

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie Alimentaire et santé



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de la formation de biofilm par des
souches de *Streptococcus* et de
Lactobacillus et de l'effet antiadhésif
d'extraits de plantes locales**

Présenté par :

MATOUH Soumeïa & OUFRICHE Souad

Soutenu le : 21 Juin 2017

Devant le jury composé de :

Mme SOUAGUI S.	MAA	Présidente
Melle BENDALI F.	MCA	Encadreur
Mme TITELI F.	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2016/2017.

Remerciements

Avant tous nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a accordé la santé, le courage, la volonté et la patience de réaliser ce travail.

Nos remerciements les plus distingués vont à notre enseignante et promotrice Dr. BENDALI F., maitre de conférences A et Vice Doyen chargée de la PGRSRE à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie pour son encadrement, son aide, ses orientations et ses conseils tout au long de la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

Nos amples et sincères remerciements vont à M^{me} SOUAGUI S. qui nous a fait l'honneur d'examiner et d'évaluer ce travail en sa qualité de présidente de jury.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à M^{me} TETILI F. d'avoir consacré son précieux temps à examiner ce manuscrit.

Nous remercions très chaleureusement M^{me} JDIR Fouzia, doctorante au Laboratoire de Microbiologie Appliquée pour l'aide qu'elle nous a porté, son encouragement et son soutien, ses conseils et astuces qui nous ont permis d'accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier également l'équipe, doctorants et ingénieurs du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, pour leur aide, leur gentillesse et surtout leur compréhension.

Enfin, nous n'oublions pas de dire merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci à tous

Dédicaces

Ce travail est dédié à:

Mes très chers parents. Que Dieu les garde pour moi.

Ma grand-mère et mon grand-père.

Mes sœurs, cousins et cousines.

Mes oncles et tantes.

Mes ami (e)s

A toute la promotion Microbiologie Alimentaire et Santé 2016/2017.

A tous ceux qui me sont chers.

Souad

Dédicaces

Je dédie ce travail à:

*Mon père et ma mère, avec mes prières qu'ils soient
toujours à mes cotés.*

Mes grands parents.

Mon frère et mes sœurs.

Mes cousins et cousines.

Toute ma famille.

Mes ami (e)s.

*A la promotion Microbiologie Alimentaire et Santé
2016/2017.*

Soumeïa

Liste des abréviations

A: absorbance

BHI: brain heart infusion

DMSO: dimethyl sulfoxide

DO: densité optique

FAO: Food and Agriculture Organization

OMS: Organisation mondiale de la santé

TS : tryptone sel

UFC : unité formant colonie

Liste des figures

Figure 1 : Les cinq étapes de formation de biofilm	5
Figure 2 : Protocole d'extraction aqueuse par macération	11
Figure 3 : Protocole d'extraction éthanoïque par macération	12
Figure 4 : Protocole d'extraction aqueuse par décoction	13
Figure 5 : Effet des extraits de plantes sur les cellules planctoniques.	17
Figure 6 : Effet antiadhésif des extraits aqueux obtenus par décoction sur les souches de <i>Streptococcus</i> et de <i>Lactobacillus</i>	18
Figure 7 : Effet antiadhésif des extraits aqueux obtenus par macération sur les souches de <i>Streptococcus</i> et de <i>Lactobacillus</i>	18
Figure 8 : Effet antiadhésif des extraits éthanoïques sur les souches de <i>Streptococcus</i> et de <i>Lactobacillus</i>	21
Figure 9 : Effet anti-biofilm des extraits végétaux sur les souches de <i>Streptococcus</i> et de <i>Lactobacillus</i>	22

Liste des tableaux

Tableau I : Exemples d'études montrant les activités antimicrobiennes des polyphénols..	9
Tableau II . Volume de solvant d'extraction utilisé.....	11

Sommaire

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Partie 1 : Synthèse bibliographique

I- Généralités sur les biofilms.....	4
I-1- Historique	4
I-2- Définition.....	4
I-3- Étapes de formation d'un biofilm.....	4
II- Généralités sur les streptocoques.....	5
II-1- Taxonomie.....	5
II-2- Morphologie	6
II-3- Caractères généraux	6
II-4- Habitat	6
III- Généralités sur les lactobacilles	6
III-1- Taxonomie	6
III-2- Morphologie.....	6
III-3- Caractères généraux	7
III-4- Habitat.....	7
III-5- Rôle probiotique des lactobacilles	7
IV- Généralités sur les extraits de plantes	8

Partie 2 : Matériel et méthodes

I- Matériel biologique.....	10
I-1- Souches bactériennes.....	10
I-2- Matériel végétal	10

II- Etude de l'activité antibactérienne des extraits végétaux.....	10
II-1- Revivification et vérification de la pureté des souches.....	10
II-2- Préparation des cultures fraîches et standardisation des <i>inocula</i>	10
II-3- Préparation des extraits	11
II-3-1-Extraction aqueuse par macération	11
II-3-2-Extraction éthanoïque	12
II-3-3- Extraction aqueuse par décoction	12
II-4- Activité antibactérienne sur cellules planctoniques (milieu liquide)	13
II-5- Activité antiadhésive des extraits de plantes	14
II-5-1- Activité anti-formation de biofilm.....	14
II-5-1- Activité dispersante du biofilm	14

Partie 3 : Résultats et discussion

I-Revivification et contrôle de la pureté.....	16
II-Standardisation de l' <i>inoculum</i>	16
III- Activité antibactérienne sur cellules planctoniques (milieu liquide)	16
IV- Activité antiadhésive des extraits de plantes.....	17
IV-1- Activité anti-formation de biofilm.....	17
IV-1-1 Étude de la capacité d'adhésion des souches de <i>Lactobacillus</i> et de <i>Streptococcus</i>	19
IV-1-2 Étude de l'activité anti-formation de biofilms des extraits de plantes.....	20
IV-2- Activité dispersante du biofilm.....	22
Conclusion	24

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Les bactéries peuvent se trouver dans la nature sous deux formes : soit des bactéries planctoniques librement flottantes ou des colonies sessiles de microorganismes formant des biofilms (**Zobell et Meyer, 1931**). Plusieurs espèces bactériennes sont capables de développer des biofilms parmi lesquelles nous pouvons citer les streptocoques (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*...) (**Merritt et al., 2002**, **Moscoso et al., 2006**) et quelques espèces de *Lactobacillus* produisent *in vitro* un biofilm protecteur épais (**Vontolini, 2015**).

Des membres du genre *Streptococcus* sont d'importants agents pathogènes humains et leur capacité d'atteindre des charges élevées peut être due à la formation de biofilms dans les zones confinées du corps, comme les cryptes amygdaliennes. *Streptococcus mutans*, le principal agent étiologique des caries dentaires, fournit un exemple notable de la formation de biofilms complexes par le microbiote oral (**Cvitkovitch et al., 2003**). Par contre, les communautés des biofilms des tractus gastro-intestinal et urogénital féminin contenant des Lactobacilles bénéfiques peuvent avoir un rôle protecteur (**Saunders et al., 2007**).

Les Streptocoques du groupe A (GAS) sont des agents pathogènes spécifiques à l'homme responsables d'un certain nombre de maladies caractérisées par un large éventail de manifestations cliniques. (**Oliver-Kozup et al; 2011**)

Streptococcus pyogenes peut coloniser la gorge ou la peau et peut causer un certain nombre d'infections suppuratives et de séquelles non-suppuratives. Cette espèce est la cause la plus fréquente de la faringite bactérienne, de l'impétigo et de la scarlatine ainsi que de l'érysipèle et d'autres infections répandues. Les streptocoques du groupe A ont été jugés responsables de la fasciite nécrosante associée aux streptococcies et du choc toxique streptococcique. Les séquelles post-streptococciques associées à cet organisme comprennent la fièvre rhumatismale aiguë, la glomérulonéphrite et l'arthrite réactive. Les streptocoques du groupe A ont également été associés au syndrome de Tourette, aux tiques et aux troubles du mouvement et de l'attention (**Cunningham, 2000**).

La structure spécifique des biofilms fournit un haut niveau de résistance aux antibiotiques, aux désinfectants et aux détergents (**Closteron et al., 1999 ; Stewart et Closteron, 2001; Stewart et Franklin, 2008**). Les bactéries englobées dans les biofilms sont plus résistantes à l'action des agents biocides que les bactéries planctoniques (**Ceri et**

al., 1999). Par exemple, il a été rapporté que la concentration minimale d'antibiotiques nécessaire pour tuer les bactéries en biofilm est d'environ 100 à 1000 fois supérieure à celle observée pour leurs homologues planctoniques (**Stewart et Closteron, 2001**).

Les échecs thérapeutiques et les coûts de plus en plus élevés des traitements des infections dues aux bactéries résistantes appellent à trouver d'autres alternatives de soins (**Toty et al., 2013**). Les produits d'origine végétale sont parmi ces agents alternatifs, explorés dans le but de remplacer les antibiotiques conventionnels (**Immanuel et al., 2004; Shahidi-Bonjar, 2004**).

Diverses études ont montré des activités antimicrobiennes de divers extraits végétaux (**Pandey et al., 2010 ; Kumar et Pandey, 2012**). En effet, les plantes ont été utilisées depuis des siècles comme remèdes par l'Homme car elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Ce sont des sources naturelles d'agents antimicrobiens principalement en raison de leur grande biodiversité et de la quantité relativement importante de métabolites qui peuvent y être extraits (**Copp, 2003**).

A titre d'exemple, il a été rapporté que l'extrait de feuilles de *Bauhinia purpurea* (Orchidée) a un potentiel antibactérien, de sorte que cette plante pourrait potentiellement être utilisée dans le traitement des maladies infectieuses causées par diverses bactéries résistantes aux antibiotiques (**Bhawna et al., 2012**). De même, l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* (Haronga) exerce une activité antibactérienne vis-à-vis de nombreuses souches multi résistantes (**Toty et al., 2013**).

En Algérie, une grande variété d'espèces végétales est susceptible d'être utilisée dans des applications médicinales (**Ziani et al., 2015**). Par exemple, les extraits flavonoïques de *Marrubium vulgare* L (Marrube commun). en provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale) ont été démontrés exerçant des effets antibactériens et antifongiques importants (**Bouterfas et al., 2014**).

Taheri et al. (2013) ont montré l'effet antibactérien de l'extrait hydroalcoolique des feuilles du Myrte sur certaines souches pathogènes en particulier *Staphylococcus aureus* et *Vibrio cholerae*. **Mansouri et al. (2001)** ont également mis en évidence l'activité antibactérienne de nombreux extraits et huiles essentielles du Myrte à l'égard, entre autres, de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus agalactiae*, en associant cette activité à la richesse de la plante en de nombreux composés bioactifs.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui vise la détermination de la capacité de formation de biofilms par des souches de *Lactobacillus* et de *Streptococcus* et d'évaluer l'efficacité d'une variété d'extraits de plantes locales dans la prévention et l'éradication du biofilm à *Streptococcus* tout en testant leurs effets sur la flore bénéfique en l'occurrence les lactobacilles.

Le document est structuré en deux parties, une partie bibliographique relative au sujet et une partie pratique dans laquelle les protocoles utilisés seront décrits suivis des résultats obtenus, de leur interprétation et des conclusions et perspectives auxquelles ils nous ont amenés.

***Partie 1 : Synthèse
Bibliographique***

I- Généralités sur les biofilms

I-1- Historique

Au XVII^e siècle et grâce à un microscope de son invention, Antone Van Leeuwenhoek mit en évidence la présence d'organismes microscopiques à la surface de ses dents. En 1943, Claude Zobell montre que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension. Enfin, dans les années 1980, les travaux de William Costerton mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines. Ces populations présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales ou animales, sont appelées biofilms (**Roux et Ghigo, 2006**).

I-2- Définition

Les biofilms microbiens sont une population naturelle de microorganismes intégrés dans une matrice visqueuse protectrice composée de divers types de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques et de lipides de synthèse microbienne (**Flemming et Wingerfer, 2010**).

I-3- Étapes de formation d'un biofilm

Stoodley et al. (2002) décrivent le développement d'un biofilm comme un processus en cinq étapes (figure 1):

- étape 1: fixation initiale réversible des cellules à la surface,
- étape 2: production d'EPS résultant en une fixation "irréversible" plus fermement adhéree,
- étape 3: développement précoce de l'architecture du biofilm,
- étape 4: maturation de l'architecture du biofilm,
- étape 5: dispersion de cellules uniques du biofilm.

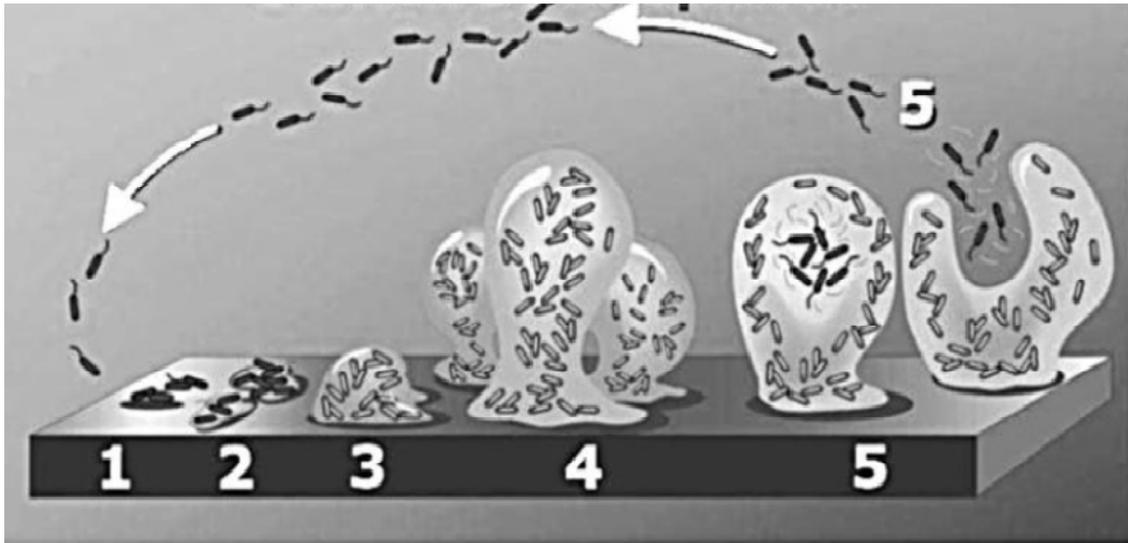


Figure 1 : Les cinq étapes de formation de biofilm (Stoodley *et al.*, 2002)

Lorsque les bactéries sont au voisinage d'une surface, des forces d'attraction physico-chimiques interviennent et conduisent à une interaction réversible avec la surface. Dans un second temps, à mesure que les cellules se divisent, le nombre de bactéries associées à la surface augmente et l'adhésion devient irréversible. Cette transition vers une adhésion irréversible correspond à la synthèse de structures à la surface de la bactérie, qui s'accompagne d'une profonde modification du profil d'expression des gènes (Schembri *et al.*, 2003; Beloin *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2004).

La troisième étape est caractérisée par la formation de microcolonies composées à la fois des bactéries initiales qui se divisent et de bactéries qui s'attachent sur le biofilm en formation. Le stade de maturation correspond au développement des microcolonies et à la structuration du biofilm. Les espaces séparant les microcolonies deviennent les canaux du biofilm à l'intérieur desquels les fluides nutritifs peuvent circuler. Certaines bactéries peuvent se détacher du biofilm mature et rentrer dans la phase de dissémination. Cette dernière étape permet la colonisation de nouvelles surfaces (Roux et Ghigou, 2006).

II- Généralités sur les Streptocoques

II-1- Taxonomie

Le genre *Streptococcus* fait partie du domaine des *Bacteria*, phylum des Firmicutes, famille des *Streptococcaceae*, ordre des *Lactobacillales* et classe des *Bacilli* (Bergey's Manual, 2011).

II-2- Morphologie

Les cellules de *Streptococcus* sont en général sphériques ou ovoïdes, de moins de 2 µm de diamètre, se présentant en chaînettes ou en paires lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux liquides (Schleifer et Kandler, 1972).

II-3- Caractères généraux

Les cellules sont non mobiles, non sporulées, à Gram positif, pratiquement toutes les espèces sont anaérobies facultatives, certaines nécessitant du CO₂ supplémentaire pour leur croissance. Elles sont chimio-organotrophes avec un métabolisme fermentaire, les glucides sont fermentés pour produire principalement de l'acide lactique mais pas de gaz. Elles sont à catalase négative et leurs besoins nutritionnels sont complexes et variables (Schleifer et Kandler, 1972).

II-4- Habitat

Les streptocoques sont associés aux animaux, y compris l'Homme, et aux oiseaux à sang chaud. La plupart des espèces peuvent être considérées comme commensales, se situant généralement sur les surfaces muqueuses dans la cavité buccale, les voies respiratoires supérieures et le tractus gastro-intestinal, et dans des conditions appropriées, elles peuvent causer des infections localisées ou systémiques (Jenkinson et Lemont, 1997).

III- Généralités sur les lactobacilles

III-1- Taxonomie

Les espèces de *Lactobacillus* font partie du domaine des *Bacteria*, phylum des Firmicutes, famille des *Lactobacillaceae*, ordre des *Lactobacillales* et la classe des *Bacilli* (Bergey's Manual, 2011).

III-2- Morphologie

La morphologie des Lactobacilles varie de bacilles longs, droits ou légèrement incurvés aux coccobacilles corynéformes. La longueur des bacilles et le degré de courbure dépend de l'âge de la culture et de la composition du milieu (Jacques et al., 1980).

III-3- Caractères généraux

Les lactobacilles font partie du groupe des bactéries lactiques et par conséquent elles sont à Gram positif, asporulés, ne possédant ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase, chimio-organotrophes et très exigeantes du point de vue nutritionnel (**Dellaglio et al., 1994**).

III-4- Habitat

Les lactobacilles sont des bactéries ubiquistes présentes en quantités infimes sur les surfaces végétales mais elles s'y développent rapidement lorsque celles-ci sont abîmées. Les lactobacilles colonisent aussi l'Homme et les animaux. Chez la femme, *Lactobacillus jensenii*, *L. crispatus* et *L. gasseri* composent généralement la population dominante de la flore vaginale et assurent un rôle de protection vis-à-vis des infections. *L. ruminis*, *L. gasseri*, *L. reuteri* et *L. salivarius* sont les espèces les plus fréquentes trouvées en population sous-dominante dans la flore colique humaine (*L. acidophilus* chez le nouveau-né) alors que *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* et *L. paracasei* colonisent les muqueuses buccale et rectale (**Tailliez, 2004**).

III-5- Rôle probiotique des lactobacilles

La FAO et l'OMS définissent les probiotiques comme étant «des microorganismes vivants, qui une fois consommés en des quantités adéquates en tant que partie d'un aliment, confèrent un bienfait pour la santé de l'hôte» (**FAO/OMS, 2001**).

Les probiotiques les plus fréquemment étudiés sont des espèces de *Lactobacillus*, incluant *L. rhamnosus* (GG), *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii* et *L. reuteri* (**Saavedra, 2007**). Ces bactéries en colonisant les différentes surfaces biotiques (muqueuses colique, buccale, vaginale) peuvent exercer un effet protecteur contre l'installation de la flore pathogène. Le phénomène d'inhibition peut être relié à un ou plusieurs mécanismes: compétition nutritionnelle, changements physico-chimiques du milieu (pH, formation d'agents réducteurs) et formation de produits antimicrobiens (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, bactériocines) (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

IV-Généralités sur les extraits de plantes

Les plantes ont été utilisées dans de nombreux domaines y compris la médecine, nutrition, fabrication d'arômes, de boissons et de colorants, parfumerie, cosmétique, fumigation, et pour d'autres buts industriels (**Djeridane et al., 2005**). L'effet bio-conservateur de plusieurs plantes suggèrent la présence de constituants antioxydants et antimicrobiens dans leurs tissus (**Djeridane et al., 2006**).

L'extraction, implique la séparation des composants actifs contenus dans les tissus végétaux des composants inactifs ou inertes en utilisant des solvants sélectifs par des procédures d'extraction standards. Les produits ainsi obtenus sont des liquides, des semi-solides ou des poudres relativement impurs (**Handa et al., 2008**). Parmi les composés bioactifs des plantes nous avons les polyphénols.

Les polyphénols sont des métabolites secondaires des plantes et sont ubiquistes dans tous les organes végétaux (**Harbone, 1993; Bravo, 1998**). En effet, les composés phénoliques, constituent le groupe le plus volumineux et le plus largement distribué chez les végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues (**Harbone, 1993**). Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique) et les flavonoïdes (**Tapiero et al., 2002**). Le tableau I illustre quelques études ayant montré certaines activités antimicrobiennes des polyphénols.

Tableau I : Exemples d'études montrant les activités antimicrobiennes des polyphénols

Polyphénols	Activité antimicrobienne	Référence bibliographique
Flavonoïdes	-Les extraits flavonoïques de <i>Marrubium vulgare</i> L. possèdent une activité antibactérienne et antifongique sur plusieurs souches microbiennes.	Bouterfas et <i>al.</i> (2014)
	-Les composés flavonoïques actifs démontrent un grand potentiel anti-plaques dentaires par l'inhibition de la croissance de <i>Streptococcus mutans</i> .	Prabu et <i>al.</i> (2006)
Acides phénoliques	Les acides phénoliques (galique, caféique et chlorogénique) exercent une activité anti-staphylocoque, et l'acide galique influence son adhésion.	Luis et <i>al.</i> (2013)

Partie 2 : Matériel et Méthodes

Ce travail est réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie Générale (bloc 9), et au niveau du laboratoire de recherche de Microbiologie Appliquée de l'université A. Mira-Béjaia.

I- Matériel biologique

I-1- Souches bactériennes

Six souches bactériennes : 03 souches de *Lactobacillus* (L14, L24 et L55) et 03 souches de *Streptococcus* appartenant aux streptocoques hémolytiques (S5, S11 et S15), d'origine alimentaire, sont incluses dans cette étude. Ces souches font partie de la collection des souches bactériennes du laboratoire de recherche de Microbiologie Appliquée (LMA, université A. Mira-Béjaia).

I-2- Matériel végétal

Cinq plantes locales : P1, P2, P3, P4 et P5, utilisées en médecine traditionnelle, sont étudiées dans ce travail. Les plantes séchées sont finement broyées à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre ainsi obtenue va servir à préparer différents extraits.

II- Etude de l'activité antibactérienne des extraits végétaux

II-1- Revivification et vérification de la pureté des souches

Un volume de 100 µl de cultures bactériennes conservées à 4°C sur milieu BHI est inoculé dans 5 ml de bouillon BHI (Institut Pasteur d'Algérie, Alger). Le bouillon est incubé à 37°C pendant 18 h.

A partir du bouillon de culture, un isolement en stries de chaque souche à la surface de la gélose BHI (Institut Pasteur d'Algérie, Alger) est réalisé, suivi d'une incubation à 37°C pendant 48 h. Après incubation, la pureté des souches est vérifiée par des observations macroscopiques et microscopiques (coloration de Gram) et un test de recherche de la catalase.

II-2- Préparation des cultures fraîches et standardisation des *inocula*

Une colonie de chaque souche est introduite dans 5 ml de bouillon BHI, puis incubé à 37°C pendant 18 h. La standardisation est réalisée selon la méthode classique en

préparant une série de dilutions pour chaque souche (10 dilutions pour les lactobacilles et 9 dilutions pour les streptocoques). A partir des 3 dernières dilutions, 1 ml est inoculé en masse dans de la gélose BHI. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 48 h. L'opération est répétée au moins 3 fois pour chaque souche. Après incubation, un dénombrement est réalisé sur toutes les boîtes de Pétri dénombrables.

II-3- Préparation des extraits

50g de la poudre de chaque plante sont ajoutées à un volume d'eau distillée ou d'éthanol tel qu'indiqué dans le tableau III. Le volume de solvant est choisi de telle façon à permettre l'immersion de toute la poudre.

Tableau II. Volume de solvant d'extraction utilisé

Plante	Extraction aqueuse (macération)	Extraction aqueuse (décoction)	Extraction éthanoïque
P1	250 ml	550 ml	100 ml
P2	320 ml	550 ml	150 ml
P3	300 ml	500 ml	150 ml
P4	300 ml	580 ml	150 ml
P5	300 ml	600 ml	100 ml

II-3-1-Extraction aqueuse par macération

Cette extraction est réalisée selon la méthode de **Nagappan (2012)** modifiée.

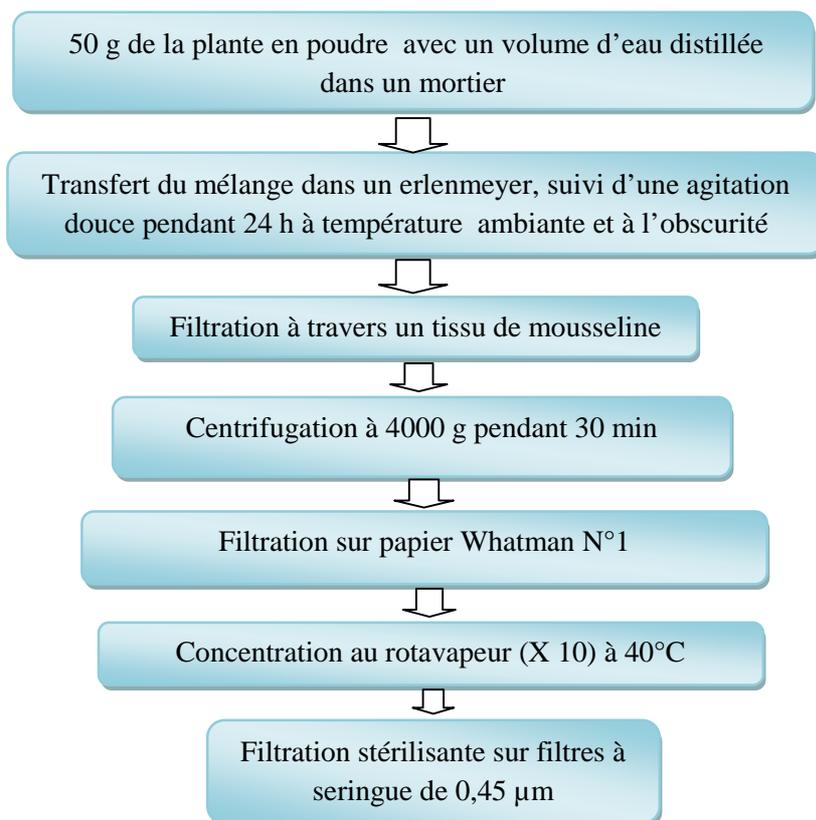
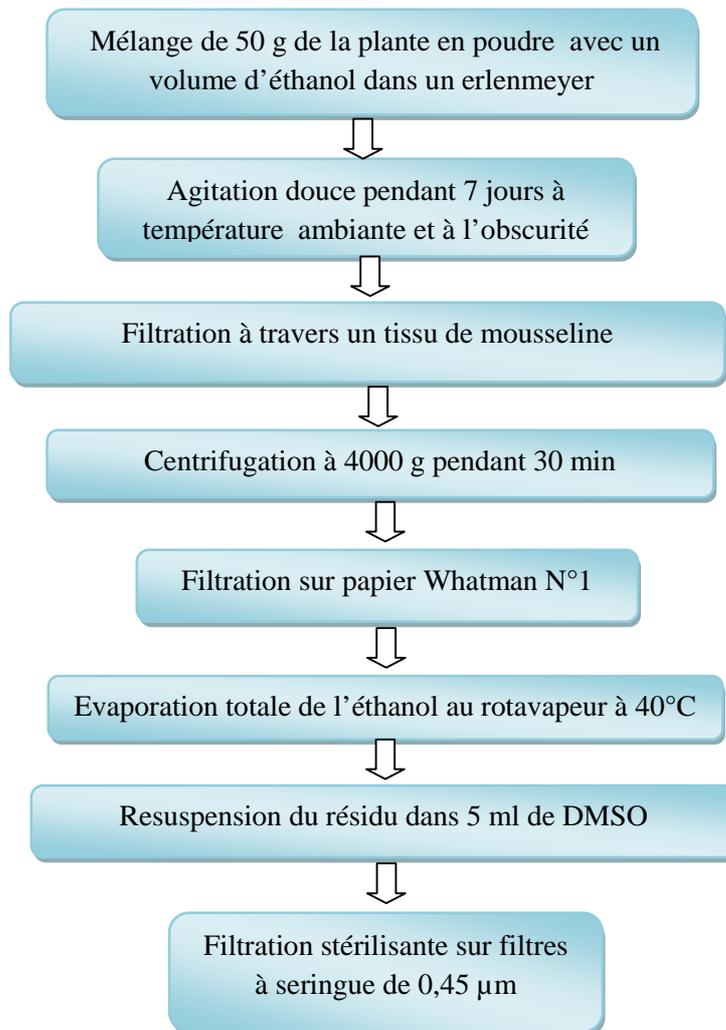


Figure 2 : Protocole d'extraction aqueuse par macération (Nagappan, 2012)

Les extraits aqueux de chaque plante sont codés : MP1, MP2, MP3, MP4 et MP5.

II-3-2-Extraction éthanoïque

Cette extraction est réalisée selon la méthode de Valle *et al.* (2015) modifiée.

**Figure 3** : Protocole d'extraction éthanoïque par macération (Valle *et al.*, 2015)

Les extraits éthanoïques de chaque plante sont codés: EP1, EP2, EP3, EP4 et EP5.

II-3-3- Extraction aqueuse par décoction

Cette extraction est réalisée selon la méthode de Ziani *et al.* (2015) modifiée.

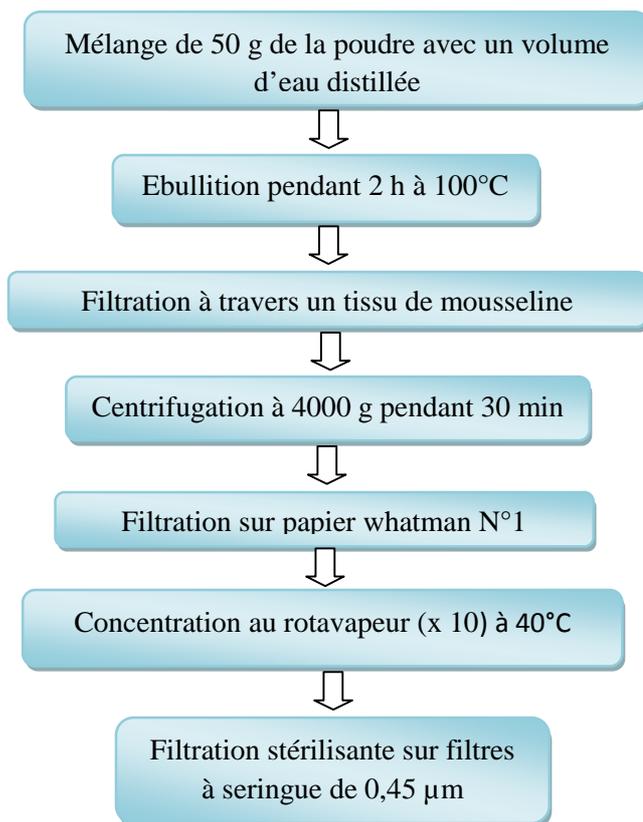


Figure 4 : Protocole d'extraction aqueuse par décoction (Ziani *et al.*, 2015)

Les extraits obtenus par décoction de chaque plante sont codés: IP1, IP2, IP3, IP4 et IP5.

II-4- Activité antibactérienne sur cellules planctoniques (milieu liquide)

Ce test est réalisé avec les 6 souches bactériennes individuellement en testant chaque extrait séparément selon la méthode décrite par Toty *et al.* (2013).

Un volume de 5 ml de bouillon BHI est inoculé avec 100 µl de la suspension bactérienne (10^8 UFC/ml). Un volume de 500 µl de l'extrait végétal non concentré est ajouté. Le mélange est bien agité puis incubé à 37°C pendant 24 h. La croissance bactérienne est estimée au spectrophotomètre (Biotech Engineering Management Co. LTD. (UK) UV-9200) en déterminant les densités optiques (DO) à 620 nm. Du bouillon BHI (5 ml) additionné de chaque extrait végétal individuellement (500 µl) est utilisé comme témoin.

II-5- Activité antiadhésive des extraits de plantes

II-5-1- Activité anti-formation de biofilm

L'activité antiadhésive est évaluée sur microplaque de 96 puits (Greiner bio-one, CELLSTAR), utilisant la méthode d'**Islam et al. (2008)** modifiée selon le protocole suivant :

- Un volume de 100 µl de bouillon BHI est introduit dans chaque puit de la microplaque;
- Un volume de 50 µl de la suspension bactérienne (10^7 UFC/ml) est inoculé dans chaque puit;
- Un volume de 50 µl de l'extrait concentré est ajouté dans chaque mélange;
- La microplaque est incubée à 37 pendant 24 h;
- Après l'incubation, le contenu des puits est versé et la microplaque est lavée avec 200 µl d'une solution de Tryptone-Sel (TS, 0,1 %, m/v) stérile sous une agitation douce pendant 10 min;
- Le TS est aspiré et les cellules sont fixées avec 200 µl d'éthanol absolu pendant 10 min ;
- L'éthanol est aspiré et la microplaque est colorée par addition de 200 µl de cristal violet (0,1 %, m/v) dans chaque puit pendant 20 min.
- Le colorant est par la suite aspiré et la microplaque est lavée 4 fois avec 200 µl de TS ;
- Le cristal violet fixé aux cellules est par la suite détaché par addition de 200 µl d'Ethanol 96 % (v/v).
- L'activité antiadhésive est évaluée en mesurant l'absorbance du colorant détaché avec un lecteur microplaque (Biotek Instruments, USA) à 490 nm.

Trois répétitions par souche sont réalisées dans chaque microplaque et ce pour chaque extrait et les tests sont répétés trois fois (3 microplaques).

II-5-2- Activité dispersante du biofilm

Six extraits (EP1-EP5 et IP4), sont testés pour leur activité détachante ou dispersante du biofilm des trois souches de streptocoques. Pour cela comme décrit

précédemment, après formation du biofilm (24 h), 200 μ l d'extrait sont ajoutés et laissés agir pendant 2 h. Au terme de cette durée, l'extrait est retiré et la microplaque est lavée 3 fois avec du TS stérile puis colorée et lue comme décrit en II-5-1.

***Partie 3 : Résultats et
discussion***

I-Revivification et contrôle de la pureté

L'observation du développement des souches dans du bouillon BHI a montré un trouble concentré au fond du tube lié à une croissance bactérienne plutôt en anaérobiose, une croissance caractéristique des lactobacilles et de certains streptocoques.

Sur gélose BHI après 48h d'incubation à 37°C, les souches de *Streptococcus* et de *Lactobacillus* ont formé des colonies circulaires de petite taille légèrement jaunâtres à Opourtour régulier. Le test de recherche de la catalase a montré que les souches sont toutes à catalase négative.

L'observation microscopique des souches a montré qu'elles sont toutes à Gram positif se présentant sous forme de coques disposés en paires (diplocoques) ou en chainettes plus ou moins longues pour *Streptococcus*, et sous forme de bacilles disposés en paires ou en longues chaînes pour *Lactobacillus*.

II-Standardisation de l'inoculum

Le but de la standardisation de l'inoculum bactérien, est d'avoir le même nombre de cellules bactériennes dans 1 ml de culture durant toute l'expérimentation. Après dénombrement, les souches de *Lactobacillus* et de *Streptococcus* ont été standardisées à une charge de 10^7 UFC/ml.

III- Activité antibactérienne sur cellules planctoniques (milieu liquide)

Les résultats obtenus après la lecture au spectrophotomètre ont permis de tracer l'histogramme de l'activité antibactérienne des extraits végétaux en fonction des souches utilisées (figure 5).

Les extraits végétaux non concentrés testés sur les différentes souches de *Streptococcus* et de *Lactobacillus* se sont révélés d'une faible activité ou inactifs sur ces souches. Ceci serait dû à l'effet dilution, étant donné que les extraits ont été préparés dans de volumes d'eau distillée assez important (250-600 ml). De plus, le test a été réalisé en ajoutant 500 µl de l'extrait à 5 ml de la suspension bactérienne préparée dans le bouillon BHI. Ce qui constitue un facteur de dilution supplémentaire.

Par ailleurs, les lectures réalisées montrent des anomalies dans les résultats du fait que les extraits très colorés absorbent fortement à la longueur d'onde utilisée (620 nm), ce qui rend difficile de détecter la présence des bactéries. Ces résultats montrent la limite

d'utilisation de la lecture au spectrophotomètre dans l'étude de l'effet antibactérien des extraits de plantes.

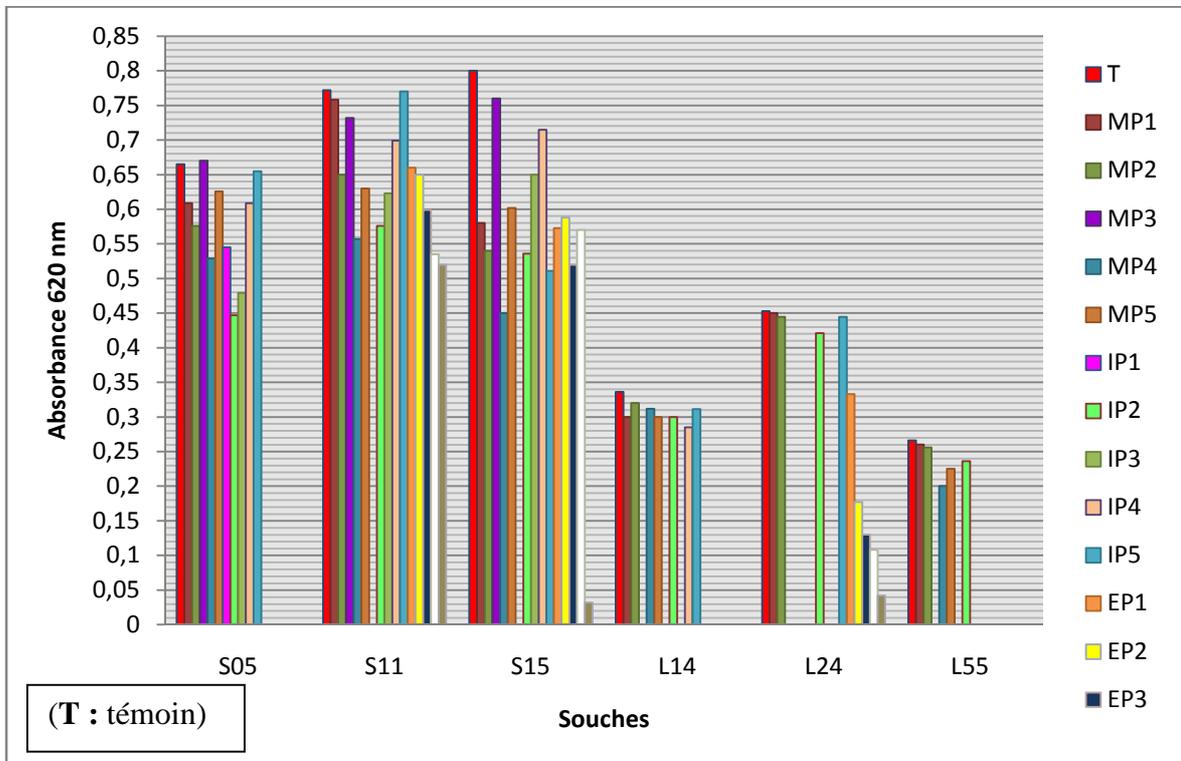


Figure 5: Effet des extraits de plantes non concentrés sur les cellules planctoniques de *Streptococcus* et de *Lactobacillus*.

IV- Activité antiadhésive des extraits de plantes

IV-1 Activité anti-formation de biofilm

Les extraits aqueux obtenus par décoction IP et par macération MP ont été testés quant à leur pouvoir anti-formation de biofilm à l'égard de 6 souches de *Lactobacillus* et de *Streptococcus*.

Les résultats de l'activité antiadhésive des extraits aqueux sont présentés sur les figures 6 et 7.

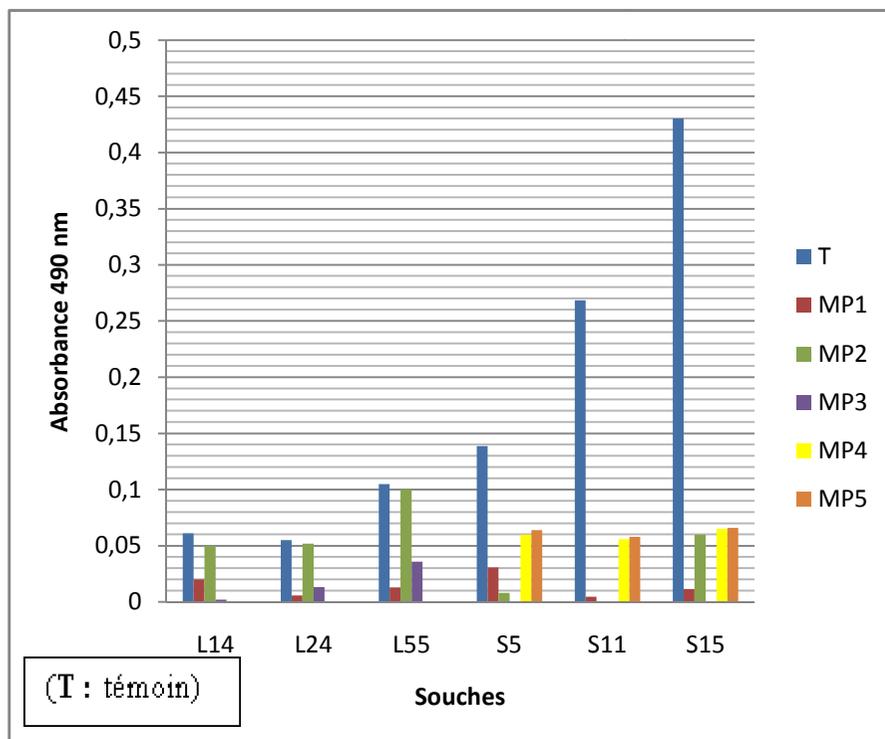


Figure 6 : Effet antiadhésif des extraits aqueux obtenus par macération sur les souches de *Streptococcus* et de *Lactobacillus*.

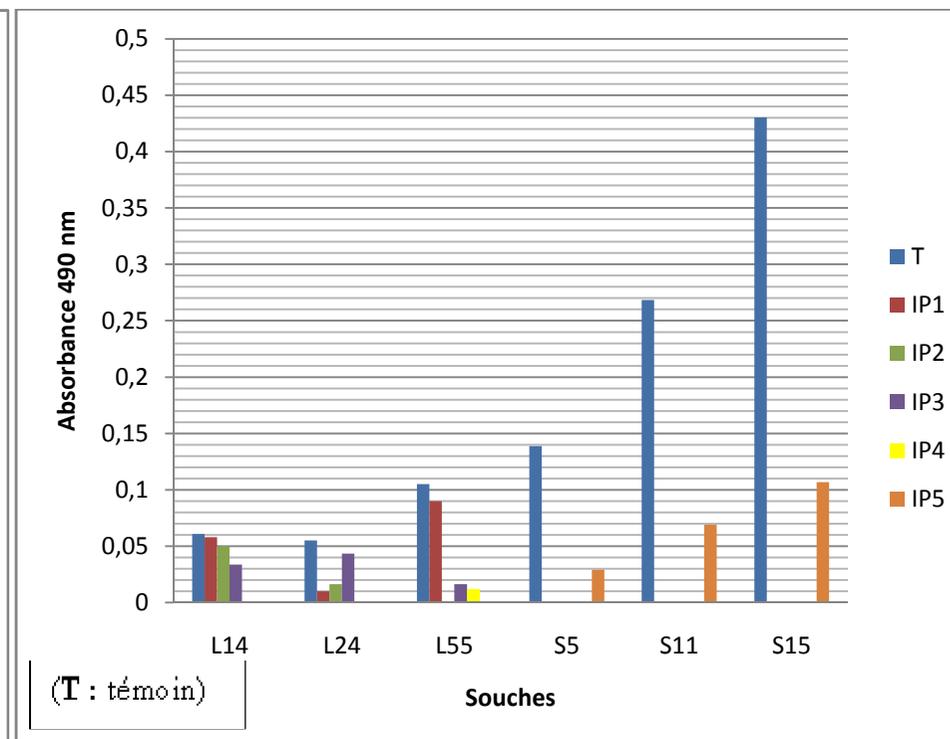


Figure 7 : Effet antiadhésif des extraits aqueux obtenus par décoction sur les souches de *Streptococcus* et de *Lactobacillus*

IV-1-1- Etude de la capacité d'adhésion des souches de *Lactobacillus* et de *Streptococcus*

Les biofilms formés sur la paroi des puits des microplaques peuvent être détectés visuellement, mais la mesure de l'absorbance après coloration au cristal violet permet d'estimer l'importance de cette adhésion.

La mesure de l'absorbance (A) à 490 nm nous a permis d'avoir les valeurs suivantes :

L14 (A=0,061), L24 (A=0,055), L55 (A=0,105), S5 (A=0,139), S11 (A=0,269) et S15 (A=0,430).

Ces valeurs ont été comparées avec l'absorbance du bouillon BHI stérile comme témoin (T) (0,054) ; l'importance de l'adhésion de chaque souche est estimée selon **Mathur et al. (2006)** comme suit :

$A \leq AT$	Pas d'adhésion
$A > AT$	Adhésion faible
$2A > A > AT$	Adhésion moyenne
$A > 2AT$	Adhésion forte

Il s'avère que les souches de *Streptococcus* sont plus adhérentes que celles de *Lactobacillus*. En effet, ces derniers n'ont présenté qu'une adhérence moyenne (L55), faible (L14) ou nulle (L24) , tandis que les 3 souches de *Streptococcus* (S5, S11 et S15) se sont révélées fortement adhérentes.

IV-1-2 Etude de l'activité anti-formation de biofilms des extraits de plantes

La souche L24 étant non adhérente, l'effet des extraits de plantes ne peut être mis en évidence.

➤ Effet des extraits aqueux obtenus par macération (MP)

L'extrait aqueux MP1 inhibe complètement l'adhésion des souches S11 et S15 et réduit considérablement l'adsorption des souches L14, L55 et S5. Par contre, l'extrait MP2 n'a montré aucune activité sur les souches adhérentes de *Lactobacillus* (L14 et L55) mais inhibe complètement l'adhésion des souches adhérentes de *Streptococcus* S11 et S5 et

réduit largement l'adsorption de la souche S15. Similairement, les extraits MP3 et MP4 empêchent complètement l'adhésion des souches de *Streptococcus* S5, S11 et S15. MP4 réduit l'adhésion de L14 et L55, tandis que MP3 empêche complètement l'adhésion de L14.

MP5 se montre très actif à l'égard des souches de *Lactobacillus* en empêchant complètement l'adhésion des souches L14 et L55 et réduit considérablement l'adhésion des souches de *Streptococcus* S5, S11 et S15.

La souche la plus sensible aux extraits MP ce sont les souches S11 puis L14 et les plus résistantes sont les souches L14 puis L55.

➤ Les extraits aqueux obtenus par décoction (IP)

L'extrait IP1 se montre sans activité à l'égard des souches adhérentes de *Lactobacillus* L14 et L55, tandis qu'il inhibe complètement la formation de biofilm par les souches de *Streptococcus* S5, S11 et S15. Similairement, IP2 inhibe complètement l'adhésion de souches S5, S11, S15 et L55 mais n'a aucune activité à l'égard de L14.

L'extrait IP3 empêche complètement l'adhésion des souches de *Streptococcus* S5, S11 et S15 et réduit l'adsorption de celles de *Lactobacillus*. Par contre, l'extrait IP4 empêche la formation de biofilm par toutes les souches S5, S11, S15, L14 et L55.

L'extrait IP5 quant à lui, il empêche complètement l'adhésion des souches de *Lactobacillus* L14 et L55 et réduit l'adsorption des souches de *Streptococcus* S5, S11 et S15.

Les souches les plus sensibles aux extraits IP sont respectivement : S15 puis L55 et les plus résistantes sont S5 puis L14.

Les extraits IP se montrent plus actifs à l'égard des souches de *Streptococcus* que les extraits MP, inversement ces derniers se montrent plus actifs à l'égard des souches de *Lactobacillus*.

➤ Les extraits éthanoïques (EP)

Les résultats de l'évaluation du pouvoir antiadhésif des extraits éthanoïques sont présentés sur la figure 8.

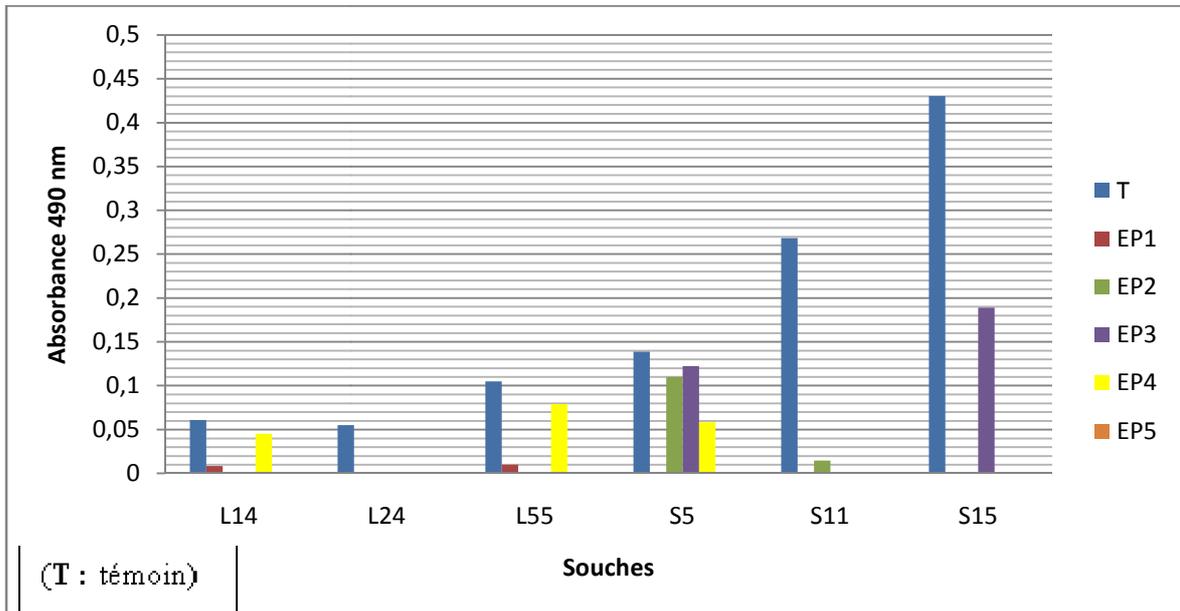


Figure 8: Effet antiadhésif des extraits éthanoïques sur les souches de *Streptococcus* et de *Lactobacillus*.

Les extraits EP1 et EP2 inhibent complètement l'adhésion des souches L14, L55, S5, S11 et S15. Par contre, l'extrait EP3 inhibe complètement la formation de biofilm par les souches L14, L55 et S11, réduit l'adhésion de S15 et n'agit pas sur S5. De même, l'extrait EP5 inhibe complètement l'adhésion des souches de *Streptococcus* S11 et S15 et réduit l'adhésion de S5. Par contre, l'extrait EP4 inhibe complètement les souches des *Streptococcus* mais se montre sans activité à l'égard des souches adhérentes de *Lactobacillus* L14 et L55.

Les souches les plus sensibles aux extraits éthanoïques sont respectivement : S11 puis S15 pour *Streptococcus* et L55 puis L14 pour *Lactobacillus*.

Les extraits EP se montrent plus actifs sur les souches de *Lactobacillus* que les extraits aqueux, tandis que leur activité à l'égard des souches de *Streptococcus* est moins importante que celle des extraits IP.

Toutefois avec ce test nous ne pouvons pas conclure à une activité antiadhésive tout en excluant une activité antibactérienne (bactériostatique ou bactéricide).

IV-2- Activité dispersante du biofilm

Les extraits EP et l'extrait IP4 ont été testés pour évaluer leur effet anti-biofilm, les résultats obtenus sont présentés sur la figure 09.

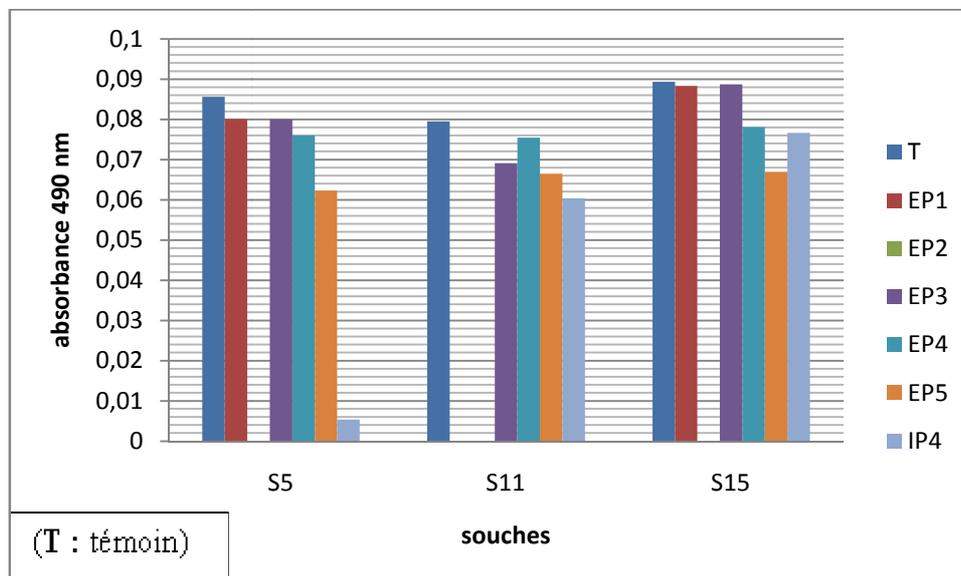


Figure 09 : Effet antibiofilm des extraits végétaux sur les souches de *Streptococcus* et de *Lactobacillus*.

Tous les extraits testés sur les souches de *Streptococcus* se sont révélés presque sans activité dispersante du biofilm à l'exception de l'extrait EP1 qui a détaché le biofilm de la souche S11, l'extrait EP2 qui a éliminé le biofilm de toutes les souches testées et IP4 qui a réduit fortement la taille du biofilm de la souche S5.

Le test d'inhibition de l'adhésion des 6 souches a montré que les extraits concentrés aqueux obtenus par décoction ont un effet inhibiteur plus important sur les souches de *Streptococcus* par rapport aux autres extraits, contrairement aux extraits concentrés éthanoliques qui ont une forte activité antiadhésive sur les souches de *Lactobacillus*.

L'inhibition de l'adhérence des différentes souches par les extraits de plantes s'explique par la présence de métabolites ayant des activités antibactériennes ou antiadhésives (Furiga et al., 2008). En effet, les glycosides, les phénols et les tanins possèdent des activités antibactériennes (Ahmed et Beg, 2001). Les composés avec une structure phénolique comme le carvacrol, eugénol et le thymol sont fortement actifs, les

membres de cette classe sont connus comme des agents bactéricides ou bactériostatiques dont l'action est dépendante de la concentration utilisée (**Pelczar et al., 1988**).

En 2007, **Alviano et al.** ont démontré l'activité antimicrobienne de 4 plantes médicinales à l'égard de la flore orale y compris *Streptococcus mutans*. La réduction de l'adhésion bactérienne en présence d'un extrait végétal pourrait être un effet des métabolites des plantes qui réduisent l'hydrophobicité de la bactérie (**Islam et al., 2008**), ou l'inhibition du *Quorum Sensing* (**Packiavathy et al., 2012**).

Une corrélation entre l'activité anti- *Quorum –Sensing* et l'activité anti-formation de biofilm des composants actifs d'extraits de plantes a été démontrée lors de la forte inhibition de la formation de biofilm de *Streptococcus pyogenes* (**Limsuan et Voravuthikunchai, 2008**).

Conclusion

Conclusion

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antiadhésive des extraits éthanoïques (EP) et aqueux (macération « MP » et décoction « IP ») de 5 variétés de plantes locales à l'égard de six souches des genres : *Streptococcus* (S5, S11 et S15) et *Lactobacillus* (L14, L24 et L55).

L'évaluation de l'activité antibactérienne sur cellules planctoniques en milieu liquide, des extraits non concentrés, a révélé que les extraits éthanoïques et aqueux non concentrés présentent une faible activité antimicrobienne à l'égard des souches testées.

Le test d'inhibition de l'adhésion des 6 souches sur microplaque en polystyrène a montré que les extraits concentrés aqueux obtenus par décoction ont un effet inhibiteur plus important sur les souches de *Streptococcus* par rapport aux autres extraits, dans l'ordre : IP>EP>MP, et que les extraits concentrés éthanoïques ont une forte activité antiadhésive sur les souches de *Lactobacillus* dans l'ordre de : EP>MP>IP.

Les IP se montrent les extraits les plus efficaces parce qu'ils agissent sur les souches de *Streptococcus* sans affecter les souches bénéfiques de *Lactobacillus*.

L'évaluation de l'activité antibiofilm (dispersante) des différents extraits concentrés à l'égard des 3 souches de *Streptococcus* a révélé une faible activité antibiofilm des extraits, à l'exception de l'extrait EP2 qui s'avère très actif dans le détachement complet des biofilms formés par les 3 souches, l'extrait EP1 qui est actif dans le détachement complet du biofilm formé par S11 et l'extrait IP4 qui détache une grande partie du biofilm formé par S5.

Il ressort de cette étude qu'il existe parmi les extraits étudiés ceux qui peuvent être utilisés comme source naturelle d'agents antibactériens, et dont l'efficacité dépend de la souche testée, la concentration de l'extrait et la plante étudiée.

Des études plus poussées sont nécessaires afin d'identifier les composés actifs responsables de l'activité antiadhésive et antibiofilm.

En perspective, il faudrait répéter ces tests plusieurs fois et élargir cette étude à d'autres paramètres :

-Procéder au dosage, à la purification et à la séparation des composés phénoliques afin d'identifier les molécules responsables de l'effet antiadhésif et de tester séparément celles qui sont actives.

-Étudier l'activité antiadhésive des extraits végétaux sur d'autres surfaces que le plastique.

-Étudier d'autres activités biologiques de ces extraits.

-Rechercher la toxicité de ces extraits végétaux *in vitro* et *in vivo*.

*Références
bibliographiques*

- **AHMAD I., BEG. Z.** Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *AZ . J. Ethnopharmacol*, (2001), vol. 74, n°2, p. 113-123.
- **ALVIANO, Wanger S. ALVIANO, Daniela S., DINIZ, Claudio G., ANTONIOLLI, Angelo R., ALVIANO Celuta S., LUIZ.** *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of oral biology*,(2008); vol. 53, n° 6, p. 545-552.
- **BHAWNA, Sunil Negi .,BHARTI P, Dave ., AGARWAL Y. K.** Evaluation of Antimicrobial Activity of Bauhinia purpurea Leaves Under In Vitro Conditions. *Indian J Microbiol*, (2012) ; vol. 53, n°3, p. 360–365.
- **BOURGEOIS C. M., LARPENT J. P.** *Microbiologie alimentaire. T. 2. Aliments fermentés et fermentations alimentaires.* Ed. Tec. et Doc., Lavoisier (Paris), (1996) ; p. 523.
- **BOUTERFAS K., MEHDADI Z., LATRECHE A., AOUA L.** Pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de Marrubium vulgare L. en provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Pharmacognosie* (2014) ; vol. 12, p. 6-14.
- **CERI H., OLSON M. E., STREMICK C et al.** The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* 37, (1999); p. 1771–6.
- **COSTERTON J. W., STEWART P. S., GREENBERG E. P.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, (1999);vol. 284, p. 1318–1322.
- **CUNNINGHAM, Madeleine W.** Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clinical microbiology reviews*, (2000), vol. 13, n°3, p. 470–511.
- **Cunningham. M.W.** pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev*, (2000); vol. 13, n°3, p. 470-511.
- **CVITKOVITCH D. G., LI Y.H., ELLEN R. P.** Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. *J. Clin. Investig*(2003);vol112, p. 1626–1632.
- **DELLAGLIO F., DE ROISSART H., TORRIANI S., CURK M. C., JANSSENS D.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques *in Bactéries*

lactiques. T. 1. Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Lorica (Uriage), (1994); 25-68. 614p.

- **DJERIDANE A., YOUSFI M., NADJEMI. B** et al. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry 97, (2006) ; p. 654–660.
- **DJERIDANE A., YOUSFI M., NADJEMI B., BOUTASSOUNA D., STOCKER P., VIDAL N.** Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry, (2006); vol. 97, p. 654–660.
- **DONLAN. Rodney.** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases, (2002), vol.8, n°9, p. 881-890.
- **FAO/OMS, 2001.** The Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO/WHO Report No. 10-1.
- **FIEDLER, Tomas., KÖLLER, Thomas., KREIKEMEYER, Bernd.** *Streptococcus pyogenes* biofilms— formation,biology,andclinicalrelevance. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,(2015) ; vol. 5, n° 15, p. 1-11.
- **FLEMMING, Hans-Curt., WINGENDER, Jost.** The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology,(2010); vol.8, p.623-633.
- **FURIG A. A, LONVAUD-FUNEL A, DORIGNAC G, BADET C.** In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of natural polyphenolic compounds on oral bacteria. Journal of Applied Microbiology ISSN, (2008) ; p. 1364-5072.
- **GASSER. F.** Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. Bulletin de l’institut Pasteur,(1994); vol. 92, n°1, p. 45-67.
- **HANDA. S. S.**(2008). An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. In: HANDA. Sukhdev Swami., KHANUJA. Suman Preet Singh., LONGO. Gennaro., RAKESH. Dev Dutt (Eds), Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, INTERNATIONAL CENTRE FOR SCIENCE AND HIGH TECHNOLOGY, Trieste, pp. 1-52.

- **HEINZ SCHLEIFER, Karl., KANDLER, Otto.** Peptidoglycan .Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications. American Society for Microbiology, (1972) ; vol. 36, n°4, p. 407-477.
- **HUSNI, Rola N., GORDON, Steven M., WASHINGTON, John A et al.** Lactobacillus Bacteremia and Endocarditis: Review of 45 Cases. Clinical Infectious Diseases, (1997) ; vol 25, p. 1048–1055.
- **ISLAM, Barira., KHAN, Shahper. N., HAQUE, Irfanul et al .** Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from *Morus alba*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, (2008) ; vol. 62,p. 751–757.
- **JACQUES, Nicholas A., HARDY, Lyn., KNOX, Kenneth W., WICKEN, Anthony.** Effect of Tween 80 on the Morphology and Physiology of *Lactobacillus salivarius* Strain IV CL-37 Grown in a Chemostat under Glucose Limitation. *Journal of General Microbiology* (1980) ; vol. 119,p. 195-201.
- **JENKINSON H. F ., LAMONT R. J .** Streptococcal Adhesion And Colonization. *Crit Rev Rev Oral Oral Biol Bid Med Med*, (1997); vol. 8,n°2,p 175-200.
- **KUMAR S., PANDEY A. K.** Antioxidant, lipo-protective and antibacterial activities of phytoconstituents present in *Solanum xanthocarpum* root, *International Review of Biophysical Chemistry*, (2012); vol. 3, no° 3, pp. 42–47.
- **MANSOURI S., FOROUMADI A., GHANEIE T., NAJAR AG.** Antibacterial activity of the crude extracts and fractionated constituents of *Myrtus communis*. *Pharm Biol*, (2001); vol. 39, p. 399–401.
- **MATHUR T., SINGHAL S., KHAN S., UPADHYAY DJ., FATMA T., RATTAN A.** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbial*, (2006); vol. 24, n°1, p. 25-29.
- **MERRITT, Justin., QI, Fengxia., GOODMAN, Steven D., ANDERSON, Maxwell H., SHI, Wenyuan.** Mutation of *luxS* Affects Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. *Infection And Immunity*,(2003) ; vol. 71, n° 4, p. 1972–1979.

- **MERRITT, Katharine., AN, Yuehuei.**(2000) H. Factors influencing bacterial adhesion: In:AN, Yuehuei., FRIEDAN, Richard. J (Eds), Handbook of bacterial adhesion: principles, methods and applications, Humana Press Inc, Totowa. NJ, pp 53-54.
- **MOSCOSO, Miriam., GARCÍA, Ernesto., LOPEZ, Rubens.** Biofilm Formation by *Streptococcus pneumoniae*: Role of Choline, Extracellular DNA, and Capsular Polysaccharide in Microbial Accretion. Journal Of Bacteriology,(2006) ;vol. 188, n°22 , p. 7785–7795.
- **OLIVER-KOZUP, Heaven. A., ELLIOTT, Meenal., BACHERT, Beth. A et al.** The streptococcal collagen-like protein-1 (Scl1) is a significant determinant for biofilm formation by group a Streptococcus. BMC Microbiology, (2011) ; vol. 11, n° 262, p. 1471-2180.
- **PACKIAVATHY, Sybiya Vasantha IA., AGILANDESWARI P, MUSTHAFA KS, PANDIAN SK, RAVI AV.** Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. Food Res Int, (2012); vol. 45, p. 85-92.
- **PANDEY A. K., MISHRA A. K., MISHRA A., KUMAR S., CHANDRA. A.** Therapeutic potential of *C. zeylanicum* extracts: an antifungal and antioxidant perspective, International Journal of Biological and Medical Research, (2010); vol. 1, pp. 228–233.
- **PELCZAR, M. J., CHAN, E. C S., KEING, N. R.**(1988).Control of microorganisms by physical agents. In: Microbiology. New York : McGrawhill International. pp. 469-509.
- **POST. JC., STOODLEY. P.** The role of biofilms in otolaryngologic infections. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg,(2004); vol 12,p. 185-190.
- **Références bibliographique**

Références bibliographiques

- **ROUX, Agnès., GHIGO, Jean-Marc.** Les biofilms bactériens. Communication, (2006) ; n°3, p. 261-268.

- **RUIZ-LINARES, Matilde, FERRER-LUQUE, Carmen Maria, ARIAS-MOLIZ, Teresa et al.** Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutans* biofilm. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* (2014) ; vol. 13, n° 41, p. 1-6.
- **SAAVEDRA, J. M.** Use of Probiotics in Pediatrics: Rationale, Mechanisms of Action, and Practical Aspects. *Nutrition and Clinical Practices*, (2007); vol. 22, n°3, p. 351-365.
- **SAUNDERS S., BOCKING A., CHALLIS J., REID. G.** Effect of *Lactobacillus* challenge on *Gardnerella vaginalis* biofilms. *Colloids Surf B Biointerfaces*(2007); vol 55, n°2, p. 138-142.
- **SAXELIN M., RAUTELIN H., SALMINEN S., MAKELA P. H.** Safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. *Infectious diseases in clinical practice*,(1996); vol. 5, n°5, p. 331-335.
- **STEWART P. S., COSTERTON J. W.** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* , (2001); vol. 358, p. 135–138.
- **STEWART P. S., FRANKLIN M. J.** Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol*, (2008), vol. 6, p. 199–210.
- **STOODLEY P, SAUER K, DAVIES D. G, COSTERTON J. W.** Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews Microbiol*, (2002) ; n°56, p. 187-209.
- **TAHERI A, SEYFAN A, JALALINEZHAD S, NASERY F.** Antibacterial effect of *Myrtus communis* hydro-alcoholic extract on pathogenic bacteria. *Zahedan J Res Med Sci*, (2013); vol. 15, n° 6, p. 19–24.
- **TAILLIEZ P.** Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Actualités microbiologiques*, (2004) ; vol. 6, p. 35-41.
- **TOTY A .A., GUESSENND N, BAHI C., KRA A. M et al.** Évaluation *in-vitro* de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*,(2013) ; vol 82, p. 12-21.
- **VENTOLINI, Gary.** Vaginal *Lactobacillus*: biofilm formation in vivo – clinical implications. *International Journal of Women's Health*, (2015); vol. 7, p. 243–247.

- **VOS, Paul., GARRITY, George., JONES, Dorothy., KRIEG, Noel R., LUDWIG, Wolfgang., RAINEY, Fred A., SCHLEIFER, Karl-Heinz., WHITMAN, William.** (eds., 2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes*, vol. 3, 2ed ed. Springer Science & Business Media, New York, NY.
- **ZIANI, Borhane E.C., CALHELHA, Ricardo C., BARREIRA, João C.M et al.** Bioactive properties of medicinal plants from the Algerian flora: Selecting the species with the highest potential in view of application purposes. *Industrial Crops And Products* 77,(2015); p. 582-589.
- **ZOBELL, C., MEYER, K.** Reduction of nitrates by representatives of the *Brucella* group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, (1931); vol. 29,p. 116–118.

Annexe

BHI bouillon (pH : 7,4 +/- 0,2) (Institut Pasteur d'Algérie, Alger)

Protéose peptone.....	10g
Infusion de cervelle de veau	12, 5g
Infusion de coaur de bœuf	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	2.5g
Glucose	2g
Eau distillé	1L

BHI gélose (pH : 7,4 +/- 0,2) (Institut Pasteur d'Algérie, Alger)

Protéose peptone	10g
Infusion de cervelle de veau	12,5 g
Infusion de coaur de bœuf	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	2,5g
Glucose	2g
Agar	15g
Eau distillé	1L

Tryptone sel

Tryptone	1g
NaCl	9g
Eau distillé	1L

Résumé

Des extraits éthanœiques et aqueux (décoction et macération) de 5 variétés de plantes locales ont été préparés et leur activité antiadhésive a été testée à l'égard de 6 souches (3 souches de *Streptococcus* et 3 souches de *Lactobacillus*).

Les résultats de cette étude ont montré que les extraits non concentrés des 5 plantes testées sur cellules planctoniques, en milieu liquide, présentent une faible activité antibactérienne sur les souches testées. Par ailleurs, le test de l'activité antiadhésive des extraits concentrés a révélé un fort pouvoir antiadhésif des extraits aqueux obtenus par décoction (IP) à l'égard des souches de *Streptococcus* sans affecter les souches bénéfiques de *Lactobacillus*. Une forte inhibition de l'adhésion des souches de *Lactobacillus* a été observée avec les extraits éthanœiques. De même, l'activité antibiofilm des extraits concentrés a montré que l'IP2 présente une très forte activité antibiofilm à l'égard des 3 souches de *Streptococcus*.

Mots clés : Extraits de plantes, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, activité antiadhésive, activité antibiofilm.

Abstract

Ethanollic and aqueous extracts (decoction and maceration) of 5 local plant varieties were prepared and their anti-adhesive activity was tested against 6 strains (3 strains of *Streptococcus* and 3 strains of *Lactobacillus*).

The results of this study showed that the non concentrated extracts of the plants tested on planktonic cells, in liquid medium, showed a low antibacterial activity on the strains tested, while the anti-adhesive activity test of the concentrated extracts revealed a strong anti-adhesive effect of the extracts obtained by decoction (IP) against *Streptococcus* strains showing without affecting *Lactobacillus* strains. A strong inhibition of the adhesion of *Lactobacillus* strains was observed with the ethanoic extracts (EP). Similarly, the antibiofilm activity of the concentrated extracts showed that IP) exhibits a very strong antibiofilm activity against the 3 *Streptococcus* strains.

Key words: Plant extracts, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, antiadhesive activity, antibiofilm activity.