



République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN

كلية علوم الطبيعة و الحياة، وعلوم الأرض والكون

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

Département de BIOLOGIE

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'environnement «  
LAMAABE »

**MÉMOIRE**

Présenté par

**HERBACHE khaoula rabab**

En vue de l'obtention du

**Diplôme de MASTER**

En Microbiologie Fondamentale

**Thème**

**Evaluation de l'activité antibiofilm des extraits de graines de *Linum usitatissimum***

Soutenu le 14/06/2022, devant le jury composé de :

Présidente	HASSAINE Hafida	Professeur	Université Tlemcen
Encadrant	MKEDDER Ilham	Maître de conférences A	Université Tlemcen
Examinatrice	BELLIFA Samia	Maître de conférences A	Université Tlemcen

**Année universitaire 2021/2022**

المخلص



# Remerciement

*En tout premier lieu, on remercie le bon Dieu de nous avoir donné la vie, la santé, la foi, la force, le courage et d'avoir fait de nous ce qu'on est aujourd'hui. C'est grâce à ces bénédictions que notre présent travail a vu le jour.*

*On voudrait tous d'abord exprimé toute notre gratitude et nos sincères remerciements à notre directrice de mémoire Madame MKEDDER Ilham pour sa gentillesse, sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils.*

*Toute notre gratitude s'adresse aussi à Madame le professeur HASSAJNE Hafida qui nous a fait l'honneur de présider notre jury, ainsi qu'à Madame BELLIFA Samia qui a accepté d'acquitté la délicate tâche d'examiner notre travail et de participer à la soutenance de ce mémoire.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour la qualité d'enseignement qu'ils nous ont prodigué, leur grande patience et leur soutien dont ils ont su faire preuve durant nos années d'études.*

*On voudrait aussi exprimer notre reconnaissance envers nos familles et amis pour leurs soutiens moral et intellectuelle indéfectibles.*

*Pour finir, on remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de notre modeste travail.*

# Dédicaces

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents qui m'ont donné la vie et qui ont fait de moi la femme dont je suis aujourd'hui ; L'amour que vous me portez, le soutien dont vous m'accordez et la bienveillance dont vous me prouvez m'ont toujours poussé à donner le mieux de moi-même. Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai jamais vous remercier comme il se doit. Merci de m'avoir appris les valeurs de la vie, merci de m'avoir appris que le chemin du bon Dieu est ma seule issue, merci de m'avoir aidé pour tout depuis que je suis née jusqu'à aujourd'hui, merci d'avoir signifié vraiment le mot « famille », merci de m'avoir appris que le savoir, la sagesse et la bonté sont les armes les plus redoutables dont je dois me munir, merci de me rendre aussi forte, merci d'avoir fait de moi ce que je suis, je vous aime tant que Dieu vous bénisse et vous préserve pour nous.*

*A ma chère grand-mère maternelle, qui ses supplications m'ont toujours accompagné dans ses prières, lui souhaitant bonne santé et longue vie.*

*A ma très chère sœur Belkiss et à mon très chère frère Mohamed, vous avoir dans ma vie est une chance inouïe, vous êtes mes piliers, mon bonheur et ma fierté je vous aime tant que Dieu vous garde pour nous.*

*A tous mes amies, Dhoha, Imen, Majda et à toute notre promo, je vous souhaite tout le bonheur et la réussite dans vos vies, ce fut un plaisir de partager ces années d'études avec vous.*

*A tous ceux que j'aime, je vous remercie tous de faire partie de ma vie et me rapporté tant de joie. Puisse Dieu le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.*

*Herbache Khaoula Rabah*

**Table des matières**

### Liste des abréviations

### Liste des figures

### Liste des tableaux

## Introduction 1

## CHAPITRE I : Les Biofilms

I.1. Définition	4
I.2. composition	4
I.3. les facteurs influençant la formation de biofilm :	5
I.3.1. Propriétés de surfaces.	5
I.3.2. Les caractéristiques du milieu.	6
I.3.3. Propriétés des cellules.	6
I.4. les étapes de formation de biofilm :	7
I.4.1. Mise en place d'un film conditionnant.	7
I.4.2. Transfert des cellules bactériennes vers la surface.	7
I.4.3. Adhésion réversible et irréversible.	7
I.4.4. Maturation.	8
I.4.5. Dispersion et détachement cellulaire.	8
I.5. Résistance des biofilms à divers agents antimicrobiens.	9
I.6. Lutte contre les biofilms :	10
I.6.1. L'hygiène.	10
I.6.2. Antibiothérapie.	10
I.6.3. Élimination mécanique du biofilm.	11
I.6.4. Désinfection.	11
I.6.5. Ultrasons et potentialisation de l'action des antibiotiques.	11
I.6.6. Utilisation d'enzymes dégradant les exopolysaccharides de la matrice.	12
I.7. Stratégies thérapeutiques utilisant des produits naturels.	13

## CHAPITRE II : *Linum usitatissimum*

II.1. Définition et historique	15
II.2. classification	16
II.3. description botanique	16
II.4. le plan morphologique	17
II.5. composition des graines de lin	18
II.5.1. Acide gras	18
II.5.2. Les protéines	19
II.5.3. Mucilage	19
II.5.4. Composés phénoliques	19
II.5.5. Les glucides	20
II.5.6. Les vitamines	20
II.6. Utilisation de lin	20

### **CHAPITRE III : Matériels et méthodes**

III.1. Matériel végétale	23
III.2. Prélèvement et mise en culture	24
III.3. Préparation de l'extrait méthanolique	24
III.4. Extraction des huiles de graines de lin	25
III.5. Chromatographie en phase liquide à haute performance	25
III.6. Préparation de la suspension bactérienne	26
III.7. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles de lin	26
III.8. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique	26
III.9. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	26
III.10. Formation de biofilm	27
III.11. Activité antibiofilm de l'huile de lin et de l'extrait méthanolique	27

### **CHAPITRE IV : Résultats et discussion**

IV.1. Analyse des extraits	29
IV.2. Activité antibactérienne	30
IV.3. Concentration minimale inhibitrice	32
IV.4. activité antibiofilm	32

<b>Conclusion</b>	<b>38</b>
-------------------	-----------

**Références bibliographique**

**39**

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

### LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>Adne</b>	acide désoxyribonucléique extracellulaire
<b>ATB</b>	antibiotique
<b>CMI</b>	concentration minimale inhibitrice
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde
<b>EPS</b>	exopolysaccharides
<b>Lu. Cr</b>	<i>Linum usitatissimum</i> a une action antibactérienne et anti-biofilm
<b>MBEC</b>	concentration minimale d'éradication de biofilm
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
<b>MSSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline.
<b>Na Cl</b>	chlorure de sodium
<b>SDG</b>	diglucoside de secoisolariciresinol
<b>UV</b>	ultraviolet
<i>E. coli</i>	<i>Escherichiacoli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>K.pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

### Paramètres caractéristiques et autres :

<b>µg</b>	Microgramme.
<b>CFU</b>	Unités formatrices de colonies totales
<b>Min</b>	Minute
<b>Mm</b>	Millimètre.
<b>Nm</b>	Nanomètre.
<b>pH</b>	Le potentiel hydrogène.
<b>Ppm</b>	Partie par million.



**LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b>	Paramètres impliqués dans l'adhésion bactérienne, la maturation et la structure	<b>5</b>
<b>Figure 2</b>	Représentation schématique montrant le développement d'un biofilm	<b>9</b>
<b>Figure 3</b>	Les techniques antibiofilms	<b>12</b>
<b>Figure 4</b>	Les étapes de production du biofilm et les cibles possibles des agents antibiofilms.	<b>13</b>
<b>Figure 5</b>	Arrachage du lin, par un dignitaire et sa femme.	<b>15</b>
<b>Figure 6</b>	Planche botanique (a), photographie de capsules et de graines de lin (b).	<b>17</b>
<b>Figure 7</b>	Fruit et graines de lin.	<b>18</b>
<b>Figure 8</b>	Fleur bleue de <i>linum usatissimum</i> .	<b>18</b>
<b>Figure 9</b>	Diagramme de l'utilisation du lin.	<b>22</b>
<b>Figure10</b>	Montage de soxhlet.	<b>25</b>
<b>Figure11</b>	Structure de diglucoside de secoisolariciresinol.	<b>29</b>
<b>Figure12</b>	Effet inhibiteur de l'extrait de graines de lin sur les isolats bactériens. (A) <i>E. coli</i> , (B) <i>S. aureus</i> (C) <i>K. pneumonia</i> .	<b>31</b>
<b>Figure13</b>	Effet inhibiteur de l'huile de lin sur les isolats bactériens.	<b>32</b>
<b>Figure14</b>	Effet de la graine de lin sur les micro-organismes avec différents concentrations.	<b>33</b>
<b>Figure15</b>	Activité antibiofilm (adhésion) de l'huile de lin	<b>34</b>
<b>Figure16</b>	Activité antibiofilm (traitement) de l'huile de lin	<b>35</b>

***LISTE DES TABLEAUX***

**Tableau 1** : Classification du lin .....16

**Tableau 2** : Composition des graines de lin en acides gras.....19

**Tableau 3** : Composition approximative de l'extrait méthanolique de *Linum catharticum*  
.....29

**Tableau 4** : Effet inhibiteur de l'huile de lin sur le nombre de bactéries dans le biofilm  
(avant la formation de biofilm).....34

**Tableau 5** : Effet inhibiteur de l'huile de lin sur le nombre de bactéries dans le biofilm  
(après la formation du biofilm).....36

# **Introduction**

La croissance des microorganismes est classiquement décrite selon 2 modalités : des cellules isolées indépendantes ou des agrégats sessiles. Le premier, mieux connu correspond au mode planctonique, le second au biofilm. Le biofilm peut être défini comme une communauté de microorganismes attachés à un support immergé et entourés d'une matrice. Dans le secteur biomédical, les impacts sont également nombreux. En effet, les infections aiguës, les infections chroniques et récidivantes seraient principalement dues à la formation de biofilms **(Bjarnsholt ,2013)**. De plus, par la colonisation du matériel et des dispositifs médicaux, la formation des biofilms va être une cause importante d'infections nosocomiales.

Face aux problèmes posés sur les activités humaines, il est apparu nécessaire de développer des stratégies de lutte efficaces contre les biofilms. Dans la mesure du possible ou celles-ci soient non toxiques aussi bien pour l'homme que pour l'environnement.

Les anti-infectieux classiques s'avérant peu efficaces en cas de formation d'un biofilm, il existe peu de solutions adaptées à ce phénomène, Dans cette perspective, les produits naturels peuvent présenter de l'intérêt [**(Almeida et Vasconcelos ,2015)** ; **(Qian et al .,2015)**].

Les plantes sont des réservoirs de molécules bioactives avec des propriétés antimicrobiennes très souvent utilisées dans le traitement des maladies infectieuses **(Han et al ., 2016)** .Pendant des milliers d'année les plantes ont été pour l'homme la principale source de remède contre les diverses pathologies.

Suite aux situations difficiles de cette année 2022 et de la pandémie du Covid-19, notre sujet de master et objectif d'origine restent irréalisables, en conséquence, nous avons orienté notre travail sur la réalisation d'une synthèse des deux articles visant à évaluer sur l'activité antibiofilm des extraits de graines de lin.

# **CHAPITRE I**

## **Les biofilms**

## **I.1. Définition**

En microbiologie, les biofilms sont définis comme des communautés de micro-organismes qui se développent en agrégats et sont entourés d'une matrice extracellulaire auto-productrice. La matrice extracellulaire est composée de protéines, d'acide désoxyribonucléique (ADN) et d'exopolysaccharides (EPS) (Allewell, 2016). Les biofilms ont acquis une grande importance, notamment dans le domaine médical, en raison de la préférence pour le développement d'infections chroniques, telles que les otites, les ostéomyélites et les infections de plaies, ainsi que des infections liées à l'utilisation de dispositifs médicaux, y compris cathéters intravasculaires et articulations Prothèses et cathéters urinaires [(Bjarnsholt, 2013) et (Romano et al., 2017)]. Traiter et éliminer les infections causées par les micro-organismes producteurs de biofilms est un grand défi car ils sont plus résistants à l'action des molécules à activité antimicrobienne (antibiotiques et désinfectants), contrairement aux micro-organismes qui se développent sous forme libre (planctonique) (Davies, 2003). En revanche, la matrice extracellulaire aide les cellules microbiennes à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte ; De plus, l'EPS de la matrice extracellulaire a le potentiel d'induire des réponses inflammatoires chroniques.

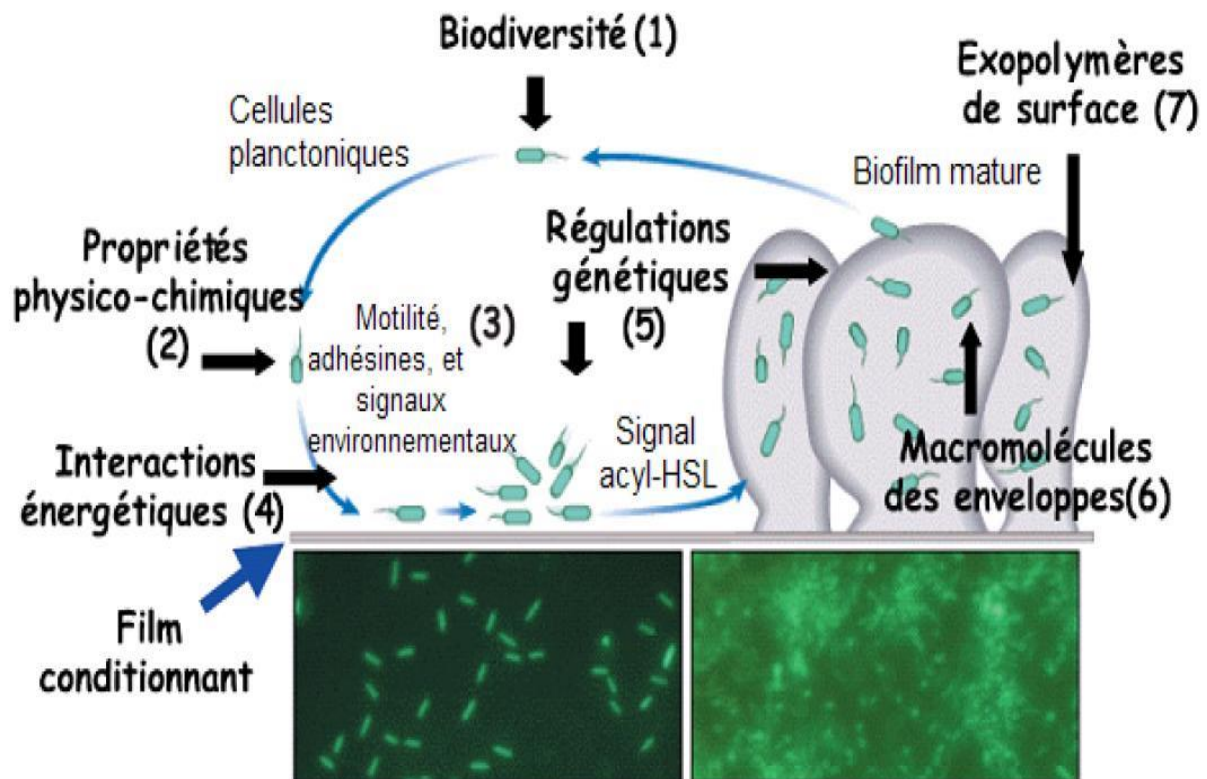
## **I.2. Composition**

Selon Costerton (1999), le biofilm est principalement constitué de bactéries et de la matrice qu'elles produisent, la matrice représentant 50 à 90 % de la masse organique carbonée du biofilm et les micro-organismes représentant 2 à 5 % de la matrice. , selon l'espèce impliquée.

La plupart des biofilms sont constitués d'une variété de micro-organismes, notamment des bactéries, des algues, des protozoaires et des champignons, chacun effectuant diverses tâches métaboliques (Alnasouri, 2010). Les organismes qui composent le biofilm, en revanche, ne sont pas totalement immobilisés ; ils peuvent s'y déplacer et même s'en séparer (Flemming et Wingender, 2010).

La matrice peut incorporer des protéines, des acides nucléiques, des surfactants, des lipides, des glycolipides et des cations en plus des polysaccharides (Tremblay et al., 2014).

La matrice maintient les cellules proches les unes des autres et permet des niveaux élevés de contact, de communication intercellulaire et la création de micro consortiums synergiques. Les ultraviolets, certains antibiotiques, les biocides, les oxydants, les cations métalliques, les défenses immunitaires sont tous protégés par cette matrice (Carpentier et Cerer, 1993).



**Figure 1.** Paramètres impliqués dans l'adhésion bactérienne, la maturation et la structure (Haras, 2005)

### **I.3. Les facteurs influençant la formation de biofilm**

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs :

#### **I.3.1. Propriétés de surfaces**

Toute surface qui entre en contact avec un fluide contenant des bactéries a le potentiel de faciliter la création d'un biofilm. L'attachement des bactéries à une surface et la création d'un biofilm sont influencés par la rugosité, les caractéristiques chimiques et l'existence antérieure de films protéiques sur cette surface (Hajoubi, 2019). La fixation se produit plus

facilement sur des surfaces rugueuses (aspérités), des surfaces hydrophobes et des surfaces qui ont été précédemment recouvertes d'une couche de protéines (**Donlan et Costerton, 2002**).

### **I.3.2. Les caractéristiques du milieu**

La production d'un biofilm nécessite la présence de certaines conditions environnementales. [(**Donlan, 2002**); (**Martinez et Casadevall, 2007**); (**Goller et Romeo, 2008**)] font partie de ces déterminants.

- La température : elle est importante car elle peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (**Dumas, 2007**).

- Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (**Hamadi et al., 2004**).

- Concentrations en nutriments : Concentrations en nutriments Dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (**Spormann, 2008**).

### **I.3.3. Propriétés des cellules**

La fixation bactérienne à une surface est influencée par l'hydrophobicité de la surface cellulaire, la présence de fimbriae et de flagelles et la synthèse d'exopolysaccharides. L'hydrophobicité d'une surface joue un rôle essentiel dans l'adhérence des microbes à celle-ci.

Les connexions hydrophobes deviennent de plus en plus essentielles à mesure que les matériaux deviennent moins polarisés. La majorité des bactéries ont des surfaces chargées négativement avec des régions hydrophobes. Les flagelles, les fimbriae, les polysaccharides et d'autres composants structurels des bactéries sont impliqués dans leur adhésion à une surface. Lorsque différents types de bactéries sont présents, il peut y avoir rivalité ou coopération entre les cellules. Les polymères de surface cellulaire non polaires comme les fimbriae, certaines protéines et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram-positives) ont tendance à adhérer davantage aux surfaces hydrophobes qu'aux surfaces polaires. Dans les processus d'adhésion aux surfaces hydrophiles, les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides jouent un rôle plus important (**Donlan, 2002**).



## **I.4. Les étapes de formation de biofilm**

### **I.4.1. Mise en place d'un film conditionnant**

Quelques minutes après l'exposition, un mélange complexe de protéines, de glycoprotéines, de lipides, de polysaccharides et de nutriments organiques créent un film de conditionnement sur la surface qui se développe pendant plusieurs heures. Le film conditionnant créé par l'hôte dans les larmes, par exemple, est un environnement riche en nutriments qui favorise l'attachement et la prolifération bactérienne (**Donlan, 2002 ; Thierry, 2008**).

### **I.4.2. Transfert des cellules bactériennes vers la surface**

Les cellules microbiennes planctoniques sont le plus souvent issues de la dispersion d'un biofilm voisin en suspension dans un fluide (le film) (**Romain et al., 2012**). Ils adhèrent à la surface via des forces physiques ou des appendices bactériens tels que des pili ou des flagelles (**Gupta et al., 2015**). L'adsorption initiale des macromolécules sur les surfaces initie le processus de développement du biofilm et ouvre la voie à la colonisation des cellules bactériennes sur la surface (**Huang et al., 2018**).

### **I.4.3. Adhésion réversible et irréversible**

Deux étapes se produisent lors de l'étape d'attachement microbien : Lorsque les bactéries sont proches d'une surface, des forces d'attraction physico-chimiques interviennent, entraînant une interaction réversible avec la surface, permettant aux bactéries de se détacher et de revenir aux formes planctoniques (**Kumar et al. , 2017**) Les interactions de **VanderWaals** (interactions dipolaires non covalentes entre molécules), les interactions électrostatiques répulsives ou attractives et les interactions hydrophobes sont des exemples d'interactions courantes (**Romain et al., 2012**).

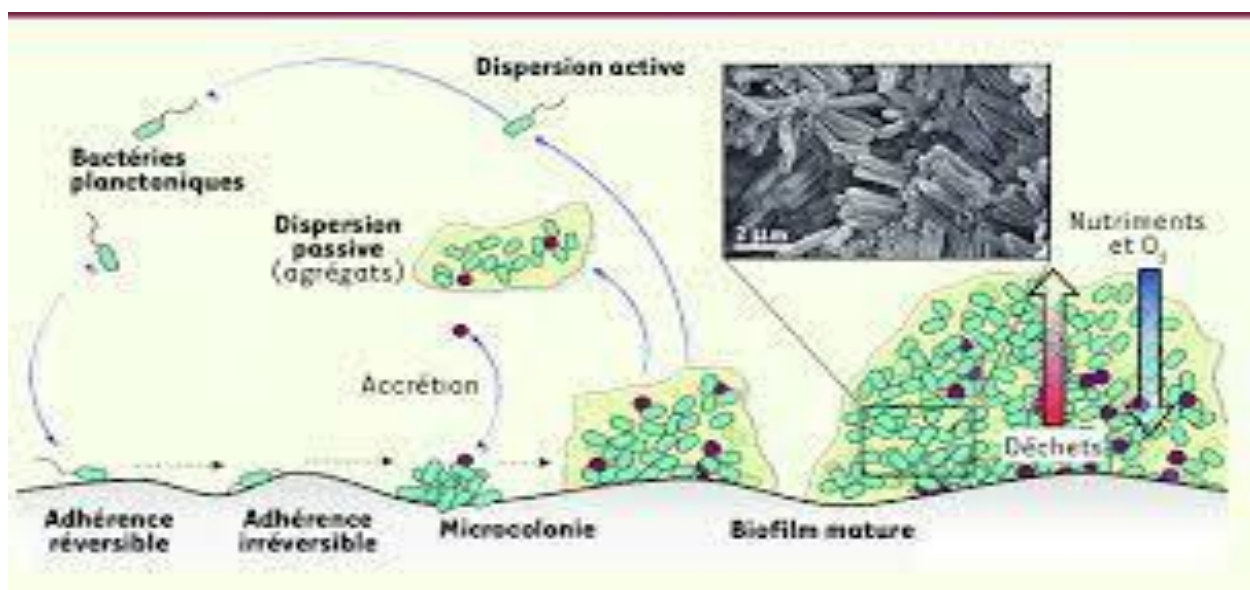
La quantité de bactéries fixées à la surface augmente au fur et à mesure que les cellules se multiplient, entraînant la formation de colonies et une adhérence irréversible. La synthèse de structures à la surface de la bactérie, ainsi que les modifications du profil d'expression des gènes, correspondent au passage à un biofilm irréversiblement adhérent (**Agnès and Jean-Marc, 2006**).

### **I.4.4. Maturation**

Les cellules microbiennes rarement produisent des signaux auto-inducteurs dans cette phase, qui provoquent l'expression de gènes spécifiques du biofilm et permettent aux cellules de communiquer (Gupta et al., 2015). Ce processus est généralement le résultat d'un type de communication bactérienne connu sous le nom de "quorum sensing" (Phillips et al., 2010). Pour entretenir le réseau de biofilm, la bactérie sécrète une matrice de substances extracellulaires polysaccharidiques (EPS) (Gupta et al., 2015). Cette étape est marquée par une croissance de la taille du biofilm (Thierry, 2008). Sécrétion pendant l'adhésion irréversible.

#### **I.4.5. Dispersion et détachement cellulaire**

La dernière étape de la croissance du biofilm peut commencer une fois que l'épaisseur maximale du biofilm a été atteinte. C'est le stade de la diffusion (Clutterbuck et al., 2007). Les cellules émergent de la matrice du biofilm sous forme de bactéries planctoniques libres à ce stade. Des enzymes spécifiques sont impliquées dans la destruction et la reconfiguration du biofilm, ce qui entraîne une désintégration partielle de la matrice, la dispersion du biofilm, la colonisation de nouvelles niches écologiques et le développement de nouveaux biofilms [(Clutterbuck et al., 2007) et (Yin et al., 2019)]. En raison de leur sensibilité au système immunitaire de l'hôte, les bactéries planctoniques qui pullulent à partir d'un biofilm sont à l'origine d'infections (Donlan et Costerton, 2002).



**Figure 2.** Représentation schématique montrant le développement d'un biofilm en cinq étapes (Lebeaux et al., 2014).

## **I.5. Résistance des biofilms à divers agents antimicrobiens**

Les bactériophages, les amibes et les biocides utilisés dans les procédés industriels sont résistants aux biofilms répandus dans les environnements naturels et industriels (**Costerton et al., 1999**). Les biofilms, comme mentionné précédemment, permettent aux germes pathogènes d'échapper à la réponse immunologique de l'hôte. De plus, les bactéries dans un biofilm sont moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que les bactéries à l'état planctonique. En fait, les bactéries dans un biofilm peuvent être 10 à 1000 fois plus résistantes aux traitements antimicrobiens que les bactéries dans un biofilm conventionnel [(**Olson et al., 2002**) et (**Ceri et al., 2010**)]. La résistance accrue des biofilms (certains auteurs préfèrent l'appeler tolérance) aux médicaments antimicrobiens peut s'expliquer par un certain nombre de facteurs [(**Anderson et O'Toole , 2008**) ; (**Stoodley, 2009**) et (**Ceri et al ., 2010**) ] . La matrice polymérique est l'un de ces facteurs, car elle agit comme une barrière, réduisant ou bloquant la diffusion de l'agent antimicrobien. Certains composés antibactériens peuvent se lier aux charges électrostatiques à la surface de la matrice polymère. Le métabolisme des bactéries dans un biofilm a également un impact significatif. Certaines cellules du biofilm seront métaboliquement inactives et pourront même être en sommeil en raison de la faible concentration de certains nutriments et du gradient d'oxygène ; ces cellules bactériennes dormantes sont également probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms (**Lewis ,2008**). Le transfert horizontal de gènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques devraient être facilités par la proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) reste l'étalon-or pour mesurer la sensibilité des bactéries planctoniques aux traitements antimicrobiens.

Cependant, il faut garder à l'esprit que la CMI des cultures bactériennes planctoniques et la concentration d'agent antimicrobien nécessaire pour éliminer un biofilm ne sont pas toujours corrélées (**Olson et al., 2002**). Il est maintenant possible d'estimer la concentration minimale d'antibiotique nécessaire pour éliminer un biofilm (ou « concentration minimale d'éradication de biofilm », MBEC). En effet, des chercheurs de l'Université de Calgary ont mis au point une méthode pour déterminer la sensibilité des biofilms à divers antibiotiques et désinfectants (**Harrison et al.,2010**). L'instrument, anciennement connu sous le nom de

"Calgary Biofilm Device", est maintenant connu sous le nom de "MBEC Assay"). Son format à 96 puits permet un dépistage rapide des agents antimicrobiens (seuls ou en combinaison), tout en ne reproduisant évidemment pas parfaitement l'environnement habituel du biofilm ou du biofilm formé dans une cellule à écoulement. Ces chercheurs ont été les premiers à montrer que le développement d'un biofilm d'un large spectre de bactéries pathogènes animales augmente la résistance aux antibiotiques (**Olson et al., 2002**).

## **I.6. Lutte contre les biofilms**

### **I.6.1. L'hygiène**

Le développement du biofilm sur les implants médicaux est lié à la durée pendant laquelle l'implant a été dans le corps. Plus l'implant est en place depuis longtemps, plus il est susceptible de développer un biofilm. L'implant doit être placé dans des conditions sanitaires strictes afin de minimiser autant que possible la contamination bactérienne. **Maki (1994)**.

### **I.6.2. Antibiothérapie**

Quels que soient les mécanismes de résistance, il est essentiel de choisir le bon antibiotique (ATB) lors du traitement d'une infection bactérienne chez l'homme ou l'animal, pas seulement au début du traitement mais tout au long, pour éviter la sélection de mutants résistants à l'antibiotique administré (**De Chalvet De Rochemonteix, 2009**). La résistance inhérente des biofilms aux antibiotiques et au système immunitaire est devenue un gros problème. Bien que certains antibiotiques, comme la rifampicine, aient une action sur le biofilm modeste, la majorité des antibiotiques conventionnels sont inefficaces aux dosages standards (**Römling et al., 2014**).

### **I.6.3. Élimination mécanique du biofilm**

L'une des stratégies les plus efficaces pour lutter contre les biofilms est le nettoyage mécanique. Du fait des fortes pressions de cisaillement exercées, il les détruit en séparant les microorganismes de leur support (**De Chalvet De Rochemonteix, 2009**).

### **I.6.4. Désinfection**

L'objectif de ce dernier est d'éradiquer les germes du biofilm qui n'auraient pas été éliminés par le seul nettoyage. Toutes les molécules n'ont pas la même efficacité. L'utilisation

de la chlorexidine comme antiseptique ne réduit pas le nombre d'infections bactériennes à Gram négatif et sélectionne les personnes résistantes à plusieurs traitements antimicrobiens. L'utilisation du triclosan pourrait être bénéfique (Stickler, 2002). Le biofilm résiste à la plupart des antiseptiques et désinfectants, et les micro-organismes du biofilm résistent à leur action. Cette stratégie s'avère inefficace.

### **I.6.5. Ultrasons et potentialisation de l'action des antibiotiques**

Les antibiotiques comme la gentamicine et les ultrasons agissent ensemble pour tuer les bactéries Gram-négatives qui sont planctoniques ou sous forme de biofilms. C'est de l'impact bioacoustique ou bioélectrique dont nous parlons. Bien que le mécanisme de cette synergie soit inconnu, il est possible qu'elle provienne d'une perturbation de l'organisation membranaire bactérienne, permettant une plus grande diffusion de l'antibiotique à l'intérieur du biofilm (Donlan, 2008).

Dans des modèles animaux, l'activité synergique des ultrasons et de la gentamicine dans la diminution des biofilms d'*Escherichia coli* a été observée. Les résultats de l'étude démontrent que l'utilisation des ultrasons en conjonction avec la gentamicine est nettement plus efficace que l'utilisation de la gentamicine seule dans le traitement des biofilms (Carmen et al, 2005).

### **I.6.6. Utilisation d'enzymes dégradant les exopolysaccharides de la matrice**

Certains produits chimiques et enzymes peuvent entraver ou perturber la croissance du biofilm. L'utilisation d'enzymes qui dégradent les polysaccharides de la matrice et désorganisent l'architecture du biofilm, conduisant à terme à sa mort, pourrait ouvrir de nouvelles possibilités de recherche pour l'éradication du biofilm. Considérez les biofilms produits par *Pseudomonas aeruginosa*. Ce dernier produit de l'alginate, un exopolysaccharide aux propriétés intrigantes : il inhibe l'action antimicrobienne des aminoglycosides en retardant leur dispersion à l'intérieur du biofilm. Lorsque nous ajoutons une enzyme dégradant l'alginate, l'alginate lyase, au milieu, l'antibiotique (gentamicine, tobramicine) a plus de capacité de pénétration et d'activité antimicrobienne dans le biofilm (Donlan, 2008).

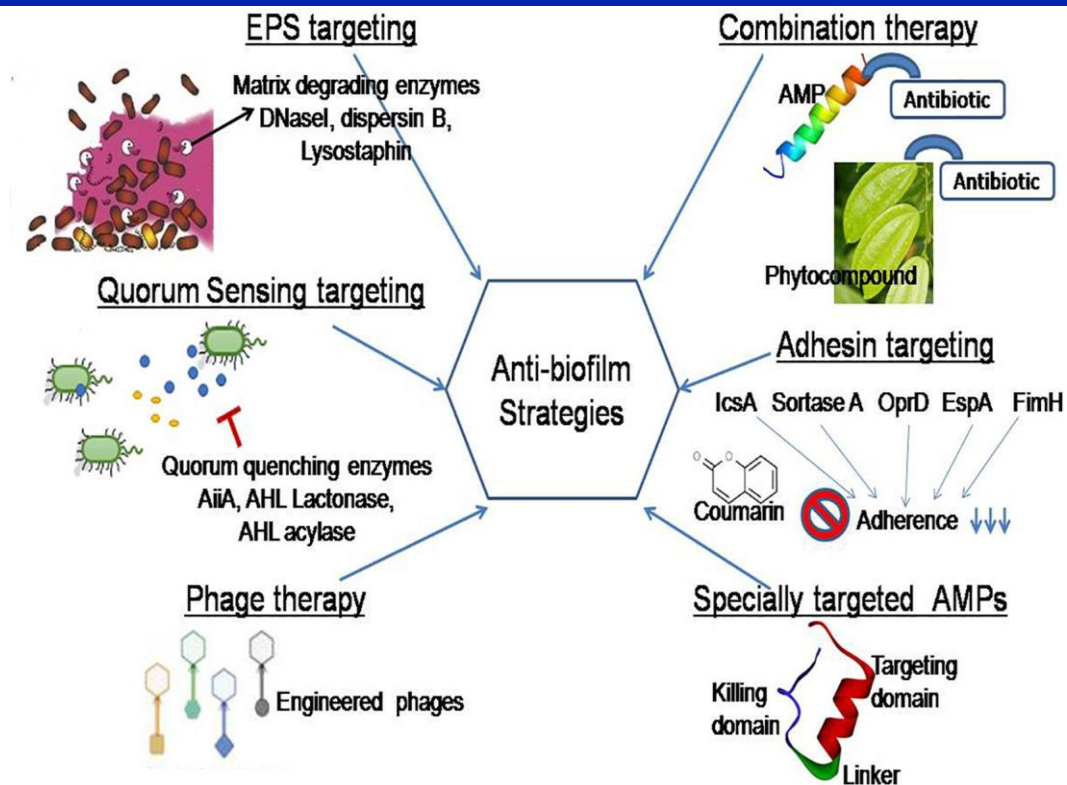


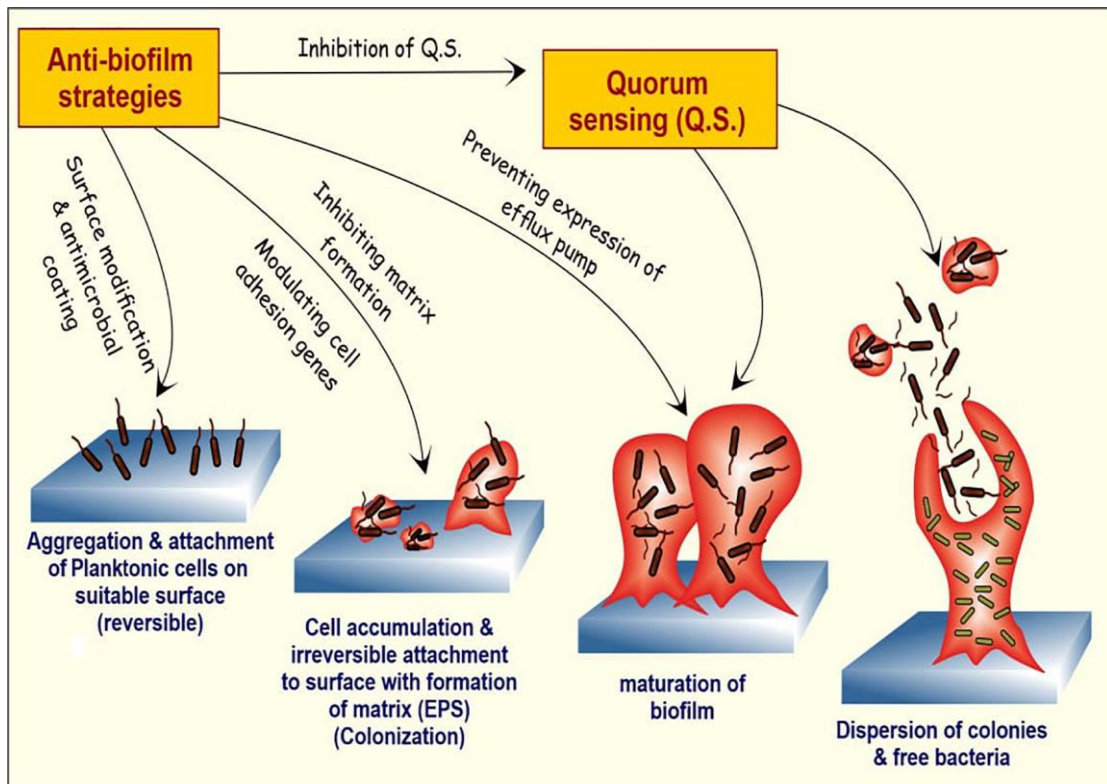
Figure 3. Les stratégies antibiofilms (Shastry et al., 2019).

Graphiquement. Les enzymes dégradant la matrice (DNaseI, dispersine B, lysostaphine) ciblent la matrice EPS pour empêcher l'adhérence microbienne à une surface. L'utilisation de substances naturelles pour perturber la communication cellule-cellule dans les biofilms préformés et moduler la synthèse des facteurs de virulence était au centre de cette méthode (Shastry et al., 2019). Thérapie avec des phages : les phages modifiés produisent des enzymes polysaccharides dépolymérase, qui décomposent l'exopolysaccharide matriciel. En raison de la présence de peptides de ciblage spécifiques à l'espèce, cette méthode innovante cible de manière spécifique à l'espèce (Xu et al., 2020). Ciblage d'adhésine : les phytocomposés ont inhibé le développement du biofilm en ciblant les protéines d'adhésine (Adnan et al., 2020). Thérapie combinée : Les agents antibiofilm naturels sont plus efficaces lorsqu'ils sont utilisés en conjonction avec d'autres traitements antibiofilm.

### I.7. Stratégies thérapeutiques utilisant des produits naturels

L'échec des médicaments conventionnellement recommandés suggère que les traitements par biofilm étaient un complément (Zhang et al., 2020). Les agents anti-biofilm naturels tuent les biofilms persistants tout en permettant aux antimicrobiens de se diffuser dans la matrice du biofilm. Ces composés naturels agissent pour décomposer la matrice du biofilm et tuer les

cellules libérées à différentes étapes du cycle du biofilm (**Figure 4**). Les chercheurs peuvent améliorer les techniques anti-biofilm en comprenant mieux le mécanisme de perturbation et de dispersion du biofilm.



**Figure 4.** Les cibles possibles des agents anti-biofilm.

Chez l'homme, les cellules bactériennes se lient aux protéines de construction de la matrice en formant une association covalente ou non covalente avec la structure du peptidoglycane.

La création d'une matrice EPS se produit lorsqu'un nombre important de cellules sont attachées et agrégées, et l'attachement est maintenant résistant aux forces répulsives externes. Les cellules au sein de la structure en vrac commencent à communiquer entre elles et sécrètent des protéines et de l'ADN spécifiques à mesure que le biofilm mûrit, et certaines de ces protéines et de l'ADN sont impliquées dans la création de la pompe à efflux. Enfin, les cellules planctoniques libres dispersées à partir du biofilm produit favorisent la création de nouveaux biofilms en périphérie. Les produits chimiques naturels anti-biofilm peuvent inhiber la formation et le développement du biofilm en l'attaquant à une ou plusieurs étapes (**Zhang et al., 2020**).

Les problèmes liés aux biofilms sont dus au développement de résistances aux agents antimicrobiens (antibiotiques et désinfectants) et ainsi donc l'émergence de souches multi-résistantes. Ceci amène à l'identification et au développement de nouvelles molécules thérapeutiques afin de lutter contre ce phénomène de résistance.

Les produits d'origine végétale sont parmi ces agents alternatifs, explorés dans le but de remplacer les conventionnels, ceci est dû au fait que les plantes sont capables de produire une grande diversité de métabolites secondaires. Nous pouvons citer comme exemple les alcaloïdes, les flavonoïdes, les stéroïdes et les poly phénols. Ces derniers représentent l'un des groupes les plus importants des produits du métabolisme secondaire, du fait qu'ils aient une faible toxicité et de nombreux avantages biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires (**Duraffourd et al.,1997**).



***CHAPITRE II***  
***Linum Usitatissimum (le lin)***

## II.1. Définitions et historique

Le lin, une plante de la famille des *Linaceae*, a été l'une des premières plantes cultivées par l'homme. Des traces de sa présence ont ainsi été retrouvées dans les communes lacustres suisses remontant à -8000 ans avant JC. Son utilisation a été élargie par les pharaons égyptiens, qui enveloppaient leurs momies dans des bandages en lin. La culture du lin est également représentée dans des peintures découvertes dans les pyramides (**Figure 5**). (Savoire, 2008).



**Figure 5.** Arrachage du lin, par un dignitaire et sa femme, Tombe de Sennedjem, Der el Medineh, XIX<sup>ème</sup> dynastie. (Savoire, 2008)

Le lin (*Linum Usitatissimum*) fait partie de la famille des *Linaceae*, qui compte 22 générations et plus de 300 espèces dans le monde (Smykal et al., 2011). Le lin possède un large éventail de caractéristiques caryotypiques, morphologiques et biochimiques. *Linnaeus* (1857) a été le premier à donner à l'espèce cultivée un nom botanique (*Linum Usitatissimum*), qui signifie « extrêmement utile » (Khan et al., 2017).

C'est un diploïde autogame avec un caryotype  $2n=30$  (Allaby et al., 2005). Un véritable tégument ou coque, un endosperme fin, deux embryons et un axe embryonnaire se trouvent tous dans les graines de lin. Les embryons représentent 55 % du poids total de la graine disséquée à la main, le tégument et l'endosperme 36 % et l'axe de l'embryon 4 %. (Singh et al., 2011). Le Canada, les États-Unis, la Chine et l'Inde sont les principaux producteurs de graines de lin (Singh et al., 2011).

## II.2. Classification

Avec environ 300 espèces dans le monde, la famille des *Linaceae* est géographiquement diversifiée. Cette famille est positionnée dans le royaume des plantes comme suit (**Tableau 1**)

**Tableau 1.** Classification du lin (**Diederichsen et Richards, 2003**)

<b>Division</b>	Pteridophyta
<b>Sous-division</b>	Angiospermae
<b>Classe</b>	Dicotyledoneae
<b>Sous-classe</b>	Rosidae
<b>Ordre</b>	Geraniales
<b>La famille</b>	Linaceae
<b>Tribu</b>	Linoideae
<b>Genre</b>	<i>Linum</i>
<b>Espèce</b>	<i>Usitatissimum L</i>

### **II.3. Description botanique**

C'est une plante herbacée annuelle. La plante est dressée, a une structure racinaire peu profonde et nécessite d'humidité suffisante pendant la saison de croissance (**Hocking et al., 1997**).

- Tige : unique se terminant par une inflorescence en forme de cyme.
- Hauteur : entre 0,8 et 1,2 m.
- Diamètre au collet : de l'ordre de 1 à 2 millimètres.
- Feuilles : allongées et sessiles (entre 80 et 100 feuilles par tige).
- Fleurs : 5 pétales. • Pollinisation : auto-pollinisation (cléistogamie).
- Durée de floraison : 15 jours (mais seulement quelques heures par fleur).
- Couleur des fleurs : bleues, rouges ou blanches (plus ou moins rosées).

- Fruit : une capsule contenant 10 graines riches en huile.
- Graines : couleur brune (parfois jaune clair), lisses, plates, petites et légères (4 à 7 grammes pour mille graines).
- Génome : compose de 15 paires de petits chromosomes ( $2n=30$ ) (**Figure 2**) (**Renouard, 2011**).



**Figure 6.**Planche botanique (a), photographie de capsules et de graines (b) de *LinumUsitatissimum*(**Renouard, 2011**).

#### **II.4. Le plan morphologique**

L'inflorescence a la forme d'une cyme et porte un certain nombre de fleurs bleues ou blanches (**Figure 7**). Les fleurs sont généralement hermaphrodites et la pollinisation du lin par les insectes est concevable mais rare en raison du pollen collant. Les graines de lin ont une longueur de 3 à 6,4 mm (**Figure8**) et la plante à une courte racine pivotante avec des radicelles fibreuses pouvant atteindre 120 cm de longueur. Les feuilles simples et sessiles, d'environ 25 mm de long, sont réparties uniformément le long de la tige haute (**Casa et al., 1999**).



**Figure 7.** Fruit et graine de lin



**Figure 8.** Fleur bleue de *Linum*

(Heli et al., 2007) *Usitatissimum* (Heli et al., 2007)

## **II.5. Composition chimique des graines de lin**

Les composants nutritionnels importants de la graine de lin sont l'acide alpha-linolénique, les protéines, la lignine et les fibres alimentaires. Les matières grasses (41 %), les protéines (20 %), les fibres alimentaires totales (28 %), l'humidité (7,7 %) et les cendres (3,4 %) sont les compositions typiques des graines (Kaushik et al., 2017).

### **II.5.1 Acide gras**

La graine de lin a longtemps été appréciée pour sa teneur élevée en matières grasses, qui offre une combinaison unique d'acides gras (**Tableau 2**). Ces acides gras fournissent les réserves nécessaires à la croissance de la plante lors de la germination (Tribalat, 2016).

**Tableau 2.** Composition des graines de lin en acides gras (**Tribalat, 2016**).

<b>Acidesgras</b>	<b>Pourcentage des acides gras totaux</b>
Acide palmitique (C 16 : 0)	3 à 8%
Acide palmitoléique (C 16 : 1)	Moins de 1%
Acide stéarique (C 18 : 0)	2 à 8%
Acide oléique (C 18 : 1)	11 à 35%
Acide linoléique (C 18 : 2)	11 à 24%
Acide linoléique (C 18 : 3) (oméga-3)	35 à 65%
Acide arachidique (C 20 : 0)	Moins de 1%

Les acides gras sont riches en oméga-3 qui possède une double liaison aux trois atomes de carbone de l'extrémité méthyle (**Russo et Reggiani, 2015**). Les acides gras oméga-3 ont des propriétés biologiques qui les rendent efficaces dans la prévention et le traitement des maladies chroniques telles que le diabète de type 2, l'hypertension, la maladie d'Alzheimer et certaines tumeurs malignes (**Rashid et al., 2018**).

### **II.5.2. Les protéines**

Les acides aminés sont des protéines de lin sont l'une des protéines végétales les plus riches en nutriments disponibles (**Rashid et al., 2018**). L'albumine 2S et la globuline de stockage 11S représentent chacune 40 % des protéines totales des graines de lin, la glutéline représentant 13,3 % et la prolamine représentant 6,5 % des protéines totales (**Savoire, 2008**).

### **II.5.3. Mucilage**

La graine de lin contient 3 à 9 % de mucilage (**Tribalat, 2016**). L'arabinoxylane neutre (75 %) et le rhamnogalacturonan acide (25 %) constituent le mucilage du lin (25 %). Le rhamnogalacturonan est composé de D-galactose, de L-rhamnose, de L-fucose et d'acide D-galacturonique, tandis que l'arabinoxylane est principalement composé de xylose, d'arabinose et de galactose (**Singh et al., 2011**). Les laxatifs, les sirops contre la toux et les cosmétiques contiennent tous du mucilage produit à partir de graines de lin (**Rashid et al., 2018**).

### **II.5.4. Composés phénoliques**

Les graines de lin comprennent des acides phénoliques, des flavonoïdes et des lignanes, entre autres composants phénoliques. Ils sont également connus sous le nom de phytoestrogènes et ils aident à réguler les niveaux d'hormones, tels que les œstrogènes, ainsi qu'à atténuer les symptômes de la ménopause ; elles contiennent 75 à 100 fois plus de lignanes que toute autre source végétale, le diglucoside de secoisolariciresinol(SDG) étant le plus abondant **(Rashid et al., 2018)**.

### **II.5.5. Les glucides**

Les graines de lin ont une faible teneur en glucides.

- Les fibres alimentaires et fonctionnelles se combinent pour former la fibre totale. Dans l'intestin, les fibres alimentaires fonctionnent comme un agent gonflant. Il augmente le poids et la viscosité de la matière digérée dans les selles tout en raccourcissant le temps nécessaire à la matière pour traverser le côlon. Les fibres alimentaires aident à contrôler l'appétit et la glycémie, abaissent ainsi les taux de lipides et même le risque de cancer colorectal **(Rashid et al., 2018)**.

- Les fibres fonctionnelles sont constituées de glucides non digestibles extraits de plantes, purifiés, puis ajoutés aux repas et autres aliments **(Rashid et al., 2018)**.

### **II.5.6. Les vitamines**

Les graines de lin contiennent une variété de vitamines hydrosolubles et liposolubles, notamment :

-La vitamine E qui est un antioxydant qui protège les protéines et les lipides cellulaires de l'oxydation et est abondante dans les graines, principalement sous forme de gammatocophérol. Elle favorise l'excrétion de sodium dans l'urine, ce qui peut aider à abaisser la tension artérielle, réduire le risque de maladie cardiaque et diminuer le risque de certains cancers **(Rashid et al., 2018)**.

- Vitamine K : Elle comprend la phylloquinone, qui est un type de vitamine K. (qui est la forme végétale de la vitamine K). Cette vitamine est nécessaire à la production de protéines spécifiques qui contribuent à la coagulation du sang et au développement des os **(Rashid et al., 2018)**.

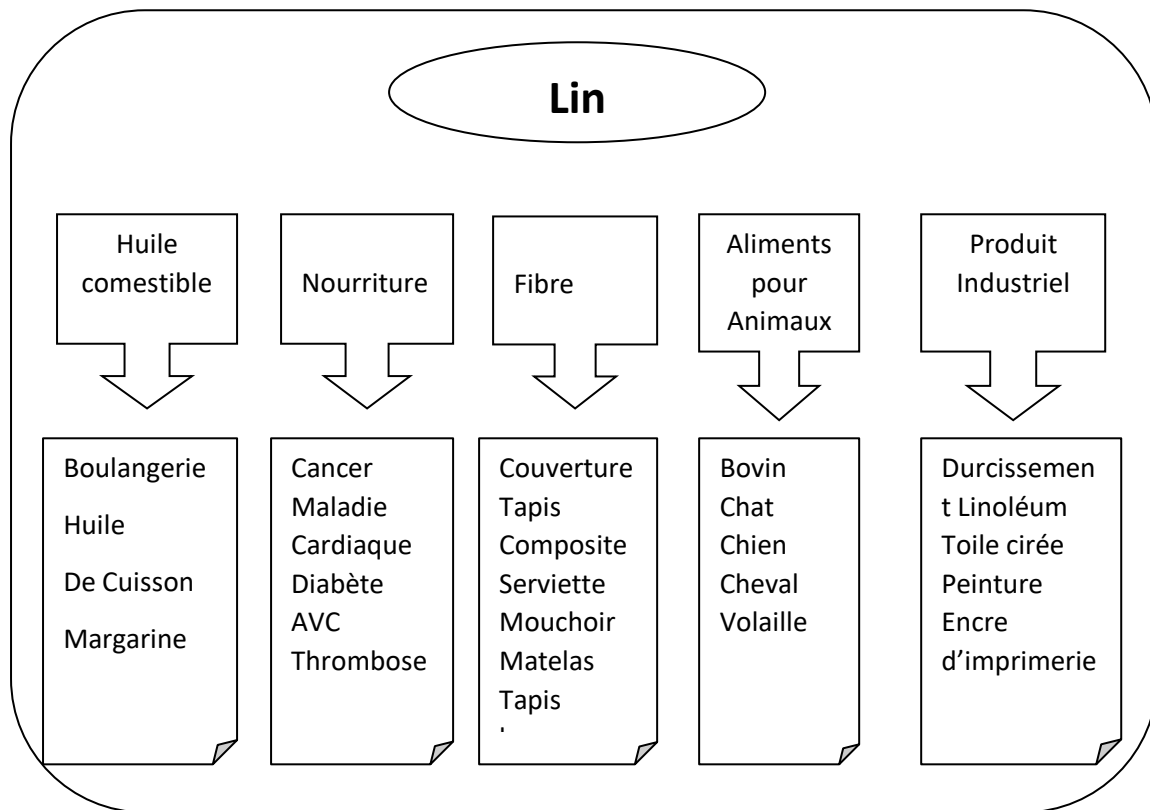
## II.6.Utilisations de lin

Le lin est à nouveau reconnu comme un excellent aliment santé. Il mérite de figurer dans la liste des aliments bénéfiques pour la santé. Le lin et son huile ont été utilisés à diverses fins dans le passé, y compris des applications industrielles telles que la production de peintures, de vernis et de linoléum, ou de composants alimentaires dans les aliments transformés (Laiq Khan et al., 2010).(Figure 9).

La graine de lin est utilisée depuis des millénaires pour son goût agréable ainsi que ses capacités médicinales et nutritionnelles (Chaudhary et al, 2016). La consommation de graines de lin a été associée à une variété d'avantages pour la santé en raison de sa teneur élevée en composants biologiquement actifs (Russo et Reggiani, 2015) :

- **Laxatif** :en raison de leur teneur élevée en fibres alimentaires, les graines de lin sont utilisées comme laxatifs pour faciliter le transit intestinal (Khan et al., 2017).
- **Anticancéreux** :les graines de lin ont la plus forte concentration de composés phénoliques, qui sont de puissants antioxydants naturels qui aident à réduire les dommages causés par les radicaux libres [(Russo et Reggiani, 2015) ; (Khan et al., 2017)].
- **Les maladies cardiovasculaires** :les eicosanoïdes, qui sont générés à partir des acides gras oméga-3 présents dans les graines de linaméliorent la fonction cardiaque en diminuant le cholestérol sanguin (Khan et al., 2017).
- **Anti-diarrhéique** :les graines de lin sont utilisées depuis longtemps pour traiter la diarrhée et les maladies gastro-intestinales en médecine traditionnelle (Palla et al., 2015).

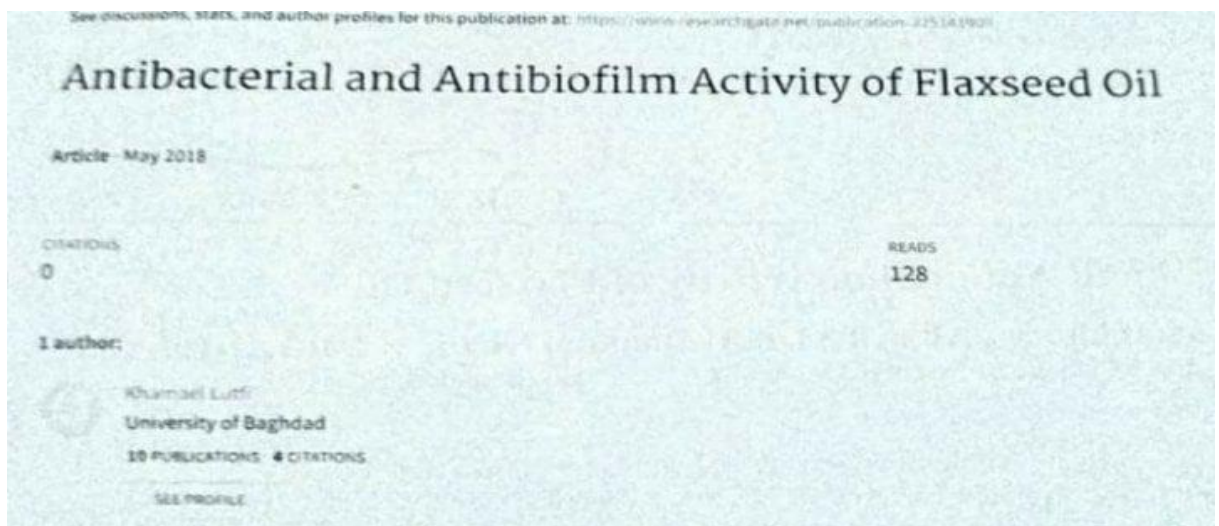
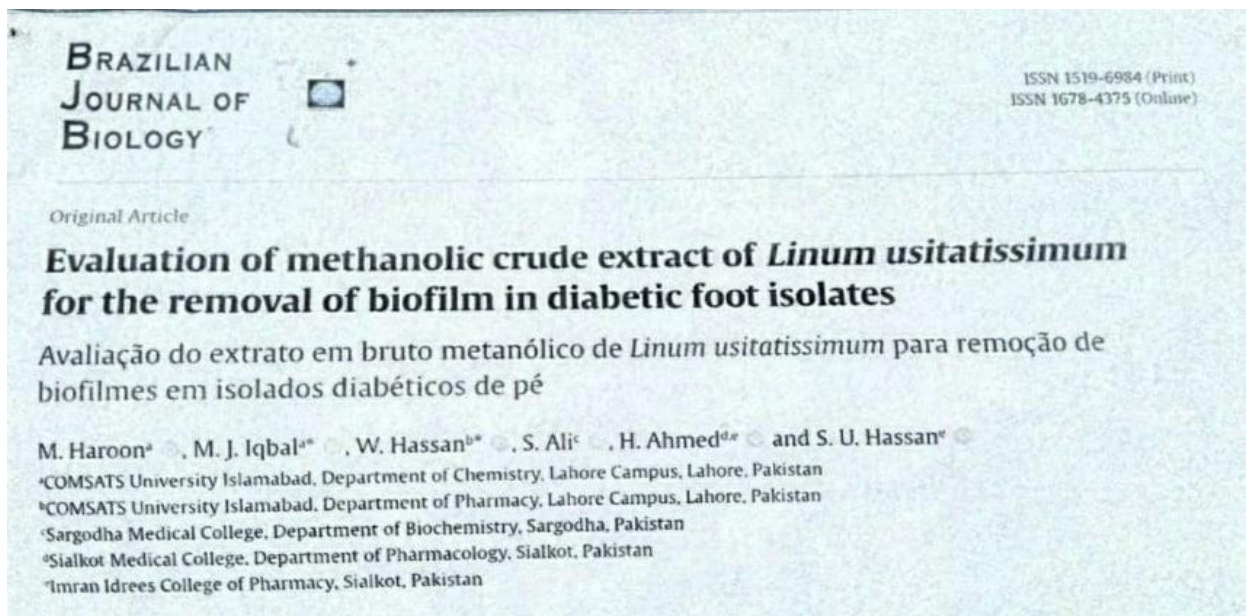




**Figure 9.** Diagramme de l'utilisation du lin (Laiq Khan et al., 2010).

***CHAPITRE III***  
***Matériel et Méthodes***

On a traité deux articles, dont les travaux présentés vise à évaluer l'activité antibiofilm de l'extrait méthanolique (Haroon et al., 2021) et les huiles de graines de lin (Al-Mathkhury et al., 2016) vis-à-vis de quelques souches pathogènes. Publiées au Pakistan et l'Iraq respectivement.



### III.1. Matériel végétal

Des graines de lin fraîches ont été collectées sur le marché local et séchées à l'air dans un four à une température de 40°C. Les graines séchées ont été broyées en poudre et stockées dans des bouteilles en plastique hermétiquement fermées pour éviter la teneur en humidité. (Haroon et al., 2021).

Dans l'étude d'Al-Mathkhury et al., 2016, des graines broyées sont utilisées pour l'extraction des huiles.

### III.2. Prélèvement et mise en culture

Après lecture des deux articles, on constate que dans l'étude de Haroon et al., 2021, les prélèvements sont d'origine hospitalière et étaient réalisés à partir des restes de bandages collectés auprès des patients à pieds diabétiques. Les différents prélèvements ont été mis en culture pour la recherche de bactéries à Gram positif et négatif : Concernant les bactéries à Gram positif essentiellement la recherche de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus* et pour les bactéries à gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Al-Mathkhury et al. (2016), ont utilisé des souches obtenues auprès du Département de Biologie, College of Science, Université de Bagdad. Ses souches sont ; *S.aureus* sensible à la méthicilline (MSSA), *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA), *S. epidermidis*, *E.faecalis*, *E.coli* et *K. pneumoniae*.

### III.3. Préparation de l'extrait méthanolique

- 5 g de graines de lin en poudre a été mélangée avec 30 ml de méthanol (95 %).
- Le mélange est mis dans un ballon à fond rond et maintenue à température ambiante pendant une semaine.
- La solution a été agitée régulièrement
- Après une semaine, le filtrat a été recueilli à l'aide de papier filtre Whatman (Amin et Thakur, 2014).
- La teneur en humidité, la teneur en protéines, la teneur en matières grasses, la teneur en cendres et la teneur en fibres des échantillons homogénéisés ont été déterminées à l'aide des procédures décrites par (Shahid et al., 2020).

### III.4. Extraction des huiles de graines de lin

- Les graines de lin (300 g) ont été broyées dans un moulin à café.
- Le mélange est soumis à une extraction Soxhlet dans du n-hexane pendant 8 heures.
- La solution récupérée est séchées au four. (AL-Mathkhury et al.,2016).

#### • Principe de l'extraction par soxhlet

Le solvant d'extraction est porté à ébullition. Ces vapeurs qui traversent le Soxhlet, sont condensées au niveau du réfrigérant et s'écoulent à travers l'échantillon dans la cartouche. Ce système de distillation-condensation assure au solvant une circulation en continu dans l'échantillon. Un siphon permet au solvant de s'écouler de la cartouche pour retourner dans le ballon. Le solvant peut donc recommencer un nouveau cycle d'évaporation - condensation. Cette méthode est utilisée pour l'extraction des composés non volatils et semi volatils.



Figure 10. Montage de soxhlet

### III.5. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Dans l'étude d'Al-**Mathkhury et al.**(2016), Les composants de l'huile de lin ont été séparés sur une colonne FLC (FastLiquidChromatographic), la phase mobile était l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1% et l'acétonitrile (55:45 V/V), la détection UV est réglée à 280 nm et le débit est de 1,5 ml/min.

### III.6. Préparation de la suspension bactérienne

Dans l'article d'**Al-Mathkhury et al., 2016**, quelques colonies, cultivées sur gélose nutritive, ont été prélevées dans un tube stérile de solution saline normale dont la turbidité a été ajustée à environ 0.5 UFC/mL.

### III.7. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles de lin

L'effet antibactérien des huiles vis-à-vis des bactéries testées a été évalué par la méthode de diffusion de sur puits de gélose; (**Valgas et al., 2007**). L'inoculum bactérien a été étalé uniformément à l'aide d'un écouvillon stérile sur une boîte de Pétri stérile contenant de Mueller Hinton. Des séries de dilutions des huiles sont réalisées dans le DMSO. Les boîtes ont été incubées pendant 24 heures à 37°C, dans des conditions aérobies.

Après incubation, une croissance bactérienne confluyente a été observée. L'inhibition de la croissance bactérienne a été mesurée en mm. Les tests ont été réalisés 3 fois.

### III.8. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique

L'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de graines de lin a été déterminée par la méthode de diffusion de disques. Différents antibiotiques (Pénicilline (P) 10 µg Cefpirome(CPO) 30 µg Vanomycine (VA) 30 µg Amoxycilline (AMC) 30 µg) ont été utilisés comme contrôle.

Les plaques ont ensuite été placées dans un incubateur pendant 24 heures à 37 °C, et les zones d'inhibition ont été mesurées(**Alahmad et al., 2018**).

### III.9. détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI)

Dans l'étude de **Haroon et al., 2021**; l'extrait brut de plante a été utilisé en quantités variées (10- 120 mg/ml) sur des plaques de gélose. Les plaques ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. Les résultats ont été vus comme une zone distincte d'inhibitions contre chaque micro-organisme (**Shad et al., 2016**).

### III.10. Formation de biofilm

**Al-Mathkhury et al. (2016)** ont utilisé la technique de culture en plaque de microtitration pour évaluer la capacité de bactéries isolées à former des biofilm (**Folkesson et al., 2008**).

Les suspensions bactériennes des souches testées dont la turbidimétrie a été ajustée à  $10^6$  UFC/mL sont déposées en triples exemplaires dans les puits d'une microplaque à 96 puits. Pour éviter l'évaporation, les plaques ont été placées dans des sacs en plastique et incubées pendant 24 heures à 37°C.

Après incubation, les puits sont lavés deux fois avec une solution de NaCl à 0,9 %, puis recouverts pendant 15 minutes avec du cristal violet à 0,1 %.

Le biofilm formé a été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaques (490 nm) après une solubilisation à l'éthanol (96%).

### III.11. Activité antibiofilm de l'huile de lin et de l'extrait méthanolique

**Al-Mathkhury et al. (2016)** ont évalué l'effet des huiles avant et après la formation de biofilm.

Dans un premier temps (**avant la formation de biofilm**), une suspension bactérienne contenant de l'huile de lin à une concentration donnée a été ajoutée aux puits. Ensuite, le protocole de biofilm comme décrit précédemment.

Parallèlement à chaque quantification, le nombre de cellules viables a également été déterminé. Brièvement, les cellules ont été vigoureusement remises en suspension et les unités formatrices de colonies totales/ml (UFC/ml) ont été déterminées par dilution en série et ensemencement sur des plaques nutritives sans lavage préalable.

L'élimination cohérente des cellules bactériennes a été confirmée par la coloration des puits au cristal violet. Des contrôles ont été effectués en ajoutant une solution saline tamponnée au phosphate au lieu de l'huile de lin

En ce qui concerne **les biofilms déjà formés**, (les biofilms cultivés dans les plaques sans l'huile) ; l'huile de lin a été soigneusement ajoutée aux puits. Après 24 h d'incubation, la procédure a été précédée comme pour la quantification des biofilms, les puits sont lavés deux

fois avec une solution de NaCl à 0,9 %, puis recouvert pendant 15 minutes avec du cristal violet à 0,1 %.

Le biofilm formé a été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaques (490 nm) après une solubilisation à l'éthanol (96%).

Concernant l'extrait méthanolique, **Haroon et al.,(2021)** ont suivi le même protocole sur des biofilms déjà formé.



***CHAPITRE IV***  
***Résultats et discussion***

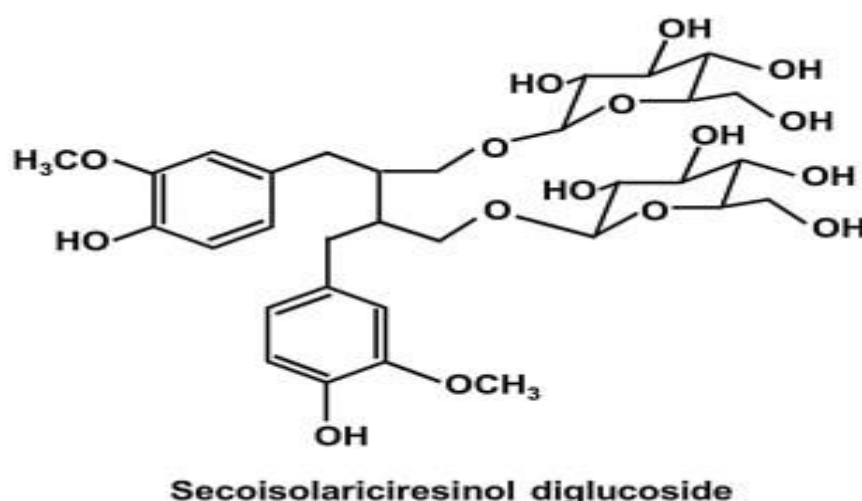
### IV.1. Analyse des extraits

Selon une analyse approximative de l'extrait méthanolique de *Linum usitatissimum*, les résultats ont révélé que la concentration de matières grasses brutes et de protéines brutes était plus élevée, mais que les niveaux de fibres, de cendres et d'humidité étaient plus faibles.

**Tableau 3.** Composition approximative de l'extrait méthanolique de *Linum usitatissimum*.

Facteurs	Extrait méthanolique
Humidité (%)	8.3
Cendres (%)	4.33
Protéine (%)	21.20
Lipides (%)	49.2
Fibres (%)	5.63

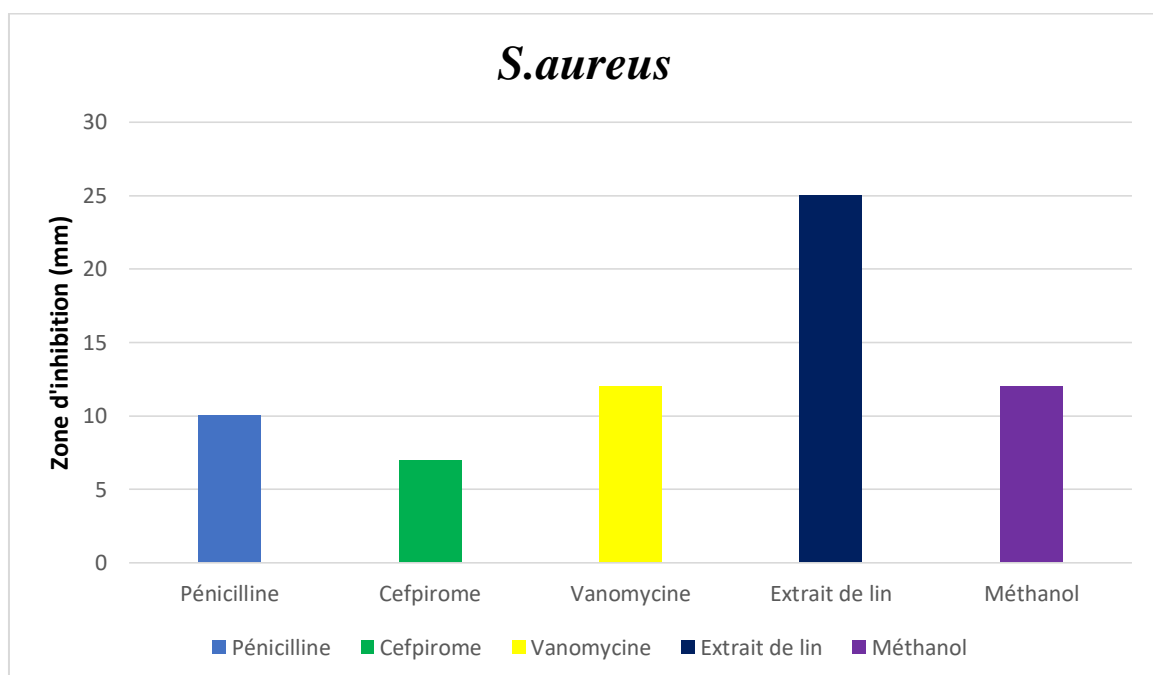
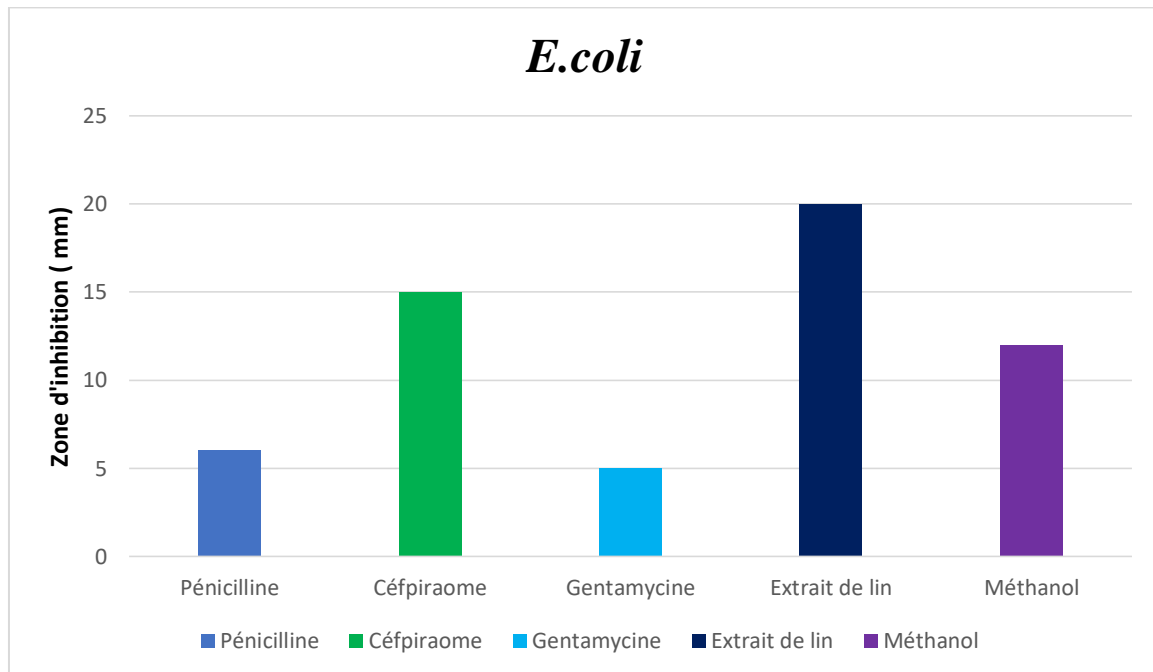
Les résultats de HPLC obtenus dans l'étude de (Al-Mathkhury et al., 2016) ont révélé que l'huile de lin était très riche en diglucoside de secoisolariciresinol (SDG), c'est un phytoestrogène antioxydant présent dans les graines de lin, de tournesol, de sésame et de citrouille. Dans les aliments, il peut être trouvé dans les pains commerciaux contenant des graines de lin.

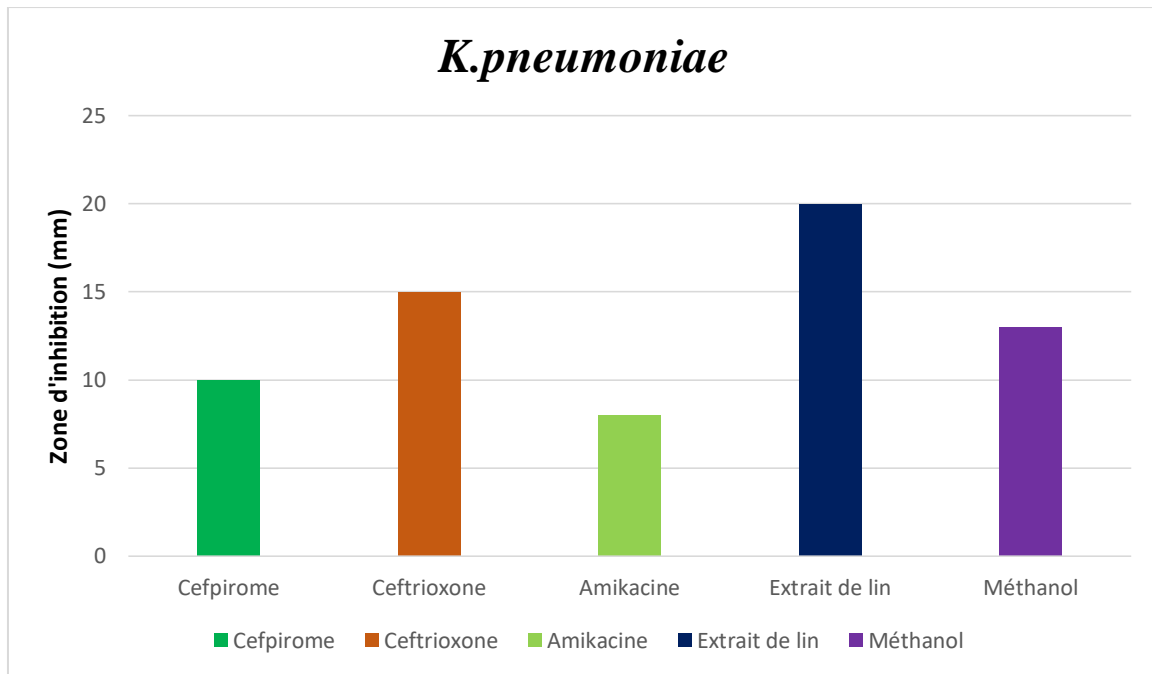


**Figure 11.** La structure de diglucoside de secoisolariciresinol. (Masashi, 2014)

## IV.2. Activité antibactérienne

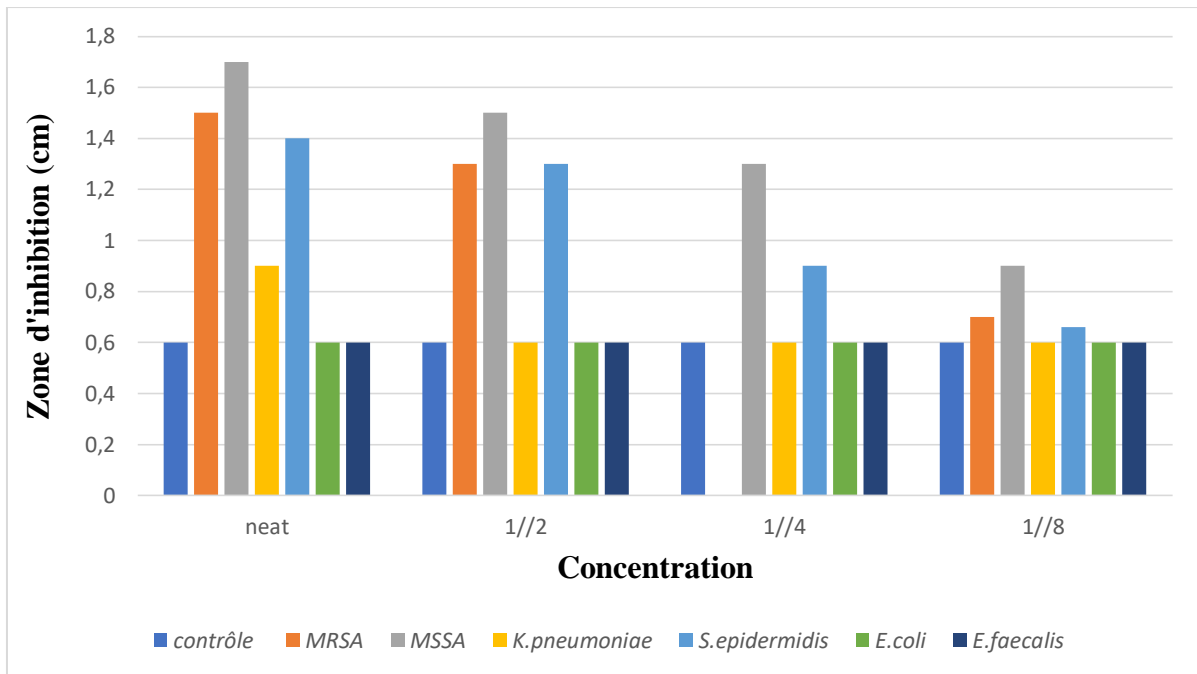
Dans le cas de l'extrait méthanolique, des zones distinctes d'inhibition des souches testées ont été détectées, les résultats révèlent qu'il a un effet très significatif sur *S. aureus* et *E. coli*, et peu significatif sur *K. pneumoniae* (figure 12).





**Figure 12.** Effet inhibiteur de l'extrait méthanolique de graines de lin sur les bactéries. (A) *E. coli*, (B) *S. aureus* (C) *K. pneumoniae* (Harron et al., 2021).

La figure 13 montre l'effet de l'huile de lin sur les souches bactériennes isolées (Al-Mathkhury et al., 2016). Aucun effet inhibiteur n'a été constaté contre *E. coli* ou *E. faecalis*. Cependant, des effets variables ont été développés contre *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA), *S. aureus* sensible à la méthicilline (MSSA), *K. pneumoniae* et *S. epidermidis*.



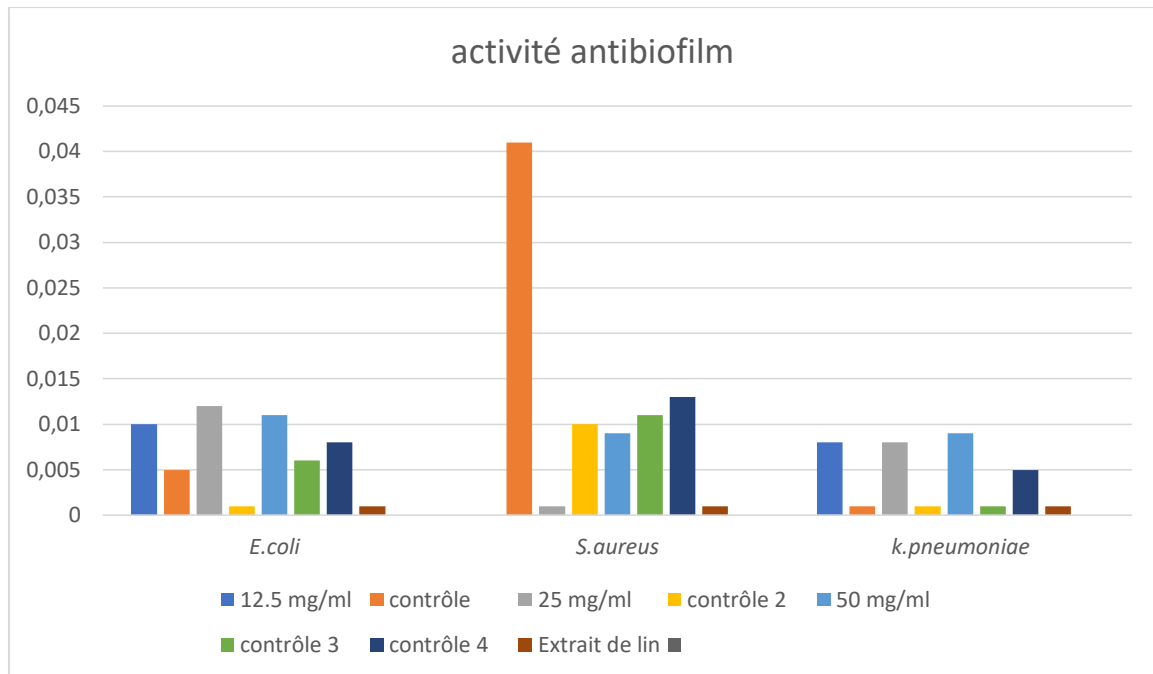
**Figure13.**Effet inhibiteur de l’huile de lin sur les isolats bactériens (Al-Mathkhury et al., 2016)

### IV.3.La concentration minimale inhibitrice (CMI)

L’effet de l’extrait méthanolique vis -à-vis de des différentes bactéries par changement de concentration (10 – 120 mg/ml) a été étudié. Les meilleurs résultats sont obtenus avec *S.aureus* à la concentration de l’extrait (120 mg/ml).

### IV.4. Activité antibiofilm

Il a été observé que l’extrait méthanolique a un grand effet inhibiteur sur *S.aureus* a donné avec une concentration de 12.5 mg/ml et la valeur moyenne pour celle-ci était de 0.043 alors que l’effet minimal a été observé contre *K. pneumoniae* avec une valeur moyenne de 0,00715 comme le montre **la figure 14**



**Figure 14.** Effet de l'extrait méthanolique de lin sur les micro-organismes avec différents concentrations. (Harron et al., 2021)

L'huile de graines de lin a montré une activité antibiofilm contre tous les isolats bactériens testés (MSSA, MRSA, *S. epidermidis* et *K. pneumoniae*) et a montré différents degrés d'inhibition contre eux. De plus, le nombre de bactéries dans le biofilm a également été réduit (Tableau 4).

En ce qui concerne l'activité antibiofilm avant la formation du biofilm, le biofilm a été réduit de manière significative notamment pour *S. aureus* (MRSA) et *S. epidermidis*.

L'huile de lin a réussi à les empêcher de former un biofilm et à tuer toutes les cellules vivantes à l'intérieur du biofilm. (Figure 15).

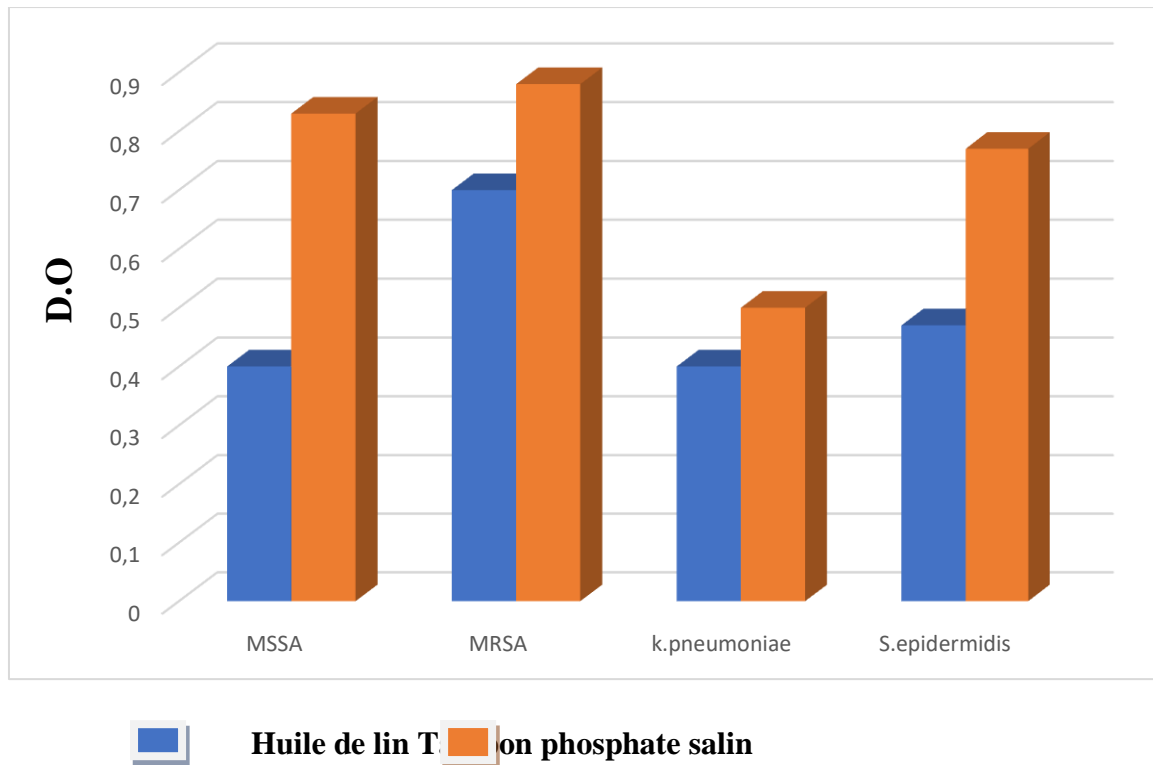
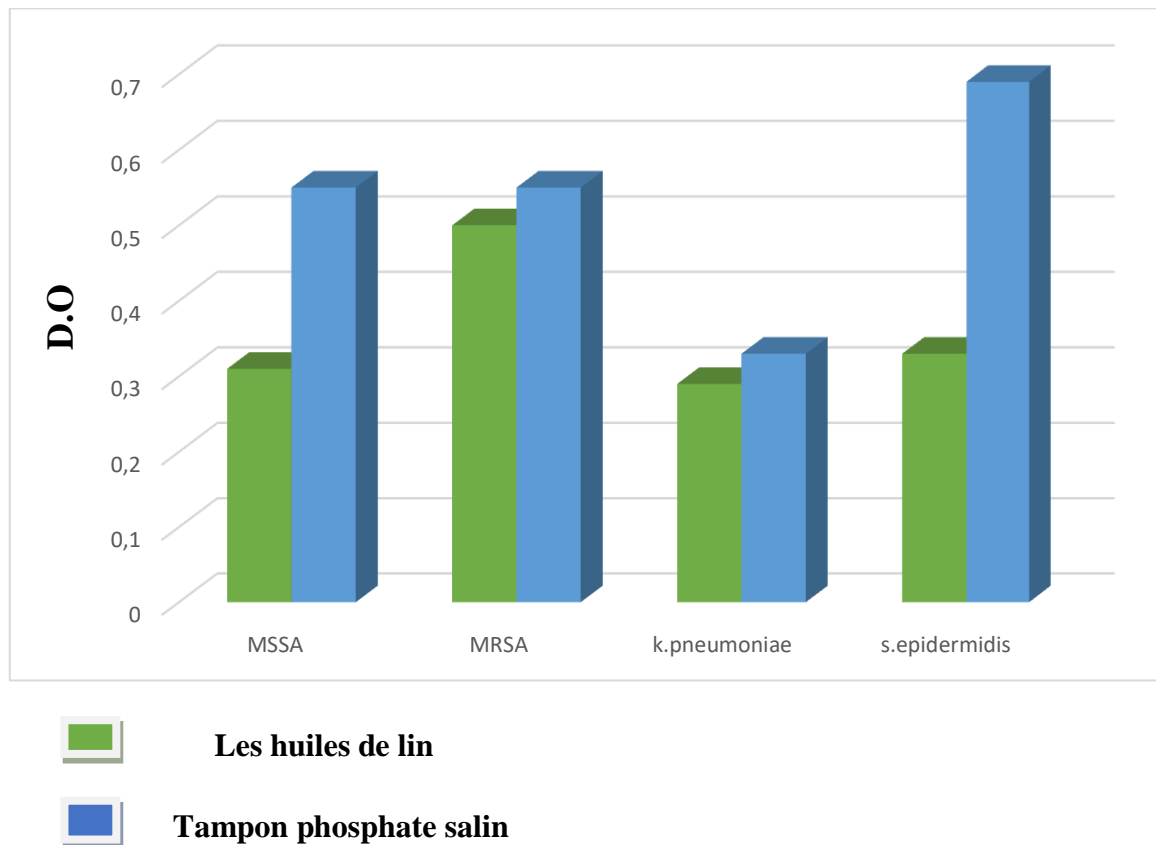


Figure 15. Activité antibiofilm (adhésion) de l’huile de lin. (Al-Mathkhury et al., 2016)

Tableau 4. Effet inhibiteur de l’huile de lin sur le nombre de bactéries dans le biofilm (avant la formation du biofilm) (Al-Mathkhury et al., 2016)

Bactérie	Huile de lin		tampon phosphate salin (témoin)	
	Numéro viable (CFU/ml)×10 <sup>6</sup>	SD	Numéro viable (CFU/ml)×10 <sup>6</sup>	SD
MSSA	48.33333	2.516611	203000	2645.751311
MRSA	ND	-	41333.33	2516.611478
<i>K.pneumoniae</i>	303.3333	25.16611	27000	2645.751311
<i>S.epidermidis</i>	ND	-	73333.33	3214.550254

Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas de l'activité de l'huile de lin sur le biofilm déjà formé. **La Figure 16** et le **Tableau 5** illustrent que l'huile de lin a été capable de diminuer, de manière significative, l'épaisseur du biofilm (mesurée par la DO490) et réduit le nombre de bactéries dans ces biofilms formés.



**figure16.**Activité antibiofilm (Après la formation de biofilm) de l'huile de lin. (Al-Mathkhury et al., 2016).



**Tableau 5.** Effet inhibiteur de l'huile de lin sur le nombre de bactéries dans le biofilm (après la formation du biofilm) (Al-Mathkhury et al., 2016).

Bactérie	Huile d lin		tampon phosphate salin (témoin)	
	Numéro viable (CFU/ml)×10 <sup>6</sup>	SD	Numéro viable (CFU/ml)×10 <sup>6</sup>	SD
<b>MSSA</b>	235.6667	6.027714	363333.3	20816.65999
<b>MRSA</b>	10200	200	138000	3000
<i>K.pnumoniae</i>	1143.333	15.27525	64666.67	3055.050463
<i>S.epidermidis</i>	976.6667	30.5505	86666.67	1527.525232

Le lin (*Linum usitatissimum*) comme d'autres plantes est considérablement employé dans le quotidien de la santé publique et énormément introduit en nutrition animale. Ses graines sont riches en humidité, en cendres, en matières grasses brutes, en protéines brutes et en fibres brutes, qui sont tous des constituants alimentaires fonctionnels importants. Elles aident à améliorer notre système immunitaire car elles sont riches en graisses et en protéines. (Haroon et al., 2021).

Les études menées par Al-Mathkhury et al., 2016 et Haroon et al., 2021 ont démontré une efficacité maximale de l'huile de lin et l'extrait méthanolique contre les bactéries à Gram positif, c'est-à-dire *S.aureus*, tandis que *K. pneumoniae* étaient moins sensibles aux deux extraits, *E. coli* était sensible à l'extrait méthanolique seulement.

L'huile de lin était inactive contre *E.coli*, ceci peut être attribué à la méthode utilisée pour l'extraction de l'huile, et qui peut affecter sa composition et donc son efficacité vis-à-vis de cette bactérie. D'après le travail de (Petropoulos et al., 2021), l'huile de lin extraite par pression à froid était très active contre *E.coli*.

Il a été observé que les graines de lin ont une activité antimicrobienne contre les bactéries gram positif alors qu'elles sont moins efficaces contre bactéries gram négatives. La sensibilité

aux molécules bioactives est différente entre bactéries Gram positives et Gram négatives et pourrait être attribuée aux différences dans les constitutions morphologiques de ces microorganismes (**Pitchamuthu et al., 2012**).

Les résultats de HPLC obtenus dans l'étude de (**Al-Mathkhury et al., 2016**) ont révélé que l'huile de lin était très riche en diglucoside de secoisolariciresinol (SDG), par conséquent, toute l'activité antibactérienne de l'extrait de graines de lin peut être attribuée à ce composant. (**Sarajlija et al., 2012**).

Pour le traitement de nombreuses maladies bactériennes, l'inhibition du biofilm est une cible thérapeutique de premier plan (**Sánchez et al., 2016**), dans ce contexte l'utilisation des extraits de graines de lin ( l'huile de lin et l'extrait méthanolique ) a montré un effet antibiofilm élevé contre *S.aureus*, tandis que l'effet contre *E.coli* était modeste dans le cas de l'extrait alcoolique. (**Bazargani et Rohloff, 2016**).

De manière générale et à travers ces études il semblerait que les extraits de graines de lin **Al-Mathkhury et al., 2016 ; Haroon et al., 2021** est plus efficace sur le biofilm des bactéries à Gram positif et plus particulièrement *S. aureus* en comparaison avec les biofilms des bactéries à Gram négatif.

# Conclusion

Les biofilms sont identifiés comme présentant une résistance accrue aux antibiotiques et aux agents antimicrobiens, ce qui représente un fardeau gênant pour les soins de santé humaine, et le traitement des infections associées aux biofilms est actuellement un défi complexe.

Ainsi, les ressources naturelles offrent une énorme bibliothèque pour le criblage d'agents anti-biofilm. Les plantes et les aliments naturels ont fait l'objet de recherches de plus en plus axées sur leurs effets bénéfiques pour la santé ces dernières années.

L'objectif de ce travail était de déterminer l'activité anti biofilm de quelques extraits de graines de lin vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes en réalisant une synthèse de deux articles.

Suite aux résultats obtenus par **Haroon et al., 2021** nous pouvons dire que *staphylococcus aureus* était la bactérie la plus sensible à cette extrait à une concentration de 12,5 mg/ml.

L'étude menée par **(Al-Mathkhury et al., 2016)** ; a montré que les huiles de graines de lin arrivent non seulement à inhiber les biofilms formés par *S.aureus* (MRSA) et *S. epidermidis* mais aussi à son éradication, en tuant les cellules bactériennes.

Les travaux réalisés par ces deux auteurs confirment de plus en plus notre besoin au développement rapide de solutions basées sur l'utilisation des molécules bioactives.

Comme perspectives, il serait souhaitable de réaliser les mêmes travaux en utilisant des extraits de plantes utilisées localement en Algérie sur des souches isolées du milieu hospitalier.

# Références Bibliographiques

1. **Adnan M., Patel M., Deshpande S., Alreshidi M., Siddiqui A. J., Reddy M. N., et al. (2020).** Effect of *Adiantum philippense* extract on biofilm formation, adhesion with its antibacterial activities against foodborne pathogens, and characterization of bioactive metabolites: an *in vitro-in silico* approach. *Frontier in Microbiology*. 11:823
2. **Alahmad B.E.M., Kashmoola M.A., Kumar P., Subramaniam L., MOKHTAR, K.I.B., Shaban M. N. (2018).**The antibacterial effect of flaxseed extract on selective oral pathogens: comparative *in vitro* study. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 7: 1-11.
3. **Allaby R.G., G.W. Peterson, D.A. Merriwether, Yong-Bi Fu. (2005).** Evidence of the domestication history of flax (*Linum usitatissimum* L.) from genetic diversity of the *sad2* locus. *Theoretical and Applied Genetics*. 112:58-65.
4. **Allewell NM.(2016).** Introduction to biofilms thematic minireview series. *Journal of Biological Chemistry*. 291:12527-8.
5. **Al-mathkhury H.J.F, Al-dhamin A.S., Al-taie, K.L. (2016).** Antibacterial and antibiofilm activity of flaxseed oil. *Iraqi Journal of Science*. 57 : 1086-1095.
6. **Al-Mathkhury H.J.F., Flaih, M.T. and Tawfiq, H. (2012).**Histopathological effects of, *Staphylococcus xylosum* peptidoglycan in comparison to *E. coli* lipopolysaccharide in urinary tract of mice. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 42 : 1278-1285.
7. **Al-Mathkhury, H.J.F., Al-Shaybany, M. (2012).** Murine Skin Damage caused by *Staphylococcus aureus* DNA and *Propionibacterium acnes* DNA. *International Journal of Recent Scientific Research*. 3 : 940 -945.
8. **Al-Mathkhury, H.J.F., Ahmed A.M. (2011).**Effect of *Lactobacillus acidophilus* on *Escherichia coli* causing urinary tract infections *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Al-Anbar*. 5 : 1-6.
9. **Almeida J.R., Vasconcelos V. (2015).**Natural antifouling compounds: Effectiveness in preventing invertebrate settlement and adhesion. *Biotechnology Advances*. 33: 343-57.
10. **Amin T., Thakur M. (2014).** A comparative study on proximate composition, phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial activities of *Linum usitatissimum* L. (flaxseeds). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3: 465-481.
11. **Anderson G.G., O'Toole GA. (2008).** Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322:85–105.

12. **Bazargani M.M., and Rohloff J. (2016).** Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*. 61 : 156-164.
13. **Bjarnsholt T. (2013).**The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*.121:1-58.
14. **Carmen J. C., Roeder B. L., Nelson J. L., Ogilvie R. L. R., Robison R. A., Schaalje G. B., Pitt W. G. (2005).** Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics. *American journal of infection control*, 33 : 78-82.
15. **Carpentier B.Y., Cerf O. (1993.)**Biofilms and their consequences with particular references to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*. 75: 499-511.
16. **Casa R., Russell G., Cascio B. L., Rossini F. (1999).** Environmental effects on linseed (*Linum usitatissimum* L.) yield and growth of flax at different stand densities.*European journal of agronomy*. 11 : 267-278.
17. **Ceri H., Olson M.E., Turner R.J. (2010).** Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother*. 11:1233–1237.
18. **Chaudhary B., Tripathi M.K., Pandey S.K., Bhandari H.R., Meena D.R., Prajapati S.P. (2016).** Uses of flax (*Linum Usitatissimum* )after harvest . *National academy of agriculture science (NAAS)*. 34:159-163.
19. **Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A., Percival S.L. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine, 121, 1–17.
20. **Costerton J. 1999.** Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11 : 217–221.
21. **Costerton JW., Stewart PS., Greenberg EP. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284: 1318-1322.
22. **Davies D. (2003).** Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2:114-22.
23. **De Chalvet De Rochemonteix A. (2009).** Les biofilms et la peau. (Thèse de doctorat. École vétérinaire de Maisons-Alfort). détermination by gaschromatography-mass spectrometry method. *Czech Journal of Food Sciences*. 30 : 45–52.
24. **Diederichsen A., Richards K. (2003).** Cultivated flax and the genus *Linum* L. Flax: the genus *Linum*, p32-38.

25. **Donlan R. M. (2008)**. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible?. In *Bacterial biofilms* (pp. 133-161). Springer, Berlin, Heidelberg.
26. **Donlan R. M., Costerton J. W. (2002)**. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15 : 167–193.
27. **Donlan R.M. (2002)**. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8 : 881–890.
28. **Dumas C. (2007)**. Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible (thèse de doctorat).
29. **Duraffourd C., Lapraz J.C., Chemli R. 1997**. La plante médicinale de la tradition à la science. 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris
30. **Flemming HC., Wingender J. (2010)**. The biofilm matrix. *Nature Reviews*. 8: 623-633.
31. **Folkesson A., Haagensen J., Zampaloni, C., Sternberg, C. (2008)**. Biofilm Induced Tolerance towards Antimicrobial Peptides. *PLoS One*. 3 : e1891.
32. **Goller C.C., Romeo T. (2008)**. Environmental Influences on Biofilm Development. In *Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg). 37– 66.
33. **Gupta P., Sarkar S., Das B., Bhattacharjee S., Tribedi P. (2015)**. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*. 198 : 1–15.
34. **Hajoubi W. (2019)**. Les infections associées aux biofilms. Thèse de doctorat en Médecine. Université Mohamed 5. Rabat. Maroc
35. **Han S.M., Kim J.M., Hong I.P., Woo S.O., Kim S.G., Jang H.R., Pak S.C. (2016)**. Antibacterial activity and antibiotic-enhancing effects of honeybee venom against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 21: 79.
36. **Harrison J.J., Stremick C.A., Turner R.J., Allan N.D., Olson M.E., Ceri H. (2010)**. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: A miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nature Protocols*. 5:1236–1254.



37. Heli J.R.D., Shanna L.M.S., Chad E.B.A, Beth K. (2007). Flaxseed: A Review of Health Benefits. Pennington Nutrition N°5, P 4
38. Hocking P.J, Kirkegaard, J.A, Angus J.F. 1997. Comparison of canola, Indian mustard and linola in two contrasting environments. I. Effects of nitrogen fertilizer on dry matter production, seed yield and seed quality. *Field Crops Research*.49 : 2-3.
39. Huang H., Peng C., Peng P., Lin Y., Zhang X., Ren H. (2018). Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*.103 :1115-1129.
40. Kaushik P., K. Dowling , R. Adhikari , C.J. Barrow ,B. Adhikari . (2017). Effect of extraction temperature on composition, structure and functional properties of flaxseed gum. *Food Chemistry*. 215 : 333-340.
41. Khan H.U., F. Zeenat W., Ahmad I.A.V., Khan (2017) .Therapeuties, phytochemistry and pharmacology of Alsi ( *Linum Usitatissimum Linn* ) : An important Unani drug . *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*. 6 :377-383.
42. Kumar A., Alam A., Rani M., Ehtesham N. Z., Hasnain S. E. (2017). Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens.*International Journal of Medical Microbiology*.307 : 481– 489.
43. Laiq Khan M, Sharif M, Sarwar Sameea M, Ameen M. (2010). Chemical composition of different varieties of linseed. *Pakistan Veterinary Journal*. 30 : 79-82.
44. Lebeaux D., Ghigo J.M., Beloin C. (2014).Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78 : 510–543.

45. **Lewis K.(2008)**. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells.*Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322:107–131.
46. **Maki D.G. (1994)**. Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention, and management. Infections associated with indwelling. *medical devices*. 2 : 155-212.
47. **Martinez L.R., Casadevall A. (2007)**. *Cryptococcus neoformans* Biofilm Formation Depends on Surface Support and Carbon Source and Reduces Fungal Cell Susceptibility to Heat, Cold, and UV Light. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 73 : 4592–4601.
48. **Olson M.E., Ceri H., Morck D.W., Buret A.G., Read R.R.(2002)**. Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics.*Canadian Journal of Veterinary Research*. 66:86–92.
49. **Palla A.H., N.A. Khan , S. Bashir , N. Ur- Rehman , J. Iqbal , A.H. Gilani . (2015)**. Pharmacological basis for the medicinal use of *Linum Usitatissimum*(Flaxseed) in infections and non - infections diarrhea .*Journal of Ethnopharmacology* . 160: 61-68 .
50. **Petropoulos SA ., Fernandes A.,Ricardo C. Calhelha , Roupael Y.,Petrovi J.,Sokovi M, Ferreira I.C.F. R., Barros L. (2021)**.Antimicrobial Properties, Cytotoxic Effects, and Fatty Acids Composition of Vegetable Oils from Purslane, Linseed, Luffa, and Pumpkin Seeds Spyridon A.*Applied sciences*.11 : 5738.
51. **PhillipsP.I., Wolcott R.D., Fletcher J., Schultz G.S. (2010)**. Biofilms made easy. *Wounds international*, 1(3): 012.

- 52. Pitchamuthu A., Muthiah G., Rajaram P. (2012).** Preliminary study on the antimicrobial activity of *Enicostemma littorale* using different solvents. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 5: 552-555.
- 53. Qian P.Y, Li Z., Xu Y., Li Y., Fusetani N.(2015).** Mini-review: Marine natural products and their synthetic analogs as antifouling compounds: 2009–2014. *Biofouling*. 31:101-22.
- 54. Rashid N., Dar P.A., Ahmad H.N., Rather S.A. (2018) .** *Alsi (linum usitatissimum)*: A potential multifaceted unani drug . *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*. 7: 3294 -3300.
- 55. Renouard S. (2011).** Régulation transcriptionnelle de la biosynthèse des lignanes du lin (*linum usitatissimum* et *linum flavum*) et amélioration de l'extraction de Lignanes. Science du vivant, Thèse de doctorat (Université d'Orléans), p231.
- 56. Romain B., Lise F., Murielle N., Catherine D.( 2012).** Biofilms, quand les microbes s'organisent. Quae. France.
- 57. Romano C.L., Romano D., Morelli I., Drago L. (2017).** The concept of biofilm-related implant malfunction and "low-grade infection". *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 971:1-13.
- 58. Römling U., Kjelleberg S., Normark S., Nyman L., Uhlin B. E., Åkerlund B. (2014).** Microbial biofilm formation: a need to act. *Journal of internal medicine*, 276: 98-110.
- 59. Roux A., Ghigo J.-M. (2006).** Les biofilms bactériens. Bul. de l'Ac. Vét. de France 261.
- 60. Russo R., R. Reggiani .(2015).** Phenolics and antioxidant activity in flax varieties with different productive attitude . *International food research journal* .22 : 1736-1739.

- 61. Sánchez E., Rivas Morales C., Castillo S., Leos-Rivas C., García-Becerra L., Ortiz Martínez D.M. (2016).** Antibacterial and antibiofilm activity of methanolic plant extracts against nosocomial microorganisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1572697.
- 62. Sarajlija, H., Čukelj, N., Novotni, D. and Mršić, G. (2012)** .Preparation of Flaxseed for lignan determination by gas chromatography-mass spectrometry method. *Czech Journal of Food Sciences*. 30 : 45–52.
- 63. Savoie R. (2008)** .Etude multi-échelles de la séparation solide - liquide dans la trituration du lin oléagineux . Thèse de doctorat (Université de technologie ,Compiègne ) .P13-14.
- 64. Shad A.A., Asmat S., Bakht J., Jan S., Khan M.A. (2016).** Antimicrobial potentials and phytochemical analysis of desert cotton (*A. Javanica*) and flax (*L. Ustitatissimum*). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 29 : 861-868.
- 65. Shahid M., Fatima H., Anjum F., Riaz M. (2020).** Proximate composition, antioxidant activities and fatty acid profiling of selected mushrooms collected from Azad Jammu and Kashmir. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 77 : 145-153.
- 66. Shastry R. P., Rekha P.D., Rai, V.R. (2019).** Biofilm inhibitory activity of metalloprotein AHL-lactonase from the cell-free lysate of endophytic *Enterobacter* species isolated from *Coscinium fenestratum* Gaertn. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1878-8181(18)30919-8.
- 67. Singh K .K., Mridula D., Rehal J., Barwal P . (2011)** .Flaxseed: A potential source of food , feed and fiber . *Food science and nutrition*. 51 : 210-222.

- 68. Smykal P., Bacova- Kerteszova N., Kalender R., Corander J., Schulman A.H., Pavelek M. (2011).** Genetic diversity of cultivated flax (*Linum Usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon - based markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 122: 1385 - 1397.
- 69. Spormann A.M. (2008).** Physiology of Microbes in Biofilms. In *Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg). 17–36.
- 70. Stickler D.J. (2002).** Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *Journal of applied microbiology*. 92 : 163S-70S.
- 71. Thierry J. (2008).** Biofilms bactériens. *Techniques de l'Ingénieur*, 3. towards Antimicrobial Peptides. PLoS ONE, 3 : 1-4.
- 72. Tremblay Y.D., Hathroubi S., Jacques M. (2014).** Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 78 : 110- 116.
- 73. Tribalat M.A. (2016).** Etude métabolique de lin (*linum usitatissimum*) mutant pour la voie de biosynthèse des lignanes. Thèse de doctorat (Université de Picardie Jules Vernes). P12.
- 74. Valgas C., De Souza S., Elza F., Smânia, J.R.A. (2007)** Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38 : 369-380.
- 75. Xu L., Shao C., Li G., Shan A., Chou S., Wang J., et al. (2020).** Conversion of broad-spectrum antimicrobial peptides into species-specific antimicrobials capable of precisely targeting pathogenic bacteria. *Scientific Reports*/  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58014-6>

76. Yin W., Wang Y., Liu L., He J. (2019). Biofilms: The Microbial —Protective Clothing‖ in Extreme Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 : 3423.
77. Zhang L., Liang E., Cheng Y., Mahmood T., Ge F., Zhou K., et al. (2020). Is combined medication with natural medicine a promising therapy for bacterial biofilm infection? *Biomed. Pharmacother.* 128:110184. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110184.