

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière: "Sciences Biologiques"

Spécialité: "Toxicologie et Sécurité Sanitaire des Aliments "

Présenté et soutenu publiquement par

- ❖ ABDELLAOUI Fatiha
- ❖ BENZAAMA Nadjat
- ❖ GHERABI Naima

Etude de l'Effet probiofilm de la catéchine vis-à-vis *Lactococcus lactis*

JURY:

- | | Grade |
|---|-------|
| • Président: ^{Melle} BOUBAKEUR.B | MCB |
| • Promoteur: ^{Mme} KHADEM.H | MAA |
| • Examineur: ^{Mme} BOUDALIS | MAA |

Année universitaire: 2016–2017

Remerciements

Nous remercions avant tout ALLAH tout puissant, de nous avoir guidé tout au long de notre vie, et nous avoir donnés la croyance, la volonté, la patience et le courage pour terminer ce travail

Au terme de ce travail, on tient particulièrement à exprimer nos profondes gratitude à notre encadreur **Mme KHADEM.H**

Pour ses orientations, ses contributions sa compréhension tout le long de l'élaboration de ce mémoire.

Nous tenons à présenter nos sincères remerciements aux membres de jury pour avoir accepté de juger ce mémoire, **M^{elle} BOUBAKEUR.B**

Pour l'honneur qu'elle a fait en président le jury et **Mme BOUDALIS** Pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant de l'examiner

Nos vifs remerciements s'adressent à l'ensemble du personnel de laboratoire et les étudiants de notre promotion qui ont tous contribué à entretenir une atmosphère agréable et conviviale.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes parents Sahraoui et

Fatima qui m'ont toujours

*Soutenue et encouragée dans les périodes les plus
difficiles*

*A mes très chers frères : Aek, Amar, Nour-el-dine-et
Ahmed, et mes très chères sœurs : Khaira et sa petit
ange Alaa, Aida et Ouahchia*

A tous les membres de ma grande famille Abdellaoui

A mes collègues : Naima Nadjat

A tous mes amis.

Fatiha

Dédicace

Je dédie ce travail à ma chère grande-famille

*Ma très cher mère *Safia* ma source d'inspiration et de volonté et pour
l'affection qui ma donnée et mon très cher père *Khathir* qui m'aide et facilité
mon travail que je prie dieu de lui une langue vie.*

A ma grande mère Mimouna et Fatma.

Mes chères frères : Djamel, Abdalkerim, Akram, Imed.

Ma chère sœur : Hanane.

Ames tantes et cousines sans exception.

Mes chères amies surtout Khaldia , Fatima, Fatiha, Naima et Mahjouba.

Sans oublier mes amies de section promo 2016/2017.

*Mes enseignants qui nous en accompagnes durant les cinq années
D'études.*

NADJET

Dédicace

Grace Allah

Je dédie ce modeste travail A mes parents

*Mon père Abdelkader, pour son soutien moral et son
encouragement sans limite.*

*Ma chère mère pour l'affection et l'amour qu'elle m'a
donné*

*A mes chères sœurs : Khaira, Fatiha Aicha et Khadidija, Fatima
et Wiam*

A mon cher frère : Mohamed Alemin

A mes chers petits neveux : kholoud, Mouad, Layan et Lejaïn

A toutes la famille

A tous mes amis et particulièrement à Fatiha, Nadjet et Fadhila

Naima

Liste des abréviations

EPS : Exopolysaccharides

LAB : Bactéries lactiques

GRAS : Generally regarded as safe

PH : Potentiel d'hydrogène

UFC: Unités formant de colonie

G⁺ : Gram positif

Nm : Nanomètre

MATS : Microbial adhesion to solvents

Liste des figures

Figure N°01 : Protocole expérimentale	04
Figure N°02 : Pourcentage d'adhésion (auto agrégation) de <i>Lactococcus lactis</i>	09
Figure N°03 : Pourcentage d'hydrophobicité (test d'adhérence aux solvants).....	10
Figure N°04 : Pourcentage d'agrégation en présence de catéchine.....	11
Figure N°05 : Pourcentage d'hydrophobicité en présence de catéchine.....	12

Liste des tableaux

Tableau N°01 : Matériel, appareillage et produits chimiques.....	03
Tableau N°02 : Quantités d'EPS produites par <i>L.lactis</i> en présence et absence de catéchine.....	13

Liste des photos

Photo N°01 : Aspect des colonies de <i>lactococcus lactis</i> après 24 h d'incubation à 37°C	08
Photo N°02: Aspect microscopique de <i>L.lactis</i> après coloration de Gram.....	08
Photo N° 03 : Effet de la catéchine sur le biofilm.....	14

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Introduction01

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1. Objectifs du travail02

I.2. Lieu de travail.....02

I.3. Matériel.....02

I.4. Appareillage et produits chimiques.....03

I.5.Méthodes04

I.5.1.Vérification de la pureté de la souche (*Lactococcus lactis*).....05

I.5.2. Standardisation et préparation des aliquotes05

I.5.3. Mesure du pouvoir adhésif (test d'auto agrégation).....05

I.5.4. Mesure de l'hydrophobicité (test d'adhérence aux solvants.....05

I.5.5. Effet prébiotique de la catéchine.....06

I.5.6. Effet de la catéchine sur l'agrégation et l'hydrophobicité de la paroi...06

I.5.7. Mesure du taux d'EPS.....06

I.5.8. Mesure du taux de biofilm formé (qualitativement) en présence de la catéchine.....07

I.5.9. Traitement des données.....07

Chapitre II : Résultats et Discussion

II.1.Vérification de la pureté de la souche08

II.2. Mesure du pouvoir adhésif (test d'auto agrégation).....09

Sommaire

II.3. Mesure de l'hydrophobicité (test d'adhérence aux solvants).....	10
I.4. Effet de la catéchine sur l'agrégation et l'hydrophobicité de la paroi.....	11
I.4. 1. Sur l'agrégation.....	11
2. Sur l'hydrophobicité.....	12
I.5. Mesure du taux d'EPS et de biofilm formé (qualitativement) en présence de La catéchine.....	13
I.5. 1. Effet sur la production d'exopolysaccharides.....	13
I.5. 2. Effet sur la production Biofilm	14

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques (LAB) sont un groupe hétérogène d'espèces bactériennes, elles sont très ubiquistes qui depuis longtemps se sont avérées utiles. Grâce à leur statut GRAS (Generally Regarded As Safe), les LAB sont d'un grand usage dans les applications alimentaires ce qui témoigne de leur parfaite innocuité. Elles sont utilisées pour la préservation des aliments ainsi que pour l'amélioration de leurs qualités structurelles et organoleptiques (Fernanda et al. 2010).

Sous forme libre, elles s'attachent à une surface de façon irréversible puis croissent en une matrice extracellulaire en formant un **biofilm** ; Communauté de microorganismes adhérant entre eux au sein d'une matrice de polymère auto-sécrétée, adhésive et protectrice, et/ou fixée à une surface Clutterbuck et al. (2007). Les biofilm jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus ; ils contribuent à la production et la dégradation de la matière organique, au recyclage de l'azote, du soufre et de nombreux métaux, ainsi la flore commensale humaine peut être considérée comme un biofilm qui protège son hôte contre les attaques des bactéries pathogènes (Cohen. 2002).

D'autres parts les exopolysaccharides (EPS) des LAB sont considérés comme sûrs, ils ont des propriétés hypocholestérolémiantes, antioxydantes et immunomodulatrices, en plus de leur effet prébiotique et antitumoral (Biarnsholt. 2013).

Notre stratégie visait à évaluer l'effet d'une substance active (la catéchine) sur la formation de biofilm d'une bactérie appartenant à la flore intestinale bénéfique : *Lactococcus lactis*.

Le corps de ce manuscrit est structuré en 3 parties, une est consacrée à la présentation des différentes techniques et méthodes adoptées lors de notre expérimentation et l'autre à la présentation des résultats et leur interprétation et se termine par une conclusion générale.

Etude expérimentale

Chapitre I:

Matériel et Méthodes

I.1. Objectifs du travail

L'objectif principal de ce travail est d'améliorer la capacité de production de biofilm à travers la mesure du pouvoir adhésif et la production d'exopolysaccharides (EPS) de *Lactococcus lactis* sous l'effet de la catéchine, pour ce faire on a :

- ✚ Évalué le potentiel prébiotique de la catéchine, son effet sur l'agrégation et les propriétés physicochimiques de la paroi.

I.2. Lieu de travail

L'étude expérimentale a été réalisée durant une période allant du mois de Mars jusqu'au mois de Mai 2017 dans les laboratoires de :

- Microbiologie (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie)
- Amélioration et Valorisation des Productions Animales Locales

I.3. Matériel

La souche bactérienne testée dans cette étude est : *L. lactis*, une bactérie Gram positif isolée du lait de chèvre

I.4.Appareillage et produits chimiques

L'appareillage et les produits (milieux de culture et réactifs) utilisés pour la réalisation de ce travail sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Appareillage	Produits chimiques et Milieux de culture	Autres
Agitateur	Bouillon nutritif	Bec bunsen
Autoclave	MRS Bouillon /gélose	Barreau magnétique
Bain marie	Colorant de Gram	Boîtes Pétri
Balance analytique	Chlorure de sodium (Na cl)	Embouts
Etuve	Chlorure de potassium (kcl)	Micropipette
Microscope optique	Phosphate disodique(Na_2Hpo_4)	Pipettes graduées
Spectrophotomètre- UV- visible	Phosphate mono potassique(KH_2PO_4)	Pipettes Pasteur
	Xylène	Tubes à essai
Centrifugeuse	Acétate d'éthyle	Seringue
Vortex	Chloroforme	
PH mètre Réfrigérateur	Ethanol	
	Phénol	
	Acide sulfurique	
	Cristal violet	

TableauN°01 : Matériel, appareillage et produits chimiques.

I.5.Méthodes

Le protocole illustré dans la **Figure N°01** a été adopté pour la réalisation de ce travail.

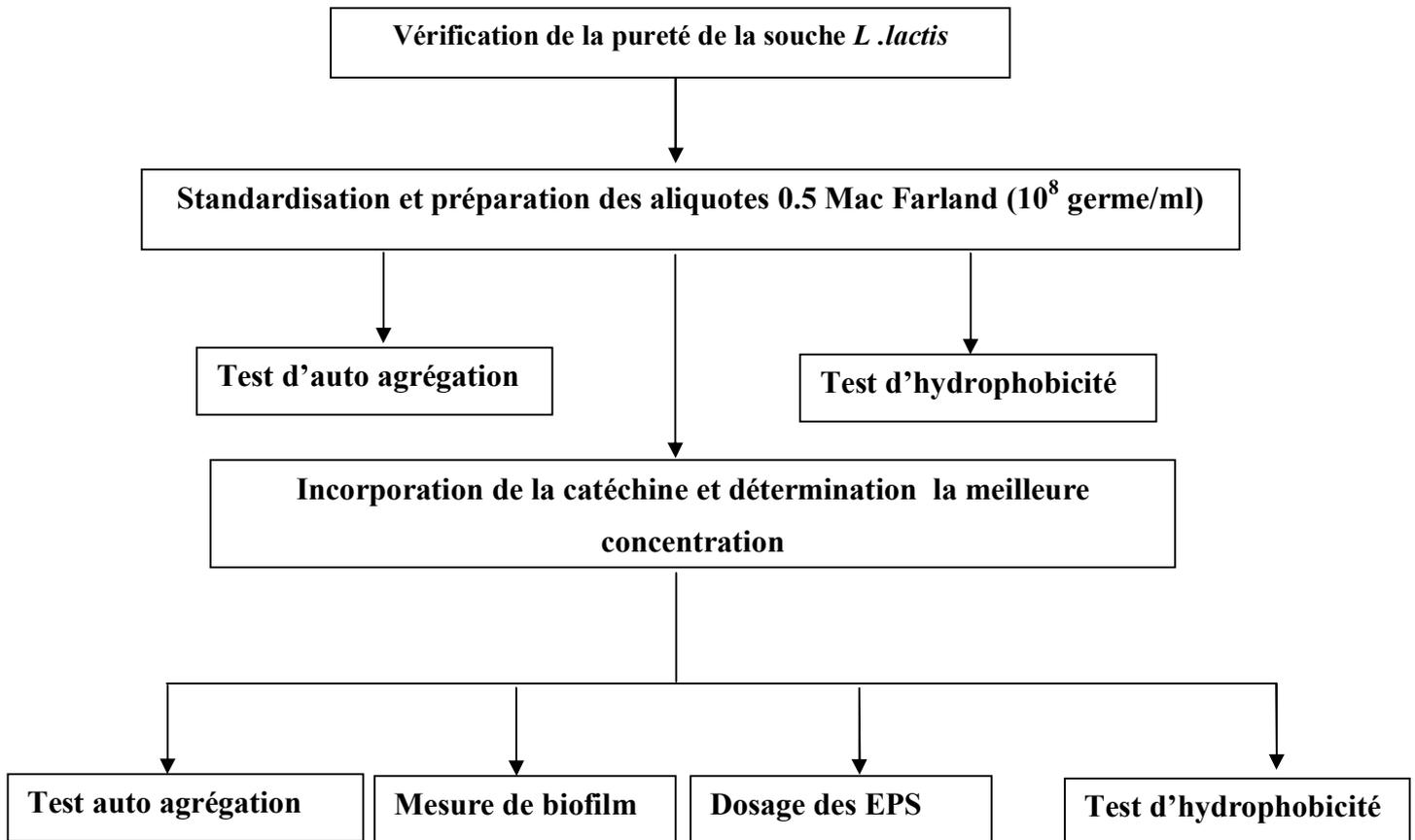


Figure N°01 : Protocole expérimental

I.5.1. Vérification de la pureté de la souche (*Lactococcus lactis*)

La vérification de la pureté de la souche bactérienne a été faite par un examen microscopique après coloration de GRAM et une appréciation de l'uniformité de l'aspect des colonies sur boîte de Pétri (**Examen macroscopique**).

I.5.2. Standardisation et préparation des aliquotes par Mac Farland

Lactococcus lactis a été incubée dans un bouillon MRS (Man Rogosa Sharpe) pendant 24h à 42°C, les inocula sont conservés après standardisation selon l'échelle 0.5 de MacFarland.

I.5.3. Mesure du pouvoir adhésif (test d'auto agrégation)

La capacité d'auto-agrégation a été évaluée selon la méthode de **Kos et al.(2003)**.

L'étude de l'auto agrégation consiste à faire décanter une charge bactérienne de l'ordre de 10^8 germe/ml. Après centrifugation les bactéries sont lavées deux fois à l'aide d'une solution tampon Phosphate Buffered Saline (PBS) et l'auto agrégation est déterminée après 5 heures d'incubation à la température de laboratoire. Toutes les heures 0.1 ml de la suspension (à partir de la surface) est transféré dans un tube contenant 3.9 ml de PBS et l'absorbance (A) est mesurée à 600 nm. Le pourcentage d'auto-agrégation est calculé comme suit :

$$\% \text{ d'auto-agrégation} = 1 - (A_t/A_0) \times 100$$

A_t = Absorbance aux temps $t = 1, 2, 3, 4, 5$ h.

A_0 = Absorbance à $t = 0$.

I.5.4. Mesure de l'hydrophobicité (test d'adhérence aux solvants)

L'adhésion microbienne aux solvants (MATS) a été mesurée en adoptant la méthode de **(Kos et al.2003)**.

Les cellules ont été récupérées par centrifugation à 5000 g pendant 15 min, lavées deux fois et calibrées à approximativement 10^8 germe /ml. Un millilitre des solvants (Xylène, chloroforme, acétate d'éthyle) est ajouté à 3 millilitre de suspension bactérienne, La phase aqueuse est récupérée après 20 min d'incubation à la température de laboratoire, puis son absorbance (A_1) est mesurée à 600 nm. Le pourcentage d'adhésion est calculé comme suit:

$$\% \text{ d'adhésion} = (1 - A0 / A1) \times 100$$

A = Absorbance après 20min d'incubation

A0 = Absorbance à *t* = 0.

I.5.5. Effet prébiotique de la catéchine

L'effet prébiotique de la catéchine a été évalué en milieu MRS liquide / solide et ceci en incorporant la catéchine à différentes concentrations (0.001, 0.002, 0.003, 0.004 g/ml), ensuite déterminer la meilleure concentration et a été maintenue pour les différents tests.

I.5.6. Effet de la catéchine sur l'agrégation et l'hydrophobicité de la paroi

Des cultures de *L.lactis* ont été réalisées en présence de catéchine et le pouvoir d'adhésion ainsi que l'hydrophobicité ont été mesurés en suivant les mêmes étapes décrites ci-dessus. Les résultats sont comparés à un témoin négatif.

I.5.7. Mesure du taux d'EPS

Des cultures de *L.lactis* ont été réalisées en présence et absence de catéchine

L'extraction d'EPS a été faite en adoptant la technique de **(Ricciro et al.2002)** suivant ces étapes:

Récupération des cellules bactériennes par centrifugation (5000 g/ 10 min) après ébullition à 80°C pendant 15min;

1. Précipitation des EPS
2. Ultrafiltration du surnageant à 4°C;
3. Addition de trois volumes d'éthanol à -20°C;
4. Centrifugation à 10.000 g/20 min à 4°C
5. Redissolution du culot dans trois volumes d'éthanol et centrifugation aux mêmes conditions ; Redissolution du culot obtenu dans de l'eau physiologique stérile

Les EPS sont quantifiées par la méthode colorimétrique (Acide sulfurique-phénol), décrite par **Dubois (1956)** : Dosage des sucres totaux.

- 1ml de la solution d'EPS
- 1ml de phénol
- 5ml d'acide sulfurique

- Agiter par vortex
- Lire la densité optique à 490 nm

I.5.8. Révélation du biofilm formé en présence de la catéchine

Le biofilm total est quantifié par le test du cristal violet décrit par **O'Toole et al. (1999)** selon ces étapes :

- ✚ Renversement de la suspension (culture en présence de catéchine)
- ✚ Coloration par le cristal violet 15min
- ✚ Lavage puis détachement
- ✚ Mesure de la densité optique

I.5.9. Traitement des données

Tous les tests ont été réalisés en duplicata et les moyennes \pm écart-types sont présentés dans les graphes.

Chapitre II:

Résultats et discussion

II.1.Vérification de la pureté de la souche**➤ Caractérisation macroscopique**

Après incubation de 24H, les colonies de *L.lactis* se présentent sous forme ronde, de couleur crèmeuse et lisse (Photo N°01)



Photo N°01 : Aspect des colonies de *lactococcus lactis* après 24 h d'incubation à 37°C

➤ Caractérisation microscopique

L'examen microscopique de *L .lactis* révèle que la souche testée est GRAM positif, sous forme coque, réparties en paires ou en chaînettes (Photo N°02).

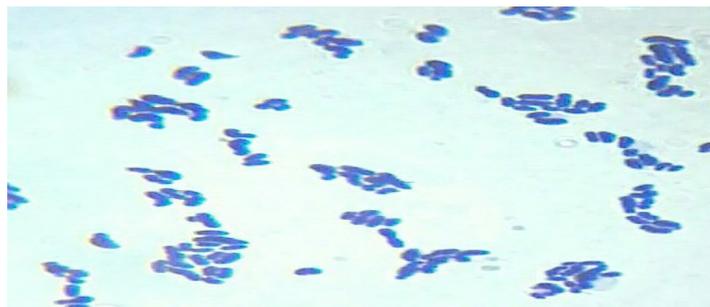


Photo N°02 : Aspect microscopique de *L.lactis* après coloration de Gram.
(Gx100).

II.2. Mesure du pouvoir adhésif (test d'auto agrégation)

La figure N°02 montre les résultats du test d'agrégation de *L.lactis*, nous remarquons que l'adhésion s'est améliorée au cours du temps (T0 à T5), elle s'est augmentée de 83,31% à 97,52.

Ces résultats ont indiqué que la souche présentait un fort caractère auto agrégatif

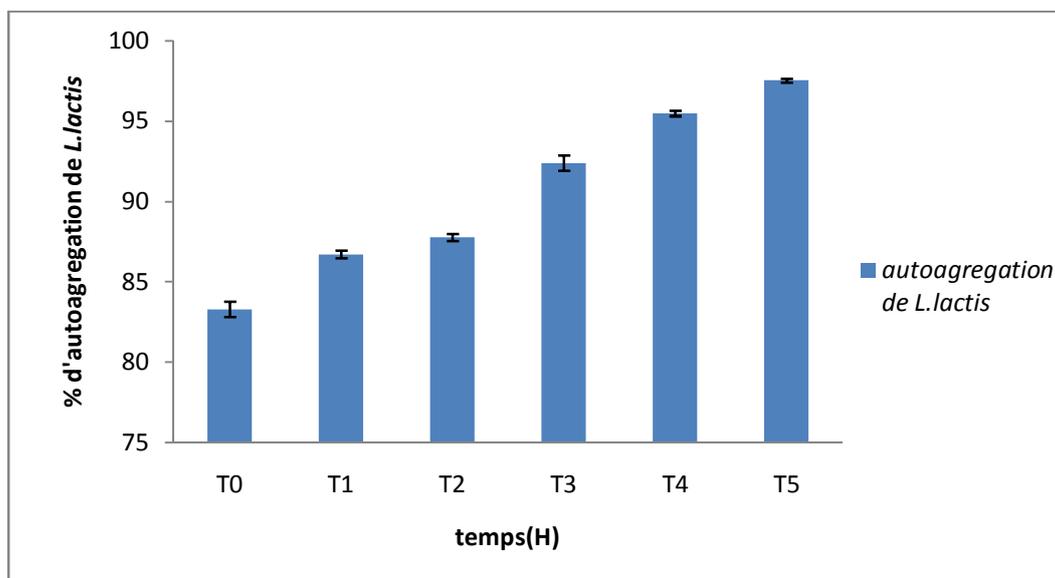


Figure N°02 : Pourcentage d'adhésion (auto agrégation) de *Lactococcus lactis*

Les résultats obtenus sont similaires à ceux de **Koset al. (2003)** qui montrait que l'agrégation de *Lactobacillus acidophilus M92* après 5h de décantation s'est améliorée jusqu'à 71.30%, selon **Kos** l'autoagrégation pourrait être liée à la présence de certaines composante de la surface cellulaire, car elle a été perdu après traitement enzymatique, alors que les cellules ont préservé ces propriétés après le lavage dans le PBS.

II.3. Mesure de l'hydrophobicité (test d'adhérence aux solvants)

Les résultats d'hydrophobicité de *L.lactis* sont indiqués dans la **figure N°03**, les résultats montrent que *L.lactis* présente une forte adhérence au xylène avec un pourcentage supérieur à 75,56 ce qui veut dire que la souche présente une paroi hydrophobe.

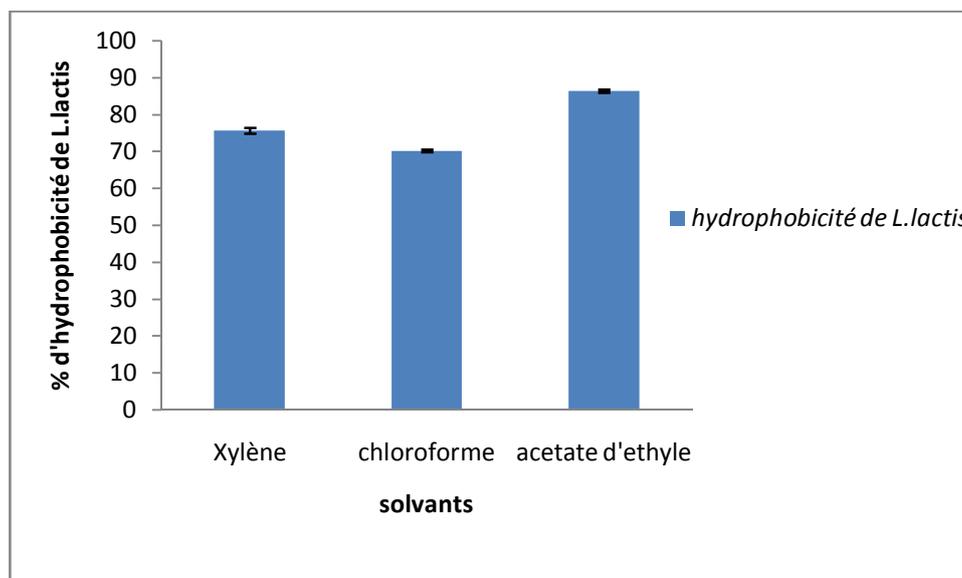


Figure N°03 : Pourcentage d'hydrophobicité (test d'adhérence aux solvants)

L'adhésion bactérienne au chloroforme et à l'acétate d'éthyle a été testée pour évaluer les caractéristiques d'acidité de Lewis de la surface des cellules bactériennes. Cette souche montre une affinité plus forte pour, l'acétate d'éthyle ($\pm 86,27\%$), qui est un solvant basique et un donneur d'électrons, que pour le chloroforme ($\pm 70,12\%$), un solvant acide et un accepteur d'électrons.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Kos et al. (2003)**, pour *L. acidophilus* qui présentait une paroi hydrophobe mais en opposition avec les résultats des deux autres souches *L. plantarum* LA et *Ent. Faecium* qui était totalement hydrophile.

De nombreuses études antérieures sur la physico-chimie des surfaces des cellules microbiennes ont montré que la présence de matériel (glycoprotéique) à la surface de la cellule entraîne une hydrophobicité plus élevée, tandis que les surfaces hydrophiles sont associées à la présence de polysaccharides.

I.4. Effet de la catéchine sur l'agrégation et l'hydrophobicité de la paroi

I.4. 1. Sur l'agrégation

La figure ci-dessous montre les résultats de pourcentage d'adhésion en présence et l'absence de catéchine nous remarquons qu'elle augmente en présence au cours du temps par rapport au témoin. Il est remarquable qu'il s'est amélioré de 86,83% contre 83,31 à T0 jusqu'à 96,245% contre 95,49 à après 4H.

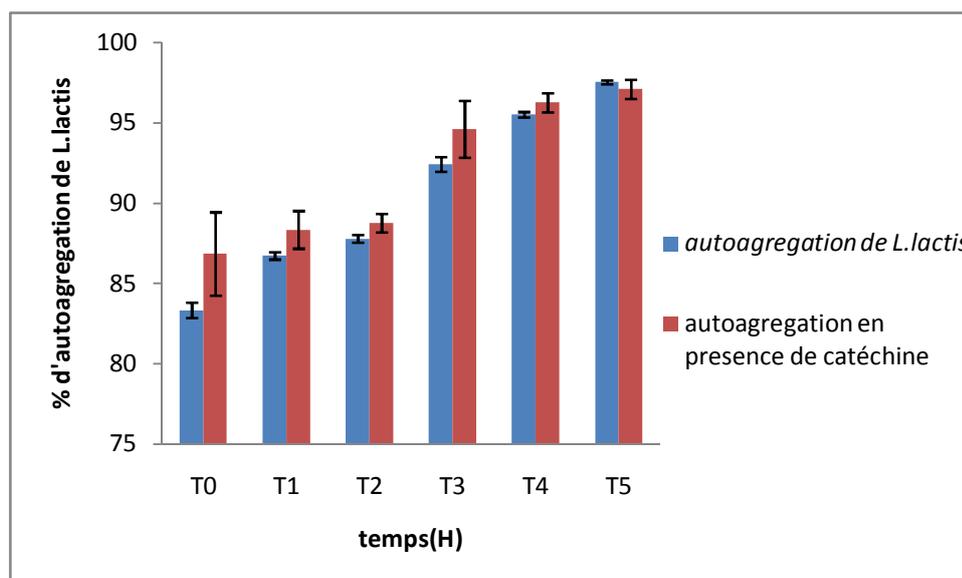


Figure N° 04 : Pourcentage d'agrégation en présence de catéchine

Ces résultats sont similaires avec ceux de **Boubakeur et al. (2016)** lors de son étude sur l'effet prébiotique d'un extrait de plante et a expliqué ce résultat par l'effet stimulant des extraits aqueux sur l'agrégation des probiotiques où elle a été augmentée de 30,625% à 60,06% et de 45,93% à 68,5% pour *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* respectivement. D'autre part l'extrait de plante riche en polyphénols, y compris la catéchine...et améliorant celle des probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus*) (**Parkar et al. 2008**).

L'effet de la catéchine sur la capacité d'agrégation peut être due à l'utilisation de cette substance active par la bactérie qui a amélioré son métabolisme.

I.4. 2. Sur l'hydrophobicité

La figure ci-dessous montre une comparaison du taux d'hydrophobicité de la paroi de *L.lactis* en présence et absence de catéchine, nous remarquons que le pourcentage d'hydrophobicité en présence de la catéchine augmente par rapport au pourcentage en absence de catéchine pour le xylène de 78,69% contre 75,56%, et diminue pour le chloroforme de 67,28% contre 70,12%, et l'acétate d'éthyle de 68,52% contre 86,27%.

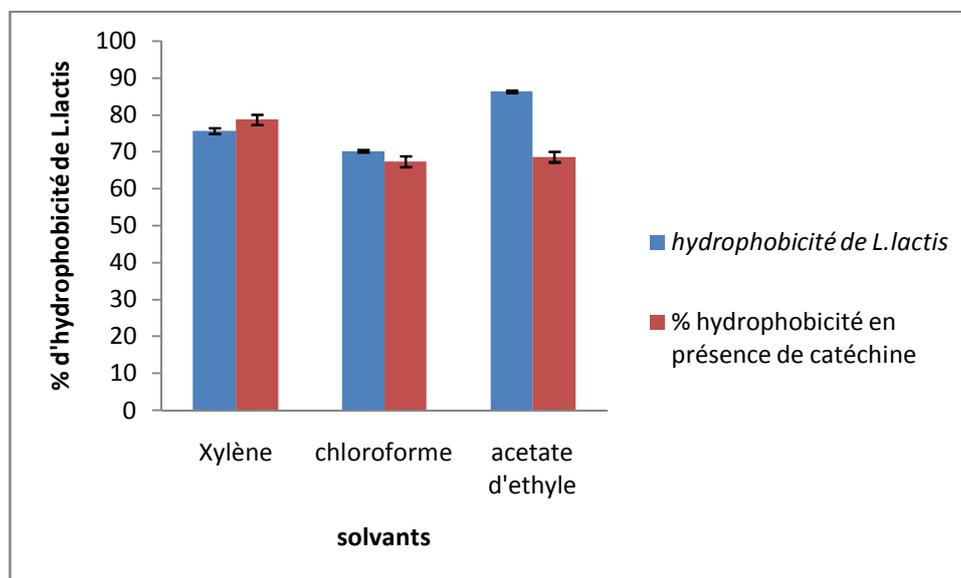


Figure N° 05: Pourcentage d'hydrophobicité en présence de catéchine

Ce résultat est en accord avec celui de **Khalilet al. (2010)** qui ont testé l'acide gallique, et ont montré que les propriétés de la surface se sont modifiées par rapport au témoin.

I.5. Mesure du taux d'EPS et de biofilm formé en présence de la catéchine**I.5. 1. Effet sur la production d'exopolysaccharides**

Le tableau ci-dessus montre les quantités d'EPS produites par *L.lactis* en présence et absence de catéchine, nous remarquons que la production s'est nettement améliorée, elle s'est augmentée de 2491.875 contre 1926.25 en absence de catéchine.

Tableau N°02 : Quantités d'EPS produites par *L.lactis* en présence et absence de catéchine

	En présence de catéchine	En absence de catéchine
Taux d'EPS mg /ml	2491.875	1926.25

La majorité des EPS produit par les LAB sont des hétéropolysaccharides, en quantité minime à raison de 0.5 g / L(Maher et al. 2003); ces polymères ont un effet sur la microflore intestinale car les oligofructoses, fructans, levan et inulin stimulent sélectivement le développement des bifidobacteria(Markus et al.2002)

I.5.2. Effet sur la production Biofilm

Concernant **l'effet de la catéchine sur le biofilm**, il est remarquable sur la photo N° 03 que la coloration en cristal violet (microplaque) est très concentrée en présence de catéchine par rapport à celle du témoin, cette coloration est proportionnelle à la charge cellulaire.

Il est remarquable qu'il y'a une corrélation entre la production d'EPS et la formation de biofilm ainsi la propension en biofilm s'est améliorée en présence de catéchine.

Les études concernant les biofilms des LAB sont minimales, la plupart des auteurs ont étudié la réduction de ces derniers en présence des extraits de plante (**Verhelst et al. 2010 ; Verhlt et al. 2013**).

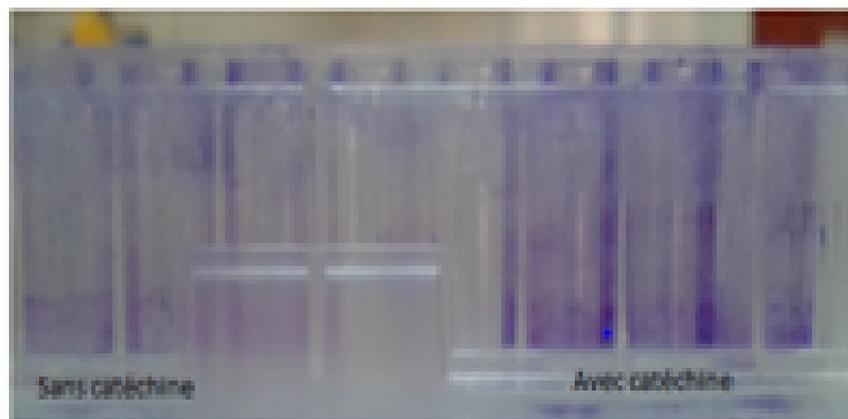


Photo N° 03 : Effet de la catéchine sur la formation du biofilm

Conclusion

Conclusion

De nombreuses équipes de recherche s'intéressent au mode de développement des biofilms et aux facteurs d'adhésion impliqués dans les différentes étapes de leur formation (Cohen, 2002). Par ailleurs peu d'études s'intéressent à l'étude des biofilms positifs, c'est pour quoi nous nous sommes intéressés dans la présente étude à l'évaluation et l'amélioration du biofilm de *L.lactis*

A l'instar des résultats obtenus, nous pouvons suggérer que l'incorporation de la catéchine affectait positivement le pouvoir adhésif (96,245% contre 95,49%) ainsi une bactérie avec caractère adhésif la production d'EPS s'est améliorée et le biofilm formé aussi.

De ce fait l'amélioration du taux d'EPS constitue une alternative aux agents et additifs de nature synthétique.

Vu le manque de certains produits et la non disponibilité du matériel, ce travail nécessite d'être complété au futur par :

- ✚ Caractérisation du polymère produit
- ✚ Etude des différentes étapes du biofilm

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Fernanda M, Raul R, Graciela M. (2010). Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications. Blackwell Publishing. PP : 03

Clutterbuck W. (2007), Biofilms and their relevance to veterinary medicine. Vet Microbiol. Mar 31: 121(1-2): 1-17

Cohen Y. (2002). Bioremediation of oil bay marine microbial mats. Int .microbial ,5,189-193.

Biarnsholtt. (2013). Role of bacterial biofilms in chronic infection. Apmis by wiley backwell. (Suppl.136) PP : 01-51

Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simprag M, Frece J and Matosic S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. Journal of Applied Microbiology. 94: 981-987.

O'Toole G A, Pratt L A, Watnick P I, Newman D K, Weaver V B, and Kolter R. (1999). Genetic approaches to study of biofilms. Methods Enzymol

Boubakeur B, Tirtouil A, Khadem H, Meddah B, Ahcen S. (2016). An Assessment of the Effect of Aqueous Extract from *Thymus fontanesii* on Growth, Aggregation and Biofilm Formation of Pathogenic and Probiotic bacteria. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences. 6(7)1-1, 2016.

Khalil S K and Rowayda A. (2010). Influence of gallic acid and catechine polyphenols on probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 strain. World journal of Microbiology and Biotechnology. 11: 2069-2079.

Parkar, Stevenson, Skinner. (2008). The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. International Journal of Food Microbiology. 124, 295–298.

Verhelst A, Schroyen B, Buys A, Niewold C. (2010). The effects of plant Polyphenols on enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesion and toxin binding. Livestock Science. 133:101–103.

Verhelst A, Schroyen B, Buys A, Niewold C. (2013). *E. coli* heat labile toxin (LT) inactivation by specific polyphenols is aggregation dependent. Veterinary Microbiology. 163 : 319-324.

Références Bibliographiques

Maher K, Melanie P, Michael G, and Rudi F .(2003) .Exopolysaccharide and Kestose Production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. Applied and Environmental Microbiology. Apr. 2003, P.2073–2079

Markus T, Maher K, Matthias A, Ehrmann, Michael G, and Rudi F. (2002). In Situ Production of Exopolysaccharides during Sourdough Fermentation by Cereal and Intestinal Isolates of Lactic Acid Bacteria. Applied And Environmental Microbiology. Feb. 2003, P. 945–952

Annexes

Annexe n°01 : Préparation des milieux de culture**MRS Bouillon**

Peptone	1g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 8.01ml
Phosphate di potassique.2g
Acétate de sodium	5g
Citrate de triammonique	2g
Sulfate de magnésium.	200g
Sulfate de manganèse.	50g

PH =6,5 Autoclavage à 120c° pendant 15min.

MRS Gélose

Il s'agit du milieu précédent gélosé à 1,5 .Autoclavage à 120c°pendant 15min.

PH=7,2 Autoclavage à 120c°pendant 15min.

PBS

Composition du PBS (phosphate Buffer saline)

Chlorure de sodium.8g
Chlorure de potassium.	0,2g
Phosphate disodique.	1,15g
Phosphate monopotassique.	0,2g

1Ld'eau distillée /PH=7,3Autoclavage à 120C° pendant 15min.

Annexe n°02 : Principe de coloration de GRAM

Elle permet l'identification de la paroi des bactéries, nous avons deux grandes catégories :

- **Les bactéries Gram+** : la paroi est riche en murine et en magnésium qui donne une couleur violette.
- **Les bactéries Gram-** : la paroi est riche en lipides qui donnent une couleur rose

Technique : (BERTRAND ,1997 ; FLANDROIS ; 1997et HIRMAN, 1999).

- Recouvrir le frottis par le violet de gentiane pendant une minute.
- Rejeter le violet en l'entraînant avec la solution de lugol mordant pendant une minute.

Faire décolorer la lame inclinée par l'alcool jusqu'à ce que la dernière goutte soit non colorée.

- Rincer par l'eau distillée
- Recolorer avec la fuchsine et laisser pendant 10à20secondes.
- Rincer par l'eau distillée une deuxième fois.
- Sécher en chaleur
- Examen à l'immersion

Résultats :

- Les bactéries Gram+ : gardant la coloration violette après décoloration par l'alcool.
- Les bactéries Gram- : décolorent par l'alcool, sont teintées par la fuchsine et apparaissent rose ou rouge.

Résumé

Le **biofilm** est une communauté de microorganismes adhérant entre eux au sein d'une matrice de polymère auto-sécrétée, adhésive et protectrice, et/ou fixée à une surface, il a un rôle essentiel dans de nombreux processus.

Cette étude vis à évaluer la propension en biofilm de *Lactococcuslactis*, une souche d'une grande utilisation en agroalimentaire et de tester l'effet d'une substance active (**catéchine**) sur le développement, l'adhérence et la production d'**Exopolysaccharide**.

Les résultats obtenus montrent l'efficacité de la stratégie d'amélioration adoptée, en effet la **catéchine** affecte positivement le pouvoir adhésif (95, 49 % contre 96,245 %), le taux d'EPS (1926.25 contre 2491.875 mg /ml) et le biofilm formé de *Lactococcus lactis*.

Mots clés : Biofilm, Exopolysaccharide, catéchine, *Lactococcuslactis*

ملخص

البيوفيلم هو مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة ملتصقة فيما بينها في البوليمار المفرز والمثبتة على السطح لها دور أساسي في الكثير من العمليات .

هدف هذه الدراسة هو تقييم تطور **بيوفيلم** *Lactococcuslactis*, وهي سلالة لها فائدة كبيرة في التصنيع الغذائي واختبار تأثير المادة الفعالة (**الكاتشين**) على التطور , الالتصاق وإنتاج **متعدد السكريات**

أظهرت النتائج المتحصل عليها فعالية تحسين الإستراتيجية المتبناة , حيث اثر **الكاتشين** ايجابيا على ظاهرة الالتصاق لدى *Lactococcuslactis* (95, 49 % مقابل 96,245 %) , ومعدل إنتاج **متعدد السكريات**

(1926.25 مقابل 2491.875مغ/مل) وتشكيل **البيوفيلم**.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية- البيوفيلم- متعدد السكريات- كاتشين