

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS-MOSTAGANEM**



Faculté des sciences de la Nature et de la vie
Domaine : S.N.V
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée
Option : Interactions microorganismes, hôte et environnement

THÈSE

**PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT 3^{ème} CYCLE LMD**

Par

Mme. BELKACEM Imane

THÈME

**Stratégies de lutte contre les biofilms bactériens responsables d'intoxications
alimentaires : polyphénols naturels**

Soutenu publiquement le : 16/11/2017

Membres de jury

Mr MEKHALDI Abdelkader	Pr Université A/ Benbadis Mostaganem	Président
Mr AIT SAADA Djamel	MCA Université A/ Benbadis Mostaganem	Examineur
Mr BEKADA Ahmed Mohammed Ali	Pr Centre Universitaire de Tissemsilt	Examineur
Mme REBAI Ouafa	MCA Université A/ Benbadis Mostaganem	Encadreur
Mr Djibaoui Rachid	Pr Université A/ Benbadis Mostaganem	Co-Encadreur

Laboratoire de microbiologie et biologie végétale

Année universitaire 2017/2018

JE DEDIE CETTE THESE

A mes très chers parents ; à mon mari, et mes oncles...

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond respect, mon grand amour et toute ma gratitude pour les sacrifices que vous avez consenti. Vous m'avez donné toute l'attention et tout l'amour qu'un être puisse espérer. Merci pour vos instructions, votre soutien, aucun de mes mots ne saurait exprimer l'ampleur de ma reconnaissance. MERCI

A Ma Très Chère Petite Princesse Meriem Liliane ;

C'est à toi mon adorable ange, ma joie, mon petit trésor que maman dédie ce travail pour te dire que tu resteras pour toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie.

Je t'aime mon bébé et je te souhaite tout le bonheur du monde....

REMERCIEMENT

La présente thèse a été réalisée conjointement au Laboratoire Microbiologie et biologie végétale (LMBV) de l'Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité de mon directeur de thèse, Docteur REBAI Ouafa, et mon co-encadreur Professeur DJIBAOUI Rachid. Je suis honorée d'avoir travaillé en leur compagnie durant tous mon parcours scientifique. Je voudrais les remercier pour leurs temps, leurs soutien et les conseils qu'ils m'ont accordés tout au long de ces années et surtout d'avoir cru en mes capacités. Merci pour tout.

Je tiens à témoigner ma gratitude à toute l'équipe du laboratoire LMBV, ainsi mes collègues pour leurs aides et conseils. Je vous serai toujours reconnaissante d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Mes respectueux remerciements s'adressent à Mr. A.MEKHALDI, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, merci d'avoir accepté de donner votre temps pour présider mon jury et juger ce travail malgré votre responsabilité scientifique et administrative.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr D. AIT SAADA Maître de conférences A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, d'avoir aimablement accepté d'apporter ses critiques à ce travail.

Je suis très honorée par la participation de Mr. BEKADA, Professeur à l'université de Tissemsilt, que je remercie d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Sommaire

Avant-propos

Sommaire

Liste des abréviations

Index des tableaux

Index des figures

Résumé

Abstract

المخلص

Introduction générale.....1

Etude bibliographique

Chapitre I : les polyphénols d'origine naturelle

Partie 1 : Les Polyphénols, structure et propriétés	4
1. Présentation générale des polyphénols.....	4
2. Classification des polyphénols.....	5
2.1. Les non flavonoïdes.....	5
2.1.1. Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3)	5
2.1.2. Stilbènes (C6-C2-C6)	6
2.1.3. Lignanes (C6-C3) ₂	6
2.2. Les flavonoïdes C6-C3-C6.....	7
2.3. Tanins.....	7
3. Biosynthèse des polyphénols.....	8
3.1. Voie de l'acide shikimique	8
3.2. Voie de l'acétate / malonate.....	9
4. Propriétés chimiques des polyphénols.....	9
5. Antioxydants et systèmes de défense	9
6. Types des antioxydants.....	12
6.1. Antioxydants non enzymatiques	12
6.2. Antioxydants de synthèse	13
7. métabolites secondaires des plantes.....	13

Partie 2 : La famille des Apiacées ex-Ombellifères (<i>Ammi visnaga</i>)	14
1. Description de la famille des Apiacées	14
2. Appareil reproducteur des Apiacées	15
3. Caractéristiques botaniques.....	16
3.1. Classification de la famille des Apiacées	16
3.2. L'espèce <i>Ammi visnaga</i>	16
3.2.1. Habitat et culture.....	17
3.2.2. Composition chimique	18
Partie 3 : La famille des Rutaceae (Les agrumes)	19
1. Généralités sur la famille des Rutaceae.....	19
2. Taxonomie chez les agrumes.....	19
3. Descriptions morphologique et physiologique.....	20
4. Quelques espèces de <i>Citrus</i>	22
4.1. Plante de citron (<i>Citrus limon</i>).....	22
4.2. Plante d'orange (<i>Citrus sinensis</i>).....	24
Chapitre II : Les biofilms bactériens	28
1. Généralités sur les biofilms bactériens	28
1.1. Formation des biofilms	28
1.2. Biofilm et industrie alimentaire	31
2. Les pathogènes responsables d'intoxications alimentaires.....	31
2.1. Caractéristiques de l'espèce d'étude <i>Bacillus cereus</i>	31
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> : agent pathogène	34
Matériel et méthodes	
1. Obtention des souches bactériennes.....	39
1.1. Source	39
1.2. Isolement des souches <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	39
1.3. Identification et caractérisation des isolats bactériens	39
1.4. Modèle antibiogramme des souches isolées.....	41
2. Extraction des polyphénols à partir des échantillons végétaux	42
2.1. Solvants et standards	42
2.2. Préparation des courbes d'étalonnage	42
2.3. Extraction des polyphénols et des flavonoïdes à partir des échantillons végétaux	42

2.3.1. Le rendement d'extraction	43
3. Dosage colorimétrique des polyphénols totaux	44
4. Dosage colorimétrique des flavonoïdes	44
5. Optimisation des conditions chromatographiques.....	45
6. Méthodes d'étude des propriétés biologiques des extraits végétaux.....	46
6.1. Détermination du potentiel antioxydant des extraits végétaux.....	46
6.1.1. Test de réduction du radical stable DPPH°(2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl).	46
6.1.2. Test de réduction du fer (FRAP) (Ferric reducing antioxidant power).....	46
6.1.3. Test de blanchissement du β -carotène.....	47
7. Mise en évidence et détermination de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes.....	48
7.1. Méthode des puits sur milieu de Mueller-Hinton gélosé.....	48
7.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	49
7.3. Essai de comportement en essaimage (Swarming).....	50
7.4. Quantification du biofilm bactérien par la méthode du cristal violet.....	50
7.5. Effet des extraits végétaux sur la croissance planctonique et les biofilms matures de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	52
7.6. Effet des enzymes sur la croissance planctonique et les biofilms matures de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	52
7.7. Détermination de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique la formation de biofilm des souches bactériennes étudiées.....	53
8. Calcul du pourcentage d'inhibition de formation des biofilms matures formés par les souches de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	54
9. Traitement statistique des résultats.....	54

Résultats

1. Isolement et identification des isolats bactériens	55
1.1. Isolement et identification des isolats de <i>Bacillus cereus</i>	55
1.2. Isolement et identification des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i>	56
2. Screening de la toxicité des isolats bactériens.....	58
3. Résistance aux antibiotiques.....	58
4. Extraction des polyphénols et des flavonoïdes à partir des échantillons végétaux..	60
4.1. Calcul du rendement d'extraction.....	60

4.2. Effet de la concentration et du type de solvant sur le rendement total en phénols.....	62
4.3. Identification par HPLC/UV des métabolites secondaires des extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> , <i>Citrus limon</i> et <i>Citrus sinensis</i>	63
5. Détermination du potentiel antioxydant des extraits végétaux.....	67
5.1. Activité antioxydante DPPH.....	67
5.2. Méthode de FRAP (Ferric reducing antioxidant power).....	70
5.3. Test de blanchissement de la β -carotène.....	71
6. Méthode d'étude du pouvoir antibactérien des extraits de plantes.....	73
6.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion des puits d'agar.....	73
6.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	74
6.3. Essai de comportement en essaimage(Swarming).....	75
7. Cinétique de croissance bactérienne de <i>B. cereus</i> et <i>S. aureus</i> au cours de formation du biofilm bactérien	76
7.1. Evaluation de la biomasse adhérente par la méthode Cristal Violet (CV).....	79
8. Effet des extraits végétaux sur l'inhibition de biofilm.....	80
9. Effet de quelques enzymes et l'acide salicylique sur la croissance planctonique et les biofilms matures de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	84
9.1. Evaluation de l'effet des enzymes sur l'adhérence bactérienne de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode cristal violet	85
Discussion des résultats	90
Conclusion	105
Références bibliographiques	107
Annexes	

Liste des abréviations

NaCl : Chlorure de sodium

AA : Acide ascorbique

TCA : Acid trichroacétique

BHI: Brain Heart Infusion

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

DPPH: 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EtOH: Ethanol

FRAP: Ferric Ion Reducing Antioxidant Power

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène..

H₃PM₀₁₂O₄₀: Acide phosphomolybdique

H₃PW₁₂O₄₀: Acide phosphotungstique

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

MH : Mueller Hinton

MeOH : Méthanol

ACN : Acétone

OH : Ion hydroxyde.

V/V : Volume / Volume.

ppm : Parties Par Million.

ROS: Reactive Oxygen Species.

Rt : Temps de Rétention

UFC : Unité Formant Colonie

tr / min : Tour par minute

UV : Ultraviolet

IR : Infrarouge

RP : Reverse phase

VIT C : Vitamine C

KCl : Chlorure de Potassium

NH₄Cl : Chlorure d'ammonium

MgSO₄ : Sulfate de Magnésium

Tris-HCl : Tris Chlorure d'hydrogène

CV : Cristal violet

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales classes des composés phénoliques	5
Tableau 2 : Classification de la famille des Apiacées (<i>Ammi visnaga</i>)	16
Tableau 3 : Constituants chimiques de citron (<i>Citrus limon</i>)	24
Tableau 4 : Constituants chimiques de l'orange (<i>Citrus sinensis</i>)	26
Tableau 5 : Nouvelle classification du groupe <i>Bacillus cereus</i>	32
Tableau 6 : classification de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Tableau 7 : Identification biochimique des isolats de <i>Bacillus cereus</i>	56
Tableau 8 : Identification biochimique de <i>Staphylococcus aureus</i>	57
Tableau 9 : Rendements d'extraction obtenus pour les différents extraits de la plante <i>Ammi visnaga</i> (L.)	60
Tableau 10 : Rendements d'extraction obtenus pour les différents extraits de <i>Citrus sinensis</i> et <i>Citrus limon</i> .	61
Tableau 11 : Activité antimicrobienne des extraits d' <i>Ammi visnaga</i> (L)	73
Tableau 12 : Activité antimicrobienne des extraits de <i>Citrus limon</i>	74
Tableau 13 : Activité antimicrobienne des extraits de <i>Citrus sinensis</i>	74
Tableau 14 : Concentration minimale inhibitrice des extraits phénoliques (mg/ml)	75
Tableau 15 : Effet des extraits d' <i>Ammi visnaga</i> (L) sur les biofilms matures de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> .	82
Tableau 16 : Effet des extraits d'agrumes sur les biofilms matures de <i>Bacillus cereus</i> .	83
Tableau 17 : Effet des extraits d'agrumes sur les biofilms matures de <i>Staphylococcus aureus</i> .	84

Liste des figures

Figure 1. Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes	6
Figure 2. Exemples des structures chimiques des lignanes. (A) unité de phénylpropane C6-C3. (B)Sauriol A (lien β - β'). (C) rufescidride	6
Figure 3. Structure de base des flavonoïdes	7
Figure 4. Voie de biosynthèse des composés phénoliques (Dixon et Paiva, 1995).	8
Figure 5. Mécanismes d'action des antioxydants	10
Figure 6. Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale	11
Figure 7. Appareil végétatif des Apiacées	14
Figure 8. Inflorescence des Apiacées	15
Figure 9. <i>Ammi visnaga</i>	17
Figure 10. La structure chimique de khelline et visnagine	19
Figure 11. Répartition en cascade des genres appartenant à la famille des Rutaceae	19
Figure 12. Caractéristiques morphologiques d'un <i>citrus</i>	21
Figure 13. <i>Citrus limon</i>	22
Figure 14. Photo de l'orange sanguine (<i>citrus sinensis</i>)	25
Figure 15. Répartition géographique de la production d'agrumes destinés au marché de fruits frais pendant la période 2000-2004	27
Figure 16. Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm	29
Figure 17. Processus de sporulation de <i>Bacillus cereus</i>	33
Figure 18. Evaluation de la cinétique de croissance des isolats bactériens de <i>B. cereus</i> et <i>S. aureus</i> au cours de formation de biofilm.	51
Figure 19. Diagramme représentant l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique et l'adhérence de <i>B. cereus</i> et <i>S. aureus</i> .	53
Figure 20. Protocole de quantification de la formation de biofilm.	54
Figure 21. Répartition des souches de <i>B. cereus</i> et <i>S. aureus</i> en fonction des prélèvements.	55
Figure 22. Observation microscopique montrant des bacilles (a) et des spores (b,c) de <i>Bacillus cereus</i> .	55
Figure 23. Répartition des souches de <i>S. aureus</i> en fonction des prélèvements.	56
Figure 24. Identification de <i>Staphylococcus aureus</i>	57

Figure 25. Recherche des enzymes complémentaires	58
Figure 26. Pourcentage de résistance de <i>Bacillus cereus</i> aux antibiotiques	59
Figure 27. Pourcentage de résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques	59
Figure 28. Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes d' <i>Ammi visnaga</i> .	61
Figure 29. L'effet des différentes concentrations d'eau sur la teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes de <i>Citrus limon</i> et <i>Citrus sinensis</i> .	62
Figure 30. L'effet de variations de la quantité de poudre sèche de <i>Citrus sinensis</i> et <i>Citrus limon</i> sur la teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes.	63
Figure 31. Identification des pics présents sur le chromatogramme de l'extrait méthanolique d' <i>Ammi visnaga</i> visualisées à 280 nm.	64
Figure 32. Identification des pics présents sur le chromatogramme de l'extrait méthanolique de <i>Citrus limon</i> visualisées à 280 nm.	65
Figure 33. Identification des pics présents sur le chromatogramme de l'extrait méthanolique de <i>Citrus sinensis</i> visualisées à 280 nm.	66
Figure 34. Test de DPPH d' <i>Ammi visnaga</i> (L.).	68
Figure 35. Corrélation entre les activités antioxydantes (méthodes DPPH et FRAP) et la corrélation entre la teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes d'extrait d' <i>Ammi visnaga</i> .	68
Figure 36. Concentrations responsables à 50% d'inhibition du radical DPPH (IC50).	69
Figure 37. Effet des concentrations d'eau sur le piégeage du radical libre DPPH par <i>Citrus limon</i> , <i>Citrus sinensis</i> et l'acide ascorbique.	69
Figure 38. Effet de variation de la quantité de matière végétale sur le piégeage du radical libre DPPH° par <i>Citrus limon</i> , <i>Citrus sinensis</i> et l'acide ascorbique.	70
Figure 39. Pouvoir réducteur des extraits de la plante <i>Ammi visnaga</i> et de l'acide ascorbique.	70
Figure 40. Effet des concentrations d'eau (a) et de variation de la quantité de matière végétale (b) sur le pouvoir réducteur (FRAP) par <i>Citrus limon</i> , <i>Citrus sinensis</i> et l'acide ascorbique.	71
Figure 41. Cinétique de blanchissement du bêta carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de la plante <i>Ammi visnaga</i> et les écorces de <i>Citrus limon</i> et <i>Citrus sinensis</i> , et de la vitamine C en fonction du temps.	72
Figure 42. Effet de l'extrait méthanolique 70% sur la mobilité de <i>Bacillus cereus</i> .	75

Figure 43. Evaluation de la cinétique de croissance bactérienne de <i>Bacillus cereus</i> au cours de formation de biofilm.	77
Figure 44. Evaluation de la cinétique de croissance bactérienne de <i>Staphylococcus aureus</i> au cours de formation de biofilm.	78
Figure 45. Evaluation de la biomasse adhéree de <i>Bacillus cereus</i> au cours de formation de biofilm.	80
Figure 46. Evaluation de la biomasse adhéree de <i>Staphylococcus aureus</i> au cours de formation de biofilm.	80
Figure 47. % d'inhibition des biofilms matures de <i>Bacillus cereus</i> par l'enzyme protéinase K	86
Figure 48. % d'inhibition des biofilms matures de <i>Staphylococcus aureus</i> par l'enzyme protéinase K	87
Figure 49. % d'inhibition des biofilms matures de <i>Bacillus cereus</i> par l'enzyme trypsine.	87
Figure 50. % d'inhibition des biofilms matures de <i>Staphylococcus aureus</i> par l'enzyme trypsine.	87
Figure 51. Evaluation de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique de <i>Bacillus cereus</i> .	88
Figure 52. Evaluation de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique de <i>Staphylococcus aureus</i> .	88
Figure 53. Evaluation de l'effet d'acide salicylique sur les biofilms matures de <i>Bacillus cereus</i>	89
Figure 54. Evaluation de l'effet d'acide salicylique sur les biofilms matures de <i>Staphylococcus aureus</i> .	89

Résumé

Staphylococcus aureus et *Bacillus cereus* sont des pathogènes opportunistes responsables des toxi-infections alimentaires dans une partie est due à leurs capacité de coloniser beaucoup de surfaces biotiques et abiotiques. Ces toxi-infections persistantes peuvent être difficiles à traiter en raison d'un grand répertoire de facteur de virulence, et les capacités d'organisation pour former des biofilms. Actuellement, l'usage de la médecine traditionnelle est très répandu et revêt une importance sanitaire et économique croissante. Les extrais naturels des plantes contiennent une variété de composés phénoliques aux quels sont attribuées diverses activités biologiques. Pour cela nous avons établi à une étude expérimentale pour déterminer l'activité antioxydante, l'effet antibactérien et le pouvoir antibiofilm des extraits bruts obtenus à partir de la plante *Ammi visnaga* et deux variétés d'agrumes soient *Citrus limon* et *Citrus sinensis*. La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et celle des flavonoïdes en utilisant la méthode de chlorure d'aluminium (AlCl₃). Les valeurs obtenues sont de (172, 66 mg/g), (33,5 mg/g) et (19,95 mg /g) pour les polyphénols et de (22 mg /g) et (2,977 mg /g) et (1,33 mg /g) pour les flavonoïdes dans les extraits d'*Ammi visnaga*, *Citrus limon* et *Citrus sinensis*, respectivement. Les résultats des analyses HPLC/UV effectuées sur les extraits méthanoliques indiquent qu'ils comportent des métabolites secondaires, les plus détectées sont des flavonoïdes. Le pouvoir antioxydant a été évalué par la technique de piégeage du radical libre (DPPH), la réduction du fer (FRAP) et le blanchissement de la β carotène. Pour le premier test les valeurs d'IC50 ont été estimées à (1, 46 mg /ml), (7,62mg/ml) et (9,45mg/ml) pour l'extrait d'*Ammi visnaga*, *Citrus limon* et *Citrus sinensis* respectivement. L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits par la méthode de diffusion des puits dans un milieu solide, a montré que tous les extraits possèdent un pouvoir antibactérien sur toutes les souches testées de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, et ce pouvoir se diffère d'une souche à une autre selon la nature de l'extrait et sa concentration. L'effet inhibiteur des extraits de plantes contre la croissance et la formation de biofilm a montré que les extraits végétaux ont un effet important sur l'inhibition de biofilms matures formés par les souches étudiées. Par ailleurs, nous avons constaté que tous les extraits étudiés possèdent un pouvoir antioxydant et semblent exercer un effet antibactérien et antibiofilm contre les isolats pathogènes utilisés dans la présente étude.

Mots-clés : Polyphénols, Flavonoïdes, antioxydant, biofilm, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.

Abstract

Staphylococcus aureus and *Bacillus cereus* are opportunistic pathogens responsible for foodborne illness in one part due to their ability to colonize many biotic and abiotic surfaces. These persistent poisonings can be difficult to treat due to a large repertoire of virulence factors, and organizational abilities to form biofilms. At present, the use of traditional medicine is widespread and it has an increasing health and economic importance. Natural plant extracts contain a variety of phenolic compounds to which various biological activities are attributed. For that we have established an experimental study to determine the antioxidant activity, the antibacterial effect and the antibiofilm power of the crude extracts obtained from the *Ammi visnaga* plant and two varieties of citrus fruits are *Citrus limon* and *Citrus sinensis*. The total content of phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu reagent and that of the flavonoids using the aluminum chloride (AlCl₃) method. The values obtained were (172.66 mg / g), (33.5 mg / g) and (19.95 mg / g) for polyphenols and (22 mg / g) and (2.977 mg / g) and (1.33 mg / g) for flavonoids in the extracts of *Ammi visnaga*, *Citrus limon* and *Citrus sinensis*, respectively. The results of the HPLC / UV analyzes performed on the methanolic extracts indicate that they comprise secondary metabolites, the most detected are flavonoids. The antioxidant power was evaluated by free radical scavenging (DPPH), iron reduction (FRAP), and bleaching of β -carotene. For the first test, IC₅₀ values were estimated at (1.46 mg / ml), (7.62 mg / ml) and (9.45 mg / ml) for *Ammi visnaga* extract, *Citrus limon* and *Citrus sinensis* respectively. The evaluation of the antimicrobial power of the extracts by the method of diffusion of the wells in a solid medium showed that all extracts possess an antibacterial power on all the tested strains of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* and this power differs from a strain to another according to the nature of the extract and its concentration. The inhibitory effect of plant extracts on the growth and formation of biofilm has shown that plant extracts have an important effect on the inhibition of mature biofilms formed by the strains studied. Furthermore, we found that all the extracts studied possess antioxidant power and appear to exert an antibacterial and antibiofilm effect against pathogenic isolates used in the present study.

Keywords: Polyphenols, Flavonoids, antioxidant, biofilm, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.

الملخص

يعتبر النوعين *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* من البكتريا المسببة للأمراض الانتهازية و قدرتها على استعمار العديد من الأسطح الحيوية وغير الحيوية هي أحد الجوانب التي جعلت منها مسؤولة عن الأمراض المنقولة بالأغذية. هذا ومن الصعب علاج هذه الأمراض الصعبة الإزالة لكونها ذخيرة للكثير من عوامل الأمراض ولقدرتها على تشكيل البيوفيلم. يستخدم الطب التقليدي حاليا، على نطاق واسع وقد اكتسب أهمية صحية واقتصادية متزايدة. فالمستخلصات النباتية الطبيعية تحتوي على مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية ذات تأثيرات بيولوجية مختلفة. وعليه فقد قمنا بإعداد دراسة تجريبية لتحديد النشاط المضاد للأوكسدة والتأثير المضاد للميكروبات والبيوفلم لمستخلصات خامة تم الحصول عليها من نبات *Ammi visnaga* واثنين من أصناف من الحمضيات هي *Citrus limon* و *Citrus sinensis*. تم تحديد المحتوى الكلي للمركبات الفينولية لهذه المستخلصات باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu و محتوى الفلافونويدات باستخدام طريقة كلوريد الألومنيوم (AIC13). القيم المتحصل عليها هي (172, 66 mg/g و 33,5 mg/g) و (19,95mg /g) للمركبات الفينولية و (22 mg /g) و (2,977 mg /g) و (1,33 mg /g) للفلافونويدات في مستخلصات *Ammi visnaga* و *Citrus limon* و *Citrus sinensis* على التوالي. إن نتائج تحليل HPLC/UV على المستخلصات الميثانولية تشير إلى أنها تشمل مواد أيضا ثانوية أكثرها فلافونويدات. تم تقييم القدرة المضادة للأوكسدة باستخدام تقنية تكبيل الجذر الحر (DPPH) و اختزال الحديد (FRAP) وتبييض β carotène حيث قدرت قيم IC50 للاختبار الأول ب (1, 46 mg /ml) و (7,62mg/ml) و (9,45mg/ml) في مستخلصات *Ammi visnaga* و *Citrus limon* و *Citrus sinensis* على التوالي. أظهر تقييم القدرة المضادة للميكروبات للمستخلصات بطريقة الانتشار في الأبار في وسط صلب أن جميع المستخلصات تمتلك قدرة مضادة لنمو جميع السلالات المختبرة التابعة ل *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* حيث أن هذه القدرة تختلف من سلالة إلى أخرى حسب طبيعة المستخلص وتركيزه. وأظهر التأثير المثبط للمستخلصات النباتية على نمو وتشكيل البيوفيلم أن المستخلصات النباتية لها تأثير هام على تثبيط أنواع البيوفيلم الناضجة التي تشكلها السلالات المدروسة. وعلاوة على ذلك، وجدنا أن جميع المستخلصات التي تمت دراستها تمتلك قوة مضادة للأوكسدة ولها تأثير مضاد للمكروبات والبيوفيلم للمكروبات المستعملة في هذه الدراسة.

الكلمات المفتاحية: البوليفينول، الفلافونويد، المضادة للأوكسدة، بيوفيلم، المكورات العنقودية الذهبية، العصوية الشمعية.



Introduction

Introduction

L'Algérie possède un patrimoine végétal important en raison de sa richesse et sa diversité dans les régions, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes, on y trouve plus de 3000 espèces végétales. Parmi ces ressources naturelles les plantes aromatiques et médicinales, elles occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines comme l'industrie alimentaire, pharmaceutique, conserverie et le domaine de la phytothérapie (**Duraffourd *et al.*, 1997**).

En effet, les plantes possèdent des milliers de substances actives à l'intérieur de leurs organes (feuilles, fleurs, racines,) et peuvent, selon des techniques chimiques, permettre l'isolation du principe actif pour l'utiliser en pharmacie. Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (**Duraffourd *et al.*, 1997**).

Les plantes sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Avec leur diversité structurale remarquable, ces derniers, également appelés polyphénols, constituent une richesse déjà largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Les polyphénols (principalement, flavonoïdes, acides phénoliques, tannins) sont présents dans toutes les parties de la plante.

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels (**Bougandoura *et al.*, 2012**). Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées (**Suhaj, 2006 ; Tadhani, 2007**), dont les polyphénols qui ont une importance croissante grâce à leur rôle d'antioxydants naturels (**Dugas *et al.*, 2000**). Ces activités sont attribuées en partie à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres mais aussi à leur affinité pour une grande variété de protéines dont certains enzymes et récepteurs.

Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Ammi*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions arides et semi arides. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles

renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Ammi visnaga*. Cette plante largement utilisée pour traiter les calculs rénaux, l'Asthme, les maladies respiratoires ...etc. a constitué le sujet de plusieurs études qui font déterminer leurs compositions chimiques (**Chopra et al., 1960 ; Badr et al., 2004**), ainsi que les propriétés biologiques.

Les écorces d'agrumes sont riches en composés phénoliques, essentiellement des flavonoïdes et des acides phénoliques. Les flavonoïdes des écorces d'agrumes sont caractérisés par leur activité antioxydante, thérapeutique, antivirale, antifongique et antibactérienne (**Bocco et al., 1998 ; Ma et al., 2009 ; Huang et al., 2010**). Grâce à cette richesse, l'extraction des composés phénoliques à partir des écorces d'agrumes a considérablement attiré l'intérêt scientifique pour les utiliser comme des antioxydants naturels, conservateurs principalement dans les aliments mais aussi dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique (**Ramful et al., 2010**). Ces quelques applications potentielles des substances bioactives des écorces d'agrumes en alimentation fonctionnelle, en pharmacie et en cosmétique ou en d'autres applications telles que la chimie et la conception de nouveaux matériaux ne sont possibles que si les molécules sont extraites tout en gardant leurs fonctionnalités. Les sous-produits de la transformation des agrumes sont une source potentielle de flavonoïdes naturels : les écorces d'agrumes contiennent une forte concentration de composés phénoliques. Les flavonoïdes sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (**Bruneton, 1999**).

Le biofilm étant une communauté structurée de micro-organismes, fixée à une surface inerte ou vivante et réunies au sein d'une matrice d'exopolysaccharides adhésive et protectrice qu'ils sécrètent. Il représente le mode de vie majoritaire des micro-organismes dans l'environnement (**Costerton et al., 1999 ; Van Houdt et Michiels, 2005 ; Espinasse et al., 2010**). Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de micro-organismes (**Behlau et Gihmore, 2008**). Les biofilms sont la source de nombreux problèmes dans l'industrie agro-alimentaire, en termes d'hygiène alimentaire et d'altération des qualités organoleptiques des produits alimentaires. Ils sont présents dans tous les secteurs : laiteries, brasseries, meuneries, sucreries, salaisonneries, etc. (**Jeyasekaran et al., 2000**).

L'objectif principal de cette étude est de tenter d'évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne des composés polyphénoliques extraits à partir de la plante aromatique *Ammi*

visnaga et des écorces d'agrumes (orange et citron). Et par la suite tenter de prouver leur pouvoir à éradiquer les biofilms bactériens formés par les deux espèces *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* responsables d'intoxications alimentaires.

Dans une première partie, une recherche bibliographique présente des généralités sur l'activité antioxydante des composés phénoliques et leurs propriétés, ainsi que des données botaniques sur les échantillons végétaux étudiés : la plante *Ammi visnaga* et les écorces de *Citrus limon* et de *Citrus sinensis*. Ensuite des généralités sur les biofilms bactériens formés par les deux espèces *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

Dans une deuxième partie, nous avons procédé à une approche expérimentale comprenant une mise au point des techniques sur l'extraction, la séparation et la quantification des composés phénoliques, ainsi que l'établissement des gammes étalons nécessaires à la quantification. Les extraits obtenus ont fait par la suite l'objet d'une série de criblages chimiques et biologiques, notamment les tests d'activité antioxydante et antibactérienne. Parallèlement, les deux souches étudiées dans le cadre de cette étude ont été isolées à partir de denrées alimentaires pour être ensuite identifiées par les tests biochimiques classiques et par des systèmes API.

Pour finir, l'effet des extraits végétaux obtenus a été testé sur la croissance planctonique et la formation de biofilm par les deux espèces *B. cereus* et *S. aureus*. De plus, une étude comparative a été menée en évaluant l'influence des enzymes (la trypsine et la protéinase K) et de l'acide salicylique sur la croissance et l'adhérence de ces deux espèces.



Etude bibliographique

Chapitre I : les polyphénols d'origine naturelle

Partie 1 : Les Polyphénols, structure et propriétés

1. Présentation générale des polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal étant trouvé dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Plus de 8000 structures ont été identifiées (**Waksmundzka-Hajnos et Sherma, 2011**), allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (**Dai et Mumper, 2010**). Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, froid, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (**Visioli et Galli, 2000**).

La nature et la fonction des composés phénoliques s'accumulant dans les plantes sont variables. Ils présentent des propriétés antimicrobiennes; ce sont des phytoalexines. Ces composés de défense regroupent différentes classes de composés tels que les isoflavonoïdes prénylés, les stilbènes, les coumarines, les flavonols ou encore les auronnes. D'autres composés ont des fonctions dans la signalisation comme l'acide salicylique, molécule signal dans les mécanismes de résistance. La blessure et l'attaque par des herbivores induisent la synthèse de l'acide chlorogénique ou d'esters phénoliques liés aux parois cellulaires, ces composés pouvant agir directement en tant que molécules de défense ou servir de précurseurs à la synthèse de la lignine, de la subérine et autres barrières polyphénoliques. Par ailleurs, la quantité d'anthocyanines augmente fortement après un stress au froid ou un stress nutritionnel (**Hoffmann, 2003**).

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton, 1999**). Ils sont communément subdivisés en acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou dérivés de l'acide cinnamique), coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines, tanins (**Cheyrier, 2005**).

2. Classification des polyphénols

Le tableau 1 regroupe les principales classes des composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005).

Tableau 1 : Les principales classes des composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simple	Catéchol	
C6-C3	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïques	Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamique	Acide caféique, acide férulique	Pomme de terre, pomme
	Coumarines	Scopolétine, esculétine	Citrus
C6-C2-C6	Silènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes		
	• Flavonols	Kamphérol, quercétine	Fruits, légumes, fleurs
	• Anthocyanes	Cyanidine, pélargonidine	Fleurs, fruits rouges
	• Flavanols	Catéchine, épicatechine	Pomme, raisin
	• Flavanones	Naringénine	Citrus
	• Isoflavonols	Daidzéine	Soja
(C6-C3) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C6-C3) _n	Lignines		Bois, noyau de fruits
(C15) _n	Tanins		Raisin rouge, kaki

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes : Les non flavonoïdes dont les principaux composés sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines (Hoffmann, 2003) ; et les flavonoïdes, dont on caractérise principalement : les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols (Pincemail *et al.*, 2007).

2.1. Les non flavonoïdes

2.1.1. Acides phénoliques (C₆-C₁ ou C₆-C₃)

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous formes d'esters ou de glycosides, (Macheix *et al.*, 2005). Les principaux

acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides phydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique (Chanforan, 2010).

Les acides hydroxycinnamiques sont retrouvés dans toutes les parties des fruits et des légumes, quoique les concentrations les plus élevées soient observées dans la partie externe du fruit mûr (De La Rosa *et al.*, 2009).

2.1.2. Stilbènes (C₆-C₂-C₆)

Les stilbènes présentent une structure en C₆-C₂-C₆, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para. Les deux noyaux aromatiques sont reliés par une double liaison, formant un système conjugué.

Ces composés sont présents dans de nombreuses familles de plantes supérieures mais les principales sources alimentaires sont le raisin (les graines, la peau, et les tiges) et le vin (Sun *et al.*, 2006) (Figure 1).

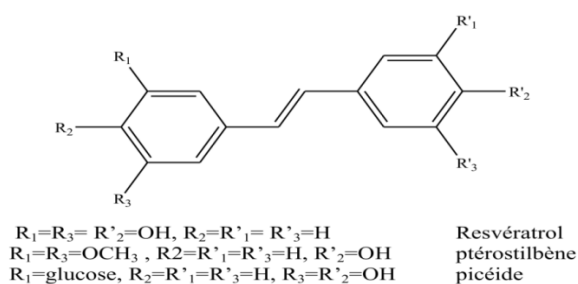


Figure 1. Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes

2.1.3. Lignanes (C₆-C₃)₂

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C₆-C₃)₂, l'unité (C₆-C₃) est considérée comme un propylbenzène. Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques. On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes (Peterson *et al.*, 2010) (Figure 2).

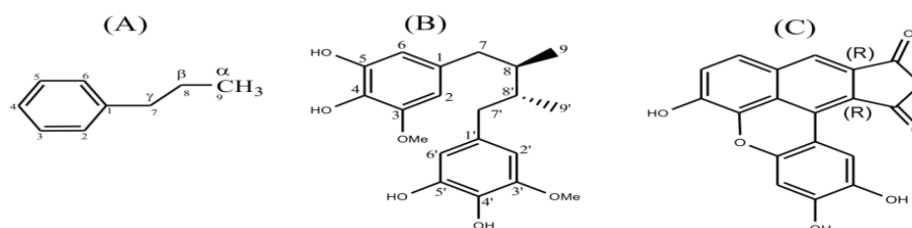


Figure 2. Exemples des structures chimiques des lignanes. (A) unité de phénylpropane C₆-C₃. (B) Sauriol A (lien β-β'). (C) rufescidride

2.2. Les flavonoïdes C₆-C₃-C₆

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (**Ghedira, 2005**). Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C₆-C₃-C₆), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base: deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones (**Figure 3**) liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (**Tapas et al., 2008**).

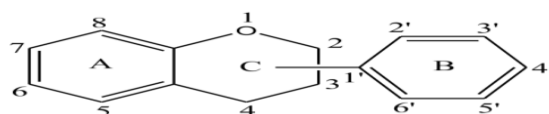


Figure 3. Structure de base des flavonoïdes (**Di Carlo et al., 1999**).

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans les plantes, et la liste ne cesse de croître. C'est à cause de l'apparition de nombreux modèles de substitution ; les substituants primaires (groupe hydroxyle) peuvent eux-mêmes être substitués (glycosylés ou acylés) donnant parfois des structures très complexes (**D'Archivio et al., 2007**). Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols les flavones, les flavanones, les flavanols, les isoflavones et les anthocyanes (**Sadasivam et al., 2003**), ils varient dans leurs caractéristiques structurelles par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle.

2.3. Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Très répandu dans le règne végétal ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. On distingue: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Roux et Catier, 2007**).

Les tanins sont largement répandus dans les organismes végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales et diverses boissons. Dans l'alimentation humaine, les sources les plus importantes de tannins sont le vin et le thé (**Pénicaud, 2009**).

3. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont issus par deux grandes voies métaboliques : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate/malonate.

3.1. Voie de l'acide shikimique

La voie de l'acide shikimique (**Figure 4**) est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes et les micro-organismes, y compris les acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ce sont des métabolites primaires qui servent de précurseurs pour de nombreux produits naturels (secondaire) tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, les alcaloïdes... (**Ghasemzadeh, 2011**).

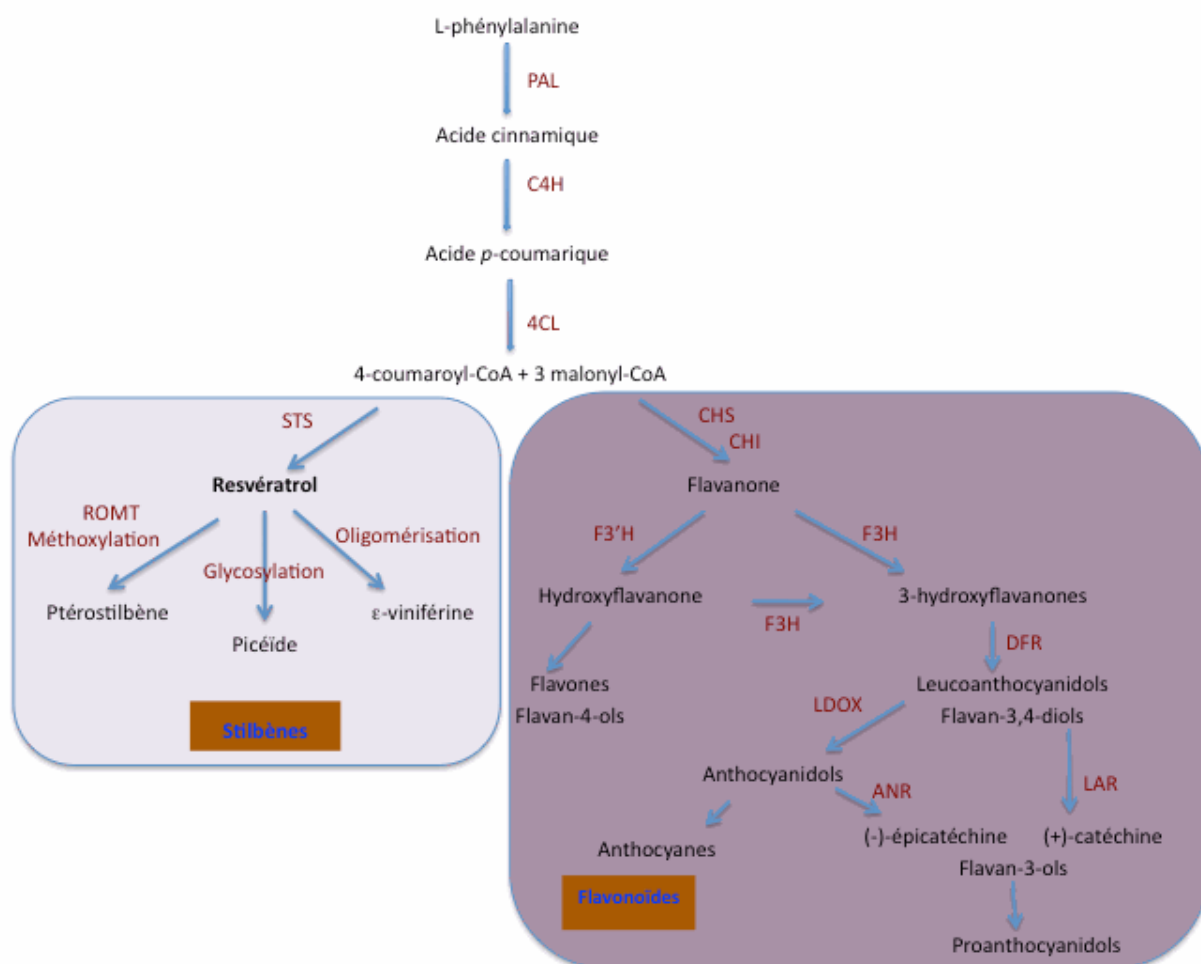


Figure 4. Voie de biosynthèse des composés phénoliques (Dixon et Paiva, 1995).

ANR : anthocyanidine réductase ; ANS : anthocyanidine synthase ; C₄H : cinnamate-4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate coenzyme A ligase ; CHS : chalcone synthase ; CHI : chalcone isomérase ; DFR : dihydroflavonol réductase ; F₃'H : NASPH-cytochrome P₄₅₀-flavonoïde 3'5'-hydroxylase ; F₃H : flavanone 3-B-hydroxylase ; LAR : leucoanthocyanidine réductase ; LDOX : leucoanthocyanidine dioxygénase ; PAL : phénylalanine ammonialyase ; ROMT : resvératrol O-méthyl transférase ; STS : stilbène synthase.

3.2. Voie de l'acétate / malonate

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétylCoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Akroum, 2010**).

4. Propriétés chimiques des polyphénols

4.1. Polarisabilité

La polarisabilité des phénols leur permet de développer de fortes interactions moléculaires de dispersion (composante attractive des interactions de Vander Waal) avec autres composés polarisables. Ce phénomène résulte du couplage entre les fluctuations électroniques de deux molécules voisines. Ainsi, en solution aqueuse, l'interaction du noyau benzénique apolaire du phénol avec une autre entité polarisable telle qu'un second cycle aromatique est favorisée par l'effet hydrophobe (**Nkhili, 2009**).

4.2. Liaison hydrogène

Les phénols sont des donneurs de liaison hydrogène (liaison H) en raison du caractère acide du proton du groupe OH. Ce sont aussi des accepteurs de liaison H. En fait, seule la paire libre de l'atome O qui n'est pas conjuguée avec le cycle est capable d'accepter une liaison H en provenance d'un donneur. Ainsi, un phénol est capable de donner une liaison H et d'en recevoir une seulement. Notons que ces liaisons H se renforcent mutuellement (coopérativité) (**Nkhili, 2009**).

5. Antioxydants et systèmes de défense

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (**Cano et al., 2006**).

Les antioxydants d'origine alimentaire participent soit directement, soit comme constituants ou précurseurs de défenses endogènes au contrôle du stress oxydant. Ainsi, outre les polyphénols, les vitamines E et C, les caroténoïdes et les composés alliacés, ou les éléments trace (zinc, sélénium, cuivre manganèse) constituants des défenses enzymatiques antioxydants, d'autres constituants de l'alimentation, comme les vitamines du groupe B, le chrome ou le magnésium, agissent comme des antioxydants indirects via la régulation de l'homocystéinémie (vitamines du groupe B), l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (chrome) ou la lutte contre l'inflammation (magnésium) (**Figure 5**) (**Evans et Halliwell, 2001**).

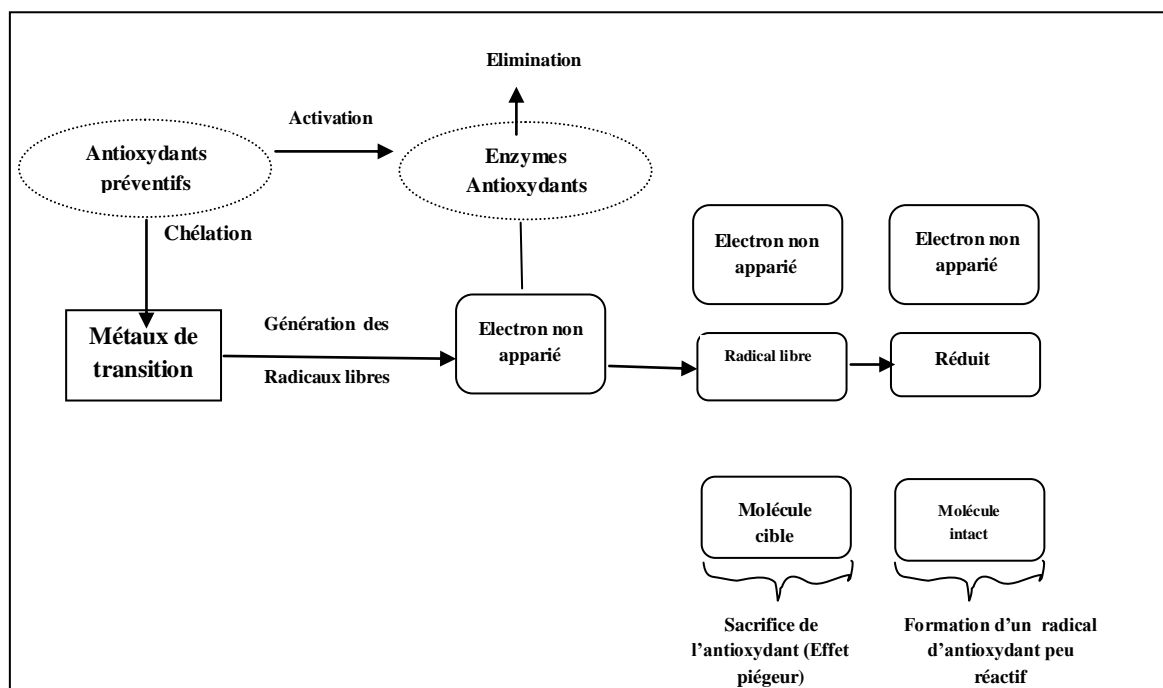


Figure 5. Mécanismes d'action des antioxydants (**Kalam et al., 2012**).

5.1. Stress oxydatif

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de L'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant (**Papazian et Roch, 2008 ; Christophe, 2011**).

5.2. Origine cellulaire des espèces réactives de l'oxygène

Pour rappel, un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante « libre » en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Goudable et Favier, 1997).

La mitochondrie est le siège majoritaire de la synthèse des radicaux superoxydes (Guidot *et al.*, 1995 ; Turrens, 1997) (Figure 6). Durant la respiration, quatre électrons sont ajoutés à l'oxygène par le complexe IV de la chaîne respiratoire, cependant l'oxygène peut être réduit en formant des espèces réactives de l'oxygène telles que l'O₂⁻ et l'HO. La production de ces espèces réactives est nettement accélérée lors de la réduction du flux respiratoires notamment au cours de maladies génétiques (Lacolley, 2007).

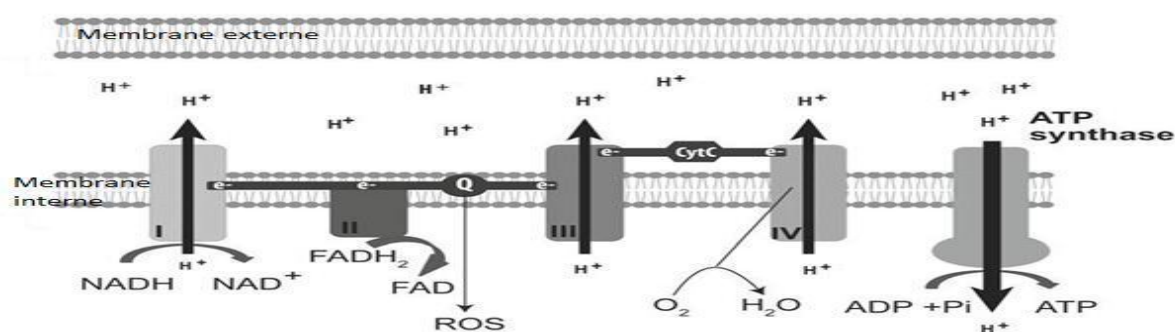


Figure 6. Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale (Alcaraz *et al.*, 2013).

5.3. Conséquence du stress oxydatif

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN (Bonnet *et al.*, 2010), les lipides (peroxydation), les protéines (Jacob, 2007)...etc. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète, dégradation des cellules et des tissus (Bonnet *et al.*, 2010).

6. Types des antioxydants

6.1. Antioxydants non enzymatiques

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Ils peuvent se comporter comme des piègeurs des radicaux libres par les interventions directes sur les molécules prooxydantes ou indirectement, en chélatant les métaux de transition, empêchant ainsi la réaction de Fenton. Ce type d'antioxydants possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au cœur des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques (**Stocker *et al.*, 1987; Piquet et Hébuterne, 2007**). Parmi les antioxydants naturels de faible poids moléculaire, on peut citer les plus connus et les plus importants ci-dessous :

6.1.1. Acide ascorbique (vitamine C)

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène. Après ingestion, elle passe rapidement dans le sang puis diffuse de façon variable dans tous les tissus. Un apport quotidien minimal d'origine alimentaire est donc nécessaire, celui-ci provient essentiellement des fruits et légumes frais (**Fain, 2004**). La vitamine C est nécessaire pour de nombreuses fonctions physiologiques de la biologie humaine. La plupart des plantes et des animaux peuvent synthétiser l'acide ascorbique sauf les singes et les humains en raison du manque de l'enzyme gulonolactone oxydase (**Naidu, 2003**).

Elle est un antioxydant puissant hydrosoluble, capable de piéger / neutraliser à des concentrations très faibles les espèces réactives de l'oxygène (**Carr, 1999 ; Césarini, 2004**).

6.1.2. Tocophérols (dont la vitamine E)

Les tocophérols sont des composés liposoluble, ils regroupent quatre substances dont l'alpha-tocophérol aussi appelé Vitamine E est l'antioxydant majeur, la plus active biologiquement (**Wang et Quinn, 2006**).

6.1.3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments fabriqués par les végétaux. Les plus importants sont le bêta-carotène, l'alpha-carotène, la lutéine, la zéaxanthine et le lycopène. Ce sont

d'excellents piègeurs d'espèces radicalaires particulièrement vis-à-vis de la lipoperoxydation des phospholipides membranaires grâce à leurs structures (**Packer, 2001**).

6.2. Antioxydants de synthèse

Il existe de nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels (**Lee, 2009**). Pour une utilisation pratique, les antioxydants doivent remplir les conditions suivantes : Ils ne doivent pas être toxiques, ils doivent être hautement actifs à des faibles concentrations (0.01-0.02%) et doivent être présents à la surface ou dans la phase grasse de l'aliment (**Bauer, 2010**).

7. métabolites secondaires des plantes

A l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol (**Bénard, 2009**).

Au niveau tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme. Au niveau de la plante entière, il faut noter que certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis (**Bénard, 2009**).

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans le métabolisme de la plante mais aussi peuvent réagir dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV). Toutes les catégories de composés phénoliques sont impliquées dans les mécanismes de résistance (**Dicko et al., 2006**). Ils assurent la communication entre cellules, entre végétaux et entre végétaux et animaux (**Robert et Catesson, 2000**).

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeurs thérapeutiques. Toutes fois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages, n'oublions pas que de temps en temps et à l'exception de ces cents dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse des maladies bénignes, rhum ou toux ou plus sérieuses tel que la tuberculose ou la malaria (**Eddouks et al., 2007**).

Partie 2 : La famille des *Apiacées* ex-Ombellifères (*Ammi visnaga*)

1. Description de la famille des *Apiacées*

Les *Apiacées* anciennement appelées Ombellifères, comprennent environ 3000 espèces se répartissant dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord. C'est une famille très homogène facile à reconnaître grâce à son inflorescence en ombelles composées. Paradoxalement, les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres (**Paloma, 2012**).

Les plantes de la famille des *Apiacées* sont essentiellement des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou le plus souvent vivaces (**Figure 7**).

L'appareil souterrain pérennant est très varié : racine pivotante, rhizome ou tubercule.

La tige est ordinairement cannelée et creuse par résorption précoce de la moelle au cours de la croissance ; elle est dite fistuleuse.

Les feuilles sont alternes, souvent très découpées. La nervation étant pennée et la découpe séquée, on parle de feuille pennatiséquée.

La gaine est très développée ; chez certaines espèces, la feuille se réduit même à la gaine.

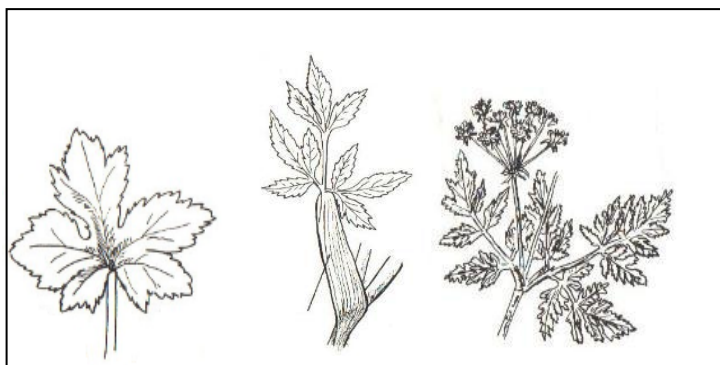


Figure 7. Appareil végétatif des *Apiacées* (**Deysson, 1979**).

La majorité des *Apiacées* sont des plantes aromatiques grâce à leurs sécrétions d'huile essentielle. La totalité de l'appareil végétatif est parcouru de canaux sécréteurs contenant un mélange d'essence et de résines. Ces canaux sont très abondants au niveau des tiges où l'on trouve un canal au niveau de chacune des cannelures. Pourtant, c'est au niveau des fruits que ces canaux sont les plus nombreux et les plus intéressants. Ces canaux sécréteurs appelés aussi bandelettes sécrétrices sont situés au centre des organes de la plante et constitués d'une assise de cellules sécrétrices de forme allongée appelées poches sécrétrices. Ces dernières sécrètent les essences qui sont délivrées dans le canal central. Ces canaux expliquent l'odeur forte qui se dégage des *Apiacées* lorsqu'on les broie (**Deysson, 1979 ; Dupont et Guignard, 2007**).

2. Appareil reproducteur des *Apiacées*

2.1. L'inflorescence ou ombelle

L'inflorescence est la partie la plus importante de la plante car c'est grâce à elle que la famille des *Apiacées* est facilement reconnue. Avant la classification APG, cette famille portait le nom d'Ombellifères en référence à son inflorescence bien caractéristique. Les fleurs sont en effet groupées en ombelles simples et le plus souvent, en ombelles composées (**Botineau, 2010**) (**Figure 8**).

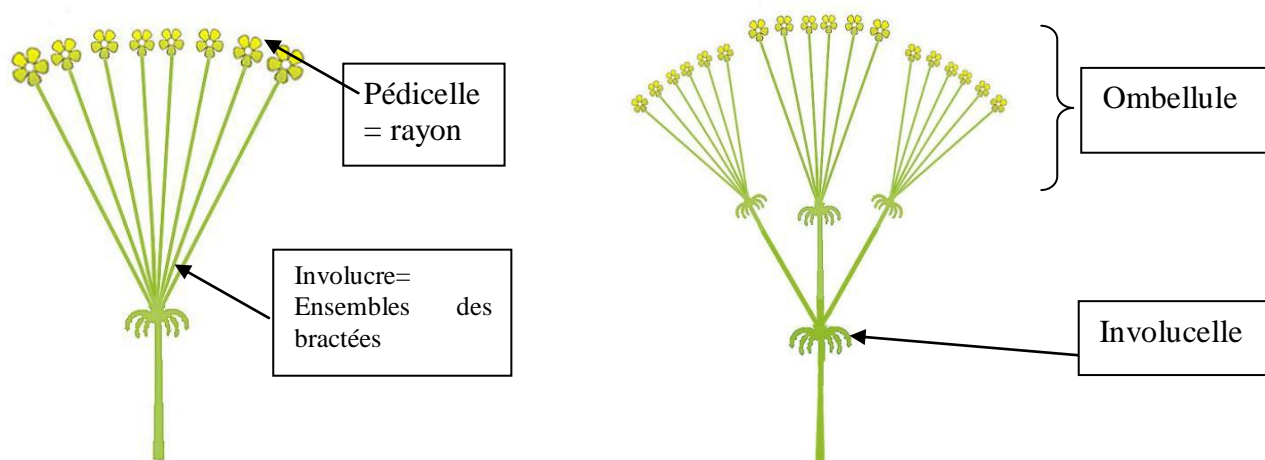


Figure 8. Inflorescence des *Apiacées* (**Paloma., 2012**).

L'ombelle est constituée par des pédicelles ou rayons insérés sur un même point de la tige. Les fleurs s'épanouissent toutes à un même niveau au bout de chaque pédicelle. Chaque rayon est en principe axilé par une bractée mais bien souvent seules les plus externes persistent et forment l'involucre. Lorsque les pédicelles sont très courts, les fleurs deviennent sessiles. On obtient un capitule et on s'approche alors de la famille des *Astéracées*.

L'ombelle composée est formée d'un groupement d'ombelles appelées alors ombellules. Chaque ombellule possède à sa base un involucelle. L'ombelle peut être pourvue d'une fleur terminale au centre de l'inflorescence. Cette fleur diffère des autres par son pédoncule plus court, son organisation florale et sa couleur (**Botineau, 2010**).

L'ombelle est souvent polygame : les fleurs centrales sont bisexuées et les fleurs périphériques sont mâles. Par ailleurs, celles-ci sont mûres les premières et possèdent souvent

une corolle plus développée et dissymétrique par suite d'un accroissement plus grand des pétales extérieurs. Les fleurs périphériques stériles servent d'organe d'attraction pour les insectes pollinisateurs tandis que les fleurs centrales sont réservées à la reproduction. L'ombelle entière tend à simuler une fleur unique (**Botineau, 2010**).

3. Caractéristiques botaniques

3.1. Classification de la famille des *Apiacées*

Les plantes de la famille des *Apiacées* appartiennent à l'embranchement des Spermatophytes ou Phanérogames car ce sont des plantes à graines. Les Spermatophytes sont classées en deux catégories : les Gymnospermes qui sont des plantes à ovules nus ; et les Angiospermes qui par évolution ont des ovules protégés par des ovaires. Parmi les Angiospermes, on distingue les Monocots et par évolution les Eudicots suivant la structure de l'embryon contenu dans la graine. En effet, l'embryon des Monocots ne contient qu'un seul cotylédon qui sert de réserve d'énergie alors que les Eudicots en possèdent deux (**Deysson, 1979 ; Dupont et Guignard, 2007**).

Tableau 2 : Classification de la famille des *Apiacées* (*Ammi visnaga*) (**APG III, 2009**).

Règne	Plantae
Ordre	Apiales
Sous-ordre	Apiienea
Famille	Apiaceae
Sous-famille	Apiioideae
Tribu	Apieae
Genre	<i>Ammi</i>
Espèce	<i>Visnaga</i>

3.2. L'espèce *Ammi visnaga*

Ammi visnaga (L.) Lam. (khella) est une plante médicinale aromatique et commerciale au goût amer principalement connue au Maghreb alors qu'elle pousse spontanément dans tout le bassin méditerranéen. C'est une plante spontanée très abondante, principalement dans la région du nord. Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle. Une décoction des fruits de la plante soulage les diabétiques, traite les abcès, lutte contre les maladies affectant les intestins et apaise différentes douleurs, notamment la migraine (**Badr et al., 2013**) (**Figure 9**).

Les extraits des semences de cette plante sont employés dans la médecine pour le traitement des maladies coronariennes et de l'asthme bronchiale. La khelline, la visnagine et la visnadine sont les principes actifs des fruits d'*Ammi visnaga*. Ils sont ainsi utilisés dans l'industrie pharmaceutique (Sittig, 1988 ; Grayna *et al.*, 1998 ; Kleeman *et al.*, 1999). La teneur de ces composés dans les fruits secs varie largement selon les facteurs génétiques et les conditions environnementales (Gynayd et Erim, 2002). *Ammi visnaga* est une plante annuelle, de 1 mètre de hauteur, à feuilles à segments linéaire canaliculés. En grappes et à bouquets avec de petites fleurs blanches. Elles dégagent un parfum puissant et produisent un nectar abondant attirant de nombreux insectes. Le fruit est un petit diakène ovale de 2-2,5 mm.

La floraison a lieu de juillet à septembre. L'inflorescence est une ombelle d'ombellules très denses composées de très nombreux rayons épaissis et connivents après la floraison qui s'insèrent sur un réceptacle dilaté en disque à maturité. Les fleurs sont blanches. L'involucre comporte des folioles divisés en lanières linéaires-filiformes (Geoff *et al.*, 2005).



Figure 9. *Ammi visnaga* (L.).

3.2.1. Habitat et culture

Originnaire d'Afrique du Nord, l'*Ammi visnaga* pousse à l'état sauvage au Moyen-Orient et dans les autres pays méditerranéens. Il s'est également acclimaté en Australie et en Amérique du Sud. On le cultive largement, par semis. Les graines sont enfermées dans de minuscules fruits qui, avant d'être complètement mûrs, sont repiqués à la fin de l'été (Geoff *et al.*, 2005).

3.2.2. Composition chimique

Trois substances cristallines distinctes ont été extraites des fruits à l'état pur : la khelline, la visnagine et le khellol glucoside (Furanochromones). Les fruits contiennent environ 1 % de khelline, 0,1 % de visnagine et 0,3 % de khellol glucoside. Les autres principaux constituants sont : Coumarines (visnadine), Flavonoïdes, Huile essentielle et Phytostérols (**Chopra et al., 1960**).

La khelline est un élément utilisé en thérapeutique. Certains ont soutenu en outre que le khellol glucoside est un vaso-dilatateur des coronaires; mais d'autres le contestent. Quant à la visnagine, si elle a une action physiologique, elle existe en quantité tellement minime que son importance est négligeable. De point de vue botanique, selon Anrep et ses collaborateurs, la khelline est un puissant vaso-dilatateur des coronaires beaucoup plus actif que l'aminophylline; elle séjourne plusieurs heures dans le système circulatoire, de sorte qu'elle peut exercer une action prolongée (**Chopra et al., 1960**) (**Figure 10**).

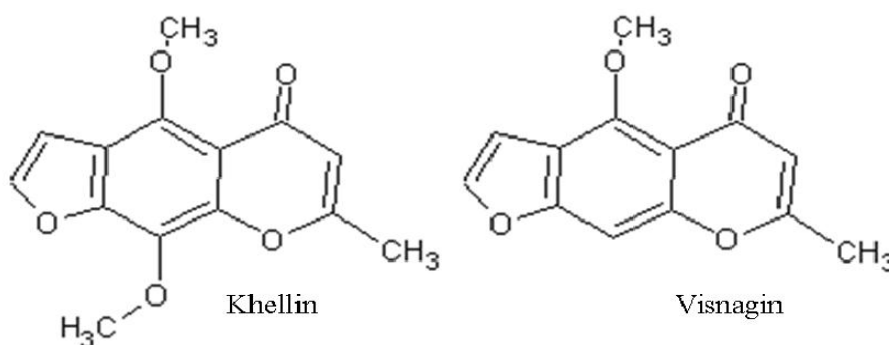


Figure 10. La structure chimique de khelline et visnagine.

Partie 3 : La famille des *Rutaceae* (Les agrumes)

1. Généralités sur la famille des *Rutaceae*

Dès la plus haute antiquité, l'homme s'est intéressé aux agrumes, Confusius parlait des qualités organoleptiques des agrumes 500 ans avant l'ère chrétienne. L'oranger est assurément l'agrumes le plus répandu dans le monde, et aussi le plus populaire. D'après **Lousser (1989)**, le mot « agrumes » d'origine italienne, est un mot collectif masculin pluriel qui désigne les fruits comestibles par extension aux arabes qui les portent appartenant au genre « *Citrus* ».

Les principaux agrumes cultivés pour la production de fruit sont : les orangers, les mandariniers, les clémentiniers, les citronniers, et les pomelos. Le terme général orangeries désigne non seulement les plantations d'orangers mais, par extension toute plantation d'agrumes constituant le verger agrumicole (**Lousser, 1989**).

2. Taxonomie chez les agrumes

Le groupe des agrumes appartient à la famille des *Rutaceae*, sous famille des *Aurantioideae*, tribu des *Citreae* et sous tribu des *Citrinae* (**Praloran, 1971**). Les agrumes se répartissent en plusieurs genres dont *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus* sont les trois genres les plus cultivés à travers le Monde. La Figure 11 reprend toute cette répartition en cascade (**Swingle, 1967**).

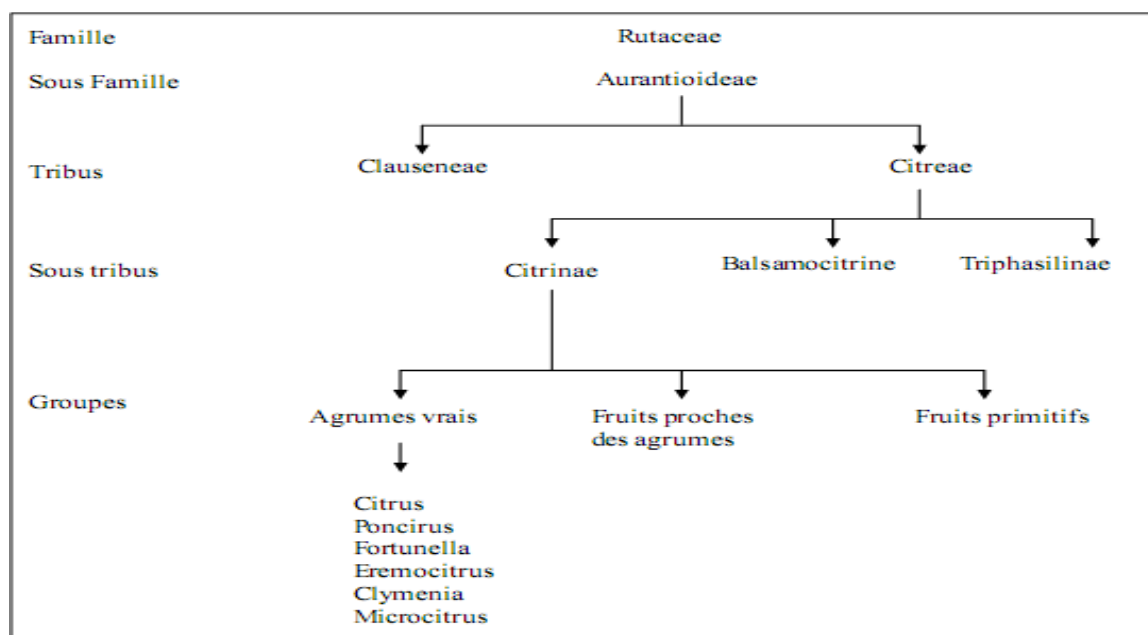


Figure 11. Répartition en cascade des genres appartenant à la famille des *Rutaceae* (**Swingle, 1967**).

Le genre *Citrus* est le plus important. C'est au sein de ce genre que se rencontrent les principales espèces cultivées :

Les oranges : *Citrus sinensis*.

Les mandarines : *Citrus reticulata*.

Les clémentines : *Citrus clementina*.

Les citronniers : *Citrus limon*.

Les pomelos : *Citrus paradisi*.

La classification des agrumes est un problème que les spécialistes s'accordent à qualifier de complexe. En effet, la complexité taxonomique des agrumes s'explique par de larges possibilités d'hybridations intra ou interspécifiques, par la polyembryonie qui peut fixer ces structures hybrides, par l'étendue de l'aire de culture où les structures génétiques ont pu évoluer indépendamment par le biais de différentes pressions environnementales (**de Rocca Serra, 1992**).

Des divergences en la matière se manifestent entre les opinions des taxonomistes, ainsi, deux grandes classifications existent, celle de (**Tanaka, 1961**) qui comprend 156 espèces tandis que celle de (**Swingle, 1967**) n'en distingue que seize. Tanaka élève au rang d'espèces de nombreux hybrides intra ou interspécifiques.

3. Descriptions morphologique et physiologique

Les fruits des principales espèces et variétés cultivées du genre *Citrus* diffèrent par leur coloration, leur forme, leur calibre, la composition de leur jus et leur époque de maturité. Cependant, tous les fruits des *Citrus* cultivés présentent la même structure anatomique présentée dans la figure 12 (**Ramful et al., 2010**). D'un point de vue botanique, les agrumes sont des fruits charnus de type baie avec un péricarpe structuré en trois parties bien différenciées : l'épicarpe appelé flavédo, le mésocarpe appelé albédo et l'endocarpe (pulpe).

L'épicarpe est la surface périphérique du fruit, il est coloré par des pigments caroténoïdes. Il contient de nombreuses glandes sécrétrices d'essences aromatiques qui sont réparties de façon irrégulière (**Figure 12**).

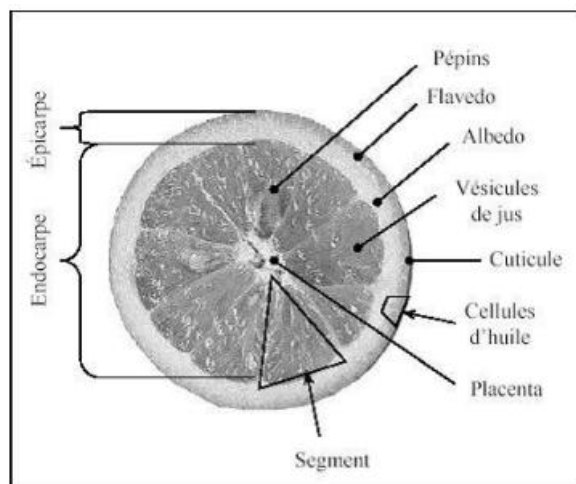


Figure 12. Coupe représentant les différents composants d'un *Citrus* (Swingle, 1967).

Ces glandes sont des poches bordées par plusieurs assises de cellules sécrétrices dont la formation fait intervenir des cellules épidermiques et des nodules méristématiques superficiels. Le mésocarpe est la couche intérieure blanchâtre, de structure spongieuse, plus ou moins épaisse par rapport à la taille du fruit, elle peut constituer 12 à 30% du fruit. Elle est intimement associée à l'épicarpe avec lequel elle forme ce qu'il est convenu d'appeler les écorces d'agrumes.

L'endocarpe est la partie comestible d'agrumes. Il est constitué d'une fine membrane qui tapisse les nombreuses loges carpellaires. Du côté interne, cette membrane porte des poils succulents dont l'ensemble forme la partie comestible ou pulpe renfermant les graines ou pépins (Huet, 1991 ; Albagnac, 2002 ; Bennici *et al.*, 2004 ; Ramful *et al.*, 2010).

Les écorces sont particulièrement riches en composés digestibles et offrent de nombreuses possibilités d'utilisation pour l'alimentation fonctionnelle humaine et animale ainsi qu'en tant que complément alimentaire (Bampidis et Robinson, 2006). L'utilisation des écorces fraîches en alimentation pour bétail est limitée à cause des maladies que peut provoquer la consommation de ce produit (mycotoxicose, parakératose du rumen) (Duoss-Jennings *et al.*, 2013).

Les écorces d'agrumes sont une source importante d'essences odorantes et d'huiles essentielles de 0,6 à 1% (Oreopoulou *et al.*, 2007; Yeoh *et al.*, 2008 ; Hosni *et al.*, 2010 ; Farhat *et al.*, 2011). Les écorces contiennent aussi des pigments, essentiellement des caroténoïdes (0,01-0,20 g/100g bs) mais aussi des anthocyanes (dans le cas des oranges sanguines).

D'autre part, plusieurs études montrent que les écorces d'agrumes contiennent aussi des composés biologiquement actifs comme la vitamine C (0,109-1,150 g/100g bs) (**Goulas *et al.*, 2012 ; Barros *et al.*, 2012**) et les fibres alimentaires (6,30-82,69 g/100g bs) (**Magda *et al.*, 2008 ; Ghasemi *et al.*, 2009**). Les écorces d'agrumes sont aussi riches en composés phénoliques (0,67-22,32 g/100g bs).

4. Quelques espèces de *Citrus*

4.1. Plante de citron (*Citrus limon*)

4.1.1. Description botanique

Le citronnier est un arbuste originaire du sud-est asiatique, cultivé sur le littoral de la Méditerranée et dans toutes les régions du globe à climat semi-tropical (**Dubois, 2006 ; Debuigne et Couplan, 2007**). Les fruits sont de forme ovale, avec un mamelon plus au moins apparent à leurs extrémités. La peau fine est colorée en jaune à maturité du fruit ; elle est pourvue de nombreuses glandes oléifères renfermant des essences. La pulpe, de coloration jaune ou verdâtre, est généralement riche en acide citrique, ce qu'il lui donne sa saveur acide (**Blancke, 2001**).

Cette plante est l'une des agrumes les plus vigoureuses, de croissance rapide, elle produit de nombreuses branches et fructifie abondamment, et la fructification de l'hiver est plus importante (de 60 à 70% de production annuelle de l'arbre) (**Dubois, 2006**). Les principales variétés méditerranéennes cultivées de citronnier sont «Verna », «Eureka », «Lisbonne », «Monachello », «Interdonato » et «Lunaris » (**Blancke, 2001**).

Selon **Padrini et Lucheroni (1996)**, la classification du citron est la suivante :

Règne : *Plantae*

Ordre: *Sapindales*

Famille : *Rutaceae*

Genre : *Citrus*

Espèce : *Citrus limon*

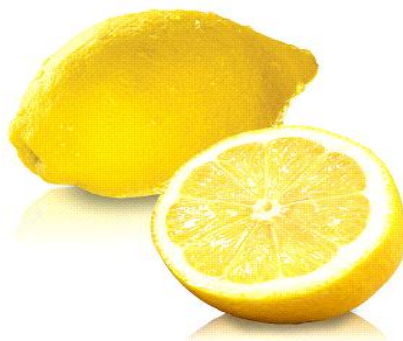


Figure 13. Fruit de *Citrus limon*

4.1.2. Composition de citron (*Citrus limon*)

4.1.2.1. Flavonoïdes

Le citron renferme différents types de flavonoïdes. Ces composés antioxydants permettent, entre autres, de neutraliser les radicaux libres du corps et, ainsi, prévenir l'apparition des maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies chroniques. Les principaux flavonoïdes contenus dans le citron et la lime sont l'ériocitrine et l'hésprétine. Des expériences menées sur des animaux ont démontré que l'ériocitrine et l'hésprétine, extraits de l'écorce (peau) du citron ou de son jus, pouvaient diminuer ou prévenir l'augmentation des dommages reliés au stress oxydatif (**Miyake et al., 1998**). De plus, l'ériocitrine pourrait induire l'apoptose des cellules leucémiques. La partie blanche de l'écorce du citron est celle qui contient le plus de ces 2 flavonoïdes.

4.1.2.2. Limonoïdes

Les principaux limonoïdes que renferment les agrumes sont la limonine et la nomiline. On les retrouve principalement dans les pépins mais aussi dans le jus (**Miller et al., 2004**). Les limonoïdes possèdent une certaine capacité antioxydante (**Yu et al., 2005**). Ils pourraient aussi entraîner l'apoptose de cellules neuroblastiques cancéreuses (cellules nerveuses embryonnaires, se différenciant ensuite en neurones) (**Poulose et al., 2005**).

4.1.2.3. Fibres solubles

Les agrumes sont riches en fibres solubles, principalement en pectine, que l'on retrouve dans l'écorce et dans la membrane blanche autour de la chair (albédo). Par leur aptitude à diminuer le cholestérol sanguin, les fibres solubles contribuent à réduire l'incidence des maladies cardiovasculaires (**Coats, 1991**). Des chercheurs ont démontré que l'écorce de citron était efficace pour diminuer les taux de cholestérol sanguin et hépatique chez l'animal. Cependant, en plus de la pectine, d'autres composés présents dans l'écorce du citron pourraient participer à ce processus.

4.1.2.4. Protéines

Une équipe de chercheurs a découvert qu'un extrait de jus de citron pourrait améliorer la réponse immunitaire chez l'animal (**Gharagozloo et Ghaderi, 2001**). Cet effet serait attribuable à un ensemble de protéines présentes dans l'extrait de jus de lime. Ces mêmes

composantes protéiques pourraient participer à l'arrêt de la prolifération de cellules cancéreuses observées *in vitro* (Gharagozloo *et al.*, 2002).

Tableau 3: Constituants chimiques de citron (Morton, 1987).

<i>Valeur nutritive pour 100 g de citron</i>	<i>Fruits (frais, pelé)</i>	<i>jus (fraîche)</i>	<i>Écorce</i>
Calories	27	25	-
Humidité	90,1 g	91,0 g	81,6 g
Protéines	1,1 g	0,5 g	1,5 g
Lipide	0,3 g	0,2 g	0,3 g
Glucides	8,2 g	8,0 g	16,0 g
Fibre	0,4 g	trace	-
Cendre	0,3 g	0,3 g	0,6 g
Calcium	26 mg	7 mg	134 mg
Phosphore	16 mg	10 mg	12 mg
Fer	0,6 mg	0,2 mg	0,8 mg
Sodium	2 mg	1 mg	6 mg
Potassium	138 mg	141 mg	160 mg
La vitamine A	20 UI	20 UI	50 UI
Thiamine	0,04 mg	0,03 mg	0,06 mg
Riboflavine	0,02 mg	0,01 mg	0,08 mg
La niacine	0,1 mg	0,1 mg	0,4 mg
acide ascorbique	53 mg	46 mg	129 mg

4.2. Plante d'orange (*Citrus sinensis*)

4.2.1. Description botanique

Le terme « orange » est apparu au XIII^e siècle. Il vient de l'arabe *narangi*. L'orange est originaire du sud-est de l'Asie, foyer du genre *Citrus*, il était déjà connu en Chine. Comme bien d'autres plantes qui servaient également en médecine, il suivra la route de la soie vers

l'Europe traversant le Moyen-Orient ou il trouvera un climat adapté. L'oranger est un arbre, pouvant atteindre 10 m de hauteur environ, avec un feuillage vert sombre persistant et légèrement ailé, la floraison blanche très parfumée. Les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir, de taille moyenne, de forme sphérique, et de couleur caractéristique orange. Il existe plusieurs variétés les plus connues la Songuilli, Thomson Navel, Valencia Laté, Washington Navel Powell, Florida Pineapple, Maltaise, Orange Portugaise, etc (**Loussert, 1989**).

La Classification botanique de l'orange (*Citrus sinensis*) d'après (**Guignard, 2001**) est comme suit :

Règne: *Plantae*

Ordre : *Sapindales*

Famille: *Rutaceae*

Genre : *Citrus*

Espèce : *Citrus sinensis*



Figure 14. Photo de l'orange sanguine (*Citrus sinensis*)

4.2.2. Structure du fruit

L'orange est un agrume qui peut aussi être appelé hesperidium. L'hesperidium diffère de fruits comme la tomate ou le raisin car il possède une peau dure et solide qui protège la partie comestible du fruit (**Davies et Albrigo, 1994**). La structure d'une orange est présentée dans la **Figure 12**. Les parties caractéristiques communes aux agrumes sont les suivantes :

- une couche extérieure colorée, le flavedo, rappelant le mot « flaveur » car elle contient les glandes à huiles essentielles,
- une couche intérieure blanche et spongieuse, l'albedo (ou mésocarpe), riche en pectines,
- une partie comestible, l'endocarpe ou épiderme interne. Dans le cas des oranges, les cellules très juteuses formant des sacs à jus ou encore vésicules à jus sont des poils produits par l'endocarpe. Les segments (ou quartiers) qui comprennent de nombreuses vésicules sont séparés par des parois carpellaires ou membranes constituées de cellulose, pectine et hémicelluloses. Les segments sont attachés à la partie centrale du fruit appelée columelle.

4.2.3. Composition d'orange (*Citrus sinensis*)

Le fruit d'orange contient 1,5% d'huile essentielle. Les principaux constituants chimiques présents dans le fruit d'orange sont le D-limonène (quantité: 90%), le citral, le citronellal, nootkaton, sinesal, le n-nonanal, le n-décanal, le n-dodécanal, l'acétate de linalyle, l'acétate de géranyle, l'acétate citronelyl et de l'acide méthyl anthranil ester. Flavonoïdes et furanocumarines lipophiles sont rapportés dans les huiles pressées. Il existe certaines preuves que les ingrédients actifs de l'orange stimulent la sécrétion du suc gastrique. Orange contient également plusieurs glycosides de flavones amer comme néohesperidine et naringine, dont le composant sucre est neohesperidose, etrutine dont la composante sucre est rutinose. Les sucres sont disaccharide de glucose et rhamnose (6 desoxymannose) (Ihrig *et al.*, 1995).

Tableau 4: Constituants chimiques de l'orange (*Citrus sinensis*)

	<i>Constituants chimiques</i>	<i>Partie de la plante</i>
1	Flavone glycosides; Neohesperidin, Naringin, Hesperidin, Narirutin, Triterpene; Limonene, citrol Pigment; Anthocyanin, Beta-cryptoxanthin, Cryptoxanthin, Zeaxanthin et Rutin, Eriocitrin, Homocysteine Polymethoxylated flavones; Tangeretin et Nobiletin, Flavonoids; Citacridone, Citbrasine et Noradrenaline	Les écorces
2	Terpenoids; Linalool, β elemene	Feuilles
3	Triterpenes; Limonene	Fleurs
4	Vitamins; B1, B2, B3, B5, B6, and Vitamin C Minerals; Calcium, Iron, Magnesium, Zinc, Phosphorus, Potassium	Fruits

4.2.4. Production mondiale des agrumes

La production mondiale d'agrumes se situe autour de 89 millions de tonnes (MT), dont 73% de la production sont consommés en frais, 26% sont destinés à la transformation et 9% à l'exportation. Cette production est répartie en plusieurs variétés d'agrumes, l'orange représente 57%, la mandarine 30%, le pamplemousse 7% et le citron et la lime 6% (USDA, 2014). Avec une production de 17,34 MT, le Brésil est le premier producteur d'oranges dans

le monde. Il assure 34% de la production mondiale, suivi par la Chine (7,6MT), les Etats-Unis (6,29 MT) et l'Union Européenne (6,07 MT).

Le bassin méditerranéen produit des agrumes pour alimenter le marché international du fruit frais avec des exportations de l'ordre de 5.42100 tonne pour la campagne de 1997 et 1998. Les agrumicoles du bassin Méditerranéen sont : L'Espagne, l'Italie, l'Egypte, le Maroc, la Grèce, l'Algérie, et la Tunisie. L'Espagne étant le premier pays producteur avec 5578000 tonnes en 1999. Parmi les producteurs d'agrumes, l'Algérie la 7^{ème} place (**Figure 15**).

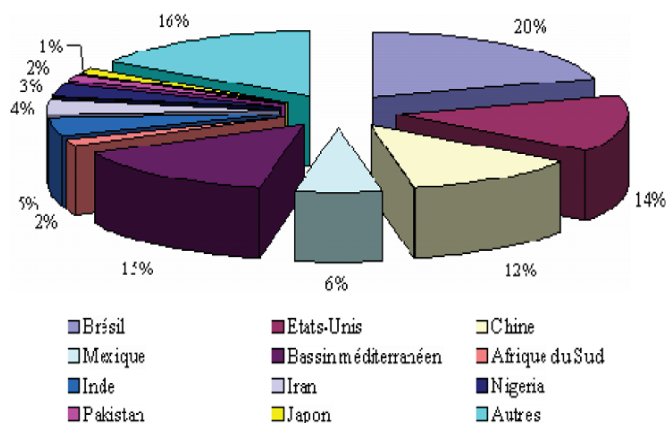


Figure 15. Répartition géographique de la production d'agrumes destinés au marché de fruits frais pendant la période 2000-2004 (Source : Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement à partir des données de la FAO).

Chapitre II : Les biofilms bactériens

1. Généralités sur les biofilms bactériens

Dans les écosystèmes naturels, les micro-organismes vivent généralement au sein de communautés microbiennes appelées biofilms. Un biofilm est constitué de microorganismes adhérant à une surface ou une interface en milieu humide ou aqueux (**Costerton et al., 1994**), on parle alors de communautés microbiennes sessiles. Ces micro-organismes sont englobés dans une matrice généralement constituée de polymères extracellulaires ou EPS ("extrapolymeric substances") sécrétés par ces mêmes microorganismes. Les EPS renferment en majorité des polysaccharides macromoléculaires et en moindre mesure des protéines, des lipides et acides nucléiques (**Flemming et al., 1999 ; Sutherland, 2001**).

La prédominance du mode de vie sous forme de biofilm ne fut cependant affirmée qu'en 1978 (**Costerton et al., 1978**). Il a été montré que plus de 99% des bactéries se développent en biofilms (**Coghlan, 1996 ; Donlan et Costerton, 2002**) sur une grande variété de surfaces telles que les métaux, les plastiques, les tissus vivants (tissus humains, feuilles et racines des végétaux), les surfaces minérales (pierres, bétons). Un biofilm peut être constitué d'une seule espèce bactérienne ou de plusieurs espèces de bactéries, champignons, algues, protozoaires (**Lock, 1993**).

Les bactéries contenues dans un biofilm présentent des caractéristiques très différentes de leurs homologues planctoniques (bactéries libres en suspension), parmi lesquelles des modifications structurales (par exemple la disparition des flagelles, (**Flemming, 1990; Costerton et al., 1995**), la production d'exopolymères, la mise en place d'un système de communication chimique ("quorum sensing") (**Parsek et Greenberg, 2000**), une augmentation significative de leur résistance aux agents antimicrobiens (désinfectants ou antibiotiques) et aux stress environnementaux (déshydratation, privation nutritionnelle, rayonnements ultraviolets...)

1.1. Formation des biofilms

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués (**Characklis et Marshall, 1990 ; Costerton et al., 1995**). La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes (**Figure 16**) :

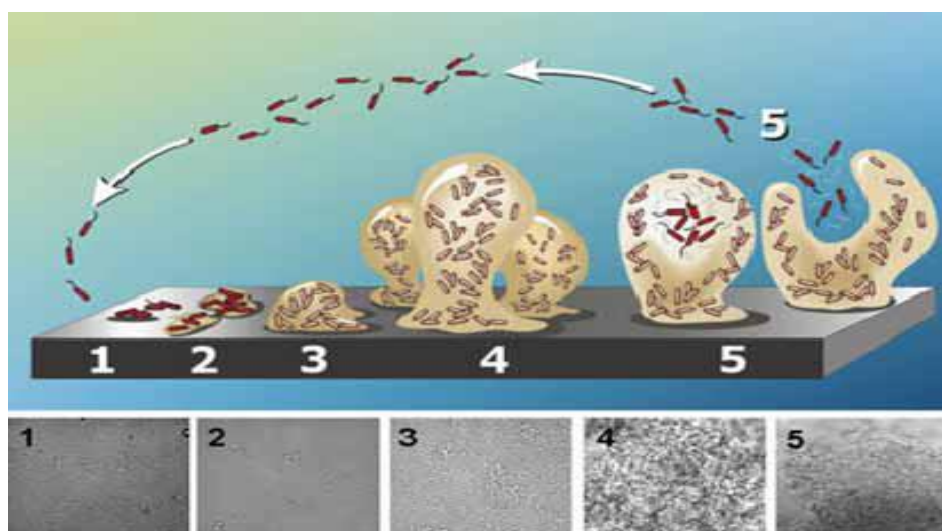


Figure 16. Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm (Stoodley *et al.*, 2002).

1.1.1. Conditionnement de la surface du milieu

La nature du milieu, du matériau, ainsi que les caractéristiques de surface de ce dernier, sont des paramètres essentiels intervenant lors de cette première étape. En effet, la surface est le siège d'une absorption irréversible de macromolécules telles que des acides humiques, des polysaccharides ou des protéines, conduisant à la formation d'un film conditionnant ("conditionning film") (Baier, 1980 ; Little et Jacobus, 1984 ; Ishida et Griffiths, 1990).

1.1.2. Adhésion des bactéries

L'approche des bactéries de la surface dépend des propriétés dynamiques du milieu (vitesse d'écoulement du fluide) et des propriétés physico chimiques de la surface (Katsikogianni *et al.*, 2004). L'adhésion bactérienne implique le déplacement de la cellule vers le lieu de son adhésion. Cette approche nécessite différents appendices bactériens, tels que les flagelles (O'Toole et Kolter, 1998; Gavin *et al.*, 2003) qui permettent également à la bactérie de se déplacer sur la surface. D'autres appendices, les pilis sont pour leur part impliqués dans l'attachement initial à la surface (Fletcher *et al.*, 1993 ; McBride, 2001). Dans un premier temps l'adhésion est due à des interactions faibles entre la surface et les bactéries (interactions de type van der Waals et électrostatiques). A ce stade, la bactérie peut adsorber de la surface et retrouver son état planctonique, l'adhésion est donc réversible.

Dans un deuxième temps, l'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce

cas, des interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type hydrophobe. La synthèse des EPS, qui débute dès les premières étapes d'adhésion, se poursuit pendant la maturation du biofilm (Spiers *et al.*, 2003 ; Kuchma *et al.*, 2005) et la matrice peut alors occuper jusqu'à 75-95 % du volume d'un biofilm mature (Suci *et al.*, 1994).

1.1.3. Croissance du biofilm

Une fois que la bactérie est irréversiblement adhérente à la surface, sa multiplication conduit à la formation de colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de cette surface selon les propriétés des bactéries et des matériaux. La structure du biofilm dépend des conditions environnementales telles que la source de carbone ou le régime hydrodynamique (Stanley *et al.*, 2003 ; Klausen *et al.*, 2006). Par la suite le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel (Costerton *et al.*, 1995 ; Davey et O'Toole, 2000 ; Sauer *et al.*, 2002). Dans cette structure tridimensionnelle se forment des canaux permettant la circulation de nutriments (Costerton *et al.*, 1999), d'oxygène et l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien. Finalement l'épaisseur du biofilm se stabilise lorsque les phénomènes d'arrachement du biofilm compensent sa croissance.

1.1.4. Dispersion du biofilm

Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition de forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles (Sauer *et al.*, 2002 ; Sauer *et al.*, 2004). Les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement. Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm mais peut avoir lieu, soit par lyse cellulaire soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement.

1.2. Biofilm et industrie alimentaire

Les biofilms ont une longue histoire dans l'industrie alimentaire car ils sont responsables de la contamination des produits transformés. L'étude des biofilms dans le milieu des industries alimentaires relève, pour une grande part, du domaine de la sécurité

sanitaire des aliments. Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, y compris les secteurs des produits laitiers sont remises en cause par le problème des biofilms (**Srey et al., 2013**). Les recherches en la matière sont néanmoins récentes. Les biofilms affectent également les transferts de chaleur et donc augmentent les temps de stérilisation par autoclave. Ils modifient aussi la résistance à la vapeur et au formol. Ils sont source de difficultés de nettoyage et de désinfection des surfaces, des instruments et de l'équipement. Ils se forment sur les surfaces et les recoins de chaînes de production et sont considérés comme un risque pour la santé même s'ils ne contiennent que des bactéries inoffensives parce qu'ils constituent un refuge pour les pathogènes (**Vlkova et al., 2008**).

2. Les pathogènes responsables d'intoxications alimentaires

2.1. Caractéristiques de l'espèce d'étude *Bacillus cereus*

2.1.1. Propriétés morphologiques

Les souches de *B. cereus* sont constituées de bacilles Gram positifs ou à Gram variable selon l'âge des cultures, aux extrémités arrondies, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, d'une longueur supérieure à 3 μm et d'un diamètre moyen de 1.4 μm , souvent groupées en chaînes formant des spores non déformantes ovales (ou parfois cylindriques), en position subterminale (ou parfois en position paracentrale), aéro-anaérobies. Les colonies ont un diamètre compris entre 2 et 7 mm, elles sont soit circulaires soit de formes irrégulières avec des bords ondulés, crénelés ou filamenteux. Leur aspect est crémeux et lisse, mat ou granuleux. Sur gélose au sang de mouton, elles sont hémolytiques. *B. cereus* possède une catalase, dépourvu d'une oxydase, ne fermentant pas le mannitol, mais possède une phospholipase très active (**Rasko et al., 2005**).

2.1.2. Habitat et pouvoir pathogène

Bacillus cereus est une bactérie pathogène, Gram-positif, formant des spores (**Shinagawa, 1990 ; Juneja et al., 2003**). Ces spores sont capables de résister à une température de 95 °C. La présence des spores de *B. cereus* pose de sérieux problèmes dans les industries agro-alimentaires car non seulement elles sont résistantes à la chaleur, mais elles ont la capacité d'adhérer fortement à de nombreuses surfaces y compris l'acier inoxydable (**Husmark et al., 1990**). La viande et les produits carnés sont des milieux très riches caractérisés par un risque de sécurité très élevé. La viande fraîche ou cuite sont considérées comme des substrats favorables pour *B. cereus* (**Ternstrom et Molin, 1987 ; Kramer et**

Gilbert, 1989). D'autre part, *B. cereus* est communément présente dans d'autres ingrédients comme les épices et persiste dans les équipements de transformations qui peuvent contribuer à une contamination de la viande (**Doyle, 2002 ; Guinebretière et al., 2003**).

2.1.3. Description taxonomique et physiologique

Les bactéries du groupe *Bacillus cereus* appartiennent à la famille des *Bacillaceae* et au genre *Bacillus*. Ce sont des bacilles à coloration Gram positif, sporogènes, aéro-anaérobies facultatives et possédant une catalase.

2.1.3.1. Description taxonomique

Le groupe *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus* sensu lato) regroupe 6 souches : *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides*. Il a été montré que ces espèces sont très proches les unes des autres au niveau génomique (**Guinebretière et al., 2008**). Ce point a compliqué la tâche des chercheurs pour faire une classification précise au sein du groupe. Ainsi, la première classification au sein du groupe *Bacillus cereus* n'est pas essentiellement basée sur les différences génomiques mais plutôt selon trois caractères phénotypiques spécifiques ; la virulence, la physiologie et la morphologie (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Nouvelle classification du groupe *Bacillus cereus* d'après (**Guinebretière et al., 2008**).

Groupes phylogénétiques	Espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i>	Profils thermiques de croissance	Cytotoxicité
Groupe I	<i>B. pseudomycoides</i>	Mésophiles (de 10 à 43°C)	Aucune observée
Groupe II	<i>B. thuringiensis</i> II <i>B. cereus</i> II	Psychrotolérantes (de 7 à 40°C)	Toxines diarrhéiques
Groupe III	<i>B. thuringiensis</i> III <i>B. cereus</i> III <i>B. anthracis</i>	Mésophiles (de 15 à 45°C)	Toxines diarrhéiques et émétiques Anthrax
Groupe IV	<i>B. thuringiensis</i> IV <i>B. cereus</i> IV	Mésophiles (de 10 à 45°C)	Toxines diarrhéiques
Groupe V	<i>B. thuringiensis</i> V <i>B. cereus</i> V	Mésophiles intermédiaires (de 8 à 40°C)	Toxines diarrhéiques
Groupe VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycoides</i> <i>B. thuringiensis</i> VI	Psychrotolérantes (de 5 à 37°C)	Aucune observée
Groupe VII	<i>B. cereus</i> VII	Thermotolérantes modérées (de 20 à 50°C)	Toxines diarrhéiques

Dans cette classification, les espèces sont donc classées par profil thermique de croissance puis par leur cytotoxicité. De plus, il a été montré que le groupe VII, constitué de *B. cereus* VII, fait en réalité référence à une nouvelle espèce *Bacillus cytotoxicus* (**Lapidus et**

al., 2008). Ainsi, cette nouvelle façon de faire révèle la complexité du groupe *Bacillus cereus* et démontre qu'une espèce peut être présente dans plusieurs groupes à la fois.

2.1.3.2. Description physiologique

Bacillus cereus est un long bacille de forme régulière et souvent en courte chaîne. C'est un bacille Gram + qui est mobile, aéroanaérobie facultatif et qui forme des spores non déformantes. Les *B. cereus* se développent sur des géloses ordinaires. Les colonies ainsi obtenues sont grisâtres, larges avec des contours irréguliers.

En galerie Api 20 E les *B. cereus* possèdent les caractères suivants : VP+, citrate+, gélatinase+. Sur gélose au sang de mouton ils possèdent une large hémolyse. b. Afin de résister à un environnement qui n'est plus favorable à leur développement, certaines bactéries sont capables de sporuler. Ainsi, lors d'une baisse des nutriments, ou encore d'une variation importante de température, les bactéries du groupe *B. cereus* produisent des spores ultra résistantes par rapport à la forme végétative (**Andersson et al., 1995**). (**Figure 17**).

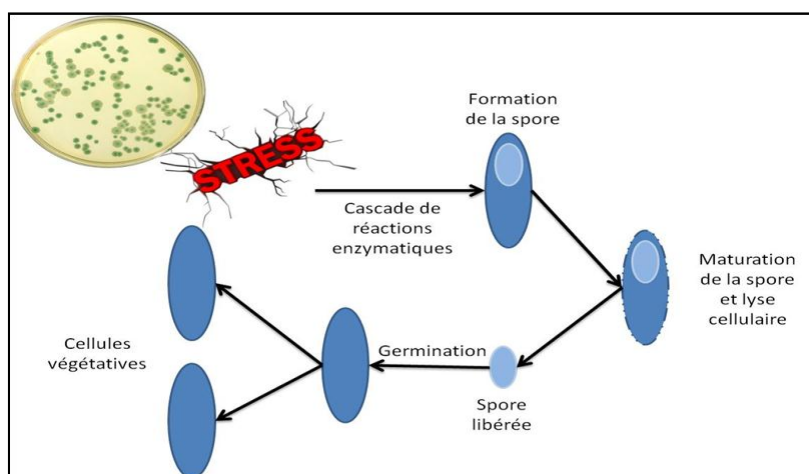


Figure 17. Processus de sporulation de *Bacillus cereus*

Les spores de *B. cereus* sont très résistantes et possèdent de remarquables capacités d'adhésion aux matières inertes. Leur adhésion sur de multiples surfaces est principalement due à 3 caractéristiques : leur grande hydrophobicité, la faible charge à la surface des spores et enfin, leur morphologie avec la présence d'appendices (**Andersson et al., 1995**).

Lorsque les spores sont libérées, elles peuvent ensuite entrer en germination pour produire de nouvelles bactéries qui seront elles-mêmes capables de se diviser. En industrie agroalimentaire, les spores des bactéries résistent aux traitements thermiques classiques

comme la pasteurisation. Ainsi, il n'est pas rare de retrouver de nombreuses traces de ces dernières sur les surfaces de travail ou encore dans les produits commercialisés. Le véritable problème est que la pasteurisation peut activer la germination des spores au lieu de les détruire (**Collado et al., 2003**). Suite à leur activation, les spores germent sous forme végétative pouvant se développer dans un produit en l'absence de flore compétitive (**Samapundo et al., 2011**).

2.1.3.3. Intoxication alimentaire

B. cereus peut causer des intoxications alimentaires et différentes infections opportunistes et nosocomiales. Il peut être responsable de deux types d'intoxication alimentaire, la première entraînant des vomissements par l'action de la toxine émétique céréulide et l'autre causant la diarrhée par l'action de différentes entérotoxines (**Kotiranta et al., 2000 ; Granum 2001 ; Stenfors et al., 2008**). La céréulide est une toxine peptidique qui doit être présente dans les aliments ingérés pour causer des vomissements (**Agata et al., 2002**). La présence de cellules vivantes n'est pas nécessaire pour causer le syndrome de vomissement.

Dans le cas du syndrome de diarrhée, on ne sait pas clairement si les entérotoxines sont présentes dans les aliments ou si elles sont produites dans l'intestin grêle par la bactérie. Cependant, les entérotoxines sont instables à un pH > 4 et peuvent être dégradées par la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine (**Granum, 1994**), de sorte qu'il est plus probable qu'elles soient produites dans l'intestin grêle. Cinq toxines ont été proposées comme causes potentielles du syndrome diarrhéique : HBL, NHE, BceT, EntFM et CytK, mais trois d'entre elles seulement (HBL, NHE et CytK) ont été associées à des flambées épidémiques d'origine alimentaire (**Agata et al., 1995a; Granum et Lund 1997; Lund et al., 2000; Schoeni et Wong, 2005 ; Stenfors et al., 2008**).

2.2. Caractéristiques de l'espèce d'étude *Staphylococcus aureus*

2.2.1. Historique

Les staphylocoques ont été identifiés dès l'aube de l'ère pasteurienne par Pasteur lui-même. Pasteur a observé, en 1879 dans des pus de furoncle et d'ostéomyélite « un organisme unique, formé de petits points sphériques, réunis par couple, rarement par quatre, mais très fréquemment associés en petit amas ».

Staphylococcus aureus est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*, est la première cause d'infection bactérienne à travers le monde (Corne, 2004). Les infections à *S. aureus* sont très polymorphes allant d'atteintes cutanées bénignes comme les furoncles ou les panaris à des pathologies mettant en jeu le pronostic vital comme les septicémies, les intoxications alimentaires et infections du système nerveux central (Lowy, 1998).

2.2.2. Taxonomie

Selon la 9^{ème} édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, les staphylocoques sont classés parmi les bactéries à Gram positif pauvres en GC, dans le phylum des firmicutes ;

Tableau 6 : classification de *Staphylococcus aureus*

Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	Staphylococcus
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

2.2.3. Caractères morphologiques

A l'examen microscopique, les *Staphylococcus aureus* se présente sous l'aspect de cocci sphérique de 1 µm de diamètre, à coloration de Gram positive, immobiles, non sporulés. La grande majorité des souches sont capsulées *in vivo* mais perdent progressivement leur capsule en culture, d'autres forment des colonies mucoïdes et sont entourées d'une pseudocapsule (Fauchère et Avril, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004).

Sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de grappes de raisin (Ananthanarayan et Paniker, 2006). Alors qu'en milieu liquide, ils sont souvent isolés, en diplocoques, en tétrades ou en très courtes chainettes (en générale de 3 à 5 cellules) (Le Loir *et al.*, 2003).

2.2.4. Caractères biochimiques

Toutes les souches de *S. aureus* ont un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif, produisent une coagulase, une nucléase thermostable et une catalase mais pas d'oxydase (Ananthanarayan et Paniker, 2006). Les *S. aureus* sont : indole -, acétone +,

uréase +, VP+, RM+, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine (**Fasquelle, 1974, Le Minor et Verron, 1990 ; Freney et al., 1999**).

La plupart des souches sont lipolytiques produisant une zone opaque lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux contenant le jaune d'œuf (**Ananthanarayan et Paniker, 2006**). La paroi cellulaire des Staphylocoques est résistante au lysosyme et sensible au lysostaphine, qui clive spécifiquement les ponts pentaglycine de *Staphylococcus spp* (**Le Loir et al., 2003**).

2.2.5. Caractères cultureux

Staphylococcus aureus sont des germes peu exigeants sur le plan nutritif et tolèrent de grandes variations (**Guiraud et Rosec, 2004**), se cultivent facilement sur milieux usuels simples en aérobiose comme en anaérobiose dans des températures de 7 à 48,5 °C avec un optimale de 30 à 37 °C et un pH de 4,5 à 9,3 avec un optimal de 7 à 7,5 (**Le Loir et al., 2003 ; Bhatia et Zahoor, 2007 ; Di Giannatale et al., 2011**). Il est capable de se multiplier dans des milieux contenant 5 à 10 % de NaCl. Ces caractéristiques confèrent à *S. aureus* la capacité de coloniser une grande variété des aliments (**Bhatia et Zahoor, 2007**).

En milieu liquide, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigments en milieu liquide (**Ananthanarayan et Paniker, 2006**).

Sur milieux solides, les colonies observées après 24 heures d'incubation sur gélose ordinaire sont larges (2-4 mm de diamètre) circulaires, légèrement bombées lisses, luisantes. La pigmentation des colonies peut se varier du blanc au jaune ou jaune orangé (**Flandrois, 1997 ; Ananthanarayan et Paniker, 2006 ; Denis et poly, 2007**).

2.2.6. Facteurs intervenant dans la colonisation, l'adhésion, l'invasion et la diffusion

2.2.6.1. La protéine de liaison au collagène

L'attachement au collagène est nécessaire et suffisant pour l'adhésion de *S. aureus* au cartilage in vitro. Ce récepteur du collagène pourrait constituer un facteur de virulence important dans les infections osseuses et articulaires à *S. aureus* (**Buckingham et al., 2004**).

2.2.6.2. La protéine de liaison à la fibronectine

Les récepteurs pour la fibronectine contribuent à l'adhérence de *S. aureus* aux caillots plasmatiques et aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang. Ils ont ainsi un rôle important dans l'initialisation des infections sur corps étrangers (**Foster et McDevit, 1994**).

2.2.6.3. La protéine de liaison au fibrinogène (clumping factor)

C'est une protéine de surface très riche en lysine (PM de 21 kDa) qui paraît être fixée au corps bactérien appelée coagulase ou "clumping factor" provoque l'agrégation des bactéries en présence de plasma. Le clumping factor est présent presque chez toutes les souches d'origine humaine, mais il est moins fréquent chez les souches d'origine animale (**Francois et al., 1997**).

2.2.6.4. Les sidérophores

Le fer est indispensable à la croissance des staphylocoques et l'une des méthodes de défense de l'hôte est la diminution de la fraction disponible du fer (complexation à la lactoferrine et à la transferrine). *S. aureus* s'adapte en sécrétant des sidérophores capables de capter et de transporter le fer à l'intérieur de la cellule. La quantité produite dépend de l'origine pathologique des souches. Le niveau de la production de sidérophores a été corrélé avec la forte expression de certaines protéines. Certaines souches virulentes de *S. aureus* pourraient produire 2 types de sidérophores : un premier dont la production serait limitée par des gènes chromosomiques et un second synthétisé par des plasmides à des quantités beaucoup plus élevées (**Cox et al., 1995**).

2.2.6.5. La coagulase

La coagulase n'est pas une enzyme mais une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte. La thrombine ainsi activée transforme le fibrinogène en fibrine. C'est un marqueur de l'identification de *S. aureus* (test de la coagulase en tube). Il n'existe pas d'argument évident indiquant un rôle de la coagulase dans la virulence des souches (**Baggett et al., 2005**). Cependant, on peut considérer logiquement qu'elle intervient dans la constitution des thrombophlébites staphylococciques et que le caillot permet aux bactéries qu'il contient de se protéger contre les défenses de l'hôte.

2.2.7. Facteurs de persistance

2.2.7.1. Le Biofilm

La formation d'un biofilm renforce l'adhésion aux matériaux et protège la bactérie des défenses immunitaires et de l'action des antimicrobiens (**Donlan et Costerton, 2002**). Cette antibiorésistance est attribuée à la présence de matrice polysaccharidique, un taux de croissance lent, une hétérogénéité spatiale, ainsi qu'à des physiologies spécifiques, tolérantes ou résistantes (**Mah et took, 2001 ; Steward et Costerston, 2001 ; Gilbert et al., 2002**).

2.8. Intoxications alimentaires de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est un agent responsable d'intoxications alimentaires survenant après l'ingestion d'entérotoxines thermostables préformées dans les aliments contaminés (viande, produits laitiers) et mal conservés. Les entérotoxines staphylococciques sont en effet presque toutes émétisantes, à l'exception de TSST- 1. Ces toxines provoquent la synthèse d'acide arachidonique par les mastocytes, qui agit sur les récepteurs neuronaux du système gastro-intestinal, conduisant à la stimulation des centres nerveux responsables de la diarrhée et du vomissement (**Vincent et al., 2008**).

Cliniquement, après une incubation courte (1 à 6 heures après ingestion), surviennent des nausées, des vomissements, des crampes abdominales et des diarrhées, le tout en l'absence de fièvre. La recherche de souches toxigènes et des entérotoxines peut être réalisée dans l'aliment ou dans les vomissements des patients (**Flandrois ,1997**). Quinze à 30 % des toxi-infections alimentaires collectives seraient liées à *S. aureus* (**Vincent et al., 2008**).



Matériel et méthodes

1. Obtention des isolats bactériens

1.1. Source

Les différents isolats de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus* testées dans cette étude, ont été isolés à partir des denrées alimentaires commercialisées (lait, produits laitiers, viande, charcuteries, volailles, pâtisseries, riz, certaines épices, semoule, et poisson) et à partir des plats cuisinés.

1.2. Isolement des souches *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*

Une pesée de 10 g de chaque échantillon est reprise dans 90 ml d'une solution PBS stérile (Phosphate buffer saline). A partir de chaque échantillon, une série de dilutions (10^{-1} à 10^{-6}) a été réalisée. Pour l'isolement de *B. cereus*, la réalisation des dilutions a été suivie d'un chauffage à 80° C pendant 10 min. Ensuite 100 µl de chaque dilution a été inoculé en surface sur milieu solide Lauria Bertani (LB) agar et Mannitol Egg Yolk Polymex B (MYP) agar (**Annexe I**), (**Vanderzant et Splittstoesser, 1992**). Pour *Staphylococcus aureus*, l'isolement a été effectué par inoculation de 100 µl de chaque dilution préparée (10^{-1} à 10^{-6}) sur les milieux Baird Parkar (BP) et Chapman. L'incubation a été faite à 30° C pendant 48 h.

1.3. Identification et caractérisation des isolats bactériens

L'identification des isolats de *S. aureus* et *B. cereus* a été faite tout d'abord par une caractérisation macroscopique (aspect, couleur et morphologie des colonies), ensuite la pureté des souches a été vérifiée par la coloration de Gram afin de sélectionner les bacilles et les cocci à coloration Gram positif. Toutes les souches ont été identifiées grâce aux techniques bactériologiques (production de catalase, oxydase, Vogues Proskauer (VP), Rouge de Méthyle (RM), Mannitol mobilité, croissance à 50°C, production d'indole, uréase, utilisation de citrate, nitrate et croissance à 7% NaCl). De plus, des caractères biochimiques ont été mis en évidence à l'aide des galeries API 20 Staph (Bio Mérieux) pour *S. aureus* et API 20 E (Bio Mérieux) pour *B. cereus* (**Cappuccino et Sherman, 2004**).

1.3.1. Recherche des enzymes respiratoires et du type respiratoire

- **Recherche de la catalase**

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire

qui peuvent détruire le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 dont l'accumulation a un effet létal pour les bactéries. La catalase a la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d' O_2 sous forme gazeuse selon la réaction suivante :



La technique est réalisée en prélevant une quantité suffisante de culture à partir d'un milieu solide et aérobie, pour la mettre dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame. La présence de catalase est marquée par la formation immédiate des bulles d' O_2 (**Joffin et al., 2001**).

- **Recherche de l'oxydase**

Il s'agit d'une réaction colorée qualitative qui met en évidence la phénylène diamine oxydase des bactéries, à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder le réactif: N- diméthyl paraphénylène diamine. Cette oxydation se manifeste par l'apparition d'une coloration mauve (**Joffin et al., 2001**).

- **Recherche du type respiratoire**

La mise en évidence de ce test a été faite en utilisant la gélose viande foie (VF) (Extrait de viande 10 g/l, Peptone 20 g/l, Extrait de levure 10 g/l, Glucose 5 g/l, Agar 15 g/l) utilisée en tube profond ensemencé en spirales. L'incubation a été faite à 30°C pendant 24 h (**Joffin et al., 2001**).

1.3.2. Identification de *Bacillus cereus*

- **Coloration des spores**

Les suspensions bactériennes des différents isolats ont subi un choc thermique à 80° C pendant 10 min. Après 72 h d'incubation, la plupart des souches ont libéré les spores, leur coloration a été faite selon la technique de **Schaeffer-Fulton** en utilisant le vert de malachite à 5 % et la fushine à 1 %.

- **Galerie API 20 E**

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

Les galeries ont été inoculées suivant les recommandations du fabricant et incubées à une température de 30° C pendant 24-48 h.

1.3.3. Identification de *Staphylococcus aureus*

- **Recherche de la coagulase**

La propriété de *Staphylococcus aureus* de provoquer la coagulation d'un plasma recueilli sur anticoagulant est un critère important de son identification. Elle est due à la sécrétion d'une enzyme thermostable ; la staphylocoagulase ou coagulase. Cette enzyme agit en liaison avec la prothrombine en absence de calcium. La confirmation du genre, *Staphylococcus* a été effectuée par coloration de Gram et divers tests biochimiques, tandis que l'espèce *S. aureus* a été confirmée par un test de coagulase tel que décrit par **Monica (1991)**.

- **Screening de la toxicité des isolats**

La toxicité des isolats bactériens a été testée par la recherche des enzymes complémentaires suivants :

Activité de la lécithinase : Un milieu à base d'œuf a été préparé en ajoutant de l'émulsion de jaune d'œuf à 5 % (v / v) à l'agar nutritif. Chaque isolât a été inoculé sur le milieu et les boîtes ont été incubées à 30° C. Les zones opaques autour des colonies, provoquées par l'hydrolyse de la lécithine, indiquent la production de lécithinase (**Guttman et Ellar, 2000**).

Activité hémolytique: L'activité hémolytique a été déterminée à 33 °C sur gélose au sang de mouton à 5% par inoculation de surface comme décrit par **Pruss et al. (1999)**. Les isolats ont été inoculés sur du milieu gélose nutritif sanguin (**Collins et al., 2001**). Les souches ont été classées en α (partiel), β (total) ou non hémolytique.

Activité de l'amylase: La capacité à hydrolyser l'amidon a été testée par inoculation sur le milieu à base d'amidon; les zones claires ont été détectées après incubation à 30°C pendant 24 h par l'addition de lugol sur les surfaces de la boîte de Pétri (**Collins et al., 2001**).

Activité caséinase: La caséinase a été identifiée selon la méthode de **Gudmudsdo (1996)** sur milieu gélose au lait. Les bactéries isolées ont été striées sur le milieu approprié pendant 24 h à 37 °C. Une zone transparente autour des colonies indique une activité caséinase.

1.4. Modèle antibiogramme des souches isolées

Pour sélectionner les isolats présentant une forte résistance, tous les isolats ont été testés pour leur sensibilité aux antibiotiques en utilisant les antibiotiques suivants: pénicilline

G (6 µg), doxycycline (30 µg), érythromycine (15 µg), norfloxacine (10 µg), amoxicilline (30 µg), ampicilline (10 µg) Cephalothine (30 µg), Carbénicilline (100 µg), Oxacilline (1 µg), Piperacilline (30 µg), Triéthoprim-Sulfaméthoxazole (25 µg), Tobramycine (30 µg), Rifampicine (5 µg) et polymyxine B (30 µg). L'antibiogramme a été réalisé sur gélose Mueller-Hinton, en utilisant un procédé de diffusion sur disque comme décrit par **Bauer et al. (1966)**. Les Inocula ont été fixées à 0,5 McFarland ou (OD = 0,08 à 0,1) à 620 nm, ce qui correspond à 10⁸ UFC / ml. L'incubation a été faite à 37 °C pendant 24 h. Les zones d'inhibition autour du disque ont été mesurées et interprétées comme sensibles, modérées ou résistantes.

2. Extraction des polyphénols à partir des échantillons végétaux

2.1. Solvants et standards

Tous les solvants (méthanol, éthanol, acétone) et les standards des polyphénols (Quercétine et acide gallique) utilisés dans cette étude proviennent de Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2. Préparation des courbes d'étalonnage

Des solutions mères à 1000 ppm de l'acide gallique et de quercétine ont été préparées dans le méthanol. Les courbes d'étalonnage ont été réalisées avec des solutions filles d'acide gallique (1- 200 µl) et de quercétine (1-400 µl) (Annexe II).

2.3. Extraction des polyphénols et des flavonoïdes à partir des échantillons végétaux

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de la plante *d'Ammi visnaga*, des écorces de citron (*Citrus limon*) et d'orange (*Citrus sinensis*). La plante *Ammi visnaga* a été recueillie, au mois d'Avril, dans la région de Sidi Lakhdar, wilaya de Mostaganem (Algérie), tandis que le citron et l'orange utilisées dans cette étude ont été achetés du marché de la région de Mostaganem. L'identification des échantillons étudiés a été faite par le Professeur Mr Mikhaldi de l'université de Mostaganem.

Les échantillons de fruits ont été lavés par l'eau, les peaux, y compris le flavedo et l'albédo, qui ont été séparés de ces agrumes. Les écorces sèches ont été broyées finement et conservés à 4° C pour l'utilisation ultérieure.

2.3.1. Le rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de l'extrait recueilli après extraction sur la quantité de la biomasse, exprimée en pourcentage. Le rendement d'extraction des trois végétaux utilisés dans cette étude a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\text{RDT (\%)} = \frac{(P1 - P2)}{P3} \times 100$$

P1 : Poids du ballon après évaporation ;

P2 : Poids du ballon avant évaporation (vide) ;

P3 : Poids de la matière végétale de départ.

Tous les échantillons ont été analysés en triple et le résultat a été exprimé par le pourcentage d'humidité de l'échantillon étudié. (**Harborne, 1980**).

2.3.2. *Ammi visnaga*

100 g de plante sèche ont été broyés dans un mortier pilon et extraits dans trois solvants différents à raison de 1/10 ml chacun : Ethanol (70 %) ; Acétone (70 %) ; Méthanol (70% et 100%). Les échantillons sont ensuite mis dans un récipient en verre fermé hermétiquement pendant 16 heures à l'obscurité. Cette macération a été réalisée à une température ambiante avec agitation. Les suspensions sont ensuite filtrées à travers un papier filtre ordinaire, et les solvants correspondants sont ensuite récupérés par un Rotavapor à 40°C (**Chavan et al., 2001**). Pour conserver toutes les propriétés biochimiques des substances actives, les extraits ont été conservés à 4°C.

L'extrait aqueux a été obtenu par trempage de 10 g de **plante en poudre** dans 100 ml d'eau stérile pendant 5 min. Les mélanges ont été centrifugés à 3000 tr / min pendant 20 minutes. Le surnageant a été utilisé pour la détermination de la teneur totale en phénol et de l'activité antioxydante (**Oboh et al., 2009**).

2.3.3. *Citrus sinensis* et *Citrus limon*

Les fruits lavés avec de l'eau distillée puis épluchés, les écorces ont été séchées à l'étuve à une température de 70° C. Ensuite, broyées et tamisées pour obtenir une poudre fine. 1 g de poudre de chaque échantillon a été homogénéisée avec différentes concentrations de méthanol aqueux. L'effet de différentes concentrations d'eau sur le pouvoir d'extraction des polyphénols du solvant sélectionné a été exploré (0-70% (V/V) de méthanol). Après agitation

magnétique à 900 tr/min pendant 30 minutes, les homogénats sont centrifugés à 3000 tr / min pendant 20 minutes. Chaque surnageant a été filtré par un papier filtre Whatmann 4, pour être finalement conservé à 4°C et à l'obscurité. En parallèle, une autre extraction a été réalisée avec un rapport Méthanol: Eau (50:50 v /v) constant, mais en faisant varier la quantité de l'échantillon (1 g ; 1,5 g ; 2,0 g et 2,5 g) (Agarwal, 2012).

3. Dosage colorimétrique des polyphénols totaux

3.1. Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par **Singleton et Rossi (1965)** avec le réactif de folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006 ; Ghazi et Sahraoui, 2005**).

3.2 .Mode opératoire

Une solution stock à une concentration de 2mg/ml d'extrait de chaque plante a été préparée dans de l'eau distillée, un volume de 0,5 ml de chaque dilution de la solution stock a été mélangé avec 5ml de réactif de Folin Ciocalteu (FCR) dilué dans l'eau distillée (1 :10). Après 6 minutes, 4 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% a été ajouté, puis une incubation du mélange réactionnel pendant une heure à température ambiante et à l'obscurité a été réalisée. L'absorbance a été mesurée à 765 nm. Le même protocole a été respecté pour préparer la courbe étalon en remplaçant le volume d'extrait par l'acide gallique. Toutes les mesures sont répétées 3 fois. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

4. Dosage colorimétrique des flavonoïdes

4.1. Principe

Le dosage des flavonoïdes de extraits végétaux a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par (**Zhishen et al., 2007**), basée sur la formation de complexes entre

les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium. Les complexes produits de couleur jaune absorbent dans le visible à 510 nm.

4.2. Mode opératoire

Une solution stock à une concentration de 2mg/ml d'extrait de chaque plante a été préparée dans de l'eau distillée. Un volume de 200 µl de nitrite de sodium NaNO₂ à 0,5 % a été mélangé avec 2 ml de chaque dilution de la solution stock. Après 6 min, 200 µl de chlorure d'aluminium AlCl₃ à 1 % a été ajouté au mélange. Ensuite, 2 ml d'hydroxyde de sodium NaOH à 1 M a été ajouté. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois.

La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée par la quercetine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercetine par gramme d'extrait.

5. Optimisation des conditions chromatographiques

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) est une technique de séparation analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide (appelée aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases – stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR) (Penchev, 2010).

La vaste gamme de polarité des molécules à analyser constitue le problème majeur rencontré lors des multiples chromatographies réalisées et qui est représenté par les co-élutions des pics. Cet événement peut être évité en modifiant la phase mobile, l'acidité, la phase stationnaire ainsi que le gradient.

5.1. Conditions chromatographiques

5.1.1. Appareil HPLC

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un appareil HPLC Shimadzu Lab Solution software ver. 5.10.153 (Kyoto, Japon), avec RP- Colonne. La phase mobile est composée par des solvants organiques. Les chromatogrammes ont été extraits à 280 nm pendant 2 h. Le volume

d'injection était 5 µl. L'identification des polyphénols a été faite selon le temps de rétention (Rt) et la littérature.

6. Etude des propriétés biologiques des extraits végétaux

6.1. Détermination du potentiel antioxydant des extraits végétaux

Pour évaluer l'effet antioxydant des extraits végétaux, trois techniques ont été réalisées: en utilisant le radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), la technique FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) et la méthode de blanchissement de la β carotène.

6.1.1. Test de réduction du radical stable DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl)

6.1.1.1. Principe

L'activité antiradicalaire des composés phénoliques contenus dans les extraits préparés a été évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl), sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction (capté par les produits testés) (**Shimada *et al.*, 1992 ; Zeghad, 2009**).

6.1.1.2. Mode opératoire

Une solution de 1 mM de DPPH a été préparée dans le méthanol absolu, puis un volume de 2 ml de chaque dilution de la solution mère de chaque extrait (2mg/ml) a été mélangé avec 0,5 ml de la solution DPPH. Après l'incubation à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 517 nm (**Shimada *et al.*, 1992**).

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) :

Pourcentage d'inhibition % = [(Abs témoin – Abs test)/ Abs témoin] x 100 (Popovici *et al.*, 2009).

Abs témoin : Absorbance du témoin sans extrait après 30 min.

Abs test : Absorbance de l'échantillon testé après 30 min.

La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'extrait permet de calculer la concentration efficace (efficent concentration value: EC50). Cette dernière est définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du DPPH à 50%.

6.1.2. Test de réduction du fer (FRAP) (Ferric reducing antioxidant power)

6.1.2.1. Principe

Le pouvoir réducteur d'une molécule est relatif à sa capacité de transfert des électrons et peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante. Dans cette technique, la couleur jaune de la solution change au vert et bleu selon le pouvoir réducteur de l'échantillon testé. Et, une absorbance élevée à 700 nm indique un pouvoir réducteur élevé (**Zovko Končić et al., 2010**).

6.1.2.2. Mode opératoire

Une solution stock à une concentration de 2mg/ml d'extrait de chaque plante a été préparée dans de l'eau distillée, 1 ml de chaque dilution de la solution stock a été mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1 %. L'ensemble a été incubé au bain marie à 50° C pendant 20 minutes. Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10 % a été ajouté pour stopper la réaction. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes, 2,5 ml de chaque surnageant a été mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3$) à concentration 0,1 %.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Toutes les mesures ont été répétées 3 fois. Le témoin positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

6.1.3. Test de blanchissement du β -carotène

6.1.3.1. Principe

L'activité antioxydante des extraits obtenus a été mesurée selon la méthode de (**Tepe et al., 2006**), L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (**Tepe et al., 2006**).

6.1.3.2. Mode opératoire

Dissoudre 2 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme. La solution obtenue est introduite dans un ballon contenant 2 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés avec agitation vigoureuse. De cette nouvelle solution 2,5 ml sont transférés dans des tubes auxquels sont additionnés 350 μ l de chaque extrait ou de VIT C (2 mg/l).

Un tube contenant 2,5 ml d'émulsion et 350 μ l d'éthanol servira de témoin négatif.

L'absorbance est immédiatement mesurée à 490 nm, D'autres lectures sont faites à différents intervalles de temps (0, 20, 40, 60, 80, 100 et 120 min) (Tepe *et al.*, 2006), Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

L'activité anti-oxydante relative est calculée selon la relation suivante :

$$\text{AAR} = (\text{Abs Échantillon} / \text{Abs témoin positif}) \times 100$$

Où :

AAR : activité antioxydante relative.

Abs Échantillon : absorbance de l'échantillon à tester.

Abs témoin positif : absorbance du VIT C.

7. Mise en évidence et détermination de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes

L'effet antibactérien a pour but de rechercher l'activité biologique de chaque extrait des plantes, *Ammi visnaga*, *Citrus sinensis* et *Citrus limon* vis-à-vis des différents isolats de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus cereus*.

7.1. Méthode des puits sur milieu de Mueller-Hinton gélosé.

7.1.1. Principe

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition, la souche étudiée sera qualifiée de sensible, intermédiaire ou résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (Broadasky *et al.*, 1976).

7.1.2. Repiquage des espèces bactériennes et préparation d'inoculum

Le support microbien est composé de 10 souches, dont 5 souches appartenant à l'espèce *Staphylococcus aureus* (SVLY3), (SPTS2R), (SFMG5BP), (SLGM1), (SSEM4), et 5 souches à l'espèce *Bacillus cereus* (BFMG17), (BLP2), (BPTS1), (BRIS3), (BCSV1). Ces souches étant préalablement isolées à partir des denrées alimentaires.

Les souches bactériennes ont été enrichies dans un bouillon nutritif à 37° C pendant 24 heures. Puis un aliquote de chaque suspension bactérienne a été ensemencé en stries dans des boîtes de Pétri préalablement coulées de gélose nutritive. Après l'incubation, deux ou trois colonies, bien isolées, ont été prélevées et mise en culture dans 10 ml de bouillon nutritif. Après 18 heures d'incubation à 37° C, Des dilutions ont été réalisées de la suspension afin de standardiser l'inoculum. Ce dernier doit être ajusté à une densité optique entre 0,08-0,1 à 600 nm soit environ 10⁸ UFC/ml.

7.1.3. Ensemencement

Une série de différentes concentrations de 1 ; 5 et 10 mg/ ml a été préparée dans de l'eau distillée stérile à partir de chaque extrait de plante.

L'essai de diffusion de puits sur gélose a été réalisé selon la méthode de **Valgas et al. (2007)**. Des boîtes de pétri contenant le milieu Mueller Hinton, ont été ensemencées par un volume de 50 µl de chaque suspension bactérienne, dont la densité optique a été ajustée à une densité optique de 0,08-0,1 à 600 nm pour toutes les souches bactériennes testées, l'ensemencement s'effectue par étalement à l'aide d'un râteau stérile de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. Sur la surface du milieu gélosé inoculée préalablement par les différentes souches testées, nous avons réalisé des puits de 6 mm de diamètre. Ensuite, un volume de 80 µl de chaque extrait végétal dissous dans de l'eau distillée a été ajouté dans les puits. Après incubation à 30 ° C pendant 24 h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés. L'ampicilline (30 µg) et un puit contenant le solvant seulement ont été utilisés comme témoins. L'activité antibactérienne des différents extraits végétaux a été évaluée contre cinq isolats de *Bacillus cereus* et cinq de *Staphylococcus aureus* et les souches de référence *Bacillus cereus* ATCC 14579 et *S. aureus* ATCC 29213. Tous les tests ont été effectués en triple.

7.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est considérée comme étant la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps

d'incubation de 18 à 24 h (Teresa Fera *et al.*, 1998). La détermination de la CMI a été réalisée par la technique de micro-dilution en milieu liquide tel que décrit par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

Dans cette technique, 100 µl de chaque suspension bactérienne ont été ajoutés aux puits d'une microplaque de 96 contenant déjà 100 µl de l'échantillon dilué d'une façon géométrique de raison de 2. La concentration finale de l'inoculum est 5×10^5 CFU/ml et la concentration maximale des échantillons testés est de 1 mg/ml

Des puits contenant du milieu de culture seul ou bienensemencé avec la souche testée mais sans l'échantillon ont été utilisés comme contrôle. Les microplaques ont été incubées à 37°C. Après 24 h d'incubation, la plus faible concentration qui a totalement inhibé le germe étudié est considérée comme la CMI.

7.3. Essai de comportement en essaimage (Swarming)

L'effet de l'extrait méthanolique d'*Ammi visnaga* sur la migration en essaimage des isolats de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* a été réalisé selon la méthode citée par Liaw *et al.* (2000). Des suspensions bactériennes ont été cultivées dans du bouillon Brain-Heart Infusion (BHI) et incubées pendant une nuit à 37 ° C. Les cultures ont été ensuite ajustées à une densité optique $DO = 1 \pm 0,05$ à 600 nm. 5 µl d'une culture bactérienne a été repiqué au centre de la surface des géloses PPGAS (sel de peptone-glucose-sel d'ammonium limité en phosphate) (KCl 20 mM, NH₄Cl 20 mM, MgSO₄ 1,6 mM, Tris-HCl MM, peptone 1,0 %, glucose 0,5 %) sans ou avec 0,5; 1, 5 ou 10 mg / ml de composés phénoliques, puis incubés à 37 ° C pendant 24 h. Pour surveiller la mobilité en essaimage, une solution de glutamate à 0,05 % à la place du NH₄Cl a été utilisée.

7.4. Quantification du biofilm bactérien par la méthode du cristal violet

Dans cette étude nous avons testé l'effet des extraits de la plante *Ammi visnaga* et des écorces d'agrumes (*Citrus limon* et *Citrus sinensis*) sur la croissance planctonique de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus* et leur pouvoir à éradiquer les biofilms bactériens formés par ces deux souches. En parallèle, nous avons utilisé les enzymes (la trypsine et la protéinase K) et l'acide salicylique pour comparer leur effet sur la croissance planctonique et l'adhérence des isolats pathogènes avec ceux de nos extraits végétaux.

Parmi les méthodes de quantification du « biofilm total », on peut citer la méthode du Cristal Violet (CV) dans laquelle le colorant est fixé sur le biofilm total puis solubilisé (par de l'éthanol par exemple). La DO de cette solution est proportionnelle à la quantité de biofilm total (Peeters *et al.*, 2008). Le CV est un colorant basique qui se lie aux molécules de surface chargées négativement et aux polysaccharides de la matrice extracellulaire. Les bactéries vivantes, les bactéries mortes et la matrice exopolysaccharidique sont donc colorées par le CV.

7.4.1. Cinétique de croissance des souches bactériennes au cours de la formation du biofilm bactérien

A raison d'évaluer la croissance planctonique et la biomasse adhérente des 10 isolats bactériens, nous avons inoculé des flacons contenant 50 ml du milieu TSB par 2 ml de suspensions bactériennes de chacune des dix isolats de *B. cereus* et *S. aureus* contenant dans de l'eau physiologie stérile ajustée à 600 nm à une densité optique de 0,05 (ce qui correspond approximativement à une concentration de 10^5 UFC/ml). Ce volume a été réparti à raison de 2 ml dans chaque tube en verre et l'incubation a été faite à 30° C pendant 48 h. Les essais ont été faits en trois répétitions.

Après différents temps d'incubation (2h, 4h, 6h, 20h, 24h, 30h et 48h) à 30°C nous avons mesuré la densité optique à 600 nm des suspensions bactériennes.

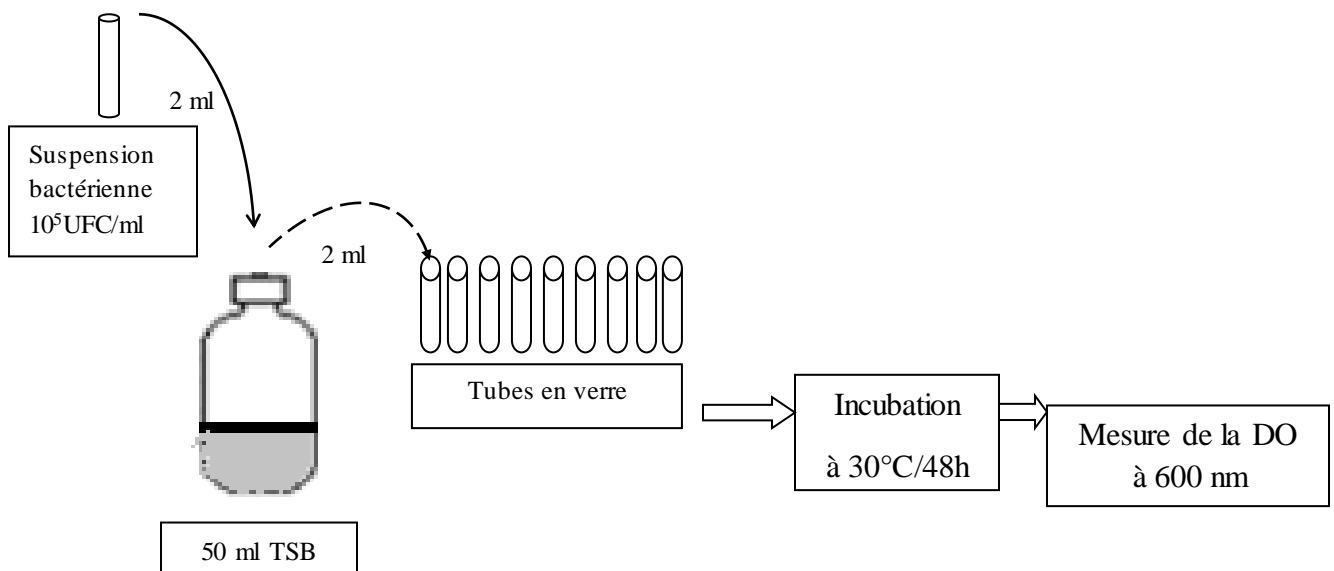


Figure 18. Evaluation de la cinétique de croissance des isolats bactériens de *B. cereus* et *S. aureus* au cours de formation de biofilm.

7.4.2. Evaluation de la biomasse adhérente en fonction du temps d'incubation

Après 2h, 4h, 6h, 20h, 24h, 30h et 48h d'incubation des tubes contenant le milieu TSB inoculé, l'évaluation de la biomasse adhérente a été réalisée par mesure spectrophotométrique à 595 nm, après l'utilisation d'analyse de violet cristal (**Li et al., 2003**).

La biomasse fixée est récupérée avec la solubilisation du cristal violet fixé sur les parois du tube à l'aide d'une solution d'un mélange éthanol 95 C° (2 ml). L'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La biomasse bactérienne accumulée au sein des biofilms formés est ainsi quantifiée. La quantité de colorant retenue étant alors directement proportionnelle à la quantité de bactéries fixées.

7.5. Effet des extraits végétaux sur la croissance planctonique et les biofilms matures de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*

A raison d'évaluer l'effet des extraits végétaux étudiés sur la formation des biofilms matures de *B. cereus* et *S. aureus*, une série de concentrations de 0,5 ; 1 ; 5 et 10 mg/ml (dans de l'eau distillée) ont été préparées à partir de chaque extrait d'*Ammi visnaga*. Alors que pour *Citrus limon* et *Citrus sinensis* des concentrations mères de 2 mg/ml ont été préparées. Chacun des dix isolats ont été inoculés avec les différentes concentrations des extraits végétaux dans des plaques de micro-titraton de 96 puits (**Regev-Shoshani et al., 2010**). Les solutions ont été réparties dans chaque puit comme suit :

- 100 µl de suspension bactérienne de chaque isolat.
- 100 µl de chaque extrait de plante (*Ammi visnaga*, *Citrus limon* et *Citrus sinensis*).
- des puits contenant 100 µl d'eau distillée et 100 µl d'extrait végétal sans culture bactérienne sont considérés comme témoin négatif. (Ligne A).
- des puits contenant 100 µl d'eau distillée et 100 µl de culture bactérienne sans extrait végétal sont considérés comme témoin positif. (Ligne H).

La densité optique a été mesurée à 595 nm après 48 h à l'aide d'un spectrophotomètre *ELISA* automatisé (*LABSYSTEMS Multiskan Ex*). Les valeurs de la densité optique des puits remplis par les extraits végétaux ont été comparées avec celles de culture bactérienne (témoin positif) pour calculer le pourcentage du taux d'inhibition des biofilms bactérien.

7.6. Effet des enzymes sur la croissance planctonique et les biofilms matures de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*

Pour tenter d'éliminer les biofilms formés par *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*, deux types d'enzymes, la trypsine et la protéinase K ont été sélectionnés. Les solutions

d'enzymes ont été préparées à raison d'une concentration de 2mg /ml dans un tampon phosphate à pH 8. Une gamme des concentrations de 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM et 200 µM a été réalisée et ajoutée à un volume de 2 ml de chaque culture bactérienne de différents isolats (**Khalil Zadeh, 2009**). L'incubation a été faite à 30° C pendant 48 h. Chaque essai a été répété trois fois.

7.7. Détermination de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique et la formation de biofilm des souches bactériennes étudiées

Chacune des dix isolats de *B. cereus* et *S. aureus* étudiées est inoculée dans des tubes à raison de 10⁵ UFC/ml soit 200 µl de suspension bactérienne/tube ajustée à une densité optique (DO) de 0,08, ces tubes contenant préalablement 2ml de TSB additionné par les différentes concentrations de l'AS (0,03- 0,06- 0,138 - 0,34 -0,69 – 1,38 – 2,76 mM) testées. La quantification des biofilms attachés aux tubes est évaluée par l'analyse cristal violet après d'incubation de 48 h.

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de façon générale est la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. Ici sa détermination s'est effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance des germes étudiés

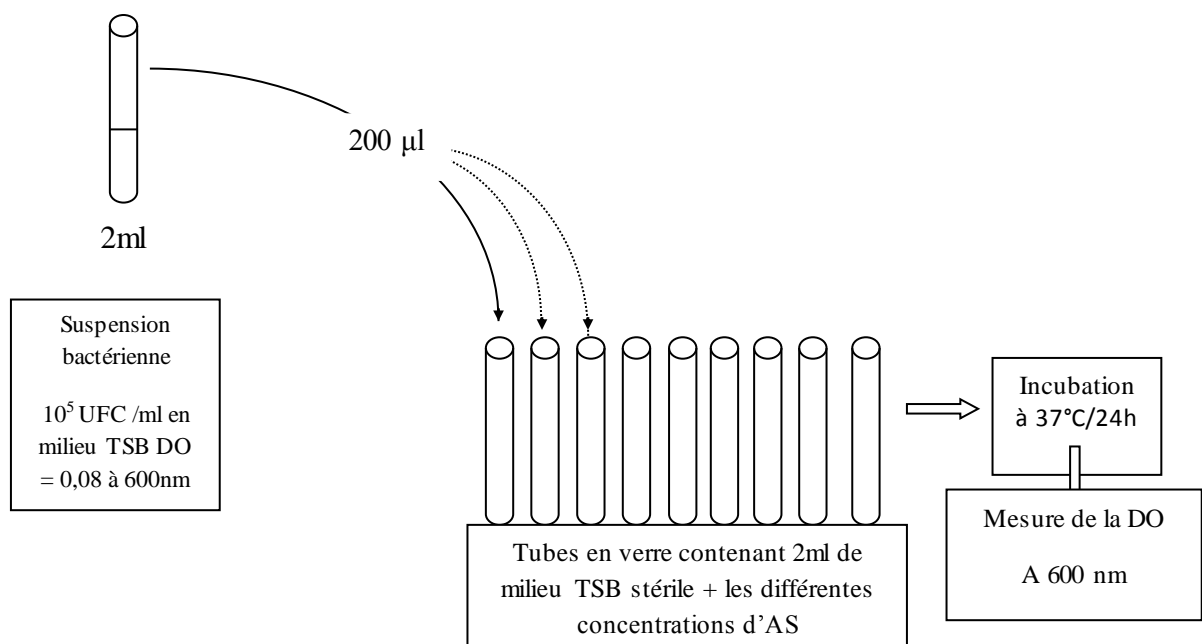


Figure 19. Diagramme représentant l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique et l'adhérence de *B. cereus* et *S. aureus*.

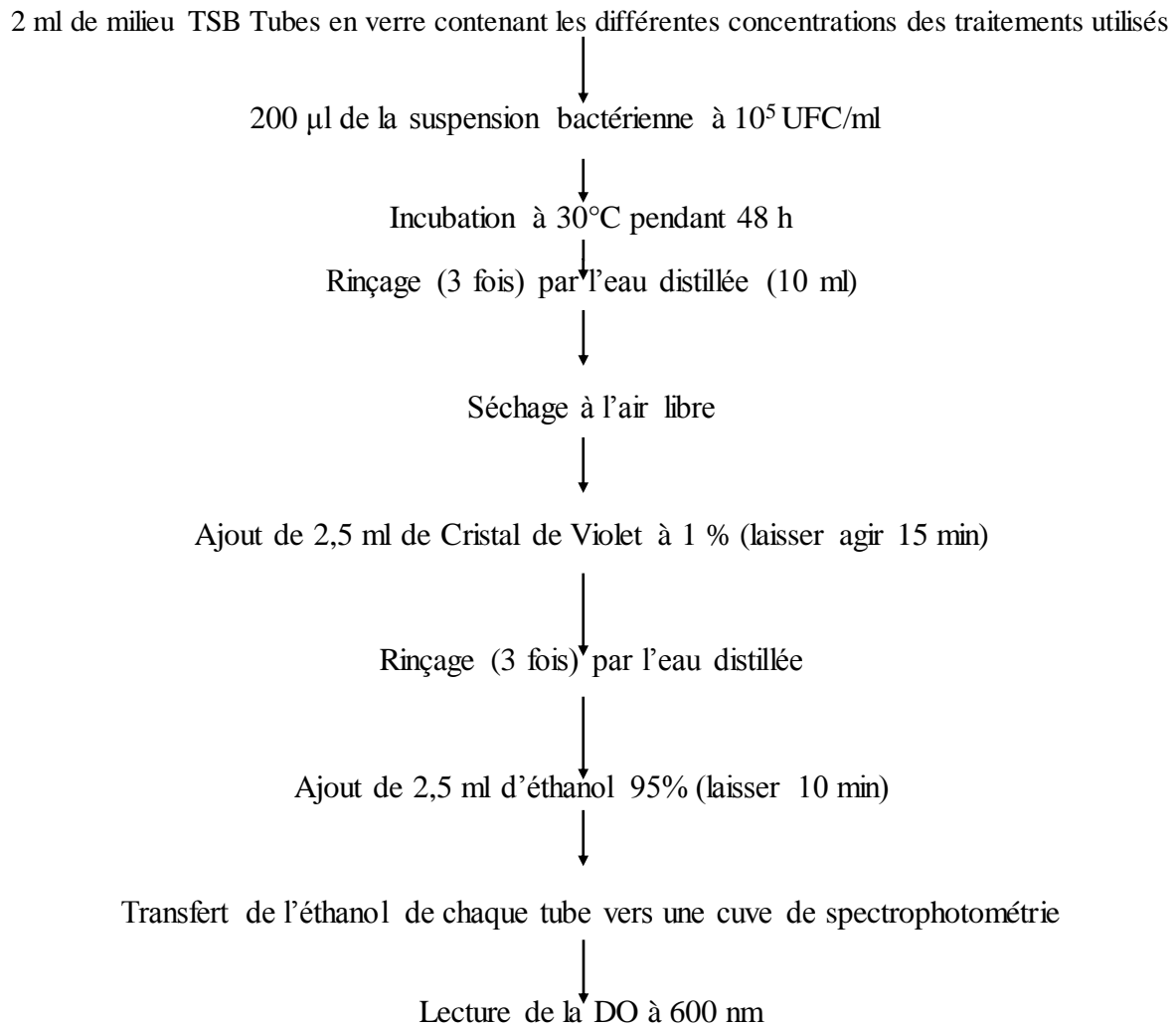


Figure 20. Protocole de quantification de la formation de biofilm.

8. Calcul du pourcentage d'inhibition de formation des biofilms matures formés par les souches de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation : Pourcentage de réduction du biofilm = $(A_C - A_T) / A_C \times 100$ (Olson *et al.*, 2002).

A_C : La densité optique (DO) à 595 nm du témoin positif.

A_T : La DO à 595 nm du biofilm traité par les extraits.

9. Traitement statistique des résultats

Chaque expérience a été indépendamment réalisée en 3 exemplaires et répétée trois fois dans un dispositif en randomisation totale et les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse de variance (ANNOVA) en utilisant le logiciel **Stat box version 6.4**. Les valeurs des IC50 ont été calculées à partir d'une analyse de régression linéaire. Les corrélations entre les variables ont été établies par Excel.



Résultats

Résultats

1. Isolement et identification des isolats bactériens

1.1. Isolement et identification des isolats de *Bacillus cereus*

156 isolats ont été obtenus par isolement à partir de différents échantillons de produits alimentaires (**Figure 21**), 24 isolats ont été sélectionnés après le screening de leur capacité de résistance à la pénicilline G et à d'autres antibiotiques.

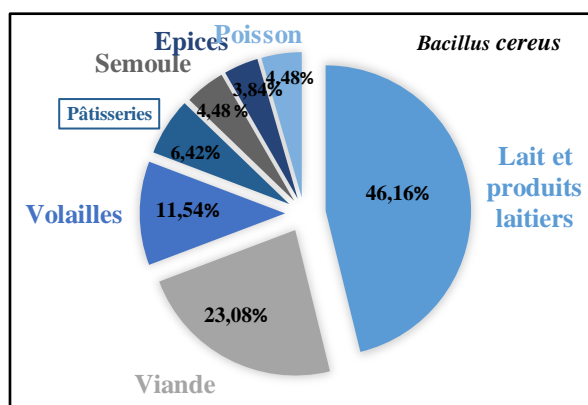


Figure 21. Répartition des isolats de *B. cereus* en fonction des prélèvements réalisés.

Les colonies de bactéries isolées étaient grandes, blanches ou grises et entourées d'une zone d'opacité. 19 d'entre eux ont été incapables de cataboliser le mannitol lors de la culture sur l'agar Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP). Les isolats étaient des bacilles à coloration Gram positive (**Figure 22**). Motiles, et croissent positivement dans le NaCl à 7 %, mais ne pouvait pas croître à 50° C. D'après les résultats indiqués dans le **tableau (7)**, 19 isolats appartenaient à *Bacillus cereus* et 5 à *Bacillus subtilis*. L'identification des espèces ci-dessus a été confirmée par le système API 20 E tel que recommandé par le manuel de Bergy.

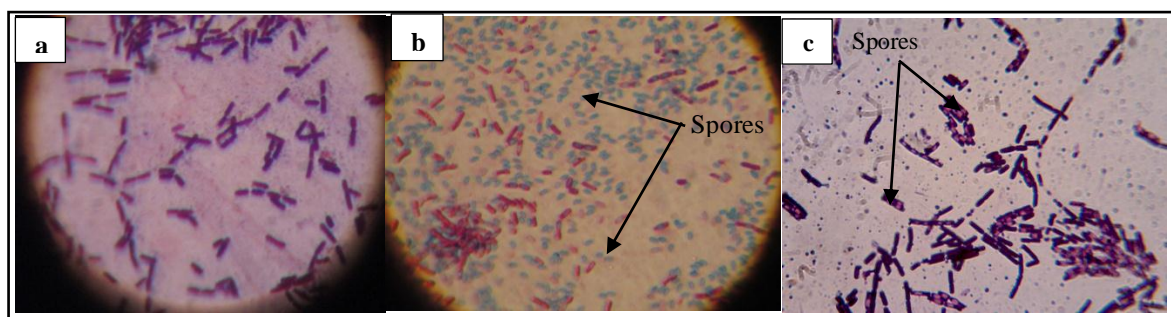


Figure 22. Observation microscopique montrant des bacilles (a) et des spores (b, c) de *Bacillus cereus*. (100X)

Tableau 7 : Identification biochimique des isolats de *Bacillus cereus*

	Indole	VP	Citrate	Urease	Nitrate	OF	7%NaCl	Man
BCSV1	-	+	+	-	+	+	+	-
BLGM18	-	+	+	-	+	-	+	+
BVLY31	-	+	+	-	+	+	+	-
BVLY16	-	+	+	-	+	+	+	-
BVLY12	-	+	+	-	+	+	+	-
LLVC2	-	+	+	-	+	-	+	+
BVDE17	-	+	+	-	+	+	+	-
BRIS7	-	+	+	-	+	+	+	-
BYLG5	-	+	+	-	+	+	+	-
LLVB1	-	+	+	-	+	+	+	-
BPTS1	-	+	+	-	+	+	+	-
BCSV2	-	+	+	-	+	-	+	+
BPTS2	-	+	+	-	+	+	+	-
BVLY22	-	+	+	-	+	+	+	-
BLLP2	-	+	+	-	+	+	+	-
BYDN3	-	+	+	-	+	+	+	-
BEPC1	-	+	+	-	+	-	+	+
BSEM1	-	+	+	-	+	-	+	+
BLVC3	-	+	+	-	+	+	+	-
BFMG16	-	+	+	-	+	+	+	-
BSEM4	-	+	+	-	+	+	+	-
BRIS3	-	+	+	-	+	+	+	-
BFMG11	-	+	+	-	+	+	+	-
BFMG17	-	+	+	-	+	+	+	-

+ : Test positif

- : Test négatif

1.2. Isolement et identification des isolats de *Staphylococcus aureus*

Concernant les isolats de *Staphylococcus*, 147 isolats ont été obtenus (**Figure 23**), 46 parmi eux ont été choisis suivant leur profil de résistance aux antibiotiques. Les colonies de *Staphylococcus* étaient de contour lisse, bombées de couleur blanche et jaune doré (*Staphylococcus aureus*). Les isolats étaient de coloration Gram positive en forme de grappes de raisin (**Figure 24**).

Sur milieu Chapman, toutes les isolats ont été capables de cataboliser le mannitol (virement de couleur du rouge au jaune), alors que sur milieu Baird Parker les colonies ont présenté une couleur noire entourées d'une zone opaque. Parmi les 46 isolats sélectionnés, 18 isolats ont été coagulase positive (39%) (**Tableau 8**).

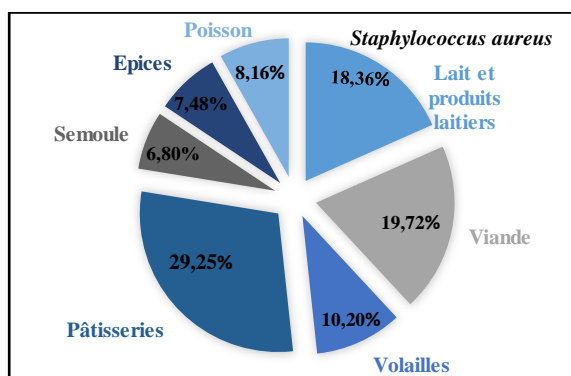


Figure 23. Répartition des isolats de *S. aureus* en fonction des prélèvements réalisés.

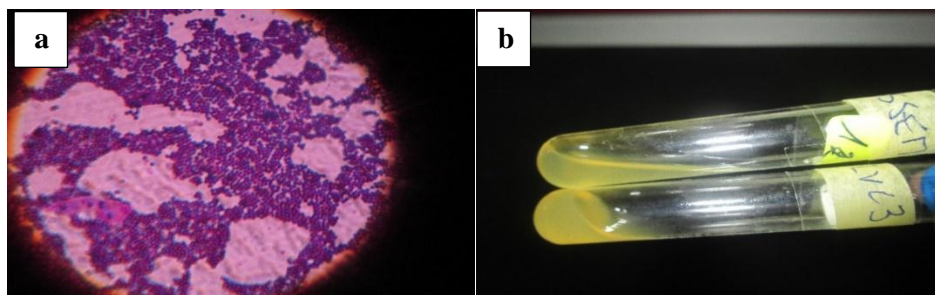


Figure 24. Identification de *Staphylococcus aureus*, (a) : Coloration de Gram, (b) : Test de coagulase.

Tableau 8 : Identification biochimique des isolats de *Staphylococcus aureus*

Test Souches	Gram	Catalase	Oxydase	Mobilité	Indole	VP	Nitrate	7,5%NaCl	Mannitol	Hémolyse	Coagulase	Urease
SVDE10	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SYDN1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SPTS2R	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SVLY7	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SEPC7	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SLV5BP	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SVDE7	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SLVC15	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SFMG2	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SLGM11	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SSEM2	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SRSC5B	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SLVC9	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SVDE9	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SEPC4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SCHR7	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SFMG14	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SYLG1.2	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SLGM4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SPSS15	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SLGM2	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SFMG8	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SEPC2	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SCSV8	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SGLC6	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SEPC1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SCSV21	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SPDR	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SRIS4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SYLG1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SFML4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SYLG4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SLVC3	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SFMG5	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
B												
SVLY3	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SLVC12	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SLGM1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SLVC2	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SLVC13	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SVLY16	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SVLY9	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SVLY3J	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SCSV2	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SVLY10	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SFMG43	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SEPC9	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
SYLG7	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+

2. Screening de la toxicité des isolats bactériens (Recherche des enzymes complémentaires)

Tous les isolats bactériens étudiés de *Bacillus* et de *Staphylococcus* étaient bêta-hémolytiques produisant la phospholipase C, l'amylase et la caséinase. Les résultats obtenus indiquent que les isolats de *B. cereus* et *S. aureus* étudiés présentent un niveau de toxicité et de virulence élevés (**Figure 25**).

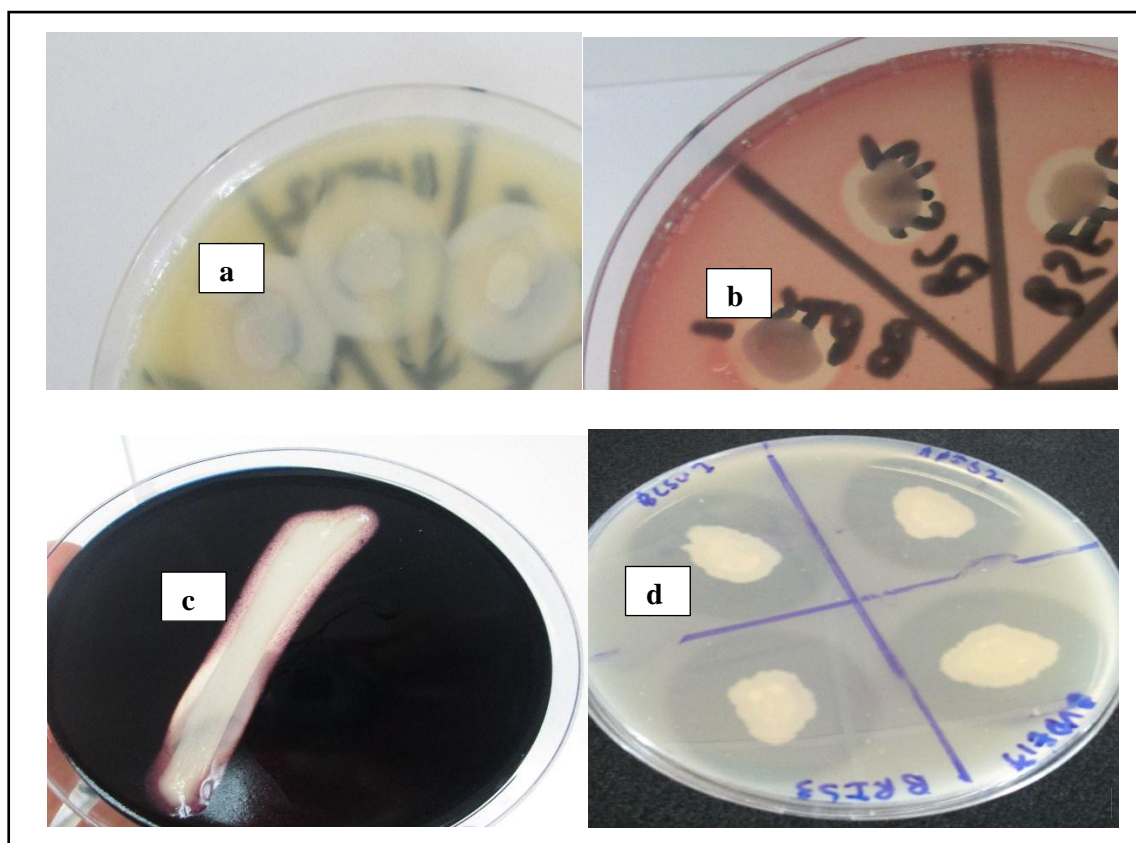


Figure 25. Recherche des enzymes complémentaires

(a) : Lecithinase, (b) : Hémolyse, (c) : Amylase et (d) : Caséinase.

3. Résistance aux antibiotiques

Le profil de résistance des isolats testés à différents antibiotiques étudiés a été réalisé. Tous les isolats de *B. cereus* ont montré une résistance élevée à la pénicilline G (100%), mais ont montré une résistance variable aux autres antibiotiques testés (**Figure 26**). Tous les isolats ont présenté une sensibilité élevée à la norfloxacine (89, 13%), à la doxycycline (84, 78%), à l'érythromycine (78, 26%) mais moins sensibles à l'oxacilline (8, 69%) et d'ampicilline (4, 34%).

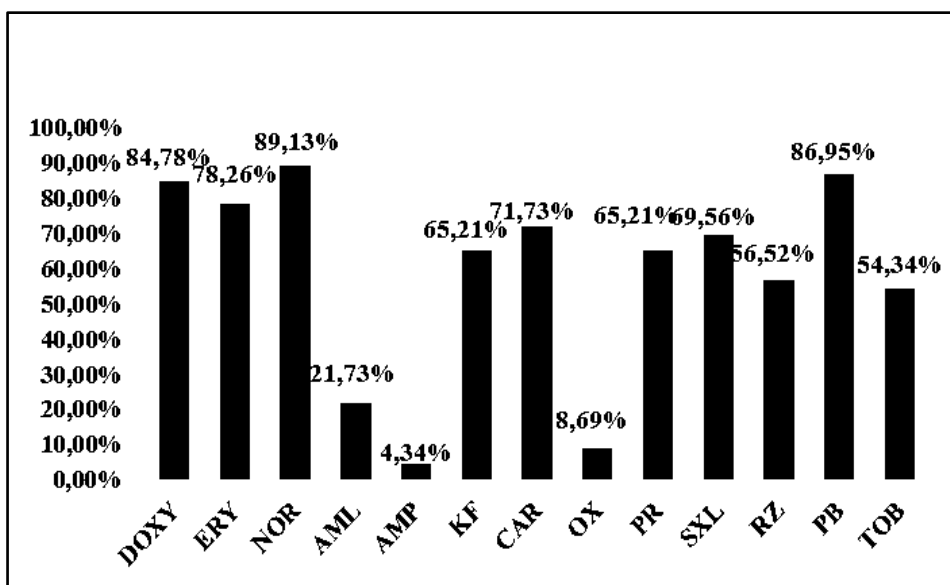


Figure 26. Pourcentage de résistance de *Bacillus cereus* aux antibiotiques.

Les isolats de *S. aureus* ont présenté une sensibilité élevée vis-à-vis la doxycycline (95,65%), suivie par l'érythromycine et Triéthoprim-Sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) avec un pourcentage de 82,60% et 80,43% respectivement. Mais une résistance élevée a été présentée pour les antibiotiques KF (84,79%), amoxiciline (60,87%) ampiciline (58,7%) (Figure 27).

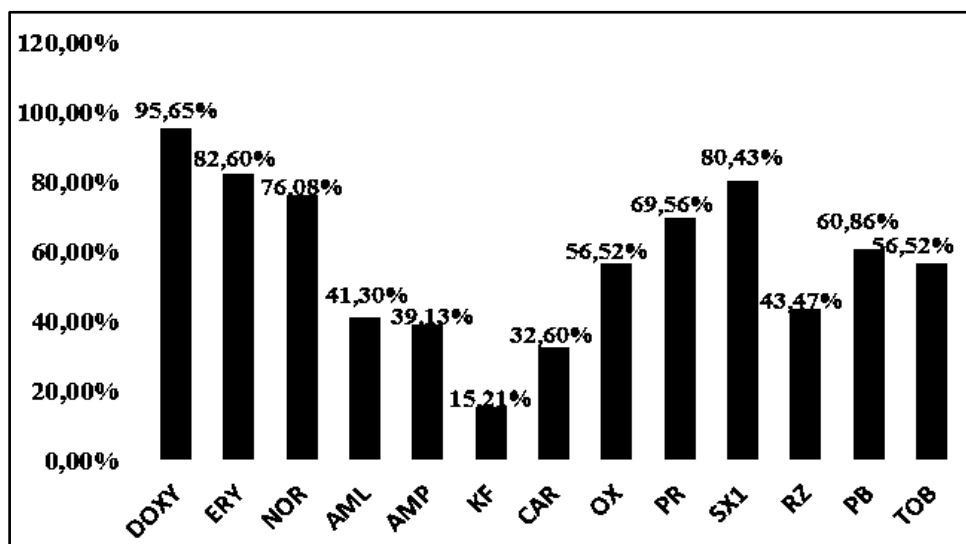


Figure 27. Pourcentage de résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques.

4. Extraction des polyphénols et des flavonoïdes à partir des échantillons végétaux

4.1. Calcul du rendement d'extraction

L'extraction par macération a été retenue comme technique d'extraction favorisée pour les trois échantillons utilisés dans cette étude. Pour l'espèce *Ammi visnaga*, nous avons utilisé trois solvants : le méthanol (70% et 100%), l'éthanol, l'acétone et l'eau.

Les rendements obtenus montrent des variations importantes entre les différents solvants. Ces résultats suggèrent que la plante *Ammi visnaga* est riche en composés peu polaires ayant des affinités avec le méthanol pur et l'eau avec des rendements de 4,6 et 5,4 %, respectivement (**Tableau 9**). Cependant, cette plante semble riche en composés polaires ayant une forte affinité pour l'acétone, l'éthanol et le méthanol avec des rendements de 7,8 ; 9,8 et 12,5 %, respectivement.

Tableau 9 : Rendements d'extraction obtenus pour les différents extraits de la plante *Ammi visnaga*

	Extrait				
<i>Ammi visnaga</i>	MeOH 70%	Ethanol 70%	Acetone 70%	MeOH pur	Extrait Aqueux
Rendement %	12,5	9,8	7,8	4,6	5,4

MeOH : Methanol

Les résultats du rendement obtenus lors de l'extraction des agrumes par le méthanol ont montré que les extraits de *Citrus limon* ont représenté des pourcentages élevés par rapport à *Citrus sinensis*. Le volume d'eau ajouté aux différentes concentrations du méthanol a influencé le taux de rendement, à 20% nous avons obtenu des valeurs faibles par rapport à 50 et 70%. Mais au-delà de 50% l'augmentation n'était pas importante. En fixant la concentration du méthanol à (50% v/v) et en variant la quantité de la matière végétale sèche à extraire. Le rendement a été augmenté avec l'augmentation de la quantité de la matière végétale (de 1g à 2,5g). A 2,5g, nous avons obtenu un rendement de 3,8% et 4% pour *Citrus limon* et *Citrus sinensis*, respectivement (**Tableau10**).

Tableau 10 : Rendements d'extraction obtenus pour les différents extraits de *Citrus sinensis* et *Citrus limon*.

Extrait Méthanolique	Rendement	
	<i>Citrus limon</i>	<i>Citrus sinensis</i>
1g (poudre sèche)	3,5%	3%
1,5g (poudre sèche)	3,8%	3,3%
2g (poudre sèche)	3,9%	3,4%
2,5g (poudre sèche)	4%	3,8%
20% (v/v)	2,04%	2,65%
50% (v/v)	3,3%	2,96%
70% (v/v)	3,95%	3,57%

4.2. Effet de la concentration et du type de solvant sur le rendement total en phénols

Les résultats de la **figure (28)** montrent le taux des phénols totaux et des flavonoïdes à l'aide de différents solvants. La teneur phénolique de tous les extraits variait de 18, 66 à 172, 66 mg EAG / g. Les valeurs les plus élevées ont été trouvées dans l'extrait de méthanol à 70% (172, 66 mg EAG / g) qui était significativement plus élevé que l'extrait d'éthanol 38 mg EAG / g et l'extrait d'acétone qui représente le plus faible rendement avec 18, 66 mg EAG / g. Le contenu total en flavonoïdes d'*Ammi visnaga* variait de 3, 3 à 22 mg EQ / g. L'extrait éthanolique a montré la valeur la plus élevée, tandis que la valeur la plus basse a été obtenue par l'extrait méthanolique pur (100%) (**Figure 28**). En général, compte tenu de tous les solvants utilisés dans cette étude, nous avons trouvé que le méthanol à 70% était le solvant le plus efficace pour extraire les phénols totaux des plantes. Pour améliorer l'effet de la concentration du solvant d'extraction, nous avons utilisé un extrait (70%), pur (100%) de méthanol et d'eau. Nous avons également constaté que le rendement d'extraction des phénols totaux obtenus par le méthanol 70% était plus élevé (172, 66 mg EAG / g) que le méthanol absolu et l'extrait aqueux avec 96 mg EAG / g et 21, 66 mg EAG / g respectivement.

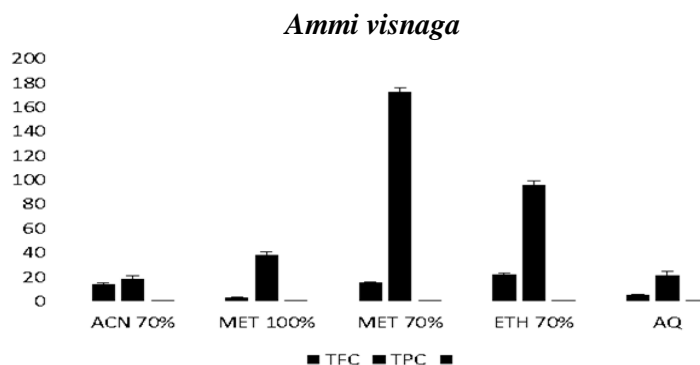
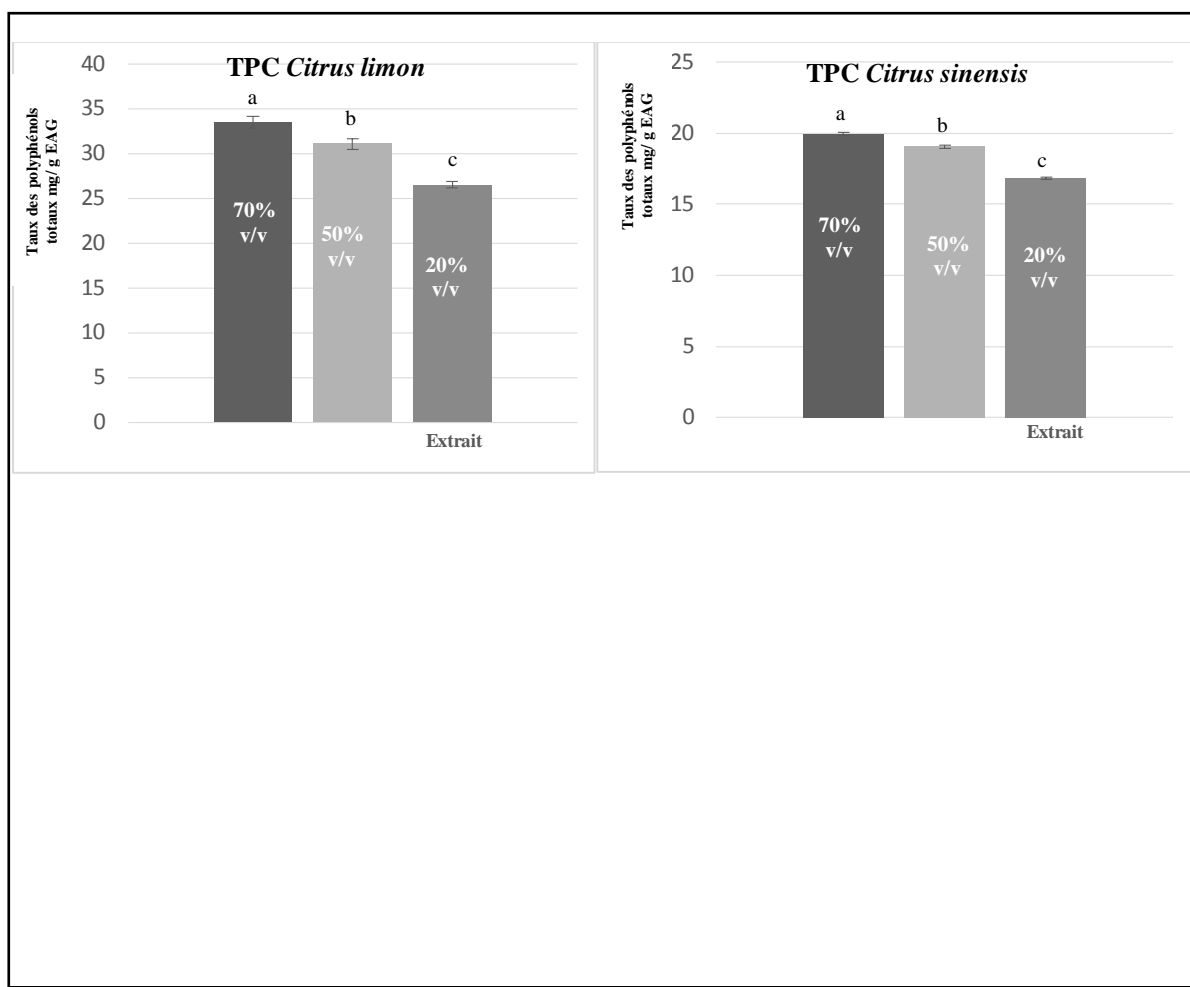


Figure 28. Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes d'*Ammi visnaga*.

La **figure 29** montre la composition quantitative des composés phénoliques des extraits de *Citrus limon* et *Citrus sinensis* analysés. L'analyse de ces résultats montre que les extraits des écorces de *Citrus limon* sont les plus riches en composés phénoliques par rapport à *Citrus sinensis*, à la concentration 70% et pour les deux espèces végétales nous avons obtenu les teneurs en polyphénols et flavonoïdes les plus élevées avec des valeurs de 33,5 mg EAG/g et 2,977 mg EQ/g, respectivement pour *Citrus limon*, et 19,95 mg EAG/g et 1,33 mg EQ/g, respectivement pour *Citrus sinensis*.



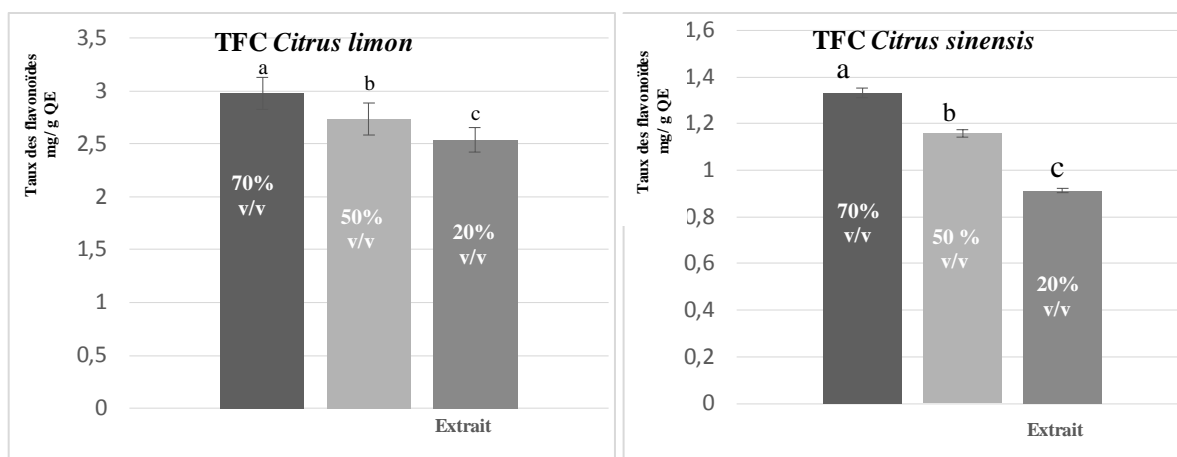
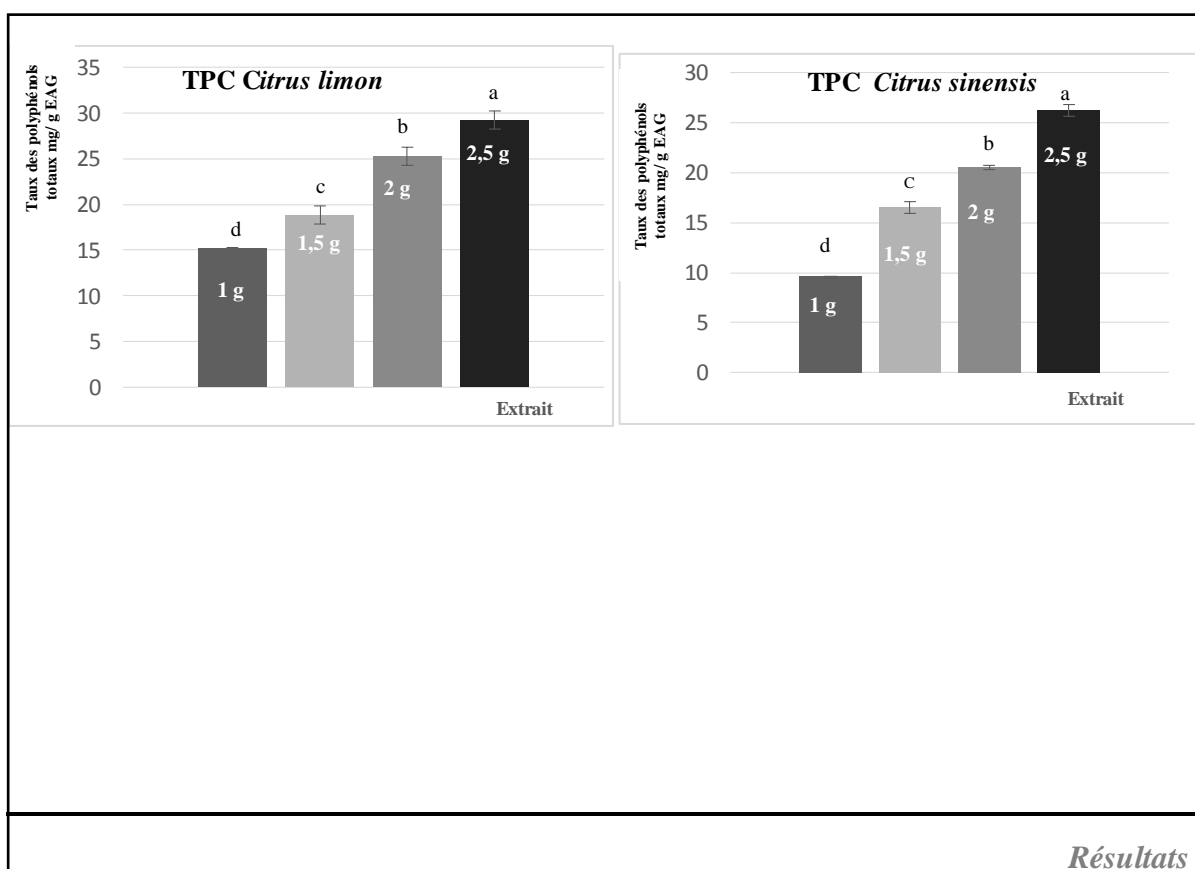


Figure 29. L'effet des différentes concentrations d'eau sur la teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*.

Les résultats illustrés dans la **figure 30** représentent l'effet de variation de la quantité de matière végétale à extraire sur le taux des polyphénols totaux et des flavonoïdes des écorces de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*, ce taux augmente avec l'augmentation de cette quantité (de 1g à 2,5g). A 2,5 g nous avons obtenu les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et flavonoïdes, 29,27 mg EAG/g et 3,55 mg EQ/g, respectivement pour *Citrus limon* et 26, 25 mg EAG/g et 2,91 mg EQ/g respectivement pour *Citrus sinensis* (**Annexe II**).



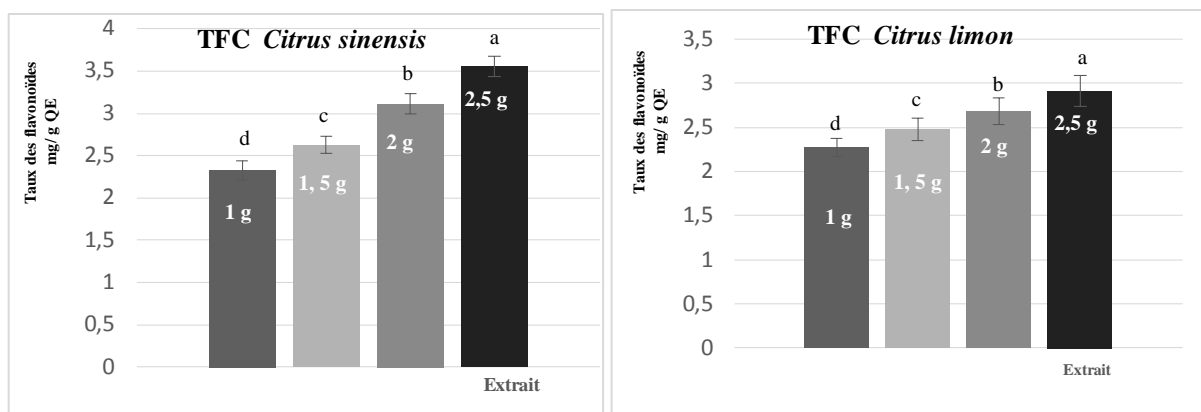


Figure 30. L'effet de variations de la quantité de poudre sèche de *Citrus sinensis* et *Citrus limon* sur la teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes.

4.3. Identification par HPLC/UV des métabolites secondaires des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga*, *Citrus limon* et *Citrus sinensis*

Les résultats des analyses effectuées sur les extraits méthanoliques par HPLC indiquent que tous les extraits comportent des métabolites secondaires signalés par les chromatogrammes illustrés dans les figures ci-dessous. L'extrait *Citrus limon* a présenté une prépondérance de la présence de plusieurs flavonoïdes (21 pics identifiés) par rapport à *Citrus sinensis* (16 pics identifiés). Alors que l'extrait d'*Ammi visnaga* a présenté plusieurs flavonoïdes dont les plus connus le visnagin et la khelline (**Figure 31, 32 et 33**).

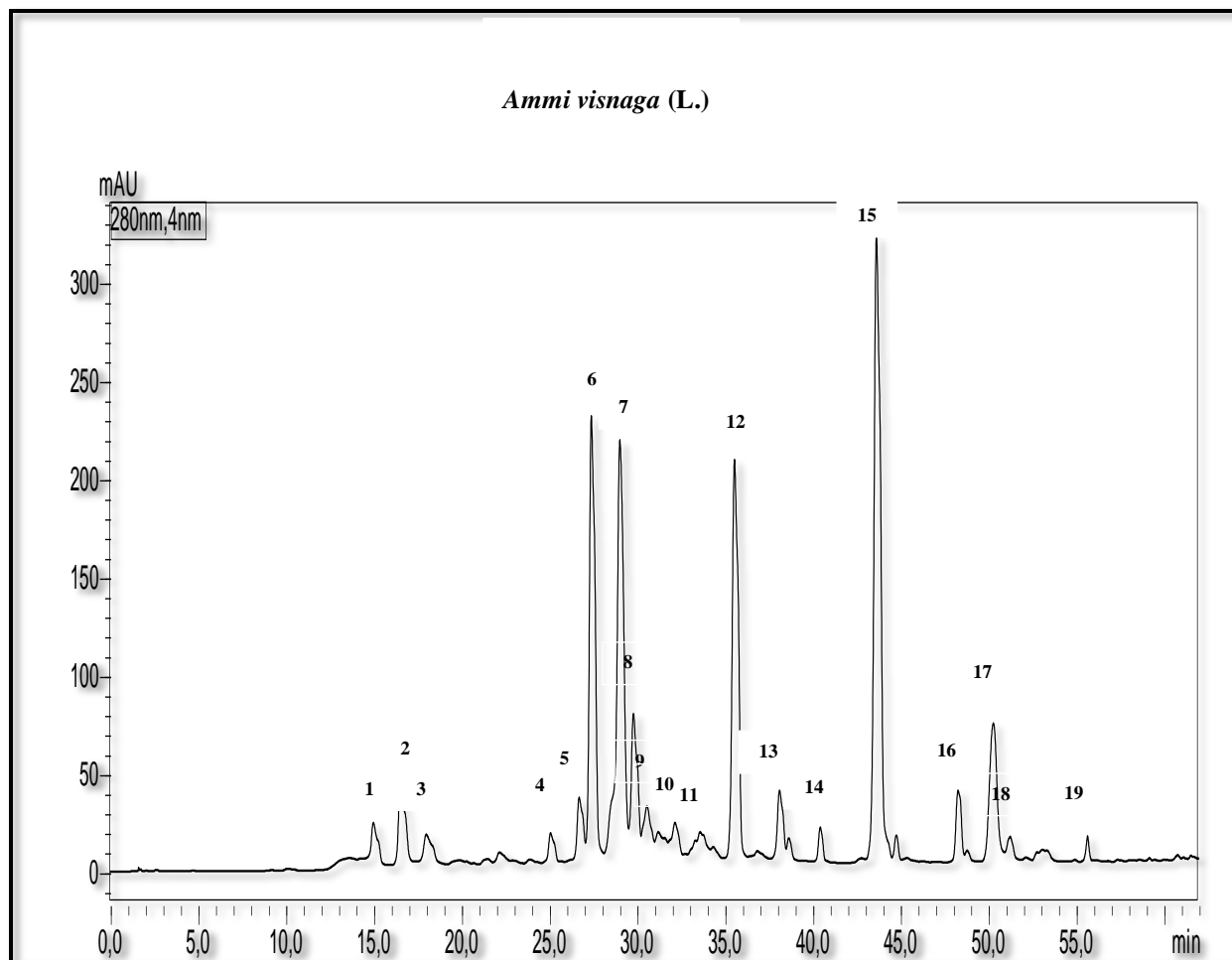


Figure 31. Identification des pics présents sur le chromatogramme de l'extrait méthanolique d'*Ammi visnaga* visualisées à 280 nm.

12 : Khelline , 15 : Visnagin

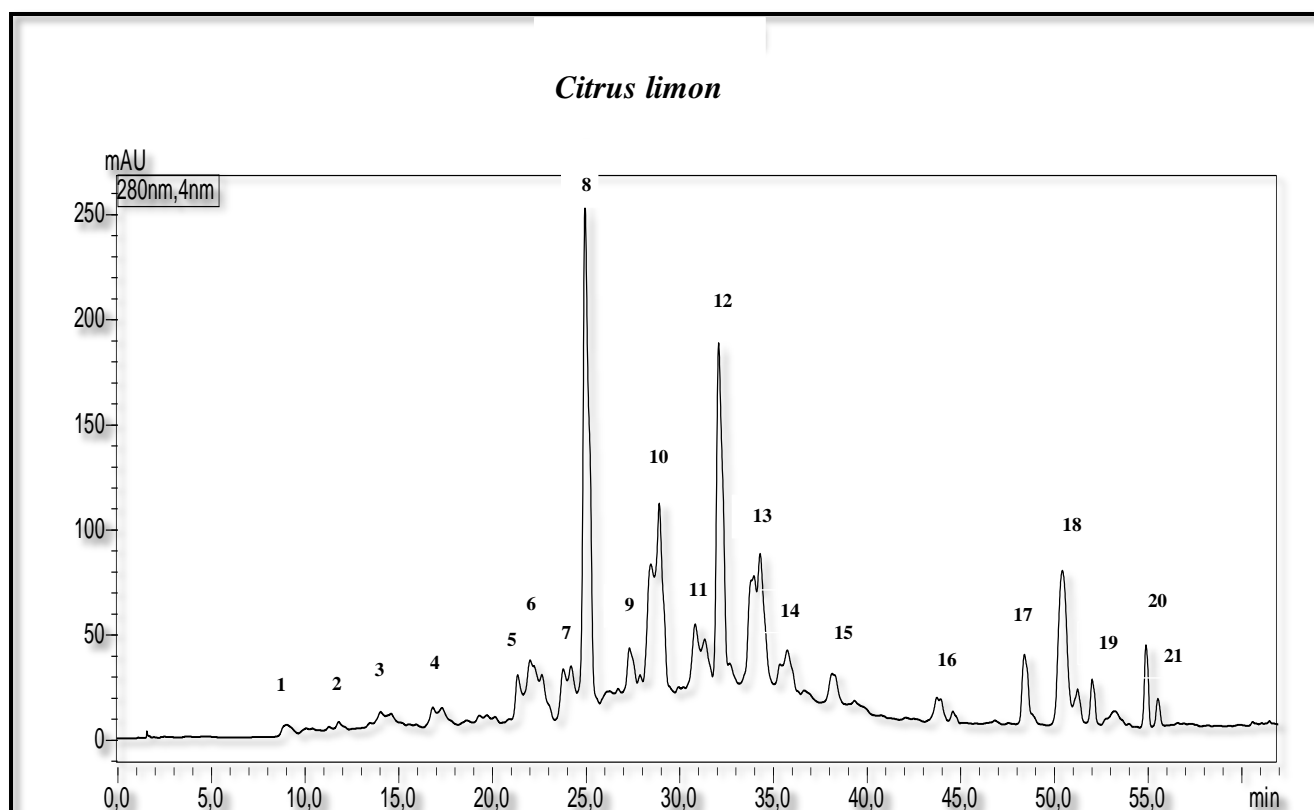


Figure 32. Identification des pics présents sur le chromatogramme de l'extrait méthanolique de *Citrus limon* visualisées à 280 nm.

- (1) Eriocitrin (2) Hesperidin (3) 6,8-di-C-Glu-Apigenin (4) 6,8-di-C-Glu-Diosmetin (5) Luteolin (6) Diosmin (7) Naringin (8) Neohesperidin (9) Quercetogetin (16) Heptamethoxyflavone (17) Natsudaïdain (18) Nobiletin (19) Sinensetin (20) Eriocitrin (21) Isorhoïfolin.

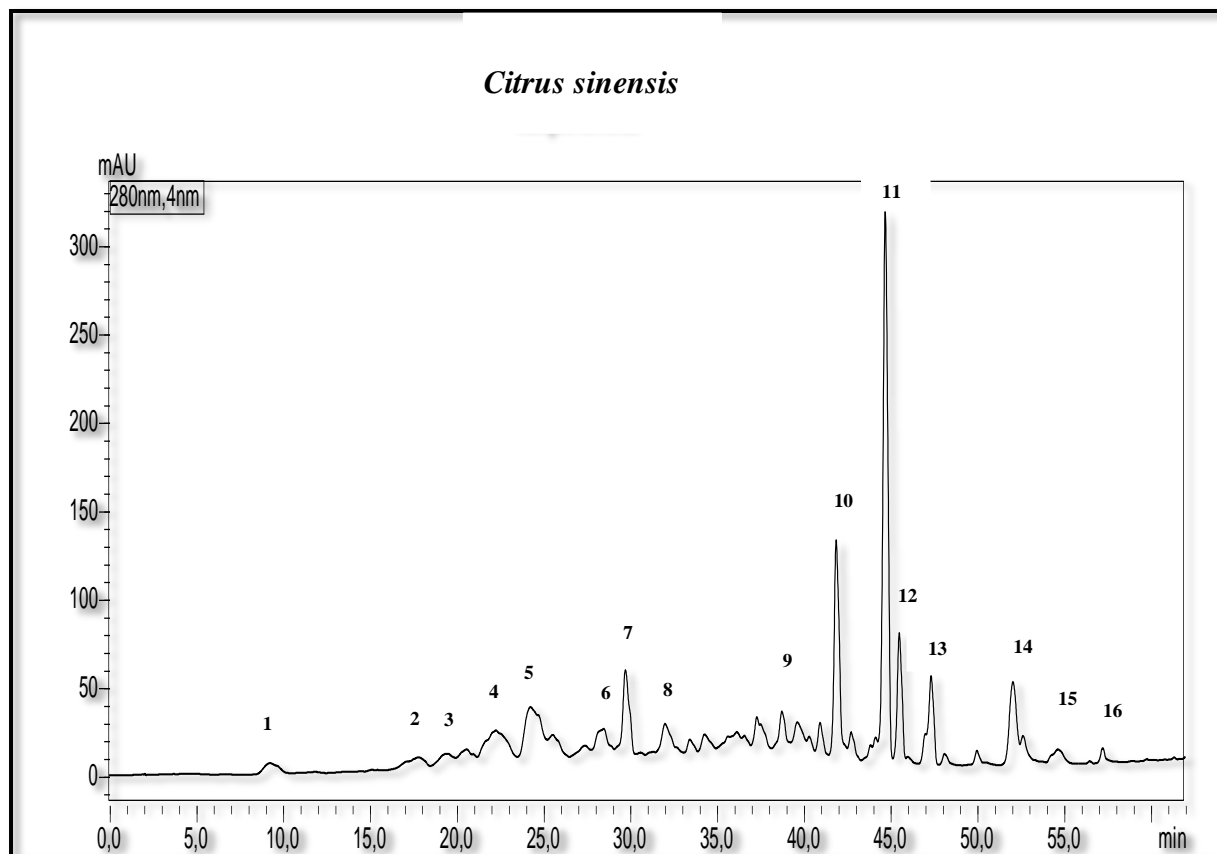


Figure 33. Identification des pics présents sur le chromatogramme de l'extrait méthanolique de *Citrus sinensis* visualisées à 280 nm.

- (1) Didymin (2) Eriocitrin (3) Hesperidin (4) Narirutin (5) Neohesperidin (6) 6,8-di-C-Glu-
(7) Apigenin (8) 6,8-di-C-Glu-Diosmetin (9) Rhoifolin (10) Isorhoifolin (11) Diosmin
(12) (13) Neodiosmin (14) Heptamethoxyflavone (15) Nobiletin (16) Sinensetin

5. Détermination du potentiel antioxydant des extraits végétaux

Pour évaluer l'effet antioxydant des extraits végétaux, trois techniques ont été réalisées : en utilisant le radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), la technique FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) et la méthode de blanchissement de la B carotène.

5. 1. Activité antioxydante par DPPH

A/ Ammi visnaga

En ce qui concerne les résultats de l'activité antioxydante par le test DPPH, et en comparaison avec l'acide ascorbique (AA) comme témoin positif, nous avons trouvé que les extraits méthanoliques représentaient l'activité de piégeage de DPPH la plus élevée (89, 21%) à une concentration de 3 mg / ml, cette valeur était significativement différente de l'éthanol et d'acétone à la même concentration (**Figure 34**). Ces valeurs étaient inférieures à celles obtenues par l'acide ascorbique (témoin positif) qui représentent 91, 79%. Indépendamment du type de solvant, les extraits avec des concentrations de 70% de solvant utilisé présentaient une capacité de piégeage de radicaux DPPH supérieure à ceux avec leurs extraits absolus de méthanol et de l'eau. Ce résultat est similaire à celui observé par la teneur totale en polyphénols. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues pour les extraits *d'Ammi visnaga* (L) étudiés sont représentées dans la **figure 36**. L'extrait méthanolique se révèle être de 1, 46 mg / ml alors que l'extrait acétonique est de 3,1. Les résultats indiquent que la capacité de piégeage de l'extrait méthanolique *d'Ammi visnaga* (L) sur le radical DPPH était forte. La **figure 35** représente les résultats de la corrélation entre les activités antioxydantes (méthodes DPPH et FRAP) et la corrélation entre la teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes. Une forte corrélation a été obtenue entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante (IC₅₀) des différents extraits de plante *Ammi visnaga* où $R^2 = 0,9203$.

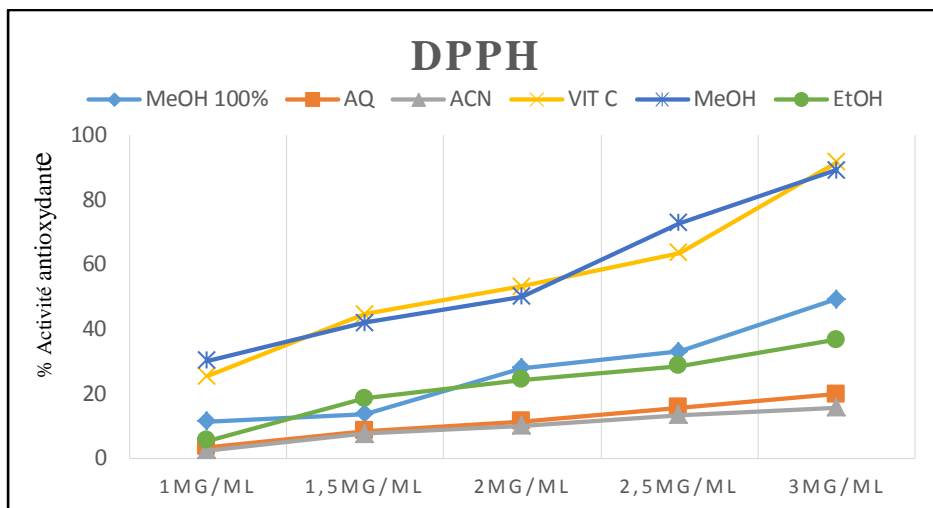


Figure 34. Test de DPPH d'Ammi visnaga.

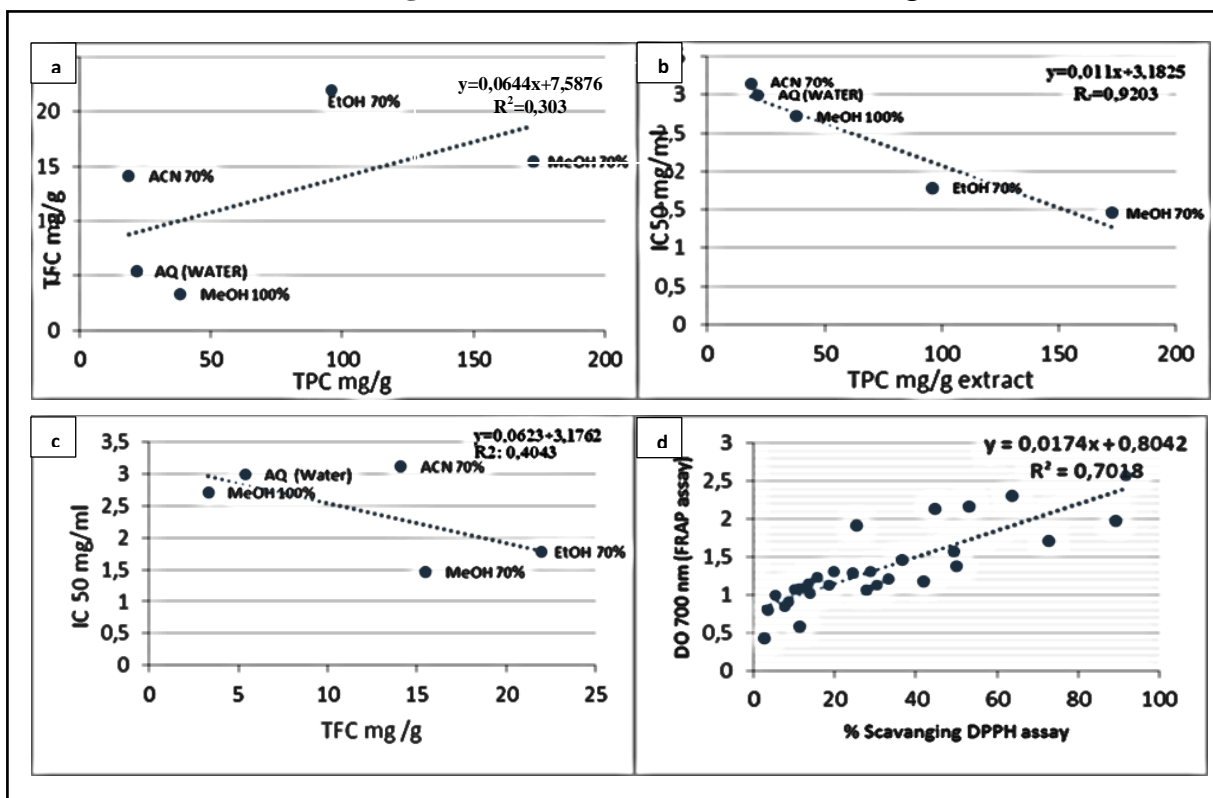


Figure 35. Corrélation entre les activités antioxydantes (méthodes DPPH et FRAP) et la corrélation entre la teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes d'extrait d'Ammi visnaga.

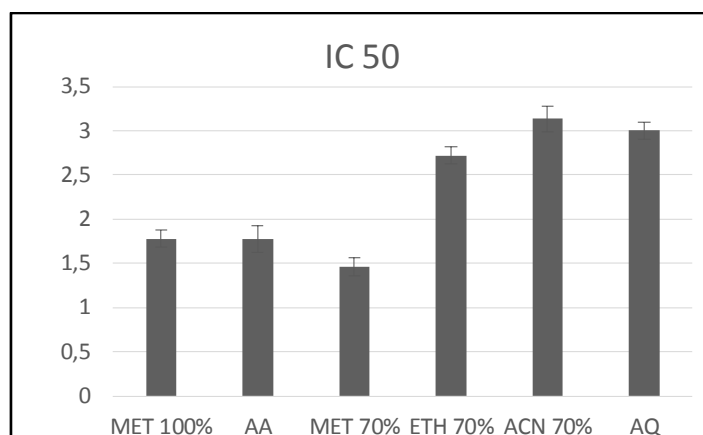


Figure 36. Concentrations responsables à 50% de réduction du radical DPPH (IC50).

D'après les résultats obtenus lors de l'activité antioxydante représentés sur les figures (37 et 38), nous avons révélé que tous les extraits des écorces de *Citrus limon* et *Citrus sinensis* étudiés possédant un pouvoir antioxydant qui se diffère entre les espèces végétales elles-mêmes, et par la concentration du solvant utilisé. Nous avons constaté que le pouvoir antiradicalaire de *Citrus limon* est plus important à celui de *Citrus sinensis*, à 70% et à 2,5 g nous avons obtenu un pourcentage de piégeage de 57,44 et 63,73 %, respectivement pour *Citrus limon*, et 50,03 et 51,08 %, respectivement pour *Citrus sinensis*. Ces valeurs ont été faibles par rapport à celles obtenues par l'acide ascorbique 61,22 et 65,03 %, respectivement.

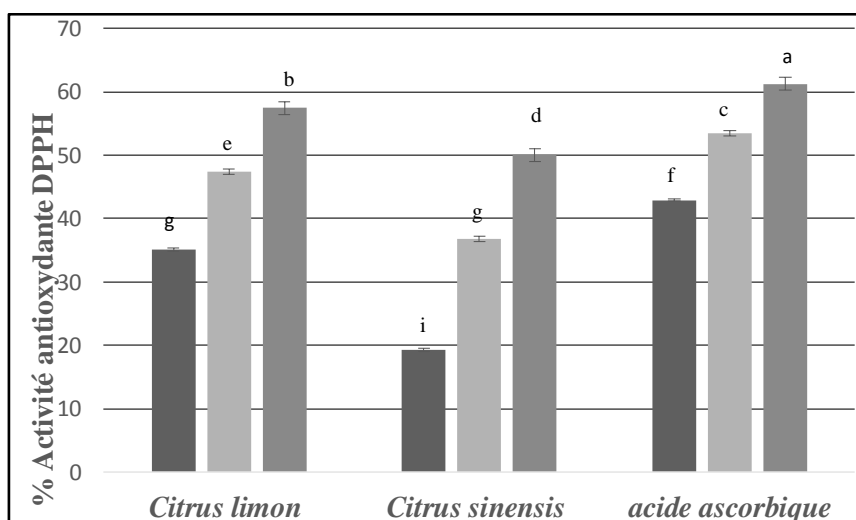


Figure 37. Effet de l'addition de l'eau au MeOH sur le piégeage du radical libre DPPH par *Citrus limon*, *Citrus sinensis* et l'acide ascorbique.

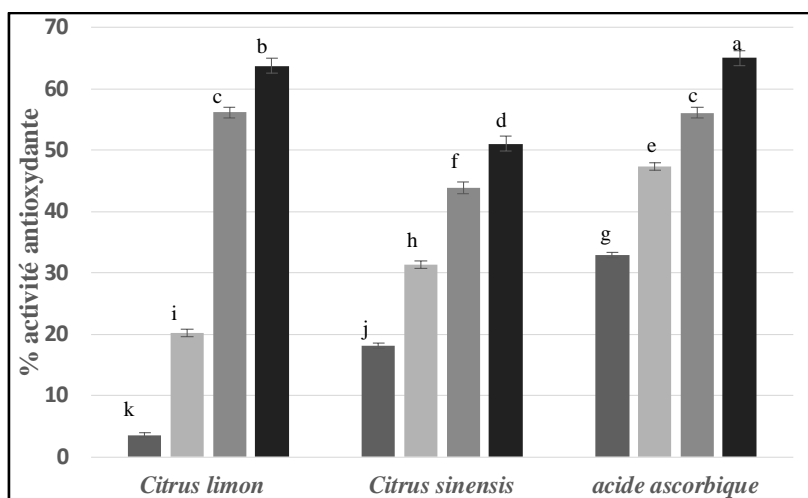


Figure 38. Effet de variation de la quantité de matière végétale sur le piégeage du radical libre DPPH par *Citrus limon*, *Citrus sinensis* et l'acide ascorbique.

5.2. Méthode de FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits d'*Ammi visnaga* à différentes concentrations utilisées ont montré une plage de valeurs d'absorbance de 0,4 à 2,57 à 700 nm (**Figure 39**). Nous avons également constaté qu'une concentration élevée de chaque extrait augmente la puissance réductrice. Les extraits méthanoliques absolus et aqueux présentaient une puissance réductrice élevée par rapport aux autres extraits végétaux. L'extrait méthanolique à 70% représente la valeur la plus élevée de $1,974 \pm 0,14$ à 3 mg / ml.

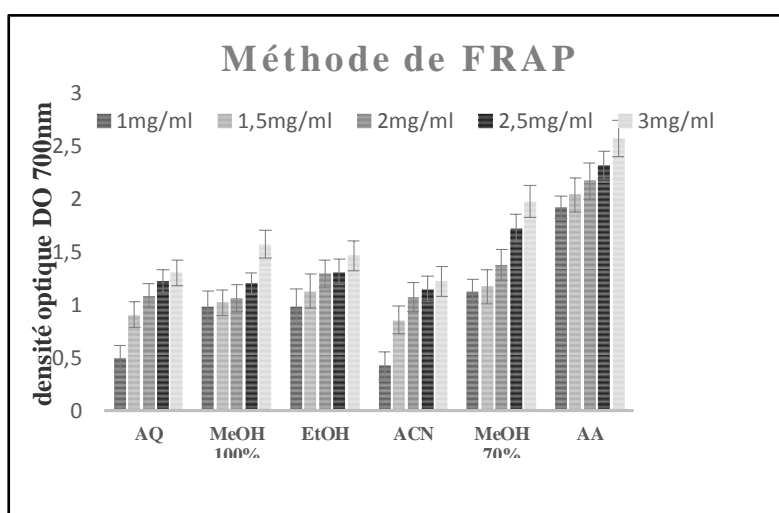


Figure 39. Pouvoir réducteur des extraits de la plante *Ammi visnaga* et de l'acide ascorbique.

L'activité antioxydante des extraits des écorces d'agrumes étudiés a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{+3} en fer ferreux Fe^{+2} . Dans notre travail nous avons opté pour tester

le pouvoir réducteur des extraits des écorces de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*. L'acide ascorbique (AA) a été utilisé comme antioxydant de référence.

Les résultats obtenus ont montré que l'augmentation de la réduction du fer (DO à 700nm) est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration de l'acide ascorbique et des deux extraits des écorces d'agrumes (**Figure 40**).

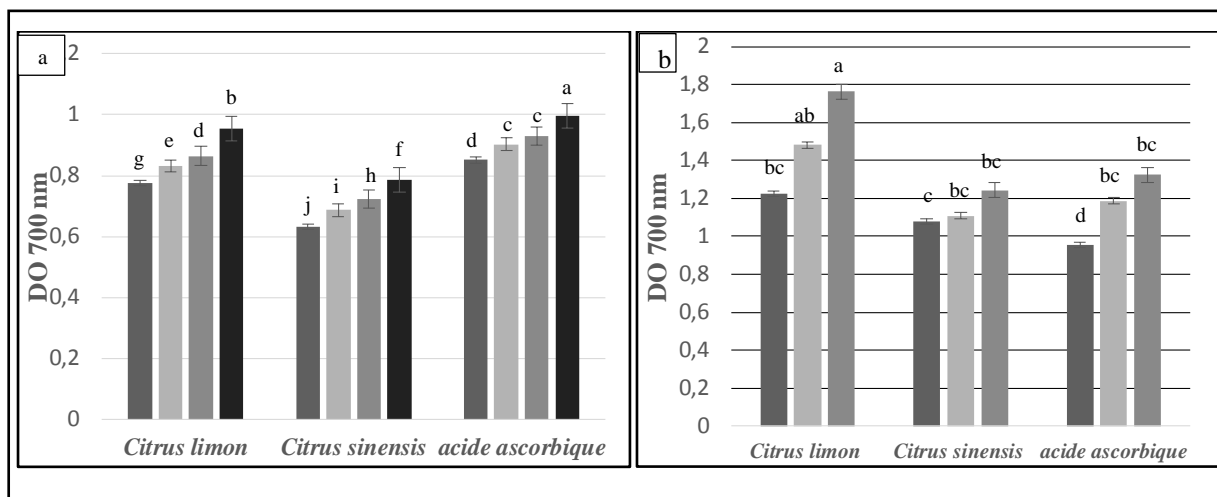


Figure 40. Effet des concentrations d'eau (a) et de variation de la quantité de matière végétale (b) sur le pouvoir réducteur (FRAP) par *Citrus limon*, *Citrus sinensis* et l'acide ascorbique.

5.3. Test de blanchissement de la β -carotène

A partir des courbes de cinétique de blanchissement du β -carotène des extraits de la plante *Ammi visnaga* et les écorces d'agrumes de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*, nous avons remarqué que l'extrait méthanolique 70% d'*Ammi visnaga* ainsi que les deux extraits 70% et 2,5 g de *Citrus limon* et la vitamine C, exercent un grand effet préventif significatif ($p < 0,05$) (**Annexe III**) contre l'oxydation de la β -carotène par les radicaux peroxydes, en comparaison avec le contrôle négatif qui a produit une décoloration et une diminution rapide de l'absorbance durant 120 minutes d'incubation (**Figure 41**).

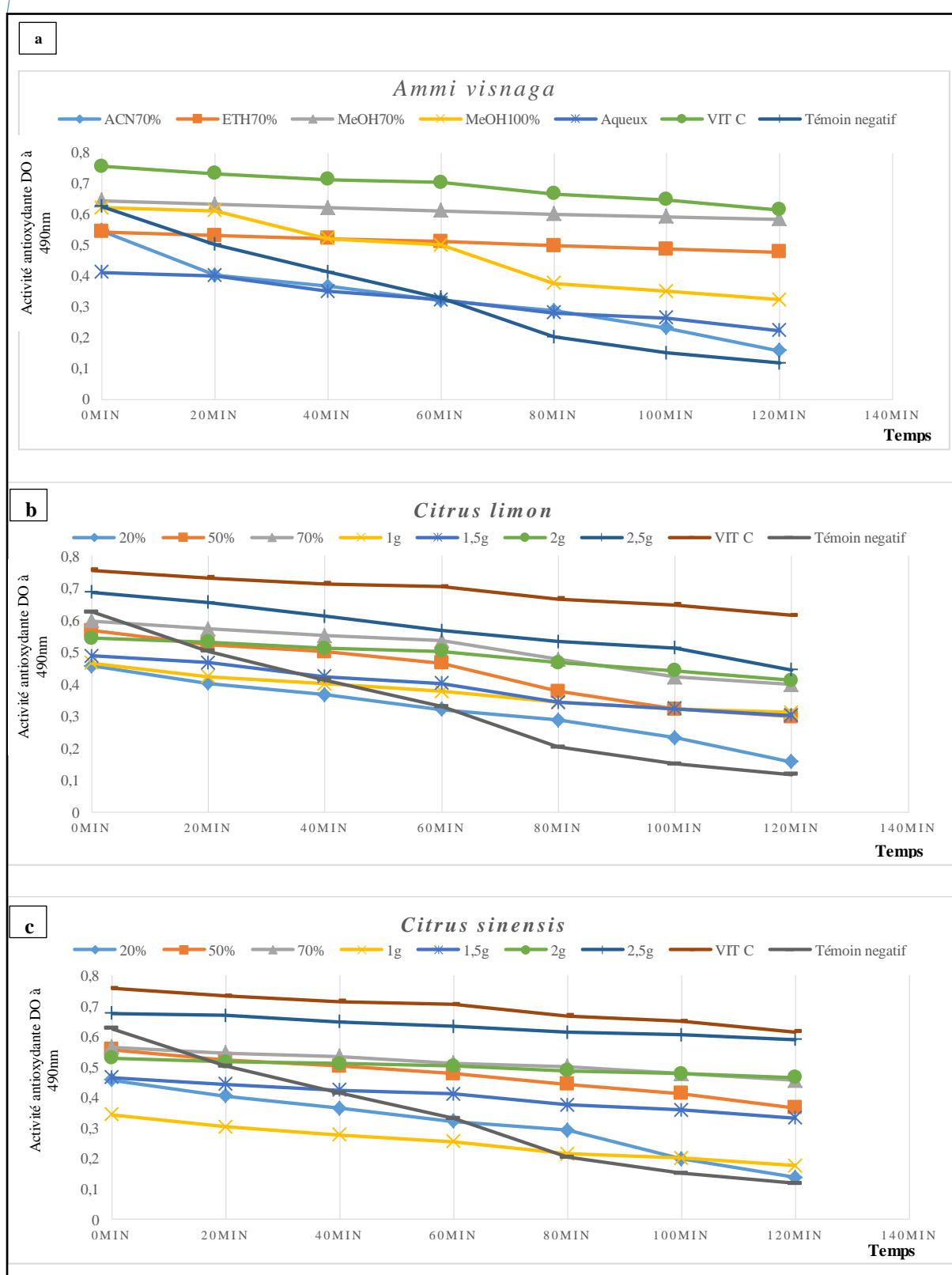


Figure 41. Cinétique de blanchissement du bêta carotène à 490 nm en absence et en présence des différents extraits et de la vitamine C en fonction du temps.

(a) : *Ammi visnaga*, (b) : *Citrus limon* et (c) : *Citrus sinensis*,

6. Méthode d'étude du pouvoir antibactérien des extraits de plantes

6.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion des puits d'agar

Les résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits de la plante *Ammi visnaga* et des écorces d'agrumes vis-à-vis des souches de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* sont illustrées dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 11,12 et 13**). Les zones d'inhibition des souches bactériennes obtenues par l'extrait méthanolique étaient dans l'ordre de 12, 66 ± 0,5 à 21 ± 1 mm, ce qui était significativement différent de celles obtenues par l'extrait éthanolique et l'extrait acétonique respectivement avec 10,33 + 0,05 à 12,66 + 0,05 et 7 + 0,05 à 9 + 0,05 mm. On peut observer que les extraits d'*A. visnaga* ont un effet inhibiteur sur toutes les souches testées, en fonction du solvant d'extraction et des quantités de composés phénoliques. Concernant l'effet antibactérien des extraits d'écorces d'agrumes, nous avons constaté que les extraits de *Citrus limon* et en comparaison à *Citrus sinensis* ont été plus efficaces sur la croissance bactérienne des deux espèces étudiées. Quant aux souches de *Staphylococcus aureus* on a pu noter une meilleure résistance aux différentes concentrations des extraits végétaux étudiés par rapport à *Bacillus cereus*. De plus, les résultats obtenus ont montré que le pouvoir antibactérien se diffère d'une souche à une autre, sachant que les mêmes concentrations des extraits ont été appliquées pour les dix (10) souches testées. Nous avons constaté que l'inhibition de la croissance bactérienne dépend de trois facteurs : la bactérie utilisée, la nature et la concentration du produit testé.

Tableau 11: Activité antimicrobienne des extraits d'*Ammi visnaga*

Extrait	BFMG17	BPTS1	BCSV1	BRIS3	BLP2	ATCC 14579
Acetone 70%	6+0,81	9+0,91	8+0,03	7+0,02	9+0,05	8,33+0,057
AQ	8,33+0,85	9,33+1,07	11,33+0,037	9,33+0,025	9,33+0,057	9,33+0,057
MeOH 70%	21+1,05	16,33+1,15	18,66+0,05	15,33+0,057	17,33+1	12,66+0,057
MeOH 100%	14+1	12,66+1,09	13+0,047	12,66+0,047	13,66+0,047	12,33+0,057
EtOH 70%	12,33+0,87	13,66+1,09	12,33+0,057	12+0,037	12,66+0,87	11,33+0,057
	SVLY3	SPTS2R	SFMG5BP	SLGM1	SSEM4	ATCC 29213
Acetone 70%	-	7 ±0,91	6 ±0,03	6,33 ±0,02	8 ±0,05	7,33 ±0,057
AQ	8,33 ±0,85	-	10,33 ±0,037	8,33 ±0,025	-	9,33 ±0,057
MeOH 70%	18 ±1,05	15,33 ±1,15	15,66 ±0,05	14,33 ±0,057	15,33 ±1	12,66 ±0,057
MeOH 100%	13 ±1	10,66 ±1,09	12 ±0,047	11,66 ±0,047	12,66 ±0,047	11,33 ±0,057
EtOH 70%	11,33 ±0,87	12,66 ±1,09	10,33 ±0,057	11 ±0,037	11,66 ±0,87	10,33 ±0,057

Tableau 12: Activité antimicrobienne des extraits de *Citrus limon*

<i>Citrus limon</i>		BFMG17	BPTS1	BCSV1	BRIS3	BLP2	ATCC 14579
	1g	8 ±0,01	7 ±0,01	11 ±0,01	8 ±0,01	9 ±0,01	11 ±0,01
	1,5g	13 ±0,01	12 ±0,01	13 ±0,01	11 ±0,01	11 ±0,01	12 ±0,01
	2g	13 ±0,01	14 ±0,01	15 ±0,01	13 ±0,01	14 ±0,01	14 ±0,01
	2,5g	15 ±0,01	14 ±0,01	17 ±0,01	14 ±0,01	18 ±0,01	17 ±0,01
<i>Citrus limon</i>		SVLY3	SPTS2R	SFMG5BP	SLGM1	SSEM4	ATCC 29213
	20%	6 ±0,01	6 ±0,01	6 ±0,01	7 ±0,01	7 ±0,01	7 ±0,01
	50%	10 ±0,01	9 ±0,01	9 ±0,01	9 ±0,01	10 ±0,01	11 ±0,01
	70%	13 ±0,01	12 ±0,01	12 ±0,01	10 ±0,01	12 ±0,01	13 ±0,01

Tableau 13: Activité antimicrobienne des extraits de *Citrus sinensis*

<i>Citrus sinensis</i>		BFMG17	BPTS1	BCSV1	BRIS3	BLP2	ATCC 14579
	1g	7 ±0,01	9 ±0,01	8 ±0,01	6 ±0,01	6 ±0,01	6 ±0,01
	1,5 g	10 ±0,01	9 ±0,01	10 ±0,01	8 ±0,01	7 ±0,01	7 ±0,01
	2g	12 ±0,01	10 ±0,01	11 ±0,01	10 ±0,01	9 ±0,01	9 ±0,01
	2,5g	12 ±0,01	13 ±0,01	14 ±0,01	11 ±0,01	9 ±0,01	11 ±0,01
<i>Citrus sinensis</i>		SVLY3	SPTS2R	SFMG5BP	SLGM1	SSEM4	ATCC 29213
	20%	8 ±0,01	9 ±0,01	9 ±0,01	7 ±0,01	6 ±0,01	7 ±0,01
	50%	12 ±0,01	13 ±0,01	14 ±0,01	8 ±0,01	9 ±0,01	11 ±0,01
	70%	15 ±0,01	16 ±0,01	18 ±0,01	10 ±0,01	11 ±0,01	13 0,01

6.2. Concentration minimale inhibitrice des extraits phénoliques (mg/ml).

Pour l'ensemble des extraits, nous avons remarqué que l'extrait méthanolique d'*Ammi visnaga* a représenté une activité plus élevée que les autres extraits. Une concentration microbienne minimale inhibitrice de 10mg / ml a été évaluée pour l'inhibition de l'ensemble de germes. Un résumé complet de l'ensemble des résultats des analyses antimicrobiennes est repris dans le **tableau 14**.

Tableau 14 : Concentration minimale inhibitrice des extraits phénoliques (mg/ml).

Extraits	<i>Ammi visnaga</i> (MeOH 70%)	<i>Citrus sinensis</i> 70%	<i>Citrus limon</i> 70%	<i>Citrus Sinensis</i> 2,5g	<i>Citrus limon</i> 2,5g
BFMG17	2,5	1	0,5	1	0,5
BLP2	5	5	1	1	0,5
BPTS1	10	2,5	5	1,25	1
BRIS3	2,5	5	5	0,5	1,25
BCSV1	0, 5	5	2,5	0,5	1
SVLY3	10	10	2,5	1	1
SPTS2R	1,25	10	10	2	1
SFMG5BP	5	10	10	2	0,5
SLGM1	10	5	5	1	2
SSEM4	10	5	5	0,5	2,5
ATCC14579	5	1,25	2,5	2,5	1,25
ATCC 29213	10	1	1,25	2,5	1

6.3. Essai de comportement en essaimage (Swarming)

Les résultats de la motilité obtenus ont révélé que l'extrait méthanolique a un effet significatif sur la mobilité en essaimage des souches testées. Le diamètre des zones d'essaimage était fortement corrélé à l'augmentation des concentrations phénoliques et le diamètre de zone le plus élevé était obtenu par la concentration de 10 mg / ml (**Figure 44**).

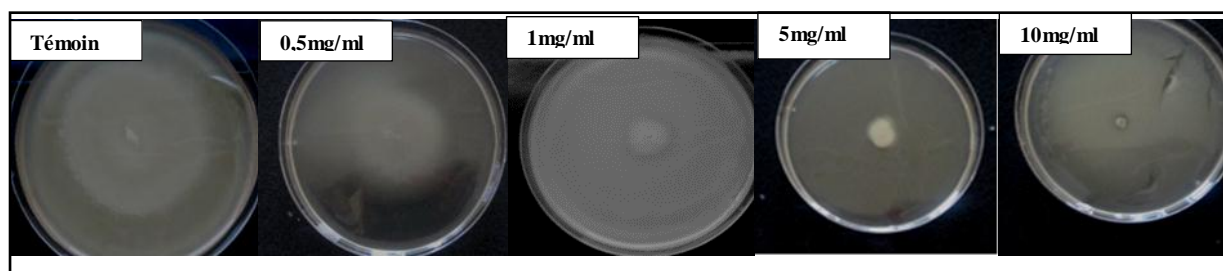


Figure 42. Effet de l'extrait méthanolique 70% sur la mobilité de *Bacillus cereus*.

7. Cinétique de croissance bactérienne de *B. cereus* et *S. aureus* au cours de formation du biofilm bactérien

A partir des graphes obtenus lors de la mesure de la densité optique (DO) des bactéries planctoniques contenues dans le milieu TSB, nous avons observé que le taux de croissance bactérienne des bactéries planctoniques est en augmentation après 6 h d'incubation pour la pluparts des souches étudiées, mais après un certain temps, cette croissance a commencé à diminuer ce qui explique l'adhésion des bactéries sur la surface des supports et provoque la formation des biofilms (**Figure 43 et 44**).

Les résultats de la cinétique de la formation de biofilm établie dans notre étude ont montré qu'il y a une augmentation de la biomasse bactérienne adhéree. Pour les souches BFM617 BRIS3 et SLGM1 SFMG5BP, des valeurs des DO_{600} maximales ont été atteintes après 24h. La grande valeur d'absorbance est observée pour la souche de *B. cereus* BFM617 (DO=1,6) à l'opposé de la souche BLP2 et BCSV1 qui ont donné des valeurs des densités optiques faibles (DO= 1 et DO= 0,9). En ce qui concerne les souches de *S. aureus*, SLGM1 a représenté une valeur de DO plus élevée par rapport aux autres souches (DO=1,4), alors que les souches SPTS2R, SVLY3 ont donné des faibles valeurs (DO= 0,9 et DO= 1). Ces résultats ont montré une différence de la capacité de formation de biofilm par les dix isolats étudiés. Les différentes souches de *B. cereus* ont présentées une forte capacité à s'adhérer et à former des biofilms, comparativement aux souches de *S. aureus*.

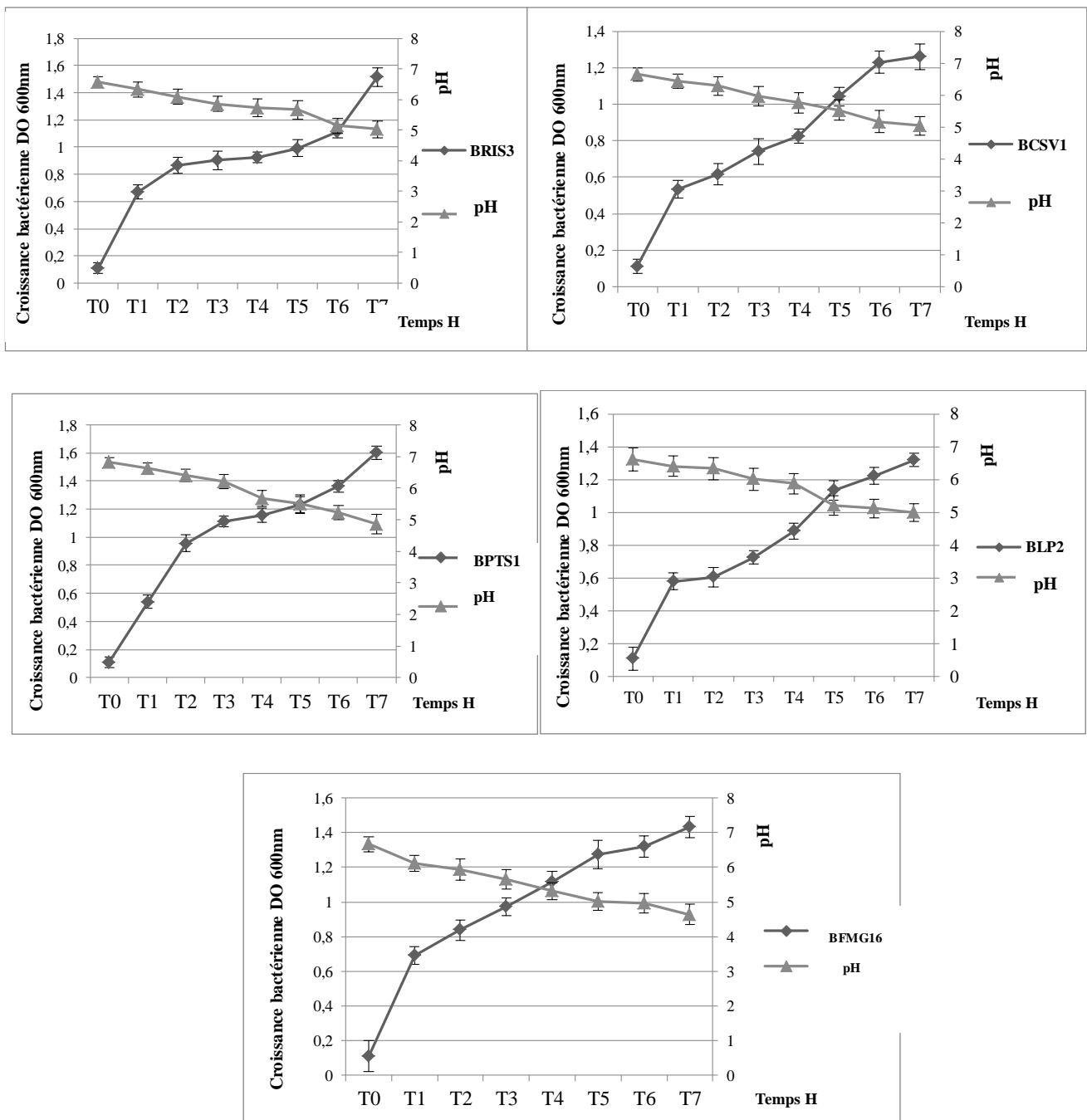


Figure 43. Evaluation de la cinétique de croissance bactérienne de *Bacillus cereus* au cours de formation de biofilm.

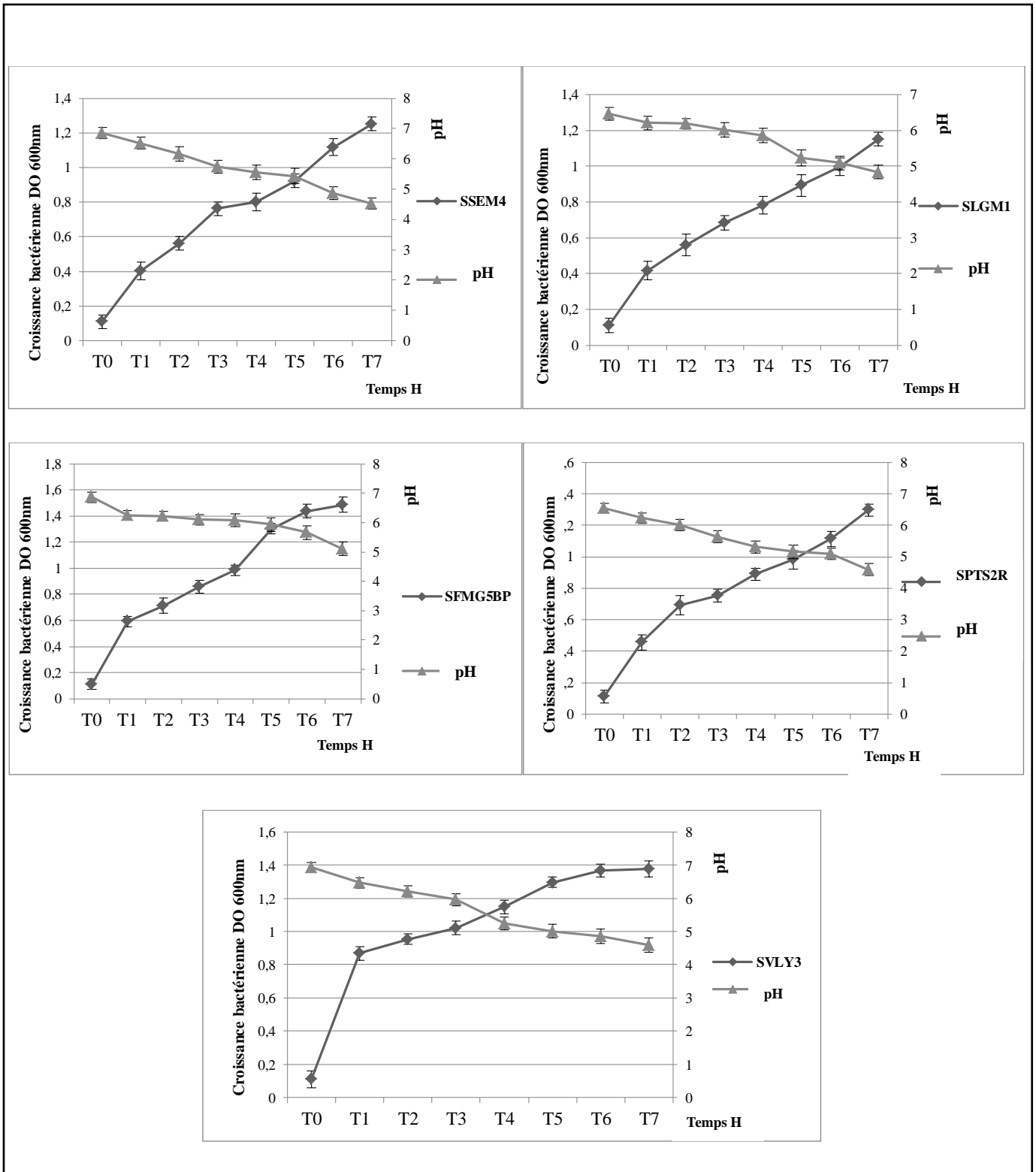


Figure 44. Evaluation de la cinétique de croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* au cours de formation de biofilm.

7.1. Evaluation de la biomasse adhérente par la méthode Cristal Violet (CV)

La méthode de coloration au cristal violet a été utilisée pour quantifier le taux de formation de biofilm par les souches étudiées (dix isolats) en fonction du temps d'incubation. Les résultats de cette étape nous a conduit à établir un test permettant de démontrer la présence des bactéries au niveau des membranes révélées après la coloration au cristal violet. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la capacité de toutes les souches de *B. cereus* et *S. aureus* isolées à former des biofilms sur surface solide (tubes en verre) après culture en milieu TSB. L'observation visuelle des tubes a montré que la formation du biofilm de *S. aureus* et *B. cereus* se caractérise, non seulement par la présence d'un prolongement et d'un anneau à l'interface du tube, mais également par la présence d'un prolongement de la croissance cellulaire au-dessus et en dessous de celui-ci. L'intensité de l'anneau formé est variable d'une souche à l'autre.

D'après nos résultats obtenus à l'issue de l'observation visuelle des tubes de celle de la mesure de DO 600 nm, la souche BFMG17 a été considérée comme une bonne formatrice de biofilm par rapport au reste des souches qui ont été des formatrices modérées (BLP2 –BPTS1 –BCSV1).

Comme l'illustre les figures suivantes (**Figure 45 et 46**) la souche BFM617 (production élevée de biofilm) a enregistré le taux de cellules planctoniques le plus élevé (DO = 1,6) à l'inverse de la souche SLGM1 (production moyenne de biofilm) avec un taux de (DO = 1,4). De même que la formation de biofilm, ces valeurs indiquent que la proportion de cellules non fixées est variable d'une souche à l'autre et elle n'est pas en corrélation directe avec les valeurs obtenues pour la formation de biofilm. Cette variabilité peut être en relation avec les conditions de croissance qui permettent ou non la formation de biofilm ainsi que la capacité de la souche elle-même à adhérer sur un support (tube en verre) et former un biofilm.

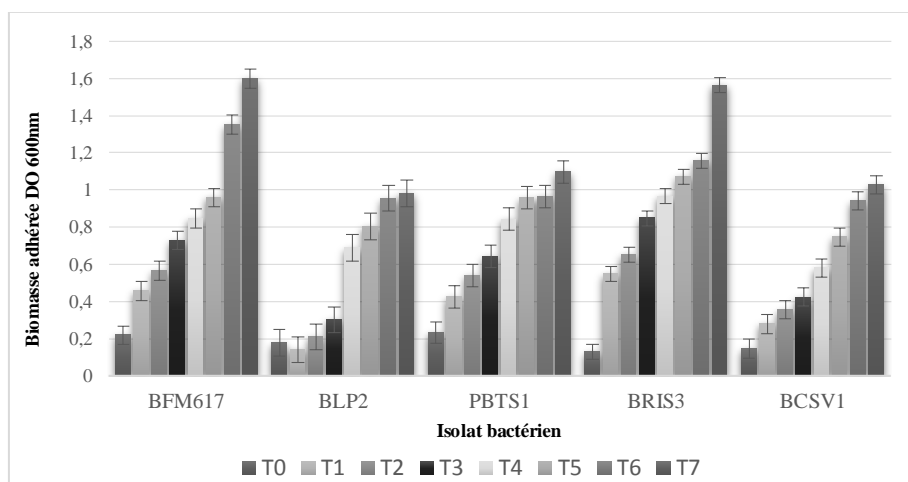


Figure 45. Evaluation de la biomasse adhérente de *Bacillus cereus* au cours de formation de biofilm en fonction du temps d'incubation.

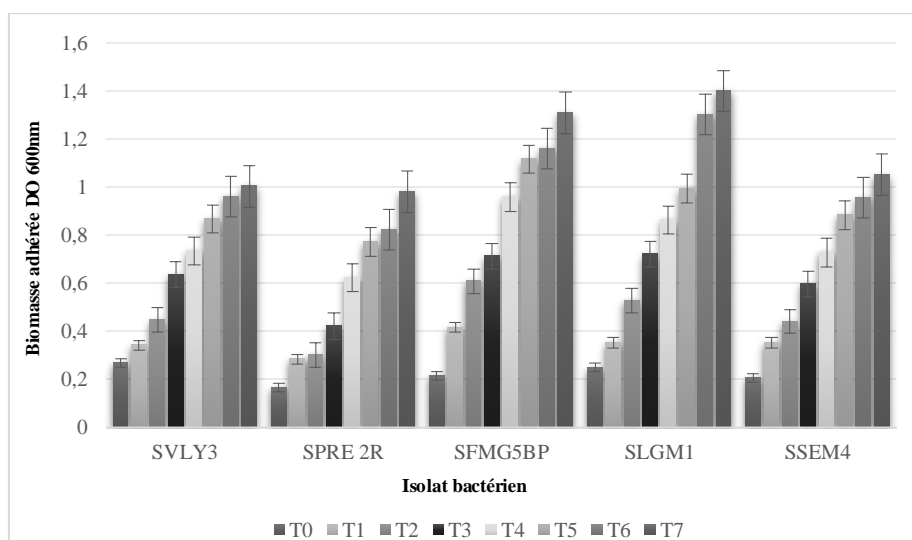


Figure 46. Evaluation de la biomasse adhérente de *Staphylococcus aureus* au cours de formation de biofilm en fonction du temps d'incubation.

8. Effet des extraits végétaux sur l'inhibition de biofilm

Dans le dosage de la quantification de biofilm, une diminution significative a été observée lorsque des souches bactériennes se sont développées en présence de l'extrait méthanolique d'*Ammi visnaga*. Les concentrations appropriées d'extrait méthanolique (0, 5, 1, 5 et 10 mg / ml) permettent une diminution de la croissance du biofilm. La réduction de la biomasse du

biofilm des isolats testés varie de 63, 33 à 81, 17% (**Tableau 15**). La biomasse du biofilm formé par les différentes souches de *B. cereus* et *S. aureus* diminue avec l'augmentation de la concentration de l'extrait méthanolique et cette réduction diffère d'une souche à une autre. Ces résultats ont supposé que l'extrait méthanolique d'*A. visnaga* a un effet important contre le biofilm de *B. cereus* et *S. aureus* en raison de leur teneur totale en phénol. Concernant les extraits d'agrumes, nous avons constaté un pourcentage d'inhibition plus élevé par *Citrus limon* en comparaison à celui de *Citrus sinensis* à différentes concentrations établies. D'après les résultats obtenus nous avons constaté que le taux d'inhibition des biofilms bactériens se diffère d'un extrait à un autre et d'une souche à une autre, et par le solvant d'extraction étudié et les concentrations établies (**Tableaux 15, 16 et 17**).

Tableau 15: Effet des extraits d'*Ammi visnaga* sur les biofilms matures de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

	BRIS3		BCSV1		BPTSI		BFMG17		BLP2	
ACETONE	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,284±0,01 ^a	0	0,182±0,01 ^{bcd}	0	0,105±0,01 ^{cd}	0	0,251±0,01 ^{ab}	0	0,191±0,01 ^{bc}	0
0,5	0,124±0,01 ^{cd}	56,34	0,135±0,01 ^{cd}	25,82	0,092±0,01 ^{cd}	12,38	0,166±0,01 ^{bcd}	33,86	0,143±0,01 ^{bcd}	25,13
1	0,093±0,01 ^{cd}	67,25	0,075±0,01 ^{cd}	58,79	0,087±0,01 ^{cd}	17,141	0,094±0,01 ^{cd}	62,55	0,067±0,01 ^{cd}	64,92
5	0,077±0,01 ^{cd}	72,89	0,06±0,017 ^{cd}	63,19	0,075±0,01 ^{cd}	28,57	0,074±0,01 ^{cd}	70,52	0,054±0,01 ^{cd}	71,73
10	0,053±0,01 ^{cd}	81,34	0,047±0,01 ^{cd}	74,17	0,067±0,01 ^{cd}	36,19	0,055±0,01 ^{cd}	78,09	0,77±0,01 ^{cd}	75,39
ETHANOL	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,184±0,01 ^c	0	0,282±0,01 ^a	0	0,105±0,01 ^e	0	0,151±0,01 ^c	0	0,191±0,01 ^b	0
0,5	0,151±0,01 ^e	17,93	0,189±0,01 ^{bc}	32,98	0,086±0,01 ^h	18,09	0,134±0,01 ^f	11,26	0,166±0,01 ^d	13,09
1	0,085±0,01 ^h	53,8	0,055±0,01 ^j	80,49	0,063±0,01 ⁱ	40	0,055±0,01 ^j	63,57	0,066±0,01 ⁱ	65,44
5	0,064±0,01 ⁱ	65,22	0,046±0,01 ^k	83,69	0,056±0,01 ^j	46,66	0,046±0,01 ^k	69,53	0,045±0,01 ^k	76,44
10	0,055±0,01 ^j	70,12	0,036±0,01 ^l	87,23	0,044±0,01 ^k	58,09	0,035±0,01 ^l	76,82	0,033±0,01 ^l	82,72
METHANOL	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,18±0,01 ^b	0	0,19±0,01 ^a	0	0,11±0,02 ^j	0	0,15±0,01 ^c	0	0,17±0,01 ^c	0
0,5	0,15±0,02 ^d	15,78	0,112±0,01 ^j	41,05	0,091±0,01 ⁿ	17,27	0,139±0,01 ^f	7,33	0,123±0,01 ^h	27,64
1	0,11±0,01 ⁱ	38,88	0,097±0,02 ^j	48,94	0,086±0,01 ^o	21,81	0,126±0,01 ^e	16	0,104±0,01 ^k	38,82
5	0,096±0,01 ^l	46,66	0,058±0,01 ^s	69,47	0,063±0,01 ^r	42,72	0,095±0,01 ^m	36,66	0,076±0,01 ^p	55,29
10	0,066±0,01 ^q	63,33	0,04±0,01 ^u	78,94	0,028±0,01 ^w	74,54	0,055±0,01 ⁱ	63,33	0,032±0,01 ^v	81,17
	SSEM4		SLVC5BP		SPIS2R		SLGMI		SVLY3	
ETHANOL	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,174±0,01 ^c	0	0,196±0,01 ^b	0	0,222±0,01 ^a	0	0,164±0,01 ^d	0	0,156±0,01 ^e	0
0,5	0,156±0,01 ^c	10,34	0,165±0,01 ^d	15,82	0,198±0,01 ^b	10,81	0,113±0,01 ^e	31,1	0,121±0,01 ^f	22,43
1	0,066±0,01 ⁱ	62,07	0,075±0,01 ^h	61,73	0,076±0,01 ^h	65,76	0,066±0,01 ⁱ	59,76	0,073±0,01 ^h	53,2
5	0,049±0,01 ^k	71,84	0,064±0,01 ⁱ	67,35	0,056±0,01 ^j	74,77	0,054±0,01 ^j	67,07	0,065±0,01 ⁱ	58,33
10	0,026±0,01 ⁿ	85,06	0,048±0,01 ^k	75,51	0,035±0,01 ^m	84,23	0,037±0,01 ^m	77,44	0,043±0,01 ^l	72,43
ACETONE	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,174±0,01 ^d	0	0,196±0,01 ^b	0	0,222±0,01 ^a	0	0,164±0,01 ^c	0	0,156±0,01 ^f	0
0,5	0,144±0,01 ^e	17,23	0,174±0,01 ^d	11,22	0,203±0,01 ^c	8,56	0,122±0,01 ^l	25,61	0,133±0,01 ^h	14,74
1	0,096±0,01 ^j	44,83	0,085±0,01 ^k	56,631	0,084±0,01 ^k	17,11	0,093±0,01 ^j	43,29	0,086±0,01 ^k	44,87
5	0,085±0,01 ^k	51,15	0,077±0,01 ^l	60,71	0,068±0,01 ^m	24,32	0,075±0,01 ^l	54,27	0,066±0,01 ^m	57,69
10	0,064±0,01 ^m	63,22	0,044±0,01 ^o	77,55	0,034±0,01 ^p	39,64	0,056±0,01 ⁿ	65,85	0,047±0,01 ^o	69,87
METHANOL	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,174±0,01 ^d	0	0,196±0,01 ^b	0	0,222±0,01 ^a	0	0,164±0,01 ^c	0	0,156±0,01 ^f	0
0,5	0,154±0,01 ^f	11,49	0,163±0,01 ^c	16,84	0,187±0,01 ^c	15,76	0,132±0,01 ^e	19,51	0,113±0,01 ^h	27,56
1	0,043±0,01 ^k	75,29	0,057±0,01 ^j	70,92	0,045±0,01 ^k	79,73	0,055±0,01 ^j	66,46	0,063±0,01 ⁱ	59,61
5	0,034±0,01 ^l	80,46	0,044±0,01 ^k	77,55	0,035±0,01 ^l	84,23	0,046±0,01 ^k	71,95	0,056±0,01 ^j	64,1
10	0,025±0,01 ^m	85,63	0,034±0,01 ^l	82,65	0,026±0,01 ^m	88,29	0,033±0,01 ^l	79,88	0,035±0,01 ^l	77,56

Tableau 16: Effet des extraits d'agrumes sur les biofilms matures de *Bacillus cereus*.

	BRIS3		BCSV1		BPTS1		BFMG17		BLP2	
Quantité de poudre de Citron	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,152+0,01 ^d	0	0,199+0,01 ^a	0	0,178+0,01 ^b	0	0,145+0,01 ^c	0	0,164+0,01 ^c	0
1g	0,083+0,01 ^f	45,39	0,075+0,01 ^g	62,31	0,053+0,01 ^j	70,22	0,059+0,01 ⁱ	59,31	0,064+0,01 ^h	60,97
1,5 g	0,072+0,01 ^g	52,63	0,066+0,01 ^h	66,83	0,047+0,01 ^k	73,59	0,042+0,01 ^k	71,03	0,051+0,01 ^j	68,9
2g	0,067+0,01 ^h	55,92	0,046+0,01 ^k	76,88	0,036+0,01 ^l	79,77	0,035+0,01 ^l	75,86	0,044+0,01 ^k	73,17
2,5g	0,044+0,01 ^k	71,06	0,036+0,01 ^l	81,91	0,026+0,01 ^m	85,39	0,024+0,01 ^m	83,45	0,033+0,01 ^l	79,88
Solvant Citron	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,152+0,01 ^d	0	0,199+0,01 ^a	0	0,178+0,01 ^b	0	0,145+0,01 ^c	0	0,164+0,01 ^c	0
70%	0,066+0,01 ^h	56,58	0,086+0,01 ^f	56,78	0,073+0,01 ^g	58,99	0,082+0,01 ^f	43,45	0,076+0,01 ^g	53,66
50%	0,057+0,01 ^j	62,5	0,064+0,01 ^h	67,84	0,062+0,01 ^{hi}	65,17	0,074+0,01 ^g	48,96	0,061+0,01 ^{hi}	62,8
20%	0,046+0,01 ^k	69,74	0,054+0,01 ^j	72,86	0,047+0,01 ^k	73,59	0,061+0,01 ^{hi}	57,93	0,053+0,01 ^j	67,68
poudre d'orange	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,152+0,01 ^d	0	0,199+0,01 ^a	0	0,178+0,01 ^b	0	0,145+0,01 ^c	0	0,164+0,01 ^c	0
1g	0,123+0,01 ^g	19,08	0,165+0,01 ^c	17,08	0,144+0,01 ^e	19,1	0,111+0,01 ⁱ	23,45	0,132+0,01 ^f	19,51
1,5 g	0,098+0,01 ^l	35,53	0,133+0,01 ^f	33,16	0,119+0,01 ^h	33,15	0,098+0,01 ^l	32,41	0,102+0,01 ^k	37,8
2g	0,077+0,01 ⁿ	49,34	0,107+0,01 ^j	46,23	0,098+0,01 ^l	44,94	0,078+0,01 ⁿ	46,21	0,088+0,01 ^m	46,34
2,5g	0,058+0,01 ^p	61,84	0,088+0,01 ^m	55,78	0,078+0,01 ⁿ	56,18	0,058+0,01 ^p	60	0,065+0,01 ^o	60,36
Solvant Orange	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,152+0,01 ^d	0	0,199+0,01 ^a	0	0,178+0,01 ^b	0	0,145+0,01 ^c	0	0,164+0,01 ^c	0
70%	0,084+0,01 ^g	63,16	0,096+0,01 ^c	66,83	0,101+0,01 ^e	61,79	0,122+0,01 ⁱ	47,59	0,132+0,01 ^f	19,51
50%	0,067+0,01 ^l	55,92	0,073+0,01 ^f	61,31	0,084+0,01 ^h	52,81	0,093+0,01 ^l	35,86	0,112+0,01 ^k	31,71
20%	0,056+0,01 ⁿ	44,74	0,066+0,01 ^j	51,76	0,068+0,01 ^l	43,26	0,076+0,01 ⁿ	15,86	0,088+0,01 ^m	46,34

	SSEM4		SLVC5BP		SPTS2R		SLGMI		SVLY3	
Quantité de poudre de Citron	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,205+0,01 ^b	0	0,255+0,01 ^a	0	0,164+0,01 ^c	0	0,116+0,01 ^e	0	0,144+0,01 ^d	0
1g	0,073+0,01 ^f	64,39	0,065+0,01 ^g	74,51	0,054+0,01 ^h	67,07	0,063+0,01 ^g	45,67	0,054+0,01 ^h	62,5
1,5 g	0,063+0,01 ^g	69,27	0,056+0,01 ^h	78,04	0,048+0,01 ⁱ	70,73	0,054+0,01 ^h	53,45	0,044+0,01 ⁱ	69,44
2g	0,054+0,01 ^h	73,66	0,046+0,01 ⁱ	81,96	0,036+0,01 ^j	78,05	0,036+0,01 ^j	68,96	0,034+0,01 ^j	76,39
2,5g	0,047+0,01 ⁱ	77,07	0,036+0,01 ^j	85,88	0,025+0,01 ^{kl}	84,76	0,028+0,01 ^k	75,86	0,021+0,01 ^j	85,42
Solvant Citron	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,152+0,01 ^d	0	0,199+0,01 ^a	0	0,178+0,01 ^b	0	0,145+0,01 ^e	0	0,164+0,01 ^c	0
70%	0,066+0,01 ^h	56,58	0,086+0,01 ^f	56,78	0,073+0,01 ^g	58,99	0,082+0,01 ^f	43,45	0,076+0,01 ^g	67,68
50%	0,057+0,01 ^{ij}	62,5	0,064+0,01 ^h	67,84	0,062+0,01 ^{hi}	65,17	0,074+0,01 ^g	48,96	0,061+0,01 ^{hi}	62,8
20%	0,046+0,01 ^k	69,74	0,054+0,01 ^j	72,86	0,047+0,01 ^k	73,59	0,061+0,01 ^{hi}	57,93	0,053+0,01 ^j	53,66
poudre d'orange	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,205+0,01 ^a	0	0,155+0,01 ^d	0	0,164+0,01 ^b	0	0,116+0,01 ^h	0	0,144+0,01 ^c	0
1g	0,177+0,01 ^c	13,66	0,132+0,01 ^f	14,84	0,142+0,01 ^e	13,41	0,102+0,01 ^j	12,07	0,121+0,01 ^g	15,97
1,5 g	0,133+0,01 ^f	35,12	0,102+0,01 ^j	34,19	0,113+0,01 ⁱ	31,1	0,091+0,01 ^j	21,55	0,101+0,01 ^j	29,86
2g	0,101+0,01 ^j	50,73	0,087+0,01 ^{mm}	43,87	0,098+0,01 ^k	40,24	0,085+0,01 ⁿ	26,72	0,089+0,01 ^{mm}	38,19
2,5g	0,082+0,01 ^p	60	0,078+0,01 ^p	49,68	0,081+0,01 ^o	50,61	0,078+0,01 ^p	32,76	0,067+0,01 ^q	53,47
Solvant Orange	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition	DO 595 nm	% D'inhibition
T	0,205+0,01 ^b	0	0,255+0,01 ^a	0	0,164+0,01 ^d	0	0,116+0,01 ⁱ	0	0,144+0,01 ^f	0
70%	0,156+0,01 ^e	23,9	0,176+0,01 ^c	30,98	0,097+0,01 ^j	40,85	0,131+0,01 ^g	11,45	0,076+0,01 ⁱ	63,19
50%	0,142+0,01 ^f	30,73	0,133+0,01 ^g	47,84	0,076+0,01 ^j	53,66	0,085+0,01 ^k	35,11	0,065+0,01 ^{mm}	54,86
20%	0,126+0,01 ^h	38,54	0,095+0,01 ^j	62,74	0,064+0,01 ^m	60,97	0,077+0,01 ^j	41,22	0,053+0,01 ⁿ	47,22

Tableau 17: Effet des extraits d'agrumes sur les biofilms matures de *Staphylococcus aureus*.

9. Effet de quelques enzymes et l'acide salicylique sur la croissance planctonique et les biofilms matures de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*

D'après les résultats obtenus, nous avons observés que l'inhibition de la croissance bactérienne des différentes souches étudiées par les deux enzymes trypsine et protéinase K se diffère d'une souche à une autre suivant les différentes concentrations. D'après les résultats obtenus nous avons trouvés qu'avec l'augmentation de la concentration des deux enzymes étudiées, la formation des biofilms bactériens par les différentes souches bactériennes diminue, nous avons constaté aussi une diminution remarquable du pH (de 8,1 jusqu'à 5 ,86) pour les différentes suspensions bactériennes, sauf dans le cas des deux souches BFMG17 et SVLY3 que la croissance bactérienne a été augmentée avec l'augmentation de la concentration des enzymes étudiées en provoquant une augmentation du pH.

A des concentrations faibles 25 μM et pour l'enzyme protéinase K, nous avons observé une faible diminution de la croissance bactérienne allons de 1,87 jusqu'à 1,23 pour *B. cereus* et de 1,52 jusqu'à 1,23 pour *S. aureus*, cette inhibition a été augmentée avec les différentes concentrations. La concentration 200 μM a été la dose la plus efficace contre la croissance de différents isolats avec des valeurs de DO allant de 0,92 jusqu'à 0,32 pour les souches de *B. cereus* et de 0,76 jusqu'à 0,50 pour les souches de *S. aureus* avec une diminution du pH de 8 jusqu'à 5. Les deux souches BLP2 et SFMG5BP ont été plus résistantes vis-à-vis du traitement enzymatique effectué par les deux enzymes en comparaison avec les autres souches. Les différentes valeurs de la turbidité due à la croissance de *B. cereus* et *S. aureus* sont présentées dans les figures illustrées dans **l'Annexe (V)**.

Les troubles bactériens observés lors de la croissance bactérienne des différents isolats ont montré que les concentrations croissantes de l'AS (0,03-0,06-0,138-0,34-0,69-1,38 et 2,76 mM) ont provoqué une diminution progressive de la turbidité des suspensions bactériennes. Après la lecture des résultats (la densité optique) par spectrophotomètre à $\lambda = 600\text{nm}$, la courbe de la croissance bactérienne a présenté une allure décroissante remarquable à partir de la concentration 1,38 mM.

Les résultats que nous avons obtenu comparativement aux témoins ont montré qu'avec l'augmentation des concentrations de l'AS ; il y'a une diminution du nombre des bactéries planctoniques. Nous avons noté une absence de la croissance bactérienne à la concentration de 2,76 mM, cette concentration correspond à la concentration minimale inhibitrice de l'AS sur les *B. cereus* et *S. aureus* testées (**Figure 51 et 52**).

9.1. Evaluation de l'effet des enzymes sur l'adhérence bactérienne de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* par la méthode cristal violet

Nous avons évalué par la méthode cristal violet la capacité des dix (10) différentes souches de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* de notre cohorte à former in vitro les biofilms bactériens en présence des enzymes protéinase K et la trypsine. D'après les résultats obtenus nous avons constaté que les deux enzymes protéinase K et la trypsine ont inhibé les biofilms formés par les souches étudiées. Les résultats obtenus ont montré que le taux d'inhibition des biofilms bactériens formés par les différentes souches étudiées a été augmenté avec l'augmentation de la concentration des enzymes testés. Une réduction importante de 71,52 % et 76,52 % a été observée par les deux enzymes protéinase K et la trypsine respectivement en concentration (200 μM) vis-à-vis des biofilms formés par *Bacillus*

cereus, le pourcentage d'inhibition estimé lors du traitement enzymatique contre les biofilms formés par les différentes souches de *Staphylococcus aureus*, est de 64, 37 % pour l'enzyme protéinase K et 72,58 % pour la trypsine. Le taux d'inhibition de la formation du biofilm par l'enzyme trypsine est plus élevé par rapport à l'enzyme protéinase K. D'après les résultats obtenus nous avons révélé que les souches de *S. aureus* ont représenté une résistance élevée par rapport à *B. cereus* (Figure 47, 48, 49 et 50).

Les résultats que nous avons obtenu lors de la détermination de l'effet de l'AS sur la biomasse adhérente des isolats testés et comparativement aux témoins, ont montré qu'avec l'augmentation de la concentration de l'AS ; il y a une diminution de la formation de biofilm par les dix isolats étudiés (Figure 51, 52, 53 et 54). Cette diminution se diffère d'une souche à une autre, les biofilms formés par les souches de *B. cereus* BLP2, BRIS3, BPTS1 ont été plus sensibles aux différentes concentrations d'AS avec un taux d'inhibition de 96,41% ; 65,75% et 59,34%, respectivement. Alors que les biofilms matures de *S. aureus* ont été moins sensibles au traitement d'acide salicylique et les souches SSEM4, SPTS2R et SLGM1 ont été les plus résistantes avec un taux d'inhibition de 57, 98% ; 53, 46% et 51, 37%, respectivement. La concentration 2, 76 mM a été considérée comme la concentration minimale inhibitrice pour la plupart des isolats des deux espèces étudiées.

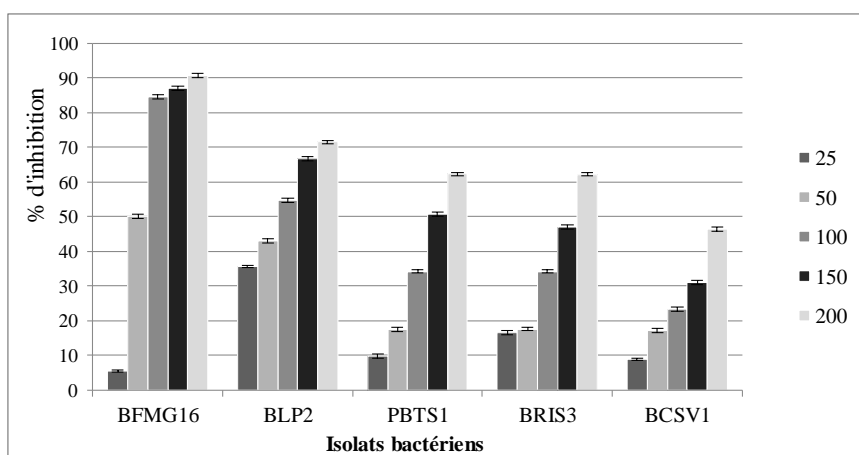


Figure 47. % d'inhibition des biofilms matures de *Bacillus cereus* par l'enzyme protéinase K

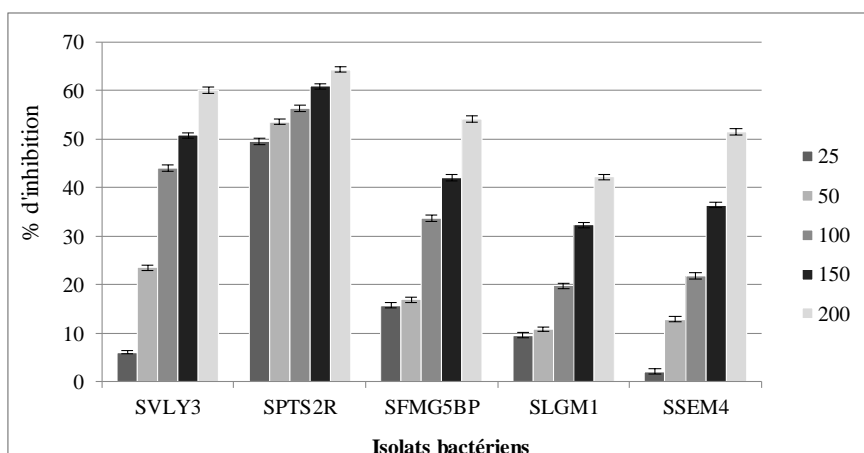


Figure 48. % d'inhibition des biofilms matures de *Staphylococcus aureus* par l'enzyme protéinase K

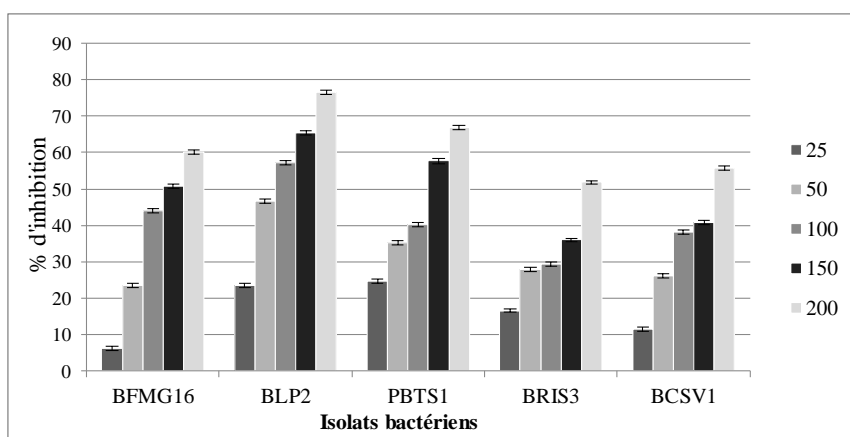


Figure 49. % d'inhibition des biofilms matures de *Bacillus cereus* par l'enzyme trypsine

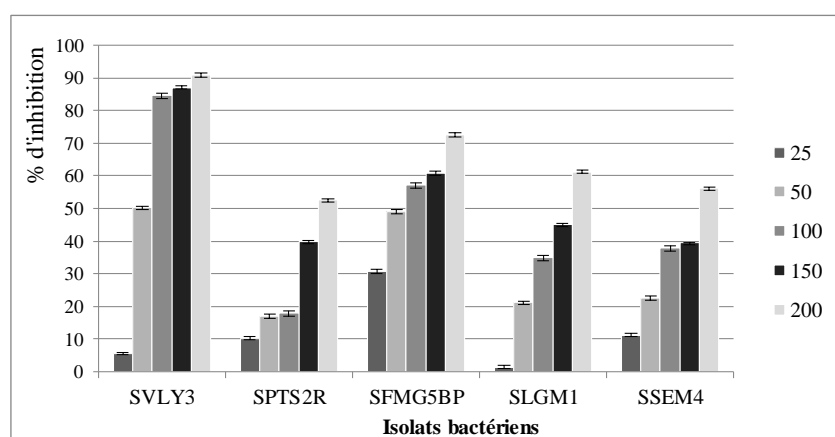


Figure 50. % d'inhibition des biofilms matures de *Staphylococcus aureus* par l'enzyme trypsine

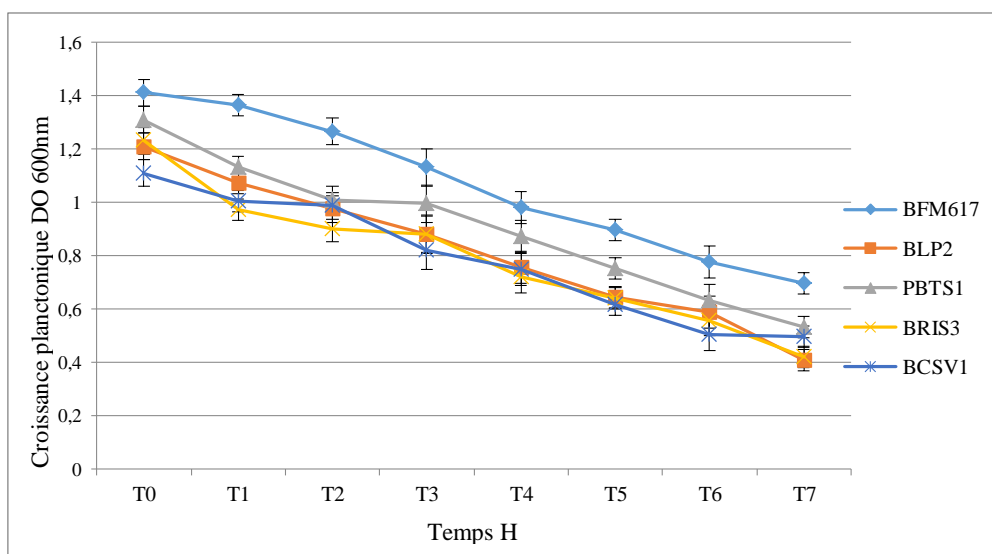


Figure 51. Evaluation de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique de *Bacillus cereus*.

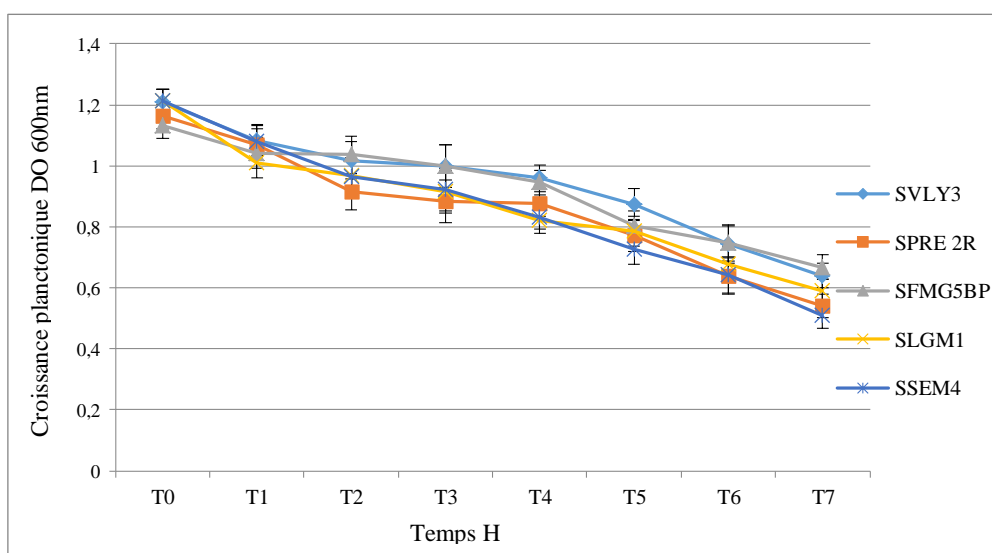


Figure 52. Evaluation de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique de *Staphylococcus aureus*.

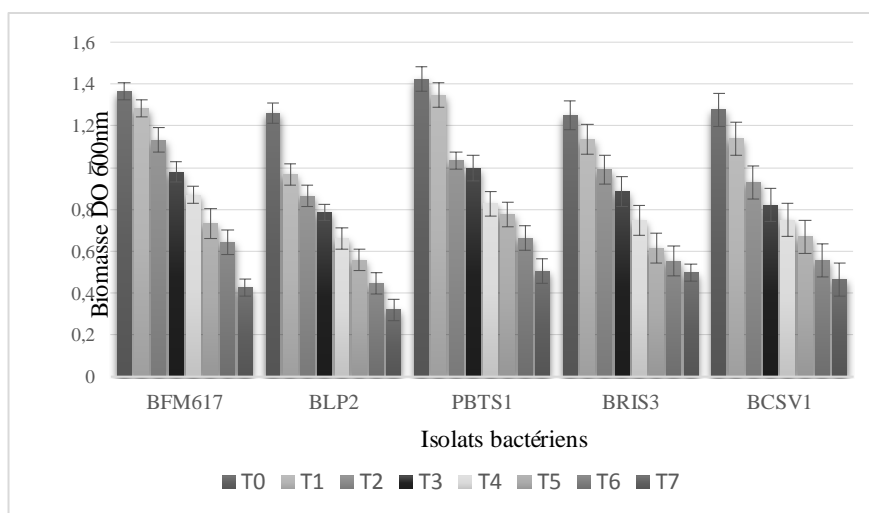


Figure 53. Evaluation de l'effet d'acide salicylique sur les biofilms matures de *Bacillus cereus*

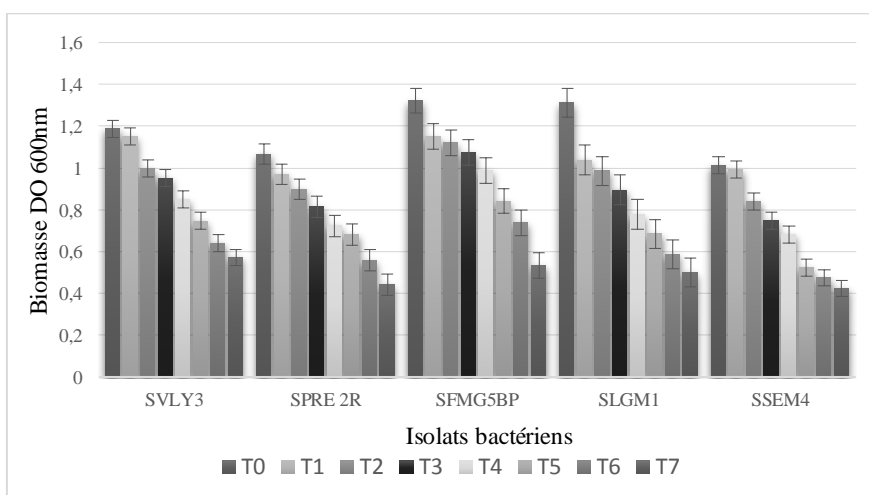


Figure 54. Evaluation de l'effet d'acide salicylique sur les biofilms matures de *Staphylococcus aureus*.

Discussion des résultats

Discussion

1. Isolement de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus* à partir de produits alimentaires

Plusieurs études importantes ont démontrés l'implication de *B. cereus* dans divers types d'intoxications alimentaires (**Stenfors et al., 2008**). Un grand nombre d'aliments semblent être potentiellement contaminable par *B. cereus*, en effet, les bactéries du groupe sont ubiquitaires. Elles sont donc régulièrement retrouvées dans les sols où poussent les matières premières des produits d'agroalimentaires. Ainsi, les bactéries peuvent contaminer les produits par le biais des matières premières mais aussi lors des processus de fabrication en industrie. En effet, il a été montré que les spores de *B. cereus* sont très difficiles à éliminer, ainsi dans le lait UHT (ultra haute température), les spores présentes sont alors activées par ce choc thermique. Les bactéries, qui ont ainsi germé, peuvent alors produire des enzymes extracellulaires. Ces enzymes sont produites lors de la fin de la croissance exponentielle ainsi que pendant le début de la phase stationnaire (**Cheng et al., 2003**). Les aliments fabriqués à partir du lait sont potentiellement altérables par *B. cereus*. Parmi ceux-ci se trouvent les crèmes glacées, les fromages et les yaourts. Dans la littérature, **Cheng et al., (2003)** ont montré que même si les bactéries qui contaminent le lait ne survivent pas à sa transformation, les enzymes, elles, sont encore plus résistantes à la température et peuvent être retrouvées dans du lait déshydraté. Ainsi, nul doute que *B. cereus* apparait comme un véritable danger en industrie agroalimentaire aussi bien d'un point de vue sanitaire qu'économique.

Par la diversité et la quantité de ses gènes de virulence, *S. aureus* est l'une des causes majeures des intoxications alimentaires. Cette bactérie peut croître dans plusieurs aliments dont le lait, la crème, le beurre, les salades, le fromage, le jambon ainsi que dans les saucisses (**Le Loir et al, 2003**). La présence de cette bactérie dans les différents types d'aliments est, entre autre, le résultat d'une mauvaise manipulation de ceux-ci durant le processus de fabrication, de stockage, de transport et de distribution (**Acco et al, 2003**). Cette bactérie serait responsable d'environ 40 % de tous les cas de mammites bovines en Algérie, où la contamination du lait cru par des mamelles est évidente et contribue à la mauvaise qualité microbiologique du lait (**André et al., 2008**). La présence de *S. aureus* dans les aliments crus est moins grave que sa présence dans ceux qui ont fait l'objet d'un traitement thermique (cuisson ou pasteurisation) d'une part, en raison de la faible présence des souches

entérotogènes, et d'autre part, à la concurrence de la microflore dans les aliments (**Soriano et al., 2002**).

2. Identification des isolats bactériens

En utilisant des milieux spécifiques, 24 isolats appartenant à *B. cereus* ont été sélectionnées après plusieurs étapes d'identification. Actuellement, le milieu sélectif MYP est recommandé par les autorités alimentaires comme des normes pour la détection de *B. cereus*. La principale caractéristique d'identification de ce milieu est l'activité de la lécithinase, aboutissant à des zones de précipitation opaques autour des colonies suspectes (**Szabo et al., 1984**). La zone opaque pourrait être due au fait que l'émulsion de tellurite de jaune d'œuf utilisée soit une lipoprotéine essentiellement composée de lécithine, et la lécithinase en décomposant la lécithine produit un précipité insoluble, aboutissant à des zones opaques autour des colonies. (**Hussain et al., 2011**).

L'étude bactériologique nous a permis d'isoler 18 (39,65 %) souches qui se sont avérées des cocci à Gram positif, immobiles, aéro-anaérobies facultatives possédant une catalase, une coagulase et une thermonucléase; ce qui a permis de les assigner à l'espèce *Staphylococcus aureus*. Cette identification a révélé une prédominance de cette espèce par rapport aux staphylocoques à coagulase négative.

Les colonies de *S. aureus* contrairement aux autres espèces de staphylocoques, étaient entourées de zones claires (**Baird-Parker, 1962**). Les colonies de *S. aureus* obtenues sur le milieu spécifique Baird Parker sont noires, brillantes et convexes, de 1 à 5 mm de diamètre. Elles possèdent également une mince bordure blanche entourée d'un halo clair de 2 à 5 mm de large. L'hydrolyse de la lipovitelline (la protéine du jaune d'œuf la plus abondante) donne naissance à une zone claire autour de la colonie. De plus, *S. aureus* peut réduire la tellurite contenue dans le milieu Baird-Parker en tellure qui donne un précipité noir observable au centre des colonies permettant ainsi leur sélection. Un halo opaque apparaît dans la zone claire après 48 heures d'incubation est due à l'activité de la lécithinase. Le milieu Baird-Parker contient du jaune d'œuf, du pyruvate ainsi que des agents sélectifs dont la tellurite, la glycine et le chlorure de lithium qui jouent un rôle dans l'inhibition de la flore secondaire (**Baird-Parker, 1990 ; Adams et al., 2008**).

3. Screening de la toxicité des isolats bactériens (Recherche des enzymes complémentaires)

Les enzymes lipolytiques produites par *B. cereus* agissent sur les lipides, notamment les acides gras du lait. Leur action d'hydrolyse est plus efficace sur des acides gras à courte chaîne (**Cheng et al., 2003**). Cette mise en évidence est d'autant plus importante que ce sont ces mêmes acides gras à courtes chaînes qui contribuent le plus à la saveur du lait (**Al-Shabibi et al., 1964**). Ainsi, cette dégradation donne une saveur rance et fruitée au lait, tout comme les lecithinases peuvent donner au lait un aspect de crème caillée en raison de l'agrégation des globules gras (**De Jonghe et al., 2010**). Les bactéries du groupe *B. cereus* sont facilement distinctes des autres *Bacillus* par leur incapacité à fermenter le mannitol et leur production de lecithinase (**Logan et Berkeley, 1984 ; Fritze, 2004**). Les résultats obtenus indiquent que les souches de *B. cereus* et de *S. aureus* étudiées présentent un niveau de toxicité et de virulence. En effet, plusieurs travaux ont montré que l'hémolysine, la lecithinase et la caséinase produits par les deux souches provenant d'échantillons alimentaires sont considérées comme des facteurs de virulence et de toxicité (**Oh, 2006 ; Kashid et Ghosh, 2010 ; Awany et al., 2010**).

L'opportunisme du *S. aureus* semble être lié à la production de nombreuses toxines et enzymes qui augmenteraient sa virulence. Les enzymes produites sont des coagulases, nucléases thermostables, fibrinolysines, phosphatases, protéases, lipases et des hyaluronidases. Parmi les diverses toxines sécrétées, les plus importantes sont les hémolysines α , β , δ et les γ leucocidine et les entérotoxines A, B, C, D et E. Ces dernières sont bien connues comme responsables d'empoisonnements alimentaires mais jusqu'à présent, on ne peut relier leur sécrétion à aucune autre maladie (**Sourek et al., 1979**). La virulence de *S. aureus* provient de l'action combinée de différentes composantes de la surface bactérienne ainsi que de la sécrétion de toxines et d'enzymes multiples (**Iandolo, 1989**). Les facteurs de virulence de *S. aureus* peuvent être répartis en trois catégories fonctionnelles : ceux qui aident à l'adhésion de la bactérie aux cellules et tissus, ceux qui contribuent aux lésions tissulaires et à la propagation de l'infection et enfin, ceux qui protègent la bactérie contre le système immunitaire de l'hôte (**Arvidson et Tegmark, 2001**). De plus, la coagulase cause une coagulation du plasma sanguin et donc la formation de thrombus obturant le vaisseau sanguin (**Sutra et al., 1994**). Une autre enzyme, la β -lactamase est à la base de la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques appartenant à la famille des β -lactames. L'enzyme hydrolyse l'anneau β -lactame et inactive la molécule de pénicilline (**Lowy, 1998**).

Les caractéristiques les plus dangereuses des entérotoxines proviennent du fait qu'elles soient fortement stables et résistantes à la chaleur ainsi qu'à la plupart des enzymes protéolytiques comme la pepsine et la trypsine (**Le Loir et al., 2003**). Selon **Anderson et al. (1995)**, l'entérotoxine staphylococcique A (SEA) demeure active après un traitement de 28 minutes à 121 °C et de 15 minutes à 127 °C. La SEA étant la toxine la plus fréquemment impliquée dans les intoxications alimentaires (**Casman, 1965 ; Asao et al., 2003**).

D'autres pathologies sont causées par un seul type de toxine comme le syndrome de la peau ébouillantée dû à l'exfoliatine, le syndrome de choc toxique dû à la toxine TSST-1 et les toxi-infections alimentaires dues aux entérotoxines (**Sutra et al., 1994**). Ces dernières, contrairement aux autres toxines et facteurs de virulence causent l'empoisonnement de l'individu ingérant un aliment contaminé par celles-ci. Le mécanisme par lequel les entérotoxines pénètrent le corps via l'intestin et causent les symptômes d'intoxication alimentaire est cependant peu connu jusqu'à présent (**Balaban et Rasooly, 2000**).

4. Résistance aux antibiotiques

La nourriture est un facteur important dans le transfert de la résistance aux antibiotiques (**Pesavanto et al., 2007**). Nos résultats sont étayés par le tableau général des modèles de susceptibilité aux antibiotiques de *B. cereus* tel que démontré par **Fenselau et al. (2008)**. Les travaux précédents ont montré que la susceptibilité antimicrobienne de *B. cereus* était très sensible à l'érythromycine, à la ciprofloxacine, à la streptomycine, au chloramphénicol et moins sensible à l'ampicilline, à la cloxacilline, à l'ampiclox et au cotrimazole. Par contre, *B. cereus* produit de grandes quantités de β -lactamases et est résistant à la Pénicilline, à l'Ampicilline, aux céphalosporines et au Triméthoprim (**Umar et al., 2006**).

Les souches de *S. aureus* sont connues pour être fréquemment résistantes aux antimicrobiens à cause de leur capacité de produire une barrière exopolysaccharide d'un côté et de l'autre, leur localisation au sein de micro-abcès, qui limitent l'action des antibiotiques (**Gundogun et al., 2005**). Notre conclusion peut prouver que les antibiotiques sont en fait largement utilisés dans les aliments, par conséquent, ils peuvent être un facteur important pour transférer des antibiotiques résistants pathogènes alimentaires qui peuvent être très nocifs pour la santé humaine (**Khan et al., 2000**).

Nos résultats indiquent un taux de résistance à l'érythromycine de 82,60 %, qui est relativement plus important que celui signalé par **Rebiahi (2011)** (55,75 %). Selon **Daurel et al. (2008)**, la sensibilité des souches de *S. aureus* sauvages aux bêta-lactamines varie selon la molécule. En effet, 80 % à 95 % des souches produisent une pénicillinase qui inactive la

pénicilline G et l'ampicilline, rendant leurs indications obsolètes dans le cadre d'une infection à *S. aureus*. Le génome de *S. aureus* contient des gènes codant pour des toxines, pour des protéines de surface ainsi que pour la résistance aux antibiotiques. Ceci augmente sa virulence et lui confère aussi une résistance à plusieurs familles d'antibiotiques dont les β -lactames (pénicilline, méthicilline), les glycopeptides (vancomycine), les quinolones, les aminoglycosides (gentamycine) et les oxazolidinones (**Lowy, 1998**).

5. Extraction et dosage des polyphénols

Ces rendements peuvent varier selon la méthode d'extraction qui a une influence sur ce caractère. Les rendements seront plus élevés dans le cas de l'extraction physique par pression que ceux dans le cas de l'extraction chimique à l'aide de solvants (**Bogani et al., 2007 ; Vassiliki et al., 2009**). En général, la diversité des plantes est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols (**De Koffi et al., 2010 ; Mahmoudi et al., 2013**), Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante (**Jokic et al., 2010 ; Garcia-Salas et al., 2010**). Ainsi, la différence des teneurs en phénols entre les résultats obtenus pour une même matrice végétale et une même origine géographique et en utilisant une extraction conventionnelle par solvant (avec différentes conditions opératoires), montre que le rendement d'extraction des phénols est variable selon les conditions d'extraction utilisées. D'où l'intérêt de standardiser le protocole d'extraction des composés bioactifs des agro-ressources.

Les écorces d'agrumes sont des matrices hautement valorisables vue leur disponibilité et leur richesse en ingrédients nutritionnels et fonctionnels (**Kammoun et al., 2011**). Ce coproduit industriel est surtout utilisé pour l'extraction des essences et des huiles essentielles (**Tian et al., 2001 ; Virot et al., 2008 ; Chutia et al., 2009 ; Singh et al., 2010**), l'extraction des fibres (**Bicu et al., 2011 ; Wang et al., 2014**), la formulation des produits alimentaires (bonbons, confitures, ..), et aussi en tant qu'aliment pour bétails (**Bocco et al., 1998 ; Bampidis et Robinson, 2006 ; Ledesma-Escobar et Luque de Castro, 2014**).

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé grâce au complexe Folin-Ciocalteu qui en présence des polyphénols change sa couleur du jaune au bleu, ce qui permet de mesurer l'intensité de la couleur à une longueur d'onde de 765 nm (**Huang et al., 2005**).

La teneur phénolique de tous les extraits variait de 18,66 à 172,66 mg / g. Les valeurs les plus élevées ont été trouvées dans l'extrait de méthanol à 70% (172,66 mg / g) qui était significativement plus élevé que l'extrait d'éthanol 38 mg / g et l'extrait d'acétone qui représente le plus faible rendement avec 18,66 mg / g. Le contenu total en flavonoïdes d'*Ammi visnaga* variait de 3,3 à 22 mg EQ / g. L'extrait éthanolique a montré la valeur la plus élevée, tandis que la valeur la plus basse a été obtenue par l'extrait méthanolique pur (100%). En général, compte tenu de tous les solvants utilisés dans cette étude, nous avons trouvé que le méthanol aqueux à 70% était le solvant le plus efficace pour extraire les phénols totaux des plantes. Pour améliorer l'effet de la concentration du solvant d'extraction, nous avons utilisé un extrait aqueux (70%), pur (100%) de méthanol et d'eau. Nous avons également constaté que le rendement d'extraction des phénols totaux obtenus par le méthanol aqueux 70% était plus élevé (172,66 mg / g) que le méthanol absolu et l'extrait aqueux avec 96 mg / g et 21,66 mg / g respectivement.

L'analyse de ces résultats montre que les extraits des écorces de *Citrus limon* sont les plus riches en composés phénoliques par rapport à *Citrus sinensis*, et à la concentration 70% et pour les deux espèces végétales nous avons obtenu les teneurs en polyphénols et flavonoïdes les plus élevées avec des valeurs de 33,5 mg EAG/g et 2,977 mg QE/g, respectivement pour *Citrus limon*, et 19,95 mg EAG/g et 1,33 mg QE/g, respectivement pour *Citrus sinensis*.

La quantification de la teneur phénolique totale dans les extraits a montré que les mélanges aqueux à 70% de solvant et en comparaison avec des solvants purs étaient plus efficaces pour extraire les composés phénoliques. Des travaux précédents suggèrent que les extraits d'éthanol et de méthanol (70%) présentent des valeurs plus élevées de polyphénols totaux que les extraits aqueux (**Lapornik et al., 2005 ; Rødtjer et al., 2006**). De plus, le méthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios seraient les solvants les plus utilisés pour une haute récupération de composés phénoliques (**Sahreem et al., 2010 ; Xia et al., 2010 ; Bouzid et al., 2011**).

La différence de teneur en phénols totaux obtenus à partir de différents extraits végétaux est principalement due à la différence de nature des composés phénoliques obtenus par chaque solvant utilisé (**Ignat et al., 2011**). De plus, **Horax et al. (2005)** ont souligné l'importance de l'effet des solvants qui a influencé de façon significative la quantité de composés phénoliques extraits. Suivant **Ross et al. (2009)**, on peut obtenir un grand nombre de composés phénoliques par extraction au méthanol tels que des acides phénoliques, des flavanons, des flavanols, des anthocyanines, des catéchines et des procyanidines. Ces résultats soulignent

que la polarité du solvant d'extraction utilisé peut influencer le rendement des composés phénoliques extraits. Ce résultat est en ligne avec ceux obtenus par **Zhao et al. (2006)**, la solubilité et le rendement d'extraction des constituants chimiques d'un échantillon peuvent être affectés par la différence de polarité du solvant utilisé pour l'extraction.

D'autres études ont indiqué que les teneurs en flavonoïdes totaux des écorces d'agrumes peuvent varier d'une façon importante de 1,4 % (**Goulas et al., 2012**) à 80 % (**Sultana et al., 2008**) selon les variétés. Ces variations peuvent s'expliquer par le fait que le test de Folin-Ciocalteu surestime les teneurs en phénols totaux à cause des interférences avec d'autres composés comme les sucres (sucrose, fructose, glucose...) et les acides organiques (acide ascorbique, acide malonique, acide citrique) qui réduisent aussi le réactif de Folin (**Li et al., 2006; Neveu et al., 2010**).

Par ailleurs, les variations des teneurs en ingrédients nutritifs des écorces des différentes variétés d'agrumes ou au sein de la même variété peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que les facteurs pédoclimatiques (le type de sol, l'exposition au soleil et les précipitations), génétiques (la variété) et agronomiques (la culture biologique, la production de fruits par arbre, l'état de maturation, la région de culture, la fertilisation, l'irrigation) (**Dragovic-Uzelacet et al., 2005 ; Causse et al., 2007**). Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (**Miliauskas et al., 2004**).

La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (**Lee et al., 2009**). Il a été prouvé que les teneurs des phénols totaux et des flavonoïdes sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et survivre (**Tim et Andrew, 2005 ; Piquemal, 2008**).

6. Pouvoir antioxydant des extraits végétaux

Les résultats de la capacité de piégeage des radicaux libres (essai DPPH) présentent des taux de 89, 21% pour l'extrait méthanolique 70% à une concentration de 3 mg/ ml, cette valeur était significativement différente de l'éthanol et d'acétone à la même concentration. Les extraits avec des concentrations de 70% de solvant utilisé présentaient une capacité de piégeage de radicaux DPPH supérieure à ceux avec leurs extraits absolus de méthanol et de l'eau. Les valeurs des IC50 obtenus, l'extrait méthanolique se révèle être de 1, 46 mg/ ml alors que l'extrait acétonique est de 3,1. Nous avons constaté aussi que le pouvoir antiradicalaire de

Citrus limon est plus important à celui de *Citrus sinensis*, à 70 % et à 2,5 g nous avons obtenu un pourcentage de piégeage de 57,44 et 63,73 %, respectivement pour *Citrus limon*, et 50,03 et 51,08 %, respectivement pour *Citrus sinensis*. Ces résultats indiquent que la capacité de piégeage de l'extrait méthanolique d'*Ammi visnaga* sur le radical DPPH était forte en comparaison avec celui des écorces d'agrumes.

Ces résultats concordent avec les résultats rapportés par **Zhang et al. (2013)**. Le piégeage de DPPH est fortement influencé par le solvant utilisé pour l'extraction des polyphénols. Les composés phénoliques ont été étudiés comme étant des donneurs d'hydrogène puissants au radical DPPH (**Von Gadow, Joubert et Hansmann, 1997**). L'activité antioxydante de la majorité des plantes est principalement due à la présence de composés phénoliques. Il est connu comme les radicaux libres scavengers (**Skerget et al., 2005**). L'estimation de l'activité antioxydante et la capacité du solvant à dissoudre un groupe sélectionné de composés antioxydants peuvent être influencées par le changement de polarité du solvant (**Zhou et Yu, 2004**). La corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur totale en phénol a été largement étudiée dans différents produits alimentaires (**Kiselova et al., 2006**).

Les résultats obtenus montrent que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons testés (**Ozturk et al., 2007 ; Su et al., 2008 ; Liuk et al., 2009**). L'activité antioxydante trouvée chez *Ammi visnaga* traduit la grande teneur de cette dernière en polyphénols, et ceci est confirmé par plusieurs travaux qui montrent la richesse de cette plante en coumarines, flavonoïdes et leurs dérivés (**Lemmich et al., 1996**).

Des études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Jeong et al., 2004**). Par ailleurs, la plupart des activités antioxydantes non enzymatiques telles que le piégeage du radical libre et l'inhibition de la peroxydation est mis en place par la réaction redox (**Zhu et al., 2002**). Selon (**Turkmen et al., 2007**), les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale. Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, parce que la synergie entre les différents produits chimiques devrait être prise en considération dans l'activité biologique (**Bourgou et al., 2008**).

De plus, l'activité antiradicalaire de ces extraits pourrait s'expliquer par la présence des tanins et des flavonoïdes qui sont détectés dans nos extraits (tests préliminaires, dosage). En effet les flavonoïdes et les tanins sont des piègeurs de radicaux libres (**Diallo, 2005**).

La capacité antiradicalaire des flavonoïdes dépend principalement de leurs structures (**Marfak, 2003**). Ainsi le pouvoir réducteur de nos extraits serait dû à leurs capacités à céder le proton pour neutraliser le radical DPPH. Cependant, cette activité reste significativement inférieure à celle du témoin positif.

La valeur d'IC50 est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, comme elle exprime la quantité de l'antioxydant nécessaire pour diminuer 50 % de la concentration du radical. Plus l'IC50 est faible plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (**Villaño et al., 2007**).

Nos résultats d'activité antioxydante obtenus par le dosage de la puissance réductrice ont montré que l'extrait méthanolique avait les valeurs d'activité antioxydante les plus élevées à 700 nm. Ce résultat était similaire à ceux obtenus à partir du rendement des composés phénoliques totaux. Les recherches et rapports antérieurs dans la littérature concordent avec nos résultats, les composés phénoliques sont les principaux composés phytochimiques responsables de la capacité antioxydante des extraits naturels (**Cevallos-Casals et al., 2006**), peut-être en raison de leurs propriétés redox qui leur permettent d'agir comme des agents réducteurs, des donneurs d'hydrogène et des désactivateurs d'oxygène singulet (**Chang et al., 2001**). Les extraits bruts sont plus actifs, cela est due sûrement à la complexité de ces extraits en substance polyphénoliques et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

Des études récentes ont mis en évidence que la polarité et l'hydrophobicité des agents antioxydants sont deux facteurs importants dans les systèmes de biomembranes. C'est la raison par laquelle beaucoup de chercheurs de l'activité antioxydante choisissent le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplés à celle du β -carotène comme modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (**Ferreria et al., 2006**). En effet, toute substance chimique qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être considérée comme antioxydant (**Liyana-Pathirana et al., 2006**).

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement de la β -carotène peut être décrit comme piègeur des radicaux libres et comme un antioxydant primaire (**Liyana-Pathirana et al., 2006**). Etant donné que ce test est basé sur un système d'émulsion des lipides dans l'eau, **Frankel et Meyer en 2000** ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes que les antioxydants polaires. Dans ce système, les antioxydants apolaires sont concentrés dans l'interface lipide-eau, permettant aussi de

prévenir la formation des radicaux lipidiques et par conséquent, l'oxydation du β -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont, donc, moins efficaces (**Frankel et Meyer, 2000**).

En générale, le potentiel réducteur des extraits végétaux est dû à la présence de molécules capables de donner des électrons qui peuvent réagir avec les radicaux libres et les convertir en produits stables, terminant de ce fait les réactions en chaînes parmi lesquelles les polyphénols (**Ferreria et al., 2006**). L'efficacité de l'antioxydant (AH) augmente si la force de la liaison A-H est faible et le radical (A) résultant doit être le plus stable possible, ce qui est le cas pour les composés phénoliques et flavonoïdes, ce sont des meilleurs donneurs d'électron ou d'hydrogène. Plusieurs études ont montré que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leur pouvoir antioxydant (**Heim et al, 2002**).

7. Activité antibactérienne des extraits végétaux

L'effet antibactérien peut s'expliquer par la relation entre le nombre de groupes hydroxyle et leur position sur le groupe phénol et leur toxicité relative pour les microorganismes, l'augmentation de l'hydroxylation induisant une augmentation de l'activité antimicrobienne. (**Marjorie, 1999**). Les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les triterpénoïdes (**Rojas et al., 1992**), le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes est tributaire de leurs compositions chimiques.

L'*Ammi visnaga* ou Noukha s'est révélé efficace contre les microorganismes (**Abroush et al., 2001**). **Jaradat et al. (2015)** ont constaté que les extraits végétaux d'*Ammi visnaga* obtenus à l'aide de solvants organiques ont montré une forte activité antimicrobienne que l'extrait aqueux et que les variations entre les espèces étaient évidentes. **Baydar et al., (2004)** ont suggéré que l'activité antibactérienne des extraits végétaux est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques dans la plante étudiée. En générale, la zone d'inhibition augmente considérablement avec la concentration des extraits (**Dordevic et al., 2007**). Comme cela a été rapporté dans la littérature, un extrait est considéré comme actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm (**Tekwu et al., 2012**).

A partir de nos résultats, on peut globalement déduire un pouvoir antibactérien des extraits testés. Les polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes comme l'épigallocatechine, la

catéchine, la myricétine, la quercétine (**Shan et al., 2007**) et lutéoline (**Askun et al., 2009**) sont des substances antibactériennes importantes.

Le mécanisme d'action des polyphénols sur ses agents pathogènes n'est pas bien connu, les études exploitées par **de Dominico et al., (2005)** ont mené à conclure que l'effet antimicrobien des produits polyphénoliques serait dû partiellement à une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes, qui en résulte une altération de la perméabilité de la membrane et la perte (fuite) de ses organites intracellulaires, en plus des caractéristiques physico-chimiques des composés polyphénoliques (la solubilité dans l'eau et la lipophilie) peuvent influencer cet effet antibactérien.

L'action inhibitrice des flavonoïdes sur la croissance bactérienne était étudiée par **Balentine et al. (2006)**. Ils ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli...*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus...*).

L'hypersensibilité des souches *B. cereus* peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels due à l'absence de la membrane externe (**Balentine et al., 2006**).

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-). Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle de la membrane externe, qui se compose de phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram (-) a été rapporté, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane, telle que les basses valeurs du pH et concentrations accrues en NaCl (**Koné et al., 2004 ; Turkmen et al., 2007 ; Fallah et al., 2008**).

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la concentration la plus basse rapportée pour donner une inhibition complète des bactéries testées après 48 heures d'incubation (**Wan et al., 1998 ; Canillac et Mourey, 2001**).

Certains chercheurs ont suggéré que l'acide tannique et le tanin sont les principaux acides phénoliques qui peuvent arrêter la motilité d'essaimage de *P. aeruginosa* sans réduire leur

capacité de croissance (**Omay et Tufenkji, 2011**). Les protéines peuvent avoir un fort effet sur le mécanisme d'inhibition de la motilité en essaimage qui est probablement due à la liaison et la précipitation de composés phénoliques pour eux (**Pratt et Kloter, 1998**).

Cinétique de formation de biofilm bactérien

Les bactéries planctoniques libèrent des protons et des molécules signal dans leur environnement lors des déplacements dans le milieu. Les protons et molécules signal diffusent de façon radiale depuis la cellule si aucune surface n'est proche, donc la concentration en molécules signal sera plus importante sur le côté de la bactérie se trouvant à proximité d'une surface. Les bactéries établissent alors un contact avec la surface par ces mécanismes de signalisation et expriment par la suite des adhésines à leur surface (**Wang et al., 2004 ; Thar et Khul, 2005**). Cependant, les gènes codant pour les caractères de motilité (synthèse du flagelle, motilité, chimiotactisme, etc.) peuvent être inhibés une fois que les bactéries se sont fixées à la surface (**Prigent-Combaret et Lejeune, 1999**).

La composition biochimique et l'architecture de la surface cellulaire (présence de protéines, de fimbriae, de flagelles, d'exopolymères, de peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif, de lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatif ou de phospho-mannoprotéines chez les levures) contribuent à l'adhésion des microorganismes aux supports. Par exemple, les fimbriae contiennent une forte proportion d'acides aminés hydrophobes, ce qui conduit à l'établissement d'interactions hydrophobes avec le matériau (**Donlan, 2002**). Les flagelles permettent à la bactérie d'être mobile et semblent jouer un rôle important dans les premières étapes de l'adhésion en contrecarrant les forces de répulsion électrostatique (**Pratt et Kolter, 1998**).

Dans la nature *S. aureus* et *B. cereus* existe rarement sous forme planctonique, libre, mais plutôt sous la forme de biofilm (**Méar, 2014**). En 2014, **Saxena et al.** ont montré que sur 80 souches des *Staphylococcies*, isolées à partir de poulet de chair, seulement 16 souches ont été de bonnes formatrices de biofilm par contre 47 ont donné une formation faible. Toutes les bactéries en générale tel que *S. aureus* et *B. cereus* en particulier résident de manière prédominante sous la forme sessile (**Nagant, 2013**). Les études de **Coban et al. (2016)** ont montré également la capacité des isolats de *B. cereus* à produire des biofilms dont la détection a été basée sur la méthode de coloration au CV et avec des pourcentages significatifs.

L'adhésion à la surface réceptrice engendre chez le microorganisme une perception différente de son environnement (**Ghigo, 2001**). Des gènes spécifiques sont alors surexprimés ou sous-exprimés selon les nouveaux besoins de la cellule. Ainsi, les gènes codant pour les flagelles sont inhibés, du fait de l'état sessile du microorganisme (**Kuchma et O'Toole, 2005**). Au contraire, l'expression des gènes impliqués dans la communication (« quorum sensing »), dans la production d'EPS, de protéines pariétales ou dans certaines voies métaboliques augmente (**Prigent-Combaret et al., 1999 ; O'Toole et al., 1998**).

Des protéines de surface, fréquemment appelées « adhésines », sont également fortement impliquées dans l'adhésion aux supports (**Flint et al., 1997**). Ainsi, **Cucarella et ses collaborateurs (2001)** ont identifié chez *S. aureus* une protéine de paroi appelée BAP (« Biofilm Associated Protein »). Ils ont démontré que les bactéries produisant cette protéine adhéraient fortement à des surfaces plastiques (polystyrène, chlorure de polyvinyle), alors que des mutants déficients pour cette protéine adhéraient peu aux deux surfaces testées. D'autres polymères présents à la surface des bactéries, notamment les polysaccharides, sont eux aussi impliqués dans l'attachement initial (**Atabek et Camesano, 2007**).

Inhibition des biofilms bactériens

Dans la pathogénèse clinique et alimentaire, l'infection associée au biofilm est connue comme un déclencheur des maladies chroniques, la détérioration des aliments. Même les produits laitiers et la détérioration des aliments réfrigérés ont également été créés par le biofilm bactérien (**Teh et al., 2014, Mizan et al., 2015**). Certains travaux antérieurs ont révélé que l'activité enzymatique de la glucosyltransférase qui permet la colonisation des bactéries et leur adhérence peut être affectée par les composés phénoliques (**Yanagida et al., 2000, Gregoire et al., 2007**). La formation de biofilm peut être inhibée par l'action de phénoliques en raison du manque de fer, certains phénols ont une propriété intermédiaire de chélation de fer (**Devoss et al., 1999**). La capacité du peptide à couvrir soit la surface du biomatériau, soit la bactérie elle-même, réduit l'adhérence des microorganismes sur la surface et diminue la croissance du biofilm (**Segev-Zarko et al., 2015**) Des études développées montrent qu'il existe une raison biologique entre la détection du quorum et le biofilm qui fonctionnent de manière coordonnée et entraînent une détérioration (**Bai et Vittal, 2014**). Les AHL bactériennes peuvent être imités par des substances sécrétées par plusieurs plantes et affectent

respectivement les comportements réglementés des bactéries associées aux plantes qui détectent le quorum. (Teplitski *et al.*, 2000).

Ces communautés sont très résistantes aux traitements antimicrobiens et à la défense immunitaire de l'hôte, étant ainsi à la base de nombreuses infections persistantes, très difficiles à éradiquer. Cette résistance accrue est attribuée, entre autres, à la pénétration limitée des agents antimicrobiens dans la matrice exopolymérique, et à la survie d'une petite sous population des cellules dormantes, les persisteurs (persisters), qui recolonisent par la suite le biofilm (Fux *et al.*, 2003; Lewis, 2007). Les biofilms constituent également une stratégie de prolifération, car leurs membres se multiplient plus efficacement comme communauté que individuellement (Caldwell *et al.*, 1997).

Ainsi, le temps d'incubation peut être connu comme le temps pour lequel les bactéries entrent en contact avec la surface. En effet, plus le temps de contact augmente plus les bactéries ont assez de temps pour se fixer et former un biofilm sur la surface du dispositif. Cette première période correspond à la dispersion du biofilm, avec une libération de cellules bactériennes dans le milieu de culture et la seconde à la formation de biofilm (Djeribi *et al.*, 2012).

Nos résultats démontrent que les deux enzymes testés la trypsine et la protéinase K ont des effets inhibiteurs sur la formation de biofilm. Le taux d'inhibition de la formation du biofilm par l'enzyme trypsine est plus élevé par rapport à l'enzyme protéinase K. D'après les résultats obtenus nous avons révélé que les souches de *Staphylococcus aureus* ont représenté une résistance élevée par rapport à *Bacillus cereus*. En comparant ces résultats avec ceux obtenus par les extraits végétaux, nous avons constaté que les taux d'inhibition de formation des biofilms bactériens obtenus par les enzymes et l'acide salicylique ont été moins élevés par rapport aux extraits végétaux.

Protéinase K et la trypsine sont toutes deux des sérine-protéases ayant une activité endo-protéolytique. Chacune dispose d'une large gamme de substrats : protéinase K clive des liaisons peptidiques amino aliphatique, aromatique ou hydrophobe les acides, et de la trypsine est spécifique pour les liaisons peptidiques de lysine et arginine (Chaignon *et al.*, 2007).

Les sérine-protéases de la protéinase K et de la trypsine ont souvent été utilisés comme efficaces agents d'élimination de biofilm qui empêchent l'adhérence des bactéries et la formation de biofilm (Chaignon *et al.*, 2007 ; O'Neil *et al.*, 2007), peut-être par la dégradation de la surface des structures (Boles et Horswill, 2008).

Les deux protéases efficacement enlevé biofilm formés par une certaine souche de *S. aureus*, mais dans d'autres, la protéinase K était plus efficace que trypsine. **Boles & Horswill (2008)** ont également montré que la protéinase K a inhibé la formation de biofilm en provoquant la dispersion des biofilms établis. Autres travaux ont étudiés le détachement du biofilm de *S. aureus* (**Yarwood et al., 2004**).

La densité décroissante des biofilms bactériens observée avec l'augmentation de la concentration de l'acide salicylique est due à l'effet de ce dernier sur sa formation. Cette activité a été démontrée par plusieurs travaux réalisés, on cite les travaux de **Prithviraj et al.** en **2005**, **Mei et al.** en **2010** et **Samuel et al.** en **2011**.

Nos résultats suggèrent que des polymères à base d'acide salicylique ne peuvent pas affecter la fixation de surface, précédemment suggéré (**Bryer et al., 2006**), et que l'acide salicylique réagit de manière irréversible avec des cellules bactériennes.

Le pH du milieu environnant a une influence sur la croissance des cellules, mais également sur leurs propriétés physico-chimiques de surface. La valeur du pH a également un impact sur la charge de surface du support, notamment dans le cas des métaux comme l'acier inoxydable, pour lequel l'état d'oxydation dépend du pH (**Palmer et al., 2007**).



Conclusion

Conclusion

Le biofilm semble faciliter la survie des bactéries pathogènes dans l'environnement et chez leurs hôtes. Parce que les bactéries formant des biofilms ont des caractéristiques différentes des bactéries planctoniques, de nouveaux outils et de nouvelles approches pour la prévention, le traitement et le diagnostic de ces bactéries pathogènes sont requis. En effet, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture.

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. En effet, les produits riches en polyphénols et principalement en flavonoïdes ont d'ailleurs montré qu'ils avaient des propriétés biologiques très importantes et très vastes. Ce sont notamment des antioxydants et antimicrobiens puissants.

A cet effet, nous avons sélectionné les espèces végétales suivantes : la plante *Ammi visnaga* et les fruits *Citrus limon* et *Citrus sinensis*. Quelques propriétés phytochimiques, l'activité antioxydante, antimicrobienne et l'inhibition de biofilm des extraits bruts ont été définis.

La caractérisation quantitative des différents extraits végétaux a été réalisée pour déterminer leur contenu en polyphénols et en flavonoïdes. Ainsi l'extrait méthanolique d'*Ammi visnaga* représente la teneur en polyphénols la plus élevée de l'ordre de 172, 66 mg/g, par rapport à *Citrus limon* et *Citrus sinensis* qui ont représentés des taux de 33,5 mg/g et 19,95 mg /g respectivement. Il semble également que le méthanol soit le meilleur solvant pour extraire les polyphénols à partir de nos échantillons végétaux. Les teneurs en flavonoïdes des extraits d'*Ammi visnaga*, de *Citrus limon* et de *Citrus sinensis* sont de 22 mg /g, 2,977 mg /g et 1,33 mg /g, respectivement. Ces résultats indiquent un contenu en flavonoïdes moins important par rapport à celui des polyphénols. L'extrait méthanolique d'*Ammi visnaga* s'est révélé le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes.

Les résultats des analyses effectuées sur les extraits méthanoliques par HPLC indiquent que tous les extraits comportent des métabolites secondaires, les plus détectées sont des flavonoïdes.

Différentes méthodes chimiques comparatives ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante. Le test DPPH étant basé sur la réduction du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, indépendamment de la polarité du substrat. Les résultats obtenus montrent

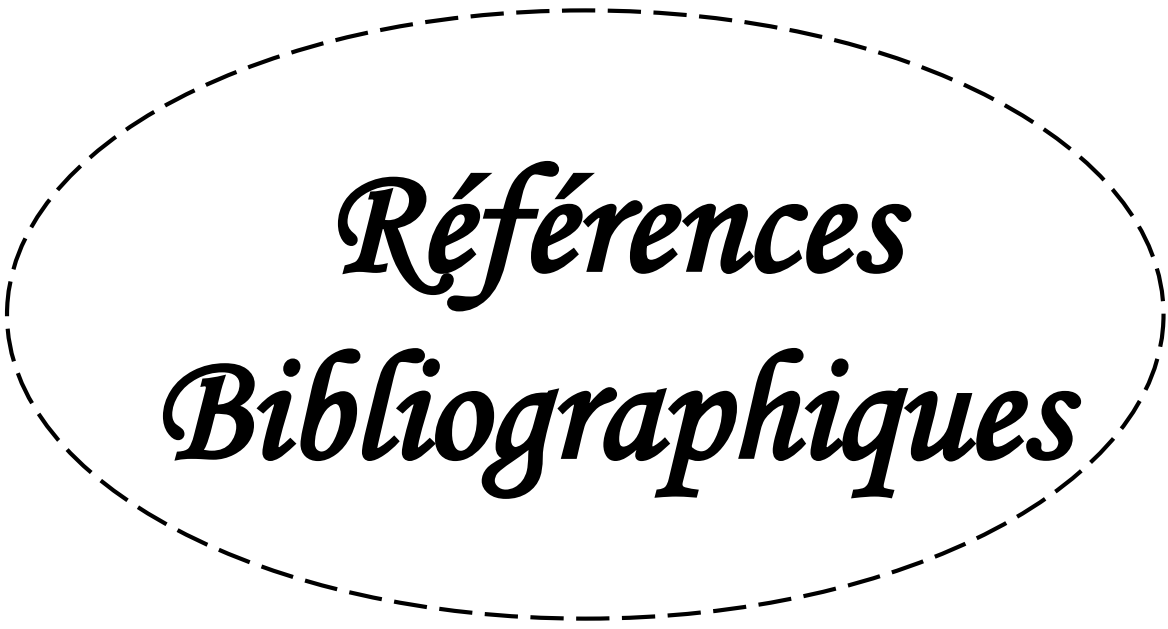
que les fractions méthanoliques renferment de puissants composés actifs capables de réduire ce radical libre, puisqu'ils agissent à de faibles concentrations. Les valeurs d'IC50 représentées sont extrêmement diverses. L'extrait méthanolique d'*Ammi visnaga* semble posséder le pouvoir antiradicalaire le plus élevé (1,46 mg/ml), par rapport à *Citrus limon* et *Citrus sinensis*. Ces résultats ont été confirmés par la technique de réduction du fer FRAP, et le blanchissement de la β -carotène.

Les différents isolats de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus* testés dans cette étude, ont été isolés à partir des denrées alimentaires commercialisées et à partir des plats cuisinés. 156 isolats *B. cereus* ont été obtenus par isolement à partir de différents échantillons de produits alimentaires, 24 isolats ont été sélectionnés après le screening de leur capacité de résistance à la pénicilline G et à d'autres antibiotiques. Concernant les souches de *Staphylococcus*, 147 isolats ont été obtenus, 46 parmi eux ont été choisis après leur profil de résistance aux antibiotiques.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur dix souches bactériennes retenues. Selon la méthode des puits, les extraits végétaux possèdent une activité antimicrobienne sur toutes les souches testées et le diamètre d'inhibition se diffère d'une souche à une autre selon la nature et la concentration de l'extrait utilisé. La plante *Ammi visnaga* a donné l'effet antimicrobien le plus important avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 22,66 mm.

Par ailleurs, nous avons constaté que tous les extraits étudiés semblent exercer un effet inhibiteur sur la croissance et l'adhérence de toutes les souches bactériennes testées. De plus une étude comparative nous a permis de montrer que les deux enzymes protéinase K et la trypsine ont la capacité d'inhiber les biofilms bactériens, sauf deux souches qui ont été résistantes aux deux traitements utilisés. Il ressort également une action inhibitrice de l'acide salicylique contre la formation de biofilm par les cinq isolats des *S. aureus* et des *B. cereus* testés avec une Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) situés autour de 2,76 mM.

Une prolongation de ce travail à l'avenir est souhaitable pour déterminer les fractions les plus actives présents dans l'*Ammi visnaga* et éventuellement de caractériser les molécules responsables de ses activités, et par la suite il serait intéressant de rechercher le mode d'action de l'activité antibactérienne et antioxydante, il serait donc nécessaire de comprendre l'interaction entre l'activité antibactérienne et antioxydante et la structure chimique du composé phénolique dans les extraits examinés. De plus des techniques biotechnologiques dans le domaine des métabolites secondaires pourraient être envisagées afin de caractériser le maximum de ces biomolécules actives utiles dans les domaines alimentaire, pharmacologique et cosmétologique.



*Références
Bibliographiques*

Références bibliographiques

-A-

- Abroush, Z., Majd, A., Rezaee, M.B. (2001).** Evaluation of antimicrobial effect of Tooth pick plant, Master of Science thesis. Biology department. Azad University.
- Acco, M., Ferreira, F.S., Henriques, J.A.P., Tondo, E.C. (2003).** Identification of multiples strains of *Staphylococcus aureus* colonising nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiology* 20, 489-493.
- Adams, M. R. et M. O. Moss. (2008).** Food Microbiology, 3rd ed, vol. Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge.
- Agarwal, M., Kumar, A., Gupta, R., Upadhyaya, S. (2012).** Extraction of polyphenol, flavonoid from *Embllica officinalis*, *Citrus limon*, *Cucumis sativus* and evaluation of their antioxidant activity. *Orient. J. Chem* 28(2), 993-998.
- Agata, N., Ohta M., Yokoyama, K. (2002).** Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology* 73, 23-27.
- Agata, N., Ohta, M., Mori, M., Isobe, M. (1995a).** A novel dodecadepspeptide cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 129, 17-20.
- Akroum, S. (2010).** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat : Université Mentouri de Constantine-Algerie.
- Albagnac, G., Varoquaux, P., Montigaud, J.C. (2002).** Technologie de transformation des fruits, *Lavoisier*, Paris, 302-304.
- Alcaraz, M., Almeda¹, R., Saiz¹, E., Calbet¹, A., Duarte, C. M., Agust, S., Santiago, R., Alonso, A. (2013).** Effects of temperature on the metabolic stoichiometry of Arctic zooplankton. *Biogeosciences* 10, 689–697, 2013
- Al-Shabibi M.M.A., Langner, E.H., Tobias, J., Tuckey, S.L. (1964).** Effect of added fatty acids on the flavor of milk. *Journal of dairy science* 47, 295-296.
- Ananthanarayan and paniker. (2006).** Textbook of Microbiology. Edition Seventh, India. 665p.
- Andersson, A., Rönner, U., Granum, P. E. (1995).** What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology* 28, 145-155.
- André, M.C.D. P. B., Campos, M.R.H., Borges, L.J., Kipnis, A., Pimenta, F.C., Serafini, A.B. (2008).** Comparaison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsedfield gel electrophoresis following small digestion. *Food control* 19, 200-207.

- APG III. (2009).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 128-131.
- Arvidson, S., Tegmark, K. (2001).** Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* 291, 159-170.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S. (2003).** An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect* 130, 33-40.
- Aşkun, T., Tumen, G., Satil, F., Ates, M. (2009).** Characterization of the phenolic composition and antimicrobial activities of Turkish medicinal plants. *Pharmaceutical Biology* 47, 7: 563-571.
- Atabek, A., Camesano, T. A. (2007).** Atomic force microscopy study of the effect of lipopolysaccharides and extracellular polymers on adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* 189, 8503-8509.
- Awany, N.M, AbouZeid, A.M, Abdo, M.A. (2010).** Prevalence of toxigenic bacteria in: some Egyptian food, in: Proceeding of Fifth Scientific Environmental Conference, Alexandria Egypt. 107–124.

-B-

- Badr, E., Cashmore, M., and Cobb, D. (2004).** The consideration of impacts upon the aquatic environment in environmental impact statements in England and Wales. *Journal of Environmental Assessment Policy and Management* 6(1), 19-49.
- Baggett, S., Protiva P., Mazzola, E.P., Yang, H., Ressler, E.T., Basile, M.J., Weinstein, I.B., Kennelly, E.J. (2005).** Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. *J Nat Prod* 68, 354-360.
- Bai, A.J., Vittal, R.R. (2014).** Quorum sensing inhibitory and anti-biofilm activity of essential oils and their in vivo efficacy in food systems. *Food Biotechnology* 28, 269–292.
- Baier, R. E. (1980).** Substrata influences on adhesion of microorganisms and their resultant new surface properties. In: G. Bitton and K.C. Marshall. Adsorption of microorganisms to surfaces. John Wiley, New York, 59-104.

- Baird-Parker, A. C. (1962).** An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *J. Appl. Microbiol* 25, 12-19.
- Baird-Parker, A. C. (1990).** The staphylococci: an introduction. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser* 19, 1S-8S.
- Balaban, N., Rasooly, A. (2000).** Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol* 61, 1-10.
- Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W. (2006).** The preand post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science* 73, 413-421.
- Bampidis, V.A., Robinson, P.H. (2006).** *Citrus* by-products as ruminant feeds: a review. *Animal Feed Science Technology* 128, 175-217.
- Barros, H. R.D.M., Ferreira, T.A.P.D.C., Genovese, M. I. (2012).** Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of *Citrus* from Brazil.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris, JC Turck, M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 36, 493-496.
- Bauer, W. J., Badoud, R., Lölliger, J., Etournaud, A. (2010).** Science et technologie des aliments: Principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. *Edition PPUR Presses polytechniques*, 212p.
- Baydar, N.G., Ozkan, G., Sagdiç, O. (2004).** Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitisvinifera* L.) extracts. *Food Control* 15, 335–339.
- Behlau, I., Gilmore, M.S. (2008).** Microbial biofilms in ophtalmology and infectious diseases. *Arch ophthalmol* 126, 1572-1581.
- Bénard, C. (2009).** Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de Doctorat : Université de NANCY.
- Bennici, A., Tani, C. (2004).** Anatomical and ultrastrucural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. *Flora* 199, 464-475.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes** (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Springer-Verlag)) 2nd Edition.
- Bhatia, A., Zahoor, S. (2007).** *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 3, 188-197.

- Bicu, I., Mustata, F. (2011).** Cellulose extraction from orange peel using sulfite digestion reagents. *Bioresource Technology* 102, 10013-10019.
- Blancke, R. (2001).** Guide des Fruits et Légumes Tropicaux. Ulmer; 108.
- Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. (1998).** Antioxidant activity and phenolic composition of *Citrus* peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(6), 2123-2129.
- Bogani, P.,Galli, C.,Villa, M.,Visioli,F. (2007).** Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* 190, 181–186.
- Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un forestier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, 79 – 82.
- Boles, B.R., Horswill, A.R. (2008).** Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 25; 4(4):e1000052.
- Bonnet, C., Alamigeon, F., Micheels, P. (2010).** Guide complet des soins esthétiques : du coté de ma vie. *Edition Eyrolles*. 14p.
- Botineau, M. (2010).** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Tec & Doc, Paris, 1335 pp.
- Bougandoura, N., Bendimerad, N. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) *Briq Rev. « Nature & Technologie »*. *B- Sciences Agronomiques et Biologiques* 09,14-19.
- Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B. (2008).** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies* 331, 48–55.
- Bouزيد, D., Haddouk, S., Amouri, A., Ben Hadj Hmida, Y., Tahri, N., Masmoudi, H. (2011).** Contribution of immunofluorescence to identification and characterization of antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Indian Journal of Gastroenterology* 30:229.
- Broadasky, T. F., Lewis, C., Eble, T.E. (1976).** Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr* 123, 33-44.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. *Edition Technique et documentation*, 233.
- Bryer, P., Elliott, J.N., Wilingham, E.J. (2006).** The effects of coal tar based pavement sealer on amphibian development and metamorphosis. *Ecotoxicology* 15 (3):241–247.

Buckingham, S.C., McDougal, L.K., Cathey, L.D. (2004). Emergence of Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children's Hospital. *Pediatr. Infect. Dis. J* 23, 619-624.

-C-

Caldwell, D. E., Atuku, E., Wilkie, D. C., Wivcharuk, K. P., Karthikeyan, S., Korber, D. R., Schmid, D. R., and Wolfaardt, G. M. (1997). Germ theory versus community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms, *Adv. Dental Res* 11, 4–13.

Canillac, N., Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 18(3), 261-268.

Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.-P., Hasselmann, M., Leverve, X. (2006). Traité de nutrition artificielle de l'adulte. *Edition Springer*, p 255.

Cappucino, J.G., Sherman, N. (2004). Microbiology A Laboratory Manuel Pearson Education (Singapore) Indian Branch. New Delhi.

Carr, A., Frei, B. (1999). Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 13(9), 1007-1024.

Casman, E. P. (1965). Staphylococcal enterotoxin. *Ann. NY Acad. Sci.* 128, 124-131.

Causse, M., Chervin, C., Mauget, J.C., Renard, C. (2007). Les sources de variabilité des qualités nutritionnelles des fruits et légumes (Chapitre 2). Paris: Institut National de la Recherche Agronomique. 63p.

Césarini, J.-P. (2004). Le sélénium: actualités. *John Libbey Eurotext Edition*, 14 p.

Cevallos-Casals, B.A., Byrne, D., Okie, W.R., Cisneros-Zevallos, L. (2006). Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties. *Food Chemistry* 96, 273–280.

Chaignon, P., Sadovskaya, I., Rangunah, Ch., Ramasubbu, N., Kaplan, J.B., Jabbouri, S. (2007). Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol* 7.5 (1), 125-32.

Chanforan, C. (2010). Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour

- l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat : Université D'Avignon et des pays de Vaucluse.
- Chang, S.T., Wu, J.H., Wang, S.Y., Kang, PL, Yang, NS, Shyur LF. (2001).** Antioxidant activity of extracts from acacia confuse bark and heartwood. *Journal of agriculture and food chemistry* 49, 3420-3424.
- Characklis, W. G., Marshall, K. C. (1990).** Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y, 2125-2133.
- Chavan, U.D, McKenzie, D.B, Shahidi, F. (2001).** Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chemistry* 74, 177-187.
- Cheng, M., Daniel, R.M., Coolbear T. (2003).** Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International dairy journal* 13, 255-275.
- Cheyrier, V. (2005).** Polyphenols in foods are more complex than often thought1–3. *Am. J. Clin. Nutr* 81, 223S-229S.
- Chopra, I.C., Abral, B.K., Handa, K.L. (1960).** Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue botanique. UNESCO, (Ed.). 48p.
- Christophe, P., & Christophe S. (2011).** Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. *Edition Springer*, p 84.
- Chutia, M., Deka Bhuyan, P., Pathak, M.G., Sarma, T.C., Boruah P. (2009).** Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology* 42, 777-780.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. M100-S22. Wayne: PA: CLSI.
- Coban, A.Y., Akbal1, A.U., Uzun, M., Cayci1, Y.T. Birinci1, A., Durupinar, B. (2016).** Evaluation of crystal violet decolorization assay for minimal inhibitory concentration detection of primary antituberculosis drugs against *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111(7), 454-459.
- Coats, J.R., Karr, L.L., Drewes, C.D. (1991).** Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids. 305-316p. In P.A. Hedin (ed.), Naturally Occurring Pest Bioregulators. ACS Symposium Series. Washington, D.C.
- Coghlan, A. (1996).** Catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarray. *J. Bacteriol* 185, 1951-1957.
- Collado, J., Fernández, A., Rodrigo, M., Camats, J., Lopez, A. M. (2003).** Kinetics of activation of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology*. 20, 545-548.

- Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M. (2001).** Collins and Lyne's microbiological methods. 7th ed. London: Arnold.
- Corne, P. (2004).** *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques et Chimiques de la Santé. Université de Montpellier I, France.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, G.K. (1978).** How bacteria stick. *Sci. Am* 238, 86-95.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., De Beer, D., well, D., Korber, D., James, G. (1994).** Mini-review: biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol* 176, 2137-2142.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., well, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott H.M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol* 49, 711-745.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S et al. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418), 1318-22.
- Cox, M., et al. (1995).** Solution structure of the Oct-1 POU homeodomain determined by NMR and restrained molecular dynamics. *J Biomol NMR* 6(1), 23-32.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J. R. (2001).** Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183, 2888–2896.
- D-**
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R. Giovannini, C., Masella, R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanità* 43(4), 348-361.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010).** Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Propreties. *Molecules* 15(10), 7313-52.
- Daurel, C., Huet, C., Dhalluim, A., Bes, M., Etienne, J., Leclercq, R., (2008).** Differences in potential for selection of Clindamycin-resistant mutants between inducible *erm* (A) and *erm* (C) *Staphylococcus aureus* genes. *J. Clin. Microbiol* 46, 546-550.
- Davey, M.E., O'Toole G.A. (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 64, 847-867.
- Davies, F.S., Albrigo, L.G. (1994).** *Citrus* CAB. (Éd) International, Original provenant de l'Université du Michigan. 254 p.
- De Domenico, I., Ward, D.M., Nemeth, E., Vaughn, M.B., Musci, G., Ganz, T. & Kaplan, J. (2005).** The molecular basis of ferroportinlinked hemochromatosis.

- Proceedings of the National Academy of Science United States of America* 102, 8955–8960
- De Jonghe, V., Coorevetis, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., De Vos, P., Heyndrickx, M. (2010).** Toxicogenic and spoilage potentiel of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International journal of food microbiology* 136(3), 318-325.
- De Koffi, E., Sea, T., Dodehe, Y., Soro, S. (2010).** Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *Journal of Animal and Plant Science* 5 (3), 550- 558.
- De La Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G. A. (2009).** Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, Nutritional value and stability. *Edition John Wiley and Sons*, p 73.
- De Rocca Serra, D., Ollitrault, P. (1992).** L'amélioration des agrumes : Les ressources génétiques : *Citrus* breeding : Management of genetic resources. *Fruits* 47, 115-123 p.
- Debuigne, G., Couplan, F. (2007).** Petit Larousse des plantes médicinales. 384p.
- Denis, F., poly, M.C., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R. (2007).** Bactériologie médicale: techniques usuelles. Edition Elsevier Masson. 27-251 pp.
- Devoss, J.J., Rutter, K., Schroeder, B.G., Barry, C.E. (1999).** Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *Journal of Bacteriology* 181, 4443-4451.
- Deysson, G. (1979).** Organisation et classification des plantes vasculaires, cours de botanique générale quatrième série, tome II, Paris, 529 pp.
- Di Carlo, G.1., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F. (1999).** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65(4), 337-53.
- Di Giannatale, E., Vincenza, P., Alfreda, T., Cristina, M., Giacomo, M. (2011).** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food for human consumption. *Veterinria Italiana* 47(2), 165-173.
- Diallo, A. (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* willd. (*Myrtaceae*). Thèse de doctorat en pharmacie : Université de Bamako faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie (FMPOS). Mali.
- Dicko, M. H., Gruppen, H., Traoré, A. S., Voragen, A. G. J., Van Berkel, W. J. H. (2006).** Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 1 (1), 21-38.
- Dixon, R.A.1., Paiva, N.L. (1995).** Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* Jul 7(7), 1085-1097.

- Djeribi, R., Bouchloukh, W., Jouenne, T., Mena, B. (2012).** Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *Am J infect control* 40 (9), 854-9.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev* 15, 167-193.
- Dorđević, N., Grubić, G., Adamović, M., Stojanović, B. (2007).** The influence of inoculant and zeolite supplementation on quality of silages prepared from whole maize plant, lucerne and perennial ryegrass. I international congress: Food, Technology, *Quality and Safety*, 51-56.
- Doyle, E. (2002).** Survival and Growth of *Clostridium perfringens* During the Cooling Step of Thermal Processing of Meat Products. *Food Research Institute*, University of Wisconsin, Madison, USA, pp. 1–15.
- Dragovic-Uzelac, V., Delonga, K., Levaj B., Djakovic, S., Pospisil, J. (2005).** Phenolic profiles of raw apricots, pumpkins, and their purees in the evaluation of apricot nectar and jam authenticity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (12), 4836-4842.
- Dubois, N., Barthomeuf, C., Bergé, J.P. (2006).** Convenient preparation of picolinyl derivatives from fatty acid esters *European Journal of Lipid Science and Technology*. 28–32 p.
- Dugas, A. J., Castaneda-Acosta, J., Bonin, G.C., Price, K.H., Fisches, N.H., Winston, G.W. (2000).** Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure activity relationships. *Journal of Natural product* 63, 31-327.
- Duoss-Jennings, H. A., Schmidt, T. B., Callaway, T. R., Carroll, J. A., Martin, J. M., Shields-Menard, S.A. (2013).** Effect of *Citrus* by products on survival of O157:H7 and non-O157 *Escherichia coli* serogroups within in vitro bovine ruminal microbial fermentations. *International Journal of Microbiology*. 1-5.
- Dupont, F., Guignard, J.L. (2007).** Abrèges botanique systématique moléculaire. 14 éditions révisées, Masson. 285 pp.
- Dupont, H.L., (2005).** What's new in enteric infectious diseases at home and a board? *Curropin. Infect Dis* 18, 407-412.
- Duraffourd C., Lapraz J.C., Chemli R. (1997).** La plante médicinale de la tradition à la science. *Ier congrès Intercontinental*. Tunis. Ed. Granche. Paris.

-E-

Eddouks, M., Ouahidi, M.L., Farid, O., Moufid, A., Khalidi, A., Lemhadri, A. (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie* 5,194 -203.

Espinasse. F., Page, B., Cottard-Bouille, B. (2010). Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs-*Revue francophone des laboration* 462 ,51-63.

Evans, P., Halliwell, B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 85 (2), 67-74.

-F-

Fain, O. (2004). Mise au point : Carences en vitamine C. *La revue de médecine interne.* 25, 872-880.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies* 331, 372-379.

Farhat A., Fabiano-Tixier A.S., El Maataoui M., Maingonnat J.F., Romdhane M., Chemat F. (2011). Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chemistry* 125, 255 261.

Fasquelle, R. (1974). Eléments de bactériologie médicale .9ème édition. Flammarion, Paris. 27-36.

Fauchère, J.L. Avril, J.L. (2002). Bactériologie générale et médicale. *ELLIPSES* (ed), 365p.

Fenselau, C., Havey, C., Teerakulkittipong, N., Swatkoski, S., Laine, O., Edwards, N. (2008). Identification of b-lactamase in antibiotic-resistant *Bacillus cereus* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 904-6.

Ferreria, A., Proenca, C., Serralheiro, M.L.M, Araujo, M.E.M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology* 108, 31-37.

Flandrois, J.P. (1997). Bactériologie médicale. Presse Universitaire de Lyon. pp 108-109.

Flemming, H.C. (1990). Introduction: biofilm as a particular form of microbial life. in *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems.* Stuttgart.

Flemming, H.C., Wingender, J., Moritz, R., Borchard, W., Mayer, C. (1999). Physico-chemical properties of biofilms. Short review, *Biofilms in the aquatic environment.* Edt *The Royal Society of Chemistry.* 1-12.

- Fletcher, E. L., Weissman, B.A., Efron, N., Fleiszig, S.M., Curcio, A.J., Brennan, N.A. (1993).** The role of pili in the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to unworn hydrogel contact lenses. *Curr. Eye Res* 12, 1067-1071.
- Flint, H. J., Whitehead, T. R., Martin, J. C. & Gasparic, A. (1997).** Interrupted catalytic domain structures in xylanases from two distantly related strains of *Prevotella ruminicola*. *Biochem Biophys Acta* 1337, 161–165.
- Foster, T.J., McDevitt, D. (1994).** Surface-associated proteins of *S. aureus*: their possible roles in virulence. *J. FEMS Microbiology Letters* 118, 199-205.
- Francois, P., Vaudaux, P., Foster, T.j., Plew, D. (1997).** Facteurs d'attachement au fibrinogene Méd. *Mal. Infect* 27, 9-143.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S. (2000).** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the science of Food and Agriculture* 13, 1925-1940.
- Freney, J., Kloos, W. E., Hajek, V., Webster, J. A., Bes, M., Brun, Y. & Vernozy-Rozand, C. (1999).** Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Subcommittee on the taxonomy of *staphylococci* and *streptococci* of the International Committee on Systematic Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 49, 489–502.
- Fritze, D. (2004).** The taxonomy of the genus of *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria. *The American phytopathology Society* 94 (11), 1245-1248.
- Fux, C.A., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. (2003).** Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev. Anti-infect.ther* 1, 667: 683.

-G-

- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutiérrez, A. (2010).** Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules* 15, 8813- 8826.
- Gavin, R., Merino, S., Altarriba, M., Canals, R., Shaw,J.G., Tomás, J.M. (2003).** Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS Microbiol. Lett* 224, 77-83.
- Geoff, D., Susannah, J., Featherstone, C., Barton, M. (2005).** The role of radiotherapy in cancer treatment Estimating optimal utilization. a review :evidence-based clinical guidelines.

- Gharagozloo, M., Doroudchi, M., Ghaderi, A. (2002).** Effects of *Citrus aurantifolia* concentrated extract on the spontaneous proliferation of MDA-MB-453 and RPMI-8866 tumor cell lines. *Phytomedicine* 9, 475–477.
- Gharagozloo, M., Ghaderi, A. (2001).** Immunomodulatory effect of concentrated lime juice extract on activated human mononuclear cells. *J Ethnopharmacol* 77, 85-90.
- Ghasemi, K., Ghasemi, Y., EbrahimZadeh, M.A. (2009).** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22 (3) 277-281.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E. (2011).** Anticancer and antioxidant activities of Malaysian young ginger (*zingiber officinale* Roscoe) varieties grown under different CO₂ concentration. *J. Med. Plant Res* 5(14), 3247-3255.
- Ghazi, F., Sahraoui, S. (2005).** Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tantboucht et Hamraïa. Mémoire d'ingénieur. *Institut national d'agronomie*. Algeria. 81 p.
- Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie* 3(4), 162-169.
- Ghigo, J.M. (2001).** Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412, 442–445.
- Gilbert, P., Allison, D.G., Mc Bain, A.J. (2002).** Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross resistance? *Symp Ser Soc App Microbiol* 92, 98-110.
- Goudable, J., & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 11, 115-120.
- Goulas, V., Manganaris, G.A. (2012).** Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry* 131, 39-47.
- Granum, P. (1994).** *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Bacteriol* 76, 61- 66.
- Granum, P. E. (2001).** *Bacillus cereus* in Doyle, M. P. e. a. (Ed), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2nd Ed.*, ASM Press. 373-381.
- Granum, P., Lund, T. (1997).** *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett* 157, 223- 228.
- Grayna, Z., Dragan, T., Gourniak, K., Basiura, E. (1998).** Determination of furanochromones and pyranocoumarins in drugs and *Ammi visnaga* fruits by combined solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography thin-layer

- chromatography-high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 797 (1-2), 305-309.
- Gregoire, S., Singn, A.P., Vorsa, N., Koo, H. (2007).** Influence of Cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferase and *Streptococcus mutans* acidigenicity. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1960-1968.
- Gudmundsdóttir, B.K. (1996).** Comparison of extracellular proteases produced by *Aeromonas salmonicida* strains isolated from various fish species. 105–113.
- Guidot, D. M., Repine, J. E., Kitlowski, A. D., Flores, S. C., Nelson, S. K., Wright, R. M., McCord, J. M. (1995).** Mitochondrial respiration scavenges extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism. *The Journal of Clinical Investigation* 96, 1131-1136.
- Guignard, J. L. (2001).** Botanique systématique moléculaire. 12^{ème} Edition Masson (Paris), 304p.
- Guinebretière, M. H. et al (2008).** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* 10, 851-865.
- Guinebretière, M.H., Girardin, H., Dargaignaratz, C., Carlin, F., Nguyen-The, C. (2003).** *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini puree processing line. *Int. J. Food Microbiol* 82, 223 -232.
- Guiraud, J.P., Rosec J.P. (2004).** Pratiques des normes en microbiologie alimentaire. Edition AFNOR, Paris. Pp 168-178.
- Gundogun, N., Citak, S., Yucel, N., Devran, A. (2005).** A note on the incidence and the antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. *Meat. Sci* 69, 807-810.
- Guttman DM, Ellar DJ. (2000).** Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringensis* virulence factors. *FFMS Microbial LeH* 118(1), 7-13.
- Gynayd, K., Erim, B. (2002).** Determination of khellin and visnagin in *Ammi visnaga* fruits by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 954, 291-294.
- H-**
- Harborne, J.B. (1980).** Plant Phenolic's: Encyclopedia of Plant Physiology. *New series* (8), 329-402.

- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13(10), 572-584.
- Hoffmann, L. (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyl transférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de Louis Pasteur-Strasbourg I.
- Holmes, C.W., Hughes T.P., Christensen, R. (1978).** Energy metabolism of Brahman x Friesian and Friesian calves, and the influence of an increase in rectal temperature on their heat production. *New Zealand journal of agricultural research* 26, 615-622.
- Horax, R., Hettiarachchy, N., Islam, S. (2005).** Total phenolic contents and phenolic acid constituents in 4 varieties of bitter melons (*Momordica charantia*) and antioxidant activities of their extracts. *Journal of Food Science* 70, C275-80.
- Hosni, K., Zhaed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Sebei H. (2010).** Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: Evidence for the genotypic influence. *Food chemistry* 123, 1098-1104.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J of Agr Food chem* 53, 1841-1856.
- Huang, Y.S., Ho, S.C. (2010).** Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chemistry*. 119, 868-873.
- Hubert, J. (2006).** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut Nationale Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bio ingénieries.
- Huet, R. (1991).** Les huiles essentielles d'agrumes. *Fruits* 4, 551-576.
- Hussain, M.A.A., Sanousi, S.M.E. (2011).** Prevalence of *Clostridium prefringens* and *Clostridium prefringens*-like organisms in fecal samples of domestic animals. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* 2, 89-101.

-I-

- Iandolo, J. J. (1989).** Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol* 43, 375-402.

- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011).** A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126, 1821–1835.
- Ihrig, T. J. Maulawizada, M.A. Thomas, B.D. Jacobson, F.S. (1995).** Production by CHO Cells: Biosynthetic Mechanism and Potential Cytotoxicity. *Animal Cell Technology*: Springer, 193-197 p.
- Ioannou, I., Serafeim, G. (2012).** What drives corporate social performance? The role of nation-level institutions. *Journal of International Business Studies* 43, 834–864.
- Ishida, K. T., Griffiths, P.R. (1990).** Adsorption of proteins and polysaccharides at aqueous-solid interfaces by infrared internal reflection spectrometry. *ACS. Symp. Ser* 447, 208-224.

-J-

- Jacob, L. (2007).** L'insuffisance rénale aiguë. *Edition Springer*. p 88.
- Jaradat, N. (2015).** Phytochemical Screening and In-vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Entire Khella Plant (*Ammi visnaga* .L.) A member of Palestinian Flora. *Palestine International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 7(1), 137-143.
- Jeong, S. M., Kim, S. Y., Kim, D. R., Jo, S. C., Nam, K. C., Ahn, D.U., Lee, S.C. (2004).** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from *Citrus* peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52, 3389-3393.
- Jeyasekaran, G. (2000).** A Report on Diagnostics in Fish Diseases. Geelong Australia: Australian Animal Health Laboratory Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. 42p.
- Joffin, J.N., Leyral G. (2001).** Microbiologie technique : 1 'Dictionnaire des techniques'. 3ème Edition, Bordeaux : CRDP d'Aquitaine, 320 p.
- Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S. (2010).** Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *J. Food Sci* 28, 206- 212.
- Juneja, V.K., Novak, J.S., Huang, L., Eblen, B.S. (2003).** Increased thermotolerance of *Clostridium perfringens* spores following sublethal heat shock. *Food Control* 14, 163-168.

-K-

- Kalam, S., Singh, R., Mani, A., Patel, J., Khan, F.N., Pandey, A. (2012).** Antioxidants: elixir of life. *International Multidisciplinary Research Journal* 2, 18–34.

- Kammoun Bejar, A., Ghanem, N., Mihoubi, D., Kechaou, N., Boudhrioua Mihoubi, N. (2011).** Effect of Infrared Drying on Drying Kinetics, Color, Total Phenols and Water and Oil Holding Capacities of Orange (*Citrus Sinensis*) Peel and Leaves. *Journal of Food Engineering* 7(5), 1-25.
- Kashid, S.G., Ghosh, J.S. (2010).** Production, isolation and characterization of exotoxin produced by *Bacillus cereus* NCIM-2156 and *Bacillus licheniformis* NCIM-5343, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 1, 50–55.
- Katsikogianni, M., Missirlis, Y.F., Harris, L., Douglas, J. (2004).** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur. Cell. Mater* 8, 37-57.
- Khalil zadeh Pouneh. (2009)** .Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse présenté à L'Université Paul Sabatier Toulouse III.
- Khan, S.A., Nawaz, M.S., Khan, A.A., Cerniglia, C.E. (2000).** Transfer of erythromycin resistance from poultry to human clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1832–1838.
- Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., Yankova, T. (2006).** Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from bulgarian herbs. *Phytotherapy Research* 20(11), 961- 965.
- Klausen, M., Gjermansen, M., Kreft, J.U., Tolker-Nielsen, T. (2006).** Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilm. *FEMS Microbiol. Lett* 261, 1-11.
- Kleman, A., Engel, J., Kutcher, B., Reichert, D. (1999).** Pharmaceutical Substances, Syntheses, Patents, Applications. AM, 4th ed., Thieme, New York, 1 380 p.
- Kone, W.M., Kamanzi Atindehou, K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traore, D., Dosso, M. (2004).** Traditional medicine in North Cote-d'Ivoire screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol* 93, 43-49.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., & Haapasalo, M. (2000).** Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect* 2, 189-198.
- Kramer, J.M., Gilbert, J.M. (1989).** *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Ch. 2. In: Doyle, M.P. (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 21-70.

Kuchma, S. L., Connolly, J. P., O'Toole, G. A. (2005). A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* 187, 1441-1454.

-L-

Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F., & Samuel, J.L. (2007). Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. Edition John Libbey Eurotext, Paris, p 317.

Lapidus, A. et al (2008). Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 171, 236-249.

Lapornik, B., Prošek, M., Wondra, A.G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71, 214-222.

Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2 (1), 63-76.

Le Minor, L., Veron, M. (1990). Bactériologie médicale «*Staphylococcus et Micrococcus*». J. Fleurette 2^{ème} édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773- 794.

Ledesma-Escobar, C.A., Luque de Castro, M.D. (2014). Towards a comprehensive exploitation of citrus. *Trends Food Science and Technology* 39, 63-75.

Lee, C. Y., Sharma, A., Cheong, J. E., Nelson, J. L. (2009). Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19, 6326-6330.

Lee, J.H. (2003). Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol* 69, 6489–6494.

Lemmich, J., Honger, T., Mortensen, K., Ipsen, J.H., Bauer, R., Mouritsen, O.G. (1996).

Lewis, A., et al. (2007). A nuclear envelope protein linking nuclear pore basket assembly, SUMO protease regulation and mRNA surveillance. *J cell BIO* 178 (5), 813-27.

Li, B. B., Smith, B., Hossain, Md. M. (2006). Extraction of phenolics from *Citrus* peels. I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology* 48, 182-188.

Li, J., et al. (2003). Protein profiling with cleavable isotope-coded affinity tag (cICAT) reagents: the yeast salinity stress response. *Mol Cell Proteomics* 2 (11), 1198-204

- Liaw, S.J., Lai, H.C., Ho, S.W., Luh, K.T., Wang, W.B. (2000).** Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Proteus mirabilis* by p-nitrophenylglycerol. *Journal of Medical Microbiology* 49, 725-731.
- Little, B., Jacobus, J. (1984).** A comparison of two techniques for the isolation of adsorbed dissolved organic material from seawater. *Org. Geochem* 5, 1-6.
- Liuk, L. et al. (2009).** Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng, *Food chemistry* 112, 35-
- Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F. (2006).** Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions *Journal of the science of food and Agriculture* 86, 477-485.
- Lock, M.A. (1993).** Attached microbial communities in rivers. In: *Aquatic Microbiology*, (Ed. T. E. Ford). Blackwell Scientific Publications, Cambridge. 113-138.
- Logan, N.A., Berkley, R.C.W. (1984).** Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen.Microbiol* 130, 1871-1882.
- Loussert, R. (1989).** Les agrumes : Arboriculture fruitière. 136 p.
- Lowy, F.D. (1998).** *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339(8), 520–532.
- Lund, T., De Buyser, M. L., Granum, P. E. (2000).** A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* 38, 254–261.
- Lund, T., Granum, P. E. (1999).** The 105-kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metallo- protease with gelatinolytic and collagenolytic activity. *FEMS Microbiol Lett* 178, 355–361.

-M-

- Ma, Y., Chen, J., Liu, D., Ye, X. (2009).** Simultaneous extraction of phenolic compounds of *Citrus* peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*.
- Macheix, J.J., Fleuriet, F., Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Polytechniques universitaires romandes. p 192.
- Magda, R.A., Awad, A.M., Selim, K.A. (2008).** Evaluation of mandarin and orange peels as natural sources of antioxidant in biscuits. *Journal of Food Science & Technology*. 75-82.

- Mah, T.F., O'Toole, G.A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *trends Microbiol* 9(1), 34-9.
- Mahmoudi, S., Khali, M., Mahmoudi N. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus L.*). *Journal of Nature and Technologie*.
- Marfak A. (2003).** Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools. 6-7-10p.
- Marjorie CM. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4), 564–582.
- McBride, R. S. (2001).** Landings, value, and fishing effort for halfbeaks, *Hemiramphus* spp., in the south Florida lampara net fishery. Proc. Gulf Caribb. Fish. Inst. 52nd Annu. Meet, Key West, Fla. 103-115.
- Mear, J.B., Gosset, P., Kipnis, E., Faure, E., Dessein, R., Jawhara, S. (2014).** *Candida albicans* air way exposure primes the lung innate immune response against *Pseudomonas aeruginosa* infection through innate lymphoid cell recruitment and interleukin-22-associated mucosal response. *Infect. Immun* 82, 306–315.
- Mei, S.H.J., Haitzma, J.J., Dos Santos, C.C. (2010).** Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis- *Am Thoracic Soc* 31, 219.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal plants and aromatic plant extract. *Food Chem* 85, 231-237.
- Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., Cohen, S.N. (2004).** SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* 305(5690), 1629-31.
- Miyake, Y., Yamamoto, K., Tsujihara, N., Osawa, T. (1998).** Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids*, 33:689p.
- Mizan, M. F. R., Jahid, I. K, Ha, S. D. 2015.** Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge. *Food Microbiology* 49, 41–55.
- Monica, C. (1991).** Medical Laboratory manual for Tropical countries. VOL 11. ELBS, 60–63.
- Morton, J. F. 1987.** Pawpaw. In: Fruits of warm climates. *Miami, FL*. p. 336–346.

-N-

- Nagant, C., Pitts, B., Stewart, P.S., Feng, Y., Savage, P.B., Dehaye1, J.P. (2013).** Study of the effect of antimicrobial peptide mimic, CSA-13, on an established biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *MicrobiologyOpen* 2(2), 318–325.
- Naidu, K. A. (2003).** Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An Overview. *Nutrition Journal* 2 (7), 1-10.
- Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Vos, F., Crespy, V., Du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., Scalbert, A., 2010.** Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*. 1-9.
- Nkhili, Ez.Z. (2009).** Polyphénols de l'Alimentation: Extraction, Interactions avec les ions du fer et du cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat : Université de Cadi Ayyad – Marrakech.

-O-

- O'Toole, G. A., Kolter, R. (1998).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol* 30, 295-304.
- Oboh, G., Alimiluyi, A.O., Akidahansi, A.A. (2009).** Changes in polyphenols and antioxidant activity during fermentation of some under-utilized legumes. *Food science and Technology. Interdium Vol 15 Issue 1*, 41-46.
- Oh, M.H. (2006).** Ecology of Toxigenic Bacillus Species in Rice Products, University of New South Wales School of Chemical Engineering and Industrial Chemistry. *International Journal of Food Science & Technology. Sydney*.
- Olson, B. G., Prodpran, T., Jamieson, A. M and Nazarenko, S. (2002).** Positron annihilation in syndiotactic polystyrene containing α and β crystalline forms, *Polymer* 43, 6775- 6784.
- Omay, C., Tufenkji, N. (2011).** The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Applied and environmental microbiology* 77(a), 3061- 3067.
- O'Neil, J.I., Grim, J., Strack P., Rao, S., Tibbitts, D., Winter, C., Hardwick, J., Welcker, M., Meijerink, J.P., Pieters, R., Draetta G., Sears R., Clurman B.E., Look A.T. 2007.** FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *Exp Med* 204(8), 1813-24.
- Oreopoulou, V., Tzia, C. (2007).** In Utilization of By-products and Treatment of Waste in the Food, chapitre 11: Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants and colorants. *Springer, USA*: 209-232.

Ozturk, M. et al. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant, *Food Chemistry* 106, 1264-1270.

-P-

Packer, L., Kraemer, K., Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17(10), 888-895.

Padrini, F., Lucheroni, M.T. (1996). L gran libro de los aceites esenciales. *Encuadernación: Tapa blanda.* 208p

Palmer, C.I., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., Brown, P.O. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *S Biol* 5(7), e177

Paloma, F. (2012). Les plantes de la famille des Apiacees dans les troubles digestifs. Sciences pharmaceutiques. 606p.

Papazian, L., Roch, A. (2008). Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, *Edition Springer.* p 153.

Parsek, M.R., Greenberg, E.P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8789-8793.

Peeters, P., Gössling, S., Lane, B. (2008). Moving towards low-carbon tourism. IN Gössling, S., Hall, C. M., & Weaver, D. (Eds.) *Sustainable Tourism Futures Perspectives on Systems, Restructuring and Innovations.* 240-57. Routledge.

Penchev, P. I. (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat : université de Toulouse.

Pénicaud, C. (2009). Etude et modélisation du couplage entre le transfert d'oxygène et les réactions d'oxydation dans les aliments au cours de leur conservation. Thèse de Doctorat : Université de MONTPELLIER II.

Pesavanto, G., Ducci, B., Comodo, N., Nostro, L.O. (2007). A antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Food. Control* 18, 196-200.

Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P., McCullough, M. L. (2010). Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr. Rev* 68(10), 571-603.

- Pincemail, J., Degruene, F., Voussure, S., Malherbe, C., Paquot, N., Defraigne, J.O. (2007).** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme* 21, 66-75.
- Piquemal, J.P., Pilmé, J., Parisel, O., Gérard, H., Fourré, I., Bergès, J., Gourlaouen, C., de la Lande, A., Severen, M.C., Silvi, B. (2008).** What can be learnt on biological or biomimetic systems with the topological analysis of the electron localization function? *Int J Quant Chem* 108, 1951–1969.
- Piquet, M.A., Hébuterne, X. (2007).** Nutrition en pathologie digestive. *Edition Wolters Kluwer France*. p 93.
- Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des Composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel* (4), 8p.
- Poulose B.K., Scholz S., Moore D.E., Schmidt C.R., Grogan E.L., Lao O.B., Nanney L., Davidson J., Holzman M.D. (2005).** Physiologic properties of small intestine submucosa. *J Surg Res* 123(2), 262-7.
- Praloran, J.C. (1971).** Les agrumes, techniques agricoles et production tropicales. Ed Maisonneuve et Larox, Paris, 665p.
- Pratt, L. A., and Kolter, R., (1998).** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol* 30, 285-293.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., Lejeune, P. (1999).** Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181(19), 5993-6002.
- Prithiviraj, B., Weir, T., Bais, H.P., Schweizer, H.P., Vivanco, J.M. (2005).** Plant models for animal pathogenesis. *Cell Microbiol* 7:315–324.
- Pruss, B.M, Dietrich R, Nibler B, Martlbauer E, Scherer S. (1999).** The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5436–5442.

-R-

- Ramful, D., Bahorunb, T., Bourdonc, E., Tarnusc, E., Aruoma, O.I. (2010).** Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology* 278, 75-87.

- Rasko, D.A., Altherr, M.R., Han, C.S., Ravel, J. (2005).** Genomic of *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 303-329.
- Rebiahi, S.A., Abdelouahid, D.E., Rahmoun, M., Abdelali, S., Azzaoui, H. (2011).** Emergence of Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in the Tlemcen university hospital (North West Algeria). *Medicine et maladies infectieuses* 41, 646-665.
- Regev-shoshani, G., Ko, M., Miller, C., Av-Gay, Y. (2010).** Slow release of nitric oxide from charged catheters and its effect on biofilm formation by *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 273-279.
- Robert, D., & Catesson, A. M. (2000).** Biologie végétale : caractéristiques et stratégie évolutives des plantes. Organisation végétative. *Wolters Kluwer France Edition* 2, 320p.
- Rødtjer, A., Skibsted, L.H., Andersen, M.L. (2006).** Antioxidative and prooxidative effect of extracts made from cherry liqueur pomace. *Food Chemistry* 99, 6-14.
- Rojas, C.M., Van Grieken, R.E. (1992).** Electron-Microprobe Characterization of Individual Aerosol-Particles Collected by Aircraft above the Southern Bight of the North-Sea. *Atmospheric Environment Part a-General Topics* 26, 1231-1237.
- Ross, K.A, Beta, T., Arntfield S.D. (2009).** A comparative study on the phenolic acid identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry* 113, 336–344.
- Roux, D., Catier, O. (2007).** Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. *Wolters Kluwer France Edition*. 74p.

-S-

- Sadasivam, S., Thayumanavan, B. (2003).** Molecular host plant resistance to pests. Volume 96 de Books in soils, plants and the environment. *CRC Press*. p221.
- Sahreen, S., Khan, M.R., Khan, R.A. (2010).** Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem* 122, 1205-1211.
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R., Devlieghere, F. (2011).** Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *International Journal of Food Microbiology* 150, 34-41.
- Samuel, S., Papayiannis, L. C., Leroy, M., Veloukas, T., Hahn, M., and Karaoglanidis, G. S. (2011).** Evaluation of the incidence of the G143A mutation and cytb intron

- presence in the cytochrome bc-1 gene conferring QoI resistance in *Botrytis cinerea* populations from several hosts. *Pest. Manag. Sci* 67, 1029–1036.
- Sauer, K., Camper, A.K., Eherlich, G.D., Costerton, J.W., Davies D.G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol* 184, 1140-1154.
- Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L.A.H., Davies, D.G., Gilbert P. (2004).** Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol* 186, 7312-7326.
- Saxena, M.S., Bajaj, D., Kujur, A., Das, S., Badoni, S. (2014).** Natural Allelic Diversity, Genetic Structure and Linkage Disequilibrium Pattern in Wild Chickpea. *PLoS ONE* 9(9), e107484.
- Schmidt, D.R., Sobota, A.E. (1988).** An examination of the antiadherence activity of cranberry juice on urinary and non-urinary bacterial isolates. *Microbios* 55, 173-81.
- Schoeni, J.L., Wong, A.C. (2005).** *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J Food Prot* 68, 636-648.
- Segev-Zarko, L., Saar-Dover, R., Brumfeld, V., Mangoni, M.L., Shai, Y. (2015).** Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides. *Biochemical Journal* 468, 259-270.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H. (2007).** The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J. Food Microbiology* 117, 112-119.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. (1992).** Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 945-948.
- Shinagawa, K. (1990).** Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Int. J. Food Microbiol* 10, 125-141.
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Kumar, P. (2010).** Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, Dlimonene. *Food Chemical Toxicology* 48, 1734-1740.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158.

- Sittig, M. (1988).** Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia. Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens. Noyes Publications. 2nd ed., 707 p.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simoncic M, Knez Z. (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 89, 191–198.
- Soriano, J.M., Font, G., Molto, J.C., Males, J. (2002).** Enterotoxigenic Staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Trends Food Sci. Technol* 13, 60-67.
- Sourek, J. (1979).** Findings of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains in scarlet fever. Zentralblatt für Bakteriologie. *Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene (Abteilung I, Originale A)* 242, 7-11.
- Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M., Rainey, P.B. (2003).** Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol. Microbiol.* 50, 15-27.
- Srey, S., Jahid, I.K., Ha S.D. (2013).** Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food control.* 31, 572-585.
- Stanley, N.R., Lazazzera, B.A., Britton, R.A., Grossman A.D. (2003).** Identification of phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46, 6, 2123-2129.
- Stenfors, A.L.P, Fagerlund, A., Granum, P.E. (2008).** From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 579-606.
- Steward P.S., Costerton, J.W. (2001).** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The lancet* 358, 135-138.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N., & Ames, B. N. (1987).** Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235 (4792), 1043-1046.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W. (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56, 187–209.
- Su, M.S. et al. (2008).** Antioxydant activities of vtrus herbai product extracts, *Food Chemistry*, 111, 892-896.
- Suci, P.A., Mittelman, M.W., Yu, F.P., Geesey, G.G. (1994).** Investigation of ciprofloxacin Infections. *Science* 284, 1318-1322.
- Suhaj, M. (2006).** Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J. Food Comp. Anal* 19, 531-537.

- Sultana, B., Anwar, F., Asi M. R., Chatha, S.A.S. (2008).** Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil. *Grasas Y Acetias* 59, 205-217.
- Sun, B., Ribes, A. M., Leandro, M. C., Belchior, A. P., Spranger, M. I. (2006).** Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta* 563, 382–390.
- Sutherland, I.W. (2001).** The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother* 38, 165-187.
- Sutra, L., Poutrel, B. (1994).** Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol* 40, 79-89.
- Swingle, W.T., Reece, P.C. (1967).** The botany of *Citrus* and its wild relative. In: *The Citrus industry*. University of California, (Eds.): W. Reuther, H.J. Webber and D.L. Batcchelor. Berkeley, pp. 190-430.
- Szabo, R.A, Todd, E.C.D, Rayman, M.K. (1984).** Twenty-four hour isolation and confirmation of *Bacillus cereus* in foods. *Journal of Food Protection* 47, 856–860.

-T-

- Tadhani, M.B., Patel, V.H., Subhash, R. (2007).** In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J. Food Composit. Anal* 20, 323-329.
- Tanaka, K., Takahashi, Y. (1961).** Chromatographic analysis of plasma fatty acid composition in arteriosclerotic patients. *Japanese Journal of Medical Science & BiologyNov* 50, 790-815.
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., Kakde, R. B. (2008).** Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3), 1089-1099.
- Teh, K.H., Flint, S., Palmer, J., Andrewes, P., Bremer, P., Lindsay, D. 2014.** Biofilm an unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? *International Dairy Journal* 34, 32–40.
- Tekwu, E.M., Pieme, A.C., Beng, V.P. (2012).** Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of ethnopharmacology* 142, 265-273.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A. 2006.** Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem* 95, 200-204.
- Teplitzki, M., Robinson, J.B., Bauer, W.D. (2000).** Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-

dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 13, 637-648.

Teresa Fera, M., Carbone, M., De Sarro, A., Blandino, G., Riggio, G., Cusumano, V., Battista De Sarro, G., Anzani Ciliberti, F. (1998). Bactericidal activity of lansoprazole and three macrolides against *Helicobacter pylori* strains tested by the time-kill kinetic method. *Int. J. Antimi. Ag* 10, 285–289.

Ternstrom, A., Molin, G. (1987). Incidence of potential pathogens on raw pork, beef and chicken in Sweden, with special reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J. Food Prot* 50, 141-146.

Thar, R., Kuhl, M. (2005). Complex pattern formation of marine gradient bacteria explained by a simple computer model. *FEMS Microbiology Letters* 246, 75–79.

Tian, Q., Miller, E.G., Ahmad, H., Tang, L., Patil, B. S. (2001). Differential inhibition of human cancer cell proliferation by *Citrus* limonoids. *Nutrition and Cancer* 40,180-184.

Tim, C.T.P., Andrew, J. L. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Ag* 26, 343–356.

Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G. (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules* 12, 484-496.

Turrens, J. F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports* 17(1), 3-8.

-U-

Umar, A.S, Yerima, M.B, Uzal, U. (2006). Antimicrobial sensitivities of *Bacillus cereus* isolated from food samples sold in Bauchi metropolis to selected antibiotics. *Nigerian Journal of Microbiology* 20(1), 655-661.

-V-

Valgas, C., Souza, S.M.D, Smânia, E.F.A, Smânia, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology* 38, 369–380.

Van Houdt, R., Michiels, C. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol* 156, 626-633.

- Vanderzant, C., Splittstoesser D.F. (1992).** Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. Washington DC, American Public Health Association.
- Vassiliki et al., 2009Vassiliki, T.,Papoti, M.,Tsimidou, Z. (2009).** Looking through the qualities of a fluorimetric assay for the total phenol content estimation in virgin olive oil, olive fruit or leaf polar extract. *Food Chemistry 112*, 246–252.
- Vermerris, W., Nicholson, R. (2006).** Phenolic compounds biochemistry; Ed. Springer, pp 1-58, fruits, *Lavoisier*, Paris, 302-304.
- Villano, D., Fernandez-Pachon, M.S., Moya, M.L., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C. (2007).** “Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical”. *Talanta 71*, p: 230–235.
- Vincent, F., Saleh, M., Prévost, G. (2008).** Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires 407*, 61-69.
- Viot, M., Tomao, V., Ginies, G., Visinoni, F., Chemat, F. (2008).** Green procedure with a green solvent for fats and oils“ determination Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *Journal of Chromatography A 1196*, 147-152.
- Visioli, F., Borsani, L., Galli, C. (2000).** Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research 47*, 419-425.
- Vlkova, H., Babak, V., Seydlova, R., Pavlik, I., Schlegelova J. (2008).** Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and effectiveness on biofilms – a review. *Czech j. food.sci 26*, (5): 309-323.
- Von Gadow, A., Joubert E., Hansmann, C.F. (1997).** Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathuslinearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry 60*, 73–77.
- Von Holt, V.H.M., Bohm, H. (1976).** Metabolic effects of methylene-cyclopropaneacetic acid, a metabolite of hypoglicin. *Biochimica and Biophysica Acta 125(1)*: 1.

-W-

- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. (2011).** High Performance Liquid .Characklis, W.G., Marshall, K.C. (1990). Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y Chromatography in Phytochemical science. *Chromatographic Science Serie. 477-478.*

Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K. (2004). Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC, *Food Chem* 87, 307-311.

Wang, M., Rangarajan, J. Li., Shao, M. Y., La Voie, E. J., Huang, T.C., Ho, C.T. (1998). Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*), *J. Agric. Food Chem* 46, 4869 – 4873.

Wang, X. & Quinn, P. J. (2006). The structure and phase behaviour of α -tocopherol-rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine. *Biochimie* 88, 1883-1888.

Wang, X., Chen, Q., Lu, X. (2014). Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids* 38, 129-137.

-X-

Xia, G., Kohler, T., Peschel, A. (2010). The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology* 300, 148–154.

-Y-

Yanagida, A., Kanda, T., Tanabe, M., Matsudaira, F., Oliveira, C.J.G. (2000). Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11), 5666-5671.

Yarwood, J.M.1., Bartels, D.J., Volper, E.M., 2004. Greenberg EP Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Bacteriol. Mar* 186(6), 1838-50.

Yeoh, S., Shi J., Langrish, T.A.G. (2008). Comparisons between different techniques for waterbased extraction of pectin from orange peels. *Desalination* 218, 229-237. Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. 670–679p.

-Z-

Zeghad, N. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne Mémoire de Magister Université de Constantine. p 17-19,41-69.

- Zhang, G., Hu, M., He, L., Fu, P., Wang, L., Zhou, J. (2013).** Optimisation of microwave assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanuts shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities in vitro. *Food and bioproducts processing* 91, 158-168.
- Zhao, M., Yang, B., Wang, J., Li, B., Jiang, Y. (2006).** Identification of the major flavonoids from pericarp tissues of lychee fruit in relation to their antioxidative activities. 539.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (2007).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64, 555-559. In: **Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2007).** Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycoxidation, *Food and Chemical Toxicology* 45, 2402-2411.
- Zhou, K, Yu, L. (2004).** Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebensmittel-Wissenschaftund-Technologie* 37, 717–721.
- Zhu, H., Pan, S., Gu, S., Bradbury, E.M., Chen, X. (2002).** Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16 (22), 2115-23.
- Zovko Cončić, M., Kremer, D., Karlović, K., Kosalec, I. (2010).** Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem Toxicol* 48, 2176 -2180.



Annexes

Annexe I : Composition des milieux de culture

Composition de Gélose Nutritive GN (1L)

Peptone	10 g
Extrait de levure	3 g
Extrait de viande	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
pH = 7	

Composition de bouillon nutritif BN (1L)

Peptone	10 g
Extrait de levure	3 g
NaCl.....	5 g
pH = 7	

Composition de Gélose Mueller-Hinton MH (1L)

Infusion de viande de bœuf.....	300 ml
Peptone de caséine.....	17,5 g
Amidon de maïs.....	1,5 g
Agar.....	17,0 g
pH = 7,4	

Composition de Gélose Baird Parker (1L)

Peptone pancréatique de caséine.....	10 g
Extrait de levure.....	1 g
Extrait de viande	5 g
Pyruvate de sodium.....	10 g
Chlorure de lithium.....	5 g
Glycine.....	12 g
Gélose.....	20 g
Tellurite de potassium.....	5 ml

Emulsion de jaune d'œuf

15 ml jaune d'œuf dans 100 ml solution ranger ou eau distillée.

Composition de Gélose Mannitol Egg Yolk Polymyxine B MYP (1L)

Tryptone.....	10 g
Mannitol.....	10 g
Extrait de viande.....	1 g
NaCl.....	10 g
Rouge de phénol.....	25 mg
Emulsion de jaune d'œuf.....	100 ml
pH=7,2	

Composition de Gélose Lauria Bertani LB (1L)

Peptone.....	10 g
Extrait de levure.....	5 g
NaCl.....	10 g
Agar.....	20 g
pH= 7,2	

Composition de Gélose Chapman (1L)

Tryptone.....	5 g
Peptone pepsique de viande.....	5 g
Extrait de viande.....	10 g
NaCl.....	75 g
Rouge de phénol.....	25 mg
Agar.....	20 g
pH=7,2	

Annexe II : Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

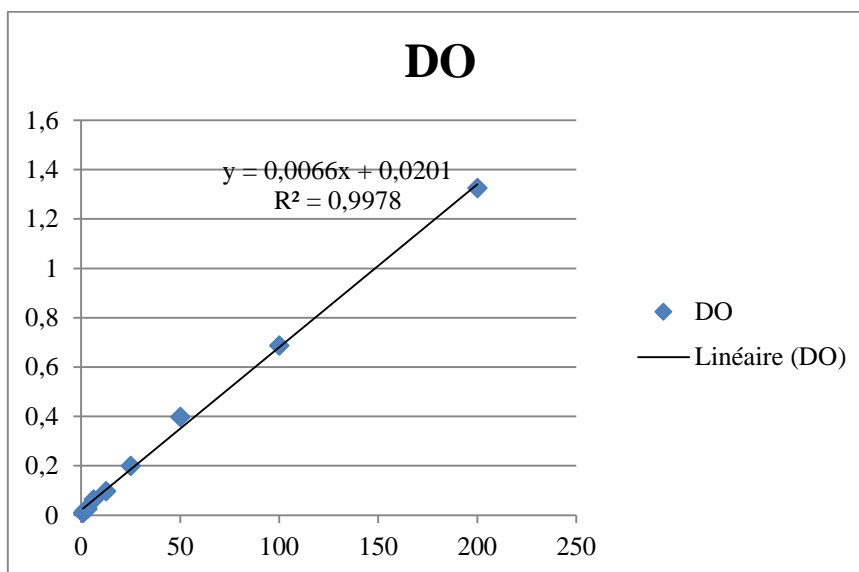
1. Dosage des polyphénols

Préparation de 20ml de 7,5 % de NaCO₃

7,5 g NaCO₃ —————> 100ml (eau distillée)

X' g —————> 20 ml

$X' = 20 \cdot 7,5 / 100$ —————> $X = 1,5$ g



La courbe étalon de l'acide gallique

2 . Dosage des flavonoïdes

Préparation de 20ml de Nitrate de sodium (NaNO₃)

0,5g NaNO₃ —————> 100ml (eau.d)

X'' g —————> 20 ml

$X'' = 20 \cdot 0,5 / 100$ —————> $X'' = 0,1$ g

Préparation de 20ml de 10% AlCl₃

0,5g AlCl₃ —————> 100ml (eau.d)

Y g —————> 20 ml

$Y = 20 \cdot 10 / 100$ —————> $Y = 2$ g

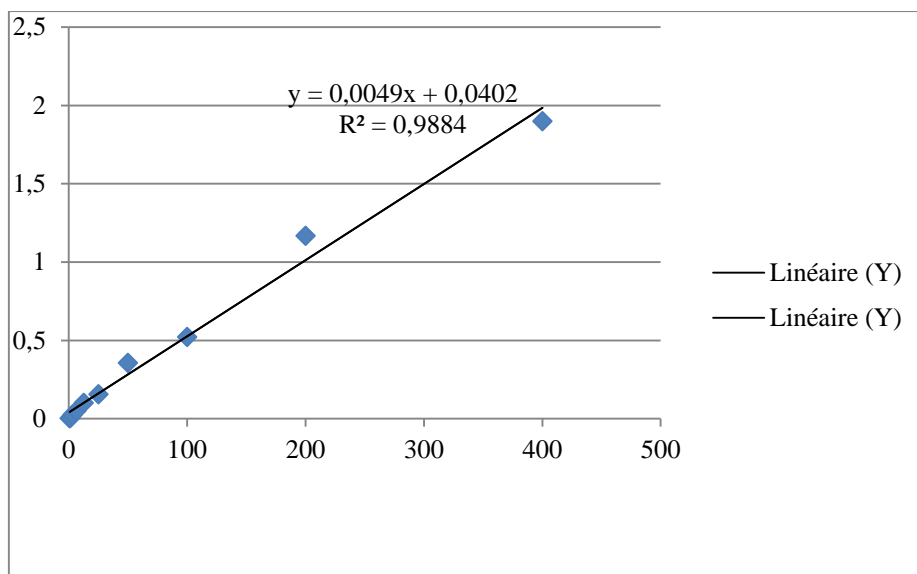
Préparation de 20ml d'une mole d'Hydroxyde de sodium (NaOH)

On a: $M_{\text{NaOH}} = 40 \text{ g/mol}$

→ 40 g NaOH → 1 mol (100 ml)

Y' g → 20 ml

$Y' = 20 \cdot 10 / 100 \rightarrow Y = 2 \text{ g}$



La courbe étalon de la quercetine

Annexe III : L'ensemble des résultats du pouvoir antioxydant des trois méthodes

Test de l'effet antioxydant :

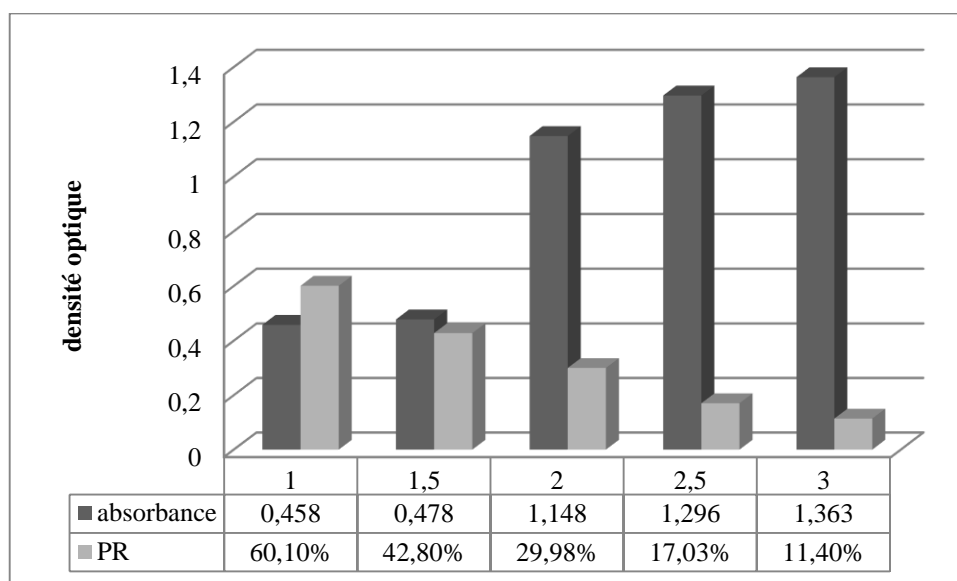
I. Test DPPH :

Préparation de 1Mm de DPPH

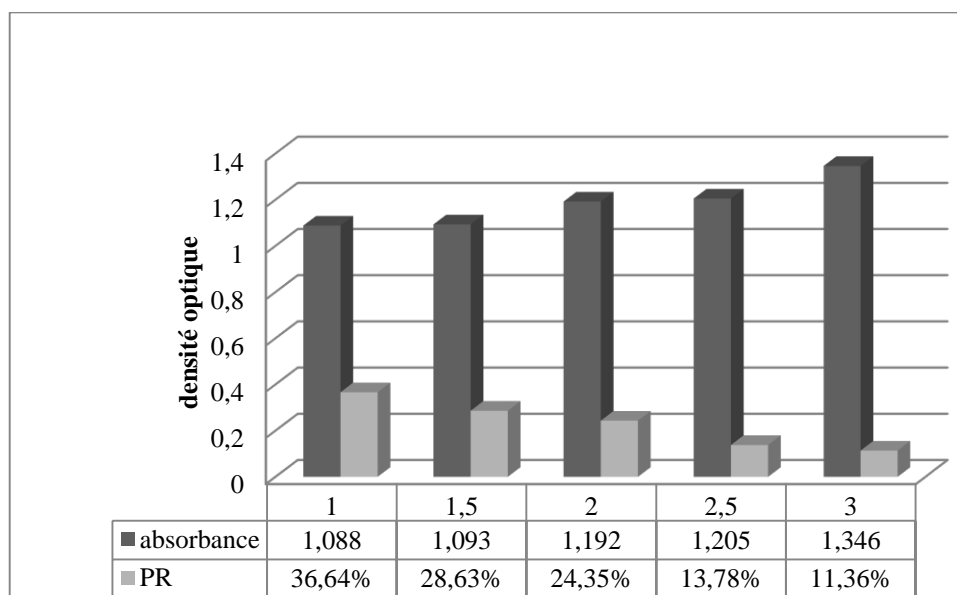
0,04 —————> 100 ml

X —————> 10 ml

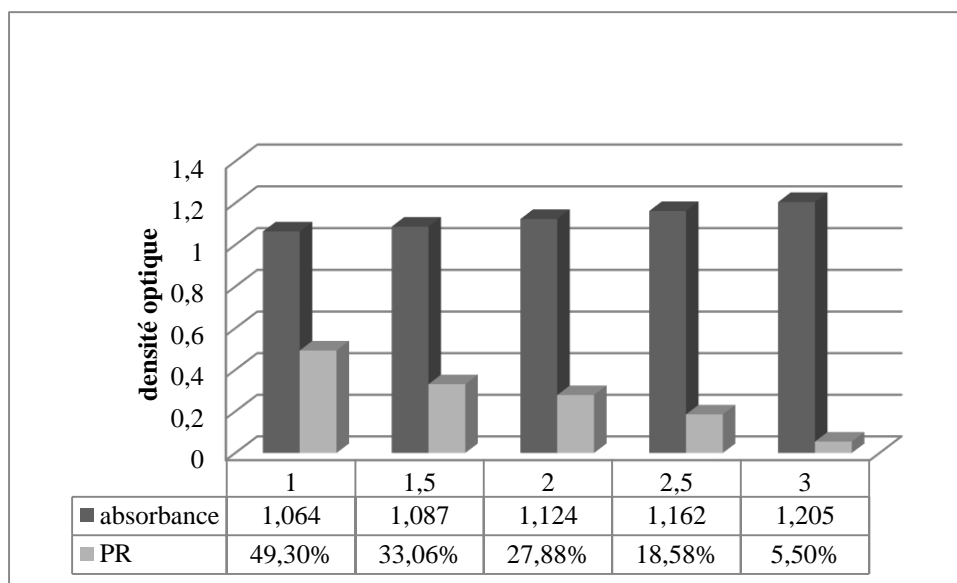
$X = 10 * 0,04 / 100 \longrightarrow X = 0,004 \text{ g}$



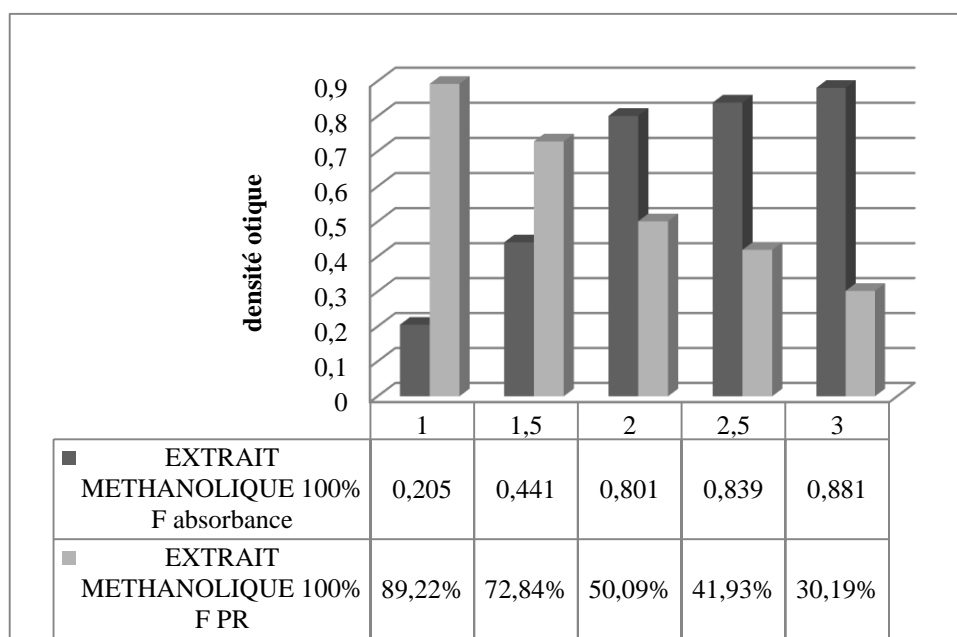
La DO de piégeage et le pourcentage de réduction du radical libre DPPH de l'extrait éthanolique d'*Ammi visnaga*



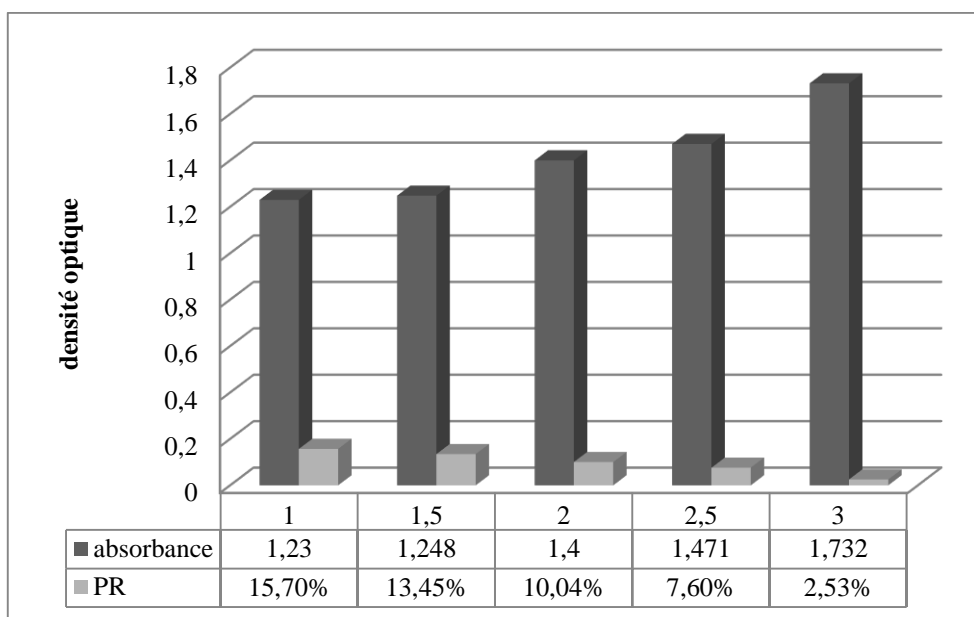
La DO de piégeage et le pourcentage de réduction du radical libre DPPH de l'extrait méthanolique à 70% d'*Ammi visnaga*



La DO de piégeage et le pourcentage de réduction du radical libre DPPH de l'extrait acétonique d'*Ammi visnaga*



La DO de piégeage et le pourcentage de réduction du radical libre DPPH de l'extrait méthanolique 100% d'*Ammi visnaga*



La DO de piégeage et le pourcentage de réduction du radical libre DPPH de l'extrait aqueux d'*Ammi visnaga*

II. Test FRAP :

Préparation de 50 ml de $K_3 [Fe(CN)_6]$ a 1%

1 g $K_3 [Fe (CN)_6]$ \longrightarrow 100 ml (eau distillée)

Y'' g \longrightarrow 50 ml

$Y'' = 50 * 1 / 100 \longrightarrow X'' = 0,5$ g

Préparation de 20ml de Nitrate de sodium ($NaNO_3$)

10 g TCA \longrightarrow 100 ml (eau distillée)

Z g \longrightarrow 10 ml

$Z = 10 * 10 / 100 \longrightarrow Z = 1$ g

III. Test de blanchissement du β carotène

1. Ammi visnaga

490nm	0min	20min	40min	60min	80min	100min	120min
ACN70%	0,456	0,403	0,367	0,321	0,287	0,232	0,157
ETH70%	0,543	0,531	0,522	0,512	0,498	0,488	0,478
MeOH70%	0,645	0,632	0,621	0,612	0,601	0,593	0,589
MeOH100%	0,522	0,512	0,421	0,401	0,376	0,350	0,323
Aqueux	0,412	0,401	0,350	0,323	0,280	0,264	0,223
VIT C	0,956	0,932	0,913	0,904	0,866	0,848	0,814

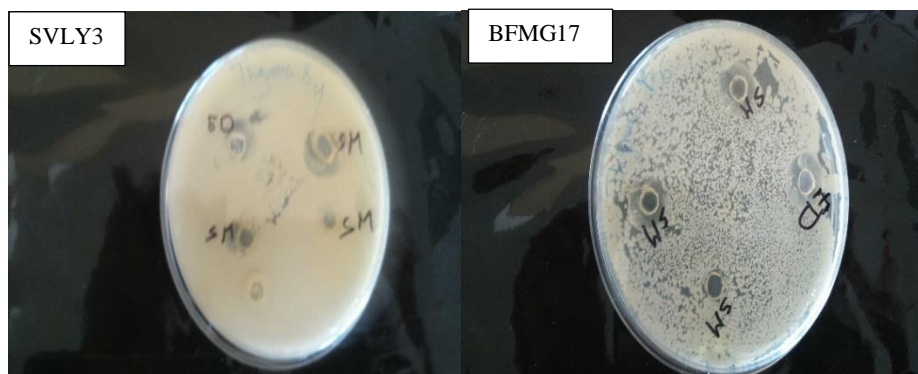
2. Citrus limon

490nm	0min	20min	40min	60min	80min	100min	120min
20%	0,356	0,303	0,243	0,221	0,207	0,187	0,147
50%	0,567	0,523	0,501	0,465	0,377	0,322	0,298
70%	0,564	0,545	0,533	0,512	0,501	0,477	0,455
1g	0,365	0,323	0,301	0,277	0,245	0,223	0,212
1,5g	0,465	0,443	0,423	0,411	0,375	0,358	0,332
2g	0,528	0,515	0,510	0,502	0,487	0,577	0,565
2,5g	0,675	0,668	0,647	0,632	0,612	0,604	0,585
VIT C	0,956	0,932	0,913	0,904	0,866	0,848	0,814

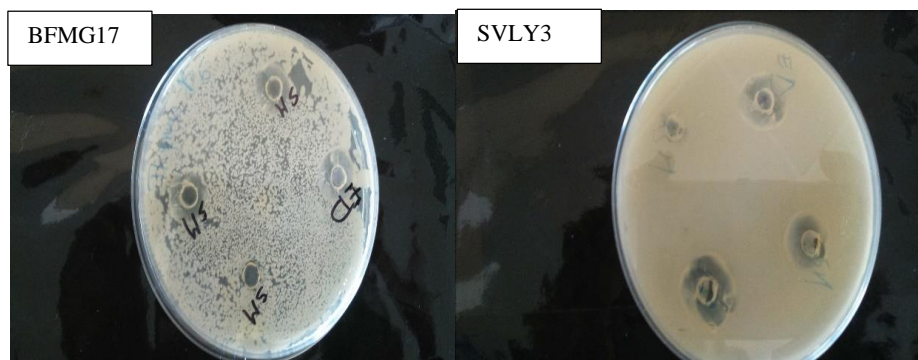
3. Citrus sinensis

490nm	0min	20min	40min	60min	80min	100min	120min
20%	0,416	0,387	0,347	0,311	0,267	0,212	0,137
50%	0,456	0,423	0,402	0,377	0,343	0,312	0,265
70%	0,597	0,573	0,551	0,535	0,477	0,422	0,398
1g	0,343	0,303	0,276	0,254	0,214	0,201	0,176
1,5g	0,488	0,467	0,423	0,402	0,343	0,323	0,302
2g	0,543	0,531	0,512	0,502	0,467	0,442	0,412
2,5g	0,687	0,656	0,612	0,567	0,533	0,513	0,445
VIT C	0,956	0,932	0,913	0,904	0,866	0,848	0,814

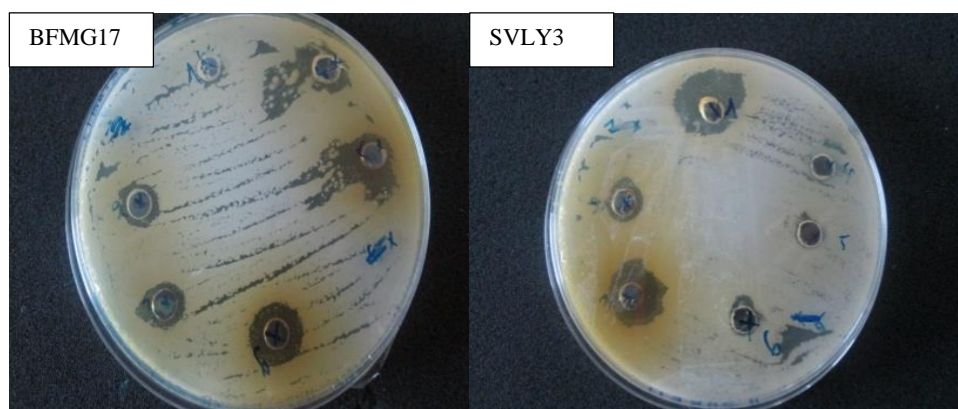
Annexe IV : Test de l'activité antibactérienne



Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *C. limon*



Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *C. sinensis*



Effet antibactérien de l'extrait méthanolique d'*Ammi visnaga*

Annexe V : inhibition de la croissance des biofilms bactériens par les enzymes

Evaluation de l'influence des enzymes sur la croissance bactérienne de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* :

Tableau 1: Inhibition de la formation du biofilm de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* par l'enzyme protéinase K

	Cont	25 µL	50 µL	100 µL	150 µL	200 µL
BFMG17	0,775±0,01	0,832±0,01	0,956±0,01	1,092±0,01	1,261±0,01	1,384±0,01
BLP2	1,876±0,01	1,604±0,01	1,182±0,01	1,132±0,01	0,997±0,01	0,922±0,01
BPTS1	1,232±0,01	1,096±0,01	0,987±0,01	0,876±0,01	0,704±0,01	0,455±0,01
BRIS3	1,431±0,01	1,222±0,01	1,098±0,01	0,904±0,01	0,765±0,01	0,432±0,01
BCSV1	1,321±0,01	1,112±0,01	0,987±0,01	0,762±0,06	0,543±0,01	0,324±0,01
SVLY3	0,112±0,01	0,243±0,01	0,653±0,01	0,917±0,01	0,981±0,01	1,054±0,01
SPTS2R	1,402±0,02	1,36±0,04	1,297±0,01	1,236±0,01	0,932±0,05	0,624±0,01
SFMG5BP	1,238±0,01	1,111±0,01	1,098±0,01	0,987±0,01	0,876±0,01	0,765±0,01
SLGM1	1,432±0,01	1,321±0,01	1,109±0,01	0,987±0,01	0,716±0,01	0,504±0,01
SSEM4	1,523±0,01	1,412±0,01	1,111±0,01	0,987±0,01	0,876±0,01	0,712±0,01

Tableau 2: pH d'enzyme proteinase k

	Cont	25 µL	50 µL	100 µL	150 µL	200 µL
BFMG17	8,03±0,06	7,337±0,06	7,4±0,06	7,413±0,06	7,46±0,01	7,503±0,06
BLP2	8,03±0,06	7,37±0,06	7,23±0,06	7,23±0,12	7,24±0,09	6,96±0,01
BPTS1	8,047±0,06	7,583±0,05	7,473±0,06	7,41±0,01	7,323±0,02	7,22±0,01
BRIS3	8,003±0,06	7,767±0,05	7,333±0,05	7±0,06	6,867±0,05	5,867±0,05
BCSV1	8,033±0,02	7,867±0,05	7,567±0,05	7,033±0,05	6,833±0,05	6,267±0,05
SVLY3	8,1±0,1	7,123±0,02	7,2±0,02	7,23±0,07	7,373±0,05	7,563±0,02
SPTS2R	8,033±0,08	7,563±0,05	7,443±0,01	7,4±0,06	7,363±0,01	7,07±0,02
SFMG5BP	8,033±0,05	7,59±0,05	7,523±0,01	7,453±0,01	7,38±0,05	7,307±0,06
SLGM1	8,033±0,05	7,59±0,05	7,523±0,01	7,453±0,01	7,38±0,058	7,307±0,06
SSEM4	8,1±0,1	7,767±0,05	7,367±0,05	7,033±0,05	6,833±0,05	6,467±0,05

Tableau 3: Inhibition de la formation du biofilm de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* par l'enzyme trypsine

	Cont	25 µL	50 µL	100 µL	150 µL	200 µL
BFMG17	0,875±0,01	0,973±0,01	1,074±0,02	1,274±0,01	1,418±0,01	1,577±0,01
BLP2	0,706±0,01	0,598±0,01	0,536±0,01	0,526±0,07	0,369±0,09	0,302±0,01
BPTS1	0,987±0,01	0,815±0,01	0,784±0,02	0,667±0,04	0,515±0,03	0,471±0,03
BRIS3	1,112±0,01	1,098±0,01	0,973±0,05	0,807±0,01	0,691±0,06	0,498±0,01
BCSV1	1,243±0,01	1,112±0,01	1,098±0,01	0,976±0,01	0,711±0,01	0,503±0,01
SVLY3	1,232±0,02	1,078±0,01	1,277±0,02	1,349±0,03	1,448±0,03	1,522±0,01
SPTS2R	0,987±0,01	0,606±0,01	0,543±0,01	0,503±0,02	0,443±0,01	0,415±0,02
SFMG5BP	1,111±0,01	0,923±0,02	0,903±0,02	0,87±0,03	0,785±0,02	0,625±0,01
SLGM1	1,432±0,01	1,312±0,01	1,202±0,01	1,098±0,01	0,876±0,01	0,565±0,01
SSEM4	1,103±0,01	0,987±0,01	0,855±0,01	0,712±0,01	0,644±0,01	0,511±0,01

Tableau 4: pH enzyme trypsine

	Cont	25 µL	50 µL	100 µL	150 µL	200 µL
BFMG17	8,03±0,05	7,337±0,06	7,4±0,05	7,413±0,06	7,46±0,1	7,503±0,06
BLP2	8,003±0,06	7,317±0,06	7,273±0,06	7,223±0,01	7,243±0,09	6,96±0,01
BPTS1	8,047±0,06	7,583±0,06	7,473±0,06	7,41±0,01	7,323±0,02	7,22±0,01
BRIS3	8,003±0,06	7,767±0,05	7,333±0,05	7±0,05	6,867±0,05	5,867±0,05
BCSV1	8,033±0,02	7,867±0,05	7,567±0,05	7,033±0,05	6,833±0,05	6,267±0,05
SVLY3	8,1±0,1	7,123±0,02	7,2±0,02	7,23±0,07	7,373±0,05	7,563±0,02
SPTS2R	8,033±0,05	7,563±0,06	7,443±0,02	7,4±0,05	7,363±0,01	7,07±0,02
SFMG5BP	8,033±0,05	7,59±0,05	7,523±0,01	7,453±0,02	7,38±0,01	7,307±0,06
SLGM1	8,033±0,05	7,59±0,05	7,523±0,01	7,453±0,02	7,38±0,01	7,307±0,06
SSEM4	8,1±0,1	7,767±0,05	7,367±0,05	7,033±0,05	6,833±0,05	6,467±0,05

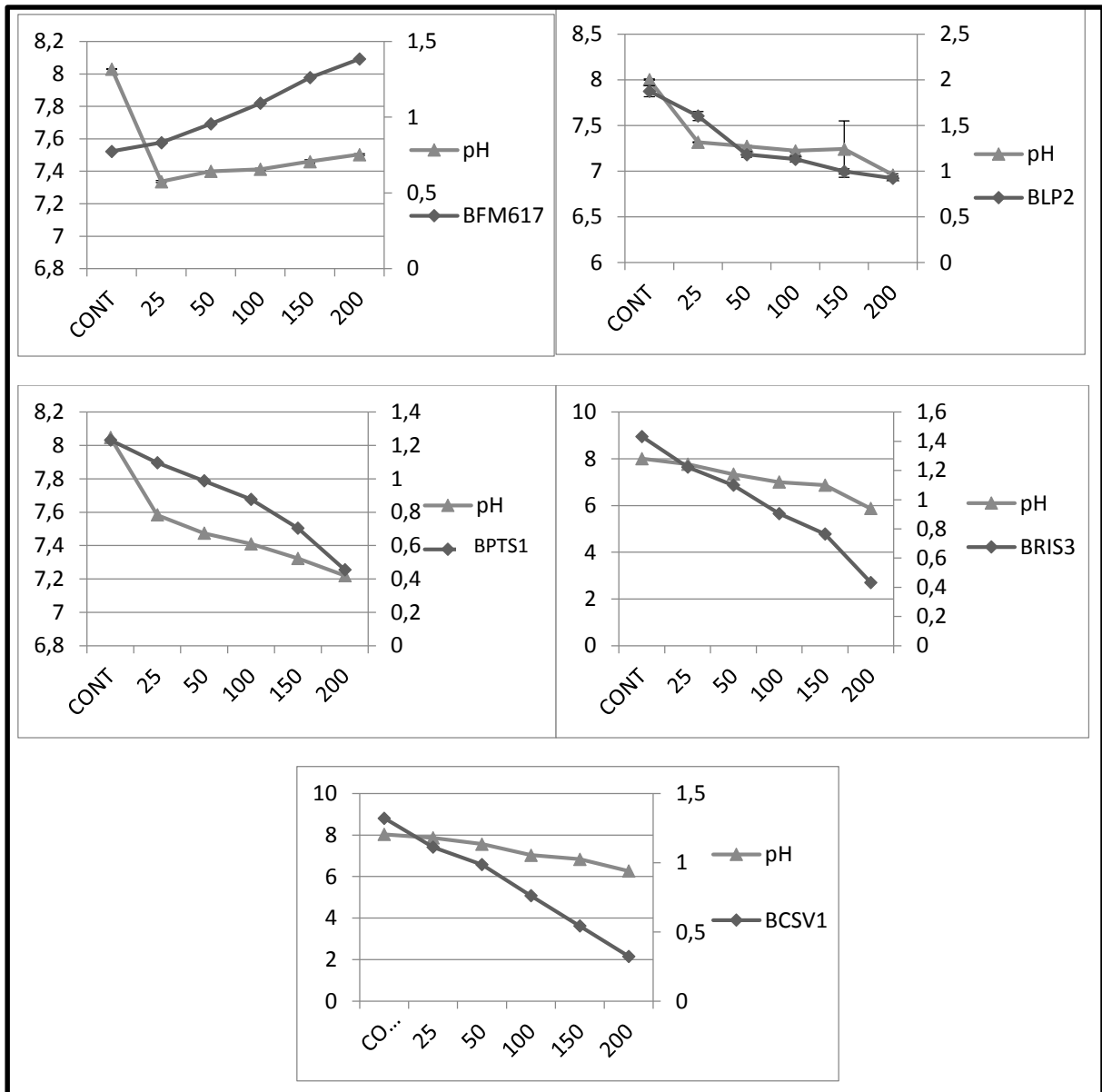
Evaluation de l'effet des enzymes sur l'adhérence bactérienne de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* par la méthode cristal violet

Tableau 1:% d'inhibition de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* par l'enzyme protéinase K

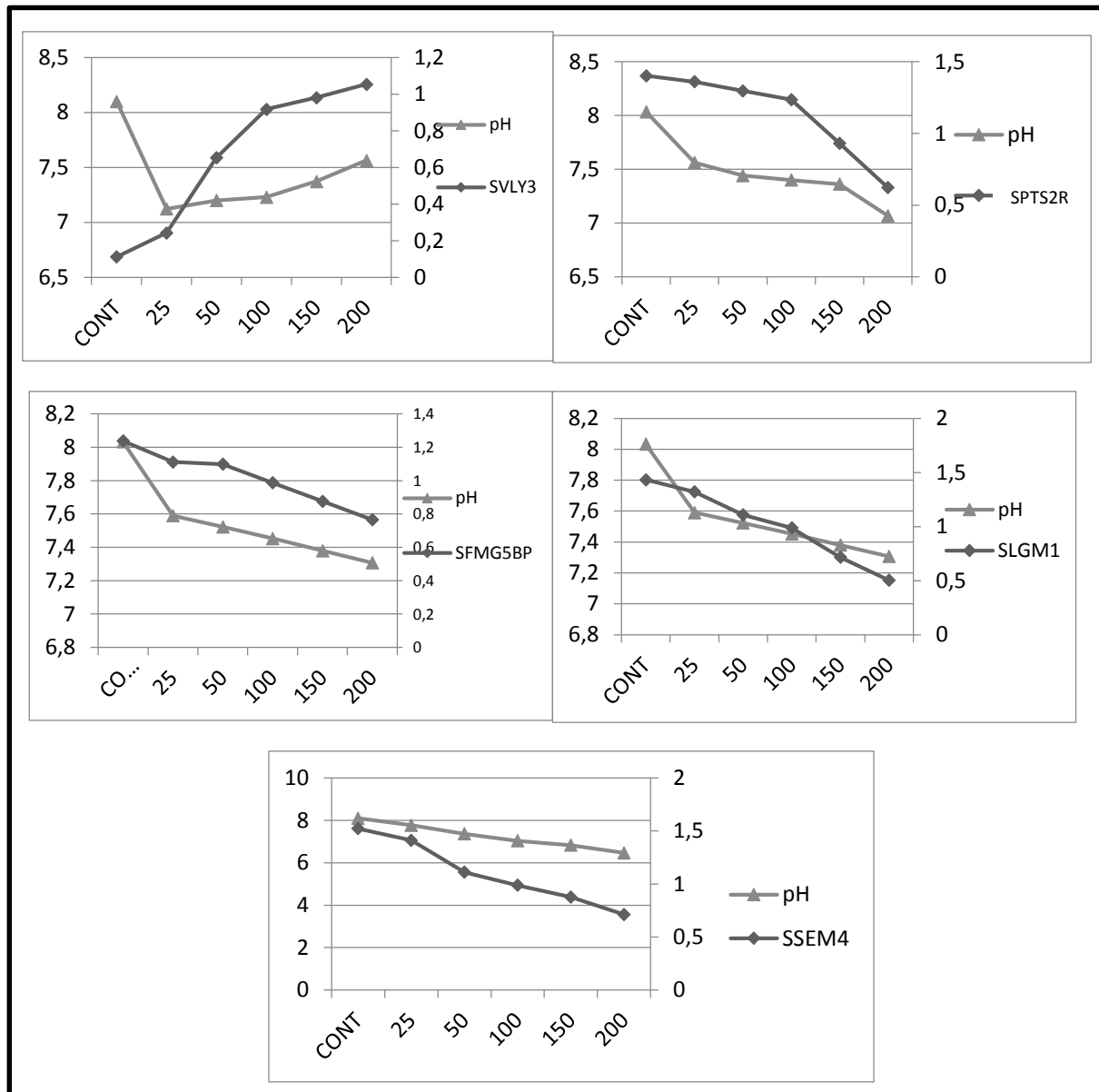
	25µL	50µL	100µL	150µL	200µL
BFMG17	-5,49 ±0,17	-7,18 ±0,17	-8,61±0,57	-17,07±0,57	-23,82±0,56
BLP2	35,50±0,37	42,99±0,57	54,81±1,57	66,73±1,84	71,52±2,84
BPTS1	9,73±0,26	17,59±0,57	34,24±1,57	50,83±1,57	62,27±1,88
BRIS3	16,52±0,37	17,54±0,57	34,21±1,57	47,03±1,57	62,22±1,88
BCSV1	8,77±0,27	17,12±0,57	23,41±1,51	31,09±1,84	46,33±1,84
SVLY3	-2,11±0,07	-6,55±0,57	-8,05±0,57	-25,69±0,57	-37,15±0,57
SPTS2R	49,52±0,7	53,59±0,57	56,37±1,58	60,90±1,89	64,37±1,88
SFMG5BP	15,79±0,47	16,95±0,57	33,68±1,57	42,11±1,85	54,20±1,85
SLGM1	9,63±0,47	10,83±0,57	19,82±1,57	32,35±1,81	42,21±1,84
SSEM4	2,13±0,47	12,95±0,57	21,87±1,57	36,43±1,82	51,56±1,85

Tableau 2:% d'inhibition de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* par l'enzyme trypsine

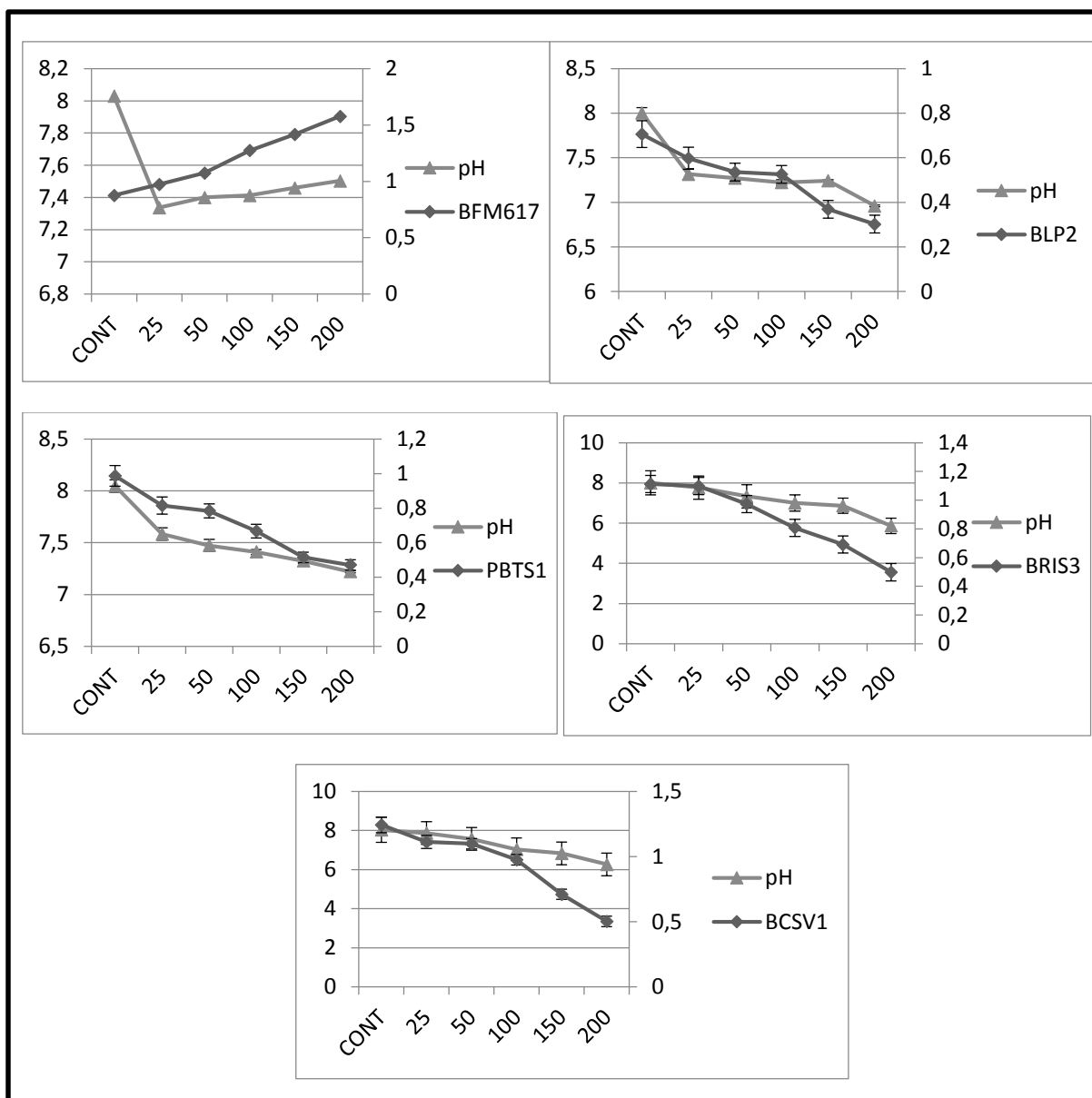
	25µL	50µL	100µL	150µL	200µL
BFMG17	-4,15±0,07	-16,61±0,07	-17,74±0,05	-23,04±0,05	-28,72±0,07
BLP2	23,60±0,57	46,70±1,57	57,21±2,84	65,41±2,84	76,52±2,84
PBTS1	24,54±0,57	35,13±1,57	40,15±1,57	57,63±2,84	66,84±2,84
BRIS3	16,61±0,57	27,88±1,57	29,37±1,57	36,02±1,57	51,78±2,84
BCSV1	11,47±0,57	26,11±1,57	38,13±1,57	40,90±1,57	55,68±2,84
SVLY3	-37,71±0,07	-51,56±0,07	-75,43±0,05	-84,62±0,05	-91,37±0,07
SPRE2R	10,24±0,57	16,94±0,57	18,05±0,57	39,73±1,57	52,68±2,84
SFMG5BP	30,76±0,57	48,99±1,57	57,23±2,84	60,86±2,84	72,58±2,84
SLGM1	1,318±0,07	21,18±0,57	35,06±1,57	45,04±1,57	61,19±2,84
SSEM4	11,21±0,57	22,43±0,57	37,93±1,57	39,39±1,57	56,25±2,84



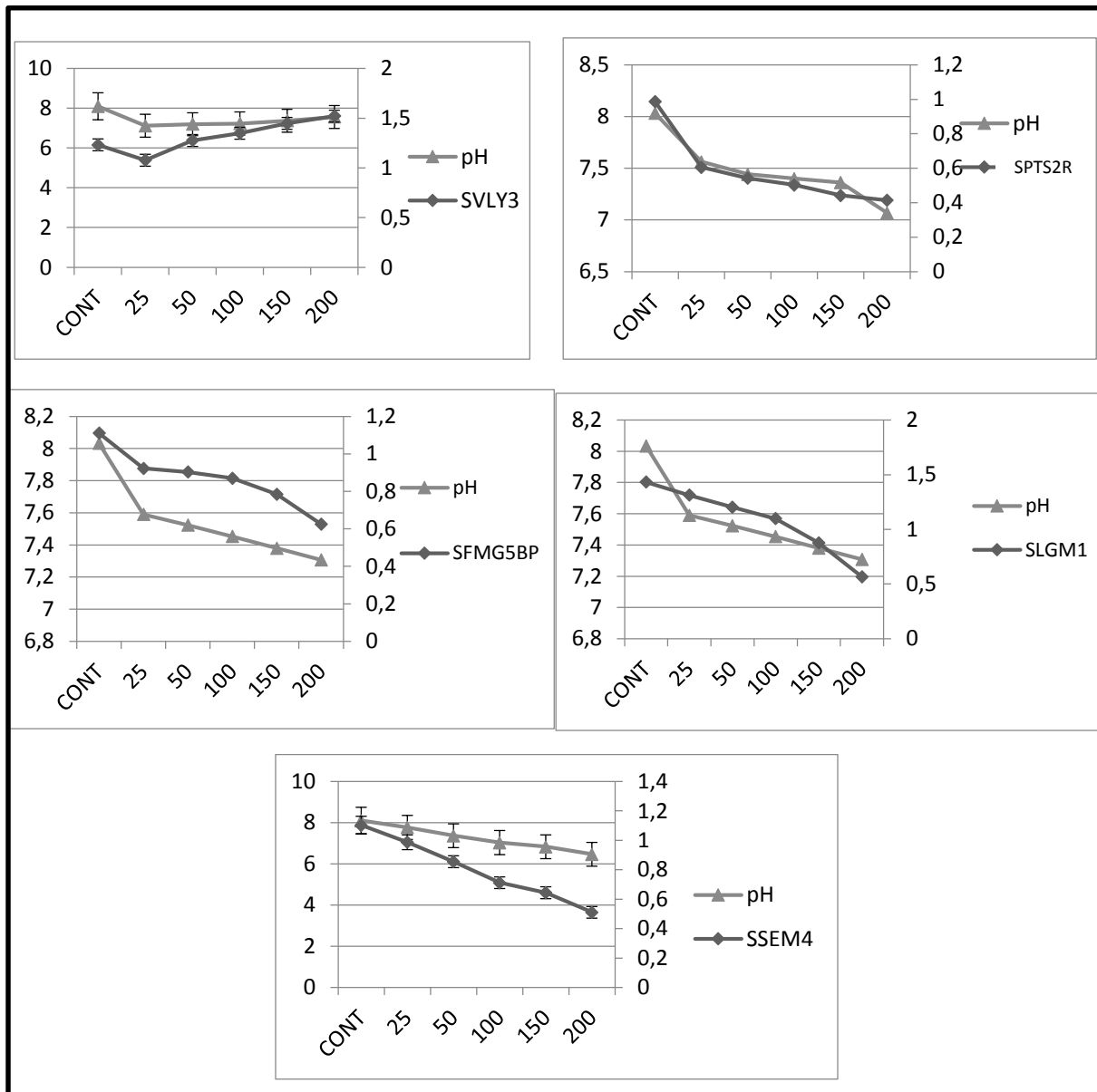
Inhibition de la croissance planctonique de *Bacillus cereus* par l'enzyme protéinase K.



Inhibition de la croissance planctonique de *Staphylococcus aureus* par l'enzyme protéinase K



Inhibition de la croissance planctonique de *Bacillus cereus* par l'enzyme trypsine.



Inhibition de la croissance planctonique de *Staphylococcus aureus* par l'enzyme trypsine.

Annexe VI : Rapport détaillé de l'analyse statistique : analyse de variance

Méthode DPPH des extraits des écorces d'agrumes et l'acide ascorbique (Concentration du solvant)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	1368,528	2	684,264	10089890**
concentration	2139,747	2	1069,874	15775930**
Extrait* concentration	547,884	4	136,971	2019718**
Erreurs	0,001	18	0	

Méthode FRAP des extraits des écorces d'agrumes et l'acide ascorbique (Concentration du solvant)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	1,425	26	0,136	19,078**
concentration	0,886	2	0,713	11,856**
Extrait* concentration	0,563	2	0,443	3,769*
Erreurs	0,672	18	0,037	

Méthode DPPH des extraits des écorces d'agrumes et l'acide ascorbique (Quantité de poudre)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	1641,875	2	820,938	2241707**
concentration	9588,351	3	3196,117	8727530**
Extrait* concentration	1417,672	6	236,279	645198,2**
Erreurs	0,009	24	0	

Méthode FRAP des extraits des écorces d'agrumes et l'acide ascorbique (Quantité de poudre)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,287	2	0,144	1111,12**
concentration	0,12	3	0,04	308,309**
Extrait* concentration	0,001	6	0	1,486 NS
Erreurs	0,003	24	0	

Inhibition des biofilms matures de *Bacillus cereus* par les extraits des écorces d'agrumes (Quantité de poudre de *C. limon*)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,006	4	0,002	232,82**
concentration	0,175	4	0,044	6661,502**
Extrait*	0,006	16	0	56,254**
concentration				
Erreurs	0	50	0	

Inhibition des biofilms matures de *Bacillus cereus* par les extraits des écorces d'agrumes (Quantité de poudre de *C. sinensis*)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,017	4	0,004	1277,944**
concentration	0,089	4	0,022	6849,219**
Extrait*	0,001	16	0	20,871**
concentration				
Erreurs	0	50	0	

Inhibition des biofilms matures de *Bacillus cereus* par les extraits des écorces de *C. limon* (concentration du solvant)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,003	4	0,001	97,512**
concentration	0,125	3	0,042	6215,231**
Extrait*	0,005	12	0	56,664**
concentration				
Erreurs	0	40	0	

Inhibition des biofilms matures de *Bacillus cereus* par les extraits des écorces de *C. sinensis* (concentration du solvant)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens		DDL	Carrés moyens	Test
Extrait	0,05		4	0,012	1,31
concentration	0,078		3	0,026	2,75
Extrait* concentration	0,113		12	0,009	0,99
Erreurs	0,38		40	0,009	

Inhibition des biofilms matures de *Staphylococcus aureus* par les extraits des écorces d'agrumes (Quantité de poudre de *C. limon*)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,015	4	0,004	691,785**
concentration	0,211	4	0,053	9601,592**
Extrait* concentration	0,024	16	0,002	274,723**
Erreurs	0	50	0	

Inhibition des biofilms matures de *Staphylococcus aureus* par les extraits des écorces d'agrumes (Quantité de poudre de *C. sinensis*)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,018	4	0,004	2493,454**
concentration	0,062	4	0,016	8748,867**
Extrait* concentration	0,008	16	0,001	298,885**
Erreurs	0	50	0	

Inhibition des biofilms matures de *Bacillus cereus* par les extraits des écorces de *C. sinensis* (concentration du solvant)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,064	4	0,016	2715,852**
concentration	0,075	3	0,025	4244,62**
Extrait* concentration	0,016	12	0,001	231,541**
Erreurs	0	40	0	

Inhibition des biofilms matures de *Bacillus cereus* par les extraits des écorces de *C. limon* (concentration du solvant)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,014	4	0,003	535,864**
concentration	0,15	3	0,05	7775,148**
Extrait* concentration	0,025	12	0,002	327,534**
Erreurs	0	40	0	

Inhibition des biofilms matures de *Bacillus cereus* par l'extrait éthanolique d'*Ammi visnaga*

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,024	4	0,006	826,56**
concentration	0,239	4	0,06	8316,028**
Extrait* concentration	0,049	16	0,003	423,478**
Erreurs	0	50	0	

Inhibition des biofilms matures de *Bacillus cereus* par l'extrait acétonique d'*Ammi visnaga*

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,022	4	0,006	2,672*
concentration	0,185	4	0,046	22,136*
Extrait* concentration	0,082	16	0,005	2,464*
Erreurs	0,104	50	0,002	

Inhibition des biofilms matures de *Staphylococcus aureus* par l'extrait éthanolique d'*Ammi visnaga*

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,01	4	0,003	439,15**
concentration	0,237	4	0,059	10208,88**
Extrait* concentration	0,015	16	0,001	156,602**
Erreurs	0	50	0	

Inhibition des biofilms matures de *Staphylococcus aureus* par l'extrait acétonique d'*Ammi visnaga*

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,006	4	0,002	247,758**
concentration	0,191	4	0,048	7743,291**
Extrait* concentration	0,018	16	0,001	187,483**
Erreurs	0	50	0	

Inhibition des biofilms matures de *Staphylococcus aureus* par l'extrait méthanolique d'*Ammi visnaga*

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,004	4	0,001	196,619**
concentration	0,288	4	0,072	12644,06**
Extrait* concentration	0,016	16	0,001	178,605**
Erreurs	0	50	0	

Cinétique de croissance bactérienne de *Bacillus cereus*

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	1,061	4	0,265	19827,24**
concentration	11,007	7	1,572	117562,3**
Extrait* concentration	0,244	28	0,009	651,375**
Erreurs	0,001	80	0	

Quantification de la biomasse bactérienne adhérente de *Bacillus cereus* (Méthode cristal violet)

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,719	4	0,18	2193,713**
concentration	9,364	7	1,338	16322,55**
Extrait* concentration	0,167	28	0,006	72,664**
Erreurs	0,007	80	0	

Cinétique d’Inhibition de la croissance planctonique de *Staphylococcus aureus* par l’acide salicylique

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,147	4	0,037	2749,448**
concentration	9,663	7	1,38	103209,5**
Extrait* concentration	0,095	28	0,003	254,001**
Erreurs	0,001	80	0	

Quantification de la biomasse bactérienne adhérente de *Staphylococcus aureus* par l’acide salicylique

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	0,977	4	0,244	5715,203**
concentration	5,752	7	0,822	19225,54**
Extrait* concentration	0,171	28	0,006	142,779**
Erreurs	0,003	80	0	

Cinétique d’Inhibition de la croissance planctonique par l’enzyme protéinase K

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	4,826	9	0,536	13825,53**
concentration	5,175	5	1,035	26688,62**
Extrait* concentration	10,496	45	0,233	6013,974**
Erreurs	0,005	120	0	

Valeurs du pH de l’enzyme protéinase K

Sources de variation	Sommes des carrées moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	3,366	9	0,374	118,028**
concentration	20,704	5	4,141	1306,677**
Extrait* concentration	9,875	45	0,219	69,249**
Erreurs	0,38	120	0,003	

Quantification de la biomasse bactérienne adhérente lors du traitement par l'enzyme protéinase K

Sources de variation	Sommes des carrés moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	16,283	9	1,809	92693,03**
concentration	3,275	5	0,655	33559,82**
Extrait* concentration	5,349	45	0,119	6089,757**
Erreurs	0,002	120	0	

Cinétique d'Inhibition de la croissance planctonique par l'enzyme trypsine

Sources de variation	Sommes des carrés moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	10,824	9	1,203	14227,49**
concentration	2,612	5	0,522	6179,336**
Extrait* concentration	5,11	45	0,114	1343,431**
Erreurs	0,01	120	0	

Quantification de la biomasse bactérienne adhérente lors du traitement par l'enzyme trypsine

Sources de variation	Sommes des carrés moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	5,227	9	0,581	11777,14**
concentration	5,125	5	1,025	20784,47**
Extrait* concentration	2,846	45	0,063	1282,487**
Erreurs	0,006	120	0	

Valeurs du pH de l'enzyme trypsine

Sources de variation	Sommes des carrés moyens	DDL	Carrés moyens	Test de Fisher
Extrait	3,366	9	0,374	118,028**
concentration	20,704	5	4,141	1306,677**
Extrait* concentration	9,875	45	0,219	69,249**
Erreurs	0,38	120	0,003	

*Significatif

** Hautement significatif

NF : Non significatif



*Publications
internationales*



Antimicrobial and antioxidant activity of *Ammi visnaga* (L) phenolic extracts and their effects on planktonic and biofilm growth of food spoilage *Bacillus cereus*

Belkacem Imane*, Rebai Ouafa, Djibaoui Rachid

Laboratory of Microbiology and vegetal Biology, Faculty of Natural Sciences and Life,
University of Mostaganem, Algeria

Key words: *Ammi visnaga*, *Bacillus cereus*, Biofilm, Polyphenols, Flavonoids, Antioxidant

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/9.4.32-47>

Article published on October 11, 2016

Abstract

Ammi visnaga (L) is a species from *Apiaceae* family (Umbelliferae), it is widely used in Algeria. It is supposed to be an interesting source of phenolic compounds which can be used against biofilm growth of bacteria. *Bacillus cereus*, a crucial pathogenic bacterium that causes food poisoning, is known as a producer of gastrointestinal diseases. In the present work we used water, acetone, ethanol and methanol to extract phenolic compound from the plant *Ammi visnaga* (L). The extracts were evaluated for their antioxidant activity and their effects on planktonic cells, swarming motility and biofilm growth of *Bacillus cereus* isolates. The results indicate that 70% methanolic extract represent the highest amount of total phenols (176mg GAE/g), and the lowest amount was obtained with acetone extract (18, 66mg GAE/g). Flavonoids extractability was found to be highest with ethanolic extract (22mg QE/g). Among all the extracts of *A. visnaga* (L), methanolic extract 70% showed the most potent radical scavenging ability (IC 50: 1, 46mg/ml) and the highest reducing power values from 1,129 to 1,974 at 700nm. DPPH assay of plant extracts was well correlated with FRAP assay ($R^2=0, 7018$) and a good correlation was found between antioxidant activity (IC 50) and polyphenols content of different extracts ($R^2=0, 8153$). No correlation was found between total polyphenol and flavonoids contents ($R^2=0, 4267$). The obtained results show that *A. visnaga* (L) extracts might possess high antimicrobial activities and methanolic extract at 10mg/ml was more effective to swarming motility and biofilm formation in *Bacillus cereus* strains.

* Corresponding Author: Belkacem imane ✉ imane.belkacem@univ-mosta.dz

Introduction

The ability of many pathogenic bacteria to adhere to surfaces and to form biofilms has major implications in a variety of industries including the food industry, where biofilms create a persistent source of contamination causing food spoilage. Microbial adhesion to surfaces and consequent biofilm formation is a survival strategy that has been studied and documented in recent decades (Watnick and Kolter, 2000). Plant secondary metabolites (phytochemicals) have demonstrated promising antimicrobial properties when applied against planktonic cells and biofilms. Natural antimicrobial products can be attractive to the food industry in that they control natural spoilage microorganisms (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Therefore, new antimicrobial products need to be identified and their antimicrobial action against bacterial biofilms must be assessed. Previous studies (Cushnie and Lamb, 2005; Vaquero *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 2009a) have demonstrated that phenolic substances, including simple phenols and phenolic acids, are a major class of phytochemicals that have already demonstrated significant antimicrobial properties. Phenolics of higher plants are ubiquitous low molecular compounds. They are the most widespread molecules among secondary plants metabolites, and are of high significance in plant development (Curir *et al.*, 1990).

A great number of medicinal plants containing flavonoids have been reported their antibacterial activity. The plant *Ammi visnaga* (L) Lam. known as Nookha (in Algeria) or Khella (in some parts of North Africa) is classified under the Apiaceae (Umbelliferae) family. It is found growing widely in North Africa, Asia and Europe (Hegnauer, 1973), where it is used in traditional medicines to treat gastrointestinal cramps. In Algeria *Ammi visnaga* (L) is largely used in traditional treatment of digestive diseases and culinary but not very well studied scientifically. The major components of the plant *Ammi visnaga* (L) are furanochromones and coumarins. Khellin and visnagin are the most biologically active of them. (Benigni *et al.*, 1962; Hegnauer, 1973).

Furthermore, *Bacillus cereus* is a spore former bacteria, responsible for the spoilage of different food products. It is widespread in nature and in many raw and processed foods. It can survive during the cooking process, resist to pasteurization and produce emetic toxins. (Granum and Lund, 1997; Finlay *et al.*, 2002).

The cooked food products when stored at room temperature, the spores can germinate, proliferate, and produce emetic and diarrhoeal toxins leading to poisoning. The adhesion of *B. cereus* to surfaces is mainly due to its high hydrophobicity, to spores surface charges, and to the long appendages covering its surfaces. (Andersson *et al.*, 1995). *B. cereus* cells can attach on stainless steel surfaces and form a biofilm which cause problems in several processes of food industry (Peng *et al.*, 2002). The bacterial biofilms are generally formed by cells clusters gathered with an extra-cellular material to colonize surfaces.

The plant *Ammi visnaga* (L) is widely used in Algerian culinary, but it has been rarely used for improving their antioxidant and antimicrobial effects. The main purpose of this study was to investigate the antioxidant activity and to evaluate the phenolic and flavonoids content of *A. visnaga* phenolic extracts, as well as their effects on planktonic cells and biofilms of *Bacillus cereus* isolates causing foodborne spoilage.

Materials and methods

Isolation of Bacillus cereus strains from different Food Sources

Several Samples from local commercial supermarket and home-made foods were collected. The used foods are mainly: fresh and raw ground meats, poultry, fish, dairy products and some cooked dishes. All food samples were transported in sterile plastic boxes. The isolation of *Bacillus* species was performed according to the conventional procedure by serial dilution in sterile phosphate buffered saline. 10g of food sample was added in 90 mL of phosphate buffered saline; the different solutions were heated at 85 C° for 10 min.

100 μ l from the appropriate dilutions were surface plated on LB agar, and on Mannitol egg-yolk polymyxin B (MYP) agar plates (Vanderzant and Splittstoesser, 1992). Incubation was carried at 30 °C for 48h. The characterization of the isolates was performed by studying colonies morphology, Gram stain, cell forms and biochemical tests, using API 20 E system and Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Cappuccino and Sherman, 2004).

Screening of Bacillus cereus toxicity

Lecithinase activity: plates were prepared by adding egg yolk emulsion up to 5% (v/v) to nutritive agar. Each isolate was spotted on the medium and the plates were incubated at 30°C. Opaque zones around the colonies, caused by hydrolysis of lecithin indicated lecithinase production. (Guttman and Ellar, 2000).

Hemolytic activity: The hemolytic activity was determined at 33°C on 5% sheep blood agar plates by surface inoculation as described by Pruss *et al.* (1999). The isolates were spotted on blooded nutritive agar medium. (Collins *et al.*, 2001). The strains were classified as α (partial), β (total), or non-hemolytic.

Amylase activity: The ability to hydrolyze starch was tested by inoculating on the starch agar medium; the zones were detected by adding lugol to the plate's surfaces. (Collins *et al.*, 2001).

Caseinase activity: Caseinase was identified according to the method of Gudmudsdo (1996) on milk agar medium. The isolated bacteria were streaked on the appropriate medium for 24 h at 37°C. A transparent zone around the colonies indicated caseinase activity.

Antibiogram pattern of the isolated strains

To select *Bacillus cereus* showing resistance to antibiotics, all isolates were tested for their sensitivity to antibiotics using following antibiotics: Penicillin G, Doxycycline (30 μ g), Erythromycin (15 μ g), Norfloxacin (10 μ g), Amoxicillin (30 μ g), Ampicillin (10 μ g), Cephalothin (30 μ g), Carbenicillin (100 μ g), Oxacillin (1 μ g), Piperacillin (30 μ g),

Trimethoprim-Sulfamethoxazole (25 μ g), Tobramycin (30 μ g), Rifampin (5 μ g) and polymyxin B (30 μ g). The antibiogram was realized on Mueller– Hinton agar, using disc diffusion method as described by Bauer *et al.*, (1966). The Inocula were set to 0.5 McFarland or (OD= 0.08 to 0.1) at 620 nm, which corresponds to 108 CFU/ mL. The plates were incubated at 37°C for 24h. The inhibition zones around the disc was measured and interpreted as sensitive, moderate or resistant.

Plant material

The plant *Ammi visnaga* (L) was studied following its large use in Algerian culinary and its potential medicinal uses. The plant was collected during spring season from the region of Sidilakhdar (Mostaganem, Algeria), and identified by Microbiology and vegetal biology Laboratory at Mostaganem University. The plant was washed with distilled water and dried at room temperature under shade. The dried aerial parts were powdered by a blender and stored away from light for further studies.

Determination of moisture content

10 g of powdered aerial parts of *Ammi visnaga* (L) was weighed and put in an oven (70°C) until dryness. Moisture lost was determined by the difference between initial fresh weight and constant weight after drying. All samples were analyzed in triplicate and the result was expressed by percentage of moisture of the sample studied.

Extraction procedure

An absolute methanol, water and three 70% (v/v) organic solvents (Methanol, Acetone and ethanol) were used to extract phenolic compounds. 10% w/v of powdered plant material was extracted by 100ml of each solvent. The extraction was performed during 30 min. Centrifugation was done at 3000 rpm/ 20min, and vacuum filtration was used to separate the liquid extract. The filtrates were collected and the solvent was evaporated at 40°C using a rotary vacuum evaporator. The aqueous extract was obtained by soaked 10 g of powdered plant in 100 ml sterile water for 5 mi, the mixtures were centrifuged at 3000 rpm for 20 min. The supernatant was used for the determination of total phenolic content and antioxidant activity. (Obob *et al.*, 2009).

Total phenolic content

Ammi visnaga (L) extracts phenolic content was determined by adding 5 ml of Folin-ciocalteau reagent (1:10) and 4 ml of 7.5% aqueous sodium carbonate to 0.5 ml of different extracts. The mixtures were kept in obscurity at room temperature for 15 min. The optical density was then measured at 765 nm using UV spectrophotometer. (Singleton and Rossi, 1965). The results were reported as Gallic acid equivalent (GAE) per gram of dry weight. Gallic acid concentrations were prepared as standard in methanol.

Flavonoid content

To determine the flavonoid content (TFC), the aluminum chloride colorimetric assay was used as described by Liu *et al.* (2008). A volume of 2 ml of diluted extract was allowed to 200 μ l of 0.5% sodium nitrite and incubated for 5 min. Then, 200 μ l of aluminum chloride 10% was added to the mixture. 2 ml of sodium hydroxide 1M was added to the mixture after 6 min, and the absorbance was read at 510 nm. Quercetin was used for the calibration curve. The results of flavonoids content were expressed as mg quercetin equivalents (QE) per g. All the samples were analyzed in triplicate.

Antioxidant activity of *Ammi visnaga* (L) extracts

Free radical scavenging assay (DPPH): to determine the ability of scavenging of phenolic extracts on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free-radicals the method of Shimada *et al.*, (1992) was used. 2ml of each plant extracts at different concentrations was added to 0.5 ml of 1 mM DPPH prepared in methanol. After shaking, the mixture was left at room temperature to stand for 30 min in the dark. The absorbance was measured at 517 nm against an aliquot blank. Methanol was used as a control. Scavenging ability (%) = $[A_0 - A_1/A_0] \times 100$. The higher values explain greater antioxidant activity of the tested sample, but higher IC₅₀ value indicates a weaker capacity to scavenge DPPH radicals.

Ferric reducing power (FRAP): The reducing power was determined by adding 1 mL of varying concentration of sample extracts to 2.5 mL phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6), then the solution was mixed with 2.5 mL of potassium ferricyanide 1%.

After incubation at 50°C for 20 min, 2.5 mL of 10% acid trichloroacetic (w/v) was added to the mixture. After centrifugation at 3000 rpm for 10 min, the upper layer (2.5 mL) was mixed with 2.5 mL of deionized water. Finally, 0.5 mL of 0.1% ferric chloride was added. The absorbance was measured at 700 nm. Distilled water was used as negative control. The assay was done in triplicate. (Oyaizu, 1986).

Antimicrobial activity of *Ammi visnaga* (L) extracts

Agar-well diffusion assay: The antibacterial activity of the different plant extracts was evaluated against five isolates of food spoilage *Bacillus cereus* and a reference strain *Bacillus cereus* ATCC 14579. The turbidity of the bacterial suspensions was adjusted to an equivalent to 0.5 McFarland. The agar-well diffusion assay was performed according to the recommended method of Valgas *et al.* (2007). A standardized bacterial inoculum was uniformly surface spread on a Mueller-Hinton agar. Next, 80 μ L of each plant extract dissolved in distilled water (10mg /ml) was added into the wells of 6 mm in diameter, the plates were incubated at 30°C for 24h and the measure of the diameter of inhibition zones was done. The Ampicillin (30 μ g) and well containing the solvent only were used as controls. All tests were done in triplicate.

Swarming behaviour assay: The effect of methanolic extract on swarming migration of *Bacillus cereus* food spoilage isolates was realized according to the method cited by Liaw *et al.*, (2000), bacterial suspensions were grown in Brain-Heart Infusion (BHI) broth and incubated overnight at 37 °C. After incubation, the cultures were adjusted to an OD = 1 ± 0.05 at 620 nm. 5 μ l of an overnight bacterial culture was spotted centrally onto the surface of dry PPGAS (phosphate-limited peptone-glucose- ammonium salt) agar plates (KCl 20 mM, NH₄Cl 20 mM, MgSO₄ 1.6 mM, Tris-HCl (pH 7.2) 120 mM, peptone 1.0%, glucose 0.5%) without or with 0, 5; 1, 5 or 10 mg/ ml of phenolic compounds, then incubated at 37°C for 24h. For monitoring swarming motility, glutamate 0.05% was used instead of NH₄Cl.

Crystal violet biofilm assay: Cell suspensions were prepared by inoculating 3 ml of TSB (tryptic soy broth) with bacterial *Bacillus cereus* strains and were cultured overnight at 37°C and then diluted in fresh media to an OD =0,06 at 620nm. The biofilm growth inhibition performed adopting method of biofilm inhibition spectrophotometric assay in 96 well microplates as described by Regev-Shoshani *et al.*, (2010). 100 µl of each prepared bacterial suspension of the tested isolates was added into 96 well microplates and 100µl of different concentration of methanolic extract of *Ammi visnaga* (L) was added and incubated at 37° C for 48h, 200 µl of 1% w/v aqueous solution of crystal violet was added after removing the liquid suspension. After 30 minutes, the wells were washed thoroughly after removing the dye and 200µl of ethanol at 95% was added and incubated for 15 minutes. The reaction solution was read in an ELISA reader at 595 nm. The TSB was used as a blank. After incubation, the MIC was defined as the lowest concentration of *A.visnaga* (L) extract that exhibit an inhibition of visible growth.

Reduction of biofilm biomass was calculated as following: % inhibition =OD in control-OD in treatment/OD in control* 100.

Statistical analysis

All the experiments were carried out in triplicate. The data were analyzed by ANOVA. The IC₅₀ values were calculated from linear regression analysis. Correlations between variables were established by excel.

Results

Isolation and identification of the isolated Bacillus cereus strains

46 isolates were obtained by isolation from different food samples, 24 isolates were selected after screening of their ability of resistance to penicillin G and other antibiotics (Fig. 1). The Colonies of isolated bacteria were big waxy white or gray, surrounded by an opacity zone. 19 of them were unable to catabolize mannitol when cultured on MYP agar.

Table 1. Identification of isolates of food spoilage *Bacillus cereus*.

Isolate name	Gram-endospore	Catalase	Oxydase	Mobilité	50°C	Indole	VP	Citrate	Urease	Nitrate	OF	7%NaCl	Man
BCSV1	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BLGM18	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
BVLY31	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BVLY16	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BVLY12	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
LLVC2	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
BVDE17	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BRIS7	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BYLG5	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
LLVB1	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BPTS1	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BCSV2	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
BPTS2	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BVLY22	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BLLP2	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BYDN3	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BEPC1	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
BSEM1	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
BLVC3	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BFMG16	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BSEM4	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BRIS3	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BFMG11	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BFMG17	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-

(+) : Positive result

(-) : Nigative result

The isolates were gram positive rods. Motile, and grow positively in 7% NaCl but could not grow at 50°C. Following results shown in table (1), 19 isolates were belonged to *Bacillus cereus* and 5 to *Bacillus subtilis*. The identification of the above species was

confirmed by API 20E system as recommended by bergy's manual. All *Bacillus cereus* stains were beta-haemolytic producing phospholipase C, amylase and caseinase. The obtained results indicate that the studied *Bacillus cereus* strains are carrying a level of toxicity and virulence.

Table 2. Antimicrobial activity of *Ammi visnaga* (L) extracts against isolates of *Bacillus cereus*.

Plant extracts (solvent)	BVDE17	BPTS3	BCSV1	BRIS3	BSEM4	ATCC 14579
Acetone 70%	6+0,81	9+0,91	8+0,03	7+0,02	9+0,05	8,33+0,057
AQ (water)	8,33+0,85	9,33+1,07	11,33+0,037	9,33+0,025	9,33+0,057	9,33+0,057
MeOH 70%	21+1,05	15,33+1,15	15,66+0,05	15,33+0,057	15,33+1	12,66+0,057
MeOH 100%	14+1	12,66+1,09	13+0,047	12,66+0,047	12,66+0,047	11,33+0,057
EtOH 70%	11,33+0,87	12,66+1,09	12,33+0,057	11+0,037	11,66+0,87	10,33+0,057

Antibiotic sensitivity

The profile of antibiotic resistance of the tested strains to different antibiotics was performed. All *Bacillus cereus* strains showed high resistance towards Penicilline G (100%), but found variably resistant to the other antibiotics tested (Fig. 1). All the strains showed high sensitivity towards Norfloxacin (89, 13%), Doxycycline (84, 78%), Erythromycin (78, 26%), but were found less sensitive to Amoxicillin (21, 73%) Oxacillin (8, 69%) and Ampicillin (4, 34%).

Among the sample studied, the aerial part of the plant *Ammi visnaga* (L) showed high moisture content which showed a value of $90.46 \pm 0.09\%$.

Effect of concentration and solvent type on total phenols yield

The results in figure (2) show the extraction yield of total phenols and flavonoids using different solvents. The phenolic content of all extracts ranged from 18, 66 to 172, 66 mg/g. The highest values was found in the aqueous methanol extract (172, 66 mg/g) which was significantly higher than ethanol extract 38 mg/g and acetone extract which represent the lowest yield with 18, 66 mg/g. The total flavonoid contents in *Ammi visnaga* (L) ranged from 3, 3 to 22 mg EQ/g. Ethanolic extract showed the highest value, while the lowest value was obtained by the pure (100%) methanol extract. (Fig.2). In general, considering all the solvents used in this study,

aqueous methanol at 70% was found to be the most effective solvent to extract total phenols from plants. To improve the effect of the concentration of extraction solvent, we have used absolute, aqueous methanol and water extract. We also found that the yield of extraction of total phenols obtained by aqueous methanol was higher (172, 66 mg/g) than absolute methanol and water extract with 96 mg/g and 21, 66 mg/g respectively.

DPPH radical scavenging activity assay

In terms of antioxidant activities, and in comparison with ascorbic acid (AA) as positive control, it was found that methanolic extracts represented the highest DPPH scavenging activity (89, 21%) at concentration of 3mg/ ml, this value was significantly different from ethanol and acetone extracts at the same concentration. (Fig. 3). These values were lower than those obtained by ascorbic acid (positive control) which represent 91, 79%. Regardless the type of solvent, extracts with concentrations 70% of solvent used presented higher DPPH radical scavenging capability than those with their respective absolute methanol and water extracts. This result was similar to thus observed by total polyphenol content. The Figure 4 represents the IC 50 values obtained for the investigated *Ammi visnaga* (L) extracts. Methanolic extract was found to be 1, 46 mg/ml while the acetonic extract was 3,1. The results indicate that the scavenging ability of methanolic extract of *Ammi visnaga* (L) on DPPH radical was strong.

Figure 5 represent the results of correlation between antioxidant activities (DPPH and FRAP methods) and correlation between total polyphenol and flavonoid content.

Free Reducing power

The results of the reducing power of *Ammi visnaga* (L) extracts at different concentration used showed a range of absorbance values from 0.4 to 2.57 at 700 nm (Fig. 6). It was also found that high concentration of each extract increase the reducing power.

Table 3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and % biofilm inhibition by *Ammi visnaga* (L) methanolic extract for *Bacillus cereus* isolates.

MIC mg/ml	BRIS3		BVDE17		BPTS2		BSEM4		BCSV1	
	OD _{595nm}	%Inhibition	OD _{595nm}	%Inhibition	OD _{595nm}	%Inhibition	OD _{595nm}	%Inhibition	OD _{595nm}	%Inhibition
C	0,18+0,01 ^B	0	0,19+0,01 ^A	0	0,11+0,02 ^J	0	0,15+0,01 ^E	0	0,17+0,01 ^C	0
0,5	0,15+0,02 ^D	15,78	0,112+0,01 ^J	41,05	0,091+0,01 ^N	17,27	0,139+0,01 ^F	7,33	0,123+0,01 ^H	27,64
1	0,11+0,01 ^I	38,88	0,097+0,02 ^L	48,94	0,086+0,01 ^O	21,81	0,126+0,01 ^G	16	0,104+0,01 ^K	38,82
5	0,096+0,01 ^L	46,66	0,058+0,01 ^S	69,47	0,063+0,01 ^R	42,72	0,095+0,01 ^M	36,66	0,076+0,01 ^P	55,29
10	0,066+0,01 ^Q	63,33	0,04+0,01 ^U	78,94	0,028+0,01 ^W	74,54	0,055+0,01 ^F	63,33	0,032+0,01 ^V	81,17

Absolute and aqueous methanolic extracts exhibited a high reducing power in comparison with the other plant extracts. Methanolic extract at 70% represent the highest value of 1.974 ± 0.14 at 3mg/ml that might attribute to the collective antioxidant effects of phenolics and flavonoids.

Antimicrobial activities of *Ammi visnaga* (L) extracts
Agar-well diffusion assay: The results of antibacterial activity against strains of *Bacillus cereus* are illustrated in table 2.

The inhibition zones of bacterial strains obtained by the methanolic extract were in the range of $12,66 \pm 0.5$ to 21 ± 1 mm, which was significantly different from those obtained by ethanolic extract and acetonc extract with $10,33 \pm 0,05$ to $12,66 \pm 0,05$ and $7 \pm 0,05$ to $9 \pm 0,05$, respectively. It can be observed that the extracts of *A. visnaga* (L) possessed an inhibitory effect on all tested strains, depending on solvent of extraction and amounts of phenolic compounds.

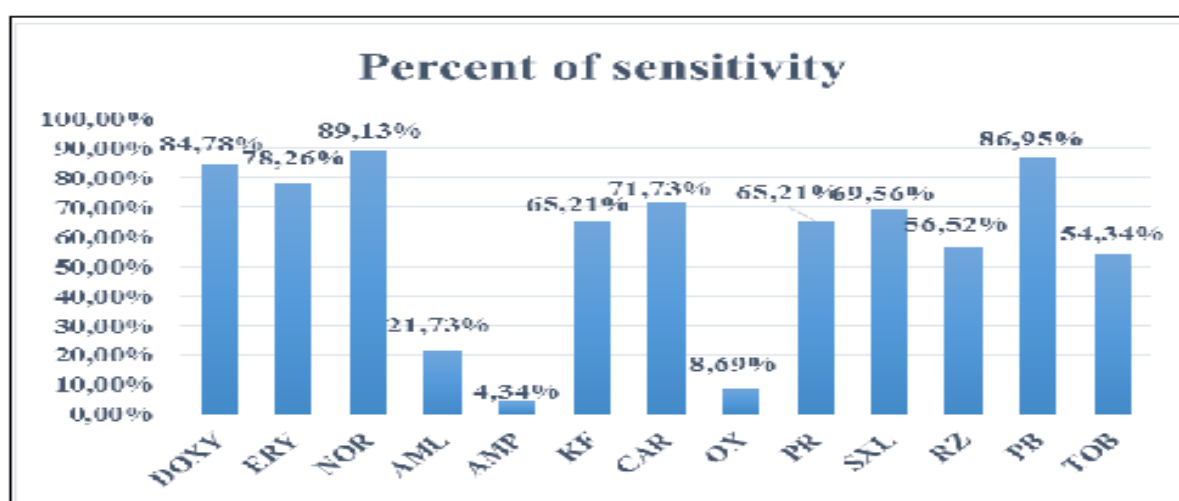


Fig. 1. *Bacillus cereus* isolates sensitivity towards antibiotics studied.

Swarming motility assay: The obtained results of motility revealed that methanolic extract possess a significant effect on swarming motility of strains tested.

The diameter of swarming zones was highly correlated to the increasing of phenolic concentrations and the highest zone diameter was obtained by the concentration of 10 mg/ml. (Fig. 7).

Biofilm inhibition assay: In biofilm quantification assay, a significant decrease was observed when bacterial strains grown in the presence of the methanolic extract. The appropriate concentrations of methanolic extract (0, 5; 1; 5 and 10 mg/ml) provides a decrease in biofilm growth. The reduction in biofilm biomass of the isolates tested range from 63, 33 to 81, 17%. (Table 3).

The biomass of biofilm formed by the different strains of *Bacillus cereus* decrease with the increase of the concentration of the methanolic extract and this reduction differ from stain to another. These results supposed that the methanolic extract of *A. visnaga* (L) has a strong effect against biofilm of *Bacillus cereus* due to their total phenolic content.

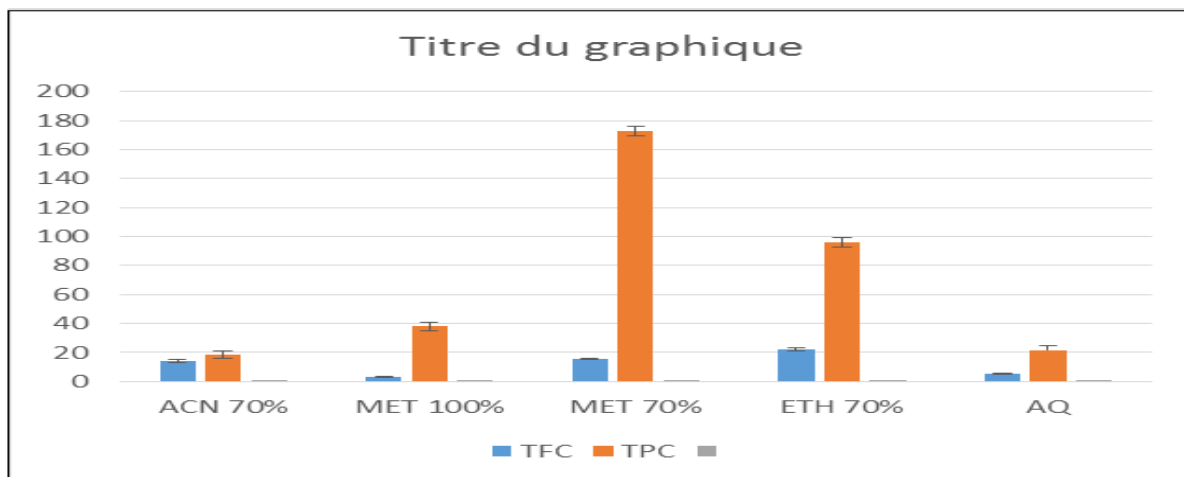


Fig. 2. Polyphenol and flavonoids content of *Ammi visnaga* (L) extracts.

Discussion

Although, substantial amount of data are available about the incidence of *B. cereus* in various types of food and food poisoning cases worldwide. (Stenfors *et al.*, 2008). Currently, the selective MYP plating medium is recommended by food authorities as standards for the detection of *B. cereus*.

The main identification feature of this medium is the lecithinase activity, resulting in opaque precipitation zones around suspect colonies. (Szabo *et al.*, 1984). The opaque zone might be due to the fact that the egg yolk tellurite emulsion used is a lipoprotein basically composed of lecithin, and lecithinase breaks down lecithin to produce an insoluble precipitate, resulting in opaque zones around the colonies. (Hussain *et al.*, 2011).

The obtained results designate that the studied *Bacillus cereus* strains are carrying a level of toxicity and virulence, as cited by Oh (2006), Kashid and

Ghosh (2010) which reported that the major features of *B. cereus* on plating media, produced caseinase, lecithinase with hemolytic activity. In this regard, Awany *et al.* (2010) reported that haemolysin, lecithinase and caseinase of *B. cereus* and *Staphylococcus aureus* from food samples are considered as virulence and toxicity factors. Our results are supported by the broad picture of antibiotic susceptibility patterns of *B. cereus* as shown by Fenselau *et al.* (2008).

Precedent works showed that antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* was highly susceptible to Erythromycin, Ciprofloxacin, Streptomycin, Chloramphenicol, and less sensitive to Ampicillin, Cloxacillin, Ampiclox, and Cotrimazole, (Umar *et al.*, 2006). Our finding can prove that actually antibiotics are widely used in foods, consequently they can be an important factor to transfer resistant antibiotic foodborne pathogens which can be very harmful to human health. (Khan *et al.*, 2000).

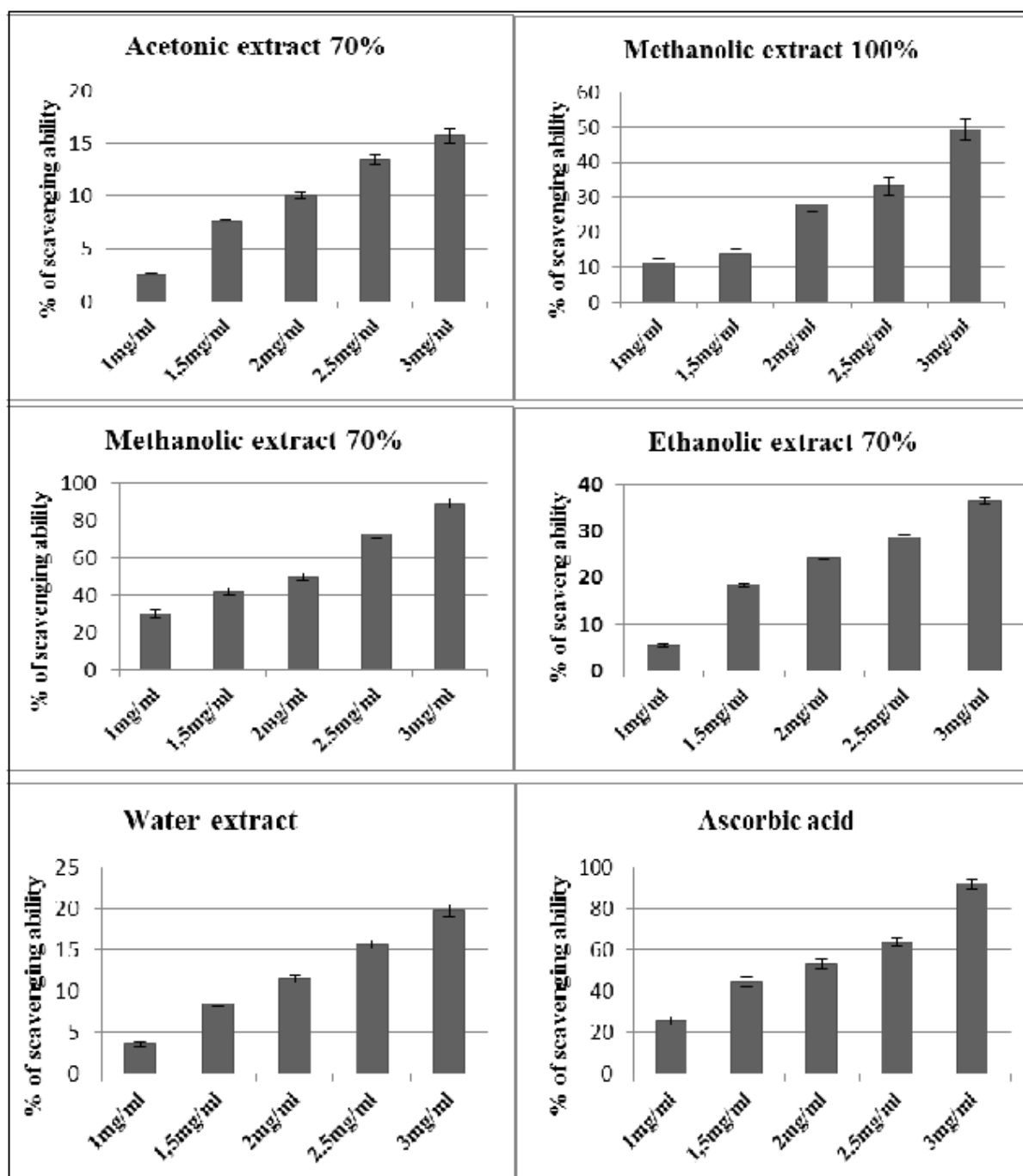


Fig. 3. Scavenging ability of different extracts of *Ammi visnaga* (L).

The difference in the yield of total phenols obtained from different plant extracts was mainly due to the difference in the nature of phenolic compounds obtained by each solvent used. (Ignat *et al.*, 2011). In addition, Horax *et al.* (2005) highlighted the importance of solvents effect that significantly influenced the quantity of phenolic compounds extracted. Following Ross *et al.* (2009), a great number of phenolic compounds can be obtained by methanol extraction

such as phenolic acids, flavanons, flavanols, anthocyanins, catechins, and procyanidins. These results highlight that the polarity of the extraction solvent used can influence the yield of extracted phenolic compounds. This result is in line with those obtained by Zhao *et al.* (2006), the solubility and the extraction yield of chemical constituents of a sample can be affected by the difference in polarity of the solvent used for extraction.

The quantification of the total phenolic content in the extracts showed that the aqueous mixtures at 70% solvent and in comparison with pure solvents, were more effective to extract the phenolic compounds. (Rødtjer *et al.* 2006) Lapornik *et al.* (2005) suggest that ethanol and methanol extracts (70%) represent higher values of total polyphenols than water extracts.

The results of free radical scavenging ability (DPPH assay) agreed with the results reported by Zhang *et al.* (2013). DPPH scavenging is significantly influenced by solvents used for extraction of polyphenols. Phenolic compounds have been investigated to be a strong hydrogen donors to the DPPH radical. (Von Gadov, Joubert, & Hansmann, 1997).

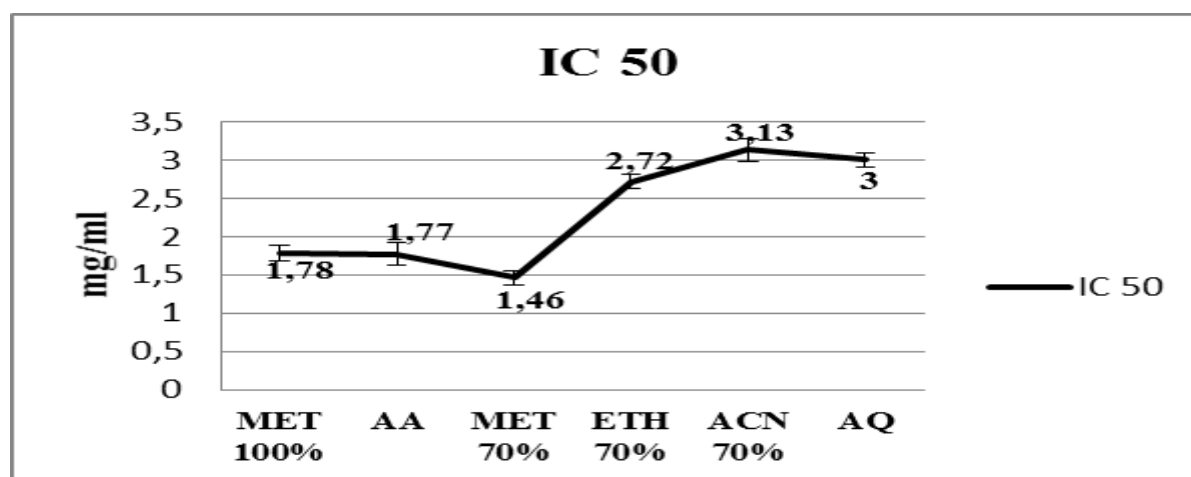


Fig. 4. IC₅₀ of different extracts of *Ammi visnaga* (L).

The antioxidant activity of the majority of plants is mostly due to the presence of phenolic compounds. It is known as free radical scavengers. (Skerget *et al.*, 2005). The antioxidant activity estimation and the ability of solvent to dissolve a selected group of antioxidant compounds can be influenced by the change in solvent polarity. (Zhou & Yu, 2004). The correlation between antioxidant activity and total phenol contents has been largely studied in different food products. (Kiselova *et al.*, 2006).

Our results of antioxidant activity obtained by the reducing power assay showed that the methanolic extract had the highest antioxidant activity values at 700 nm, this result was similar to those obtained from the yield of total phenolic compounds. Previous researches and reports in the literature agree with our results, phenolic compounds are the major phytochemicals responsible for the antioxidant capacity of natural extracts (Cevallos-Casals *et al.*, 2006), maybe due to their redox properties, which permit them to act as reducing agents, hydrogen donors, and singlet oxygen quenchers. (Chang *et al.*, 2001).

The antibacterial effect can be explained by the relationship between the number of hydroxyl groups and their position on the phenol group and their relative toxicity to microorganisms, the increase in hydroxylation induce an increase of antimicrobial activity. (Marjorie, 1999). The *Ammi visnaga* (L) or *Noukha* has been shown to be effective against microorganisms. (Abroush *et al.*, 2001). Jaradat *et al.* (2015) found that the plant extracts of *Ammi visnaga* (L) obtained by using organic solvents have shown a strong antimicrobial activity than the aqueous extract and variations among species were obvious. Baydar *et al.*, (2004) have suggest that the antibacterial activity of plant extracts is proportional to the amount of phenolic compounds in investigated plant.

Some researchers suggested that tannic acid and tannin are the main phenolic acids which can stopped *P. aeruginosa* swarming motility without reducing their growth capacity (Omay and Tufenkji, 2011). Proteins can have a strong effect on the mechanism of inhibition of swarming motility that is probably due to binding and precipitation of phenolic compounds to them. (Pratt and Kloter, 1998).

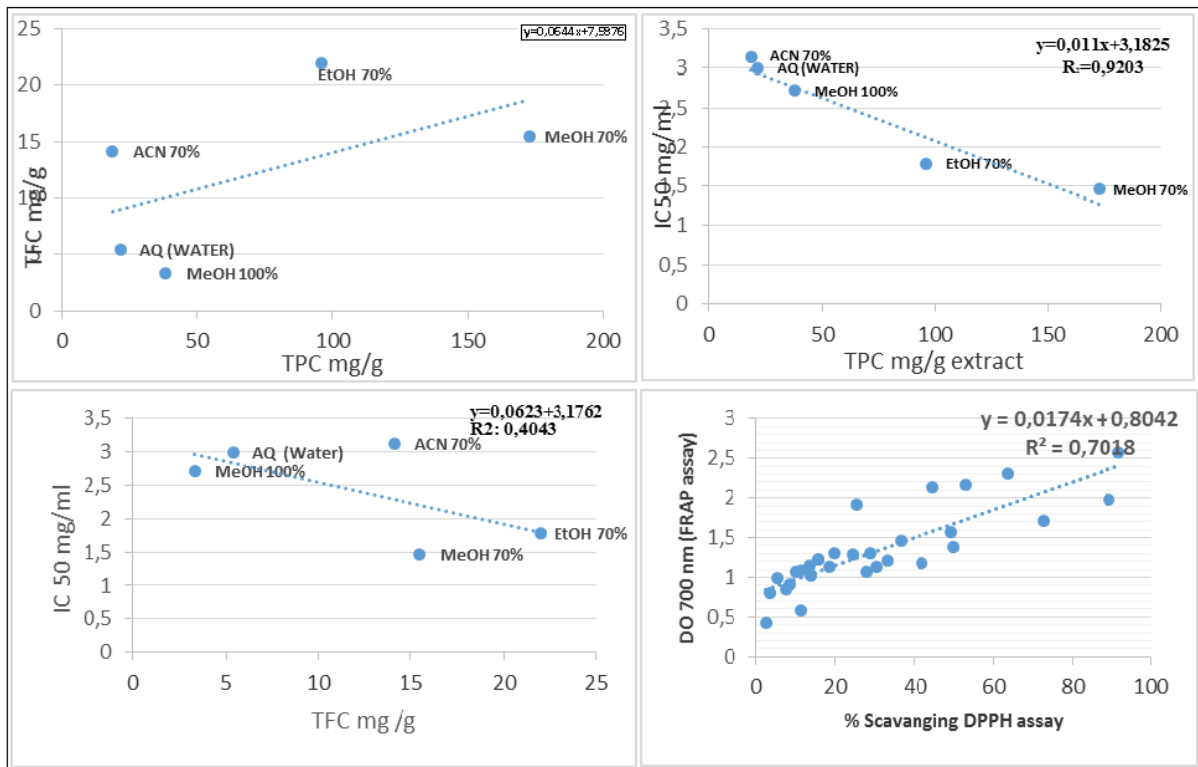


Fig. 5. Correlation between polyphenol and flavonoid content (a) and between antioxidant activity (IC 50) and polyphenol content of extracts of *Ammi visnaga* (L) (b). (c) Represent correlation between IC 50 and flavonoid content, and (d) correlation between antioxidant activities DPPH and FRAP methods.

In clinical and foodborne pathogenesis biofilm associated infection is known as a trigger to chronic diseases, food spoilage. Even dairy and refrigerated food spoilage was also created by the bacterial biofilm. (Teh *et al.*, 2014; Mizan *et al.*, 2015). Some previous works revealed that the enzymatic activity of glucosyltransferase which permit the colonization of

bacteria and their adherence can be affected by the phenolic compounds. (Yanagida *et al.*, 2000, Gregoire *et al.*, 2007). Biofilm formation can be inhibited by the action of phenolics due to lack of iron, some phenolics have intermediate property of iron chelating. (Devosset *et al.*, 1999).

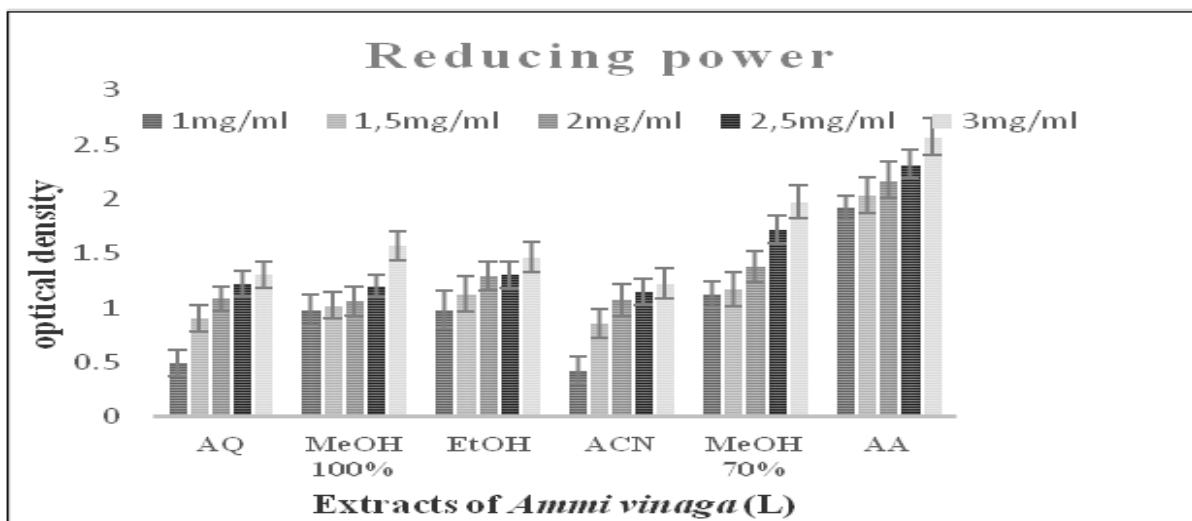


Fig. 6. Reducing power of *Ammi visnaga* (L) extracts.

The peptide's capability to cover either the surface of biomaterial or the bacterium itself, reduce the adherence of microorganisms on surface and decrease the biofilm growth. (Segev-Zarko *et al.*, 2015) Developed studies are demonstrating that there is a biological rationale between quorum sensing and

biofilm which work on a coordinate manner leading to spoilage. (Bai and Vittal, 2014.) Bacterial AHLs can be imitate by substances secreted by several plants and affect the regulated behaviors of quorum-sensing plant-associated bacteria, respectively. (Teplitski *et al.*, 2000).

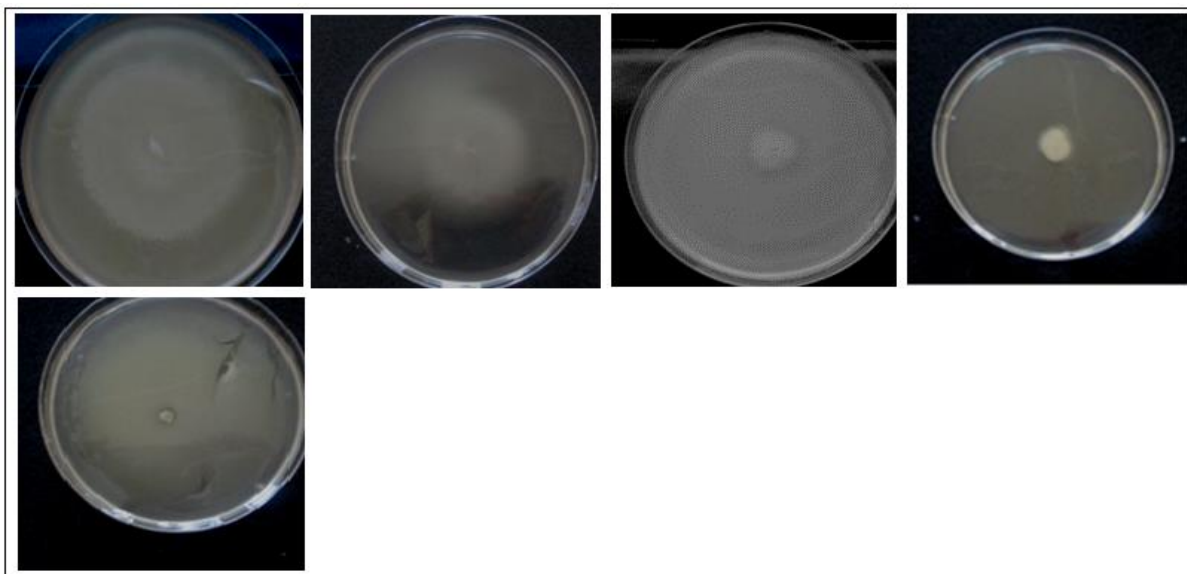


Fig. 7. Effect of *Ammi visnaga* (L) methanolic extract on swarming motility of *Bacillus cereus*.

Conclusion

In conclusion, the extracts of *Ammi visnaga* (L) obtained by using solvents with less polarity were strong radical scavengers than those obtained with high polarity solvents. The selection of the appropriate solvent is a important step to optimize the extraction of total polyphenol, flavonoid and antioxidant activities of the investigated plant extracts. Methanol was recommended as the best solvent for the production of antioxidant compounds from the aerial parts of the plant of *A. visnaga* (L). It also possess a strong antibacterial and antibiofilm activity against *Bacillus cereus* strains responsible for food spoilage. For this, it can be used in food industries as a natural preservative. However, further studies are needed to explore the individual or major polyphenolic groups and other bioactive compounds in the extracts of *A. visnaga* (L) and their contribution to health care and biotherapy. In addition, in vivo assay of antioxidant are recommended to confirm the strong potentiel of *Ammi visnaga* (L) to treat diseases caused by food spoilage.

Acknowledgements

This research was funded by the laboratory of Microbiology and vegetal biology at Abdelhamid Ibn badis University in Algeria.

References

- Abroush Z, Majd A, Rezaee MB.** 2001. Evaluation of antimicrobial effect of Tooth pick plant, Master of Science thesis. Biology department. Azad University.
- Andersson A, Rönner U, Granum PE.** 1995. What problems does the food industry have with the spore forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? International Journal of Food Microbiology **28**, 145-155.
- Awny NM, AbouZeid AM, Abdo MA.** 2010. Prevalence of toxigenic bacteria in: some Egyptian food, in: Proceeding of Fifth Scientific Environmental Conference, Alexandria Egypt. 107-124.

- Bai AJ, Vittal RR.** 2014. Quorum sensing inhibitory and anti-biofilm activity of essential oils and their in vivo efficacy in food systems. *Food Biotechnology* **28**, 269–292.
<http://dx.doi.org/10.1080/08905436.2014.932287>.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris, JC Turck M.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* **36**, 493-496
- Baydar NG, Ozkan G, Sagdiç O.** 2004. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitisvinifera* L.) extracts. *Food Control* **15**, 335–339.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00083-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00083-5).
- Benigni R, Capra C, Cattorini PE.** 1962. *Piantemedicinali - Chimicafarmacologia e terapia*. Vol. 1, Inverni& Della Beffa, Milano. 60-82.
- Cappucino JG, Sherman N.** 2004. *Microbiology A Laboratory Manuel Pearson Education (Singapore) Indian Branch*. New Delhi.
- Cevallos-Casals BA, Byrne D, Okie WR, Cisneros-Zevallos L.** 2006. Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties. *Food Chemistry* **96**, 273–280.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.032>
- Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF.** 2001. Antioxidant activity of extracts from acacia confuse bark and heartwood. *Journal of agriculture and food chemistry* **49**, 3420-3424
- Collins CH, Lyne PM, Grange JM.** 2001. *Collins and Lyne's microbiological methods*. 7th ed. London: Arnold.
- Cushnie TPT, Lamb AJ.** 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**, 343-356.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>.
- Curir PV, Sumere CF, Termini A, Barthe P, Marchesini A, Dolci M.** 1990. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Journal of Bacteriology* **92**, 1148–1153.
- Devoss JJ, Rutter K, Schroeder BG, Barry CE.** 1999. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *Journal of Bacteriology* **181**, 4443-4451.
- Fenselau C, Havey C, Teerakulkittipong N, Swatkoski S, Laine O, Edwards N.** 2008. Identification of b-lactamase in antibiotic-resistant *Bacillus cereus* spores. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 904-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00788>.
- Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD.** 2002. *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice. *Food Microbiology* **19**, 431-439.
<http://dx.doi.org/10.1006/fmic.2002.0505>.
- Granum PE, Lund T.** 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters* **157**, 23-228.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776>.
- Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Koo H.** 2007. Influence of Cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferase and *Streptococcus mutans* acidogenicity. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1960-1968.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03441.x>.
- Gudmundsdó BK.** 1996. Comparison of extracellular proteases produced by *Aeromonas salmonicida* strains isolated from various fish species. *Applied Bacteriology* **80**, 105–113.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.tb03196.x>
- Guttman DM, Ellar DJ.** 2000. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringensis* virulence factors. *FFMS MicrobiolLeH*. Jul **1**, **118(1)**, 7-13.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.15746968.2000.tb09160.x>

- Hegnauer R.** 1973. ChemotaxonomiederPflanzen, Band **8**, 418-433.
- Horax R, Hettiarachchy N, Islam S.** 2005. Total phenolic contents and phenolic acid constituents in 4 varieties of bitter melons (*Momordicacharantia*) and antioxidant activities of their extracts. *Journal of Food Science* **70**, C275-80.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.13652621.2005.tb07173.x>.
- Hussain MAA, Sanousi SME.** 2011. Prevalence of *Clostridium prefringens* and *Clostridium prefringens*-like organisms in faecalsamples of domestic animals. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* **2**, 89–101.
- Ignat I, Volf I, Popa VI.** 2011. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**, 1821–1835.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.12.026>.
- Jaradat N.** 2015. Phytochemical Screening and In-vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Entire Khella Plant (*Ammi visnaga*.L.) A member of Palestinian Flora. *Palestine International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* **7(1)**, 137-143.
- Kashid SG, Ghosh JS.** 2010. Production, isolation and characterization of exotoxin produced by *Bacillus cereus* NCIM-2156 and *Bacillus licheniformis* NCIM-5343, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **1**, 50–55.
- Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Cerniglia CE.** 2000. Transfer of erythromycin resistance from poultry to human clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 1832–1838.
- Kiselova Y, Ivanova D, Chervenkov T, Gerova D, Galunska B, Yankova T.** 2006. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from bulgarian herbs. *Phytotherapy Research* **20(11)**, 961-965.
<http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1985>.
- Lapornik B, Prošek M, Wondra AG.** 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* **71**, 214-222.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036>.
- Liaw SJ, Lai HC, Ho SW, Luh KT, Wang WB.** 2000. Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Proteus mirabilis* by p-nitrophenylglycerol. *Journal of Medical Microbiology* **49**, 725-731.
<http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-49-8-725>.
- Liu X, Zhao M, Wang J, Yang B Jiang Y.** 2008. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthusemblica* L.) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis* **21**, 219–228.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2007.10.001>.
- Marjorie CM.** 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12(4)**, 564–582.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf0100907>.
- Mizan MFR, Jahid IK, Ha SD.** 2015. Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge. *Food Microbiology* **49**, 41–55.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.009>.
- Oboh G, Alimiluyi AO, Akidahansi AA.** 2009. Changes in polyphenols and antioxidant activity during fermentation of some under-utilized legumes. *Food science and Technology. Interdium Vol 15 Issue 1*, 41-46.
<http://dx.doi.org/10.1177/1082013208101022>.
- Oh MH.** 2006. Ecology of Toxigenic *Bacillus* Species in Rice Products, University of New South Wales School of Chemical Engineering and Industrial Chemistry. *International Journal of Food Science & Technology*. Sydney.
- Omay C, Tufenkji N.** 2011. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthoeyanidins and other tannin-containing materials. *Applied and environmental microbiology* **77(a)**, 3061- 3067.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02677-10>.

- Oyaizu M.** 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition* **44**, 228-234 ().
- Peng JS, Tsai WC, Chou CC.** 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal of Food Microbiology* **77**, 11-18.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00060-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00060-0).
- Pratt LA, Kotter R.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation roles of flagella, motility and chemotaxis. *Molecular Microbiology* **30**, 285-293.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x>.
- Pruss BM, Dietrich R, Nibler B, Martlbauer E, Scherer S.** 1999. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 5436-5442.
- Regev-shoshani G, Ko M, Miller C, Av-Gay Y.** 2010. Slow release of nitric oxide from charged catheters and its effect on biofilm formation by *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 273-279.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00511-09>.
- Rødtjer A, Skibsted LH, Andersen ML.** 2006. Antioxidative and prooxidative effect of extracts made from cherry liqueur pomace. *Food Chemistry* **99**, 6-14.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.011>.
- Ross KA, Beta T, Arntfield SD.** 2009. A comparative study on the phenolic acid identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry* **113**, 336-344.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.064>.
- Segev-Zarko L, Saar-Dover R, Brumfeld V, Mangoni ML, Shai Y.** 2015. Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides. *Biochemical Journal* **468**, 259-270.
<http://dx.doi.org/10.1042/BJ20141251>.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T.** 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 945-948.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf00018a005>.
- Singleton VL, Rossi JA.** 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**, 144-158.
- Simões M, Bennett RN, Rosa EA.** 2009a. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports* **26**, 746-757.
<http://dx.doi.org/10.1039/b821648g>.
- Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z.** 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* **89**, 191-198.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.025>.
- Stenfors ALP, Fagerlund A, Granum PE.** 2008. from soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 579-606.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>.
- Szabo RA, Todd ECD, Rayman MK.** 1984. Twenty-four hour isolation and confirmation of *Bacillus cereus* in foods. *Journal of Food Protection* **47**, 856-860.
- Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO.** 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* **21**, 1199-1218.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>.
- Teh KH, Flint S, Palmer J, Andrewes P, Bremer P, Lindsay D.** 2014. Biofilm an unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? *International Dairy Journal* **34**, 32-40.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.002>.

- Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD.** 2000. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **13**, 637-648.
<http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.13.6.637>.
- Umar AS, Yerima MB, Uzal U.** 2006. Antimicrobial sensitivities of *Bacillus cereus* isolated from food samples sold in Bauchi metropolis to selected antibiotics. *Nigerian Journal of Microbiology* **20(1)**, 655-661.
- Valgas C, Souza SMD, Smânia EFA, Smânia Jr A.** 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology* **38**, 369-380.
<http://dx.doi.org/10.1590/S151783822007000200034>.
- Vanderzant C, Splittstoesser DF.** 1992. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 3rd edn. Washington DC, American Public Health Association.
- Vaquero MJR, Alberto MR, de Nadra MCM.** 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* **18**, 93-101.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.08.010>.
- Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF.** 1997. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry* **60**, 73-77.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00312-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00312-3).
- Watnick P, Kolter R.** 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* **182**, 2675-2679.
<http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000>.
- Yanagida A, Kanda T, Tanabe M, Matsudaira F, Oliveira CJG.** 2000. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48 (11)**, 5666-5671.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf000363i>.
- Zhang G, Hu M, He L, Fu P, Wang L, Zhou J.** 2013. Optimisation of microwave assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanuts shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities in vitro. *Food and bioproducts processing* **91**, 158-168.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2012.09.003>.
- Zhao M, Yang B, Wang J, Li B, Jiang Y.** 2006. Identification of the major flavonoids from pericarp tissues of lychee fruit in relation to their antioxidative activities. *Food Chemistry* **98**, 539.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.028>.
- Zhou K, Yu L.** 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **37**, 717-721.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.008>.

Effect of phenolic extracts of Algerian medicinal plants on the bacterial growth and adherence of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* pathogens responsible of food poisoning.

Belkacem Imane*¹, Rebai Ouafa¹, Djibaoui Rachid¹

*Corresponding author:

Belkacem Imane

¹Laboratory of Microbiology and vegetal Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mostaganem, ALGERIA.

Received: 08 February 2017

Accepted: 09 May 2017

Published: 02 September 2017

Abstract

Artemisia, one of the larger genera in the family Asteraceae, comprises from 200 to more than 500 taxa at the specific or subspecific level. *Artemisia herba-alba* Asso (Shih) is grown in North Africa and certain parts of Asia and Middle East. It is one of the most widely used plants in the Algerian folk medicine. The antioxidant and free radical scavenging activities of the methanolic extracted materials were tested together with their antibacterial effects against isolated bacterial strains causing food poisoning. In summary, *A. herba-alba* Asso represent a good phenolic and flavonoid content (161, 64 mg/g and 16,83mg/g, respectively) in comparison with *T. capitatus* L which represent a phenolic content of 131, 48 mg/g and 14, 96 of flavonoid content. The results shows also that the methanolic extracts of the two plants possess a strong antioxidant (DPPH, FRAP assays) and antibacterial activities, which supports their ethnopharmacological use and *A. herba alba* represent the highest values (IC 50: 2, 35 mg/ml and OD 1, 13 at 700nm). Our results show the interest of *A. herba-alba* Asso and *T. capitatus* L, among other medicinal plants, in search of new chemo-preventive agents against biofilm and planktonic growth of food spoilage pathogens. Further studies are envisaged to target the most interesting molecules responsible for these activities. It is concluded that organic extracts from *Artemisia herba alba* Asso, exert strong antioxidant activities which are related to their polyphenol contents. These findings demonstrate the remarkable potential of these plants as valuable source of Natural antioxidants.

Keywords: food poisoning, *S. aureus*, *B. cereus*, *A. herba alba*, *T. capitatus*, Antioxydant.

Introduction

Foodborne illness is a major problem with enormous associated costs. Foodborne pathogens occur widely in nature and it is difficult to prevent them from entering raw foods. *Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacterium and is considered one of the most prevalent causes of gastroenteritis worldwide [1], with milk and dairy products and meat products (particularly cooked and fermented) being some of the most frequently involved foods. *Bacillus cereus* belongs to a genus of Gram-positive, endospore-forming bacteria, which is involved in foodborne outbreaks with variable incidence from country to country [2]. Medicinal plants primary and secondary metabolite constituents have a long history of use in old and modern medicines and in certain systems of traditional medicines, and are considered the sources of important medications such as vincristine, codeine, quinine, morphine, digoxin, atropine and others¹. In Algeria *Artemesia herba-alba*, and

thyme (*T. capitatus*) are largely used in traditional treatment of digestive diseases and culinary but not very well studied scientifically. *Artemesia herba-alba* and thyme (*T. capitatus*) are aromatic plants naturally grown in mountain areas of Algeria. *A. herba-alba* is used for treatment of gastric disturbances, such as diarrhea, abdominal pain and for healing external wounds. It is also used as remedy for gastritis and inflammation of the gastrointestinal tract [3]. The thyme has traditionally been considered as an anthelmintic, antispasmodic, carminative, emmenagogue, expectorant, rubefacient, sedative, stimulant, and tonic. The plant has been used as a folk medicine against asthma, arteriosclerosis, colic, bronchitis, coughs and diarrhea [4]. On the other hand, phenolic compounds, in addition to their antimicrobial properties, are known to have antioxidant ability because of their role as free radical scavengers. Their antioxidant potential depends on the number and arrangement of the hydroxyl groups and the extent of structure conjugation [5]. A reagent with a triple function as flavoring, antioxidant (preventing the chemical spoilage of food) and antimicrobial (against pathogenic and spoilage

DOI:10.5138/09750185.2018



This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

microorganisms) would be of interest to the food industry, because it would enable the total amount of additives used in foods to be reduced.

Materials and Methods

Isolation of *Bacillus cereus* strains from different Food Sources

Several Samples from local commercial supermarket and home-made foods were collected. The used foods are mainly: fresh and raw ground meats, poultry, fish, dairy products and some cooked dishes. All food samples were transported in sterile plastic boxes. The isolation of *Bacillus* species was performed according to the conventional procedure by serial dilution in sterile phosphate buffered saline. 10 g of food sample was added in 90 mL of phosphate buffered saline; the different solutions were heated at 85 C for 10 min. 100 μ l from the appropriate dilutions were surface plated on LB agar, and on Mannitol egg-yolk polymyxin B (MYP) agar plates [6]. The isolation of *S. aureus* was done by the method described previously using Baird parker agar, after a 10-fold serial dilution, a volume from each dilution was spread onto plate containing Baird Parker (BP) agar with 20% egg yolk telluride emulsion by drop plating technique. Plates were incubated aerobically at 37 C for 24 - 48 h. [7,8]. The characterization of the isolates was performed by studying colonies morphology, Gram stain, lecithinase, hemolysis on blood agar, coagulase production and biochemical tests, using API 20 E, API Staph system and Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. [9].

Screening of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* virulence

The hemolytic activity was assessed on blood agar medium (The isolates were spotted on blooded nutritive agar medium. [10]. After incubation at 33 C for 18 h. The strains were classified as α (partial), β (total), or non-hemolytic. The production of phospholipase-C was measured by adding egg yolk emulsion up to 5% (v/v) to nutritive agar. Each isolate was spotted on the medium and the plates were incubated at 30 C. Opaque zones around the colonies, caused by hydrolysis of lecithin indicated lecithinase production. [11]. Caseinase activity was identified according to the method of Gudmundsdóttir [12] on milk agar medium. The isolated bacteria were streaked on the appropriate medium for 24 h at 37 C. A transparent zone around the colonies indicated caseinase activity. The ability to hydrolyse starch was tested by inoculating on the starch agar medium; the zones were detected by adding lugol to the plate's surfaces. [10].

Coagulase test tube

Confirmation of the genus, *Staphylococcus* was done by Gram staining and various biochemical tests, while the species, *S. aureus* was confirmed by Coagulase test as described by Monica [13].

Original CRA (CRAori) test

S. aureus strains were cultivated on BHIA (Difco) with 0.08 % (w/v) Congo red (Sigma- Aldrich, Germany) supplemented with 5% (w/v) sucrose. The strains were inoculated in streaks and incubated at 35 C under aerobic conditions for 24 and 48 h. The staphylococci bio film producer strains formed black colonies, while the non-bio film producer strains formed red colonies. The stains were incubated at 35 C under microaerophilic conditions and were evaluated after 24 and 48 h [14].

Plant material

The plant materials were studied following its large use in Algerian culinary and its potential medicinal uses. The plant used in this study consisted by *Thymus capitatus*, collected during spring season from the region of Safsaf (Mostaganem, Algeria), *Artemisia herba alba* (Asso) from the region of Saida, Algeria. The identification of the different plant studied was done at Microbiology and vegetal biology Laboratory at Mostaganem University. The plants were washed with distilled water and dried at room temperature under shade. The dried aerial parts were powdered by a blender and stored away from light for further studies.

Extraction procedure

70% methanol (v/v), was used to extract phenolic compounds. 10% w/v of powdered plant material was extracted by 100 ml of solvent. The extraction of both plants *A. herba alba* and *T. capitatus* was done under reflux using methanol as solvent. The extraction was performed during 30 min. Centrifugation was done at 3000 rpm/20min, and vacuum filtration was used to separate the liquid extract. The filtrates were collected and the solvent was evaporated at 40 C using a rotary vacuum evaporator.

Total phenolic and Flavonoid content

Phenolic content of the obtained extracts was determined by the method of Singleton and Rossi, [15]. Gallic acid concentrations were prepared as standard in methanol. To determine the flavonoid content (TFC), the aluminum chloride colorimetric assay was used as described by Liu et al. [16]. Quercetin was used for the calibration curve. The results of flavonoids content were expressed as mg quercetin equivalents (QE) per g. All the samples were analyzed in triplicate.

Measurement of radical-scavenging activities



The antioxidant activity of the phenolic compounds used as antimicrobials was determined according to two procedures: 1) the scavenging of DPPH radical, 2) the FRAP method. The scavenging of DPPH radical was carried out as described by Shimada *et al.*, [17]. The FRAP method (procedure 2) was conducted according to the procedure of Oyaizu [18]. All data were expressed from three assay methods.

Antimicrobial activity of plant extracts

Agar-well diffusion assay: The antibacterial activity of the different plant extracts was evaluated against five isolates of food spoilage *Bacillus cereus* and five of *Staphylococcus aureus*. The turbidity of the bacterial suspensions was adjusted to an equivalent to 0.5 McFarland. The agar-well diffusion assay was performed according to the recommended method of Valgas *et al.* [19]. A standardized bacterial inoculum was uniformly surface spread on a Mueller-Hinton agar. Next, 80 μ L of each plant extract dissolved in distilled water (10mg /ml) was added into the wells of 6 mm in diameter, the plates were incubated at 30 C for 24h and the measure of the diameter of inhibition zones was done. Well containing the solvent and water only were used as controls. All tests were done in triplicate.

Effect of plant extracts on the adherence and planktonic growth of *B. cereus* and *S. aureus*

This test was used to detect the ability of bacteria to adhere to smooth surface (glass tubes), and to evaluate the effect of *A. herba alba* and *T. capitatus* extracts on the adherence and planktonic growth of the tested strains. The test was done by cultivation the tested bacteria in glass tubes containing (2ml) of Trypticase soy broth (TSB) with 200 μ l of the different concentrations of plant extracts (10 μ L-200 μ L) obtained after dilution of a solution stock (2mg/ml) of each plant extract. The control tube contains (2ml) of TSB without extracts. All the tubes were incubated for 24 h at 37°C. After incubation, the absorbance of the bacterial suspensions was read at 600 nm. After that, the contents of tubes were removed and tubes were stained by adding (2 ml) of 0.1% crystal violet for 30 minutes, then the effect of plant extracts on adhering bacteria was seen. Slime production was visible through a

film that occurred on tube walls. After 30 minutes, the dye was removed and the wells were washed thoroughly, 2 ml of 95% ethanol was added and incubated for 15 minutes. The reaction mixture was read at 595 nm. [20].

Statistical analysis

All the experiments were carried out in triplicate. The data were analysed by ANOVA. The IC50 values were calculated from linear regression analysis. Correlations between variables were established by excel.

Results

Isolation and identification of the isolated *Bacillus cereus* and *S. aureus* strains

24 isolates of *B. cereus* and 18 of *S. aureus* were selected after screening of their ability of resistance to penicillin G and other antibiotics (data not shown). 5 isolates of each genus showing high resistance to the different antibiotics were selected for this study. The colonies of isolated *B. cereus* bacteria were big waxy white or gray, surrounded by an opacity zone. Unable to catabolize mannitol when cultured on MYP agar. The isolates were gram positive rods. Motile, and grow positively in 7% NaCl but could not grow at 50 C. (Table 1). While, the colonies of *S. aureus* isolates were black with an opacity zone, all *Staphylococcus aureus* isolates were found able to ferment mannitol sugar and positive to coagulase, and 12 strains (66,66%) of *S. aureus* were able to form biofilm when were cultivated on CRA agar. The isolates were gram positive cocci not motile and were able to grow in 7, 5 % NaCl (Chapman agar). The presence of *S. aureus* in these samples was determined by plating on BP agar, followed by confirmation via biochemical tests. (Table 2). The identification of the above species was confirmed by API 20 E and API Staph system as recommended by bergy's manual. All *Bacillus cereus* and *S. aureus* stains were beta-hemolytic producing phospholipase C, amylase and caseinase. The obtained results indicate that the studied *Bacillus cereus* and *S. aureus* strains are carrying a level of toxicity and virulence.



Table 1: Identification of isolates of food spoilage *Bacillus cereus*

	Gram-endospore	Catalase	Oxydase	Mobilité	50°C	Indole	VP	Citrate	Urease	Nitrate	OF	7%NaCl	Man
BCSV1	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BM18	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
BF15	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BL5	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BV12	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
LC2	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
BVDE17	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BRIS7	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BY5	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BLB1	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BP12	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BS2	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
BP14	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BV22	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BLP2	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BM23	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BC13	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
BSM11	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
BL3	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BFMG16	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BSEM4	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BRIS3	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BM11	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BM2	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-

Table 2: Identification of isolates of food spoilage *Staphylococcus aureus*

	Gram	Catalase	Oxydase	Mobilité	Indole	V P	Nitrate	7,5%NaCl	Man	Hémolyse	Coagulase	Urease
SVDE10	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
SYDN1	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SPTS2R	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SVLY7	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SEPC7	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
SLV5BP	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SVDE7	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SLVC15	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SFMG2	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
SLGM1 1	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SSEM2	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SRSC5B	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
SLVC9	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
SVDE9	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SEPC4	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SCHR7	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SFMG1 4	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SYLG12	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Total phenolic and Flavonoid content

The results in figure (1) show the extraction yield of total phenols and flavonoid from the different plant extracts. This yield increase

with the increase of the concentration of the extracts used in this study and *A. herba alba* represents the highest content of polyphenols and flavonoids (161, 64 mg/g and 16,83mg /g) followed by *T. capitatus* (131, 48 mg/g and 14,96).

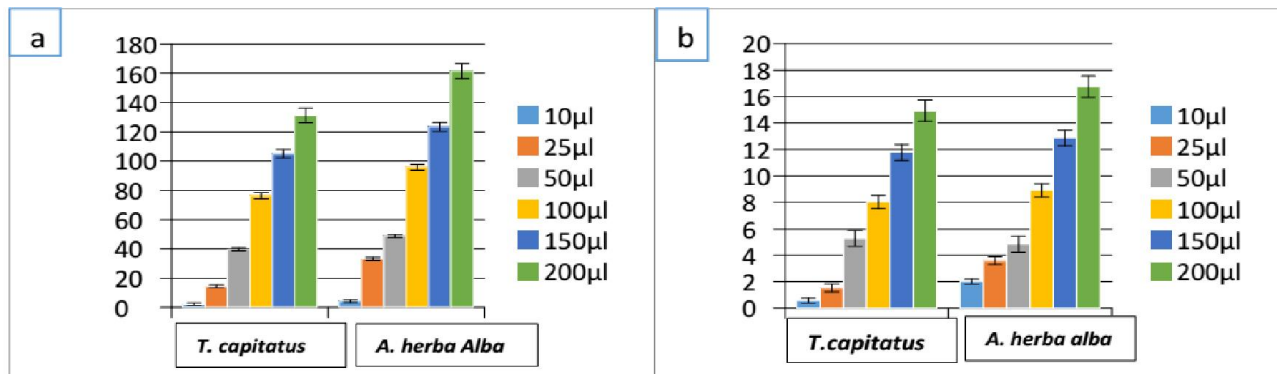


Figure 1. Total phenolic content (a) and flavonoid content (b) of *T. capitatus* and *A. herba alba* extracts.

Measurement of radical-scavenging activities

To evaluate the antioxidant activity, two methods were used DPPH and FRAP. For the first method and in comparison with ascorbic acid (AA) as positive control, it was found that methanolic extract of *A. herba alba* represented the highest DPPH scavenging activity (91, 65% +0,001), this value was significantly different from *T. capitatus* extracts which represent 80,13%+ 0,027. (Figure. 2). These values were lower than those obtained by ascorbic acid (positive control) which represent 91, 79%. IC 50 values obtained

for the investigated plant extracts, methanolic extract of *A. herba alba* was found to be 2, 35 mg/ml while *T. capitatus* extracts was 13,62 mg/ml and ascorbic acid represent a value of 12,21 mg/ml. The results indicate that the scavenging ability of methanolic extract of *A. herba alba* (Asso) on DPPH radical was strong. The results of FRAP method confirmed those obtained by DPPH assay and the extract of *A. herba alba* (Asso) represented the highest values of DO (0, 16-1, 13) at 700 nm (Figure 3). These results were correlated with the results of phenolic contents.

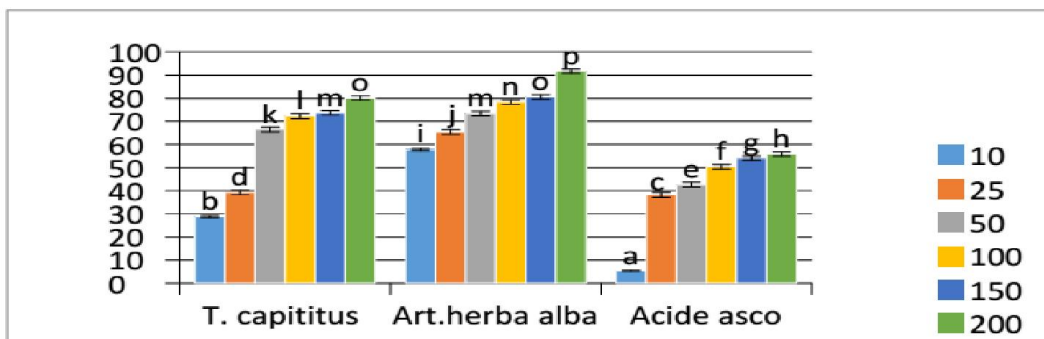


Figure 2. Scavenging ability of different plant extracts.

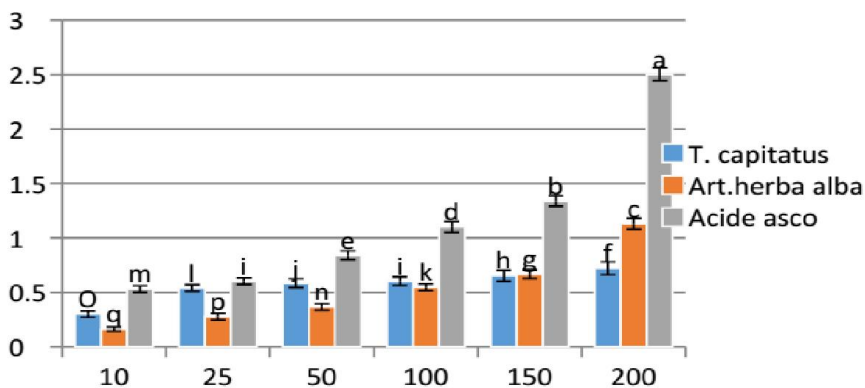


Figure 3. Reducing power of plant extracts.



Antimicrobial activity of plant extracts (Agar-well diffusion assay)

The results of antibacterial activity against strains of *Bacillus cereus* and *S. aureus* are illustrated in figure 4. The inhibition zones of

bacterial strains obtained by the *A. herba alba* extract were in the range of $10,33 \pm 0,05$ to $12,66 \pm 0,05 \pm 1$ mm, which was significantly different from those obtained by a *T. capitatus* extracts with $7 \pm 0,05$ to $9 \pm 0,05$, respectively. It can be observed that the extracts studied possessed an inhibitory effect on all tested strains, depending on plant extracts and amounts of phenolic compounds.

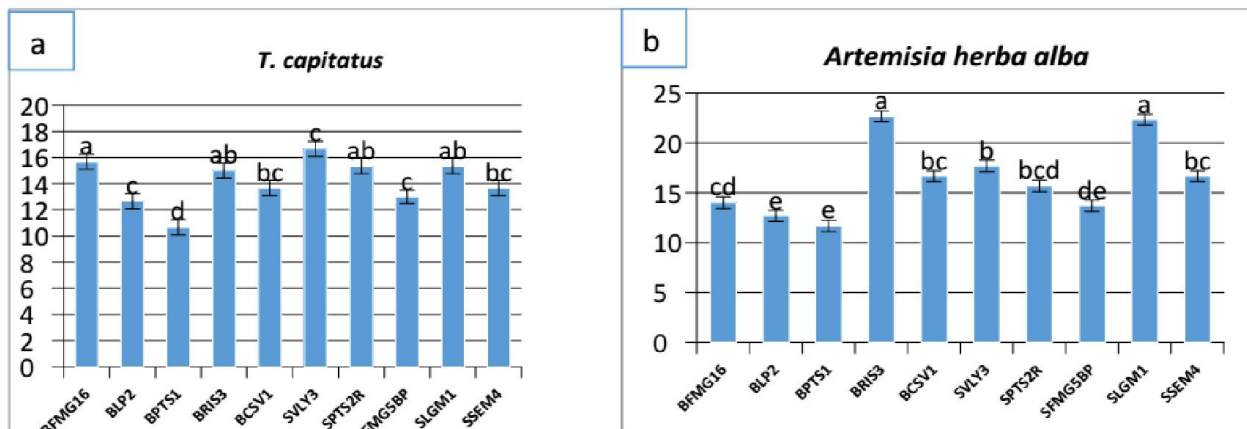


Figure 4. Antimicrobial activity of *T. capitatus* (a) and *Artemisia herba alba* (b) extracts against isolates of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*.

Effect of plant extracts on the adherence and planktonic growth of *B. cereus* and *S. aureus*

According to the obtained results we found that both methanolic extracts *Thymus capitatus* and *Artemisia herba-alba* inhibited bacterial growth of different isolates of the two species studied. The results presented in the figure (5 and 6) showed that in the case of low concentrations (0.5 mg / ml) of the tested extracts, a small decrease in bacterial growth of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* strains (OD 1.12 to 1.09) and (OD of 1.54 to 0.75), respectively, was observed by the *Thymus capitatus* extract. About *Artemisia herba-alba* the OD values obtained are 1.21 to 1.12 for *Bacillus cereus*, and 1.09 to 0.75 for *Staphylococcus aureus*. A significant reduction in bacterial biomass formed by the two strains studied was observed in the presence of methanol extracts of *Thymus capitatus* and *Artemisia herba alba* at a concentration of 2 mg/ ml. From the results obtained in the inhibition of bacterial growth of *Staphylococcus aureus* and *B. cereus* by the two plant extracts, we found that these inhibition differ from strain to another. The results presented in the figures 7 and 8 have shown that biofilm formation decreases with the increase of the concentration of methanolic extracts of *Thymus capitatus* and *Artemisia herba-alba*, except for BFMG16, BPTS1, SVLY3 and SSEM4 strains that the bacterial biofilm grew in the presence of plant extracts studied, which explains that these strains are resistant to our extracts tested. The antibiofilm activity of *Artemisia herba-alba* extract was

higher on both bacterial species than the extract of *Thymus capitatus*. We tested by the method of crystal violet the capacity of ten (10) different strains of our cohort belonging to *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* to form in vitro bacterial bio films in the presence of extracts from *Thymus capitatus* and *Artemisia herba-alba*. For inhibiting biofilm formation most of the tested bacterial strains was lower in the case of the concentration (0.5 mg / ml) and for *Bacillus cereus* strains, the percentage inhibition obtained for the extract *Thymus capitatus* was 7.19 up to 22.48% for the *Artemisia herba-alba* was 23.41 to 40.10%. The percentage of biofilm formation inhibition obtained with the extract of the plant *Thymus capitatus* against the growth of *Staphylococcus aureus* is 10, 20% to 56.75% for the extract of *Artemisia herba-alba* the values obtained are 1.13% up to 34.59%. At high concentrations (2 mg/ ml), the percent of inhibition of biofilm formation was raised to extract *Thymus capitatus* was 26, 02% up to 50.33%, while the *Artemisia herba-alba* represented a percentage of inhibition of 38.82% to 59.42% vis-a- vis the various *Bacillus cereus* isolates. On *Staphylococcus aureus* strains were less sensitive to different concentrations of both methanolic extracts tested. The percentage inhibition obtained with the extract of *Thymus capitatus* was 21.12% to 67.07%, and 13.59% up to 47.53% were obtained by the extract of *Artemisia herba-alba*. All these results showed that the percentage of inhibition of biofilm formation by both extracts of the test plants, increases with increasing the concentration of the methanol extract of each plant extract of *Artemisia herba-alba* was more effective at inhibiting biofilm formation than *Thymus capitatus*.



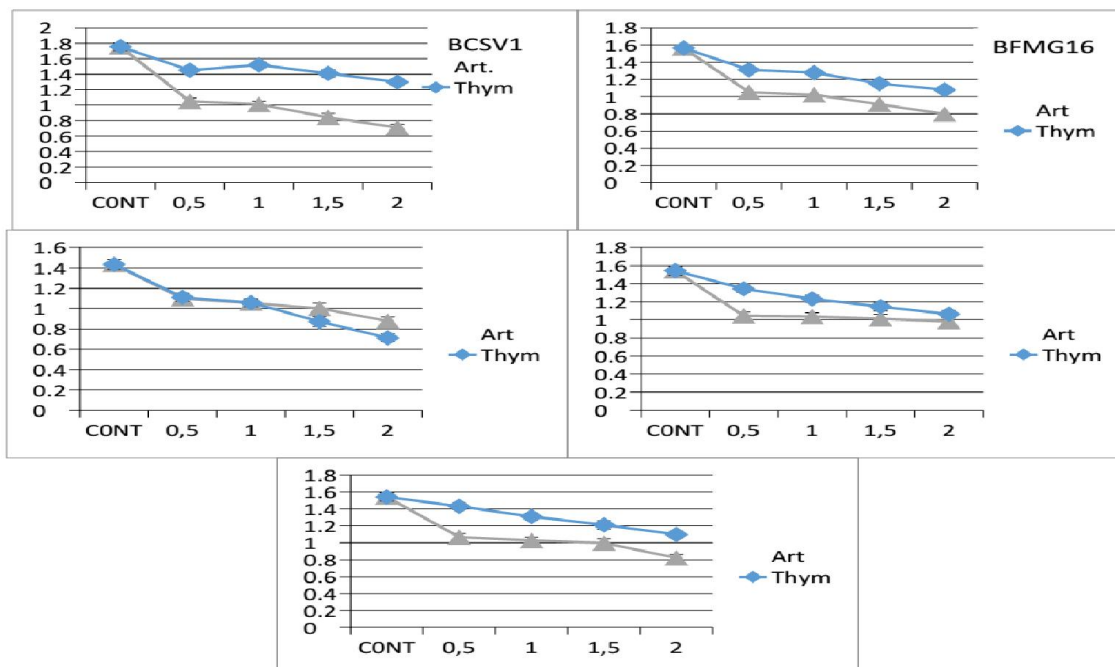


Figure 5. Inhibition of planktonic growth of *Bacillus cereus* by methanolic extract of *Artemisia herba-alba* and *Thymus capitatus*.

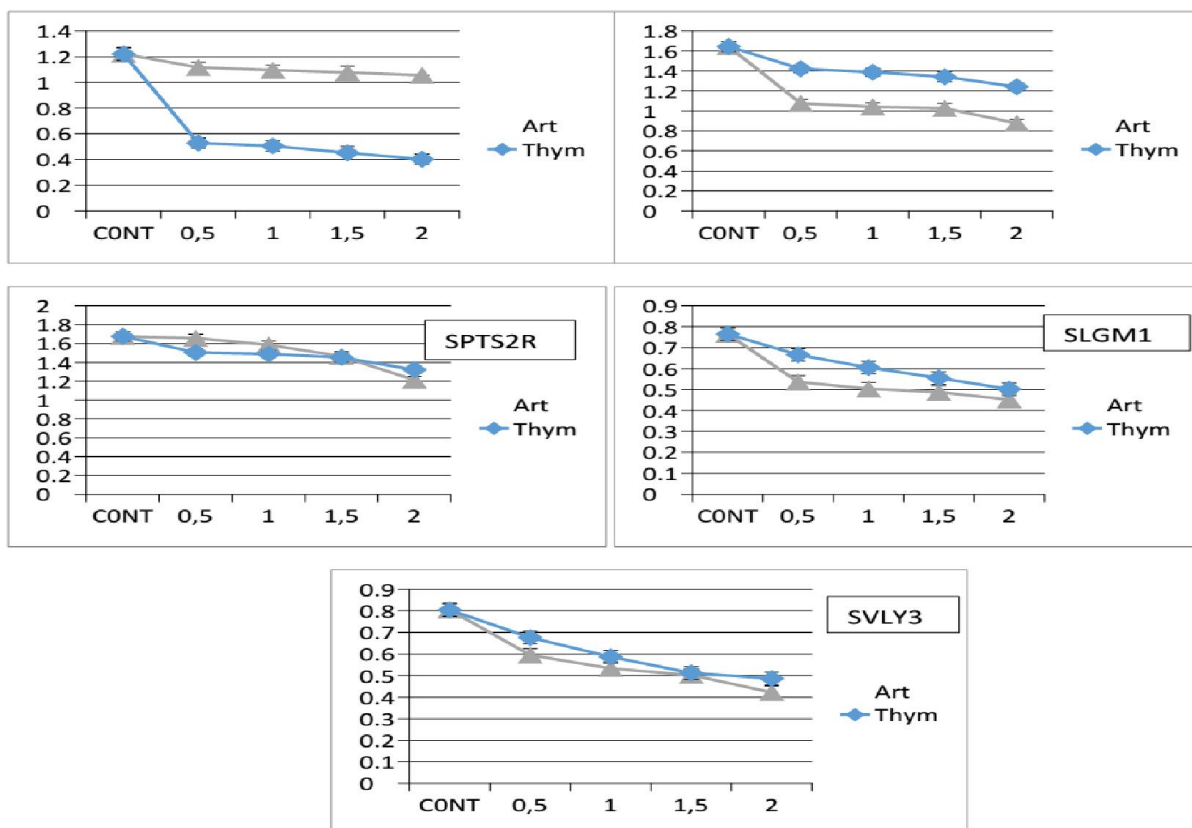


Figure 6. Inhibition of planktonic growth of *Staphylococcus aureus* by methanolic extract of *Artemisia herba-alba* and *Thymus capitatus*.



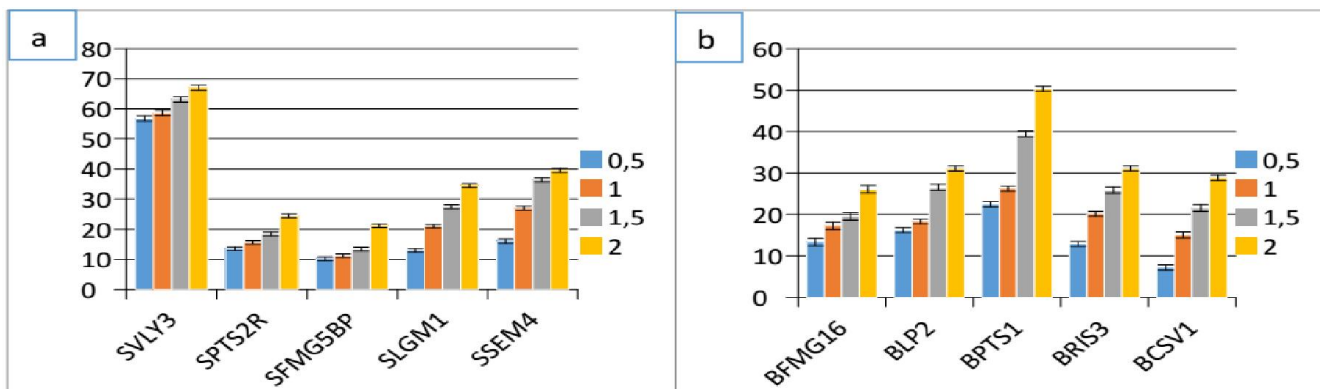


Figure 7. % Inhibition of mature bio films of *Staphylococcus aureus*(a) and *Bacillus cereus*(b) by the methanolic extract of *Thymus capitatus*.

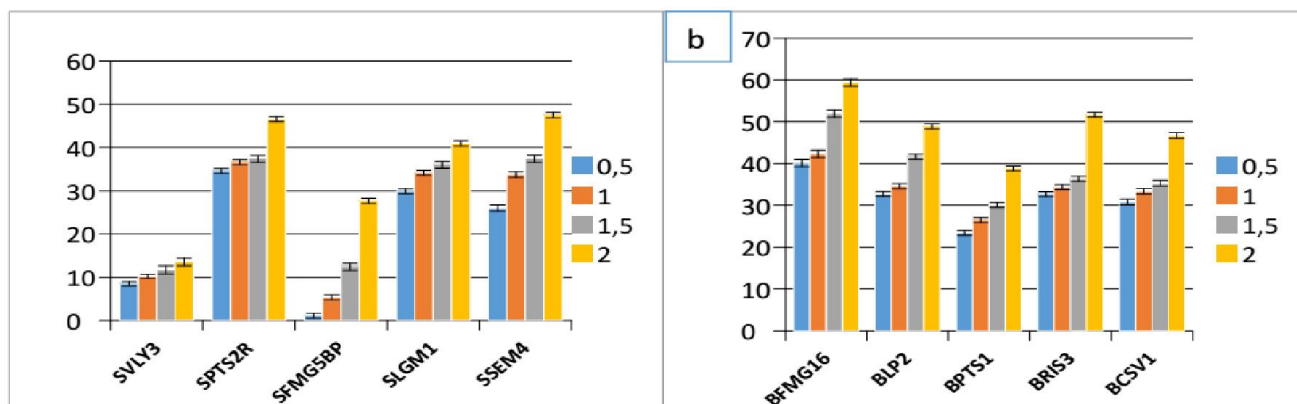


Figure 8. % Inhibition of mature bio films of *Staphylococcus aureus*(a) and *Bacillus cereus*(b) by the methanolic extract of *Artemisia herba-alba*.

Discussion

Spices are important vectors for various microorganisms implicating possible health problems for consumers as well as quality and shelf-life problems for foods. Studies on the microbiological quality of spices demonstrated profiles of microorganisms, including total heterotrophs, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Shigella* [21, 22]. Meat and milk products are found to be among the most frequently involved matrices during outbreaks of food poisoning [23, 24]. 13 staph enterotoxins foods that have been frequently incriminated in staphylococcal intoxication include meat and meat products, poultry and egg products, milk and dairy products, bakery products, particularly cream filled pastries and cakes salads, , and sandwich fillings [25, 26]. *B. cereus* is an important underestimated foodborne pathogen that is ubiquitous in the environment [27]. The contamination of milk and other dairy products with *B. cereus* is a common problem due to its effect on the quality of the products and the potential health hazards of the presence of toxigenic strains [28]. The pathogenicity of foodborne *S. aureus* is associated with the ability of some strains to produce enterotoxins [23]. The resistance to antimicrobials, particularly to b-lactam antibiotics, has also raised high concern as

an emerging problem in the food environment [29]. According to the results of the present study, most *B. cereus* group strains produced extracellular enzymes, such as protease, lipase, lecithinase, gelatinase and amylase. In Italy, Cosentino et al. [30] reported that nearly all strains with their origin in dairy products origin showed a strong enzymatic activity by hydrolyzing casein, gelatin, starch, and olive oil. In addition, Molva et al. [31] noted that most of *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains from cheese samples were found to produce lecithinase, gelatinase, lipase and protease. In another survey, De Jonghe et al. [32] investigated the production of the spoilage enzymes that adversely affect milk quality among the *Bacillus* species. *Bacillus* strains were strongly proteolytic and lipolytic, but lecithinase activity seems to be the less abundant trait. Pathogenic staphylococci are commonly identified by their ability to produce coagulase, and thus clot blood [33]. Following Ross et al. [35], a great number of phenolic compounds can be obtained by methanol extraction such as phenolic acids, flavanons, flavanols, anthocyanins, catechins, and procyanidins. The quantification of the total phenolic content in the extracts showed that the aqueous mixtures at 70% solvent and in comparison with pure solvents, were more effective to extract the phenolic compounds. [36]. In fact, recent studies showed that many flavonoids and related polyphenols contribute significantly to the total antioxidant activity



of many medicinal plants [37]. Thus, our data support conclusions of others who attributed antioxidant activities to the presence of phenolic compounds in thyme [38, 39]. Recent studies showed that natural antioxidants such as polyphenols are often added to foods to stabilize them and prevent off-flavour development and considerable interest for their potential role as functional foods or nutraceuticals [40]. In fact, it has been found that antioxidant molecules such as polyphenols, flavonoids, and tannins reduce and discolour DPPH due to their hydrogen donating ability [41]. These results may be due to hydroxyl groups existing in the chemical structure of phenolic compounds from *T. capitatus* extracts that can provide the necessary component as a radical scavenger [42, 43, 44]. Thymol is a natural phenolic monoterpene, known for its antioxidant [45] and anti-inflammatory [46] properties. It also has a significant effect against several pathogens such as bacteria [47]. Phenolic compounds were reported to be very strong antioxidants [48]. The correlation between antioxidant activity and total phenol contents has been largely studied in different food products. [49]. It has been reported that amount of total phenolic compounds in Aseteraceae varieties is higher than in other families. Indeed, amounts of total phenolic compounds in extracts of plants we tested were higher compared to what was reported in other plants [34]. Interestingly, the amounts of total phenolics and flavonoids in *A. herba-alba* extract were higher compared to what was found elsewhere [50]. Al Mustafa and Al Thunibat [51] found a phenolic amount in methanolic extracts from *A. herba-alba* shoots fourfold lower than what we measured. These differences may be due to variability of phenolic metabolism in different *A. herba-alba* organs, but also to differences in climate conditions (hot temperature, high solar exposure, dryness, short growing season) between Central Tunisia and other countries. It was reported that *Artemisia herba-alba* has a weaker antibacterial activity than the related species of *Artemisia* [52, 53]. Antibacterial activities of flavonoids were described previously [54]. Various plant products, particularly spices and extracts of various herbal plants were widely utilized as natural antimicrobials and antioxidants [55]. The demand of these herbal products is increasing because of their antimicrobial activity against many human as well as animal pathogens [56]. In clinical and foodborne pathogenesis bio film associated infection is known

as a trigger to chronic diseases, food spoilage. Even dairy and refrigerated food spoilage was also created by the bacterial bio film. [57, 58]. Developed studies are demonstrating that there is a biological rationale between quorum sensing and bio film which work on a coordinate manner leading to spoilage. [59]. Adhesion and bio film formation are also important virulence factors in *S. aureus* since they promote the colonization of food environments [60]. In fact, bio films formed on food processing surfaces enhance the tolerance to disinfectants, thereby increasing the risk of cross-contamination of food. Of note, bio film formation by *S. aureus* can be enhanced by some processing conditions used in the food industry, such as a suboptimal growth temperature or the combined presence of salt and glucose [61].

Conclusion

The contamination level of food contact surfaces with *S. aureus* suggests that the handling of livestock as well as cleaning and disinfection of food industry facilities must be improved. In this respect, it must be pointed out that all isolates showed the potential ability to form bio films, which may allow them to adhere to different food contact surfaces. These bio films could be a potential source of food contamination, likely due to an unsatisfactory application of disinfectants against bio film-associated cells. In addition, food industry surfaces seemed to be a reservoir for other food pathogenic bacteria as well as for some food spoilage microorganisms coexisting with *S. aureus*. In turn, the presence of *S. aureus* in mixed-species bio films could also enhance the colonization and persistence of this bacterium in the food environment. These results therefore point toward the need to improve hygiene conditions during the production of food.

Acknowledgments

Authors would like to express gratitude to the members of the laboratory of Microbiology and vegetal Biology at the University of Mostaganem, ALGERIA.

References

- [1]. Seo KS, Bohach GA. *Staphylococcus aureus*. In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition American Society of Microbiology. 2007;493-518.
- [2]. Griffiths MW, Schraft H. *Bacillus cereus* food poisoning. In D. O. Cliver, & H. P. Riemann (Eds.), Foodborne diseases (2nd Ed.). (261e270) London: Academic Press. 2002.
- [3]. Feuerstein I, Muller D, Hobert K, Danin A, Segal R. The constituents of essential oils from *Artemisia herba alba* population of Israel and Sinai. Phytochemistry. 1986; 25:2343-2347.
- [4]. Akrouf A, El Jani H, Amouri S, Neffati M. Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L, *Artemisia herba alba* Asso and *Thymus capitatus*
- [5]. Hoff. Et Link. Recent Research in Science and Technology. 2010; 2(1): 29-39.
- [6]. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine. 1996; 20: 933-956.
- [6]. Van der Veen S, Abee T. Mixed species bio films of *Listeria*



- monocytogenes and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 2011; 144:421–431.
- [7]. FDA Bacteriological Analytical Manual: *Staphylococcus aureus*, In: AOAC International, 8th rev. ed., Gaithersburg, MD. 1998; 12.01-12.05
- [8]. Yousef AE, Carlstrom C. *Staphylococcus aureus*. In: Food Microbiology: A Laboratory Manual, A Wiley- Interscience publication. 2003.
- [9]. Cappucino JG, Sherman N. *Microbiology A Laboratory Manual* Pearson Education (Singapore) Indian Branch. New Delhi. 2004.
- [10]. Collins CH, Lyne PM, Grange JM. Collins and Lyne's microbiological methods. 7th ed. London: Arnold. 2001.
- [11]. Guttman DM, Ellar DJ. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringensis* virulence factors. *FFMS Microbial Lett.* 2000; 118(1): 7-13.
- [12]. Gudmundsdóttir BK. Comparison of extracellular proteases produced by *Aeromonas salmonicida* strains isolated from various fish species. *Applied Bacteriology.* 1996; 80: 105–113.
- [13]. Monica C. Medical Laboratory manual for Tropical countries. ELBS. 1991; 60–63.
- [14]. Cotter JJ, Gara JP, Mack D, Casey E. Oxygen-mediated regulation of biofilm development is controlled by the alternative sigma factor β in *Staphylococcus epidermidis*. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(1):261–4.
- [15]. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* 1965; 16:144–158.
- [16]. Liu X, Zhao M, Wang J, Yang B, Jiang Y. Antioxidant activity of methanolic extract of *Emblica fruit* (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2008; 21: 219–228.
- [17]. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1992; 40: 945-948.
- [18]. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics.* 1986; 44(6): 307-15.
- [19]. Valgas C, Souza SMD, Smânia EFA, and A. Smânia Jr: Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2007; 38:369–380.
- [20]. Christensen GD, Purisi JT, Bisno AL, Sineson WA and Beachey EH. Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative *Staphylococci*. *J. Clin. Microbiol.* 1983; 18: 258-264.
- [21]. Powers EM, Lawyer R, Masuoka Y. Microbiology of processed spices. *J. Milk Food Technol.* 1975; 38: 683–687.
- [22]. Banerjee M, Sarkar PK. Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. *Food Control.* 2003; 15(6): 491-496.
- [23]. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res.* 2003; 2 (1): 63-76 (www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0009_full_text.htm accessed on 18 May 2011).
- [24]. Zschöck M, Botzler D, Blöcher S, Sommerhäuser J, Hamann HP. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Int Dairy J.* 2000; 10: 569-574.
- [25]. Tamarapu, S, McKillip JL, Drake M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J. Food Prot.* 2001; 64: 664–668.
- [26]. Wieneke AA, Roberts D, Gilbert RJ. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–1990. *Epidemiol. Infect.* 1993; 110: 519–531.
- [27]. Ceuppens S, Boon N, Uyttendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol Ecol.* 2013; 84: 433-50
- [28]. Yobouet BA, Kouame-Sina SM, Dadié A, Makita K, Grace D, Dje KM, et al. Contamination of raw milk with *Bacillus cereus* from farm to retail in Abidjan, Coted'Ivoire and possible health implications. *Dairy Sci Technol.* 2014; 94: 51-60.
- [29]. Lee JH. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:6489 – 6494.
- [30]. Cosentino S, Mulargia AF, Pisano B, Tuveri P, Palmas F. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *Int J Food Microbiol.* 1997; 38:235e8.
- [31]. Molva C, Sudagidan M, Okuklu B. Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. *Food Control.* 2009; 20:829-34.
- [32]. De Jonghe V, Coorevits A, De Block J, Coillie EV, Grijspeerdt K, Herman L, et al. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int J Food Microbiol.* 2010; 136:318-25.
- [33]. Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl. Microbiol.* 1975; 30:381–385.
- [34]. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 2002; 37: 53–161.
- [35]. Ross KA, Beta T, Arntfield SD. A comparative study on the phenolic acid identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry.* 2009; 113:336–344.
- [36]. Rødtjer A, Skibsted LH, Andersen ML. Antioxidative and prooxidative effect of extracts made from cherry liqueur pomace. *Food Chemistry.* 2006; 99: 6-14.

- [37]. Bourgou S, Ksouri R, Bellila A, Skandrani I, Falleh H, Marzouk B. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologie*. 2008; 331: 48–55.
- [38]. Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN, Neffati M, Costa MM, Figueiredo A, Barroso JG, Pedro LG. Chemical composition antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff et Link. *Food Chemistry*. 2007; 105:146–155.
- [39]. Miguel G, Simoes M, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Carvalho L. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry*. 2004; 86:183–188.
- [40]. Espin JC, Garcia-Conesa, MT, Tomas-Barberan FA. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*. 2007; 68, 2986–3008.
- [41]. Kumaran A, Karunakaran RJ. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Food Science and Technology*. 2007; 40:344–352.
- [42]. Das NP, Pereira TA. Effects of flavonoids on thermal autooxidation of Palm oil: structure- activity relationship. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1990; 67: 255-258.
- [43]. Matkowski A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnol. Adv.* 2008; 26: 548-560.
- [44]. Shimoi K, Masuda S, Shen B, Furugori B, Kinae N. Radioprotective effect of antioxidant plant flavonoids in mice. *Mutat. Res.* 1996; 350: 153-161.
- [45]. Braga PC, Sasso MD, Culici M, Galastri L, Marceca MT, Guffanti EE. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell free systems. *Pharmacology*. 2006; 76: 61–68.
- [46]. Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Bianchi T, Bordoni L, Marabini L. Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. *Pharmacology*. 2006; 77: 130–136.
- [47]. Khanuja SPS, Srivastava S, Shasney AK, Darokar MP, Kumar TRS, Agrawal KK, Ahmed A, Patra, NK, Sinha P, Dhawan S, Saikia D, Kumar S. Formulation comprising thymol useful in the treatment of drug resistant bacterial infections. *US Patent*. 2004; 6: 795–824.
- [48]. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Products*. 2000; 63: 1035-1042.
- [49]. Kiselova Y, Ivanova D, Chervenkov T, Gerova D, Galunska B, Yankova T. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from bulgarian herbs. *Phytotherapy Research*. 2006; 20(11):961- 965.
- [50]. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 2006; 97:654–660.
- [51]. Al Mustafa AH, Al Thunibat OY. Antioxidant activity of some Jordanian plants used traditionally for treatment of diabetes. *Pak. J. Biol. Sci.* 2008; 11, 351–358
- [52]. Yashphe J, Segal R, Breuer A, Erdreich-Naftali G. Antibacterial activity of *Artemisia herba alba*. *J. Pharm. Sci.* 1979; 68(7): 924-925.
- [53]. Kaur S, Shinna GK. Antibacterial activity of volatile oils and their important constituents from some indigenous plants. *Indian J. Phys. Nat. Sci.* 1982; 15: 43-47.
- [54]. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52: 673-751.
- [55]. George FOA, Ephraim RN, Obasa SO, Blankole MO. Antimicrobial properties of some plant extracts on organisms associated with fish spoilage. *AJMR*. 2009; 6 (2):12-17.
- [56]. Gur S, Balik DT and Gur N. Antimicrobial activities and some fatty acids of Turmeric, ginger root and Linseed used in the treatment of infectious diseases. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2006; 2(4): 439-442.
- [57]. Teh KH, Flint S, Palmer J, Andrewes P, Bremer P, Lindsay D. . Biofilm an unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? *International Dairy Journal*. 2014; 34: 32–40.
- [58]. Mizan MFR, Jahid IK, Ha SD. Microbial bio films in seafood: a food-hygiene challenge. *Food Microbiology*. 2015; 49:41–55.
- [59]. Bai AJ, Vittal RR. Quorum sensing inhibitory and anti-biofilm activity of essential oils and their in vivo efficacy in food systems. *Food Biotechnology*. 2014; 28:269–292.
- [60]. Brooks JD, Flint SH. Bio films in the food industry: problems and potential solutions. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2008; 43:2163–2176.
- [61]. Rode TM, Langsrud S, Holck A, Møretrø T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; 116:372–383.

