



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM

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

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

**Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical
et à l'environnement « LAMAABE »**

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en
Biologie Option : Microbiologie et contrôle de qualité

Thème

**Effet des extraits de quelques plantes médicinales sur des biofilms
bactériens**

Présentée par

M^{elle} Latti Nawel

Devant le jury composé de :

Présidente	Melle. BENARIBA Nabila	M.C.A	Université de Tlemcen
Encadreur	Mme. MALEK F	M.C.A	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme. BENSALAH Fatima	M.C.B	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2017 – 2018.

Résumé

Cette étude vise à évaluer l'activité antibactérienne et antibiofilm des extraits végétaux provenant de 6 espèces végétales : *P. halepensis*, *A. visnaga*, *B. vulgaris*, *R. raetam*, *C. colocynthis* et truffes de désert vis-à-vis des souches cliniques de *Staphylococcus* et *Micrococcus* isolées de services de la néonatalogie et la chirurgie A ainsi que des souches de référence et de collection de laboratoire appartenant aux espèces de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*. L'identification des souches de *Staphylococcus* a été réalisée par des tests morphologiques et biochimiques ainsi que la détermination de biotype. Les résultats obtenus par la méthode de diffusion des disques ont montré que l'extrait végétal de *B. vulgaris* possède un effet inhibiteur plus important que celui des autres extraits sur la croissance libre de toutes les souches bactériennes testées. De même, les biofilms formés par la souche *S. aureus* par la méthode de microdilution ont été inhibés par le même agent naturel à une valeur de CMIB équivalente à $6,25 \cdot 10^{-4}$ g/ml. Les résultats ont montré aussi que l'extrait végétal de *B. vulgaris* interfère avec l'adhésion bactérienne au verre des souches de *B. subtilis* et *S. aureus* empêchant la formation de leur biofilms à un stade précoce.

Mots clés : Biofilm, souches cliniques, souches de références, CMIB, Extraits végétaux.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للبكتيريا و الشريط الحيوي للمستخلصات النباتية لست أنواع نباتية : *P. halepensis* ، *A. visnaga* ، *B. vulgaris* ، *R. raetam* ، *C. colocynthis* و الكما الصخراوي على سلالات سريرية من نوع *Staphylococcus* و *Micrococcus* معزولة من قسمي طب الولدان و الجراحة " أ " بالإضافة إلى سلالات مرجعية أخرى من نوع *Bacillus subtilis* ، *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus*. تحديد السلالات تم بواسطة فحوص مورفولوجية ، بيوكيميائية إضافة إلى تحديد النمط الحيوي . بينت النتائج المتحصل عليها من طريقة انتشار الأقراص أن المستخلص النباتي لشجرة الباربريس يمتلك تأثيرا مثبتا أكثر من المستخلصات النباتية الأخرى على كل السلالات البكتيرية المجربة. كذلك الشرائط الحيوية التي كونتها السلالة *S. aureus* عبر طريقة التخفيف الجزئي قد تم تثبيطها بواسطة نفس المستخلص الطبيعي عند تركيز أدنى مثبت لتكوين الشريط الحيوي (CMIB) يعادل $6.25 \cdot 10^{-4}$ غ / مل . تظهر النتائج أيضا أن المستخلص النباتي لشجرة يتداخل مع الالتصاق البكتيري على الزجاج لكل من السلالتين *B. subtilis* و *S. aureus* مانعا تكوينهم للشرائط الحيوية في مرحلة مبكرة .

الكلمات المفتاحية : شريط حيوي ، سلالات معزولة ، سلالات مرجعية ، CMIB ، مستخلصات نباتية .

Abstract

This study aims to evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of plant extracts from 6 plant species: *P. halepensis*, *A. visnaga*, *B. vulgaris*, *R. raetam*, *C. colocynthis* and desert truffles vis-à-vis strains. *Staphylococcus* and *Micrococcus* clinics isolated from neonatology and surgery departments "A" as well as reference strains and laboratory collections belonging to species of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. The identification of *Staphylococcus* strains was performed by morphological and biochemical tests as well as biotype determination. The results obtained by the disk diffusion method have shown that the vegetable extract of *B. vulgaris* has a greater inhibitory effect than that of the other extracts on the free growth of all the bacterial strains sucked. Similarly, the biofilms formed by the *S. aureus* strain by the microdilution method were inhibited by the same natural agent to a CMIB value equivalent to $6.25 \cdot 10^{-4}$ g / ml. The results also showed that *B. vulgaris* plant extract interferes with the bacterial adhesion to glass of *B. subtilis* and *S. aureus* strains preventing the formation of their biofilms at an early stage.

Key words: Biofilm, clinical strains, reference strains, CMIB, plant extracts.

Remerciements

En tout premier lieu, Je remercie le Dieu le tout puissant d'avoir m'accorder la force et la patience pour achever ce modeste travail.

*Je tiens à remercier mon encadreur de mémoire **M^{me} Malek F.**, Maître de Conférences « A » à l'université de Tlemcen, que j'estime énormément. J'ai beaucoup apprécié ses qualités d'enseignant et d'encadrement. J'aimerais lui adresser mes plus vifs remerciements pour l'attention qu'elle a portée à ce travail, pour son soutien, ses conseils précieux, sa gentillesse, sa disponibilité et sa rigueur dans le travail qui est un des éléments majeurs du bon déroulement de ce mémoire. J'ai eu le privilège de bénéficier de son savoir et de sa grande expérience qui, alliés à ses qualités humaines resteront pour moi un modèle.*

*Le mot « merci » est bien court pour exprimer ma profonde reconnaissance à **M^{me} BENARIBA N.**, Maître de Conférences « A » à l'université de Tlemcen, pour m'avoir fournie les extraits utilisés pour la réalisation de ce travail. Merci pour votre qualité humaine, et pour l'honneur que vous me faite en acceptant de présider ce travail.*

*Je veux exprimer, ma respectueuse gratitude à **M^{me} BENSALAH .**, Maître de Conférences « B » à l'université de Tlemcen, pour avoir bien voulu participer à ce jury. Je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.*

*Je remercie aussi **Mr. Yazid Amine** ingénieur de laboratoire de microbiologie au Département de Biologie pour son aide, ses remarques et sa disponibilité.*

En fin, mes remerciements à toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail.

Dédicace

*louange à Dieu le tout puissant
que sans lui je n'arrive jamais à terminer*

ce modeste travail , que je dédie à :

Mes parents,

ma sœur , mes frères,

et à tous ceux qui me sont chers.

Liste des abréviations

EPS : Extra polymeric substances

MSCRAMM : microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules

QS : quorum sensing

EDS : eau distillée stérile

TSB : Tryptophane- Soja-Broth

TSA : Tryptophane- Soja-Agar

DO : densité optique

DO_t : densité optique du témoin

ATCC : American Type Culture Collection

SARM : *S.aureus* résistants à la méthicilline

CMIB : concentration minimale inhibitrice de la formation du biofilm

g : gramme

h : heure

ml : millilitre

nm : nanomètre

µl : microlitre

CV : cristal violet

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition générale de biofilm	04
Tableau 02 : Caractéristiques typiques de certaines espèces staphylococciques y compris <i>S.aureus</i> .	11
Tableau 03 : Quelques composants d'huiles essentielles de <i>P. halepensis</i> de différents régions algériennes	17
Tableau 04 : les souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits végétaux par la méthode de diffusion des disques.	29
Tableau 05 : Critères morphologiques des colonies apparaissent sur gélose au sang	33
Tableau 06 : Tests biochimiques de la souche S2 .	34 39
Tableau 07 : l'effet inhibiteur de certains extraits végétaux sur différentes souches bactériennes	
Tableau 08 : Effet de quelques antibiotiques sur la croissance bactérienne de Sar, BR, BS, P53 et S13	43

Liste des figures

Figure 01 : Les étapes de formation de biofilm .	05
Figure 02 : Micrographies électroniques à balayage de deux biofilms matures .	07
Figure 03 : Représentation schématique de dispersion (active et passive) d'un biofilm .	08
Figure 04 : Représentation schématique de l'hétérogénéité physiologique dans un biofilm d'une seule espèce.	09
Figure 05 : Micrographie en contraste de phase de <i>S. aureus</i> apparaît en grappes	11
Figure 06 : Processus de formation de biofilm chez <i>S. aureus</i> .	12
Figure 07 : Micrographies électroniques d'un biofilm précoce (24h) et un autre mature (48h) de <i>S.aureus</i> .	13
Figure 08 : Les fleurs d' <i>Ammi visnaga</i> .	15
Figure 09 : Structures chimiques de la Khelline et la visnagine d' <i>A.visnaga</i> .	16
Figure 10 : L' arbre et le cône de <i>P.halepensis</i> .	16
Figure 11 : fruits jeunes et matures de <i>C.colocynthis</i> .	18
Figure 12 : Structures chimiques de Cucurbitacines B et E isolés de <i>C. colocynthis</i> .	19
Figure 13 : Exemples d'un truffe de désert.	20
Figure 14 : Feuilles et fleurs de <i>Berberis vulgaris</i> .	21
Figure 15 : Structure chimique de la berbérine .	22
Figure 16 : Aspects morphologiques de certains isolats .	32
Figure 17 : Observation microscopique de la souche S2 après la coloration de Gram et au bleu de méthylène	
Figure 18 : une réaction positive de l'enzyme catalase de la souche S2 en contact avec l'H ₂ O ₂ .	34
Figure 19 : Détection des biofilms formés à différentes températures (30°C, 37°C et 40°C) dans les microplaques à 96 puits par la coloration au cristal violet .	35
Figure 20 : Biomasse des biofilms formés par différentes souches bactériennes à 40 °C	38
Figure 21 : Biomasse des biofilms formés par différentes souches bactériennes à 37 °C.	38

Figure 22 : Biomasse des biofilms formés par différentes souches bactériennes à 30 °C .	38
Figure 23 : Effet des extraits végétaux sur différentes souches de <i>Bacillus</i> évalué par la méthode des disques.	40
Figure 24 : Effet de quelques extraits végétaux sur la croissance du <i>S.aureus</i> , <i>Staphylococcus spp</i> et <i>Micrococcus spp</i> évalué par la méthode des disques.	40
Figure 25 : Le pouvoir antimicrobien de quelques extraits végétaux obtenus par méthode de diffusion des disques sur <i>Bacillus cereus</i> (S13, BR, P53) et <i>Bacillus subtilis</i> (BS).	41
Figure 26 : Effet antibactérien de quelques extraits végétaux sur les souches de <i>Staphylococcus spp</i> (S1), <i>S. aureus</i> (Sar) et <i>Micrococcus spp</i> (S3) .	41
Figure 27 : Effet antibactérien de l'extrait de <i>B. vulgaris</i> sur les souches Sar , S3,S1,BS , BR, S13 et P53 .	42
Figure 28 : Biomasse de biofilms formés par <i>S.aureus</i> en présence de l'extrait de <i>B.vulgaris</i> à différentes concentrations	43
Figure 29 : Observation microscopique de <i>Bacillus subtilis</i> en phase d'adhésion avec et sans extrait de <i>B.vulgaris</i> .	44
Figure 30 : Observation microscopique de <i>S. aureus</i> en phase d'adhésion avec et sans extrait de <i>B.vulgaris</i> .	44
Figure 31 : Observation microscopique de Biofilms de <i>Staphylococcus aureus</i> formés en présence de l'extrait de <i>B.vulgaris</i> .	45

Table des matières

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement « LAMAABE »	1
Introduction générale.....	1
1. Les biofilms.....	3
1.1 Caractéristiques générales	3
1.2 Composition	3
1.2.1 Matrice extracellulaire.....	3
1.2.2 Microorganismes	4
1.3 Etapes de formation de biofilm	4
1.3.1 Adhésion réversible.....	6
1.3.2 Adhésion irréversible	6
1.3.3 Formation des micro-colonies.....	6
1.3.4 Maturation de biofilm.....	6
1.3.5 Détachement / dispersion de biofilm.....	7
1.4 Hétérogénéité de biofilm.....	8
1.5 Rôle du quorum sensing dans la formation du biofilm	9
1.6 Résistance des biofilms aux agents antimicrobiens	9
2. Exemple d'un biofilm bactérien.....	10
2.1.1 Habitat naturel.....	10
2.1.2 Aspects morphologiques et cultureux	10
2.1.3 Pathogénicité.....	12
2.1.3.1 Risque infectieux.....	12
2.1.3.2 Formation de biofilm.....	12
3. Application des plantes médicinales dans la lutte contre les biofilms	13
3.1 Introduction.....	13
3.2 <i>Ammi visnaga</i>	14
3.2.1 Description botanique	14
3.2.3 Intérêt thérapeutique.....	15
3.2.4 Activité antimicrobienne	15
3.3 <i>Pinus halepensis</i>	16
3.3.1 Description botanique	16
3.3.2 Localisation.....	17
3.3.3 Intérêt thérapeutique.....	17
3.3.4 Activité antimicrobienne	17
3.4 <i>Citrullus colocynthis</i>	18
3.4.1 Description botanique	18
3.4.2 Localisation.....	18
3.4.3 Intérêt thérapeutique.....	18
3.4.4 Activité antimicrobienne	19
3.5 Truffes du désert	19
3.5.1 Description botanique	19

3.5.2 Localisation	20
3.5.3 Intérêt thérapeutique.....	20
3.5.4 Activité antimicrobienne	20
3.6.1 Description botanique	21
3.6.2 Localisation.....	21
3.6.3 Intérêt thérapeutique.....	21
3.6.4 Activité antimicrobienne	22
1. Isolement des bactéries.....	24
1. 1 Prélèvement.....	24
1.1.1 Au niveau de l'unité de la néonatalogie.....	24
1.1.2 Au niveau de l'unité de la réanimation	24
1.2 Transport des échantillons.....	24
2. Isolement	25
2.1 Enrichissement	25
2.2 Ensemencement.....	25
2.3 Purification.....	25
3. Identification des isolats.....	25
3.1 Identification morphologique.....	25
3.1.1 Critères macroscopiques	25
3.1.2 Critères microscopiques	26
3.1.2.1 Coloration simple.....	26
3.1.2.2 Coloration de Gram.....	26
3.2 Identification biochimique	26
3.2.1 Test de catalase	26
3.2.2 Utilisation du Mannitol	26
3.2.3 Identification par la galerie API Staph (BioMérieux®).....	27
4. Conservation des isolats.....	27
5.1 Préparation de l'inoculum	27
5.2 Remplissage des microplaques.....	27
5.3 Incubation des microplaques	27
5.4 Coloration au cristal violet	28
5.5 Lecture des microplaques.....	28
5.5.1 Lecture qualitative.....	28
5.5.2 Lecture quantitative.....	28
6. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits végétaux	29
6.1 Préparation des solutions des extraits végétaux	29
6.2. Stérilisation et conservation des solutions.....	29
6.3 Activité antibactérienne des extraits végétaux	29
6.3.1 La méthode de diffusion des disques	29
6.3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la formation du biofilm (CMIB).....	30
6.3.4 Formation de biofilm par la technique Porte germe (The Drop method).....	31
6.3.4.1 Effet de l'extrait de <i>B. vulgaris</i> sur l'adhésion bactérienne	31
6.3.4.2 Effet de l'extrait de <i>B. vulgaris</i> sur la formation du biofilm de <i>S. aureus</i>	31

1.1 Critères macroscopiques	32
1.2 Critères microscopiques	33
1.4 Détermination du biotype.....	34
4. Le potentiel de formation de biofilm <i>in vitro</i>	35
4.1 Détermination qualitative	35
4.2 Détermination quantitative	36
5. Activité antibactérienne.....	39
5.1 Résultats du screening.....	39
5.4 Microscopie de l'inhibition de la formation du biofilm	44
5.4.1 Inhibition de l'adhésion Bactérienne.....	44
5.4.2 Inhibition de la formation du biofilm.....	45
Conclusion.....	48
Références bibliographiques	49

Introduction générale

Introduction générale

Le monde bactérien est caractérisé par deux modes de vie comprenant l'état planctonique, caractéristique des bactéries qui vivent librement dans leur habitat naturel et un autre dite sessile où les microorganismes se trouvent fixés à un support vivant ou inerte formant des communautés bactériennes complexe nommées biofilms (Filloux et Vallet, 2003). Ces derniers peuvent être définis comme des amas cellulaires attachés un substratum et enrobés par une matrice polymérique autoproduite (Tremblay *et al.*, 2014). En outre, la formation de biofilms est une stratégie de survie pour les bactéries de s'adapter à leur environnement de vie, en particulier dans l'environnement hostile (Wu *et al.*, 2015).

En effet, la structure complexe de biofilm confère aux bactérie qui sont apparentées une tolérance accrue aux antibiotiques et aux produits chimiques désinfectants (Høiby *et al.*, 2010). Par conséquent, lorsque des biofilms sont formés sur des organes humains ou sur des dispositifs médicaux, tels que des cathéters veineux centraux et des stimulateurs cardiaques, ils provoquent fréquemment des maladies infectieuses chroniques (Sugimoto *et al.*, 2018).

L'utilisation des agents naturels issues des plantes médicinales pour lutter contre les agents infectieux est une alternative intéressante à l'usage des molécules bioactives. les plantes médicinales sont des ressources précieuses et disponibles de soins primaires de santé pour des milliers d'années et elles sont l'origine de plusieurs molécules bioactives, principalement les métabolites secondaires qui renferme diverses propriétés pharmacologiques (Teapaisan *et al.*, 2016), y compris le pouvoir antimicrobien (Costa *et al.*, 2016).

L'objectif assigné à ce travail est l'évaluation de l'activité antibactérienne et antibiofilm des extraits végétaux de : *Pinus halepensis*, *Ammi visnaga*, *Citrullus colocynthis*, *Berberis vulgaris*, *Retama raetam* et truffes de désert contre différentes souches bactériennes de *S. aureus*, *Staphylococcus spp*, *Micrococcus spp*, *B. cereus* et *B. subtilis*. Dans le cadre de cette étude nous avons suivi le plan expérimental suivant :

- Prélèvement des souches bactériennes à partir des servies de la néonatalogie et la chirurgie A affiliés au CHU de Tlemcen .
- Identification phénotypique des isolats.
- Etude de potentiel de formation du biofilm des isolats et des souches de référence .
- Evaluation de l'activité antimicrobienne des six extraits végétaux de différentes plantes médicinales locales sur les isolats d'intérêt clinique et d'autres souches de référence par la méthode de diffusion des disques.

- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la formation du biofilm de *S.aureus* de l'extrait végétal de *B.vulgaris* par la technique de dilution en milieu liquide .
- Etude de l'effet inhibiteur de l'extrait de *B.vulgaris* sur la formation de biofilm par la technique « porte germe » .

Synthèse bibliographique

1. Les biofilms

1.1 Caractéristiques générales

Les micro-organismes ne vivent pas en tant que des cellules individuelles dispersées mais s'accumulent aux interfaces pour former des amas polymicrobiens nommés 'biofilms' (Flemming et Wingender, 2010) . Ces derniers ont été définis comme des agrégats de microorganismes attachés à une surface (état sessile) et dans lesquels les cellules sont incorporées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) autoproduite (Flemming *et al.*, 2016) . Ces microorganismes adhèrent les uns aux autres et à une surface qui peut être biotique ou abiotique (Mathur *et al.*, 2018) .

Au sein d'une population de biofilms, des cellules expriment divers génotypes et phénotypes , des voies métaboliques distinctes, des réponses au stress et d'autres activités biologiques spécifiques . Les mécanismes qui contribuent à cette hétérogénéité génétique et physiologique comprennent des gradients chimiques à l'échelle microscopique, l'adaptation aux conditions environnementales locales, la variation génotypique qui se produit par mutation et sélection (Stewart et Franklin, 2008). Contrairement aux cellules bactériennes planctoniques, Les bactéries incorporées dans les biofilms sont intrinsèquement résistantes au système immunitaire de l'hôte et également aux agents antimicrobiens tels que les antibiotiques et les désinfectants (Tremblay *et al.*, 2014).

1.2 Composition

Le biofilm se compose de cellules organisées en microcolonies et d'une matrice polymérique extracellulaire.

Tableau 01 : Composition générale de biofilm (Vasudevan, 2014).

N°	Composant	Pourcentage de la matrice
1	Eau	jusqu'à 97%
2	cellules microbiennes	2-5%
3	Polysaccharides	1-2%
4	Protéines	<1-2% (comprend les enzymes)
5	ADN et ARN	<1-2%
6	Ions	(liés et libres)

1.2.1 Matrice extracellulaire

La matrice de biofilm est un environnement dynamique dans lequel les cellules

microbiennes atteignent l'homéostasie et sont organisées de façon optimale pour utiliser tous les nutriments disponibles (**Sutherland, 2001**). Dans la plupart des biofilms, les microorganismes représentent moins de 10% de la masse, alors que la matrice extracellulaire (MEC) peut représenter plus de 90% (**Flemming et Wingender, 2010**). Cette dernière est principalement constituée de polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques et des lipides (**Sugimoto et al., 2018**) (**Tableau 01**). La matrice organique fournit la stabilité mécanique des biofilms, médie leur adhérence aux surfaces et forme un réseau de polymère tridimensionnel cohésif qui interconnecte et immobilise transitoirement les cellules de biofilm (**Flemming et Wingender, 2010**) d'autre part elle protège les microbes contre les stress environnementaux, les attaques par le système immunitaire de l'hôte et par les agents antimicrobiens (**Sugimoto et al., 2018**). En outre, la stabilité de biofilm est attribuée aux propriétés viscoélastiques de la matrice polysaccharidique extracellulaire (**Shaw et al., 2004**)

1.2.2 Microorganismes

D'après **Costerton, (1999)** les microorganismes constituent environ 2 à 5 % en allant parfois jusqu'à 35 % (**Sun et al., 2005**) de la masse totale de biofilm alors que le reste est constitué de la matrice, dans laquelle un seul type de bactéries ou même plusieurs peuvent y exister (**Kumar et al., 2017**).

Au sein d'un biofilm, bien que les microorganismes sont dans une large gamme d'états physiologiques (**Flemming et al., 2016**), ils adoptent un comportement multicellulaire qui facilite et prolonge leur survie dans diverses niches environnementales (**Kostakioti et al., 2013**) ce qui leur confère une résistance remarquable face aux agents antimicrobiens par un ou une multitude de mécanismes (**Donlan et Costerton, 2002**).

1.3 Etapes de formation de biofilm

La formation du biofilm est un processus complexe qui se fait en plusieurs stades ce qui nécessite un type particulier de signalisation nommé « *quorum sensing* » entre les microorganismes (**Jamal et al., 2018**) et l'expression de plusieurs gènes par rapport à ceux des formes planctoniques des mêmes microorganismes (**Donlan, 2002; Federle and Bassler, 2003**).

Ces étapes de formation du biofilm (**Figure 01**) peuvent être résumées comme suit :

- a) Un contact initial entre le microorganisme et le substrat qui doit finir par une fixation covalente à ceci ou ce qu'on appelle : l'adhésion réversible et l'adhésion irréversible.
- b) la formation de micro-colonies due à l'agrégation cellulaire et à la production d'EPS
- c) la maturation et la formation de l'architecture du biofilm

d) la dispersion de biofilm qui peut se produire lorsque les bactéries retournent à un mode de vie planctonique / ou on parle de détachement au cours de quel toute une fraction va se détacher de biofilm (Sutherland, 2001 ; Marchand *et al.*, 2012; Janissen *et al.*, 2015 ; Jamal *et al.*, 2018).

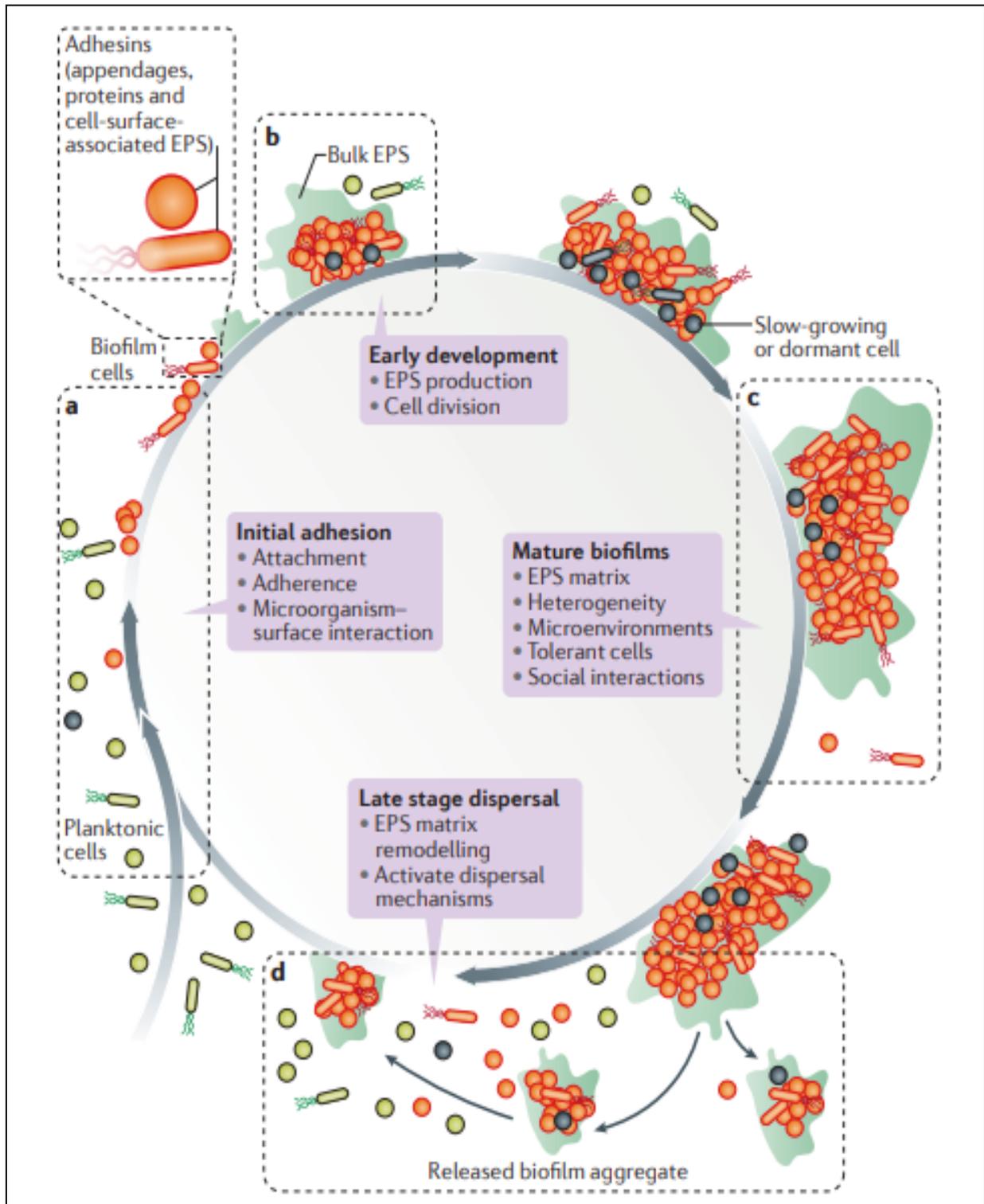


Figure 01 : Les étapes de formation de biofilm (Koo *et al.*, 2017).

1.3.1 Adhésion réversible

Cette étape de formation du biofilm consiste à une interaction initiale entre les microorganismes et une surface biotique ou abiotique où ils peuvent se fixer réversiblement, grâce à des forces physiques de faible amplitude comme les forces de van der Waal attractives et les interactions électrostatiques répulsives (**Tremblay et al., 2014 ; Jamal et al., 2018;**).

Bien que les surfaces abiotiques sont reconnues par leur hydrophobicité qui joue un rôle important dans le renforcement de l'attachement des microorganismes en minimisant la force de répulsion entre eux et les bactérie adhérente (Kumar and Anand, 1998a; Tribedi and Sil, 2014), l'adhésion bactérienne à un substrat biotique quelconque peut s'effectuer indirectement par le biais d'un film conditionnant (fibronectine, collagène et fibrinogène) fourni par l'hôte et reconnues à l'aide des molécules de surface des bactéries nommées : les MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) (**Otto, 2013 ; GOETZ et al., 2016**).

1.3.2 Adhésion irréversible

A ce stade là, les bactéries commencent à produire des substances polymériques extracellulaires (EPS) qui assurent la transition de l'adhésion réversible à une adhésion irréversible des cellules individuelles et facilitent la fixation des bactéries motiles (**Stoodley et al., 2002 ; Janissen et al., 2015**) ce qui implique des interactions dipôle-dipôle, hydrophobes, liaisons covalentes et interactions hydrogènes et qu'une fois la bactérie s'associe irréversiblement au substrat, la régulation des gènes se déclenche en quelques minutes (**Akbas, 2015**).

1.3.3 Formation des micro-colonies

Durant cette étape, les bactéries adhérentes définitivement à une surface communiquent entre elles à travers une signalisation chimique particulière et commencent à se multiplier, ce qui conduit à l'augmentation de la production des EPS, les contrôler et la formation des micro-colonies coordonnées entre elles (**Kumar et Anand, 1998 ; Costerton, 1999**).

1.3.4 Maturation de biofilm

Le biofilm en stade de maturité représente une structure complexe due à l'expression de plusieurs gènes et la production des exopolysaccharides et d'autres composants de la matrice extracellulaire qui jouent un rôle principal dans la structure tridimensionnelle du biofilm caractérisée par des vides interstitiels (**Tremblay et al., 2014**). Ces canaux sont remplis d'eau

et agissent comme un système circulatoire, utilisés pour distribuer des nutriments importants et éliminer les déchets des communautés au sein de biofilm (Parsek et Singh, 2003) .

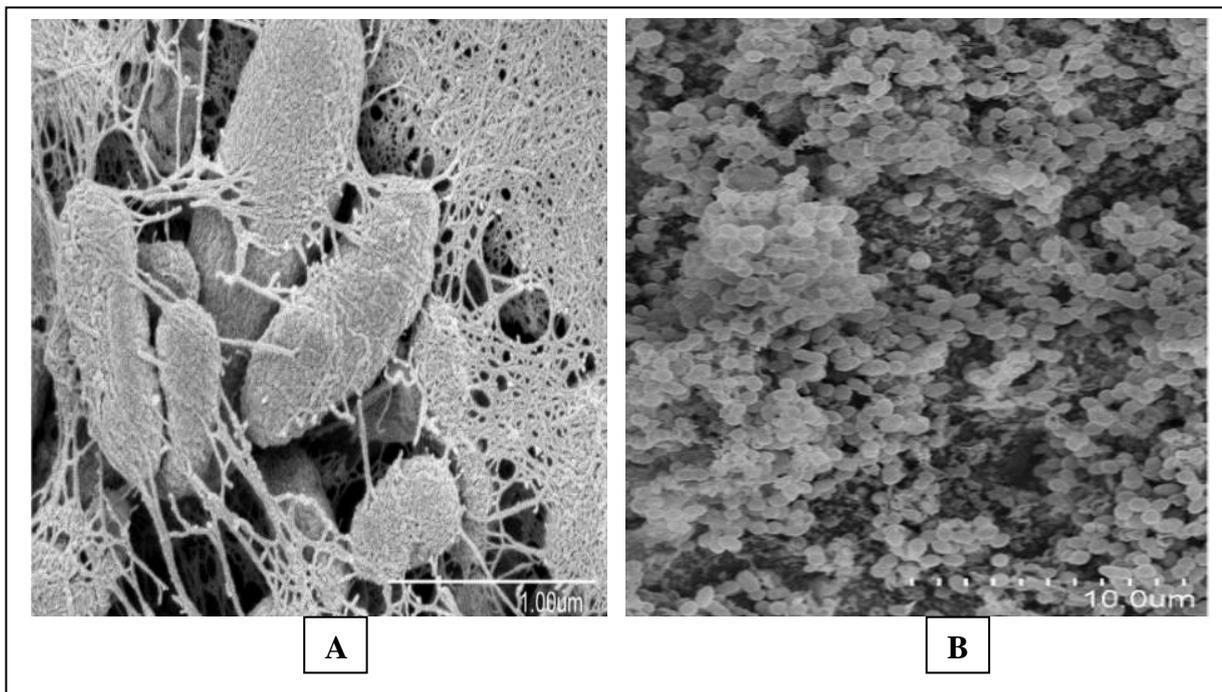


Figure 02 : Micrographies électroniques à balayage de deux biofilms matures , **A** : Biofilm de *Pseudomonas sp* dominé par les EPS qui crient une structure en forme de toile qui entoure les cellules et se propage à travers la matrice, créant une architecture complexe (Grossissement de 15 000) (Henry *et al.*, 2017) / **B** : Biofilm de 4 semaines formé par *E. faecalis* (dominé par les cellules) à la surface de la dentine (Grossissement x 3000) (Wu *et al.*, 2014) .

1.3.5 Détachement / dispersion de biofilm

La dispersion correspond à la dernière phase du cycle de vie d'un biofilm. C'est un processus hautement régulé sous l'effet de facteurs génétiques et environnementaux tels que la force mécanique, l'épuisement des nutriments , les altérations dues au pH et la l'accumulation des déchets (Vasudevan, 2014) . Elle se produit selon plusieurs mécanismes au cours desquels les cellules microbiennes à l'intérieur du biofilm effectuent une multiplication et une dispersion rapides afin de passer de l'état sessile à la forme motile (Jamal *et al.*, 2018) .

En général, les mécanismes de dispersion du biofilm peuvent être : actifs qui font référence aux mécanismes déclenchés par les bactéries, tandis que la dispersion passive fait référence au détachement des cellules du biofilm qui est influencé par des forces externes telles que le cisaillement, l'abrasion (collision de particules solides avec le biofilm), le broutage des prédateurs et l'intervention humaine (Lawrence *et al.*, 2002; Choi et Morgenroth, 2003 ; Ymele-Leki et Ross, 2007) .

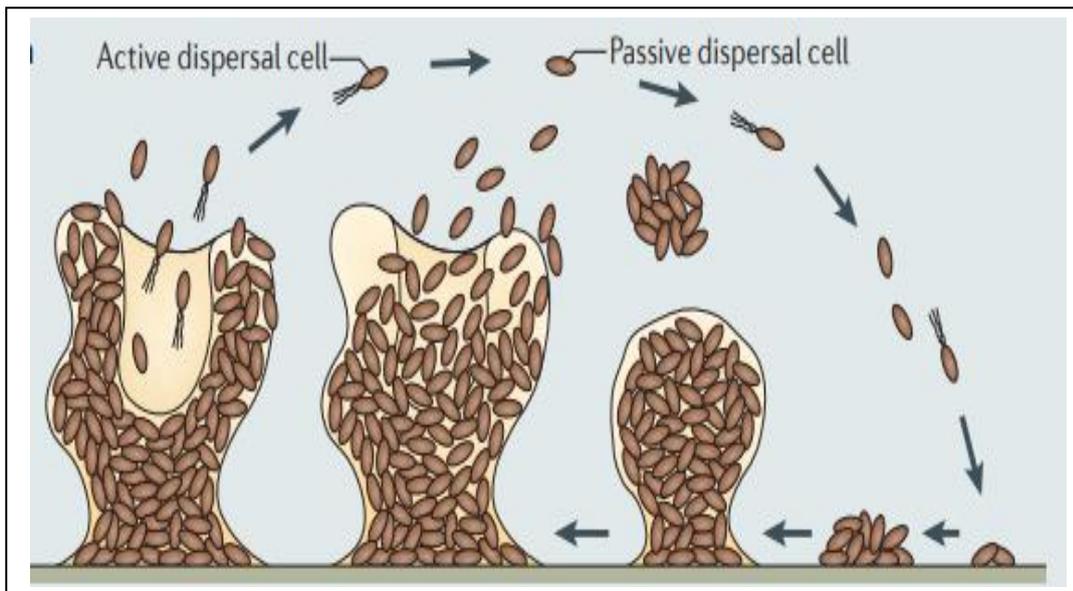


Figure 03 : Représentation schématique de dispersion (active et passive) d'un biofilm
(McDougald *et al.*, 2012).

Lors de la dispersion active, les cellules en retournant à l'état planctonique, perdent le phénotype biofilm ce qui les rend plus sensibles à l'action des agents antimicrobiens (Vasudevan, 2014).

Le détachement de biofilm peut s'effectuer en plusieurs modes tels que l'érosion qui se réfère à la libération de cellules individuelles ou de petites grappes de cellules à partir d'un biofilm au cours de sa formation provoquée par les forces de cisaillement du fluide, et la desquamation qui fait référence au détachement soudain de grandes parties du biofilm, habituellement au cours des dernières étapes de la formation du biofilm (Ma *et al.*, 2009 ; Kaplan, 2010; Mogha *et al.*, 2014).

1.4 Hétérogénéité de biofilm

Il est bien établi que les bactéries qui se développent dans les biofilms sont physiologiquement distinctes des bactéries à l'état planctonique (Hall-Stoodley *et al.*, 2004), car les activités métaboliques ainsi que le gradient de concentration de nutriments, des molécules de signalisation et l'accumulation des déchets peuvent les changer physiologiquement au fil du temps (Figure 04) (Stewart et Franklin, 2008). De même, l'expression génique hétérogène ou les changements génotypiques que subissent les microorganismes peuvent être aussi à la base de l'hétérogénéité au sein des biofilms (Ren *et al.*, 2018).

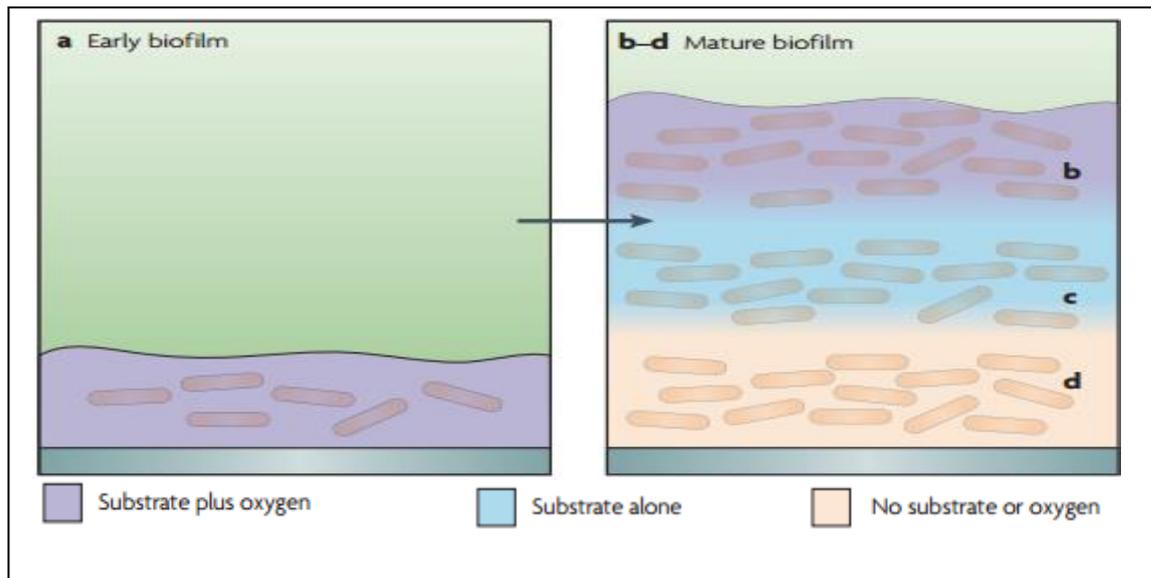


Figure 04 : Représentation schématique de l'hétérogénéité physiologique dans un biofilm monoespèce : un biofilm mince à un stade précoce du développement (a) regorge à la fois de substrat et d'oxygène alors que dans le biofilm mature, les environnements qui contiennent à la fois substrat et oxygène (b), substrat mais pas d'oxygène (c) et ni substrat ni oxygène (d) peuvent apparaître (Stewart et Franklin, 2008).

1.5 Rôle du quorum sensing dans la formation du biofilm

Le quorum sensing (QS) est un processus chimique dépendant de la densité cellulaire qui permet aux bactéries de communiquer entre elles (Emge et al., 2016). Lorsque la charge microbienne requise est atteinte, il en résulte la perception du signal via la diffusion des molécules de signalisation extracellulaires appelées « autoinducteurs » et l'activation des gènes d'intérêts par le QS (Vasudevan, 2014; Papenfort and Bassler, 2016). Celui-ci joue un rôle crucial dans la formation de biofilm notamment la dispersion, la sécrétion de certains facteurs de virulence et le protège contre l'attaque d'autres organismes vivants et prédateurs, comme des protozoaires (Queck et al., 2006 ; Irie et Parsek, 2008 ; ; Papenfort et Bassler, 2016) .

1.6 Résistance des biofilms aux agents antimicrobiens

L'expression de plusieurs facteurs phénotypiques et génotypiques suite à la fixation microbienne à une surface rend les bactéries du biofilm plus résistantes par rapport aux formes planctoniques et leur confère la capacité de tolérer l'impact antimicrobien (Vasudevan, 2014). Cette résistance est multifactorielle et est expliquée par plusieurs mécanismes inspirés de tels que :

- l'expression de gènes vitaux des microorganismes ,

- la matrice polymérique extracellulaire (EPS) : l'exemple de l'alginate produits par *Pseudomonas aeruginosa* qui sont capables de se lier aux aminoglycosides positivement chargés et d'empêcher leur pénétration dans les biofilm ,
- l'émergence de sous-populations isogéniques de bactéries sensibles aux antibiotiques qui acquièrent une tolérance à de multiples antibiotiques , ces derniers qui sont très efficaces sur les cellules en croissance active (**Davies, 2003; Walters *et al.*, 2003 ; Brackman *et al.*, 2011; Maisonneuve et Gerdes, 2014**).

Par conséquent, lorsque des biofilms sont formés sur des organes humains ou sur des dispositifs médicaux, tels que des cathéters veineux centraux et des stimulateurs cardiaques, ils provoquent fréquemment des maladies infectieuses chroniques(**Sugimoto *et al.*, 2018**).

2. Exemple d'un biofilm bactérien

De nombreuses espèces bactériennes, que ce soit dans le secteur médical ou agroalimentaire, ont la capacité de refugier dans des biofilms ce qui leur confère plusieurs avantages notamment leur survie en échappant aux agents antimicrobiens.

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Habitat naturel

Bien que le genre *Staphylococcus* comprenne 52 espèces et 28 sous-espèces , le plus cliniquement pertinent c'est *Staphylococcus aureus* , ce dernier qui est un habitant naturel de la peau humaine et animale , des narines, et des voies respiratoires et génitales , il est présent dans le microbiote commensal humain de la muqueuse nasale chez 20 à 40% de la population générale (**Bhunja, 2018; Lee *et al.*, 2018**) . Mais de nombreuses espèces de genre *Staphylococcus* notamment *S. aureus* et *S. epidermidis* ont la capacité d'être des agents pathogènes opportunistes en infectant principalement les individus qui ont des implants de dispositifs médicaux ou qui sont autrement immunodéprimés (**Paharik et Horswill, 2016**) .

2.1.2 Aspects morphologiques et culturels

S. aureus est une bactérie coccoïde à Gram positif (1 µm de diamètre) , apparaissant au microscope sous forme de grappes de raisin (**Figure 05**) , une caractéristique qui a conduit à l'appellation *Staphylococcus* (*staphyle* : une grappe de raisin et *kokkos* : un grain) , non sporulée , non mobile , anaérobie facultative et qui se développe abondamment en présence d'oxygène , catalase et coagulase positive (**Tableau 02**) en plus qu' elle produit des colonies jaunes pigmentées d'où l'appellation aureus qui signifie d'or (**Paharik et Horswill, 2016 ; Bhunja, 2018**) .

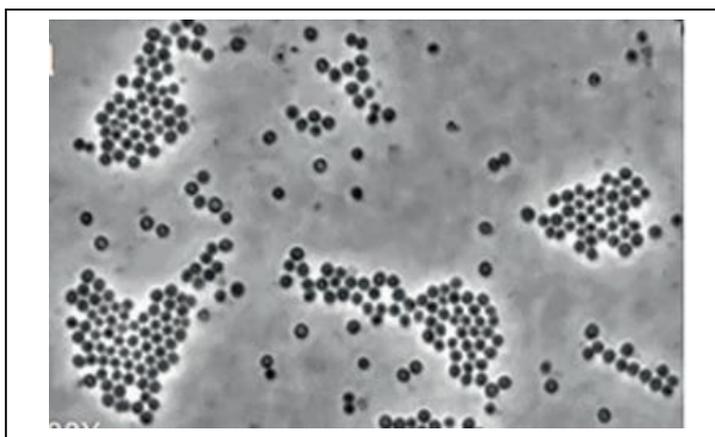


Figure 05 : Micrographie en contraste de phase de *S. aureus* mettant en évidence le mode de regroupement en grappes de raisin (grossissement $\times 1000$) (**Bhunia, 2018**) .

Une culture de *S. aureus* à 37 °C pendant 18 à 24 h sur gélose au sang produit des colonies brillantes, lisses, translucides et le plus souvent avec une pigmentation dorée ; En revanche, le développement de la même espèce sur gélose Baird-Parker montre l'aspect noir caractéristique entouré d'un halo (**Bhunia, 2018; Bojang et al., 2018**) .

Tableau 02 : Caractéristiques typiques de certaines espèces staphylococciques y compris *S.aureus* (**Bhunia, 2018**) .

Caractéristiques	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.intermedius</i>	<i>S.hyicus</i>
Activité de la catalase	+	+	+	+
Hémolyse	+	+/-	+	-
Production de coagulase	+	-	+/-	+/-
Production de thermonucléase	+	-	+	+/
Sensibilité à la lysostaphine	+	+/-	+	+
Utilisation anaérobie de Glucose	+	+	-	-
Mannitol	+	-	-	-

- + : 90% ou plus des souches sont positives
- - : 90% ou plus des souches sont négatives.

2.1.3 Pathogénicité

2.1.3.1 Risque infectieux

Lorsque les barrières cutanées et muqueuses sont perturbées, par exemple, en raison de plaies, d'une intervention chirurgicale ou d'une diminution de l'immunité, les staphylocoques peuvent provoquer des infections de gravité variable (**Rebrošová et al., 2017 ; Lee et al., 2018**). Après avoir pénétré dans la circulation sanguine, *S.aureus* peut devenir la cause d'une septicémie, d'une méningite, d'une endocardite, d'une ostéomyélite, ou d'autres maladies invasives constituant un danger de mort (**Lindberg et al., 2011**) qui sont souvent acquises en milieu hospitalier en raison de souches résistantes y compris les SARM (*S.aureus* résistants à la méthicilline) (**van den Berg et al., 2015; Lee et al., 2018**).

2.1.3.2 Formation de biofilm

L'une des raisons pour lesquelles les staphylocoques sont problématiques est leur capacité bien connue de former des biofilms (**Paharik et Horswill, 2016**) et en particulier *S. aureus* qui suit un processus de développement en cinq étapes comprenant: l'attachement, la multiplication, l'exode, la maturation et la dispersion (**Figure 06**) (**Moormeier et al., 2014**).

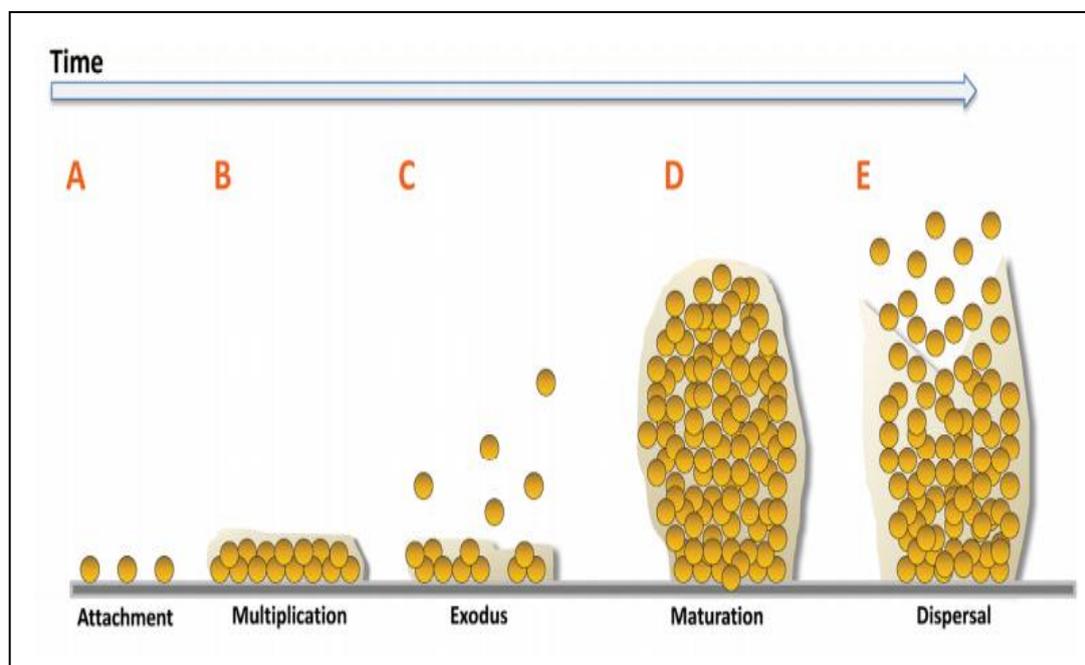


Figure 06 : Processus de formation de biofilm chez *S. aureus* (**Moormeier et Bayles, 2017**).

D'abord, *S. aureus* utilise une variété de protéines ancrées dans sa paroi cellulaire pour faire s'attacher à une surface biotique ayant des spécificités de liaison différentes pour les composants de la matrice hôte, tels que le fibrinogène et le collagène ; En stade de multiplication, il produit des protéines extracellulaires qui jouent un rôle dans le maintien de

biofilm en stabilisant les cellules filles nouvellement formées et vulnérables au détachement (**Speziale *et al.*, 2014 ; Moormeier et Bayles, 2017**) .

Dans le but d'une restructuration, certaines cellules sessiles se détachent prématurément du biofilm, pendant la phase d'exode qui est associée à des changements dans la composition de la matrice structurale du biofilm, et à la sensibilité de ce dernier au traitement par la DNase, suivi par une phase de maturation qui consiste en une multiplication bactérienne conduisant à l'accumulation du biofilm sur la surface (**Figure 07**) (**Figueiredo *et al.*, 2017**).

En fin la dispersion, cette dernière phase de cycle de vie du biofilm est médiée par le système agr et joue un rôle important en modulant l'expression des différents gènes associés à la virulence et les enzymes assurant la dégradation de la matrice extracellulaire telles que les protéases, l'ADNe, l'autolysine principale et les nucléases (**Sahukhal *et al.*, 2015 ; Paharik et Horswill, 2016; Figueiredo *et al.*, 2017**)

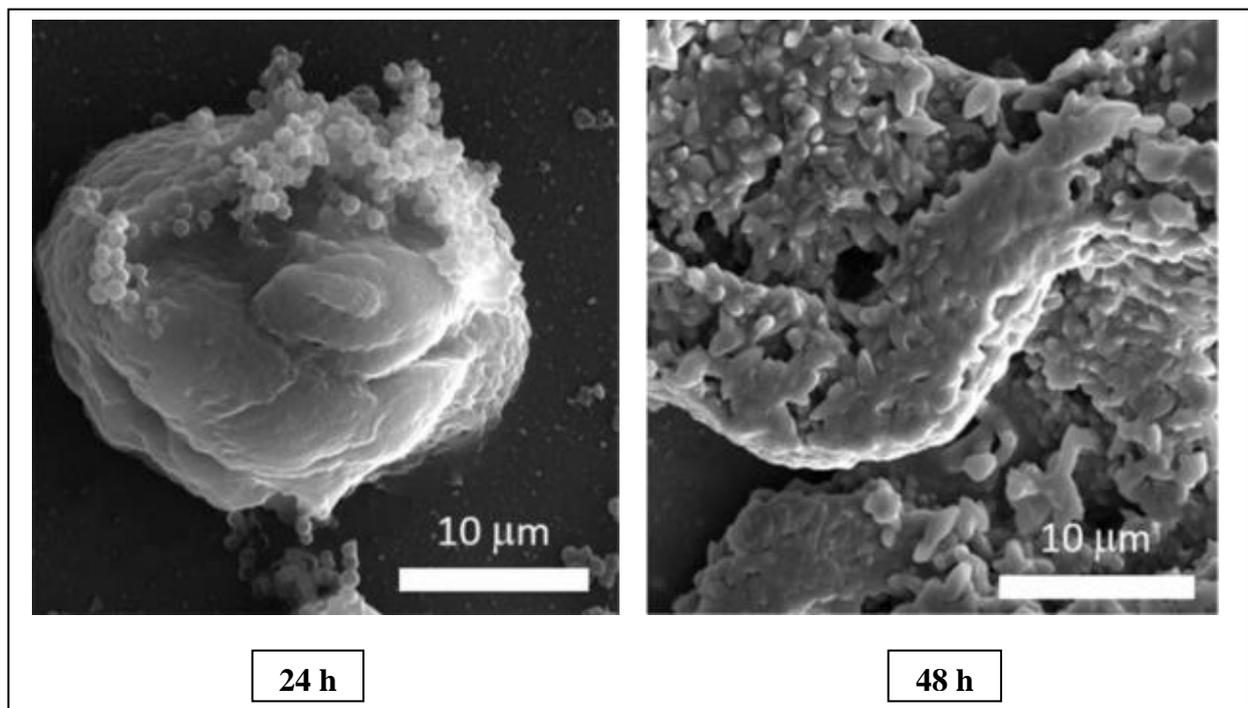


Figure 07 : Micrographies électroniques d'un biofilm précoce (24h) et un autre mature (48h) de *S.aureus* (**Kim *et al.*, 2018**) .

3. Application des plantes médicinales dans la lutte contre les biofilms

3.1 Introduction

Au cours des dernières décennies, un grand nombre de molécules thérapeutiques synthétiques a été produit dans le but d'éliminer les microorganismes responsables de nombreuses infections qui sont la cause principale de mortalité et de morbidité à l'échelle mondiale, mais ces molécules ont induit des mutations dans le génome de nombreux

microorganismes les rendant résistants à plusieurs médicaments (**Gupta et al., 2016; Teka et al., 2015**) . En outre, les effets de l'utilisation intensive des médicaments de synthèse peuvent conduire à de graves dommages au niveau de nombreux organes humains (**Jahantighi et al., 2016**) . Ce qui conduit à la recherche d'une nouvelle alternative à base des produits naturels extraits des plantes, ces dernières qui ont montré une efficacité contre plusieurs bactéries ayant développé une résistance aux antibiotiques (**Wikaningtyas et Sukandar, 2016**) .

D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS) , les plantes médicinales constituent une source principale pour l'obtention d'une variété d'agents thérapeutiques (**Jahantighi et al., 2016**) . Elles sont largement utilisées pour la production de différents composés ayant des propriétés thérapeutiques, telles que l'activités antioxydante, antidiabétique , gastroprotectrice , antipyrétique , anti-inflammatoire et antimicrobienne (**Gupta et al., 2016**) .

D'ailleurs , Les plantes médicinales produisent divers composés biochimiques nommés : métabolites secondaires, tels que les tanins, les terpénoïdes, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les phénols et les quinones (**Ababutain, 2011**) . Ces métabolites sont synthétisés dans toutes les parties de la plante : écorce, feuilles, tige, racines , fleurs , fruits, graines, etc., c'est à dire qu'une partie quelconque de la plante peut contenir des composants actifs jouant un rôle crucial en collaboration avec d'autres molécules biologiques pour la formation d'une partie intégrante du système de défense contre diverses phytopathologies et conditions de stress (**Nandagoapalan et al., 2016**) . En effet , l'utilisation de ces composés sous forme d'extrait brut ou purifiés est préférable à celle des drogues ou des produits synthétiques car ils sont utilisés depuis longtemps en médecine traditionnelle et sont considérés comme sans danger pour l'homme (**Rakholiya et al., 2013**) .

De plus, plusieurs métabolites naturels avec différentes structures chimiques isolés de diverses plantes médicinales possèdent des propriétés antimicrobiennes contre les bactéries Gram positives et négatives y compris les extraits végétaux qui sont de plus utilisés pour lutter contre les maladies humaines présentant un avantage supplémentaire de limiter les dommages environnementaux , de réduire les coûts de production et d'améliorer l'accessibilité aux communautés rurales (**Teka et al., 2015 ; Cimanga et al., 2018**) . De nombreuses espèces végétales locales telles que : *Ammi visnaga*, *Pinus halepensis*, *Citrullus colocynthis*, *Berberis vulgaris* , *Retama raetam* et les truffes de désert sont connues par leurs propriétés thérapeutiques y compris l'effet antimicrobien.

3.2 *Ammi visnaga*

3.2.1 Description botanique

Ammi visnaga est une plante annulaire qui pousse à environ 120 cm de hauteur appartenant à

la famille des Apiacées (**Figure 08**) , elle est connue sous le nom : Khella , qui a une légère odeur aromatique et un goût très amer (**Beltagy et Beltagy, 2015**) . Au sommet, cette plante forme une inflorescence généreuse, de grandes ombelles avec de nombreux rayons portant des ombelles secondaires et une abondance de fleurs blanches se combinant pour former d'énormes parapluies (**Keddad et al., 2016**) . La tige est dressée , très ramifiée, et les fruits produits ont des structures ovales comprimées d'environ 3 mm , (**Travaini et al., 2016**).



Figure 08 : Fleurs d'*Ammi visnaga* (**Dirar et al., 2014**).

3.2.2 Localisation

A. visnaga a ses origines dans le climat chaud de la Méditerranée mais en tant qu'espèce naturalisée ,elle apparaît en Amérique du Nord, en Argentine, au Chili, au Mexique, en Asie du Sud-Ouest , dans certaines îles de l'Atlantique et elle est cultivée en Amérique du Nord, au Mexique, en Argentine, au Chili, en Égypte, en Iran, en Tunisie et en Fédération de Russie , au Pakistan où elle est considérée comme plante médicinale envahissante des champs cultivés (**Hashim et al., 2014**) .

3.2.3 Intérêt thérapeutique

Les fruits d'*A.visnaga* ont été décrits dans les pharmacopées comme antispasmodique, relaxant musculaire vasodilatateur et utilisés dans la médecine traditionnelle incluent le traitement des angines , des crampes gastro-intestinales, , du vitiligo, du diabète et des calculs rénaux (**Travaini et al., 2016**) . de plus , l'huile essentielle de cette espèce végétale est connue pour ses propriétés contre les maladies coronariennes et l'asthme bronchique (**Keddad et al., 2016**).

3.2.4 Activité antimicrobienne

A.visnaga est considéré comme une plante médicinale ayant des activités antimicrobiennes associées à la khelline et la visnagine (**Figure 09**) avec des effets antifongiques, antibactériens et antiviraux (**Hashim et al., 2014**) .

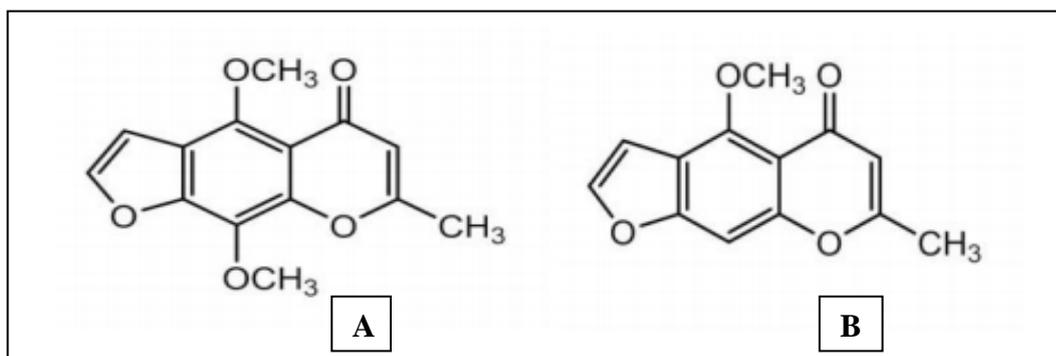


Figure 09: Structures chimiques de la Khelline (A) et la visnagine (B) d'*A.visnaga* (Winderl *et al.*, 2016) .

3.3 . *Pinus halepensis*

3.3.1 Description botanique

P. halepensis L. ou pin d'Alep (**Figure 10 A**) est un arbre appartenant à la famille des Pinaceae qui peut atteindre jusqu'à 20 m de hauteur et un diamètre du tronc qui varie de 80 à 100 cm (**Mauri *et al.*, 2016 ; Bouzenna *et al.*, 2017**) . Il possède plusieurs branches qui forment une couronne largement conique en forme de dôme qui s'ouvrent avec l'âge (**Pâques, 2013**) . Cependant , l'écorce du pin d'Alep est grisâtre et initialement lisse devenant brun rougeâtre et fissurée avec l'âge (**Farjon, 2010**) . Ses aiguilles sont vert pâle disposées en groupes de deux ou trois , avec une longueur entre 6 et 12 cm et de 1 mm de large (**Mauri *et al.*, 2016**) .

En outre , Le pin d'Alep est caractérisé par une production élevée de cônes coniques (**Figure 10B**) pédonculés qui restent fermés sur l'arbre pendant une ou plusieurs années après la maturation des graines jusqu'à s'ouvrir avec une couleur grise à brun rougeâtre et une longueur de 5 à 12 cm (**Ganatsas et Spanos, 2007; Moreira *et al.*, 2012; Pâques, 2013**) .

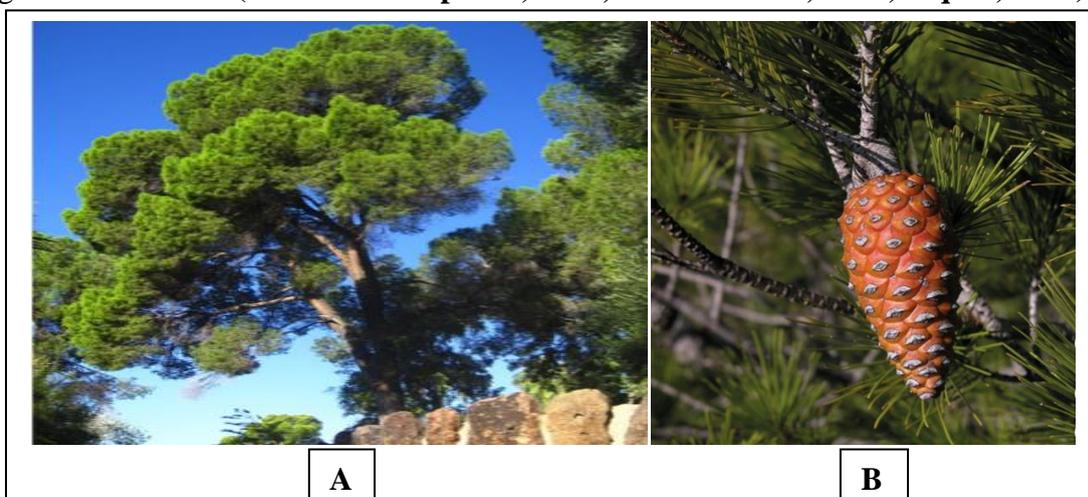


Figure 10 : L' arbre (A) et le cône (B) de *Pinus halepensis* (**Warren *et al.*, 2015 ; Mauri *et al.*, 2016**) .

3.3.2 Localisation

L'aire de répartition continentale de *P. halepensis* s'étend de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye) et Moyen-Orient (Syrie en particulier Alep (ou Haleb) comme son nom l'indique, Liban, Jordanie, Palestine, Turquie), jusqu'au sud de l'Europe méditerranéenne (Grèce orientale, Croatie, Italie du Nord, Est de la France et Espagne orientale) (Farjon, 2010 ; Djerrad *et al.*, 2015).

3.3.3 Intérêt thérapeutique

De nombreuses plantes appartenant au genre *Pinus*, y compris *P. halepensis*, sont utilisées en médecine traditionnelle comme remède naturel contre plusieurs maladies, avec un effet anti-âge, anti-inflammatoire, antinéoplasiques, antibactériens, et anticancéreux (Kadri *et al.*, 2015). Récemment, l'huile essentielle de *P. halepensis* a été étudiée pour son utilisation en tant qu'agent antioxydant (Bouzenna *et al.*, 2017).

3.3.4 Activité antimicrobienne

La composition des huiles essentielles de *P. halepensis* a donnée dans le **tableau 03**. L'effet antimicrobien de cette espèce végétale est montré sur certaines bactéries testées et serait lié leurs composants monoterpènes oxygénés qui constituent plus de 16,2% de l'huile. (Fekih *et al.*, 2014).

Tableau 03 : Quelques composants d'huiles essentielles de *P. halepensis* de différents régions algériennes (Djerrad *et al.*, 2015).

Composés	T1	T2	T3	T4	T5	T6
α -Pinène	nd	6.4	1.2	6.7	17.6	12.2-24.5
Sabinene	nd	0.7	1.2	7	2.6	1.5-6.3
β -Pinène	nd	5.6	0.2	2.0	1.6	1.7-2.2
Myrcène	nd	0.5	3.1	8.7	3.2	15.2-32.0
3-Carène	nd	0.4	0.2	0.1	1.9	0.6-5.5
Limonène	nd	0.1	Tr	0.8	0.1	0.6-1.4
p – Cymène	nd	Nd	Nd	0.3	3	0.2-1.8
Terpinolène	nd	2.4	Nd	Nd	nd	1.8-13.8
Terpinen-4-ol	0.4	0.6	Tr	Nd	0.6	1.0-8.2
α – Terpinolène	nd	Nd	0.1	0.2	tr	tr-0.7
(E)- β Caryophyllène	3	Nd	Nd	7.1	2.7	7.0-17.1
(Z)- β -Caryophyllène	nd	25	40.31	Nd	nd	Nd
α – Humulène	0.7	10.5	7.9	2.8	1.4	1.3-3.4

- **T1**: Ghazaouet; **T2**: Saïda; **T3**: Sidi Feradj; **T4**: Tissemsilt; **T5**: Djelfa; **T6**: Zones de l'ouest du nord de l'Algérie, **tr**: trace (<0,05%), **nd**: composés non détectés.

3.4 *Citrullus colocynthis*

3.4.1 Description botanique

C. colocynthis (Figure 11) appartient à la famille des Cucurbitaceae (Hussain *et al.*, 2014). C'est une plante vivace à longue durée de vie qui pousse à l'état sauvage sur des rivages sablonneux et dans des conditions xérophiles (Mahendiran et Umavathi, 2015). Les membres de cette famille sont généralement des plantes dioïques qui peuvent être prostratées ou grimpantes (Ali, 2016). En particulier chez *C. colocynthis*, les fruits sont lisses, sphériques et tachetés de vert lorsqu'ils sont jeunes, jaunes à maturité et sont connus comme «pomme amère», «colocynth», «vigne-o-Sodome» ou «tumba» (Eidi *et al.*, 2015) avec des graines qui sont riches en huile et en protéines (Sahu *et al.*, 2017).

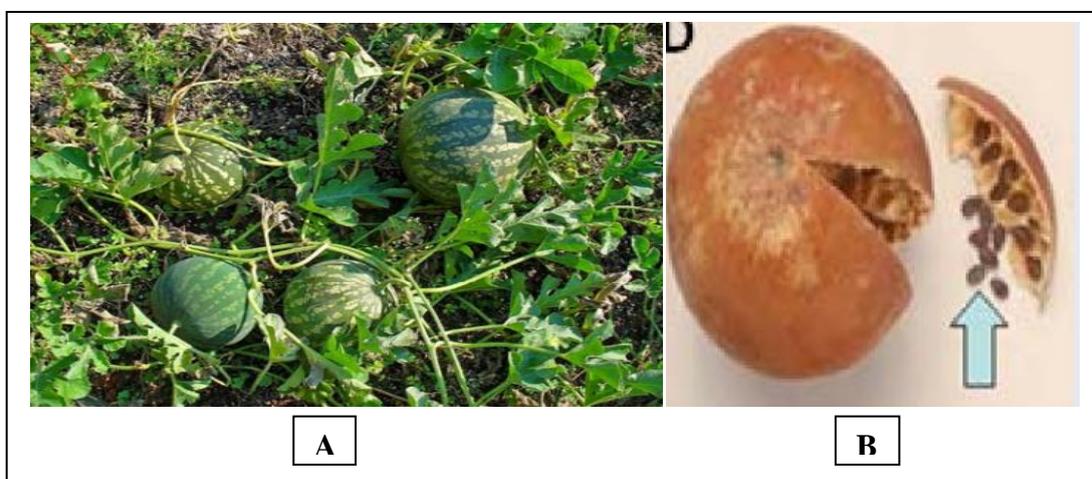


Figure 11 : fruits jeunes (A) et (B) fruit mature de *Citrullus colocynthis* (Shawky *et al.*, 2014 ; Khattak *et al.*, 2015).

3.4.2 Localisation

C. colocynthis est originaire des régions arides d'Afrique du Nord, elle est connue dans la région méditerranéenne depuis l'époque biblique et se trouve maintenant en Afrique du Nord (Algérie, Egypte; Libye, Maroc, Tunisie), Afrique tropicale du Nord-Est (Tchad, Éthiopie, Somalie); Afrique tropicale orientale (Kenya), Afrique tropicale occidentale (Mali; Asie: Koweït, Arabie saoudite, Iraq, Jordanie, Liban, Syrie, Yémen, Afghanistan, Iran, Turquie, Inde, Pakistan, Sri Lanka), Europe (Grèce, Italie, Espagne) et Australie (Al-Snafi, 2016).

3.4.3 Intérêt thérapeutique

Les fruits de *C. colocynthis* sont utilisés pour le traitement des maladies microbiennes, de l'inflammation et de l'ulcère dans les pays asiatiques et africains (Ali, 2016). De plus, ils sont très efficaces contre les tumeurs du tractus gastro-intestinal et fortement utilisés dans la

drogue anticancéreuse pour traiter la leucémie et les douleurs articulaires (**Mahendiran et Umavathi, 2015**).

En outre, L'extrait aqueux de *C. colocynthis* possède un effet antidiabétique et des propriétés antioxydantes, ces dernières qui dépendent de la teneur des fruits et des graines en composés phénoliques (flavonoïdes principalement), en protéines et en lipides (**Hussain et al., 2014**). D'autre part, l'extrait de racines est très utilisé contre la jaunisse, les maladies urinaires et les rhumatismes (**Mahendiran et Umavathi, 2015**).

3.4.4 Activité antimicrobienne

L'analyse phytochimique des extraits bruts de *C. colocynthis* a révélé la présence de plusieurs molécules bioactives (tanins, saponines, flavanoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes, cucurbitacines...), ce qui confère à cette plante une large gamme d'activités pharmacologiques, y compris l'effet antimicrobien (**Al-Snafi, 2016**). Notamment, les cucurbitacines E et B (**Figure 12**) qui ont montré un pouvoir inhibiteur contre *S.aureus*, *K. pneumoniae* et *B.cereus* à une concentration minimale équivalent à 500mg / ml (**Ali et al., 2013**).

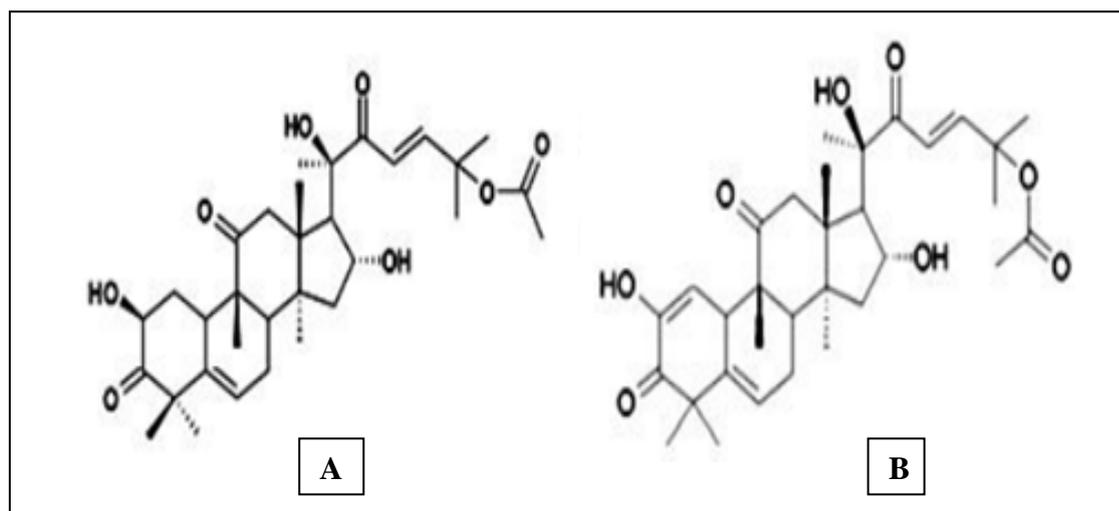


Figure 12 : Structures chimiques de Cucurbitacines B (A) et E (B) isolés de *C. colocynthis* (**Shawkey et al., 2014**).

3.5 Truffes du désert

3.5.1 Description botanique

Les truffes du désert (**Figure 13**) sont des champignons hypogés mycorhiziens (**Zitouni-Haouar et al., 2014**) appartenant aux ascomycètes (**Dafri et Beddiar, 2017**) principalement endémiques aux zones arides et semi-arides de la région méditerranéenne, où ils sont associés aux espèces d'*Helianthemum* (**Bradai et al., 2014; Díez et al., 2002**). Ces champignons comprennent plusieurs espèces dont *Terfezia*, *Tirmania*, *Picoa* et quelques espèces

de tubercules (**Dafri et Beddiar, 2017**) .



Figure 13 : Exemple d'un truffe de désert (*Tuberraria guttata*)
(**Dafri et Beddiar, 2017**) .

3.5.2 Localisation

Les truffes du désert ont évolué dans des conditions difficiles et hostiles, des régions arides et semi-arides du Moyen-Orient, de l'Afrique du Nord et de la Méditerranée (**Bradai et al., 2014**) . Ces champignons doivent ce nom à leur répartition géographique plus longtemps considérée comme typique des territoires désertiques (**Dafri et Beddiar, 2017**).

3.5.3 Intérêt thérapeutique

Les truffes ont été utilisés traditionnellement dans le traitement des maladies oculaires, telles que le trachome (**Alhussaini et al., 2016a; El Enshasy et Hatti-Kaul, 2013**). ils ont également des propriétés immunomodulatrices, hépatoprotectrices, antidépressives, antivirales, antioxydantes et antiradicalaires en raison de leur teneur en phénol, caroténoïde, anthocyanine, acide ascorbique, flavonoïde, tanin, glycoside et ergostérol (**Owaid, 2017**).

3.5.4 Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des truffes a été prouvée en 1980 par l'ophtalmologiste égyptien Dr. Al-Marzooky, qui a trouvé que l'eau extraite des truffes inhibe la formation de tissu fibreux dans la zone infectée pour prévenir l'apparition de la fibrose dans le cas du trachome oculaire (**Dafri et Beddiar, 2017**). Plusieurs études ont montré que les extraits des truffes possèdent une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positif et les autres à Gram négatif (**Neggaz et al., 2015 ; Alhussaini et al., 2016; Gargano et al., 2017**), une activité antifongique et également une activité antivirale (**Owaid, 2017**) .

3.6 *Berberis vulgaris*

3.6.1 Description botanique

B.vulgaris L. ou le Barberry (**Figure 14**) est une plante médicinale appartenant à la famille des Berberidaceae (**Hoshyar et al., 2016; Imenshahidi et Hosseinzadeh, 2016**). Le genre *Berberis* se compose d'arbustes à feuilles persistantes épineux à feuilles caduques, caractérisés par le bois et les fleurs jaunes et qui peuvent remonter jusqu'à deux cents ans (**Saeidnia et al., 2014**). En particulier chez *B. vulgaris*, les fruits ont de longues baies de couleur rouge écarlate qui sont oblongues, légèrement incurvées, d'environ 0,5 pouce de long et comestibles (**Tabeshpour et al., 2017**).



Figure 14 : Feuilles et fleurs de *Berberis vulgaris* (**Tabeshpour et al., 2017**).

3.6.2 Localisation

Les espèces appartenant au genre *Berberis*, y compris *B.vulgaris*, sont originaires des régions modérées et semi-tropicales d'Asie, d'Europe, d'Afrique, d'Amérique du Nord et d'Amérique du Sud (**Rahimi-Madiseh et al., 2017**).

3.6.3 Intérêt thérapeutique

Différentes parties de *B. vulgaris* ont été largement appliquées pour la guérison d'un certain nombre de maladies cutanées, respiratoires, cardiovasculaires, digestives et infectieuses notamment les fruits qui sont utilisés dans les cas des troubles du tractus gastro-intestinal, des affections bronchiques et comme stimulant pour le système circulatoire, en plus, les racines et les tige qui ont montré un effet désirable contre certaines maladies du foie, de la vésicule biliaire, des reins et des voies respiratoires (**Mahmoudvand et al., 2017; Shahid et al., 2017**).

Matériel et méthodes

Ce travail porte sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de certains extraits végétaux. Il a été réalisé au niveau de laboratoire pédagogique de microbiologie 02, département de biologie, faculté SNV & STU, Université de Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

1. Isolement des bactéries

1.1 Prélèvement

Différents prélèvements ont été effectués au niveau des unités de néonatalogie et de réanimation affiliées aux services de Pédiatrie et de Chirurgie A respectivement Centre Hospitalo- Universitaire de Tlemcen (CHU) .

1.1.1 Au niveau de l'unité de la néonatalogie

Selon le protocole adapté de **Denis *et al*, (2011)** , différents échantillons ont été prélevés :

- A partir des surfaces : par écouvillonnage différentes surfaces (couveuse, balance, seringue de sérum, bordures de lit) ont été balayées.
- A partir des instruments : la seringue utilisée pour prélever le sang d'un bébé atteint d'une méningite , un cathéter d'un autre bébé atteint d'une infection sévère à origine inconnue ont été sélectionnés aussi comme échantillons .

Chaque échantillon a été immédiatement immergé tout seul dans un tube à essai contenant 5 ml de TSB (Tryptophane- Soja-Broth) stérile.

1.1.2 Au niveau de l'unité de la réanimation

Suite à différents types d'infections observées chez différents patients, quatre cathéters infectés ont été choisis pour faire l'isolement des contaminants bactériens. Leurs parties intraveineuses ont été mises directement dans des boites de pétri préalablement coulées avec une gélose au sang stérile.

- Un prélèvement à partir de l'ambiance de la réanimation a été effectué en ouvrant une boite de pétri préalablement coulée avec de la gélose au sang pendant 15 minutes.

1.2 Transport des échantillons

En une courte durée, tous les échantillons ont été transportés au laboratoire . A la réception , les boites contenant de cathéters ont été incubées tout de suite à 37° C de 24 h jusqu'à 72 h. En outre, les tubes à essai portant des écouvillons ont subi d'autres traitements comme montre l'étape suivante.

2. Isolement

2.1 Enrichissement

En utilisant un vortex, les tubes ont été agités pour faire détacher le maximum des bactéries adhérentes aux écouvillons et les autres dispositifs médicaux. Ces derniers ont été par la suite plongés dans des bacs à javel et les suspensions ont été récupérées. Aseptiquement, à l'aide des pipettes pasteur en forme râteau, 0.1 ml de bouillon inoculé de chaque tube a été étalé uniformément sur la surface de gélose TSA (Tryptophane- Soja-Agar) ou gélose au sang préalablement coulée dans des boîtes de Pétri (**Brun-Buisson *et al.*, 1987**). Les boîtes ont été incubées à 37°C de 24 h jusqu'à 72 h.

le tube à hémolyse contenant le sang a été aussi bien agité. Une aliquote de 0.1 ml de a étéensemencée par râteau d'une manière homogène sur toute la surface de gélose TSA préalablement coulée dans des boîtes de Pétri. Les boîtes ont été incubées à 37°C de 24 h jusqu'à 72 h.

2.2 Ensemencement

Après l'enrichissement de nos souches bactériennes d'origine clinique, à l'aide d'une anse de platine un ensemencement par strie pour chaque colonie différenciée a été effectué sur gélose au sang (milieu riche) préalablement coulée dans des boîtes de Pétri. Ces dernières ont été incubées à 37°C pendant 24 h.

2.3 Purification

Après une nuit d'incubation, les boîtes de Pétri ont montré différents aspects culturels (envahissement, en tapie, aspect rhizoïde...). Celles qui ont présenté un profil hémolytique (zone claire ou verte tout autour des colonies caractéristique de l'hémolyse β et α respectivement) ont été retenues. Les colonies d'intérêt ont été repiquées sur gélose au sang et incubées à 37°C pendant 24h. Dans les mêmes conditions (temps et température), d'autres repiquages ont été répétés jusqu'à avoir des colonies bien distincts et pures.

3. Identification des isolats

3.1 Identification morphologique

3.1.1 Critères macroscopiques

L'examen macroscopique est considéré comme le premier test après l'étape de l'isolement. Il est basé essentiellement sur une observation directe à l'œil nu des critères morphologiques des isolats tels que : la taille, la forme, le relief, la couleur, l'opacité et la consistance.

3.1.2 Critères microscopiques

3.1.2.1 Coloration simple

Elle consiste à appliquer un seul colorant (le plus souvent bleu de méthylène) pendant une minute sur le frottis préalablement préparé (étalement puis une fixation à la chaleur) . Après un rinçage à l'eau distillée de notre lame, cette dernière a été observée sous microscope photonique au grossissement $\times 100$ en lui rajoutant une goutte de l'huile à immersion. Cette coloration a pour intérêt de préciser la forme et le mode de regroupement des bactéries.

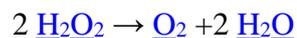
3.1.2.2 Coloration de Gram

Après l'application du protocole de la coloration de Gram (étalement , séchage , fixation et coloration) appelée aussi la double coloration, une observation microscopique a été réalisée au grossissement $\times 100$ en ajoutant de l'huile à immersion à notre préparation. Sous microscope, une couleur violette ou rose signifie que la bactérie est à Gram positif ou négatif respectivement.

3.2 Identification biochimique

3.2.1 Test de catalase

Il s'agit de la recherche de l'enzyme catalase chez la bactérie étudié, qui assure la transformation de peroxyde d'hydrogène en dioxygène et eau selon l'équation chimique:



A l'aide d' une pipette pasteur stérile boutonnée, un prélèvement d'une colonie isolée a été homogénéisé avec une goutte d'eau distillée sur une lame en verre bien nettoyée. Une goutte de peroxyde d'hydrogène a été ajoutée au mélange (bactérie + eau distillée) , une réaction positive se traduit immédiatement par une effervescence due au dégagement du dioxygène (O_2) (Garnier et Denis, 2007) .

3.2.2 Utilisation du Mannitol

C'est le pouvoir des bactéries étudiées à fermenter le mannitol (polyalcool) qui est met en évidence par un virage de l'indicateur coloré du pH du milieu (le rouge de phénol) . A partir des souches isolées , un ensemencement par épuisement a été réalisé sur un milieu gélosé à base du mannitol (Chapman) , qui est utilisé le plus souvent pour l'identification des espèces staphylococciques (De Visscher *et al.*, 2013) . Une réaction positive ou négative se traduit par le jaunissement ou non du milieu de culture respectivement.

3.2.3 Identification par la galerie API Staph (BioMérieux®)

La galerie API Staph contient 20 microtubes dans lesquels se trouvent des milieux de culture déshydratés. Une culture jeune de la souche étudiée a été réalisée sur une gélose au sang. Après l'incubation, la galerie a été inoculée selon son guide puis incubée pendant 24 h à 37°C.

La lecture de la galerie a été faite après 24 h en observant le virage des couleurs et l'ajout des réactifs appropriés pour quelques tests (VP1/ VP2, NIT1/NIT 2, ZYM A/ ZYM B). Pour préciser de qu'elle espèce il s'agit, le profil obtenu a été comparé au catalogue de référence et le logiciel numérique pour l'identification des galeries API Staph.

4. Conservation des isolats

Les bactéries purifiées ont été ensemencées par stries serrées sur GN (gélose nutritive) inclinée, incubées pendant 24 à 37°C et conservées au réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'utilisation.

5. Formation de biofilm *in vitro*

Différentes souches de référence appartenant aux espèces de *B. cereus* et *B. subtilis* ainsi que des souches de collection (S1, S2; S3; S13, S7, LVP et Cru) de *S. aureus*, *Micrococcus* spp et *B. cereus* respectivement ont été utilisées pour former des biofilms dans des microplaques de titration à 96 puits selon la technique adaptée de **Wijman et al, (2007)**; **O'Toole, (2011)** et **Gupta et al, (2016)**.

5.1 Préparation de l'inoculum

Pour remplir les microplaques de titration, les souches bactériennes choisies pour la formation de biofilms *in vitro* ont été repiquées sur un milieu gélosé TSA, puis incubées pendant 24 h à une température appropriée.

A partir des cultures jeunes obtenues, on a préparé des suspensions bactériennes en utilisant le milieu TSB, suivi par un calibrage des densités optiques de nos suspensions ajustées à une charge bactérienne de 0.8 à 595 nm ou approximativement 10⁸ UFC/ml.

5.2 Remplissage des microplaques

- Chaque puits de la première et la deuxième rangée de microplaque a été rempli par 150µl de l'eau distillée (le blanc) et TSB stériles (le contrôle négatif) respectivement.
- Les autres puits de microplaque ont été remplis par 150 µl des inocula préalablement préparés, chaque rangée correspondant à une seule souche bactérienne.

5.3 Incubation des microplaques

Chaque microplaque a été répétée en trois exemplaires qui ont été tous incubées pendant 24 h à trois températures 30°C, 37 °C et 40°C, en emballant celle de la température

la plus élevée par l'aluminium et en créant de l'humidité pour éviter l'évaporation de l'inoculum à cause de la température élevée .

5.4 Coloration au cristal violet

La mise en évidence des biofilms bactériens formés a été faite après 24h d'incubation par une coloration au cristal violet qui a été décrite pour la première fois par **CHRISTENSEN *et al*** , (**1985**). Le cristal violet est un colorant de nature basique qui s'associe à des polysaccharides et des molécules de surface chargées négativement dans la matrice extracellulaire (**Li *et al.*, 2003**).

Le protocole utilisé pour colorer les biofilms étudiés est inspiré de **Wijman *et al.*,(2007)** :

- Chaque microplaque a été vidée de son contenu.
- Un rinçage doux à l'eau distillée stérile (EDS) a été appliqué trois fois sur les microplaques pour éliminer les bactéries non ou faiblement adhérees.
- Les plaques ont été séchées pendant 10 à 15 min à température ambiante.
- A l'aide des micropipettes (20 μ – 200 μ), les puits correspondant aux : EDS (blanc) , TSB non ensemencé (contrôle négatif) et ceux des autres souches ont été remplis par un volume de 150 μ l de cristal violet à 0,5 % pour fixer et colorer les biofilms.
- le cristal violet a été laissé en contact avec les puits pendant 20 min (le temps de coloration) .
- Rinçage avec de l'EDS trois fois
- Laisser sécher les microplaques à température ambiante en position inversée.

5.5 Lecture des microplaques

5.5.1 Lecture qualitative

C'est une observation à l'œil des microplaques en voyant la persistance ou non de cristal violet après la coloration des puits, qui signifie la présence ou l'absence de biofilms respectivement. Qualitativement, une bonne formation de biofilm se révèle par une forte intensité de colorant dans les puits et vis versa.

5.5.2 Lecture quantitative

D'abord, les microplaques ont subi un traitement avec de l'acide acétique à 33% pour la solubilisation des biofilms formés et déjà colorés par le cristal violet (**Peeters *et al.*, 2008**) . Chaque puits a été rempli par 150 μ l de la solution dissolvante (acide acétique). La lecture a été faite à l'aide d'un lecteur des microplaques (ELISA) qui a permis de mesurer la densité optique de chaque puits dans les microplaques à 595 nm .

6. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits végétaux

L'effet antimicrobien des extraits végétaux de 6 plantes médicinales appartenant aux espèces d' d'Ammi visnaga, Pinus halepensis , Citrullus colocynthis , les truffes , Retama raetam et Berberis vulgaris a été testé sur 7 souches bactériennes appartenant aux espèces suivantes (**Tableau 04**) :

Tableau 04 : les souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits végétaux par la méthode de diffusion des disques.

Bactérie	Origine	Code	Gram
<i>Micrococcus spp</i>	Cathéter	S3	Positif
<i>Staphylococcus spp</i>	Cathéter	S1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Sar	
<i>Bacillus cereus</i>	Lait	P53	Positif
<i>Bacillus cereus</i>	Sol	S13	
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 778	BR	
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC	BS	

6.1 Préparation des solutions des extraits végétaux

Une solution mère à 10 % de chaque extrait végétal a été préparée en choisissant l'eau distillée comme un diluant approprié à l' exception de l'extrait de *B.vulgaris* qui a été dissout une solution de DMSO à 1%.

6.2. Stérilisation et conservation des solutions

Les solutions des extraits végétaux préalablement préparées ont été stérilisées par autoclavage pendant 10 min à 115°C puis mises à 4° C dans le réfrigérateur jusqu'à utilisation.

6.3 Activité antibactérienne des extraits végétaux

6.3.1 La méthode de diffusion des disques

Cette méthode a été décrite par Kirby et Bauer , et standardisée pour être utilisée dans les études de la sensibilité ou de la résistance des bactéries pathogènes aérobies et anaérobies facultatives à divers composés antimicrobiens (Black, 2007) y compris les produits d'origines végétales tels que les huiles essentielles (aromatogramme) et les extraits végétaux (Abdollahzadeh *et al.*, 2014).

Le protocole utilisé a été inspiré de (Balouiri *et al.*, 2016). Un disque de papier filtre de 6 mm stérilisé par autoclavage et imprégné de 10 μ / 15 μ de notre extrait végétal à 10 % a été déposé sur une gélose Mueller-Hinton préalablement ensemencée en surface avec un inoculum bactérien de 24h à une DO de à 0.6. En suite, les boîtes de pétri ont été placées pendant 2 heures à 4°C. Après la diffusion de l'agent antimicrobien, les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C \pm pendant 24 h. Sachant que des disques imprégnés de EDS / ou DMSO et des antibiotiques ont été utilisés comme un contrôle négatif et contrôle positif respectivement lors de la réalisation de ce test, Un résultat attendu est révélé après 24 h d'incubation par l'apparition ou non des zones d'inhibition tout au tour des disques.

6.3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la formation du biofilm (CMIB)

La recherche de la concentration minimale inhibitrice de la formation du biofilm (CMIB) a été réalisée par la méthode de dilution en milieu liquide. La CMIB a été définie comme la plus faible concentration de l'agent antimicrobien pour laquelle la formation de biofilm est inhibée de 50 % à 90% (Teapaisan *et al.*, 2017).

Une culture bactérienne jeune (de 18 - 24 h) avec une DO comprise entre 0.7 à 0.8 a été préparée pour inoculer les microplaques à 96 puits. Chaque puits a été rempli par 135 μ l d'inoculum bactérien lui ajoutant 15 μ l de l'extrait de *B. vulgaris* à des concentrations décroissantes (0.1g/ml, 0.05g/ml, 0.025g/ml, 0.01 g/ml, 0.005g/ml, 25. 10^{-4} g/ml, 12,5. 10^{-4} g/ml, 6,25. 10^{-4} g/ml, 5. 10^{-4} g/ml) en utilisant le DMSO à 1% comme diluant approprié. Les microplaques ont été par la suite incubées à 37°C pendant 24 h. La mise en évidence de la formation ou non de biofilm a été effectuée après 24 h en utilisant la coloration au cristal violet décrite précédemment. La lecture quantitative des microplaques a été faite au lecteur ELIZA à 630 nm.

6.3.3 Détermination de la concentration minimale éradicatrice du biofilm (CMEB)

La détermination de la concentration minimale d'éradication du biofilm (CMEB) a été faite selon (Shimizu et Harada, 2017).

- **Formation de biofilm**

La souche de référence de *S.aureus* (ATCC 25923) a été utilisée pour former un biofilm de 24h à 37°C dans les microplaques de titration à 96 puits selon le même protocole décrit précédemment.

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

Après 24 h d'incubation, les microplaques ont aseptiquement subi un rinçage doux à l'eau distillée stérile 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) . Les microplaques ont été incubées une deuxième fois pendant 24 h à 37°C et les résultats sont révélés par une coloration au cristal violet et le lecteur ELIZA comme décrit précédemment.

6.3.4 Formation de biofilm par la technique Porte germe (The Drop method)

Des biofilms ont été formés selon la technique de **Maris, (1992)** . Cette technique consiste à placer 100 µl d'une culture bactérienne aux centres des lames préalablement nettoyées (plongées dans un bain d'éthanol pendant 2 h) et stérilisées. Les lames sont incubées pendant un certain temps pour permettre l'adhésion des cellules. En suite, 100 µl de milieu de culture est ajouté à chaque lame après l'avoir rincer. Après 24 h d'incubation les lames sont de nouveau rincées, colorées au cristal violet et observées au microscope photonique.

6.3.4.1 Effet de l'extrait de *B.vulgaris* sur l'adhésion bactérienne

Des cultures bactériennes jeunes de *S.aureus* et *B.subtilis* ayant une DO comprise entre 0.6- 0.8 ont été utilisées pour inoculer les lames. Pour chaque bactérie, une dilution de 1/10 de l'extrait de *B.vulgaris* a été mélangée avec l'inoculum bactérien pour être placés sur des carrés de 1cm² des lames. De même, une inoculation des lames sans extrait végétal servant un contrôle négatif à été réalisée.

Les lames inoculées ont été incubées à 37°C pendant 3 h . Après ce temps , elles ont été rincées colorées au cristal violet à 0.5% et observées au grossissement × 100 au microscope photonique .

6.3.4.2 Effet de l'extrait de *B.vulgaris* sur la formation du biofilm de *S.aureus*

Des biofilms de *S.aureus* ont été formés sur des lames en verre selon le principe de la technique de Maris. Les lames inoculées on été incubées pendant 24h à 37°C. Les résultats obtenus sont révélés par une coloration au cristal violet à 0.5 % et une observation microscopique au grossissement×100.

Résultats et Discussion

1. Caractères phénotypiques des isolats

La mise en culture des souches isolées de différents services du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Tlemcen a été faite à 37°C pendant 24 h - 72 h sur des milieux enrichis : TSA et gélose au sang à fin de favoriser la croissance des isolats y compris les bactéries exigeantes. L'identification a porté sur l'étude des caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques.

1.1 Critères macroscopiques

L'aspect cultural des colonies apparues sur milieu gélose au sang nous a permis de distinguer différents types de colonies (**Figure 16**).

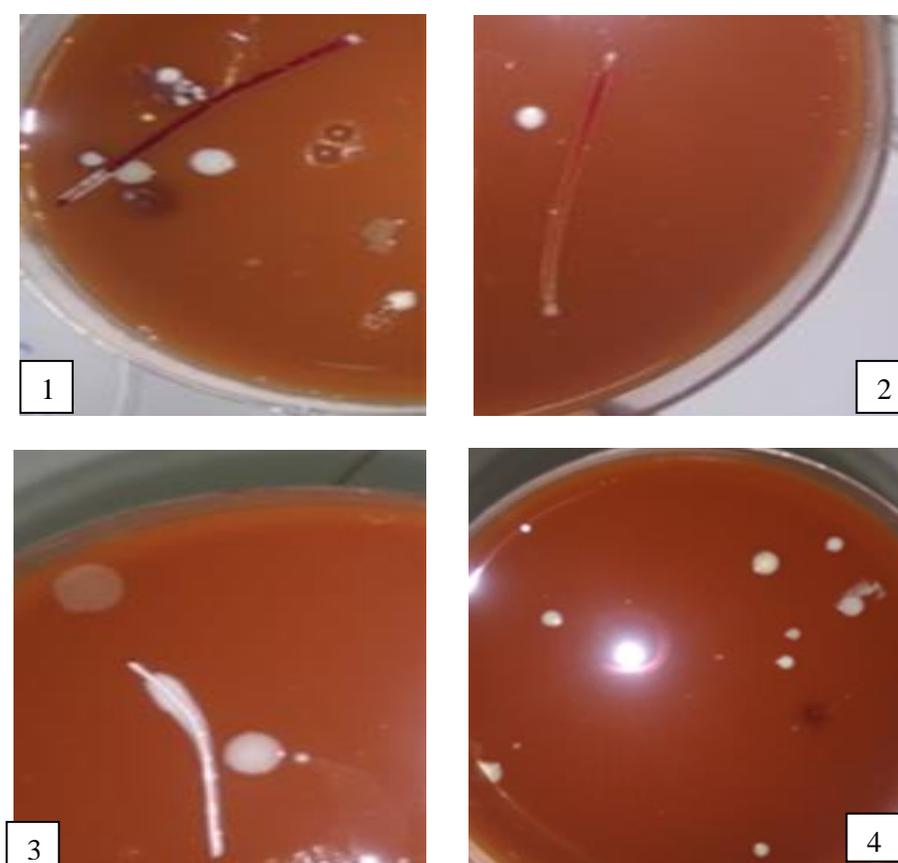


Figure 16 : Aspects morphologiques de certains isolats prélevés des dispositifs médicaux (**1, 2, 3**) et de l'ambiance (**4**) de l'unité de la réanimation affiliée au service de la chirurgie A après 24-72h d'incubation sur gélose au sang.

Les ensemencements sur milieu TSA ont donné des tapis microbiens ce qui a empêché la différenciation entre une colonie et une autre contrairement au milieu gélose au sang qui nous a permis la distinction de différents aspects culturels (**Tableau 05**).

Tableau 05 : Aspects culturels des colonies sur gélose au sang.

Souche	Taille (mm)	Forme	Couleur	Consistance	Le relief	Opacité
S1	1 – 2	Arrondie	Blanchâtre	lisse et crémeuse	Bombé	Opaque
S2	3	Arrondie	jaune pale	Crémeuse	Bombé	Opaque
S3	1 – 1,5	Arrondie	Verdâtre	Muqueuse	Bombé	Opaque

1.2 Critères microscopiques

Une coloration simple au bleu de méthylène nous a permis de révéler que la souche S2 choisie pour l'identification se présente sous forme de coques, regroupées en amas caractéristiques (grappe de raisin) et parfois même en très courtes chaînes (**Figure 17**).

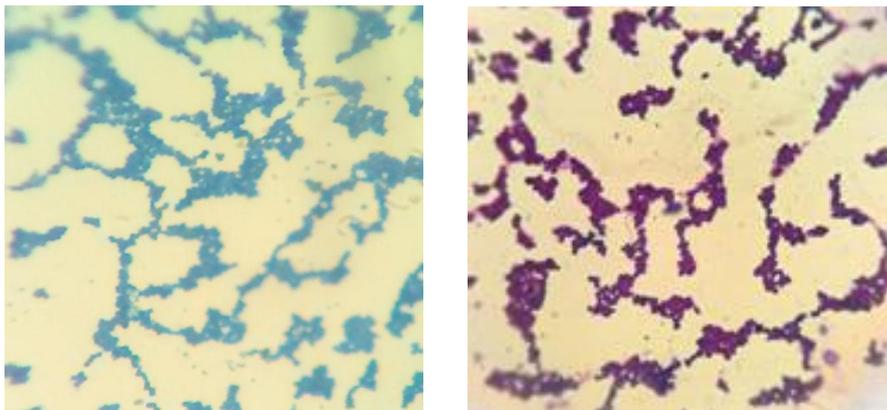


Figure 17 : Observation microscopique de la souche S2 après coloration de Gram (micrographie adroite) et de bleu de méthylène (micrographie à gauche) (G× 100).

La coloration de Gram nous a permis de valider le Gram et le mode de regroupement des bactéries. Une coloration double de la souche S2 nous a montré des coques violettes regroupées en grappe de raisin.

Les caractères morphologiques et le type de Gram a permis d'orienter l'identification microscopique vers le genre *Staphylococcus* constitué de cocci à Gram positif, asporulés et regroupés en amas (grappe de raisin) (**Bhunja, 2018**). Cet aspect a été décrit pour la première fois en 1882 par Sir Alexander Ogston qui a observé la présence de cocci sous la forme des grappes ressemblant à des raisins dans les lésions purulentes chez l'homme (**Hennekinne et Le Loir, 2014**).

1.3 Critères biochimiques

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

Une réaction immédiate entre les bactéries et l'H₂O₂ nous a montré une réaction positive révélée par l'apparition d'une effervescence ce qui confirme que la souche S2 est catalase positive (**Figure 18**).



Figure 18: une réaction positive de l'enzyme catalase de la souche S2 en contact avec l'H₂O₂.

Le dégagement de gaz résulte de la décomposition de l'eau oxygénée en oxygène et eau sous l'action de la catalase. Cette enzyme est une caractéristique des Staphylocoques, à l'exception de quelques espèces y compris *S.capitis* et *S.saccharolyticus*, contrairement au Streptocoques qui sont catalase négative (**Kloos, 1999; Pane et al., 2015**).

Concernant la fermentation de mannitol, le jaunissement du milieu Chapman indique que la souche S2 est Mannitol positive et halotolérante. En outre, ce milieu au mannitol et à fortes concentrations en chlorure de sodium est souvent utilisé pour l'identification bactérienne, il permet aussi sélectivement la croissance des staphylocoques (**BOUDRAA et al., 2014**).

1.4 Détermination du biotype

Une incubation pendant 24h de la galerie Api Staph suivie par l'ajout des réactifs appropriés (VP1/ VP2, NIT1/NIT 2, ZYM A/ ZYM B) nous a permis d'avoir le profil biochimique (**Tableau 06**).

Tableau 06 : Profil biochimique de la souche S2

Tests	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
Profil	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-

D'après le logiciel d'identification de la galerie API, le profil des tests biochimiques obtenu correspond à 92 % de l'espèce de *Staphylococcus aureus*.

S. aureus est de loin le plus pertinent sur le plan clinique, présent dans le microbiote commensal humain des fosses nasales d'où il peut avoir accès aux tissus sous-jacents ou à la circulation sanguine provoquant des infections surtout chez les personnes ayant des dispositifs médicaux invasifs tels que les cathéters veineux (Lee *et al.*, 2018).

De même, d'autres études ont également retrouvé la même espèce au CHU de Tlemcen notamment les travaux de Rebiahi, (2012) qui a montré une dominance de certaines souches de *S.aureus*, y compris le biotype 6336153. Ce dernier qui présente des caractères biochimiques similaire à ceux de la souche « S2 » étudiée, suggérant la persistance de ce biotype dans l'environnement hospitalier.

4. Le potentiel de formation de biofilm *in vitro*

La coloration des microplaques au cristal violet nous a permis de révéler à l'œil nu et par le biais d'un lecteur ELIZA la formation ou non des biofilms après 24h d'incubation à 30°C, 37°C et 40°C.

4.1 Détermination qualitative

Une observation directe des microplaques préalablement colorées au cristal violet a montré la formation d'anneaux à l'interface air-liquide dans certains puits. L'intensité de couleur est caractéristique et varie d'une souche à une autre, certaines sont non ou faiblement colorés (Figure 19).

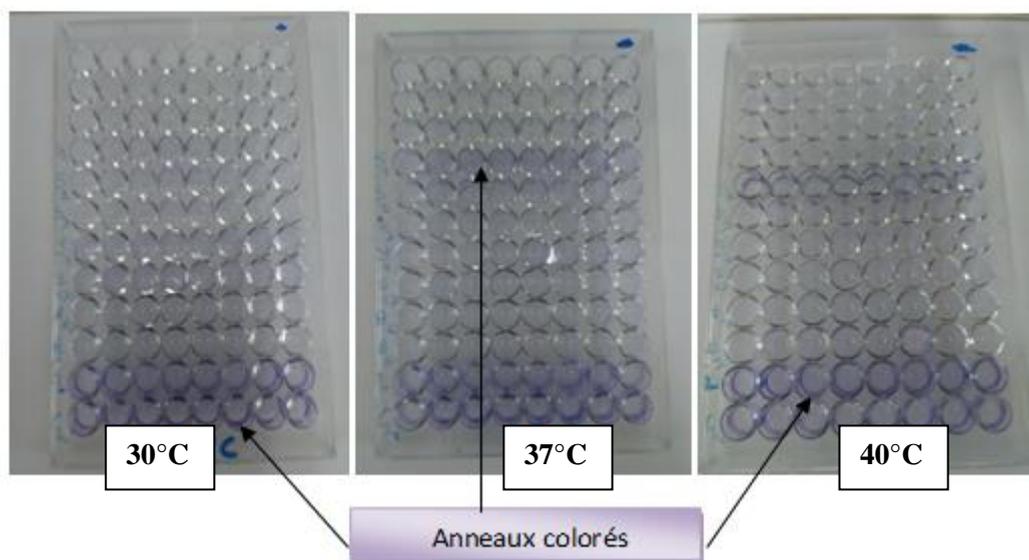


Figure 19: Détection des biofilms formés à différentes températures (30°C, 37°C et 40°C) dans les microplaques à 96 puits par la coloration au cristal violet.

4.2 Détermination quantitative

Le lecteur ELIZA nous a permis d'évaluer quantitativement le pouvoir des souches testées à adhérer au polystyrène et former un biofilm dans les microplaques en mesurant la DO de chaque puits (**Figure 20-22**). D'après **CHRISTENSEN et al.,(1985)** l'interprétation des résultats se réfère à la densité optique du puits témoin (DO_t). (**Hola et Ruzicka, 2011**) les souches sont classées en :

- $DO \leq DO_t$: non formatrice de biofilm .
- $2 DO_t \leq DO \leq 4 DO_t$: modérément formatrice de biofilm .
- $4 DO_t \leq DO$: fortement formatrice du biofilm .

A 40°C , en comparant avec la DO du témoin (0.185) , les souches de *B.cereus* (LVP et CRU) et la souche de *S.aureus* (S2) à ont été fortement formatrice du biofilm ($DO \geq 4 DO_t$) .Contrairement aux souches de *Staphylococcus spp* (S1) , *Micrococcus spp*(S3) , *B.cereus* (BR) et *B.subtilis* sont non formatrices du biofilm dont les DO enregistrées sont très faibles , les plaçant dans la catégorie non-formatrices du biofilm .

A 37°C ($DO_t=0.18$),les souches de *B.cereus*(LVP, CRU) et *Staphylococcus spp* (S1) sont classées comme modérément formatrices du biofilm .Les autres se sont distinguées par une absence de formation du biofilm à cette température .

La température de 30°C($DO_t = 0.159$) , seules les souches de *B.cereus* (LVP et CRU) se sont montrés modérément formatrices du biofilm, alors que les souches restantes ont considérées comme non formatrices du biofilm d'après les DO enregistrées allant du 0.067 jusqu'à 0.140 .

A la lumière des résultats obtenus, on peut constater que certaines souches de *B. cereus* ont la capacité d'adhérer au polystyrène et générer des biofilms dans les microplaques de titration avec une légère augmentation à 40°C. Cette formation du biofilm est conforme aux travaux de **Wijman et al., (2007)**. De même *B.cereus* est considéré comme une souche à haut potentiel d'adhésion aux surfaces inertes et de formation de biofilm (**Hussain et Oh, 2017**). L'effet stimulateur par la température élevée (40°C) est clairement remarquable de la formation du biofilm chez les souches de *B.cereus* mésophiles . Le même effet a été observé chez des souches des bacilles thermophiles d'origine laitière (**Burgess et al., 2010**).

De même , la souche de *S.aureus* (S2) est caractérisée par un potentiel de formation du biofilm important et montre la DO la plus élevée (1.2) à 40°C. Contrairement aux autres valeurs obtenues aux autres températures (30°C-37°C) et à celles de la souche S1.Celle ci est modérément formatrice du biofilm à 37°C malgré qu'elle ne forme pas du biofilm à 30°Cet 40°C .

S.aureus est l'une des causes principales d'infections nosocomiales chroniques comprennent l'ostéomyélite, l'endocardite, ces dernières qui nécessitent l'attachement et la croissance de cette bactérie dans des biofilms en se développant sur des surfaces corporelles hôte ou des dispositifs médicaux (Mootz *et al.*, 2015). Dans l'étude présente, la souche S2 appartenant au *S.aureus* a montré une forte formation de biofilm à 40° contrairement à plusieurs travaux notamment de Sugimoto *et al.*,(2018) et qui ont montré une meilleure productivité de biofilm à la température physiologique de 37°C .De plus, cette souche présente un biotype qui persiste dans les milieux hospitaliers, probablement à cause de formation du biofilm.

En revanche, plusieurs souches *Micrococcus spp*, *B.cereus* et *B.subtilis* (S3 ; BR, S13, S7 et BS) ont montré des DO nettement inférieures à celle du témoin .Ceux-ci indiquent qu'elles sont non formatrices du biofilm. D'ailleurs, la formation de biofilm dépend de certains facteurs environnementaux et de la souches elle-même (Wijman *et al.*, 2007).

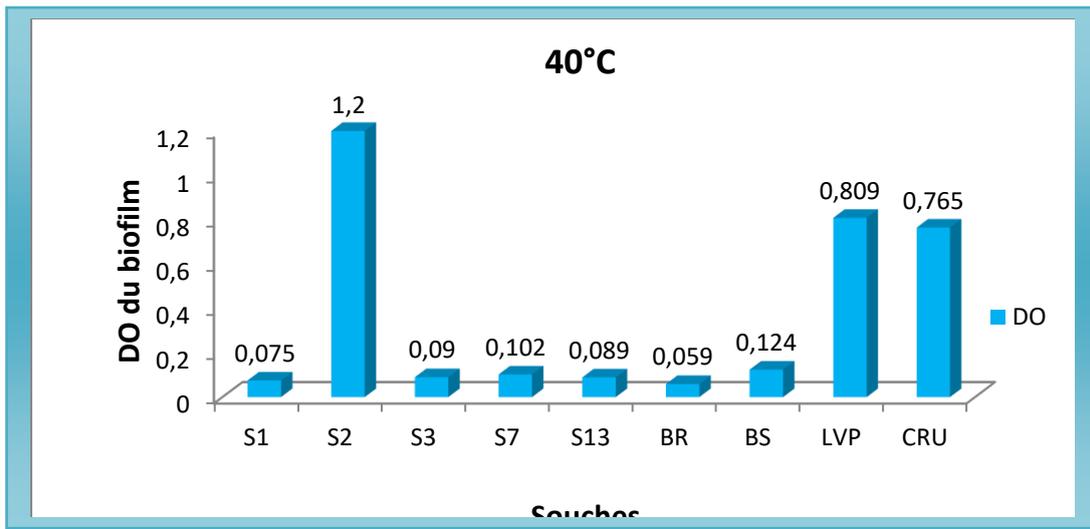


Figure 20 : Biomasse des biofilms formés par différentes souches bactériennes à 40 °C .

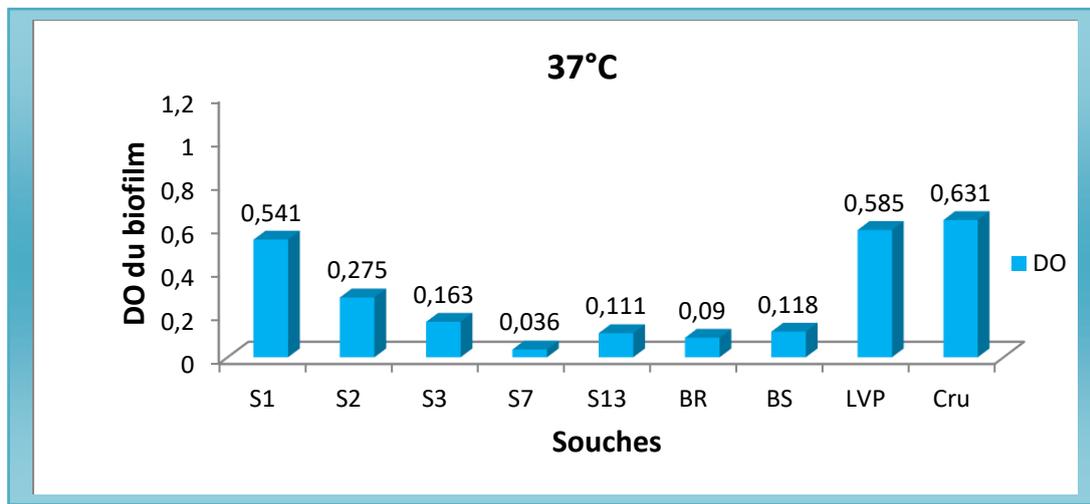


Figure 21 : Biomasse des biofilms formés par différentes souches bactériennes à 37 °C.

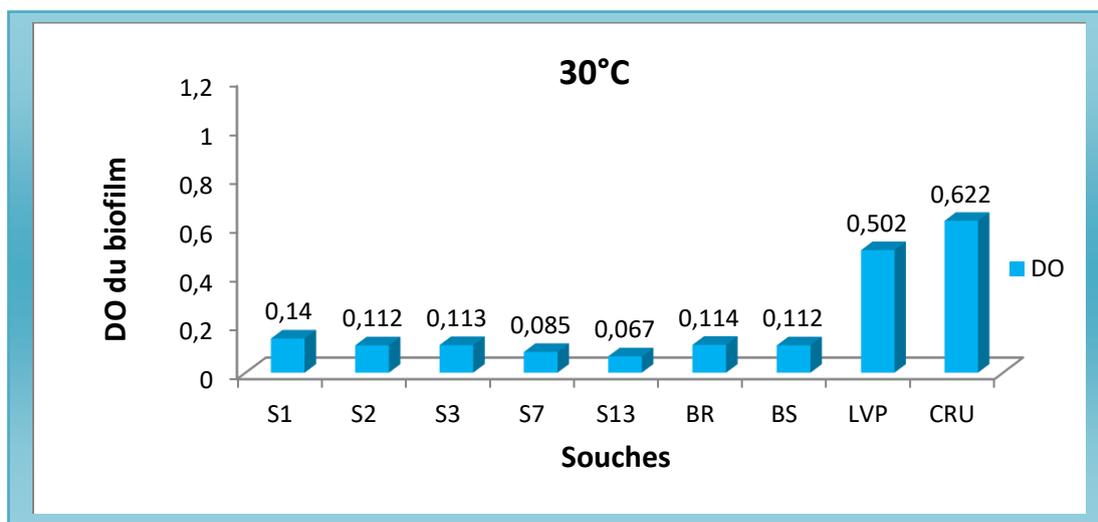


Figure 22 : Biomasse des biofilms formés par différentes souches bactériennes à 30 °C.

5. Activité antibactérienne

5.1 Résultats du screening

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 (**Figure 24,25**). L'extrait de n. butanol de *Berberis vulgaris* donne un diamètre d'inhibition varie en fonction des souches testées contrairement à la majorité des autres extraits végétaux qui n'ont aucun effet ou sont faiblement actifs (**Tableau 07 , Figure 23 - 27**).

Tableau 07 : Effet inhibiteur de certains extraits végétaux sur différentes souches bactériennes

Bactéries	Effet des extraits végétaux					
	<i>R. raetam</i>	Truffes	<i>C.colocynthis</i>	<i>B.vulgaris</i>	<i>P.halepensis</i>	<i>A.visnaga</i>
BS	-	-	-	++	+	-
S13	+	+	-	++	+	-
BR	+	+	+	++	+	-
P53	-	-	-	++	-	-
S1	-	-	-	++		-
S3	-	-	-	++	+	-
Sar	-	+	+	++	-	-

- + : Diamètre d'inhibition < ou = 15 mm .
- ++ : Diamètre d'inhibition > 15 mm .
- - : pas d'inhibition.

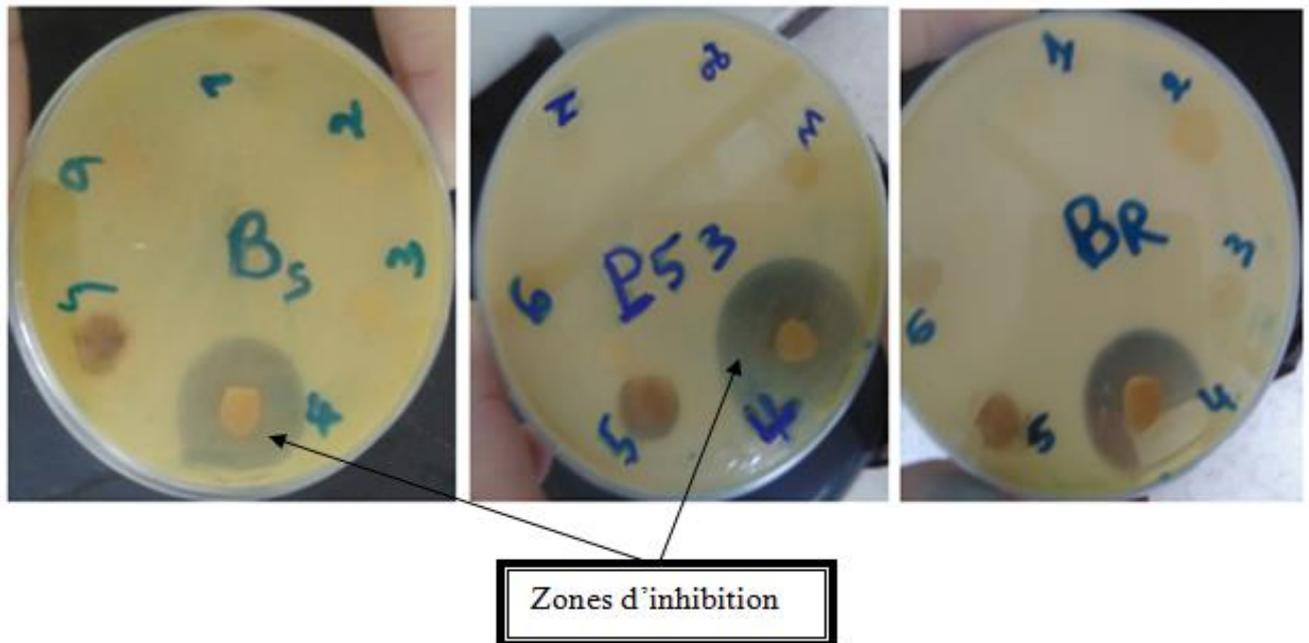


Figure 23: Effet des extraits végétaux de 1 : *R. raetam* , 2 : truffes, 3 : *C.colocynthis*, 4 : *B.vulgaris*, 5 *P.halepensis*, 6 *A.visnaga* sur différentes souches bactériennes de Bacillus (BS , BR, S13 et P53) évalué par la méthode des disques .

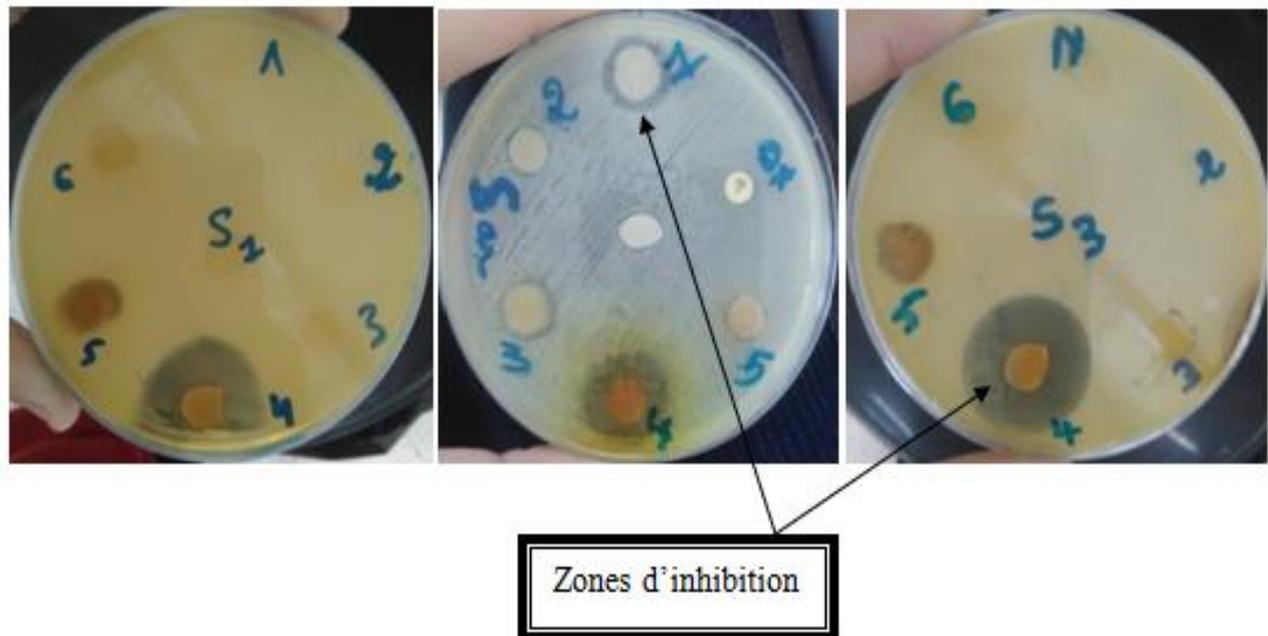


Figure 24 : Effet des extraits végétaux de 1 : Truffes , 2 : *R. raetam* , 3 : *C.colocynthis*, 4 : *B.vulgaris*, 5 *P.halepensis*, 6 *A.visnaga* sur la croissance du *S.aureus* , *Staphylococcus spp* et *Micrococcus spp* évalué par la méthode des disques.

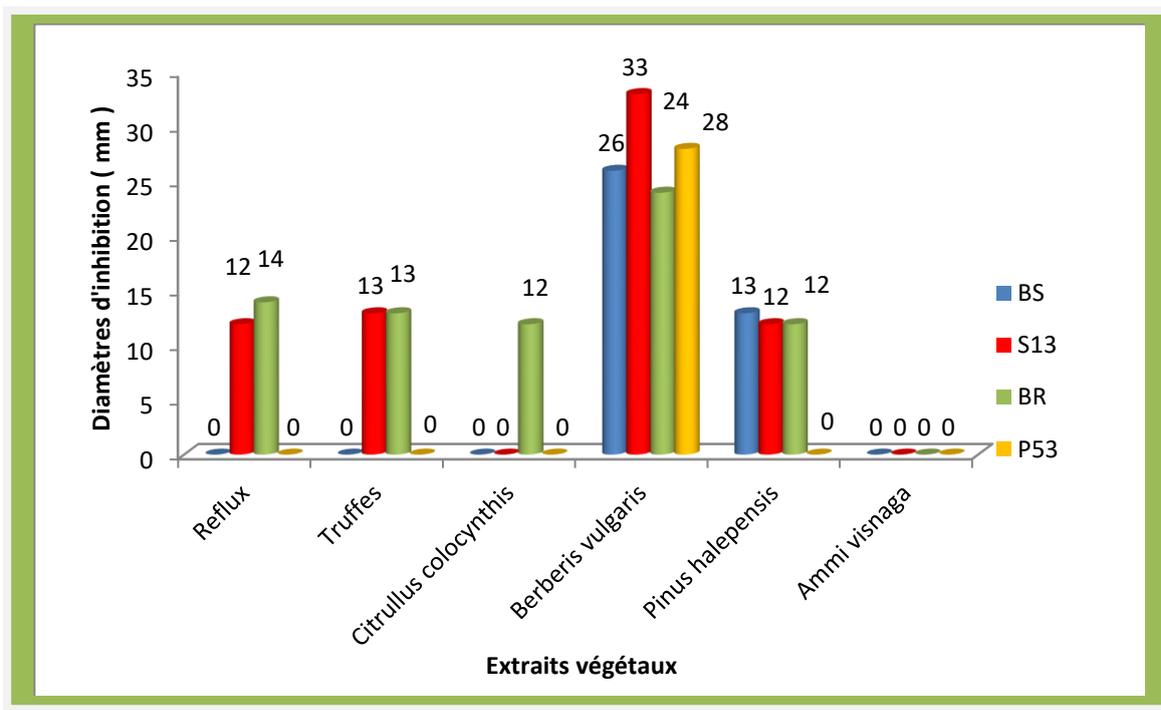


Figure 25 : Le pouvoir antimicrobien des extraits végétaux de *R. raetam* , truffes, *C.colocynthis*, *B.vulgaris*, *P.halepensis*, *A.visnaga* obtenus par méthode de diffusion des disques sur *Bacillus cereus* (S13, BR, P53) et *Bacillus subtilis* (BS) .

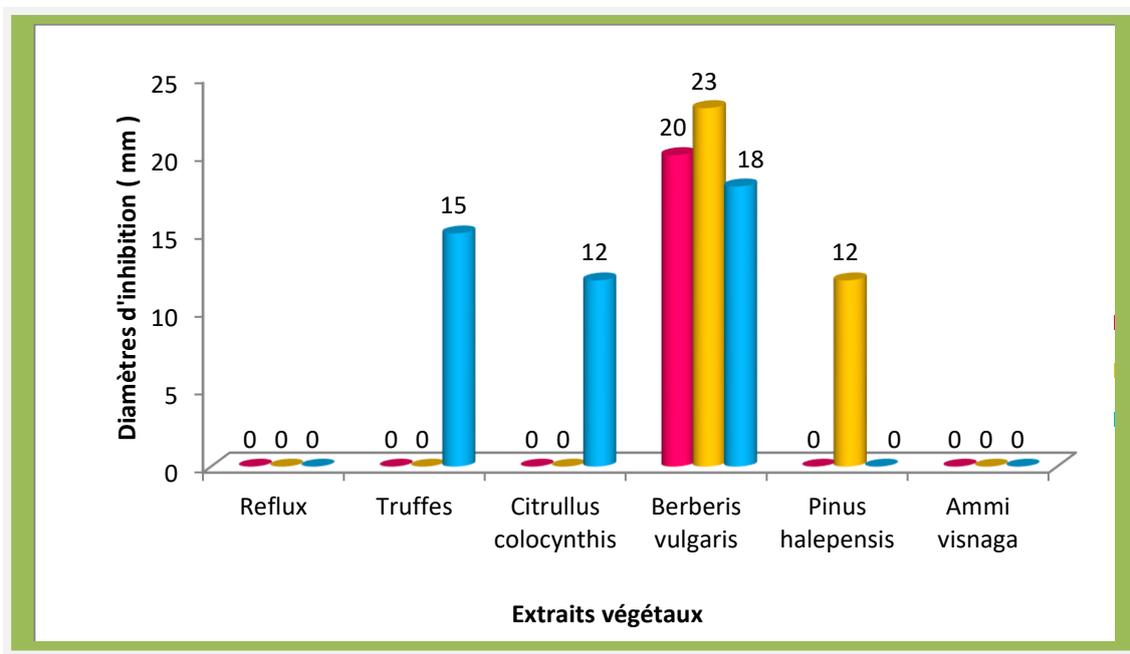


Figure 26 : Effet antibactérien des extraits végétaux de *R. raetam* , truffes, *C.colocynthis*, *B.vulgaris*, *P.halepensis*, *A.visnaga* sur *Staphylococcus* spp (S1), *S. aureus*(Sar) et *Micrococcus* spp (S3) .

D'après la méthode de diffusion des disques, l'extrait de *B. vulgaris* s'avère la plus efficace toutes les souches testées. Les diamètres des zones d'inhibition varient de 22- 33 mm (*B.cereus*), de 18-20 (*S. aureus* et *Staphylococcus spp*) et 23 mm (*Micrococcus spp*).

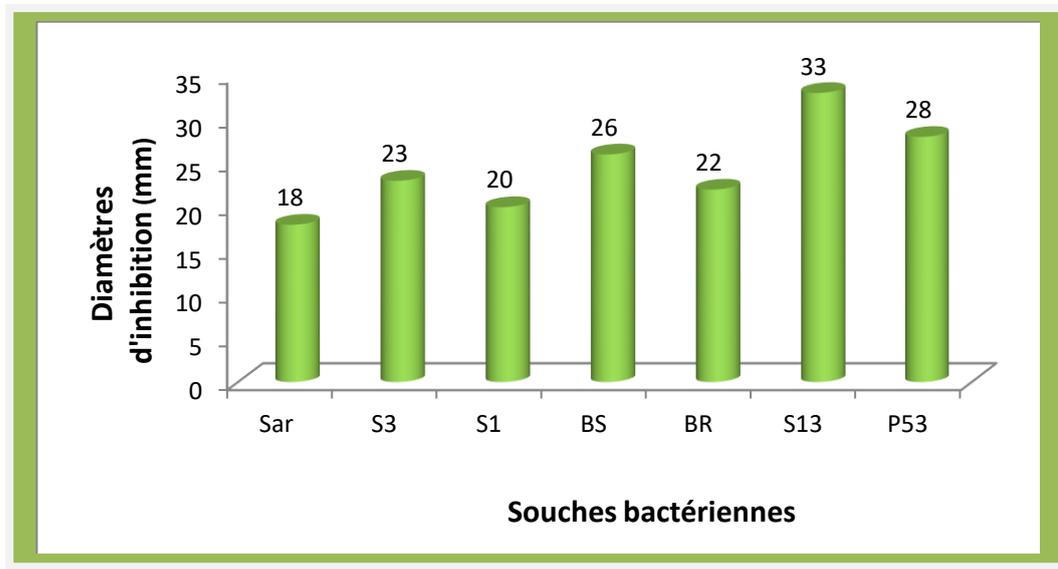


Figure 27 : Comparaison de l'effet antibactérien de l'extrait de *B. vulgaris* sur les souches de *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *B.cereus*.

Les antibiotiques (vancomycine et la gentamycine) utilisés comme contrôle positif ont montré une efficacité vis-à-vis les souches du genre *Bacillus* : BR, S13, BS et P53, et qu'à l'exception de la gentamycine, la souche « Sar » a été résistante face à l'oxacilline et l'ampicilline (**Tableau 08**). A lors que le DMSO et l'EDS (deux contrôles négatifs) ont été inactifs contre toutes les souches bactériennes testées.

En comparaison avec la Gentamycine, l'extrait de *B. vulgaris* a montré aussi un effet sur toutes les souches étudiées et la croissance de chacune a été inhibée même en présence de l'extrait végétal d'intérêt à 10 %.

Les Diamètres d'inhibition fournis par l'extrait de *B. vulgaris* sont inférieurs à ceux de la Gentamycine dans le cas de *S.aureus* (Sar) et *Bacillus cereus* contrairement à *Bacillus subtilis* qui a été légèrement plus sensibles à l'extrait végétal qu'à la Gentamycine.

5.2 La CMIB de l'extrait de *B.vulgaris*

La capacité de l'extrait de *B.vulgaris* à inhiber la formation de biofilm à été étudiée en utilisant la méthode de dilution en milieu liquide.

Après la coloration au cristal violet, à l'œil nu, la formation de biofilm par *S. aureus* (Sar) à 37°C a été observée normalement dans les puits du témoin (contrôle positif). Or, l'ajout de l'extrait de *Berberis vulgaris* dans les autres puits a empêché la formation du biofilm en présence des concentrations décroissantes en extrait allant jusqu'à $6,25 \cdot 10^{-4}$ g/ml qui

présente la CMIB. dont Des biofilms en anneaux apparaissent clairement formés dans l'interface air-liquide des puits dont la concentration est inférieure à la CMIB. Une lecture au spectrophotomètre nous a permis à mesurer les DO des résultats obtenus (**Figure 28**).

Tableau 08 : Effet de quelques antibiotiques sur la croissance bactérienne de *S. aureus* , *B.cereus* et *B.subtilis* .

Antibiotiques	Souches	Diamètres d'inhibition (mm)
Gentamycine	BS	25
	BR	25
	S13	30
	P53	26
	Sar	26
Vancomycine	BS	20
	BR	15
	S13	23
	P53	18
Oxacilline	Sar	-
Ampicilline	Sar	-

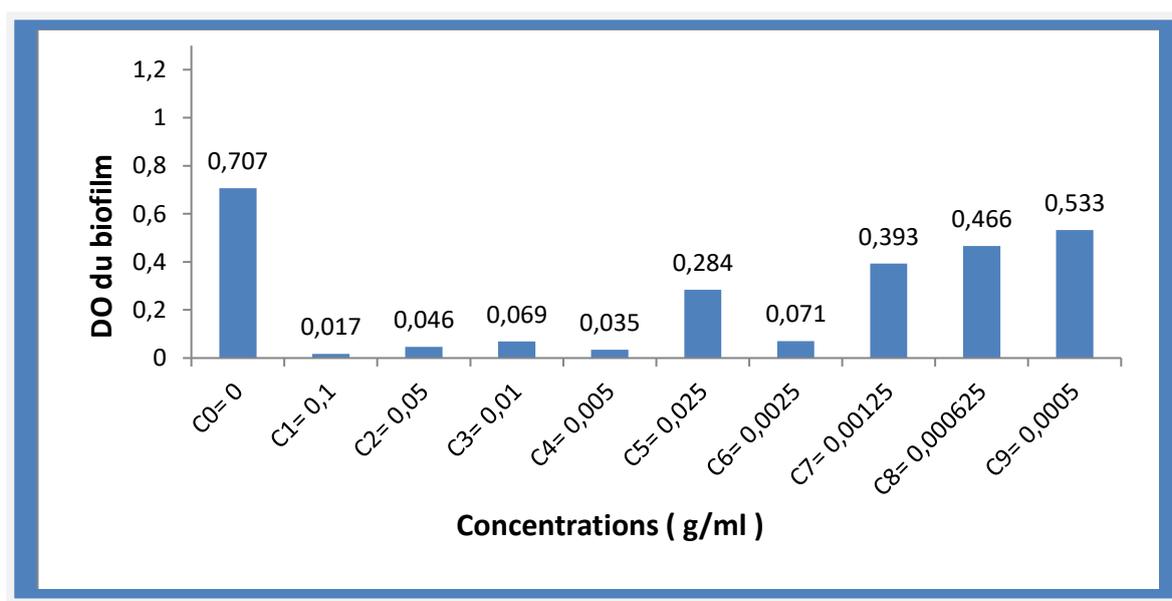


Figure 28 Biomasse de biofilms formés par *S.aureus* en présence de l'extrait de *B.vulgaris* à différentes concentrations.

5.4 Microscopie de l'inhibition de la formation du biofilm

5.4.1 Inhibition de l'adhésion Bactérienne

L'effet de l'extrait de *B.vulgaris* à 10 % sur l'adhésion de *S. aureus* et *B. subtilis* nous a montré une diminution du nombre de cellules adhérentes aux lames en verre. Ces cellules qui ont été traitées par l'extrait végétal apparaissent moins chargées que les cellules qui n'ont pas été traitées (**Figure 30 , 31**) .

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).

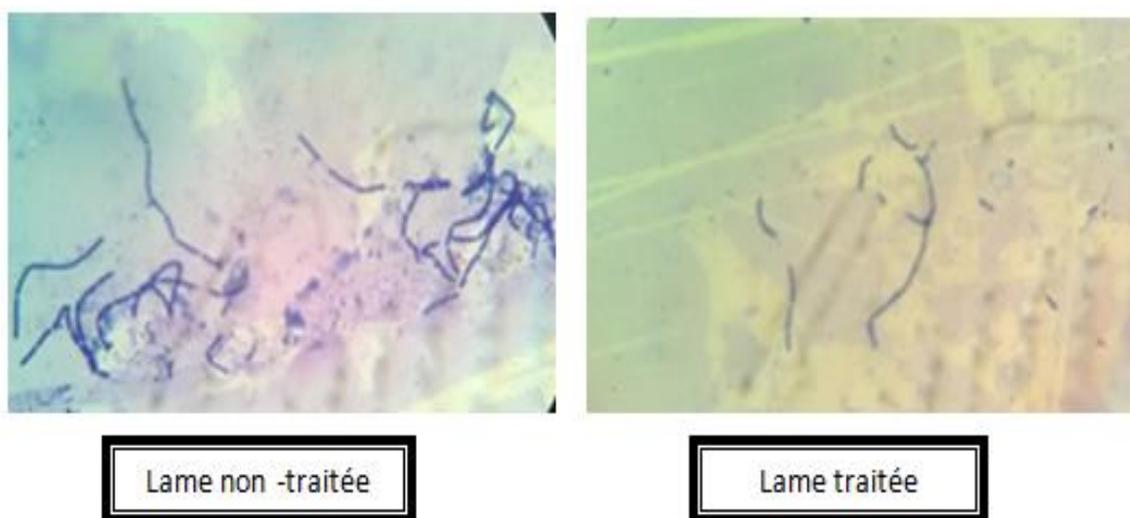


Figure 29 : Observation microscopique de *Bacillus subtilis* en phase d'adhésion avec et sans extrait de *B.vulgaris* (G×100).

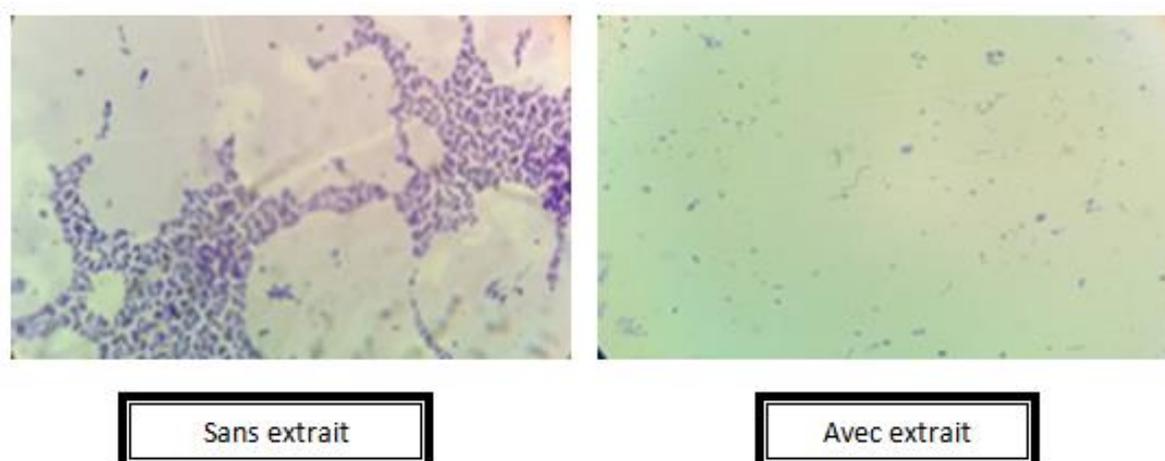


Figure 30 : Observation microscopique de *S. aureus* en phase d'adhésion avec et sans extrait de *B.vulgaris* (G×100).

5.4.2 Inhibition de la formation du biofilm

L'ajout de l'extrait de *B. vulgaris* nous a montré qu'il n'y a pas un effet d'inhibition totale de la formation du biofilm, et que celui-ci dépend de la concentration en extrait. Les lames traitées avec l'extrait végétal à 0.1 % montrent un faible développement de cellules comparées aux autres traitées avec 0.025 g/ml et 0.005 g/ml de l'extrait et qui apparaissent peu chargées en cellules (**Figure 32**).

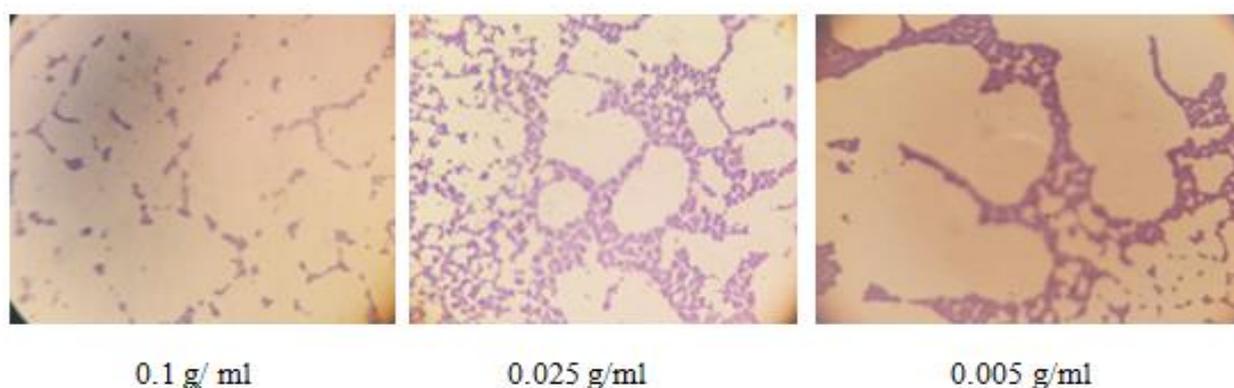


Figure 31 : Observation microscopique de Biofilms de *Staphylococcus aureus* formés en présence de l'extrait de *B.vulgaris* ($G \times 100$).

Sur les six extraits analysés seule celui de l'espèce de *B.vulgaris* a montré un effet sur les biofilms de *B.subtilis* et *S.aureus*. De même c'est l'extrait le plus actif sur la croissance des souches comme montre par la technique de diffusion du disque.

Concernant l'effet de *P. halepensis*, l'application des huiles essentielles isolées par hydrodistillation à partir des aiguilles de pin d'Alep récoltées dans différentes provenances a montré une faible activité antifongique contre divers champignons phytopathogènes (**Hamrouni et al., 2015**). En outre, une étude sur l'huile essentielle de *P. halepensis* de la région de Ghazaouet a montré une inhibition de la croissance de nombreuses espèces bactériennes notamment *S. aureus* et *B. cereus* (**Fekih et al., 2014**). Dans ce travail, différentes souches de *B.cereus* de *Micrococcus* spp se sont montrées sensibles à l'action de l'extrait organique de *P. halepensis* contrairement à d'autres souches y compris *S.aureus* qui était nettement résistante.

D'après les travaux de **Mahendiran et Umavathi, (2015)**, l'extrait d'acétone de *C. colocynthis* a montré une activité antifongique remarquable contre certains champignons tels que *Penicillium* sp *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, ce qui peut être attribué à la présence des composés actifs hydrosolubles comme les glucosides et de résines qui inhibent l'activité enzymatique dans la membrane cytoplasmique. Contrairement à nos résultats, l'extrait aqueux

de cette plante a été inactif contre plusieurs souches bactériennes testées dans la présente étude à l'exception d'une faible activité inhibitrice enregistrée face à une seule souche de *B.cereus* (BR) et de *S.aureus* (Sar) respectivement .

Bien que l'activité antibactérienne de l'extrait des truffes testée dans ce travail a montré un faible potentiel inhibiteur de certaines souches de *S.aureus* et *B.cereus* alors que d' autres étaient complètement résistantes , plusieurs études ont montré que les extraits aqueux des truffes de désert possèdent des propriétés antimicrobiennes significatives notamment contre les bactéries Gram⁺ et Gram⁻ (Alhussaini et al., 2016; Gargano et al., 2017; Neggaz et al., 2015) . Une activité antifongique de cette matière végétale a été également confirmée par les travaux de Owaid, (2017) .

D'après les travaux d' Imenshahidi et Hosseinzadeh, (2016) ,la berbérine qui fait partie de *B.vulgaris* a montré une activité antibactérienne contre diverses espèces bactériennes y compris *Streptococcus spp*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Staphylococcus spp* et *Shigella dysenteriae* ainsi qu'une activité inhibitrice de la croissance de plusieurs espèces fongiques notamment *Candida albicans* et *Microsporium canis* et que l'extrait de l'écorce a montré aussi un potentiel inhibiteur contre *Botrytis cinerea* (Imenshahidi et Hosseinzadeh, 2016) . L'effet inhibiteur de la formation du biofilm chez souches testées dans la présente étude de l'extrait de *B.vulgaris* est remarquable comparé aux autres extraits et peut confirmer la richesse de cette plante en berbérine.

En effet , l'extrait aqueux des feuilles de *R. reatam* a montré une faible activité inhibitrice uniquement contre deux souches (BR , S13) de *B.cereus* . contrairement au résultat des travaux de Hayet et al., (2008) sur l'extrait butanol de la même espèce végétale qui a montré une activité antimicrobienne élevée contre plusieurs bactéries Gram-positives notamment *B.subtilis* , *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium spp*, et SARM à des CMI comprises entre 0.256-0.512 mg / ml .

Contrairement à l'extrait d'A.visnaga qui n'a montré aucun effet sur les souches testées , les travaux de Beltagy et Beltagy, (2015) et Travaini et al., (2016) sur les extraits aqueux et éthanoliques ainsi que l'huile essentielle de la même plante médicinale ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis de nombreuses espèces bactériennes à Gram positives et les *Candida* . Ainsi que les tests de Khalfallah et al, (2011) et Hashim et al (2014) sur l'extrait éthanolique à 95 % de ses fruits qui a montré un effet inhibiteur sur la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* H37RVTMC 102 même à très faible concentration (dilution de 1:40) et l'huile essentielle qui a montré aussi une meilleure activité antibactérienne contre *E. coli*, *S.aureus* et *P. aeruginosa* .

Conclusion

Conclusion

L'émergence de la résistance des bactéries face à différents agents antimicrobiens tels que les antibiotiques, les biocides, et les complications sanitaires que présentent les biofilms bactériens conduisent à la recherche de nouvelles molécules doués d'un pouvoir antimicrobien notamment les molécules bioactive d'origine naturelle.

L'identification phénotypique des souches bactériennes isolées du milieu hospitalier a permis de déterminer les caractères morphologiques, biochimiques et le biotype. En outre l'activité antimicrobienne des extraits végétaux des plantes médicinales *P. halepensis*, *A. visnaga*, *B. vulgaris*, *R. raetam*, *C. colocynthis* et truffes de désert sur la croissance libre de certains isolats cliniques ainsi que d'autres souches de référence a montré que l'extrait végétal de *B. vulgaris* possède un pouvoir antimicrobien plus important vis-à-vis de toutes les souches testées par rapport aux autres extraits apparus faiblement actifs ou inactifs.

De même, l'extrait végétal de *B. vulgaris* a montré une efficacité contre la formation du biofilm par la technique « porte germe » par les souches de *S. aureus* et *B. subtilis* en empêchant leur adhésion au verre., cet agent naturel a inhibé également la croissance en biofilm de la souche *S. aureus* reconnue par son pouvoir pathogène en milieu hospitalier.

L'ensemble des résultats obtenus peuvent être complétés par :

- Une analyse de la composition chimique des extraits végétaux testés et l'identification des molécules bioactives.
- Etude de mécanismes d'action des molécules à principes actifs constituant les plantes d'intérêt.
- Consolider les résultats obtenus par d'autres travaux de recherche montrant l'importance de ces extraits végétaux dans l'inhibition et l'éradication des biofilms.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Ababutain, I.M. (2011). Antimicrobial activity of ethanolic extracts from some medicinal plant. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5, 678–683.
2. Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., and Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control* 35, 177–183.
3. Akbas, M.Y. (2015). Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, Badajoz: Formatex 383–394.
4. Alhussaini, M.S., Saadabi, A.M., Hashim, K., and Ghanayem, A.A.A.- (2016a). Efficacy of the Desert Truffle *Terfezia clavaryi* to Cure Trachoma Disease with Special Emphasis on its Antibacterial Bioactivity. *Trends in Medical Research* 11, 28–34.
5. Alhussaini, M.S., Saadabi, A.M., Hashim, K., and Ghanayem, A.A.A.- (2016b). Efficacy of the Desert Truffle *Terfezia clavaryi* to Cure Trachoma Disease with Special Emphasis on its Antibacterial Bioactivity. *Trends in Medical Research* 11, 28–34.
6. Ali, F. (2016). Evaluation Of The Antifungal And Antioxidant Activity Of *Citrullus Colocynthis* Against The Dieback Of Olive Tree In South Tunisia. *Evaluation* 2.
7. Ali, A., Alian, M., and Elmahi, H. (2013). Phytochemical analysis of some chemical metabolites of *Colocynthis* plant (*Citrullus colocynthis* L.) and its activities as antimicrobial and antiplasmidial. *J. Basic. Appl. Sci. Res* 3, 228–236.
8. Al-Snafi, A.E. (2016). Chemical constituents and pharmacological effects of *Citrullus colocynthis*-A review. *IOSR Journal Of Pharmacy* 6, 57–67.
9. Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibsouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71–79.
10. Beltagy, A.M., and Beltagy, D.M. (2015). Chemical composition of *Ammi visnaga* L. and new cytotoxic activity of its constituents khellin and visnagin. *J. Pharm. Sci. Res* 7, e291.
11. van den Berg, S., Bonarius, H.P.J., van Kessel, K.P.M., Elsinga, G.S., Kooi, N., Westra, H., Bosma, T., van der Kooi-Pol, M.M., Koedijk, D.G.A.M., Groen, H., et al. (2015). A human monoclonal antibody targeting the conserved staphylococcal antigen IsaA protects mice against *Staphylococcus aureus* bacteremia. *International Journal of Medical Microbiology* 305, 55–64.
12. Bhunia, A.K. (2018). *Staphylococcus aureus*. In *Foodborne Microbial Pathogens*, (New York, NY: Springer New York), pp. 181–192.
13. Black, A. (2007). Information history. *Annual Review of Information Science and Technology* 40, 441–473.
14. Bojang, A., Camara, B., Jagne Cox, I., Oluwalana, C., Lette, K., Usuf, E., Bottomley, C., Howden, B.P., D'Alessandro, U., and Roca, A. (2018). Long-term Impact of Oral

- Azithromycin Taken by Gambian Women During Labor on Prevalence and Antibiotic Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in Their Infants: Follow-up of a Randomized Clinical Trial. *Clinical Infectious Diseases*.
15. Boudraa, W., Khemis, M.D.E., Boumaaza, O., Bouslama, Z., Merzou, S.-E., and Houhamdi, M. (2014). qualité bactériologique et physicochimique de l'eau des pages d'Annaba. p.
 16. Bouzenna, H., Hfaiedh, N., Bouaziz, M., Giroux-Metges, M.-A., Elfeki, A., and Talarmin, H. (2017). Cytoprotective effects of essential oil of *Pinus halepensis* L. against aspirin-induced toxicity in IEC-6 cells. *Archives of Physiology and Biochemistry* 123, 364–370.
 17. Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H.J., and Coenye, T. (2011). Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 2655–2661.
 18. Bradai, L., Bissati, S., and Chenchouni, H. (2014). Desert Truffles of the North Algerian Sahara: Diversity and Bioecology. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 26, 429–439.
 19. Bradai, L., Bissati, S., Chenchouni, H., and Amrani, K. (2015). Effects of climate on the productivity of desert truffles beneath hyper-arid conditions. *Int J Biometeorol* 59, 907–915.
 20. Brun-Buisson, C., Abrouk, F., Legrand, P., Huet, Y., Larabi, S., and Rapin, M. (1987). Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip cultures. *Archives of Internal Medicine* 147, 873–877.
 21. Burgess, S.A., Lindsay, D., and Flint, S.H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* 144, 215–225.
 22. Choi, Y.C., and Morgenroth, E. (2003). Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. 8.
 23. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., and Beachey, E.H. (1985). Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *J. CLIN. MICROBIOL.* 22, 11.
 24. Cimanga, K., Lubiba, N., Makila Bool-Miting, F., Tona, L., Kambu, K., Vlietinck, A., and Pieters, L. (2018). Biological activities of arredoul jaune, a phytomedicine based ethanol extract from fresh roots of *Pentadiplandra brazzeana* baill. (Pentadiplandaceae) used as an antidiarrhoeal drug in Kisangani-Democratic Republic of Congo. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 5, 130–139.
 25. Costerton, J.W. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284, 1318–1322.
 26. Dafri, A., and Beddiar, A. (2017a). desert truffles from Northeastern Algerian Coastal dunes : Ecology , Identification and symbiosis . *Journal of Fundamental and Applied Sciences* 9, 153–169.
 27. Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 114.

28. Denis, F., Ploy, M.-C., Bingen, E., and Quentin, R. (2011). *Bactériologie médicale: techniques usuelles* (Elsevier Health Sciences).
29. Díez, J., Manjón, J.L., and Martin, F. (2002a). Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*), host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia* *94*, 247–259.
30. Díez, J., Manjón, J.L., and Martin, F. (2002b). Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*), host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia* *94*, 247–259.
31. Dirar, A.I., Mohamed, M.A., Osman, W.J., Abdalgadir, H., and Khalid, H.S. (2014). A Phytopharmacological review on four antitumor medicinal plants grown in sudan. *Am. J. PharmTech Res* *4*, 28–41.
32. Djerrad, Z., Kadik, L., and Djouahri, A. (2015). Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products* *74*, 440–449.
33. Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* *8*, 881–890.
34. Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* *15*, 167–193.
35. Eidi, S., Azadi, H.G., Rahbar, N., and Mehmannaavaz, H.R. (2015). Evaluation of antifungal activity of hydroalcoholic extracts of *Citrullus colocynthis* fruit. *Journal of Herbal Medicine* *5*, 36–40.
36. El Enshasy, H.A., and Hatti-Kaul, R. (2013a). Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends in Biotechnology* *31*, 668–677.
37. Emge, P., Moeller, J., Jang, H., Rusconi, R., Yawata, Y., Stocker, R., and Vogel, V. (2016). Resilience of bacterial quorum sensing against fluid flow. *Scientific Reports* *6*.
38. Farjon, A. (2010). *A Handbook of the World's Conifers* (2 vols.) (Brill).
39. Federle, M.J., and Bassler, B.L. (2003). Interspecies communication in bacteria. *Journal of Clinical Investigation* *112*, 1291–1299.
40. Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., El Amine, M., Djabou, N., Muselli, A., Tabti, B., and Costa, J. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* *4*, 97–103.
41. Figueiredo, A.M.S., Ferreira, F.A., Beltrame, C.O., and Côrtes, M.F. (2017). The role of biofilms in persistent infections and factors involved in *ica* -independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Critical Reviews in Microbiology* *43*, 602–620.
42. Filloux, A., and Vallet, I. (2003). Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Médecine/Sciences* *19*, 77–83.

43. Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010a). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8, 623–633.
44. Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010b). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633.
45. Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* 14, 563–575.
46. Ganatsas, P., and Spanos, I. (2007). Root system asymmetry of Mediterranean pines. In *Eco- and Ground Bio-Engineering: The Use of Vegetation to Improve Slope Stability*, (Springer), pp. 127–134.
47. Gargano, M.L., Bella, P., Panno, S., Arizza, V., Inguglia, L., Catara, V., Venturella, G., and Davino, S. (2017a). Antimicrobial activity of the extracts of *terfezia claveryi* and *tirmania pinoyi* against gram-positive and gram-negative bacteria causal agent of diseases in tomato. *Chemical Engineering Transactions* 73–78.
48. Gargano, M.L., Bella, P., Panno, S., Arizza, V., Inguglia, L., Catara, V., Venturella, G., and Davino, S. (2017b). Antimicrobial activity of the extracts of *terfezia claveryi* and *tirmania pinoyi* against gram-positive and gram-negative bacteria causal agent of diseases in tomato. *Chemical Engineering Transactions* 73–78.
49. Garnier, F., and Denis, F. (2007). *Bactériologie médicale: Techniques usuelles: Cocci à Gram positif*. Masson. Chapitre 29, 254.
50. Goetz , C., Dufour , S., Archambault, M., Malouin, F., and Jacques , M. (2016). intra-mammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique. *Revue Méd. Vét.* 14.
51. Gupta, D., Dubey, J., and Kumar, M. (2016a). Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected common human pathogenic microorganisms. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 6, 15–20.
52. Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., and Tribedi, P. (2016b). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology* 198, 1–15.
53. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2, 95.
54. Hamrouni, L., Hanana, M., Amri, I., Romane, A.E., Gargouri, S., and Jamoussi, B. (2015). Allelopathic effects of essential oils of *Pinus halepensis* Miller: chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 48, 145–158.
55. Hashim, S., Jan, A., Marwat, K.B., and Khan, M.A. (2014). Phytochemistry and medicinal properties of *Ammi visnaga* (Apiaceae). *Pak J Bot* 46, 861–867.
56. Hennekinne, J., and Le Loir, Y. (2014). *Staphylococcus: Detection by Cultural and Modern Techniques*.

57. Henry, V.A., Jessop, J.L.P., and Peeples, T.L. (2017). Differentiating *Pseudomonas* sp. strain ADP cells in suspensions and biofilms using Raman spectroscopy and scanning electron microscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409, 1441–1449.
58. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35, 322–332.
59. Hola, V., and Ruzicka, F. (2011). The formation of poly-microbial biofilms on urinary catheters. In *Urinary Tract Infections*, (InTech), p.
60. Hoshyar, R., Mahboob, Z., and Zarban, A. (2016). The antioxidant and chemical properties of *Berberis vulgaris* and its cytotoxic effect on human breast carcinoma cells. *Cytotechnology* 68, 1207–1213.
61. Hussain, M.S., and Oh, D.H. (2017). Substratum attachment location and biofilm formation by *Bacillus cereus* strains isolated from different sources: Effect on total biomass production and sporulation in different growth conditions. *Food Control* 77, 270–280.
62. Hussain, A.I., Rathore, H.A., Sattar, M.Z.A., Chatha, S.A.S., Sarker, S.D., and 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, 54–66.
63. Imenshahidi, M., and Hosseinzadeh, H. (2016). *Berberis Vulgaris* and Berberine: An Update Review: *Berberis Vulgaris* and Berberine. *Phytotherapy Research* 30, 1745–1764.
64. Irie, Y., and Parsek, M.R. (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. In *Bacterial Biofilms*, (Springer), pp. 67–84.
65. Jahantighi¹, A., Kiani¹, G., Moghaddam, T.T., and Ghahari, S. (2016). In Vitro Antibacterial Activity of Selected Medicinal Plants Traditionally Used in Iran Against Plant and Human Pathogenic Bacteria. [Http://Jjbs. Hu. Edu. Jo 4221](http://Jjbs. Hu. Edu. Jo 4221).
66. Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., and Kamil, M.A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* 81, 7–11.
67. Janissen, R., Murillo, D.M., Niza, B., Sahoo, P.K., Nobrega, M.M., Cesar, C.L., Temperini, M.L.A., Carvalho, H.F., de Souza, A.A., and Cotta, M.A. (2015). Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. *Scientific Reports* 5.
68. Kadri, N., Khettal, B., Aid, Y., Kherfellah, S., Sobhi, W., and Barragan-Montero, V. (2015). Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents. *Food Chemistry* 188, 184–192.
69. Kaplan, J.B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research* 89, 205–218.
70. Keddad, A., Baaliouamer, A., and Hazzit, M. (2016). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from Umbels of Algerian *Ammi visnaga* (L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 19, 1243–1250.

71. Khalfallah, A., Labeled, A., Semra, Z., Alkaki, B., Kabouche, A., Touzani, R., and Kabouche, Z. (2011). Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Ammi visnaga* L.(Apiaceae) from Constantine, Algeria. *International Journal of Medicine and Aromatic Plant* 1, 302–305.
72. Khattak, M.I., HAMEED, R.J.M., and ARFAT, Y. (2015). A study of some heavy metals found in medicinal plants (*Euphorbia cornigera*, *Rhazya stricta* and *Citrullus colocynthis*) in Turbat region of Balochistan with reference to prevention of environmental pollution. *Pak. J. Bot* 47, 1511–1516.
73. Kim, S.J., Chang, J., Rimal, B., Yang, H., and Schaefer, J. (2018). Surface proteins and the formation of biofilms by *Staphylococcus aureus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860, 749–756.
74. Kloos, W.E. (1999). *Staphylococcus and micrococcus*. *Manual of Clinical Microbiology*.
75. Koo, H., Allan, R.N., Howlin, R.P., Stoodley, P., and Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology* 15, 740–755.
76. Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., and Hultgren, S.J. (2013). Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3, a010306–a010306.
77. Kouidhi, B., Al Qurashi, Y.M.A., and 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.
78. Kumar, C.G., and Anand, S.. (1998a). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42, 9–27.
79. Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N.Z., and Hasnain, S.E. (2017). Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 307, 481–489.
80. Lawrence, J.R., Scharf, B., Packroff, G., and Neu, T.R. (2002). Microscale Evaluation of the Effects of Grazing by Invertebrates with Contrasting Feeding Modes on River Biofilm Architecture and Composition. *Microbial Ecology* 44, 199–207.
81. Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., and Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers* 4, 18033.
82. Li, X. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* 149, 353–362.
83. Lindberg, E., Adlerberth, I., Matricardi, P., Bonanno, C., Tripodi, S., Panetta, V., Hesselmar, B., Saalman, R., Åberg, N., and Wold, A. (2011). Effect of lifestyle factors on *Staphylococcus aureus* gut colonization in Swedish and Italian infants. *Clinical Microbiology and Infection* 17, 1209–1215.

84. Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., and Wozniak, D.J. (2009). Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS Pathogens* 5, e1000354.
85. Mahendiran, M., and Umavathi, S. (2015). In vitro antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* (Linn.) against selected microorganisms. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 4, 60–69.
86. Mahmoudvand, H., Ayatollahi Mousavi, S.A., Sepahvand, A., Sharififar, F., Ezatpour, B., Gorohi, F., Saedi Dezaki, E., and Jahanbakhsh, S. (2014). Antifungal, Antileishmanial, and Cytotoxicity Activities of Various Extracts of *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) and Its Active Principle Berberine. *ISRN Pharmacology* 2014, 1–6.
87. Mahmoudvand, H., Tavakoli Kareshk, A., Keyhani, A., Zia-Ali, N., and Aflatoonian, M.R. (2017). In vivo evaluation of *Berberis vulgaris* extract on acute toxoplasmosis in mice. *Marmara Pharmaceutical Journal* 21, 558–558.
88. Maisonneuve, E., and Gerdes, K. (2014). Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell* 157, 539–548.
89. Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., and Herman, L. (2012). Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11, 133–147.
90. Maris, P. (1992). Biofilms and disinfection. Development of a microorganism carrier-surface method. *Sciences Des Aliments* (France).
91. Mathur, H., Field, D., Rea, M.C., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2018). Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *Npj Biofilms and Microbiomes* 4, 9.
92. Mauri, A., Di Leo, M., de Rigo, D., and Caudullo, G. (2016). *Pinus halepensis* and *Pinus brutia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *European Atlas of Forest Tree Species* e0166b6.
93. McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., and Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* 10, 39–50.
94. Mogha, K.V., Shah, N.P., Prajapati, J.B., and Chaudhari, A.R. (2014). Biofilm-A threat to dairy industry. *Indian J. Dairy Sci* 67.
95. Mohammadzadeh, N., Mehri, S., and Hosseinzadeh, H. (2017). *Berberis vulgaris* and its constituent berberine as antidotes and protective agents against natural or chemical toxicities. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*.
96. Moormeier, D.E., and Bayles, K.W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism: *Molecular mechanisms of S. aureus biofilm development*. *Molecular Microbiology* 104, 365–376.
97. Moormeier, D.E., Bose, J.L., Horswill, A.R., and Bayles, K.W. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *MBio* 5, e01341-14.

98. Mootz, J.M., Benson, M.A., Heim, C.E., Crosby, H.A., Kavanaugh, J.S., Dunman, P.M., Kielian, T., Torres, V.J., and Horswill, A.R. (2015). Rot is a key regulator of *S taphylococcus aureus* biofilm formation: Rot regulates *S . aureus* biofilm formation. *Molecular Microbiology* 96, 388–404.
99. Moreira, F., Arianoutsou, M., Vallejo, V.R., de las Heras, J., Corona, P., Xanthopoulos, G., Fernandes, P., and Papageorgiou, K. (2012). Setting the scene for post-fire management. In *Post-Fire Management and Restoration of Southern European Forests*, (Springer), pp. 1–19.
100. Nandagoapalan, V., Doss, A., and Marimuthu, C. (2016). Phytochemical analysis of some traditional medicinal plants. *Bioscience Discovery* 7, 17–20.
101. Neggaz, S., Fortas, Z., Chenni, M., Abed, D.E., Ramli, B., and Kambouche, N. (2015a). In vitro evaluation of antioxidant, antibacterial and antifungal activities of *Terfezia claveryi* Chatin. *Phytothérapie* 1–7.
102. Neggaz, S., Fortas, Z., Chenni, M., Abed, D.E., Ramli, B., and Kambouche, N. (2015b). In vitro evaluation of antioxidant, antibacterial and antifungal activities of *Terfezia claveryi* Chatin. *Phytothérapie* 1–7.
103. Nostro, A., Germano, M., D'angelo, V., Marino, A., and Cannatelli, M. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology* 30, 379–384.
104. O'Toole, G.A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*.
105. Otto, M. (2013). Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annual Review of Medicine* 64, 175–188.
106. Owaid, M.N. (2017a). Bioecology and Uses of Desert Truffles (Pezizales) in the Middle East. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)* 15, 179–188.
107. Owaid, M.N. (2017b). Bioecology and Uses of Desert Truffles (Pezizales) in the Middle East. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)* 15, 179–188.
108. Paharik, A.E., and Horswill, A.R. (2016a). The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. In *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, Fifth Edition, I.T. Kudva, N.A. Cornick, P.J. Plummer, Q. Zhang, T.L. Nicholson, J.P. Bannantine, and B.H. Bellaire, eds. (American Society of Microbiology), pp. 529–566.
109. Paharik, A.E., and Horswill, A.R. (2016b). The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. In *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, Fifth Edition, I.T. Kudva, N.A. Cornick, P.J. Plummer, Q. Zhang, T.L. Nicholson, J.P. Bannantine, and B.H. Bellaire, eds. (American Society of Microbiology), pp. 529–566.
110. Pane, G., Coppo, E., Cacciola, G., Giacco, E., Mariottini, G., and Marchese, A. (2015). Antimicrobial activity of algae extracts against bacteria isolated from ear swabs. *Journal of Biological Research* 88, 111.
111. Papenfort, K., and Bassler, B.L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 14, 576–588.

112. Pâques, L.E. (2013). Forest tree breeding in Europe: current state-of-the-art and perspectives (Springer Science & Business Media).
113. Parsek, M.R., and Singh, P.K. (2003). Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annual Review of Microbiology* 57, 677–701.
114. Peeters, E., Nelis, H.J., and Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* 72, 157–165.
115. Queck, S., Weitere, M., Moreno, A.M., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2006). The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environmental Microbiology* 8, 1017–1025.
116. Rahimi-Madiseh, M., Lorigoini, Z., Zamani-gharaghoshi, H., and Rafieian-kopaei, M. (2017). *Berberis vulgaris*: specifications and traditional uses. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*.
117. Rakholiya, K., Kaneria, M., Desai, D., and Chanda, S. (2013). Antimicrobial activity of decoction extracts of residual parts (seed and peels) of *Mangifera indica* L. var. Kesar against pathogenic and food spoilage microorganism. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*. FORMATEX 850–856.
118. Rebiahi S.A. (2012). caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen .
119. Rebrošová, K., Šiler, M., Samek, O., Růžička, F., Bernatová, S., Holá, V., Ježek, J., Zemánek, P., Sokolová, J., and Petráš, P. (2017). Rapid identification of staphylococci by Raman spectroscopy. *Scientific Reports* 7.
120. Ren, Y., Wang, C., Chen, Z., Allan, E., van der Mei, H.C., and Busscher, H.J. (2018). Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. *FEMS Microbiology Reviews*.
121. Saeidnia, S., Gohari, A., Kurepaz-Mahmoodabadi, M., and Mokhber-Dezfuli, N. (2014). Phytochemistry and Pharmacology of *Berberis* Species. *Pharmacognosy Reviews* 8, 8.
122. Sahu, B., Rathinam, A., Javid, M.A., and Gupta, S. (2017). Preparation of fatliquor having antifungal activity using the oil of *Citrullus colocynthis* for application in leather processing. *Industrial Crops and Products* 108, 553–557.
123. Sahukhal, G.S., Batte, J.L., and Elasri, M.O. (2015). *msaABCR* operon positively regulates biofilm development by repressing proteases and autolysis in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 362, 1–10.
124. Shahid, T., Memon, M., Malik, R.A., Ikram, N., Malik, W., and Ali, A. (2017). A study of Antimicrobial Activity of *Berberis vulgaris* (Zirishk) Aqueous Plant Extract using Pathogenic Isolates from Patients of Islamabad and Rawalpindi. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research* 3.
125. Shaw, T., Winston, M., Rupp, C.J., Klapper, I., and Stoodley, P. (2004). Commonality of Elastic Relaxation Times in Biofilms. *Physical Review Letters* 93.

126. Shawkey, A.M., Rabeh, M.A., and Abdellatif, A.O. (2014). Biofunctional molecules from *Citrullus colocynthis*: An HPLC/MS analysis in correlation to antimicrobial and anticancer activities.
127. Shawky, A., Abdulaal, A., Rabeh, M., and Abdellatif, A. (2014). Enhanced biocidal activities of *Citrullus colocynthis* aqueous extracts by green nanotechnology. *International Journal of Applied Research in Natural Products* 7, 1–10.
128. Shimizu, T., and Harada, K. (2017). Determination of minimum biofilm eradication concentrations of orbifloxacin for canine bacterial uropathogens over different treatment periods: MBECs of OBFX for canine uropathogens. *Microbiology and Immunology* 61, 17–22.
129. Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T.J., and Geoghegan, J.A. (2014). Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4, 171.
130. Stewart, P.S., and Franklin, M.J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 6, 199–210.
131. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology* 56, 187–209.
132. Sugimoto, S., Sato, F., Miyakawa, R., Chiba, A., Onodera, S., Hori, S., and Mizunoe, Y. (2018a). Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports* 8.
133. Sugimoto, S., Sato, F., Miyakawa, R., Chiba, A., Onodera, S., Hori, S., and Mizunoe, Y. (2018b). Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports* 8, 2254.
134. Sutherland, I. (2001a). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* 9, 222–227.
135. Sutherland, I.W. (2001b). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* 9, 222–227.
136. Tabeshpour, J., Imenshahidi, M., and Hosseinzadeh, H. (2017). A review of the effects of *Berberis vulgaris* and its major component, berberine, in metabolic syndrome. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*.
137. Teanpaisan, R., Kawsud, P., Pahumunto, N., and Puripattanavong, J. (2017). Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7, 172–177.
138. Teka, A., Rondevaldova, J., Asfaw, Z., Demissew, S., Van Damme, P., Kokoska, L., and Vanhove, W. (2015). In vitro antimicrobial activity of plants used in traditional medicine in Gurage and Silti Zones, south central Ethiopia. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15.
139. Travaini, M.L., Sosa, G.M., Ceccarelli, E.A., Walter, H., Cantrell, C.L., Carrillo, N.J., Dayan, F.E., Meepagala, K.M., and Duke, S.O. (2016). Khellin and Visnagin,

- Furanochromones from *Ammi visnaga* (L.) Lam., as Potential Bioherbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 9475–9487.
140. Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., and Jacques, M. (2014). [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health]. *Can. J. Vet. Res.* 78, 110–116.
141. Tribedi, P., and Sil, A.K. (2014). Cell surface hydrophobicity: a key component in the degradation of polyethylene succinate by *Pseudomonas* sp. AKS2. *Journal of Applied Microbiology* 116, 295–303.
142. Ultee, A., Bennik, M., and 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, 1561–1568.
143. Vasudevan, R. (2014). Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. *Journal of Microbiology & Experimentation* 1.
144. Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., and 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, 317–323.
145. Warren, P., Quist, T., Schuch, U., Erickson, C., Celaya, B., and Richardson, J. (2015). Pine Engraver Beetles in the Low Elevation Sonoran Desert in Tucson.
146. Wijman, J.G.E., de Leeuw, P.P.L.A., Moezelaar, R., Zwietering, M.H., and Abee, T. (2007). Air-Liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation, and Dispersion. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1481–1488.
147. Wikaningtyas, P., and Sukandar, E.Y. (2016). The antibacterial activity of selected plants towards resistant bacteria isolated from clinical specimens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6, 16–19.
148. Winderl, B., Schwaiger, S., and Ganzera, M. (2016). Fast and improved separation of major coumarins in *Ammi visnaga* (L.) Lam. by supercritical fluid chromatography: Other Techniques. *Journal of Separation Science* 39, 4042–4048.
149. Wu, D., Fan, W., Kishen, A., Gutmann, J.L., and Fan, B. (2014). Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Journal of Endodontics* 40, 285–290.
150. Wu, H., Moser, C., Wang, H.-Z., Høiby, N., and Song, Z.-J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science* 7, 1–7.
151. Ymele-Leki, P., and Ross, J.M. (2007). Erosion from *Staphylococcus aureus* Biofilms Grown under Physiologically Relevant Fluid Shear Forces Yields Bacterial Cells with Reduced Avidity to Collagen. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1834–1841.
152. Zitouni-Haouar, F.E.-H., Fortas, Z., and Chevalier, G. (2014). Morphological characterization of mycorrhizae formed between three *Terfezia* species (desert truffles) and several *Cistaceae* and Aleppo pine. *Mycorrhiza* 24, 397–403.

Annexes

Annexes 01 : Liste des réactifs et milieux de culture

- Cristal violet

Eau distillée	100 ml
Cristal violet	0.5 g

- Eau physiologique

Eau distillée	1000 ml
NaCl	1g

- Gélose nutritive

Eau distillée	1000 ml
Gélose nutritive	18 g

- Muller-Hinton

Eau distillée	1000 ml
Muller-Hinton	38 g

- Gélose au sang

Eau distillée	100 ml
Gélose à base du sang	24 g
Sang	6 ml

- Chapman

Eau distillée	1000 ml
Chapman	35.5 g

- DMSO à 1%

Eau distillée	100ml
DMSO pure	1ml

- TSA (Tryptic Soy Agar)

Composants	Quantité (g/l)
Hydrolysate enzymatique de la caséine	17 g/l
Peptone de soja	3 g/l
D-glucose	2,5 g/l
Chlorure de sodium	5 g/l
Hydrogénophosphate	2,5 g/l

pH : 7,3 ±0,2

- TSB (Bouillon tryptic soy broth)

Composants	Quantité (g/l)
Tryptone	17 g/l
Soytone	3 g/l
Glucose (Dextrose)	2,5 g/l
Chlorure de sodium	1 g/l
Hydrogénophosphate bipostassique	2,5 g/l

pH : 7,3 ±0,2

Annexe 02 : Tableaux des résultats

Tableau 05 : Profil biochimique de la souche S2

Tests	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
profil	+	+	+	+	·	+	+	·	·	+	+	+	·	·	+	·	+	+	·

Tableau 07 : Effet de quelques antibiotiques sur la croissance bactérienne de *S. aureus* ,
B.cereus et *B.subtilis* .

Antibiotiques	Souches	Diamètres d'inhibition (mm)
Gentamycine	BS	25
	BR	25
	S13	30
	P53	26
	Sar	26
Vancomycine	BS	20
	BR	15
	S13	23
	P53	18
Oxacilline	Sar	-
Ampicilline	Sar	-