

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle Hamou Hadjer

Mme Bouchelil amina

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: PHARMACOGNOSIE & PHYTOTHÉRAPIE

THÈME

**L'effet in vitro du miel de datte sur quelques
gèrmes pathogènes**

DEVANT LE JURY

Président Dr. Douichene.S

(MCB) U. Mostagane

Encadreur Dr.Hammadi.k

(Professeur) U. Mostaganem

Examineur Mr. Bakouri.H.

(MAA) U. Mostaganem

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2015/2016

Dédicace

-Je dédie ce travail à :

*Mes défunts grands-parents.

*Mes chères parents que dieu les protège.

*Ma sœur Amina et son époux Amine.

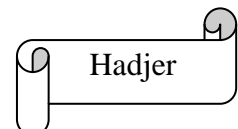
*Mon oncle Djilali et sa famille.

*Dr.Boukraa.A et sa famille.

*Mes sœurs Rima et Rabia.

*Pr. Djebli et sa famille.

* toutes mes amies.



Hadjer

REMERCIEMENT

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à « *Dieu le Tout Puissant* » de m'avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Au moment où s'achève ce travail, permettez-moi de remercier du fond du cœur, tous ceux et toutes celles qui, pendant cette période de mémoire, m'ont dirigée, soutenue, aidée et encouragée.

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier mon directeur de mémoire, *Dr Hamadi.K*, pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté. Pour son soutien et sa grande générosité, tout le long de mon travail de mémoire, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie sincèrement *Dr.Douichene.S* mon examinateur de mémoire.

Mes remerciements vont également à Monsieur *Dr.Bakouri.H* d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de mémoire.

Un merci tous particuliers à *Pr.Djebli.N* pour ses conseils et ses commentaires mais aussi sa bienveillance et son humour auront été fort utiles pendant les années d'étude, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

J'adresse de sincères remerciements aux techniciennes du laboratoire : *M^{me}.Katroussi.n* et *M^{me} Miaad*. Et tous sans oublier mes amies. Merci à tous pour leur amitié et pour leur aide précieuse.

Je tiens enfin à remercier tous mes honorables professeurs de l'université de Mostaganem(*ITA*).

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier de tout cœur, mes parents, mes sœurs, pour son amour et sa compréhension.

Résumé

La datte a toujours été depuis les temps immémoriaux un élément important de l'alimentation tant pour les humains que pour les animaux, sa production mondiale s'élève à plus de 58 millions de tonnes plaçant ainsi l'Algérie au 6^{ème} rang des pays producteurs de dattes avec 470 000 t/an, dont 30% sont des dattes communes à faibles valeurs marchandes pour la plus part destinées à l'alimentation du bétail (FAO, 2007) .

La présente étude à été conduite dans la perspective de la valorisation de produit de datte en essayant de mettre au point le miel de datte (Hmira) et d'évaluer l'importance de ce produit pour la santé.

Pour l'activité antimicrobiennes, des inhibitions nettes et effectifs ont été obtenue avec tous les souches testées jusqu'à la concentration (10^{-4}) et négatives avec les autres dilutions (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}).

Concernant le biofilm les résultats étaient négatifs avec tous les microorganismes étudiés.

Mots clés : Datte Algérienne, Miel de datte, Activité antibactérienne, Activité antifongique.

Summary

The date has always been since time immemorial An important element of the power supply for both humans and animals, its world production amounts to more than 58 million tonnes thus placing the Algeria in the 6 rd row of the producer countries of dates with 470 000 t/year, of which 30% are dates common to low market values for the most part intended for the feeding of livestock (FAO, 2007) .

This study was conducted in the perspective of the valorisation of product of dates in trying to develop the honey of dates (HMIRA) and to assess the importance of this product for the health. For the antimicrobial activity, net inhibitions and staff have been obtained with all strains tested up to the concentration (10⁻⁴) and negative with the other dilutions (10⁻⁵,10⁻⁶,10⁻⁷). Concerning the biofilm results were negative with all studied strains.

Key words: Algerian Date, Honey of dates, Antibacterial activity, Antifungal activity.

Sommaire

Résumés

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Etudes bibliographique

Chapitre I

Miel de datte

I.Généralités.....3

II. Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du sirop de dattes (Rob)3

III. Dattes utilisées pour la fabrication du rob4

IV. Processus de fabrication du «Rob » par les artisans6

V. Proposition d'amélioration de procédé de fabrication des produits à base de dattes7

Chapitre II :

Les biofilms.

I. Introduction.....13

II. Structure et organisation14

III. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm15

III.1 Caractéristiques de la surface15

III.2. Caractéristiques du milieu15

III.3. Propriétés des cellules16

III.4. Interactions physicochimiques17

IV. Formation des biofilms18

V. Différentes méthodes d'obtention des biofilms18

VI. Diversité de biofilms	19
VII. Principaux constituants du biofilm	20
VIII. Importance des biofilms	21

Partie expérimentale

Chapitre III

Matériel et méthodes

I. Lieu d'étude	23
I.1: Choix des microorganismes.....	23
II. Etude de l'activité antimicrobienne	24
II.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	24
II.1.1. Activation des souches	25
II.1.2: Dilution en milieu liquide.....	25
II.1.3. Ensemencement	25
II.1.3.a : Méthodes de diffusion sur gélose	25
II.1.3.a.1 : Méthode des disques	25
II.1.3.a.2 : Méthode des puits	25
II.1.4 : Lecture des résultats	25
III.Les Biofilms : (La technique de Cléri)	
II.1.4.a : Lecture des antibiogrammes	25
III.1. Densité optique	26
III.2. Technique de diffusion en milieu solide (méthode des puits)	26
III.3. Détermination des CMI.....	26

Chapitre IV

Résultats et discussion

I. Résultats	27
I.1. Activité antimicrobienne	27
I.1.a- Méthode de diffusion sur gélose	27

I.1.b. Biofilm	32
II. Discussion	34
Conclusion.....	35
Références bibliographiques.....	36
Annexes	

Listes des figures

Figure (1) : miel de datte.	3
Figure (2) : datte Hmira.....	3
Figure(3) : Variétés utilisées pour la fabrication de « Rob ».....	5
Figure (4) : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un Biofilm bactérien.....	14
Figure(5) : Cycle de développement simplifié d'un biofilm.....	18
Figure (6) : Diamètres d'inhibition en mm pour la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	31
Figure (7) : Diamètres d'inhibition en mm pour la souche <i>Bacillus</i>	31

Liste des tableaux

Tableau(1) : Composition biochimique du sirop de dattes.....	4
Tableau(2) : des sirops des dattes variété Mech-Degla et Ghars.....	5
Tableau (3) : Les souches testées.....	23
Tableau (4) : de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
Tableau (5) : de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>Bacillus</i>	29
Tableau (6) : zones d'inhibition en (mm) pour les bactéries et les dermatophytes (10 ⁻¹).....	32
Tableau (7) : Zones d'inhibition en (mm) pour <i>Klebsiella</i>	33
Tableau (8) : zones d'inhibition en (mm) pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Tableau (9) : zones d'inhibition en (mm) pour <i>Staphylococcus aureus</i>	34

L'Algérie est un pays producteur de dattes (*Phoenix dactylifera* L) avec une production annuelle de plus de 500 000 tonnes. La partie la plus importante de ce tonnage constitue les dattes communes. Celles-ci sont des variétés sèches à faible valeur marchande. (**Ben Abbes 2011**).

Les produits dérivés des dattes sur le marché national restent faibles quantitativement au regard de l'importance de la production. La pâte de dattes et tout récemment le rob reste les produits les plus présents sur le marché national, comme produits transformés à base de dattes.

Dans les écosystèmes naturels, les micro-organismes vivent généralement au sein de communautés microbiennes appelées biofilms. Un biofilm est constitué de micro-organismes 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 ("extrapolyméric substances") sécrétés par ces mêmes micro-organismes. 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**).

Depuis plusieurs années, les biofilms sont la cible d'importantes recherches montrant que leurs propriétés biologiques sont aussi diverses que les organismes qui les constituent et qu'il existe une multitude d'environnements dans lesquels ils peuvent se développer. Les recherches sont axées soit sur la lutte contre les biofilms, ceux-ci étant responsables de nombreux problèmes économiques et sanitaires, soit sur l'utilisation des propriétés positives des biofilms. (**Parot, 2007**)

Il y a des maladies qui sont dues à des erreurs dans la biochimie du corps, mais beaucoup d'autres résultent des activités de certains micro-organismes qui provoquent une maladie. Parmi les nombreuses maladies d'origine microbienne, certaines sont dues à des champignons, certaines à des virus, d'autres à des protozoaires et d'autre enfin à des bactéries. (**Bousseboua, 2002**)

L'objectif principal de cette étude est de tenter d'évaluer l'activité antibactérienne et antifongique de miel de datte «Rob» extrait à partir des dattes.

Le mémoire est présenté au travers de trois parties. La première est une synthèse bibliographique qui présente en premier lieu le miel de datte, ensuite une revue bibliographique est faite sur les propriétés du biofilm. La deuxième partie détaille les matériels et méthodes ; elle décrit les conditions expérimentales utilisées. Dans la dernière partie nous exposons les résultats obtenus en les discutant.

Enfin une conclusion générale permet de résumer les résultats obtenus et de discuter les perspectives et applications potentielles d'un tel travail.

Etude bibliographique

Introduction générale

I. Généralités :

Le sirop de datte, également appelé miel de datte, est un sirop sucré foncé (mélasse de fruit) obtenu à partir d'extrait des dattes et typique de la cuisine arabe. Il est appelé Rub Al Tamr dans le monde arabe (**Mohamed et Ahmed, 2006**).

Le sirop de dattes est un produit naturel extrait des dattes, il est liquide et très concentré, il peut être utilisé comme un édulcorant (**MUNIER, 1973**).

Le sirop de dattes peut être fabriqué avec toutes les variétés de dattes de qualité secondaires préférentiellement (**MUNIER, 1973 et EL-OGAIDI, 1987 cite par MIMOUNI, 2009**), il peut être considéré comme un sucre inverti naturellement, car il contient des proportions en glucose et fructose presque égales, et une faible quantité de saccharose, qui peut être inverti en sucres simples lors de l'extraction sous l'effet thermique et acidité du milieu (**EL-OGAIDI, 1987 cité par MIMOUNI, 2009**).

Figure (1) : miel de datte.

D'après (www.riafoodtech.fr)



Figure (2) : datte Hmira.

D'après (data.abuledu.org)



Rob est généralement fabriqué avec des dattes de la variété Mech-Degla de bonne qualité ou médiocre. (**Alokaïdi, 1987**) signale que toutes les variétés peuvent servir à la fabrication du sirop de datte. Dans la préparation du Rob nécessite de grande quantité en dattes (30 kg /20 l d'eau pour 8 litre de Rob), ce qui rend impérativement nécessaire aux artisans de

S'approvisionner en dattes plus aptes à la conservation avec un prix d'achat abordable.

II. Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du sirop de dattes (Rob) :

Le sirop de dattes se caractérise par une teneur en eau de 25% du poids frais et une teneur élevée en sucres totaux qui représente 96% dont la majorité est sous forme de sucres réducteurs.

Les éléments minéraux et les protéines sont présents en faibles quantités (ABDELFATTAH, 1990 ; IBRAHIM et KHALIL, 1997citer par MIMOUNI, 2009) et en substances bioactives tel que les polyphénols totaux qui sont élevées par rapport à celles des matières premières.

Le sirop de dattes à un degré Brix compris entre 73 à 75 % ce qui permet sa conservation au-delà de deux ans, sans risque d'altération et le pH de sirop est compris entre 6 et 6,5.

(ABDELFATTAH, 1990 cité par MIMOUNI, 2009). Selon ULRICH MAZIS (2013), la teneur de sirop en glucose est égale à 37%, celle de fructose est 35% et le Saccharose 1%.

La teneur en eau de sirop de dattes est de 20 %. Cette valeur est supérieure à celle trouvée par AL -HOOTI et al., (2002) cite par DJOUAB, (2007) qui sont de 16,76 % et 16,25 % pour les sirops des variétés Saoudiennes Bihri et Safri respectivement. Ils rapportent que le taux de solide soluble de sirop est de 80° Brix, le sirop de datte peut être une bonne source de macroéléments comme le calcium, le phosphore, le potassium, le magnésium (DJOUAB, 2007).

Tableau(1) : Composition biochimique du sirop de dattes (ABDELFATTAH, 1990 ; IBRAHIM et KHALIL, 1997 cité par MIMOUNI, 2009).

Paramètres	Sirop de datte	
	ABDELFATAF, 1990	IBRAHIM et KHALIL, 1997
Teneur en eau (%)	25,00	24,80
Sucres réducteurs (glucose et fructose) (%)	90,40	81,50
62 ,06 Sucres non réducteurs (saccharose) (%)	05,60	04,90
Sucres totaux (%)	96,00	86,40
Protéines (%)	0,50	2,10
Eléments minéraux (%)	01,83	6,60
Acidité	0,17	0,20
Degré Brix (°Bx)	73 à75	76,0
Vitamine A, les vitamines du groupe B	+	+

Concernant, le sirop de la variété Ghars et Mech-Degla possède les caractéristiques biochimique .Le taux des polyphénols totaux est élevé dans la variété Mech-Degla et Ghars

9,1±0.107 % et 9,5 ±0.005 %(MS) respectivement dans le tableau.2 (**BENAHMED DILALI, 2012**).

Tableau(2) : des sirops des dattes variété Mech-Degla et Ghars (BENAHMED DILALI, 2012).

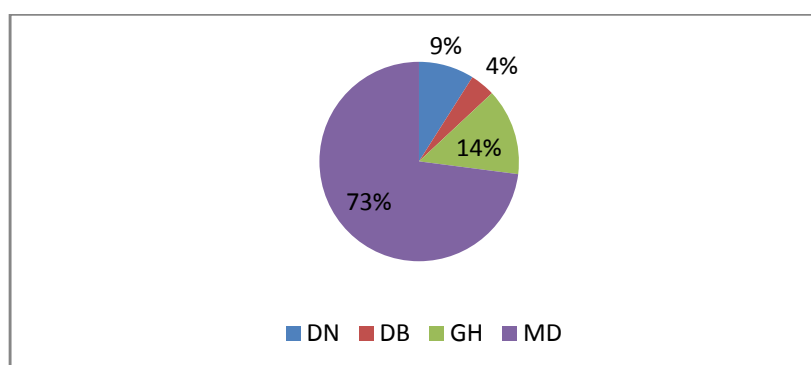
Paramètres	Teneurs moyennes		
	Sirop de variété Ghars	Sirop de variété Mech-degla	
pH à 22°C	5,64 ± 0,01	5,22 ± 0,02	
Matière sèche (%)	58,25 ± 0,12	59,92 ± 0,35	
Taux de cendres (%)	1,29 ± 0,66	1,26 ± 0,43	
Acidité titrable (g d'acide citrique pour 100g de produit)	2,10±0,01	3,36±0,01	
Teneur en poly-phénols totaux (% EAG ou mg pour 100g de MF)	9,5±0,005	9,1±0,107	
sucres (g/l)	Sucres totaux	95,28	85,10
	Sucres réducteurs	87,73	25,10
	Saccharose	7,25	57,6

II. Dattes utilisées pour la fabrication du rob :

Les variétés les plus couramment rencontrées et les plus utilisées sont : Mech-Degla (datte à consistance sèche), Ghars (datte de consistance molle) et Deglet- Nour (datte de consistance demi-molle).

Figure(3) : Variétés utilisées pour la fabrication de « Rob »

MD : Mech Degla **DB** : Degla Beida **DN** : Deglet Nour **GH** : Ghars



IV. Processus de fabrication du «Rob » par les artisans :

Selon (Belguedj et al. (2015)).

IV.1. Triage :

Cette opération s'avère lente et fastidieuse : étant la surface de triage étroite, il faut ramasser toutes la quantité de dattes triées et les stocker à part, ensuite verser une autre caisse ou sac remplie de dattes non triées, ce qui nécessite plus d'effort musculaire de la part de la personne chargé de triage.

IV.2. Lavage par trempage :

Le trempage s'avère une méthode efficace pour débarrasser les dattes des différentes sources d'altérations, sauf que le renouvellement manuelle de l'eau de lavage nécessite de faire drainer cette eau, ensuite le remplissage du bac de lavage à nouveau. - L'agitation manuelle n'est pas toujours efficace car elle doit être faite régulièrement.

IV.3. 1ère Extraction à chaud :

L'extraction des sucres contenus dans les dattes n'est pas efficace car ces dernières utilisées ne sont pas écrasées ce qui entraîne une diminution de la surface de contact entre la pulpe de datte

Et l'eau d'extraction, et par conséquence une perte non négligeable des matières sucrantes contenues la dedans ;

Le rapport Eau / datte $\approx 0.6/0.40$ n'est pas suffisant pour une meilleur extraction ;

En conclue des deux points citées ci-dessus que il y'avait une relation positive entre le taux d'extraction du sucre et le rapport Eau /Datte pourrait être due à l'augmentation du taux de diffusion moléculaire et du meilleur contact solide-liquide. En conséquence, l'augmentation du taux d'extraction entraîne la diminution du taux de sucre résiduel dans la pulpe de datte ; - La présence de pectine (polymères complexes à haut poids moléculaire, très estérifiées et très hydrophiles et la principale source de rétention des liquides dans le fruit) et matières cellulosique conduit à sa gélification et entravent l'extraction ce qui en diminue l'efficacité ; - La température d'extraction (85.83 ± 14.05 °C) pendant un temps plus au moins prolongé (7.25 ± 4.95 h) peut

entraîner la perte en sucres et éléments nutritifs engendrées par les réactions de Maillard et la caramélisation.

- La solubilité des protéines contenant dans les dattes diminue lors de l'extraction à chaud. Cette perte de solubilité a des conséquences majeures sur les propriétés moussantes des protéines. Sous l'action de différents procédés, chauffage..., les molécules de protéines se dénaturent, se déroulent et emprisonnent de l'air. Cette opération conduit à la formation d'une mousse.

IV.4. 2ème extraction à chaud :

Les dattes sont déjà perdues leurs contenues en matière sucrantes lors de la première extraction, passant à une 2ème extraction avec un rapport datte / eau = 1/2, à une température plus au moins élevée ($76.83 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 15$), pendant un temps relativement long ($6.44 \text{ h} \pm 3.28$), le liquide va s'enrichir davantage en matière pectiques et cellulosiques.

IV.5. Concentration :

Par évaporation Difficultés de contrôler l'étape de l'évaporation de l'extrait de datte, le phénomène de caramélisation est fréquent.

IV.6. Pressurage par torsion :

- Bien que les résidus subissent un double filtration, l'extrait de la 2ème cuisson n'est pas filtré. De ce fait l'extrait final est encore chargé de matières pectiques et de fins résidus, ainsi le Rob obtenu présente une pulposité et une astringence prononcée.

IV.7. Concentration :

par évaporation Difficultés de contrôler l'étape de l'évaporation de l'extrait de datte à une température de $64.25^{\circ}\text{C} \pm 19.27$, pendant un temps plus au moins long $3.37 \text{ h} \pm 1.06$ Jusqu'à $74,62 \pm 3,01 \text{ }^{\circ}\text{Brix}$, le phénomène de caramélisation est fréquent.

V. Proposition d'amélioration de procédé de fabrication des produits à base de dattes :

Dans cette partie, des techniques d'amélioration de procédé de fabrication de Rob ont été proposées afin d'augmenter le rendement, diminuer les pertes en composées ayant intérêt dans le processus.

V.1. Rob :

V.1.1. Réception :

La décharge du camion, les dattes sont transportées vers la section de triage à travers élévateur à godets en chaîne, munie d'une balance automatique afin de peser les dattes entraînées vers la transformation ; ces derniers sont déchargés dans un bac (figure 3 (2)) allant au ruban roulant.

V.1.2. Triage :

Manuel, sur un ruban roulant afin d'éliminer les débris végétaux (pédicelles, périanthes) et les dattes impropres à la transformation (dattes Seiches, immatures, infestés ...) ;

V.1.3. Nettoyage :

Les dattes destinées à la transformation sont encore souillées : il y est nécessaire de se débarrasser des souillures qui peuvent être de nature :

- Chimiques : résidus de pesticides et fertilisants ;
- Biologiques : comme les œufs de le ver de la datte (*Myeloïs ceratoniae*. Zeller)
- Physiques : terre adhérente, petits cailloux,...

Afin de rendre le nettoyage efficace, 2 opérations de lavage humide sont préconisées :

V.1.4. Trempage :

Dans un bac de lavage contenant l'eau continuellement renouvelée, une agitation est recommandée à l'aide d'un agitateur afin d'augmenter l'efficacité de trempage. L'eau doit être à une T° ne dépassant pas 25°C afin d'éviter la perte en sucre. Les dattes acheminées vers un roulant convoyeur, tandis que l'eau de lavage est éliminée par passage à travers une grille de filtration au fond du bac de lavage ;

V.1.5. Aspersion :

Par un jet d'eau, les dattes sont triées aussi manuellement pendant leur passage.

V.1.6. Écrasement des dattes :

Afin de perfectionner l'extraction, on va augmenter la surface de contact entre les dattes et l'eau d'extraction : Écraser la peau afin de faciliter la pénétration de l'eau d'extraction vers les parois cellulaires ; L'écrasement des dattes se fait dans un moulin frappant ou broyeur marteaux .Un des points critiquables de cette étape est d'obtenir une consistance propre pour que l'extraction du jus soit économique : Si la pulpe contient de larges morceaux, le rendement d'extraction sera bas, mais l'extrait sera relativement libre de solide en suspension. D'un autre côté, si la pulpe est trop finement divisée, le pressage sera difficile, et l'extrait contiendra une grande quantité de solides. Il est donc important d'utiliser l'équipement adéquat pour garantir la bonne consistance.

V.1.7. Extraction :

Se fait par diffusion des substances solubles dans l'eau directe à un rapport eau/datte = 2.5 ± 0.71 °C ; Min = 2 ; Max = 3 et une température $T^\circ = 50 \pm 5$ °C ; Min = 45 °C ; Max = 55 °C. L'extraction se fait pendant 55 ± 31.22 min ; Min = 30 min ; Max = 90 min ; afin d'éviter au maximum la perte en sucres et éléments nutritifs. Une extraction à plus de 82°C pendant 15 sec peut provoquer l'inactivation de pectine galacturonase dont l'action est très rapide ; L'extraction se fait avec une agitation continue dans un diffuseur: un cylindre conique H = 15 m ; Ø= 60 cm à double paroi, muni des tubes contenant de la vapeur d'eau chaude qui sert au chauffage de l'eau d'extraction et d'un convoyeur rotatif (vis spirale). Grâce au mouvement du convoyeur spirale, l'extraction se fait en contre courant, il s'avère le meilleur mode pour une extraction maximale : les dattes en montant s'appauvrissent en sucre, tandis que l'eau d'extraction s'en enrichie en descendant : Le taux du résidu sec soluble de l'extrait obtenu TSS est 20 ± 7.07 °Bx ; Min = 15 °Bx ; Max = 25 °Bx Il est recommandé d'installer deux cylindres d'extraction afin de diminuer le temps d'extraction et augmenter le rendement ainsi il que le bas du diffuseur soit en forme U pour en faciliter le nettoyage ;

V.1.8. Filtration :

La séparation des dattes cuites se fait dans un filtre générique. La concentration directe du jus de datte ne peut se poursuivre très loin car elle donne rapidement une gelée plus au moins épaisse par des débris celluloseux. Par ailleurs, il est impossible d'épurer ce liquide sans le filtrer au préalable, car ces matières mucilagineuses se colmatent très rapidement les membranes ou les toiles filtrantes. L'extrait passe alors est filtré dans un filtre presse ; En ce qui concerne les dattes cuites, on n'a pas intérêt à les mener à une 2ème cuisson ; cette dernière a pour résultat l'augmentation de la teneur en composés pectiques indésirable ce qui entrave la filtration ; il est préconisé de soumettre les dattes suites à une aspersion avec un jet d'eau chaude (55°C) afin d'extraire les maximum matières solubles (sucres, sels minéraux,..) et augmenter le rendement.

L'extrait récupéré passe ensuite à travers une toile filtrante au fond du bac de lavage et il est pompé vers le filtre générique. Quand aux déchets, ils sont menés au pressage.

V.1.9. Pressage :

Les déchets de dattes sont pressés à chaud dans une presse à piston (presse hydraulique) ; Le pressage à chaud a l'avantage d'accroître le rendement, l'inconvénient est de faciliter l'extraction des tanins. La présence de la peau facilite le drainage de l'extrait à travers la masse pressée ; L'opération est discontinue, le cycle dure 20-30 min ; L'extrait récupéré est filtré dans un filtre presse, les résidus et déchets de dattes sont inutiles et seront rejetés. L'extrait récupéré de pressage avec celui issu de lavage des dattes est pompé à l'aide d'une pompe volumétrique vers le filtre générique pour être re-filtré.

V.1.10. Dépectinisation :

Le jus est refroidi à 45°C et acheminé vers les bacs de traitement à la pectine phosphorique est ajouté afin d'ajuster l'acidité de jus à $\text{pH} = 4$. Le pectinase est ajouté à un pourcentage de 0.0275 ± 0.0170 % ; Min = 0.01 % ; Max = 0.05 % de Brix du jus. Ce dernier est mélangé par agitation pendant 30 min.

V.1.11. Clarification :

Après la filtration de l'extrait, le jus obtenu renferme des composés non sucrants qui le rendent limpide (non translucide), ces impuretés sont séparées de la solution de sucre par "chaulage" et "carbonatation" :

□ Chaulage : Le jus est premièrement traité à 70°C grâce à un échangeur de chaleur, le pH est ajusté à 7 ± 0.71 ; Min = 6.5 ; Max = 7.5 Le chaulage se fait par injection de la chaux sous forme d'oxyde de calcium à la solution sucrée au fond du bac de traitement de chaulage. Cela conduit à l'élévation du pH du jus de dattes au dessous de pH= 9.

□ Carbonatation Se fait en deux reprises successives :

- 1ère carbonatation : Injection du carbone actif en haut du bac : il résulte la formation des sels basiques de carbonate de calcium. Ces derniers se sédimentent avec les particules solides pour former un flocculat
- 2ème carbonatation : a pour but la précipitation de la chaux en excès. L'injection de CO₂ en excès cause la diminution de pH et la diminution de l'alcalinité de jus au dessous de pH = 8.5 ce qui en résulte la formation de bicarbonate de calcium solubles et ainsi l'augmentation de la concentration en sel solubles.

V.1.12. Décantation :

Une décantation dans des tanks est premièrement préconisée afin de faciliter la séparation.

V.1.13. Filtration :

La filtration de jus trouble a pour but de séparer le coagulat formé : Le jus coagulé est pompé vers les filtres presses à l'aide des pompes volumétriques.

V.1.14. Concentration :

Afin d'éviter la dégradation des constituants de jus de datte, on fait recours à l'évaporation sous vide à basse température (50-55°C), à 650-700 mm mercure dans un évaporateur.

L'évaporateur à effets multiples est proposé afin de réduire la consommation en énergie de chauffage : la vapeur vive est injectée pour le chauffage du premier effet et la buée d'évaporation sert au chauffage de l'effet suivant. L'évaporateur est muni d'un contrôleur de Brix.

V.1.15. Pasteurisation :

L'extrait de datte condensé est chauffé progressivement jusqu'à $T^{\circ} = 77.5 \pm 3.54 \text{ }^{\circ}\text{C}$;

Min = $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Max = $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 5 min dans des échangeurs de chaleur à plaques.

V.1.16. Conditionnement :

Se fait à chaud à l'aide des conditionneuse doseuses. Les bocaux en verre sont auto-stérilisés par la chaleur émis par le liquide chauffé : ils sont renversés après sertissage.

V.1.15. Refroidissement et stockage

Se font à température ambiante. (BELGUEDJ, 2014)

V.1.15.a. Au niveau des ménages :

La différence entre la méthode de fabrication de Rob au niveau des artisans et celle au niveau des ménages réside essentiellement dans les proportions d'eau et de dattes utilisées ainsi que la quantité préparé. Le Rob est fabriqué par 6 % des ménages enquêtées comme suit :

1. Après un triage manuel et un trempage, les dattes sont dénoyautées manuellement.
2. Ensuite, elles sont cuites dans un récipient en inox, rempli d'eau potable. Le volume d'eau égale au volume des dattes, la T° en moyenne de $75,05^{\circ}\text{C} \pm 20,10$ et la durée est $4,7 \text{ h} \pm 2,15$.
3. La filtration est effectuée sur chèche placé sur un couscoussier, ce dernier est placé sur un récipient afin de récupérer l'extrait filtré.
4. L'extrait obtenu est évaporé à une T° de $88,21^{\circ}\text{C} \pm 14,59$ pendant $4,7 \text{ h} \pm 2,15$.
5. Au début de la concentration, des petits pâtons de semoule de blé dur d'environ 50 g sont immergées afin de donner un aspect plus épais au Rob : l'amidon joue un rôle d'épaississant.

Chapitre I :

Le Miel

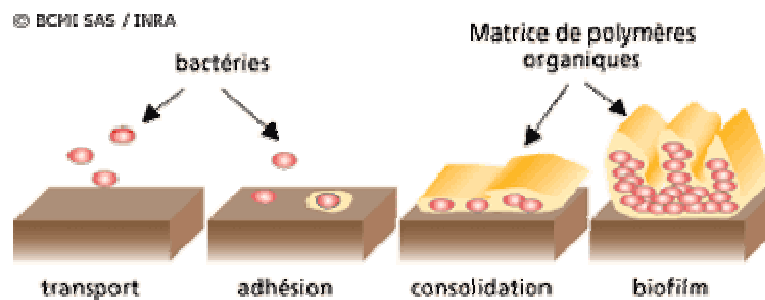
I. Introduction :

Un biofilm est une communauté de micro-organismes (bactéries, champignons, protozoaires ou algues) adhérant entre eux et fixés à une surface, et enrobés dans une matrice d'exopolysaccharides protectrice et adhésive qu'ils synthétisent. (**CHALVET de ROCHEMONTEIX, 2009**)

Le mode de vie en biofilm est le mode de comportement prédominant des organismes unicellulaires. L'autre alternative est la flottaison libre de type dit "planctonique", dans un milieu liquide, fluide ou même solide. Les biofilms sont observés dans les milieux aqueux ou exposés à l'humidité. Ils peuvent se développer sur n'importe quel type de surface naturelle ou artificielle, qu'elle soit minérale (roche, interfaces air-liquide...), organique (peau, tube digestif des animaux, racines et feuilles des plantes), industrielle (canalisations, coques des navires) ou médicale (prothèses, cathéters, sondes urinaires....) (**CHALVET de ROCHEMONTEIX, 2009**).

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...) (**Frank et Koffi, 1990; Morton et al., 1998, Mah et O'Toole, 2001 ; Campanac et al., 2002**).

Figure (4) : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm bactérien. (Balestrino, 2006)



II. Structure et organisation :

Le biofilm est constitué essentiellement des microorganismes et de la matrice qu'ils synthétisent. Les micro-organismes représentent 2 à 15% du matériel du biofilm selon l'espèce impliquée alors que la matrice extracellulaire (EPS, extracellular polymeric substances), représente 50 à 90% de la masse organique carbonée du biofilm. Mais l'eau demeure le principal composant du biofilm [(Costerton, 1999); (Sutherland, 2001); (Donlan, 2002)].

Les propriétés physico-chimiques de l'EPS sont variables d'un biofilm à un autre, mais un biofilm est initialement constitué de polysaccharides. La composition et la structure de polysaccharides déterminent la conformation primaire du biofilm. La quantité des EPS produite varie en fonction du micro-organisme, et elle augmente avec l'âge du biofilm. La matrice du biofilm peut aussi être composée d'ions métalliques, de cations divalents, de macromolécules (protéines, ADN, lipides, phospholipides) et de composants de l'hôte [(Sutherland, 2001); (Donlan, 2002); (Hall-Stoodley et al., 2012)].

La matrice d'exopolysaccharides exerce différents rôles. Elle assure la protection et la cohésion de chaque microcolonie bactérienne, absorbe l'eau et piège les petites particules circulantes. L'EPS intervient aussi sur la relation des microorganismes entre eux et avec les surfaces. Son important degré d'hydratation, due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet de lutter contre la dessiccation de certains

biofilms dans le milieu naturel. Cette matrice contribue aussi aux propriétés d'antibiorésistance des biofilms en se liant directement aux agents antimicrobiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm (**Wingender et al., 1999**). Elle est aussi impliquée dans le maintien d'un microenvironnement unique pour les bactéries (**Costerton et al., 1994**).

III. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm :

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules (**Donlan, 2002**).

III.1. Caractéristiques de la surface :

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques influent sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm (**De Chalvet De Rochemonteix, 2009**).

□ Rugosité de la surface :

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante (**Characklis, 1990**). Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (**Donlan, 2002**). Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses (**Donlan et Costerton, 2002**).

III.2. Caractéristiques du milieu :

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs [(**Fletcher, 1988**) ; (**O'Toole et al., 2000**); (**Donlan, 2002**) ; (**Martinez, 2007**) ;(**Goller, 2008**)]:

a. La température est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité électrophorétique cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (**Dumas, 2007**).

b. Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (**Hamadi et al., 2004**) ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (**Boutaleb, 2007**).

c. concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques,

d. sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (**Martínez, 2007**).

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

f. concentrations en certains cations : l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na⁺, Calcium Ca²⁺, ion ferrique Fe³⁺) influence l'attachement de *Pseudomonas* fluorescents sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (**Fletcher, 1988**).

g. hydrodynamique du fluide : selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (**Donlan, 2002**).

III.3. Propriétés des cellules :

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent

importantes. La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides. Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (**Donlan, 2002**). La synthèse de fimbriae de type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules (stimulation de la synthèse si déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uropathogènes d'*Escherichia coli*) et par les conditions environnementales (pas de synthèse si pH bas ou température basse). L'expression des curli est sous le contrôle de cascades de phosphorylation. Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression de gènes codant pour des caractères de motilité. La synthèse de curli est stimulée dans les conditions environnementales suivantes : faible osmolarité, basse température, faible disponibilité du milieu en azote, phosphate, fer et croissance ralentie (**Goller, 2008**).

III.4. Interactions physicochimiques :

La nature de la surface bactérienne détermine les interactions microorganisme-support [(**Reifsteck et al., 1987**); (**Bellon-Fontaine et al., 1996**)]. Ainsi, les interactions physicochimiques entre une surface bactérienne et un support résultent d'une combinaison de forces de Van der Waals, de forces électrostatiques, de propriétés acide-base de Lewis et de liaisons hydrophobes [(**Bellon-Fontaine et al., 1996**); (**Briandet, 1999**); (**Krepsky et al., 2003**)].

IV : Formation des biofilms :

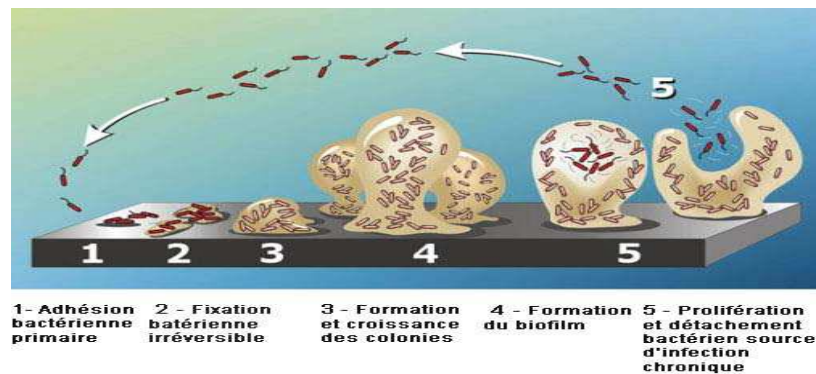
On distingue cinq étapes dans le mécanisme de formation des biofilms (Figure). Tout d'abord, les bactéries interagissent avec un substrat et s'y fixent de façon réversible par des interactions non spécifiques de type liaison hydrogène ou liaison de Van der Waals : on

parle d'**adhérence** (Figure (1)) (Golovlev, 2002 ; Van Houdt, 2005). Puis les bactéries se fixent de façon irréversible et spécifique au substrat grâce à des molécules d'adhésion comme par exemple les pili, et synthétisent une matrice d'exopolysaccharides : il s'agit de la phase d'**adhésion** (Figure (2)). On distingue ensuite des phases de **croissance** (Figure (3)) et de **maturation du biofilm** (Figure (4)). Puis, sous l'effet de facteurs environnementaux, des bactéries vont **se détacher du biofilm** (Figure (5)), et se disperser sous forme planctonique dans le milieu environnant : on parle d'essaimage du biofilm (Clutterbuck, 2007).

Figure(5) : Cycle de développement simplifié d'un biofilm.

D'après [<http://www.biofilm.montana.edu>], avec accord du Montana State University Center for Biofilm Engineering.

Les bâtonnets rouges représentent les bactéries à l'état planctonique et celles figurées en beige à l'état de biofilm. Ce dernier est représenté en beige. Les cinq stades successifs du passage d'un de ces états à l'autre sont schématisés : (1), (2), (3), (4) et (5).



V : Différentes méthodes d'obtention des biofilms :

Des chercheurs ont développé différents modèles de biofilms artificiels, reproductibles d'un laboratoire à un autre (Lemon, 2008).

Les cuves à flux continu sont de petites chambres à parois transparentes dans lesquelles des biofilms submergés peuvent se former et sont continuellement approvisionnés en nutriments. Comme l'indique le nom de la technique, les biofilms sont dans un milieu aqueux, caractérisé par un flux de liquide, dont la vitesse est constante.

Les biofilms formés dans ces cuves à flux continu peuvent être facilement observés avec les techniques de microscopie confocale à balayage laser : on obtient ainsi des images de biofilms à tous leurs stades de développement. On peut observer des images de biofilms avec une structure « bourgeonnante » caractéristique, en forme de champignons séparés par des canaux aqueux.

On peut aussi réaliser des cultures en lots, en absence de flux. Cette technique consiste à mettre des bactéries en culture dans des plaques de micro-titrage, sans flux.

Avec ce système, on peut analyser rapidement de nombreux échantillons. Cette méthode d'étude est utilisée en vue du séquençage des génomes des micro-organismes, de même que la technique d'analyse de pellicules flottant à l'interface air-liquide. Elle consiste à recueillir des biofilms formés au niveau d'une interface liquide-air et de les analyser.

Enfin, on peut obtenir des biofilms sous forme de colonies formées à la surface de milieux gélosés. La plupart des souches bactériennes utilisées en laboratoire produisent des biofilms fragiles comparativement aux souches sauvages des mêmes espèces bactériennes. Les souches auraient accumulé des mutations au fil des années lors des expériences de culture en laboratoire et auraient subi en quelque sorte une domestication (**Branda, 2001**).

VI : Diversité de biofilms :

Le terme de biofilm pourrait laisser entendre qu'il s'agit d'une simple couche de micro-organismes déposée sur une surface. Les biofilms sont très hétérogènes, dans le temps et dans l'espace. Ils sont constamment remodelés, suite à l'influence permanente de facteurs endogènes et exogènes (**Tolker-Nielsen, 2000**). Ils présentent une grande diversité aussi bien au niveau structural (une ou plusieurs espèces de micro-organismes au sein du biofilm, épaisseurs diverses) qu'au niveau des supports colonisés.

Un biofilm peut être constitué d'une ou de plusieurs espèces de micro-organismes : on parle respectivement de biofilms homogènes ou de biofilms hétérogènes (**Tolker-Nielsen, 2000**). La plupart des biofilms rencontrés sont hétérogènes. La présence d'une espèce de micro-organisme ou d'une autre au sein du biofilm dépend des conditions environnementales.

Par exemple, les biofilms éclairés par la lumière du soleil sont composés majoritairement d'organismes phototrophes, comme les algues ou les cyanobactéries, réalisant la photosynthèse et produisant leur biomasse à partir de carbone minéral. Les biofilms formés en absence de lumière sont constitués principalement de bactéries hétérotrophes (dégradation de la matière organique) et chimiotrophes (transformation de substances minérales) (**Wanner, 2006**).

Les biofilms peuvent se former sur des surfaces, biologiques ou inertes, d'une grande diversité : tissus vivants, appareillage médical (sonde, cathéter, broches...), système de canalisation industriel ou d'eau potable, surfaces immergées... Les propriétés physiques et chimiques de la surface jouent un rôle dans les mécanismes de formation du biofilm.

Selon le type de support sur lequel se forme le biofilm, l'organisation structurale de ce dernier sera différente. Un biofilm fixé dans la lumière d'une canalisation a une structure très complexe, et contient divers composants : produits issus de réactions de corrosion, boue, algues unicellulaires et bactéries filamenteuses. Un biofilm formé à la surface d'un cathéter a une organisation plus simple : on distingue des micro-colonies de coques associées à une matrice d'exopolymères (**Donlan, 2002**).

Tous les biofilms n'ont pas la même épaisseur. Les biofilms des eaux naturelles oligotrophes sont plus fins que ceux des milieux aqueux riches comme la plaque dentaire ou les cathéters (**Bury-Moné, 2007**). Les biofilms récemment formés sont souvent monocouches, à l'inverse des biofilms plus anciens qui sont stratifiés (**Bury-Moné, 2007**).

L'architecture du biofilm dépend des conditions nutritives, ce qui suggère une facilité de remodelage des biofilms. De bonnes conditions nutritives sont nécessaires aux étapes de formation du biofilm, alors que les phases de développement tardif sont possibles dans des conditions nutritives moins bonnes.

VII : Les principaux constituants du biofilm :

Les constituants essentiels d'un biofilm sont les micro-organismes agglomérés et la matrice qu'ils synthétisent. L'eau est leur principal composant, ce qui explique leur propriété hydrophile. La présence de canaux et de pores permet des flux d'eau, d'ions et de nutriments (**Clutterbuck, 2007**).

Les micro-organismes représentent 2 à 15 % du matériel du biofilm. La matrice extracellulaire représente 50 à 90% de la masse organique carbonée d'un biofilm. Le rapport C/N d'un biofilm est cinq fois plus élevé que pour une suspension de bactéries planctoniques, ceci étant dû à la prédominance de la matrice (**Bury-Moné, 2007**).

La matrice d'exo-polysaccharides joue un rôle structural important, et explique certains avantages permis par le mode de vie sessile, notamment la protection des micro-organismes contre les facteurs environnementaux et d'autres propriétés comme la résistance aux agents bactéricides.

Les propriétés physico-chimiques de la matrice d'exopolysaccharides sont variables d'un biofilm à l'autre. Elle est toujours initialement composée de polysaccharides.

Sa très forte teneur en eau, due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet de lutter contre la dessiccation de certains biofilms dans le milieu naturel. Parfois, la couche la plus externe de la matrice se déshydrate afin de former une interface sèche et d'empêcher une dessiccation plus marquée (**Sutherland, 2001**).

La matrice d'exo-polysaccharides joue aussi un rôle mineur dans les propriétés d'antibiorésistance des biofilms en se liant directement aux agents antimicrobiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm (**Donlan, 2002**).

Ainsi, la matrice d'exo-polysaccharides joue un rôle structural et fonctionnel important puisqu'elle sert de barrière protectrice contre la dessiccation, les substances bactéricides mais Aussi contre les bactériophages (**Donlan, 2002**).

VIII. Importance des biofilms :

Tous les organes internes creux en communication directe avec l'environnement extérieur comme la bouche, l'anus, les cavités nasales ou encore le vagin, sont des niches écologiques abritant des micro-organismes qui existent majoritairement sous forme de biofilms. Ces micro-organismes sont pour la plupart des bactéries, mais on trouve aussi des champignons et des levures (**Martini, 2006**). Ils co-évoluent avec leur hôte et son système immunitaire et jouent un rôle fonctionnel important pour l'organisme, dans la digestion par exemple, surtout chez les ruminants. Ces micro-organismes, présents de façon physiologique chez un individu sain, constituent la flore commensale de l'organisme.

Cette flore commensale se trouve à la surface de la peau et des muqueuses (appareils digestif, respiratoire, urinaire et génital) d'un individu sain (**Martini, 2006**). Elle joue un véritable rôle de protection de l'organisme face à des infections. Elle n'est, à l'état normal chez un individu sain, à l'origine d'aucune infection. Ceci est dû la présence d'une véritable homéostasie bactérienne. Tout désordre de cette homéostasie entraîne des troubles

(Digestifs, cutanés...). On rencontre ainsi des infections dues à des micro-organismes de la flore commensale lors d'effraction des barrières cutanées et muqueuses.

Les micro-organismes de la flore commensale ne peuvent donc devenir pathogènes que lorsque des conditions de déséquilibre leur permettent de proliférer.

CHAPITRE II :

Les Biofilms.

I1.Lieu d'étude :

Cette étude est réalisée au niveau de deux laboratoires : Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Abd Al Hamide Ibn Badiss (ITA) et Laboratoire de Pharmacognosie et Api-phytothérapie Université de mostaganem (INES).

I.1.3:Choix des souches testées :

Les souches bactériennes et les dermatophytes testées sont procurées du laboratoire de microbiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) d'Oran.

	Les micro-organismes testés.	Quelques généralités.
Les bactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bacille pyocyannique est une bactérie saprophyte de l'air, l'eau et du sol, commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux. BOUAMER et GUERBATI,2008) - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> présente fréquemment dans le milieu hospitalier elle atteint essentiellement les sujets débilisés : cancéreux brûlés, insuffisant respiratoires. BOUAMER et GUERBATI,2008) - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> présente comme un fin bacille (0.5x3µ m) asporulé et acapsulé, gram négative, il possède souvent des granulations plus fortement colorées. Elle pousse facilement en 2 heures à une température de 37° C. (BOUAMER et GUERBATI,2008)
	<i>Klebsiella</i>	<ul style="list-style-type: none"> -est naturellement présente à faibles concentrations dans l'environnement, mais également dans le tube digestif et les cavités naturelles de l'homme. Dans certaines situations (température, humidité), elle peut constituer des agrégats dénommés biofilms notamment sur des surfaces inertes (sondes urinaires, tubes endotrachéales, cathéters et autres). (Balestrino, 2006) -<i>Klebsiella pneumoniae</i> est une bactérie commensale de l'homme et les animaux, elle est responsable d'infection communautaires (urinaire et respiratoire) et d'infections opportunistes chez les malades hospitalisés. (Jarler et al ,2004) - Elle est naturellement résistante aux pénicillines. (Jackson et al, 1978)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Sont des coques (cocci) à Gram+ groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés (Bactériologie, 2003). -<i>S.aureus</i> est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. -On le trouve sur la muqueuse nasale d'un tiers environ des sujets normaux peuvent survivre longtemps dans l'environnement (Bactériologie, 2003).

	les souches testées	Quelques généralités
Les dermatophytes	<i>Microsporium canis</i>	- <i>M.canis</i> appartient à une famille de champignons connus sous le nom « dermatophytes » C'est une espèce à croissance rapide qui forme en culture des macrospores en forme de fuseau cloisonnées transversalement avec une paroi épaisse et dure. -L'habitat naturel ou réservoir de cette espèce est le chat mais il peut affecter l'homme aussi. -De ce fait, ce pathogène est de nature à la fois anthrophile et zoophile (Monod et al, 2014).
	<i>Trichophyton rubrum</i>	- <i>Trichophyton rubrum</i> est un champignon filamenteux microscopique. Il se reproduit sur la gélose de Sabouraud en formant des hyphes mycéliens et des spors par voie asexuée. Ce dermatophyte est le responsable principal des dermatophytoses des pieds (ou pieds d'athlète, tinea pedis) et des ongles (onychomycose, onyxis, tinea unguium). C'est actuellement le dermatophyte le plus fréquemment isolé dans les laboratoires à partir des mycoses des pieds en Europe et Amérique du Nord. Dans certaines régions, comme Afrique, il est principalement responsable de la mycose de la peau glabre (herpès circiné, tinea corporis) et des cheveux (teigne, tinea capitis) (Yvonne Graser, 2007)
	<i>Candida albicans</i>	- <i>Candida albicans</i> est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. - <i>C.albicans</i> sont la cause de pathologies graves et dont la fréquence reste constante malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques. - <i>Candida albicans</i> est considéré chez l'Homme et les animaux à sang chaud comme un commensal des muqueuses, faisant partie intégrante de la flore microbienne. - <i>Candida albicans</i> possède tous les organites intracellulaires caractéristiques des eucaryotes. -La seule structure différenciant la levure d'une cellule eucaryote « classique » est la présence d'un système vaculo-vésiculaire, évoluant en relation avec le cycle cellulaire et la division, et impliqué en majeure partie dans la synthèse de la paroi.

Tableau (3) : Les souches testées.

I. Etude de l'activité antimicrobienne :**I.1 : L'évaluation de l'activité antimicrobienne :**

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par diffusion sur gélose en utilisant la méthode de diffusion des disques selon **Rahal et al (2005)** et la méthode des puits décrite par **Ismail et al (2008)** et par dilution en milieu liquide (**El amri et al., 2014**).

I.1.1.Activation des souches :

A l'aide d'une pipette de pasteur, on a ensemencé dans 10 ml de bouillon nutritif les souches bactériennes prélevées à partir de leurs milieux de conservation.

Des spores de chaque souche des dermatophytes sont ensemencées dans 10ml de sabouraud solide.

I.1.2: Dilution en milieu liquide:

-A partir de la solution mère (miel de datte « rob ») on réalise les dilutions suivantes : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , par l'addition de 1ml de chaque dilution ou solution mère dans des tubes de 9ml de l'eau distillé stérile.

I.1.3.Ensemencement :

I.1.3.a : Les méthodes de diffusion sur gélose :

I.1.3.a.1 : Méthode des disques :

- & -Tremper une pipette de pasteur stérile dans la suspension bactérienne.
- Frotter la pipette sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrés.
- Répéter l'opération en tournant la boîte de 90° à chaque fois.
- Recharger la pipette à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de pétri avec la même souche.
- Déposer des disques imprégnés d'extrait délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

I.1.3.a.2 : Méthode des puits :

- Sur une gélose inoculée, creuser des puits à l'aide d'une pipette pasteur stérile.
- Un volume de l'extrait à tester est déposé dans chaque puits.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.

Le même protocole des deux méthodes a été suivi pour les dermatophytes et l'incubation a été faite à 37°C pendant 3 jours.

I.1.4 : Lecture des résultats :

I.1.4.a : Lecture des antibiogrammes :

La lecture des antibiogrammes a été réalisée en notant le diamètre de la zone d'inhibition trouvée. Un extrait est considéré actif lorsque la zone d'inhibition autour du disque ou du

puits est supérieure à 6mm et à l'intérieur de la quelle aucune croissance des microorganismes n'est observée.

II. Les Biofilms : (La technique de Cléri)

II.1. La densité optique :

La suspension microbienne à été inoculé dans l'eau physiologique dans un tube à essai. La densité optique à été déterminé dans un spectrophotomètre à 625 nm avant l'ensemencement.

II.2. Technique de diffusion en milieu solide (méthode des puits) :

La gélose (20 ml) coulée en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4mm, est ensemencée par écouvillonnage de la surface par la suspension fongique avec une densité de 10^7 UFC/ml. Les boites sont ensuite mises à sécher pendant 15 minutes à température ambiante. Nous avons aménagé des cavités (puits) de 5 mm de diamètre à l'aide d'une pipette dans la gélose, les puits doivent être espacés de 24mm, centre à centre. Puis nous avons rempli les puits avec le miel à partir de différentes concentration (0.1ml), ensuite les boites sont incubées à 37°C pendant 24 heures. L'action du miel se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits. L'activité antimicrobienne du miel a été déterminée en mesurant, à l'aide d'une règle transparente, le diamètre de la zone d'inhibition déterminée par les différentes concentrations de miel.

Les témoins négatifs sont préparés dans des puits isolés contenant le milieu de culture et les souches testées, mais sans addition de miel.

II.3. Détermination des CMI :

Nous avons déterminé l'effet antibactérien des miels, par l'estimation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est la concentration du miel qui empêche d'une façon complète la croissance.

Partie expérimentale

Chapitre III :


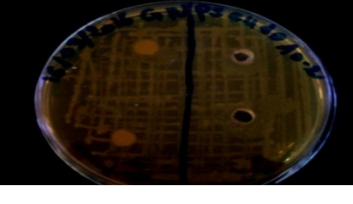
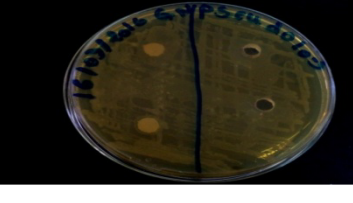
Matériel et méthodes

I. Résultats :**I.1. Activité antimicrobienne :****I.1.a-Méthode de diffusion sur gélose :**

Après 24h d'incubation à 37°C, on a observé des zones d'inhibitions dans les deux souches testées avec (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) et rien observé avec les autres concentrations (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}).

Les données expérimentales sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau (4): de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Pseudomonas aeruginosa*.

Dilutions	Diamètre d'inhibition		Photos
	Disques	Puits	
10^{-1}	27	29	
	25	28	
10^{-2}	23	25	
	16	24	
10^{-3}	15	23	
	13	20	

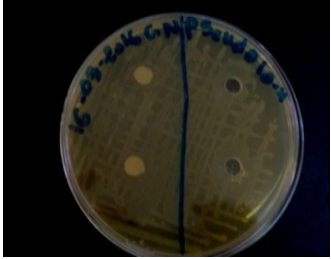

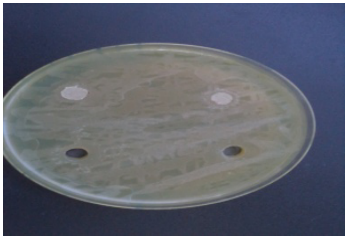
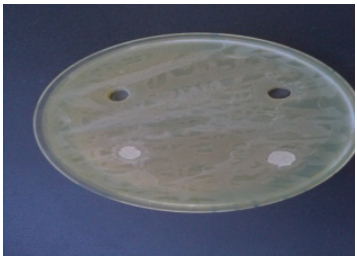


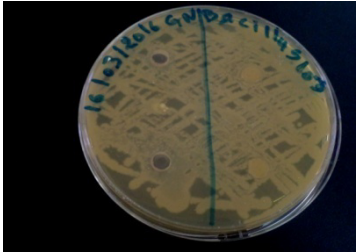


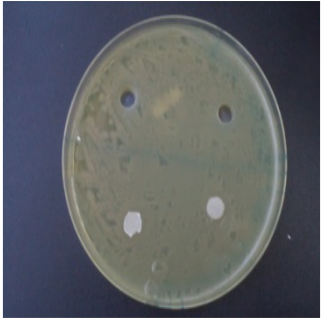

10^{-4}	10 8	15 12	
10^{-5}	0 0	0 0	
10^{-6}	0 0	0 0	
10^{-7}	0 0	0 0	

Tableau (5): de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Bacillus*.

Dilution	Diamètre d'inhibition		Photos
	Disques	Puits	
10^{-1}	23	33	
	22	32	
10^{-2}	17	25	
	18	24	
10^{-3}	13	23	
	11	22	
10^{-4}	9	14	
	8	13	

10^{-5}	0 0	0 0	
10^{-6}	0 0	0 0	
10^{-7}	0 0	0 0	

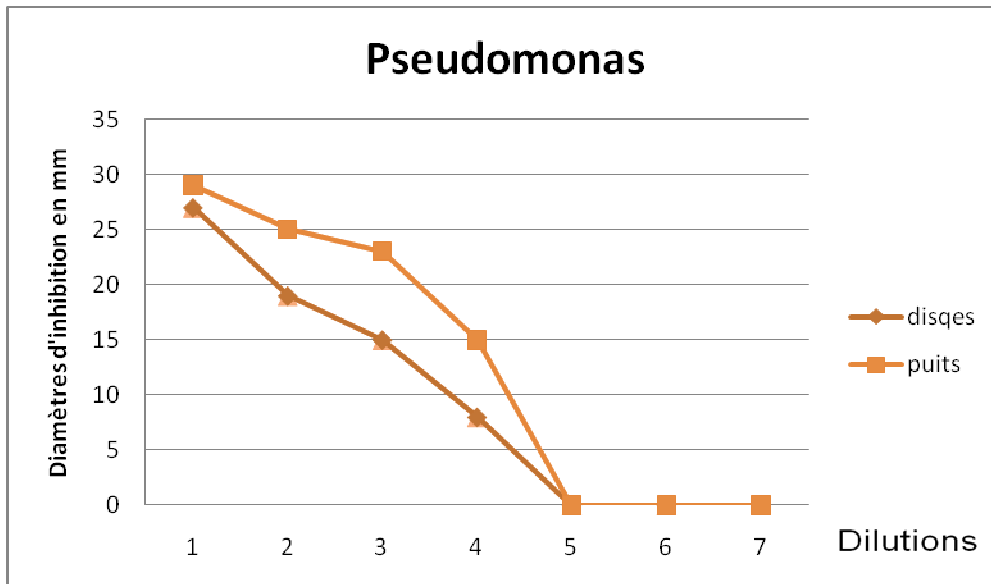


Figure (6) : Diamètres d'inhibition en mm pour la souche Pseudomonas aeruginosa.

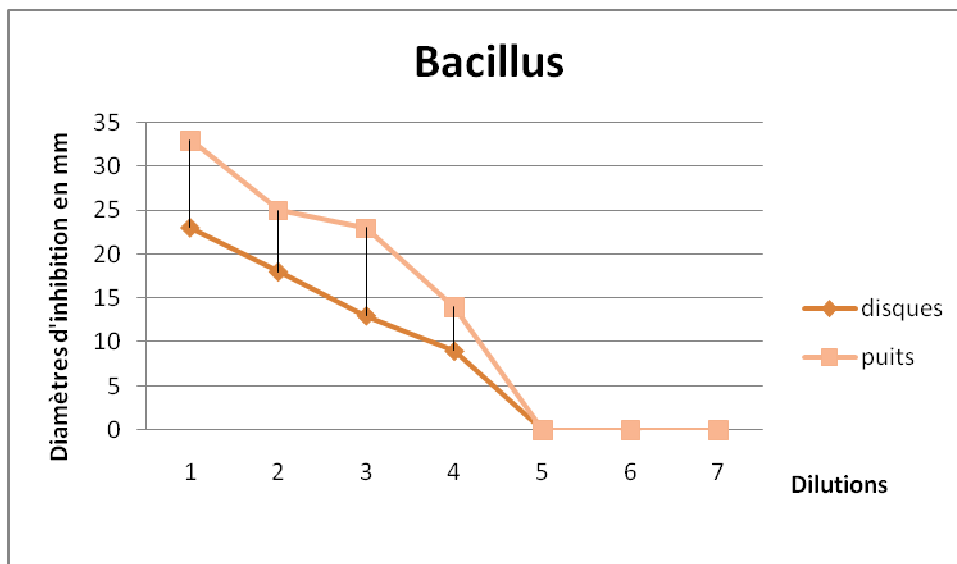


Figure (7) : Diamètres d'inhibition en mm pour la souche Bacillus.

-Concernant les bactéries : (10^{-1})

*Pour *Klebseilla*, les inhibiteurs de la croissance de ce germe sont manifestés par le rob avec des diamètres de 19mm pour les puits et 12mm pour les disques.

*Les effets inhibiteurs de la croissance du germe *Pseudomonas aeruginosa* sont manifestés par le rob avec des diamètres d'inhibitions de 17mm pour les puits. Ce pendant, les disques n'ont manifestés aucun effet inhibiteur.

*Concernant la bactérie *Staphélocoque aureus*, elle donne des zones d'inhibition de 12mm pour les disques et 18mm pour les puits.

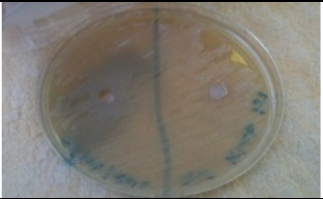
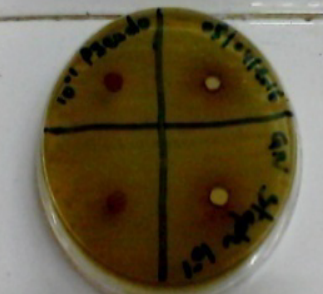
-Concernant les dermatophytes : (10^{-1})

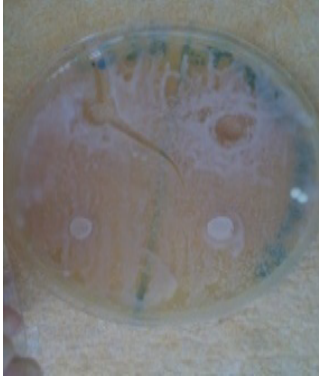

*Pour *Tricophytum rubrum*, les inhibitions sont nettes avec 15mm de diamètre pour les puits et 10mm de diamètre avec les disques.

*Pour *Micosporium canis*, elle donne des zones d'inhibition de 18mm pour les puits et 13mm avec des disques.

*Pour *Candidas albicans*, es inhibiteurs de la croissance de ce germe sont manifestés par le rob avec des diamètres de 30mm pour les puits et 15mm pour les disques.

Tableau (6) : zones d'inhibition en (mm) pour les bactéries et les dermatophytes. (10^{-1})

	Puits	Disques	Photos
<i>Klebseilla</i>	16	11	
<i>Staphylococcus</i>	17	12	
<i>Pseudomonas</i>	17	-	

<i>Trichophyton rubrum</i>	15	10	
<i>Microsporium canis</i>	18	13	
<i>Candidas albicans</i>	30/25	15/12	

-Les résultats étaient négatives avec ces dilutions (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}).

I.1.b. Biofilm :

Après, 24h d'incubation des bactéries et 72h d'incubation des dermatophytes, on à observé une sensibilité qu'avec la concentration (10^{-1}) seulement.

-Les données sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau (7) : Zones d'inhibition en (mm) pour klebsella.


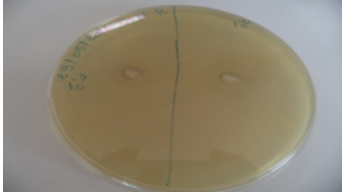
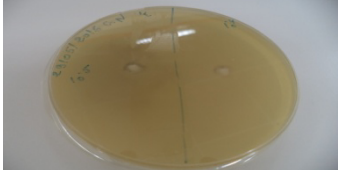
Dilution	Diamètre d'inhibition	Photos
10 ⁻¹	20 19	
10 ⁻² 10 ⁻³	- -	
10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	- -	

Tableau (8) : zones d'inhibition en (mm) pour *Pseudomonas aeruginosa*.

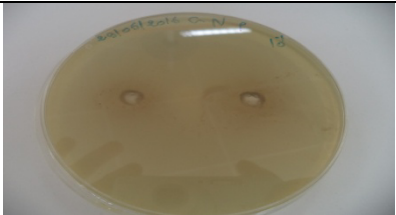
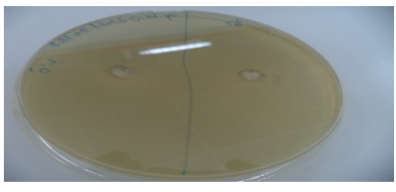
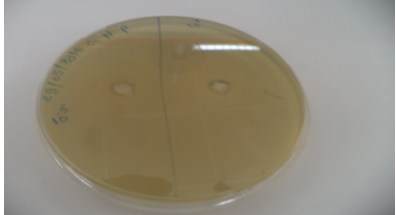
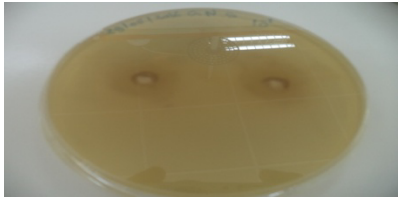

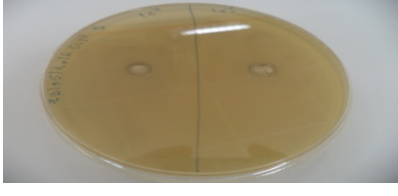
Dilutions	Zones d'inhibition	Photos
10 ⁻¹	15 13	
10 ⁻² 10 ⁻³	- -	
10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	- -	

Tableau (9) : zones d'inhibition en (mm) pour *Staphylococcus aureus*.

Dilutions	Zones d'inhibition	Photos
10 ⁻¹	16 15	
10 ⁻² 10 ⁻³	- -	
10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	- -	

-Les résultats étaient négatifs avec tous les dermatophytes testées, aucune sensibilité n'a été détectée.

II. Discussion :

L'activité antibactérienne du miel de datte (rob) est due à la présence de l'acide caféique, **Rodriguez et al., (2007)** ont rapporté que la fraction propénoïque des acides hydroxycinnamiques, moins polaire peut entrer en interaction avec la membrane lipidique cellulaire et neutraliser son potentiel électrique et ainsi affecter son métabolisme.

Les souches *Bacillus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont sensibles aux fortes concentrations du rob.

Les extraits testés possèdent des effets antimicrobiens nets et effectifs sur la croissance in vitro de *Bacillus* et *Pseudomonas*.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) exprimées par le miel de datte sur les souches testées ont été comprises entre 13 et 14 mm avec les puits et 8mm et 9 mm avec les disques sur la souche *Bacillus*.

Les CMIs sont de 12 et 15 mm avec les puits et 8 et 10 mm avec les disques sur la souche *Pseudomonas aeruginosa*

Concernant le biofilm les résultats étaient négatifs avec tous les micro-organismes qu'on a utilisés, car l'activité du miel de datte était inactive a cause de la température du labos qui était très élevée et aussi les conditions du stockage du produit.

Chapitre VI :

Résultats et discussion

Conclusion

Les dattes sont particulièrement riches en sucres et en éléments minéraux, notamment en K, Ca, et Mg nécessaire à la métabolisation des sucres avec une consommation de 2,5 kg/h/mois. Les fruits de dattes y compris les variétés sèches sont un véritable concentré de calories avec plus de 50% de sucre par rapport à la matière sèche.

Cette étude nous situe sur les vertus thérapeutiques antibactérienne et antifongique accordées à cette espèce de plante et ces extraits sur quelques germes étudiés : *Staphylocoques*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Candidas albicans*, *Micosporium Canis*, *Tricophyton* et *Bacillus*.

La mise en évidence d'activités biologiques dans le miel de datte à révélé une forte sensibilité avec tous les souches bactériennes et fongiques testées ce qui explique la présence de substances douées d'activité similaire aux antibiotiques, tandis que la méthode du biofilm à révélé une activité négatives avec tous les souches testées.

Les produits dérivés des dattes sur le marché national restent faibles quantitativement au regard de l'importance de la production. La pâte de dattes et tout récemment le Rob, restent les produits les plus présents sur le marché national, comme produits transformés à base de dattes. Il existe par contre un savoir et un savoir-faire traditionnel en matière de transformation des dattes en divers produits alimentaires (vinaigre, confiture, jus, Rob, farine...), en aliments du bétail et produits thérapeutiques, mais cela reste renfermé au niveau des ménages.

Compte tenu des résultats intéressants obtenus, il parait d'une grande utilité de poursuivre la présente étude tout en touchant, dans le future, à différents axes dans le but d'approfondir les connaissances scientifique et technologique.

Alors, nous envisageons entreprendre des études sur le miel de datte avec d'autres souches microbiennes pour application thérapeutiques.

Conclusion

Références bibliographiques

Alice de CHALVET de ROCHEMONTEIX (2009), Les biofilms et la peau. p5.

Balestrino D. (2006). Formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* : facteurs impliqués et rôle du quorum-sensing. Thèse de doctorat Clermont Ferrand. France p7-9.

BELGUEDJ Naïma, (2014) Préparations alimentaires à base de dattes en Algérie : Description et diagrammes de fabrication.

Bendinger B., Rijnaarts H. H., Altendorf K., Zehnder A. J. (1993). Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*. 59(11): 3973-3977.

BOUAMER Hanane et GUERBATI Malika (2008), Fréquence de l'otite moyenne causée par *Pseudomonas aeruginosa* dans la région d'Ouargla (Isolement, identification, antibiogramme).

Characklis WG, Marshall K.C. (1990). *Biofilms*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

Clutterbuck A. L., Woods E. J., Knottenbelt D. C., Clegg P. D., Cochrane C. A., Percival S. L. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*. 121(1): 1-17.

Costerton J. W., Lewandowski Z., Debeer D., Caldwell D., Korber D., James G. (1994). Biofilms, the customized micro niche. *Journal of Bacteriology*. 176: 2137-2142.

Donlan RM (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease journal*. 8 (9): 881-89.

Donlan RM, Costerton JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*.15: 167- 193.

Donlan RM. (2008).Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Curr. Top. Microbiology and Immunology*. 322: 133-161.

HALL-STOODLEY L, COSTERTON JW, STOODLEY P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 95-108.56.

Hatt JK, Rather PN. (2008) .Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322: 163- 192

HENRICI AT (1933) Studies of freshwater bacteria. A direct microscopic technique. *J. Bacteriol.*, 25, 277-287.

Jackson R.T., Harris L.F., Alford R.H. (1978). Sodium clavulanate potentiation of cephalosporin activity against clinical isolates of cephalothin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 14:118-25

Références bibliographiques

Jacobsen S. M., Stickler D. J., Mobley H. L. T., Shirliff M. E. (2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical microbiology reviews*: 21(1): 26-59.

Lagane Celein (2007) ; Rôle de l'il'-13 et des ligands de PPAR- γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida albicans*. Implication de PPAR- γ .

• **MELCHIOR MB, VAARKAMP H, FINK-GREMMELS J (2006)** Biofilms: à rôle in récurrent mastites infections? *Vet. J.*, 171, 398-407.

Mittelman MW. (1996). Adhesion to biomaterials. Bacterial adhesion. Molecular and ecological diversity. 89- 127.

Monod M., Fratti M., Mignon B et Baudraz-Rosset F. (2014), Dermatophytes transmis par les animaux domestiques. *Rev. Med. Suisse.* 10:53,749.

-Rodriguez Vaquero M. J., Alberto M. R. and Manca de Nadra M. C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control.* 18: 93-101

Sandrine Parot (2007), Biofilms électroactifs : Formation, caractérisation et mécanismes.

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB (2007). Dental caries. *The lancet*, 369: 51-59

Teng YT (2003). The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 14: 237-252

Tenke P., Jackel M., Nagy E. (2004). Prevention and Treatment of Catheter-Associated Infections: Myth or Reality? *EAU Update Series.* 2:106-115.

Tunney MM, Jones DS, Gorman SP et al. (1999). Biofilm and biofilm-related encrustation of urinary tract devices. *Doyle editor, Methods Enzymol.*, 310: 558-566

Université Pierre et Marie Curie Bactériologie Niveau DCEM12002 – 2003

V. Jarlier, A. Carbonne, P. Astagneau (C.CLIN Paris-Nord), B. Coignard (InVS). (2004) Cas groupés d'infections à *Klebsiella pneumoniae* résistante à toutes les bêta-lactamines y compris à l'imipénème en région parisienne. Note d'information technique InVS/RAISIN aux responsables des C.CLIN et coordinateurs des réseaux BMR. P1.

Wingender J., Neu T. R., Fleming H.C. (1999). Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function. Springer-Verlag, NY, ISBN

3-54065720-7.

Références bibliographiques

ZOBELL CE (1943): The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.*, 46, 39-

(Université de l'Etat de Montana. Site de l'Université de l'Etat de Montana, Center for Biofilm engineering.

[<http://www.biofilm.montana.edu>]. Consulté le 22 Mars 2009).

[Clutterbuck AL, Woods EJ, et al. (2007) Biofilms and their relevance to veterinary medicine.

Vet Microbiol., Mar 31; 121 (1-2): 1-17].

1/ : Annexe des milieux de culture :

-Préparation du milieu de culture « Gélose nutritive » :

*Extrait de viande : 1g.

*Extrait de levure : 2g.

*Peptone : 5g.

*Chlorure de sodium : 5g.

*Agar-agar : 15g.

*Eau distillée : 1000ml.

*pH : 7.4

-Préparation du milieu de culture Sabouraud :

*Peptone : 5g.

*Glucose : 20g.

*Hydrolysate de caséine : 5g.

*Agar-agar : 18g.

*Eau distillée : 1000ml.

*pH : 6.

2/ : Le miel de datte :



3/ : Les dilutions en milieu liquide du miel de datte :



4/ : Lecture spectroscopique :

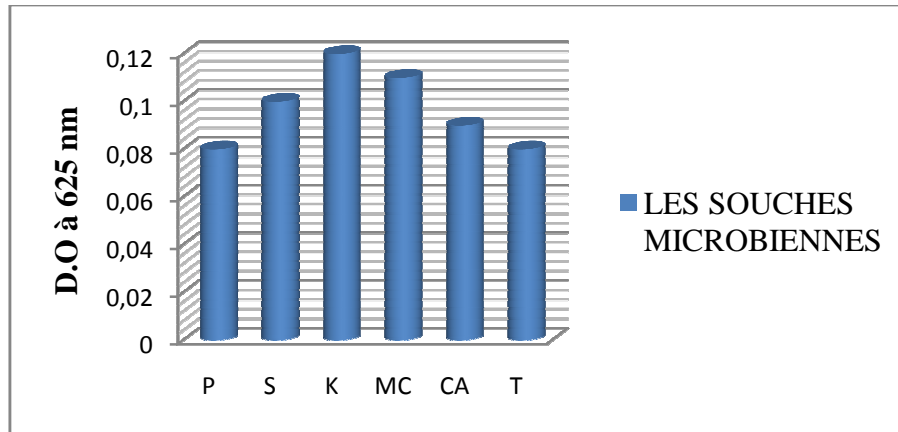


Figure : détermination de la densité optique des suspensions microbiennes à 625 nm.

5/ : Diamètres d'inhibition pour:

Bacillus

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Disques	23 22	18 17	13 11	9 8	0	0	0
puits	33 32	25 24	23 22	13 14	0	0	0

Pseudomonas aeruginosa

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Disques	27 25	19 16	15 13	8 10	0	0	0
puits	29 28	25 24	23 20	15 12	0	0	0

Annexe