à des doses plus faibles (Sharma et al., 2020). De même, il a été démontré que les agents antimicrobiens naturels microencapsulés incorporés dans les emballages alimentaires contrôlent toute une série de micro-organismes et permettent donc de mieux préserver les caractéristiques organoleptiques, la sécurité et la durée de conservation d'un produit (Olszewska et al., 2020). L'utilisation de substances naturelles dans l'industrie pharmacologique minimise les dangers et les allergies habituellement associés aux produits chimiques (Aljabry et al., 2019).

Bien que les extraits de plantes et autres produits naturels sont parfois considérés sans danger, il est nécessaire de déterminer leur cytotoxicité pour fournir des preuves scientifiques de leur innocuité (Famuyide et al., 2019).

CONCLUSION

Conclusion

La formation d'un biofilm est l'un des moyens d'action indirects par lesquels les bactéries sont résistantes aux différents agents antimicrobiens et qui permet également de transférer des gènes de résistance au sein de la microcommunauté du biofilm. Aujourd'hui, à l'ère des organismes multirésistants, les biofilms soulignent la nécessité de renforcer les moyens de lutte contre la résistance des microorganismes aux agents antimicrobiens et d'améliorer les conditions et mesures d'hygiène pour prévenir la formation d'un biofilm.

Dans le cadre d'améliorer l'hygiène des laboratoires de notre faculté, nous avons analysé la contamination microbienne de l'environnement (air, surfaces). Nous avons constaté que la charge microbienne est importante et la flore est riche et que le laboratoire N° 03 présente la contamination la plus importante. L'isolement et l'identification des souches bactériennes ont montré une contamination de l'environnement des laboratoires par des bactéries d'origine environnementale tel que *Bacillus cereus* et d'autres d'origine humaine telles que des entérobactéries et des *Staphylococcus*.

Des études récentes sur l'activité antimicrobienne des produits naturels visent à trouver des composés qui pourraient potentialiser l'activité bactéricide d'antibiotiques connus contre des souches bactériennes multirésistantes et être utilisés comme désinfectant des surfaces dans les industries agro-alimentaires. Les résultats de différentes études ont montré des activités antimicrobiennes et antibiofilm importantes des extraits de *Citrullus colocynthis* et *Berberis vulgaris* vis-à-vis de nombreux micro-organismes (**Latti, 2018 ; Benkhaldi, 2017**). L'activité antimicrobienne dépendait de la souche bactérienne, de l'organe végétal, de son état de maturation et de la nature de l'extraction. Les parties aériennes de ces plantes, les racines et les extraits de fruits constituaient une bonne source de composés bioactifs présentant des bonnes propriétés antimicrobiennes.

Enfin, il serait souhaitable que cette investigation soit complétée par :

- d'autres études plus détaillées et plus approfondies pour découvrir les composés bioactifs spécifiques responsables des propriétés antimicrobiennes.
- Les extraits actifs devraient être testés pour une synergie potentielle avec d'autres antimicrobiens.
- Des essais *in situ* par incorporation des extraits actifs dans des formulations pour le nettoyage et la désinfection des surfaces et de l'environnement des laboratoires.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

-A-

- **Albertini, R., Colucci, M. E., Turchi, S., et Vitali, P. (2020).** The management of air contamination control in operating theaters : The experience of the Parma University Hospital (IT). *Aerobiologia*, 36(1):119-123. <https://doi.org/10.1007/s10453-019-09572-4>
- **Aliyu, A. B., Koorbanally, N. A., Moodley, B., Singh, P., et Chenia, H. Y. (2016).** Quorum sensing inhibitory potential and molecular docking studies of sesquiterpene lactones from *Vernonia blumeoides*. *Phytochimie*, 126:23-33. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.02.012>
- **Aljabry, A. S., Ahmed Alrasheid, A., et Ramadan, E. (2019).** *Citrullus Colocynthis* a Prospective Antimicrobial and Antifungal Agent. *American Journal of Medicine and Medical Sciences*, 9(2):41-45. <https://doi.org/10.5923/j.ajmms.20190902.01>
- **Alshammary, A.S., et Ibrahim, N.A. (2014).** Antimicrobial Activity of *Citrullus Colocynthis* Extracts Against Soil Bacteria. *Global Journal of Biology, Agriculture and Health Sciences*, 3(4): 71-73.
- **Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L. M., Briandet, R., et Cotter, P. D. (2019).** Biofilms in Food Processing Environments : Challenges and Opportunities. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1):173-195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805>
- **Alvesalo, J., Vuorela, H., Tammela, P., Leinonen, M., Saikku, P., et Vuorela, P. (2006).** Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures. *Biochemical pharmacology*, 71(6):735–741.
- **Anderson, G. G., et O'Toole, G. A. (2008).** Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Current topics in microbiology and immunology*, 322 :85–105. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_5
- **Ashurst, P. R., et Hargitt, R. (2009).** Manufacture of soft drinks and fruit juices. In *Soft Drink and Fruit Juice Problems Solved*. (p.60-82). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845697068.60>

- **Augustin, JM., Kuzina, V., Andersen, SB. et Bak S. (2011).** Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*.72(6):435-457.doi:10.1016/j.phytochem.2011.01.015

-B-

- **Badis, A., Laouabdia ND., Guetarni, D., Kihal, M. et Ouzroute R. (2005).** Caractérisation Phénotypique Des Bactéries Lactiques Isolées A Partir De Lait Cru De Chevre De Deux Populations Caprines Locales "ARABIA ET KABYLE". *Sciences et technologie*, 23:30-37.
- **Badri, DV., Weir, TL, van der Lelie D. et Vivanco JM.(2009)** Rhizosphere chemical dialogues:plant-microbe interactions. *Curr.Opin.Biotechnol.* 20(6):642–50.doi:10.1016/j.copbio.2009.09.014
- **Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., et Laglaoui, A. 2016).** Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de Mentha : *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*. *Phytothérapie*, 14(2):88-96. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-0970-y>
- **Basli, A., Chibane, M., Madani, K., et Oukil, N.(2012).** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10(1): 2-9. <https://doi.org/10.1007/s10298-012-0683-9>
- **Baumann, A. R., Martin S. E., et Feng, H. (2009).** Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. *Journal.of.food.protection*, 72 (6) :1306–1309. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.6.1306>.
- **Benkhaldi D. (2017).** Activité antimicrobienne des extraits végétaux application à l'inhibition de biofilm des bacilles thermophiles d'origine laitière. Mémoire de Master en Biologie : Microbiologie Appliquée. Université de Tlemcen.
- **Bhunia A.K. (2018).** *Staphylococcus aureus*. in Foodborne Microbial Pathogens : Mechanisms and Pathogenesis (New York, NY Springer). Pp.181-192
- **Blazjewski, C., Wallet, F., et Nseir, S. (2014).** Quoi de neuf dans les techniques de désinfection des chambres de réanimation ? *Réanimation*,23(3):256-262.<https://doi.org/10.1007/s13546-014-0884-y>

- **Bnyan, I., Hasan, H., et Ewadh, M. (2013).** Antibacterial Activity of *Citrullus Colocynthis* against different types of bacteria. *Advances in Life Science and Technology* 7:48-52
- **Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P., et Aubourg, S. P. (2014).** Antibacterial, Antiviral and Antifungal Activity of Essential Oils : Mechanisms and Applications. In T. G. Villa & P. Veiga-Crespo (Éds.), *Antimicrobial Compounds* (p. 51-81). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40444-3_3
- **Bouharb, H., Badaoui, K. E., Zair, T., Amri, J. E., Chakir, S., et Alaoui, T. (2014).** Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences*, 78:6685-6693. <https://doi.org/10.4314/jab.v78i1.3>
- **Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., et Dakka, N. (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1118-z>
- **Brackman, G., et Coenye, T. (2015).** Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents *current pharmaceutical design*, 21(1):5–11. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905114627>.
- **Branger Alain, Branger Alain, Richer Marie-Madeleine, et Roustel Sébastien. (2008).** *Microbiochimie et alimentation / ouvrage collectif; coordination, Alain Branger, Marie-Madeleine Richer, Sébastien Roustel*. Éducagri éd. Dijon. P. 146
- **Bremer, P. J., Fillery, S. et Mc Quillan, A. J. (2006).** Laboratory scale Clean-In- Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int. J. Food Microbiol.* 106:254–262. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.004.
- **Briandet, R., Lacroix-Gueu, P., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E., Steenkeste, K., Bellon-Fontaine, M. N., et Fontaine-Aupart, M. P. (2008).** Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 74(7):2135–2143. <https://doi.org/10.1128/AEM.02304-07>. PMID: 18245240

- **Bridier A., Sanchez-Vizueté P., Guilbaud M., Piard J. C., Naïtali M., et Briandet, R. (2015).** Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food microbiology*, 45:167-178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.01>
- **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Ed Tec&Doc. Paris.P: 145.
- **Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., et Kjelleberg, S. (2006).** Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 72(6) : 3916–3923. doi: 10.1128/aem.03022-05

-C-

- **Carpentier, B., et Cerf, O. (1993).** Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *The Journal of applied bacteriology*, 75(6) : 499–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01587.x>
- **Caillet S. et Lacroix M (2006)** Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69(12):2961–2969.
- **Ceri, H., Olson, M. E., & Turner, R. J. (2010).** Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 11(8) :1233–1237. <https://doi.org/10.1517/14656561003724747>.
- **Chaouche, T. Med, Haddouchi, F., Zerhouni, K. et Sidi-Yakhlef, A. (2016).** Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*. *Afrique science* 12 (3):144-150.
- **Characklis W. G. et Marshall K. C. (eds). (1990).** “Biofilm processes,” in *Biofilms*, New York, NY: John Wiley & Sons, 195–231.

- **Chmielewski, R. a. N., et Frank, J. F. (2003).** Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1): 22-32. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x>
- **Christensen, LD., Moser, C., Jensen PO., Rasmussen, TB., Christophersen,L., Kjelleberg S, Kumar N, Hoiby N, Givskov M, Bjarnsholt T (2007)** .Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an *in vivo* intraperitoneal foreign-body infection model.*Microbiology*,153:2312-2 320.doi: 10.1099/mic.0.2007/006122
- **Christiansson, A., Bertilsson, J., et Svensson, B. (1999).** *Bacillus cereus* Spores in Raw Milk : Factors Affecting the Contamination of Milk During the Grazing Period. *Journal of Dairy Science*, 82(2): 305-314. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75237-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75237-9)
- **Clinical and Laboratory Standards Institute.(2012).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. M100-S22. Wayne: PA: CLSI.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute, (2015)** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: CLSI.
- **Coleman, J. J., Okoli, I., Tegos, G. P., Holson, E. B., Wagner, F. F., Hamblin, M. R., et Mylonakis, E. (2010).** Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS chemical biology*, 5(3): 321–332. <https://doi.org/10.1021/cb900243b>
- **Compean, K. L., et Ynalvez, R. A. (2014).** Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: a Review. *Research Journal of Medicinal Plants*, 8(5): 204–213. DOI: 10.3923 / rjmp.2014.204.213
- **Cookson A. L., Cooley, W. A., et Woodward, M. J. (2002).** The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *International journal of medical microbiology*, 292(3-4):195–205.[https://doi.org/ 10.1078/1438-4221-00203](https://doi.org/10.1078/1438-4221-00203).

- **Cortes ME, Consuegra J. et Sinisterra RD (2011).** Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. *Sci Against Microbial Pathog Commun Curr Res Technol Adv* 2:896–905.
- **Costerton, J. W., Geesey, G. G., et Cheng, K. J. (1978).** How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1):86–95. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>
- **Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., et Alvarez-Ordóñez, A. (2016).** New Weapons to Fight Old Enemies : Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Frontiers in Microbiology*, 7:1-21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01641>
- **Cox, S. D., Mann, C. M., et Markham, J. L. (2001).** Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of applied microbiology*, 91(3):492–497. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01406.x>
- **Cushnie, T. P., et Lamb, A. J. (2011).** Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 38(2) :99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>

-D-

- **Dadi, PK., Ahmad M., et Ahmad Z. (2009).** Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *International journal of biological macromolecules*, 45(1):72-79. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.04.004>
- **Daglia, M. (2012).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2):174-181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>.
- **Dancer S. J. (2009).** The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *The Journal of hospital infection*, 73(4):378–385. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.03.030>.
- **D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., et Masella, R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 43(4):348–361.

- **da Silva, E.P., et De Martinis, E.C. (2013).** Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3): 957–968. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4611-1>
- **Davey, M.E., et O'toole, G.A. (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4):847–867. <https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.847-867.2000>
- **David, C., et Balty, I. (2014).** La désinfection des surfaces en laboratoire de biologie. 40. institut national de recherche et de sécurité (INRS).ED 6188.
- **Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., et Greenberg, E. P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm *Science (New York, N.Y.)*, 280(5361) :295–298. <https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295>
- **de Kievit, T. R., & Iglewski, B. H. (2003).** Quorum Sensing and Microbial Biofilms. In M. Wilson & D. Devine (Éds.), *Medical Implications of Biofilms* (1^{re} éd., p. 18-35). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511546297.003>
- **Denis F., Bingen E., Martin C. Ploy M-C, et Quentin R. (2011).** Bactériologie médicale : Techniques usuelles. 2^{ème} Edition. Elsevier Masson. Les Molineaux Cedex.
- **Donlan R. M. (2002).** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9):881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>.
- **Dong, Y. H., et Zhang, L. H. (2005).** Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 43 : 101–109.
- **Donlan R.M. et Costerton J.W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2): 167–193. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. PMID: 11932229
- **Donlan, R.M. (2009).** Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol.* 17(2) : 66–72. doi:10.1016/j.tim.2008.11.002.

-E-

- **Ebrahimi, A., Moazami, B., Mahzoonieh, M. R., et Lotfalian, S. (2017).** Antibacterial and ciprofloxacin -potentiation activities of *Berberis vulgaris* L. root extracts against some gram-negative pathogenic bacteria. *Advanced Herbal Medicine*, 3(1):20-25.
- **Eidi, S., Azadi, H. G., Rahbar, N., et Mehmannaavaz, H. R. (2015).** Evaluation of antifungal activity of hydroalcoholic extracts of *Citrullus colocynthis* fruit. *Journal of Herbal Medicine*, 5(1):36-40. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2015.01.003>
- **El-Habib R (2012).** Antifungal activity of some essential oils on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 10(2):274–279.
- **Emanuel G. et Lorrence H.G. (2009).** Practical handbook of microbiology. CRC press. USA, pages : 853.
- **Endersen L., O'Mahony J., Hill C., Ross R.P., McAuliffe O., et Coffey A. (2014).** Phage therapy in the food industry. *Annu. Rev. Food. Sci. Technol.* 5(1) :327–349. doi:10.1146/annurev-food-030713-092415
- **Eroğlu, A. Y., Çakır, Ö., Sağdıç, M., et Dertli, E. (2020).** Bioactive Characteristics of Wild *Berberis vulgaris* and *Berberis crataegina* Fruits. *Journal of Chemistry*, 2020:1-9. <https://doi.org/10.1155/2020/8908301>
- **Espinal, P., Martí, S., et Vila, J. (2012).** Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of Hospital Infection*, 80(1):56-60. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.08.013>

-F-

- **Faille, C., Lequette, Y., Ronse, A., Slomianny, C., Garénaux, E., et Guerardel, Y. (2010).** Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium : Consequences on their ability to adhere to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3) :125-135. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.038>

- **Famuyide, I. M., Aro, A. O., Fasina, F. O., Eloff, J. N., et McGaw, L. J. (2019).** Antibacterial and antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated south African *Eugenia* and *Syzygium* (Myrtaceae) species and their selectivity indices. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1):141. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2547-z>
- **Featherstone, S. (2015).** Cleaning and sanitising. In *A Complete Course in Canning and Related Processes* (p.149-171).Elsevier.<https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-677-7.00008-6>
- **Fessenden, R. J., et J. S. Fessenden. (1982).** Organic chemistry, 2nd ed. Willard Grant Press, Boston, Mass.
- **Fialho, J. F., Naves, E. A., Bernardes, P. C., Ferreira, D. C., dos Anjos, L. D., Gelamo, R. V., ... et de Andrade, N. J. (2018).** Stainless steel and polyethylene surfaces functionalized with silver nanoparticles.*Food.Sci..Technol.Int*, 24(1):87-94.
- **Filloux, A., et Vallet, I. (2003).** Biofilm : Mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *médecine/sciences*, 19(1):77-83. <https://doi.org/10.1051/medsci/200319177>
- **Fleming, D., et Rumbaugh, K. (2017).** Approaches to Dispersing Medical Biofilms. *Microorganisms*, 5(2):15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020015>
- **Flemming, H.-C., et Wingender, J. (2010).** The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9):623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- **Foster T.J. (2004).** The *Staphylococcus aureus* "superbug". *The Journal of Clinical Investigation*, 114(12): 1693-1695.

-G-

- **Gambello, MJ., Kaye S., et Iglewski, BH (1993)** LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of *exotoxin A* expression. *Infect. Immun.* 61(4): 1180-1184. doi:10.1128/IAI.61.4.1180-1184.1993
- **Garrett, T. R., Bhakoo, M., et Zhang, Z.(2008).** Bacterial adhesion and biofilms on surfaces.*Progress in Natural Science*,18(9):1049-1056.<https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>

- **George, E.A., Novick, R.P., et Muir, T.W.(2008).** Cyclic peptide inhibitors of staphylococcal virulence prepared by Fmoc-based thiolactone peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 130(14) :4914–4924. <https://doi.org/10.1021/ja711126e>.
- **Ghigo,J.M.(2001).**Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development.*Nature* 412(6845):442–445. <https://doi.org/10.1038/35086581>
- **Gledhill JR, Montgomery MG., Leslie, AGW., et Walker JE (2007)** .Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34) : 13632–13637. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706290104>
- **Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., et Cotter, P. D. (2015).** The Prevalence and control of Bacillus and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Frontiers in Microbiology*, 6:1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01418>
- **Gordon, S. B., et Parry, E. (2013).** Streptococcus pyogenes and Staphylococcus aureus. In D. Mabey, G. Gill, M. W. Weber, & C. J. M. Whitty (Éds.), *Principles of Medicine in Africa* (4^{ème} éd.,p.316-322).Cambridge University Press.<https://doi.org/10.1017/CBO9780511751660.024>.
- **Granum P., et Lindbäck T. (2013).** *Bacillus cereus*,. In Doyle M, Buchanan R (ed), *Food Microbiology*. p 491-502 ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555818463.ch19
- **Greay, Sara et Hammer, Katherine. (2011).** Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. *Phytochemistry Reviews* . 14 :1-6. DOI :10.1007/s11101-011-9212-6.
- **Guinoiseau E. (2010)** : Molécules antibactériennes issues d’huiles essentielles : séparation, identification et mode d’action. Thèse de doctorat. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Corse.

- **Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., et Tribedi, P. (2015).** Biofilm, pathogenesis and prevention: a journey to break the wall : A review. *Archives of Microbiology*, 198(1):1-15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>
- **Gutiérrez D., Rodríguez-Rubio L., Martínez B., Rodríguez A., et García P. (2016).** Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Frontiers in microbiology*, 7 : 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825>.
- **Gutiérrez, D., Ruas-Madiedo, P., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2014).** Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PloSone*, 9(9):107307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107307>

-H-

- **Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews.Microbiology*, 2(2):95-108.<https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- **Hallouët, P., Eggers, J., et Malaquin-Pavan, E. (2008).** Nettoyage et désinfection des locaux. In *Fiches de soins infirmiers* (p. 72-77). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-2-294-70428-4.50008-5>
- **Hamadouche, M. (2020).** Moyens de prévention du risque d'exposition au SARS-Cov-2 : Enquête auprès des pharmaciens d'une ville de l'Est Algérien. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*. <https://doi.org/10.1016/j.admp.2020.06.005>
- **Hartemann, P. (2019).** Le prélèvement bactériologique des surfaces : Que mesure-t-on réellement ?. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2019(516):49-54.[https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(19\)30492-7](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(19)30492-7)
- **Hennekinne, J.A., et Le Loir, Y. (2014).** STAPHYLOCOCCUS | Detection by Cultural and Modern Techniques. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (p.487-493).Elsevier.<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00318-9>
- **Hilaire, D. J.-C., Audry-Blanchard, A., Breton, N., Bihan, M.-R. le, Negre, M., Lefebvre, A., et Allouch, P.-Y. (2007).** Utilisation de la méthode vapeur au quotidien. *Higiène*, 15(4):312-315.

- **Holmes, C. W., Hughes, T. P., & Christensen, R. (1978).** Energy metabolism of Brahman × Friesian and Friesian calves, and the influence of an increase in rectal temperature on their heat production. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21(4):557-561. <https://doi.org/10.1080/00288233.1978.10427450>
- **Hmelo, L. R. (2017).** Quorum Sensing in Marine Microbial Environments. *Annual Review of Marine Science*, 9(1):257-281. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010816-060656>
- **Hurlow, J., Couch, K., Laforet, K., Bolton, L., Metcalf, D., & Bowler, P. (2015).** Clinical Biofilms: A Challenging Frontier in Wound Care. *Advances in wound care*, 4(5):295–301. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0567>
- **Hussain, A. I., Rathore, H. A., Sattar, M. Z. A., Chatha, S. A. S., Sarker, S. D., & Gilani, A. H. (2014).** *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (bitter apple fruit): A review of its phytochemistry, pharmacology, traditional uses and nutritional potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1):54-66. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.011>

-I-

- **International Organization for Standardization ISO 7932:2004)** Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présumptifs — Technique par comptage des colonies à 30 degrés C

-J-

- **Jefferson KK. (2004).** What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* 236(2):163–73. DOI : 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x.
- **Joffin, J.N et Layeral,G., (2006).**Microbiologie technique. Tom 1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux, France: Centre Régional De Documentation Pédagogique, 368

-K-

- **Kalai, A., Malek, F., et Bousmaha-Marroki, L. (2018).** Effect of *Thymus ciliatus* oil-based disinfectant solutions against bio- films formed by *Bacillus cereus* strains isolated from pasteurized-milk processing lines in Algeria. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 8(1):1-12.
- **Kaplan J. B. (2010).** Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of dental research*, 89(3):205–218.
- **Kim, M. K., Zhao, A., Wang, A., Brown, Z. Z., Muir, T. W., Stone, H. A., et Bassler, B. L. (2017).** Surface-attached molecules control *Staphylococcus aureus* quorum sensing and biofilm development. *Nature microbiology*, 2(8) :17080. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.80>.
- **Klein, J.-P. (2012).** Le poste de sécurité microbiologique : De la réglementation à l'accréditation. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2012(445), 91-100. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(12\)71681-7](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(12)71681-7)
- **Kloos W.E. et Veron M. (1990).** Bactériologie Médicale «Staphylococcus et Micrococcus» J.Fleurette 2^{ème} édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773-794.
- **Kocić, B. D., Dimitrijević, M. V., Miladinović, L. C., Marković, M. S., Ranković, G. Ž., & Miladinović, D. L. (2019).** *In Vitro* Anti-Helicobacter pylori Activity of Berberine and Barberry Extracts: A Preliminary Report. *Natural Product Communications*, 14(6):1-3. <https://doi.org/10.1177/1934578X19857905>
- **Koudokpon, H., Dougnon, T. V., Bankolé, H. S., Fah, L., Hounmanou, Y. M. G., BABA-MOUSSA, L., & Loko, F. (2017).** Enquête Ethnobotanique sur les Plantes Utilisées dans le Traitement des Infections au Sud-Bénin. *Health Sci. Dis*, 18(2): 92-99.
- **Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M., & Chaieb, K. (2015).** Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. *Microbial pathogenesis*, 80 :39–49. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.02.007>
- **Kumar, CG, et Anand, SK. (1998).** Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol* 42(1):9–27.

- **Kumari, S., et Sarkar, P. K. (2016).** Bacillus cereus hazard and control in industrial dairy processing.environment..*Food.Control*,69 :20–29.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.012>

-L-

- **Latti N.(2018).** Effet des extraits de quelques plantes médicinales sur des biofilms bactériens. Mémoire de Master en Biologie, Microbiologie et contrôle de qualité. Université de Tlemcen
- **Le Berre, R., Faure, K., Nguyen, S., Pierre, M., Ader, F., & Guery, B. (2006).** Quorum sensing : Une nouvelle cible thérapeutique pour *Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 36(7):349-357. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2006.01.008>
- **Le Gallou, F., et Lepelletier, D. (2017).** Contrôles particulières et microbiologiques de l'air et contrôles microbiologiques des surfaces dans les établissements de santé. *Biologie médicale*, 12(4):12.
- **Le, K. Y., et Otto, M. (2015).** Quorum-sensing regulation in staphylococci:An overview. *Frontiers in Microbiology*, 6:1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01174>
- **Lepsanovic, Z., Djordjevic, V., Lakicevic, B., Savic, D., Velebit, B., Josic, D., et Karabasil, N. (2018).** Detection of toxin genes and randomly amplified polymorphic DNA typing of *Bacillus cereus* isolates from infant milk formulas. *Journal of Food Safety*, 38(4):1-7. <https://doi.org/10.1111/jfs.12474>
- **Lesley, M. B., Ernie, S. R., Kasing, A., et Son, R. (2017).** Detection of *Bacillus cereus* in formula milk and ultra high temperature (UHT) treated milk products. *International Food Research Journal*, 24(3) :985–989.
- **Lewis K. (2008).** Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current topics in microbiology and immunology*, 322 : 107–131. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_6.
- **Lin, H., et Tsao, R. (2019).** Antimicrobials From Plants:Food Preservation and Shelf Life Extensionq.*Comprehensive Biotechnology*, 3rd Edition,4:703-714.<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00249-4>

- **Lu, X., Tang, K., et Li, P. (2016).** Plant Metabolic Engineering Strategies for the Production of Pharmaceutical Terpenoids. *Frontiers in plant science*, 7:1-11.
- **Lugasi A, Hovari J, Sagi K.V., et Biro L. (2003).** The Role of Antioxidant of the Flavonoids Luteolin. Mini-Reviews In *Medicinal Chemistry*, 9 :31-59.

-M-

- **Malek, F., Boudjemaa, B. M., Aouar-Métri, A., et Kihal, M. (2013).** Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria. *Dairy Science & Technology*, 93(1):73-82. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0093-2>
- **Malek, F. (2019).** Bactéries sporulées et biofilms : Un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombiné pasteurisé. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(6):405-420. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0435>
- **Malik, T. A., Kamili, A. N., Chishti, M. Z., Ahad, S., Tantry, M. A., Hussain, P. R., & Johri, R. K. (2017).** Breaking the resistance of *Escherichia coli*: Antimicrobial activity of *Berberis lycium* Royle. *Microbial Pathogenesis*, 102:12-20. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.011>
- **Marchal, N. et Bourdon, J.L. (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin. Paris, pages : 482.
- **Maric, S, et Vranes J (2007).** Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Period Bilogor* 109(2) :115–121
- **Martineau, B. (1996).** Systématique bactérienne, Guide d'identification des bactéries aérobies. Edition Déclaré, Montréal. ISBN: 2891371518.
- **Melaugh G., Hutchison J., Kragh K. N., Irie Y., Roberts A., Bjarnsholt, T., Diggle S. P., Gordon V. D., et Allen R. J. (2016).** Shaping the Growth Behaviour of Biofilms Initiated from Bacterial Aggregates. *PloS one*, 11(3),1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.014683>

- **Mezouar D. (2014).** Recherche d'activités biologiques de *Berberis vulgaris*. Mémoire de Magister en Biologie : Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien. Université de Tlemcen.
- **Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Chaabouni, Y., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., & Chaieb, K. (2017).** Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. *Microbial pathogenesis*, 104:56–63. <https://doi.org/10.016/j.micpath.2017.01012>
- **Mion, S., Rémy, B., Plener, L., Chabrière, É., et Daudé, D. (2019).** *Quorum sensing et quorum quenching* : Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence ? *médecine/sciences*, 35(1): 31-38. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018310>
- **Mocan, A., Vlase, L., Vodnar, D. C., Gheldiu, A. M., Oprean, R., et Crişan, G. (2015).** Antioxidant, Antimicrobial Effects and Phenolic Profile of *Lycium barbarum* L. Flowers. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(8) :15060–15071. <https://doi.org/10.3390/molecules200815060>
- **Mojaddar Langroodi, A., Ebadi Fathabad, A., Moulodi, F., Mashak, Z., et Alizade Khaled Abad, M. (2018).** Antioxidant and Antimicrobial Activities of Aqueous and Ethanolic Extracts of Barberry and Zataria multiflora Boiss Essential Oil Against Some Food-Borne Bacteria. *Journal of Kermanshah University of Medical Sciences*, 22(2):1-7. <https://doi.org/10.5812/jkums.83087>
- **Müh, U., Schuster, M., Heim, R., Singh, A., Olson, E. R., et Greenberg, E. P. (2006).** Novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors identified in an ultra-high-throughput screen. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11) :3674–3679. <https://doi.org/10.1128/AAC.00665-06>.
- **Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. et Robinow, C. F. (1994).** Determinative and cytological light microscopy. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 22–41. Edited by G. Philipp, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology

- **Muthusamy, B., et Shanmugam, G. (2020).** Analysis of flavonoid content, antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity of in vitro hairy root extract of radish (*Raphanus sativus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (PCTOC)*, 140(3):19-633. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01757-6>

-N-

- **Nakayama, M., Suzuki, K., Toda, M., Okubo, S., Hara, Y., et Shimamura, T. (1993).** Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral research*, 21(4) : 289–299. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(93\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0166-3542(93)90008-7).
- **Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., et Goździcka-Józefiak, A. (2014).** Plant antimicrobial peptides. *Folia microbiologica*, 59(3) :181–196. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0280-4>.
- **Neu, T. R., et Lawrence, J. R. (2015).** Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends in microbiology*, 23(4) :233–242. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.010>
- **Nicolella, C., Chiarle, S., Di Felice, R., et Rovatti, M. (1997).** Mechanisms of biofilm detachment in fluidized bed reactors. *Biofilm Systems III*, 36(1):229-235. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00329-6](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00329-6)
- **Niemira BA, Boyd G, et Sites J. (2014).** Cold plasma rapid decontamination of food contact surfaces contaminated with Salmonella biofilms. *Journal of food science*, 79(5):917–922. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12379>.
- **Nostro A., Roccaro A.S., Bisignano G., Marino A., Cannatelli M.A., Pizzimenti F.C. (2007).** Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of medical microbiology*, 56 :519–523. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46804-0>

-O-

- **Olszewska, M. A., Gędas, A., et Simões, M. (2020).** Antimicrobial polyphenol-rich extracts : Applications and limitations in the food industry. *Food Research International*, 134:1-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109214>
- **Omojate, G.C., Enwa, F.O., Jewo,A.O., et Eze, C.O.(2014).** Mechanisms of Antimicrobial Actions of Phytochemicals against Enteric Pathogens-A Review. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2(2) : 77–85
- **Organisation Mondiale de la Santé (2020).** Nouveau coronavirus (2019-nCoV) : conseils au grand.public.Consultable.sur:<https://www.who.int/fr/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/advice-for-public/myth-busters> (accès le 20 Août 2020).
- **Otto, M. (2013).** Staphylococcal Infections : Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, 64 (1): 175-188. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140023>
- **Oulahal, N.,Martial-Gros,A.,Bonneau,M., et Blum,L.J.(2007).** Removal of meat biofilms from surfaces by ultrasounds combined with enzymes and/or a chelating agent. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 8 : 192–196. doi: 10.1016/j.ifset.2006.10.001
- **Oyeniran, O. I., et Chia, T. (2020).** Lutte contre la pandémie de maladie à coronavirus (Covid-19) : Tirer les leçons de la réponse à la maladie du virus Ebola. *Ethics, Medicine and Public Health*, 100558. <https://doi.org/10.1016/j.jemep.2020.100558>

-P-

- **Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., et Bajpai, V. K. (2017).** Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Frontiers in microbiology*, 7: 2161. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
- **Pasquarella, C., Pitzurra, O., et Savino, A. (2000).** The index of microbial air contamination.*Journal of Hospital Infection*, 46(4):241-256.<https://doi.org/10.1053/jhin.2000.0820>

- **Paton S., Thompson K.A., Parks S.R., et Bennett A. M. (2015).** Reaerosolization of Spores from Flooring Surfaces To Assess the Risk of Dissemination and Transmission of Infections. *Applied and environmental microbiology*, 81(15):4914–4919 .
- **Pelnier, J.-M. Prevosto, J.Y., Dusseau, V., Cheminel, C., Renard, H. Thefenne, Thual A., et Chaulet J.-F (1999).** Hygiène et sécurité au laboratoire : exemples d’actions menées dans le cadre d’une démarche d’assurance qualité. *Annales de Biologie Clinique*.57(5):619-26.
- **Persat A., Nadell, C. D., Kim M. K., Ingremeau F., Siryaporn A., Drescher K., Wingreen N. S., Bassler B. L., Gitai, Z., et Stone, H. A. (2015).** The mechanical world of bacteria. *Cell*, 161(5):988–997. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.005>
- **Prescott, L.M., Hareley J.P. et Klein D.A.(2007).** Microbiologie de Boeck, 3ème édition française. p.134
- **Peterson R.V., et Pitt, W.G.(2000).**The effect of frequency and power density on the ultrasonically-enhanced.killing of biofilm-sequestered.*Escherichia coli*.*Colloids Surf.Biointerfaces* 17:219–227. doi:10.1016/S0927-7765(99) 00117-4
- **Pilchová, T., Hernould, M., Prévost, H., Demnerová, K., Pazlarová, J., et Tresse, O. (2014).** Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 35 : 366–372. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.021.
- **Puligundla P., et Mok C. (2017).** Potential applications of nonthermal plasmas against biofilm-associated micro-organisms *in vitro*. *Journal of applied microbiology*, 122(5) : 1134-1148. <https://doi.org/10.1111/jam.13404>

-Q-

- **Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., et Pouységu, L. (2011).** Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(3):586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>

-R-

- **Rasamiravaka, T., Jedrzejowski, A., Kiendrebeogo, M., Rajaonson, S., Randriamampionona, D., Rabemanantsoa, C.,..... et Vandeputte, O. M. (2013).** Endemic malagasy *Dalbergia* species inhibit quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. PAO1. *Microbiology* 159:924-938. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064378-0>
- **Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., et El Jaziri, M. (2015).** The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* : A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International*, 2015, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
- **Rasmussen, T. B., Manefield, M., Andersen, J. B., Eberl, L., Anthoni, U., Christophersen, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., et Givskov, M. (2000).** How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology (Reading, England)*, 146 :3237–3244. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-12-3237>.
- **Renner, L. D., & Weibel, D. B. (2011).** Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bulletin*, 36(5):347-355. <https://doi.org/10.1557/mrs.2011.65>
- **Rhayour K. (2002).** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté des Sciences Dhar Mehraz –Fès
- **Riazi, F., Zeynali, F., Hosseni, E., & Behmadi, H. (2015).** Determination of the Minimum Inhibitory Concentration of the Barberry Extract and the Dried Residue of Red Grape and Their Effects on the Growth Inhibition of Sausage Bacteria by Using Response Surface Methodology (RSM). *Nutrition and Food Sciences Research*, 2(4):55-63.
- **Richter G., (1993).** Metabolisme des végétaux (physiologie et biochimie). Ed : presses polytechnique et universitaire Romandes. P 321.
- **Roux, A., & Ghigo, J.-M. (2006).** Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 3: 261-268. <https://doi.org/10.4267/2042/47842>

- **Rudrappa T, Bais HP (2008).** Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *J Agric Food Chem* 56:1955–1962.
- **Ryther, R. (2014).** Development of a Comprehensive Cleaning and Sanitizing Program for Food Production Facilities. In *Food Safety Management* (p. 741-768). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381504-0.00027-5>

-S-

- **Safefood (2012).** *Whitepaper.Cleaning and Disinfection in Food Processing Operations*. NewYork:Safefood 360,Inc.Available at: <http://safefood360.com/resources/Cleaning.pdf>.
- **Salehi, B., Selamoglu, Z., Sener, B., Kilic, M., Kumar Jugran, A., de Tommasi, N., et Cho, W. (2019).** Berberis Plants:Drifting from Farm to Food Applications, Phytotherapy, and Phytopharmacology. *Foods*, 8(10):1-27. <https://doi.org/10.3390/foods8100522>
- **Sant'anna, J. R., Franco, C. C., Miyamoto, C. T., Cunico, M. M., Miguel, O. G., Côcco, L. C., Yamamoto, C. I., Junior, C. C., et de Castro-Prado, M. A. (2009).** Genotoxicity of Achillea millefolium essential oil in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. *Phytotherapy research* , 23(2):231–235. <https://doi.org/10.1002/ptr.2596>
- **Sampedro, J., et Valdivia, E. R. (2014).** New Antimicrobial Agents of Plant Origin. In T. G. Villa & P. Veiga-Crespo (Éds.), *Antimicrobial Compounds* (p. 83-114). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40444-3_4
- **Sauer K., Camper AK., Ehrlich GD., Costerton JW. et Davies DG. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184(4):1140–1154. <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>
- **Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Sari-Belkharroubi, L., et Boucherit, K. (2017).** Risque infectieux lié à la formation des biofilms multi-espèces (Candida – bactéries) sur cathéters vasculaires périphériques.*Journal.de Mycologie Médicale*,27(1):20-27. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.10.005>

- **Selka, M. A., Chenafa, A., Achouri, M. Y., Aoued, L., Tareb, S., Nourredine, M. A., & Toumi, H. (2016).** Activité antimicrobienne et antioxydante des feuilles de *Vitis vinifera* L. *Phytothérapie*, 14(6): 363-369. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1036-5>
- **Shaikh, J., Shaikh, D., Rahman, A. B., et Shafi, S. (2016).** Antimicrobial and toxicological studies on fruit pulp of *Citrullus colocynthis* L. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 29 (1):9-15.
- **Sharma, N., et Tripathi, A. (2008).** Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van. Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3):337–344. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.009>.
- **Sharma, A., Singh, S., et Nag, T.N. (2010).** Antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* and *Tribulus terrestris* against some pathogenic bacteria. *Asian Journal of Microbiology and Biotechnology and Environmental Sciences*, 12: 633–637.
- **Sharma, S., Verma, H. N., et Sharma, N. K. (2014).** Cationic Bioactive Peptide from the Seeds of *Benincasa hispida*. *International journal of peptides*, 2014:1-13. <https://doi.org/10.1155/2014/156060>
- **Sharma, K., Guleria, S., Razdan, V. K., et Babu, V. (2020).** Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. *Industrial Crops and Products*, 154:1-14. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112569>
- **Shimose, L. A., Masuda, E., Caban, A. B., et Munoz-Price, L. S. (2018).** Air Contamination in the Hospital Environment. In G. Bearman, S. Munoz-Price, D. J. Morgan, & R. K. Murthy (Éds.), *Infection Prevention* (p.63-172). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60980-5_17
- **Sibi G., Venkategowda A., et Gowda L. (2014).** Isolation and Characterization of Antimicrobial Alkaloids from *Plumeria alba* Flowers against Food Borne Pathogens *American Journal of Life Sciences*. Special Issue: *Recent Developments in Health Care through Plants and Microbes*. 2 :6-1. doi: 10.11648/j.ajls.s.2014020601.11.

- **Siddique, S., Parveen, Z., Baren, F., Mazhar, S., et Chaudhary, M. N (2018).** Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Leaves of Seven Eucalyptus Species Grown in Pakistan. *The J. Anim. Plant Sci.*28 : 222–230.
- **Siddiqui Y.M., Ettayebi M., Haddad A.M et Al-Ahdal M.N(1996).**- Effect of essential oils on the enveloped viruses : antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type 1 and Newcastle disease virus. *Med. Sci.Res.*, 24: 185-186.
- **Singh, R. P., Desouky, S. E., et Nakayama, J. (2016).** Quorum Quenching Strategy Targeting Gram-Positive Pathogenic Bacteria. In G. Donelli (Éd.), *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*,901:109-130.Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/5584_2016_1
- **Smith, K. M., Bu, Y., et Suga, H. (2003).** Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs.*Chemistry and biology*,10(1): 81–89. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(03)00002-4).
- **Soualeh, N., et Soulimani, R. (2016).** Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie*, 14(1):44-57. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1024-9>
- **Squinazi F. (2017).** Analyses en microbiologie :Environnement microbien (air, surfaces, eau). Page 31. Analyse et mesure en biotechnologie, Réf. Internet : 42160 | 4^{ème} édition , Techniques de l'Ingénieur. www.techniques-ingenieur.fr
- **Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., et Costerton, J. W. (2002).** Biofilms as Complex Differentiated Communities.*Annual Review of Microbiology*,56(1):187-209.<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- **Sung L. M. J., Lloyd H. D., et Lindsay A.J. (2008).** Staphylococcus aureus host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology*, 154: 1949-1959.

-T-

- **Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H., et Tan, W. L. (2015).** Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals(Basel,Switzerland)*,8(4) :711-757.<https://doi.org/10.3390/ph8040711>

- **Tan, J., Wang, J., Yang, C., Zhu, C., Guo, G., Tang, J., et Shen, H. (2019).** Antimicrobial characteristics of Berberine against prosthetic joint infection-related *Staphylococcus aureus* of different multi-locus sequence types. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1):1-10. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2558-9>
- **Tapas, A. R., Sakarkar, D. M. et Kakde, R. B. (2008).** Flavonoids as Nutraceuticals: A Review *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*.7(3) 1089-1099.doi:10.4314/tjpr.v7i3.14693.
- **Tarraf, W., Laquale, S., De Mastro, G., et D'Addabbo, T. (2019).** The potential of *Citrullus colocynthis* oil as a biocide against phytoparasitic nematodes. *Crop Protection*, 124:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104843>
- **Teanpaisan, R., Senapong, S., et Puripattanavong, J. (2014).** *In vitro* Antimicrobial and Antibiofilm Activity of *Artocarpus Lakoocha* (Moraceae) Extract against Some Oral Pathogens.*Tropical Journal of Pharmaceutical Research*,13(7):1149-1155.<https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i7.20>
- **Teanpaisan, Rawee, Kawsud, P., Pahumunto, N., et Puripattanavong, J. (2017).** Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(2):172-177. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.06.007>
- **Teresa Fera, M., Carbone, M., De Sarro, A., Blandino, G., Riggio, G., Cusumano, V., Battista De Sarro, G., et Anzani Ciliberti, F. (1998).** Bactericidal activity of lansoprazole and three macrolides against *Helicobacter pylori* strains tested by the timekill kinetic method. *International Journal of Antimicrobial Agents* 10: 285–289.
- **Tremblay, Y. D. N., Hathroubi, S., et Jacques, M. (2014).** *Les biofilms bactériens : Leur importance en santé animale et en santé publique.* *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 78:110-116.
- **Turgis, M., Han, J., Caillet, S., et Lacroix, M. (2009).** Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*, 20(12):1073-1079. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.001>

-U-

- **Ultee, A., Bennik, M. H., et Moezelaar, R. (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4):1561–1568. <https://doi.org/10.1128/aem.68.4.1561-1568.2002>

-V-

- **Vandeputte OM, Kiendrebeogo M, Rasamiravaka T, Stévigny C, Duez P, Rajaonson S, Diallo B, Mol A, Baucher M et El Jaziri M. (2011).** The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology(Reading,England)*, 157:2120–2132. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049338-0>.
- **Vasudevan R (2014)** Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(3):84-98. DOI: 10.15406/jmen.2014.01.00014

-W-

- **Walters, M.C., Roe F., Bugnicourt, A., Franklin M.J., et Stewart, P. S. (2003).** Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(1) :317–323. <https://doi.org/10.1128/aac.47.1.317-323.2003>.
- **Waters, C. M., et Bassler, B. L. (2005).** Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual review of cell and developmental biology*, 21 :319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- **Willcox, M. D. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* infection and inflammation during contact lens wear : a review. *Optometry and Vision Science : Official Publication of the American Academy of Optometry*, 84(4) : 273-278. doi : 10.1097/OPX.0b013e3180439c3e
- **Wu LT, Tsou MF, Ho CC., Chuang JW. Kuo HM. et Chung JG. (2005).** Berberine inhibits arylamine *N*-acetyltransferase activity and gene expression in *Salmonella typhi*. *Current Microbiology*,. 51:255–261. doi:10.1007/s00284-005-4569-7.

- **Wu, Y., Bai, J., Liu, X., Liu, L., Zhong, K., Huang, Y., et Gao, H. (2018).** Antibacterial Effect of 3-P-Trans-Coumaroyl-2-Hydroxyquinic Acid, a Phenolic Compound from Needles of *Cedrus Deodara*, on Cellular Functions of *Staphylococcus aureus*. *RSC Advances*, 8(9): 4969–4975. <https://doi.org/10.1039/C7RA13457F>

-Y-

- **Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Hóiby, N., Molin, S., et Song, Z. J. (2011).** Current understanding of multi-species biofilms. *International journal of oral science*, 3(2):74–81. <https://doi.org/10.4248/IJOS11027>

ANNEXE

- **Milieu Mossel**

Milieu de base

Tryptone	10g
Extrait de viande	1g
D-mannitol	10g
Chlorure de sodium	10g
Rouge de phénol	0.025g
Agar-agar	17g
Après stérilisation à 120°C pendant 20 minutes ajouter :	
Colistine	1×10 ⁶ UI
Emulsion du jaune d'œufs	100mL

pH : 7±0.2

- **Préparation de l'émulsion du jaune d'œufs :**

Utiliser des œufs frais de poule à coquille intacte, nettoyer les œufs avec un détergent liquide à l'aide d'une brosse. Les rincer à l'eau courante ensuite les plonger dans l'alcool à 95°C pendant 30 seconds et les sécher, casser chaque œuf et séparer les jaunes des blancs par transferts répétés du jaune d'une demi coquille dans l'autre.

Placer les jaunes d'œufs dans une éprouvette stérile et ajouter quatre parties en volumes d'eau distillée stérile. Transférer de façon aseptique dans un flacon stérile et mélanger vigoureusement. Porter le mélange au bain d'eau réglé à 45°C pendant 2h et entreposer entre 0 et 5°C pendant 18 à 24h pour permettre au précipité de se former.

Recueillir aseptiquement l'émulsion surnageante.

L'émulsion peut être conservée à 4°C pendant au maximum 72 h.

(ISO 7332 : 1993)

- **Milieu Tryptone sel eau (TSE)**

Peptone	0.5g
Chlorure de sodium	4g
Eau distillée	500mL

Autoclavé à 120°C pendant 20 minutes

- **Gélose nutritive**

Gélose nutritive déshydratée	28g
Eau distillée	QSp 1L

pH :6.8±0.2 à 25°C

Autoclavé à 121°C pendant 20 minutes

- **Milieu Trypticase-Soja-Agar**

Milieu tryptone-soja-agar déshydraté	40g
Eau distillée	Qsp 1L

pH :7.2 ±0.2 à 25°C

Autoclavé à 121°C pendant 20 minutes

- **Bouillon Trypticase-Soja**

Bouillon Tryprone-Soja déshydraté	30g
Eau distillée	Qsp 1L

pH :7.3 ±0.2 à 25°C

Autoclavé à 121°C pendant 20 minutes