

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
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 de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Toxicologie et sécurité alimentaire

Présentée par :

MECHRI Amel

MECHETAK Nacera

Thème

Investigation de l'effet des extraits polyphénoliques des graines de fenugrec et des noyaux de dattes sur les caractéristiques membranaires et adhésives des bactéries opportunistes pathogènes

Soutenu publiquement le 2/07/2019

Jury:

Grade

Encadrant : M^{me} KHADEM .H MAA

Présidente : M^{me} MILLIANI. A.....MAA

Examineur : M^{mr} ABBES A.M ... MCB

Année universitaire 2018/2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Allah (الله) le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre chère encadrante M^{me} KKADEM K pour ses précieux conseils sa confiance et son aide durant toute la période du travail

Un merci tout spécial à M^{lle} BOUBAKER B pour sa bonne humeur et ses encouragements au cours de la réalisation de ce travail

Nos vifs remerciements pour les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions

Un grand merci à M^{me} Meliani A pour avoir acceptée de présider le jury.

On tiens à exprimer nos sincères gratitude à M Abbase M pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant d'en être l'un des examinateurs

Nos profonds remerciements vont également à tous les enseignants qui nous ont donné les bases de la recherche pendant les cinq ans et les Personnes qui nous ont aidé et contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce travail :
Aux deux être les plus chers au monde qui ont donné sens à mon existence, en
m'offrant une éducation digne de confiance qui m'ont soutenu nuit et jours
durant tout mon parcours.

J'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de
fierté que j'éprouve d'être votre fille

Mes très chères soeurs, Soraya , houda , Kadjer
Mes très chers frères, Zakaria Abd aldjalil , Kichem
A mes neveux Schayb , Farouk , Firasse
A toute la famille Mechri
A toutes mes amies Amel , Asama , Mnawra , Nadjet , Sara , Fatima
, Schrak

A ma chère binôme Nassira

Amel

Dédicace

Avant tous mes profonds remerciements vont à Allah qui m'a aidé et m'a donné courage pour effectuer ce travail

Je dédie ce modeste travail à

À mes très chers parents qui ont été toujours à mes côtés pour leur générosité et leur sacrifices

À mon cher frère Kadi merci beaucoup

À toutes mes sœurs et leurs enfants

À tous mes amis(es) sans exception surtout : Houda ; Nesrine ; Mimi ; Nadjet ; Sara ; Menawera ; Asmaa ; Amel ; Khalida ; Ichraque ; Fadila

Nacera

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Partie Bibliographique

I.1 Historique et Définition.....	01
I.2 Formation de biofilm.....	01
I.3 Biofilms négatifs et positifs	02

Chapitre I : Matériel et méthode

1.1 Objectifs du travail	05
1.2 Lieu de travail	05
1.3 Matériel et produits chimiques	05
1.4 Démarche expérimentale	05
1.5 Etude phytochimique	09
1.5.1 Préparation des extraits.....	09
1.5.2 Dosage des poly phénols totaux et des flavonoïdes.....	10
5.2.1 Dosage des polyphénols totaux.....	10
5.2.2 Dosage des flavonoïdes.....	11
1.5.3 Etude microbiologique	11
5.3.1 Préparation des aliquotes.....	11
5.3.2 Evaluation de l'effet antibactérien des extraits de fenugrec et des dattes	11
1.5.4 Effet antiadhésif des extraits de fenugrec et des dattes.....	12
1.5.5 Analyse statistiques.....	13

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1 Identification macroscopique et microscopique des souches	14
II.2 Résultats de l'étude phytochimiques.....	15
2.1 Optimisation du la matrice d'extraction et estimation des taux de polyphénols et de flavonoïdes	15

2.2 Estimation de taux de poly phénols et flavonoïdes de l'extrait aqueux des graines des dattes	16
II.3 Activité antibactérienne des extrait aqueux des graines de fenugrec et des graines des dattes	17
II.4 Evaluation de l'éradication de biofilm par l'extrait de fenugrec et des grains des dattes.....	20
II.5 Effet de l'extrait de fenugrec sur l'adhérence bactérienne	21
II.5 Effet de l'extrait de fenugrec sur l'adhérence bactérienne	21
 Conclusion	24
 Référence bibliographiques	25
 Annexes	26

Liste des figures

Figure N°1 : Développement et structure d'un biofilm bactérien.....	02
Figure N°2 : Principales infections associées aux biofilms.....	03
Figure N°3 : Schéma du Protocole expérimental.....	08
Figure N°4 : Etapes de préparation de l'extrait des graines de fenugrec.....	09
Figure N°5 : Etapes de préparations de l'extrait des noyaux des dattes	10
Figure N°6 : Aspect microscopique et macroscopique de <i>S.aureus</i>	14
Figure N°7 : Aspect microscopique et macroscopique de <i>E.Coli</i>	14
Figure N°8 : Taux de polyphénols et de flavonoïdes d'extrait aqueux de fenugrec.....	15
Figure N°9 : Taux de polyphénols et de flavonoïdes de l'extrait aqueux des dattes	17
Figure N°10 : Viabilité de <i>S.aureus</i> et <i>E.Coli</i> en présence de l'extrait aqueux de fenugrec.....	18
Figure N°11 : Viabilité en présence de l'extrait aqueux des graines des dattes	19
Figure N°12 : Pourcentage d'inhibition de biofilm de l'extrait aqueux de fenugrec de deux souches <i>E.coli</i> et <i>S.aureus</i>	20
Figure N°13 : Concentration inhibitrice de biofilm d'extrait aqueux des dattes sur les deux souches <i>E.coli</i> et <i>S.aureus</i>	21
Figure N°14 : Pourcentage d'autoagregation des deux souches en présence et absence d'extrait aqueux de fenugrec sur les deux souche.....	22
Figure N°15 : Pourcentage de coagregation des deux souches en présence et absence de l'extrait aqueux de fenugrec	22

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Description botanique des deux graines.....	06
Tableau N°2 : Caractéristiques des deux souches.	06
Tableau N°3 : Produits, appareillage utilisés dans l'expérimentation.....	07

Introduction

Le biofilm est un processus cellulaire dynamique dont la formation pour plusieurs pathogènes est étroitement liée à la communication cellule-cellule ; Connue sous le nom de quorum (QS).

En milieu clinique, ces derniers sont la cause majeure de la plus part des infections et de leur dangerosité, en effet ce mode de vie offre aux microorganismes une protection accrue contre les agents antimicrobiens et même au système immunitaire de l'hôte (**Kaufmann ; 2008**).

En effet la lutte contre les biofilms est un défi; grâce aux nombreuses recherches ; les progrès en moyen d'investigation ont amélioré les connaissances concernant ce phénomène et ont permis de mieux comprendre la structuration et la composition des biofilms ; Cependant certaines moyens classiques de lutte devient inefficaces face à ces formes rigides de résistance, chose qui exige l'application de nouvelles alternatives.

Depuis des siècles, les composés d'origine végétale dotés d'une certaine innocuité sont utilisés contre les infections microbiennes (**Costerton et al, 1999**) ; des approches innovantes ont été adoptées récemment et ont prouvées leur pouvoir antimicrobiens et antibiofilm.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude visant à évaluer l'effet antiadhésif et antibiofilm des graines de fenugrec et des dattes dont l'optique de trouver une alternative permettant d'atténuer les biofilms.

Le corps de ce manuscrit est composé de deux parties, une bibliographie présentant les notions de base sur les biofilms bactériens et une partie expérimentale exposant les protocoles adoptés, les résultats obtenus et leur discussion et en fin une conclusion générale.

Il est admis maintenant que les bactéries existent majoritairement (plus de **90%**) dans la nature, le corps humain et l'environnement industriel n'ont pas dans leur état planctonique (mode libre) mais plus tôt fixées à des supports dans des biofilm (mode sessile) ; Ce mode de vie confère sans doute beaucoup d'avantages aux populations microbiennes.

I.1. Historique et Définition

Le terme biofilm a été utilisé pour la première fois en **1943** par **C.E. Zobbel**, à cette époque les biofilms étaient connues par leur existence dans les écosystèmes naturels et aussi par leurs applications industrielles lors de l'épuration des effluents; mais vue la non disponibilité des outils d'investigation, il était impossible de les observer **in situ** ni de comprendre leur formation et leur fonction (**Branger, 2007**).

Ce n'est qu'à la fin des années **1970** que le microbiologiste **John william (dit Bill) Costerton** a désigné le terme biofilm comme étant " communautés microbienne se développant sur des surfaces ". Depuis, les biofilms ont fut objet de nombreuses études, d'ailleurs en **1990**, un institut de recherche a été fondé dans le Mantana et a été entièrement dédié à l'étude des biofilms.

En **1995**, le terme biofilm a été redéfini en tant que " populations bactériennes à matrice fermée adhérant les unes aux autres et/ou à des surfaces ou des interfaces " (**Briandet et al, 2012**).

I.2. Formation de biofilm

Face à un stress environnemental ou lors d'un traitement destructif, les bactéries ont tendance à former des biofilms différents selon la variation des facteurs qui les induisent. Ces facteurs sont nombreux et concerne, la surface, le milieu et les microorganismes ainsi que les interactions entre ces derniers. Selon (**Percival et al 2000**), la formation de biofilm s'agit d'un phénomène complexe qui peut se résumer en cinq étapes citées ci-dessous et expliquées dans la **figure N°1** Développement d'un film conditionnant (film primaire)

- 1.** Transport des bactéries vers la surface et initiation à l'adhérence qui est au début du processus réversible et devient irréversible par la suite
- 2.** Croissance et division des microorganismes avec la colonisation de la surface
- 3.** Formation de microcolonies et de biofilms
- 4.** Détachement (naissance d'un nouveau biofilm)

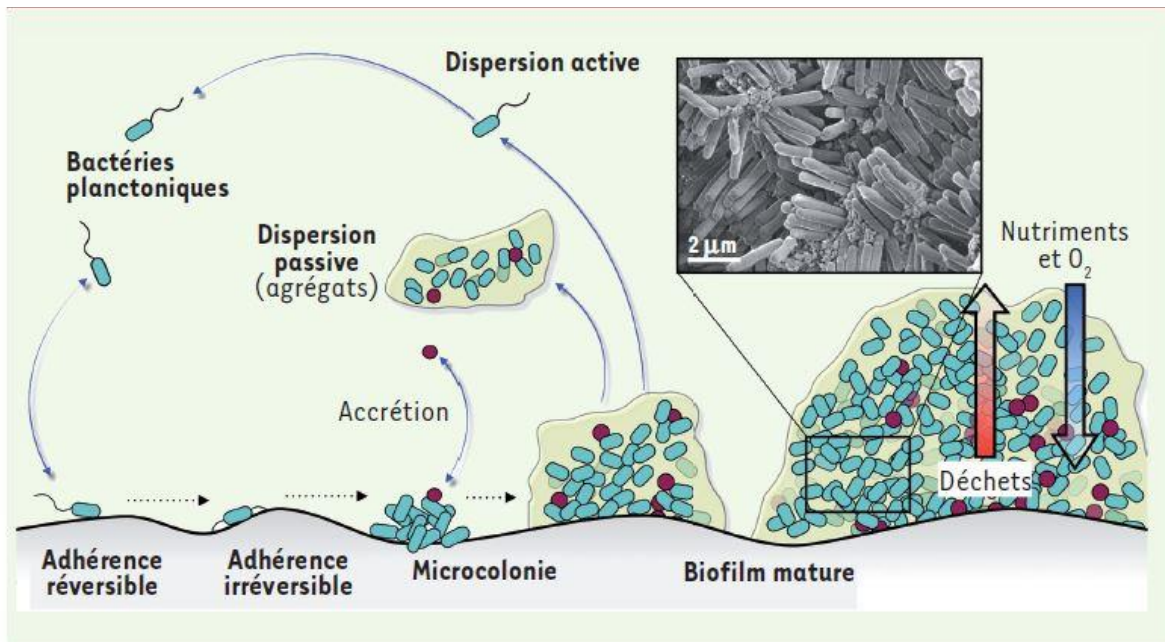


Figure N°1 : Développement et structure d'un biofilm bactérien (Leboux et al, 2012)

I.3. Biofilms négatifs et positifs

A cause de leur développement non contrôlable, les biofilms sont à l'origine de nombreux problèmes économiques et sanitaires. Selon (Branger 2007), 80% des infections sont causées par des biofilms, ces dernières touchent plus particulièrement les personnes immunodéprimées.

En effet les biofilms peuvent se développer en contribuant à des infections en milieux hospitaliers (instruments médicaux : sondes urinaires, cathéters veineux, tubes) et également dans l'environnement agroalimentaire (les installations industrielles, bioréacteurs) (Roux et al 2006)

La figure N°2 montre l'implication des biofilms dans de nombreuses infections.

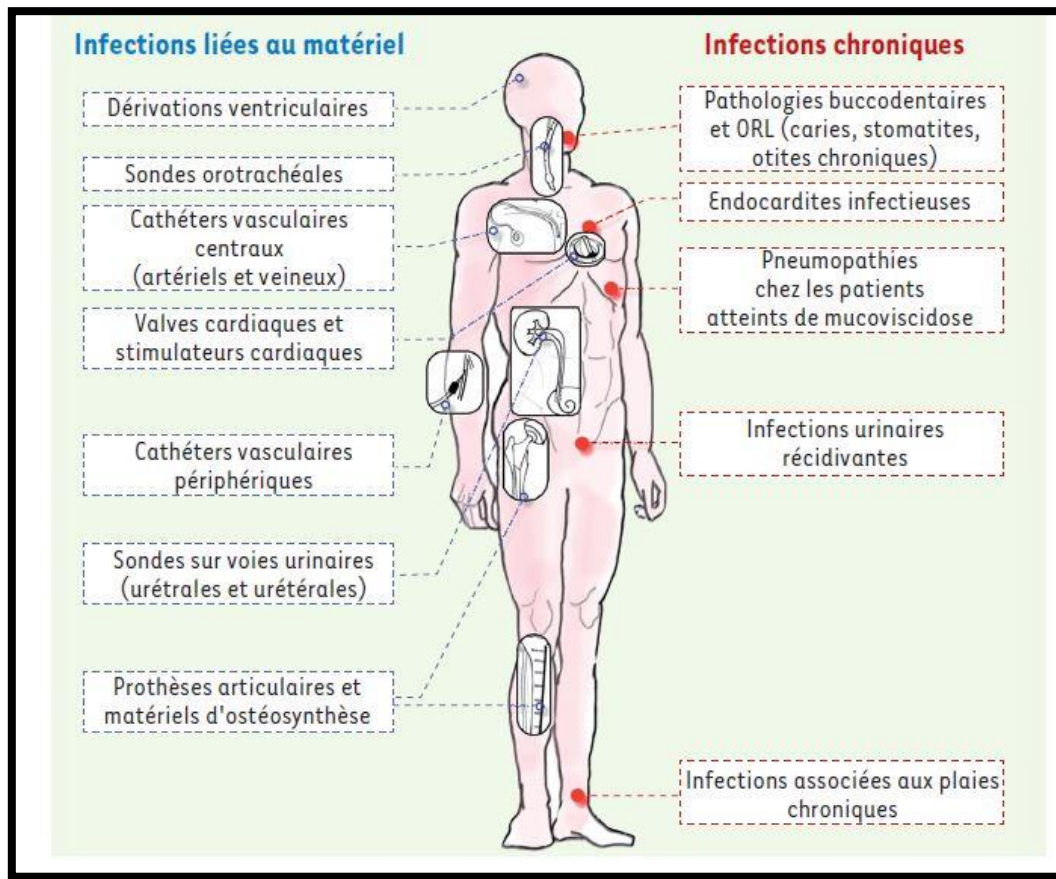


Figure N°2 : Principales infections associées aux biofilms (Leboux et al, 2012)

Lors des infections chroniques, les biofilms sont les premiers responsables de la fatalité de la maladie. Leur architecture leur permet d'échapper au système immunitaire ; *Pseudomonas aeruginosa* produit comme substances des rhamnolipides pour détruire les globules blancs (Branger , 2007).

Biofilms bactériens : Mi ange- Mi démon

Les biofilms peuvent aussi être utiles à l'homme, ce côté ange se manifeste par exemple lors de la symbiose microorganismes-hôtes jouant un rôle crucial dans la digestion, d'ailleurs l'effet barrière du microbiote intestinal contre les pathogènes est favorisé par l'interaction probiotiques-prebiotiques. Ainsi lors des productions à l'échelle industrielle, l'approche d'utilisation des cultures fixées (biofilms) est une alternative aux cultures planctoniques dans un but d'améliorer le rendement par exemple en alcool, polysaccharides et acides (**Branger, 2007**).

Chapitre I :
Matériel et méthodes

I.1. Objectif

Le principal objectif de la présente étude était d'appliquer une stratégie naturelle permettant de minimiser et ou d'éradiquer le biofilm de certaines bactéries pathogènes *E. coli* et *S. aureus*.

La conduite expérimentale était faite en plusieurs étapes :

- ✚ Optimiser la matrice d'extraction (Eau, méthanol dilué), l'extrait retenu est choisis après vérification de son qualité (richesse en substances actives)
- ✚ Déterminer la concentration éradicatrice de biofilm (CEB)
- ✚ Evaluer l'effet des extraits de plante sur certains facteurs responsables de l'adhérence bactérienne et donc de sa pathogénicité.

I.2. Lieu et période de travail

La démarche expérimentale relative à cette étude a été effectuée sur une période de trois mois allant du mois de Février au mois de Mai 2019, elle a eu lieu au sein des deux laboratoires de biochimie et de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret.

I.3. Matériel et produits chimiques



Le matériel nécessaire pour accomplir le présent travail consistait en :

I.3.1. Matériel biologique

I.3.1.1. Matériel végétal

- a) Les graines de plantes choisis dans cette étude sont celles du Fenugrec et du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*). Ces deux graines ont été choisies vu que leur utilisation n'a fait objet que pour peu de recherche scientifique. Il est a noté que l'objectif initial de l'étude était d'évaluer l'effet des extraits des deux graines, cependant à cause de la difficulté de travail dans le laboratoire et l'impossibilité de prolonger la durée, il était impossible d'achever le travail. Le **tableau N°1** présente une description botanique des deux graines

Tableau N°1 : Description botaniques des graines des dattes et fenugrec (Djerbi 1994 , Bermejo 1994)

Plantes	Palmier dattier	Fenugrec	Description morphologique
Ordre	Palmales	Fabales	
Famille	Palmacée(Arecaceae)	Fabaceae	
Tribu	Phoeniceae	Rosidae	
Genre	Phoenix	Trigonella	
Espèce	Dactylifera L.	Trigonella foenum-graecum L	

I.3.1.2. Souches bactériennes

Les souches bactériennes faisant objet de cette étude sont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, ces bactéries ont été fournies de l’institut vétérinaire de l’université de Tiaret. Le **tableau N°2** présente certaines caractéristiques des deux souches.

Tableau N° 2 : Caractéristiques des deux souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*

Souches bactériennes	Type de Gram	Morphologie	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Coque	25922
<i>Escherichia coli</i>	-	Bacille	25923

I.3.2. Matériel du laboratoire

Le tableau suivant regroupe le matériel et les produits chimiques nécessaires à la réalisation de ce travail.

Tableau N°3 : Produits, appareillages utilisés dans l'expérimentation

Matériels et Appareillages	Produits chimiques et réactifs	Milieus de culture
Autoclave <i>SANOCLAVE</i>) Agitateur magnétique chauffant (<i>FISHERBRAND</i>) Balance de précision (<i>KERN ALS 12C 4N</i>) Centrifugeuse (<i>HETTICH</i>) Etuve (<i>MEMMERT</i>) Spectrophotomètre (<i>UV-1600PC</i>) Incubateur (<i>Haraeus</i>) Vortex Réfrigérateur	Carbonate de sodium (Na_2CO_3) Trichlorure d'aluminium (ALCL_3) Acide acétique Folin ciocalteu Cristal violet Méthanol Glycérine Luguol Violet de Gentiane Fuschine	Bouillon nutritif Mac conky Chapman Mueller Hinton

I.4. Démarche expérimentale

Les étapes nécessaires à la conduite expérimentale sont illustrées dans l'organigramme suivant.

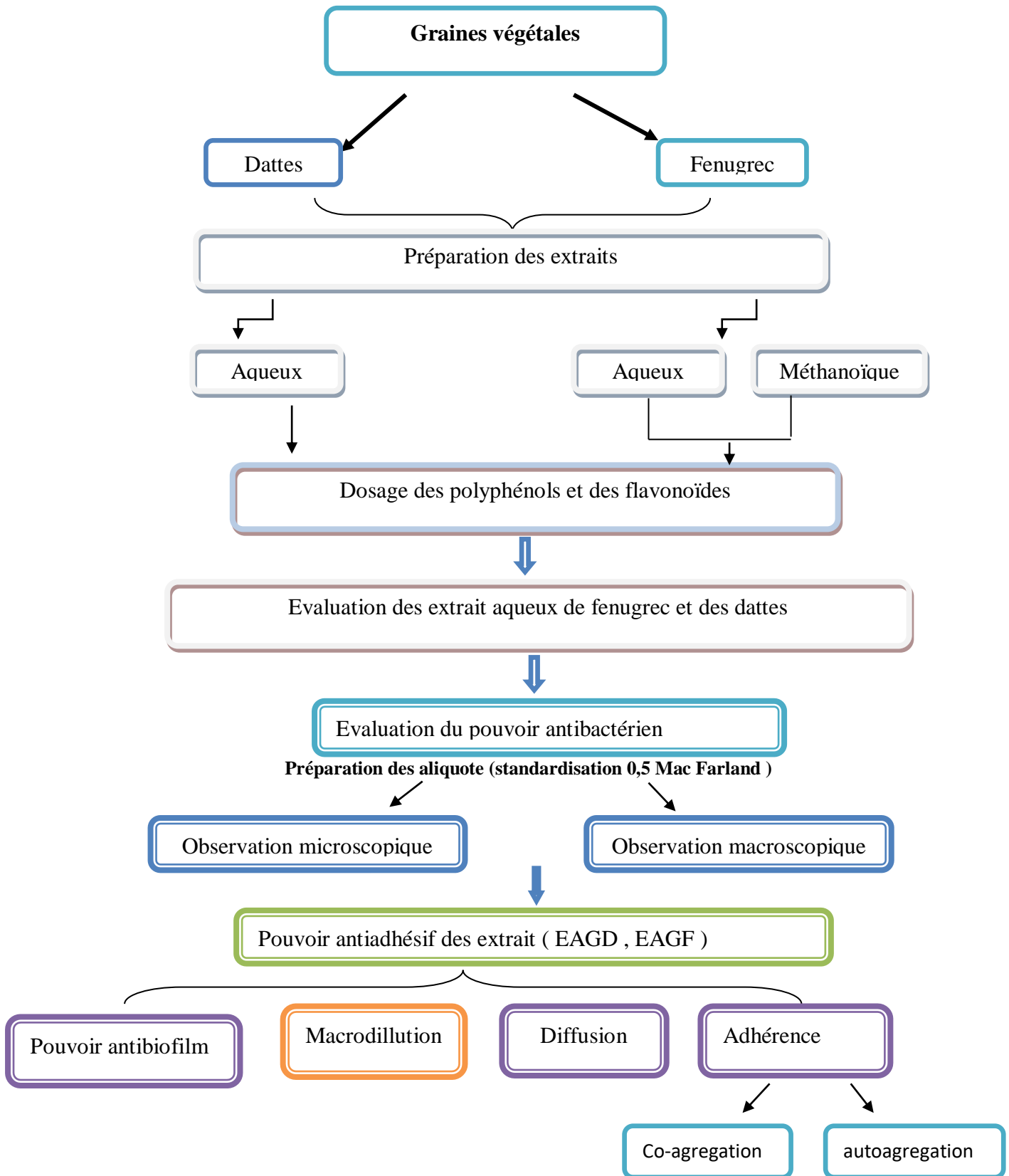


Figure N°3 : Schéma du Protocole expérimental

I.5. Etude phytochimique

I.5.1. Préparation des extraits

- a) **Extrait du fenugrec** : Cette préparation a été réalisée en adoptant le protocole de **ElNour (2015)** et ces collaborateurs avec certaines modifications. **50g** de graine de fenugrec ont été macérés dans 100mL d'eau distillée pour préparer l'extrait aqueux, et dans un mélange de solvants eau/ méthanol à raison de **70%**. Le mélange ont été broyés dans un mortier puis filtré (voir figure ci-dessous)

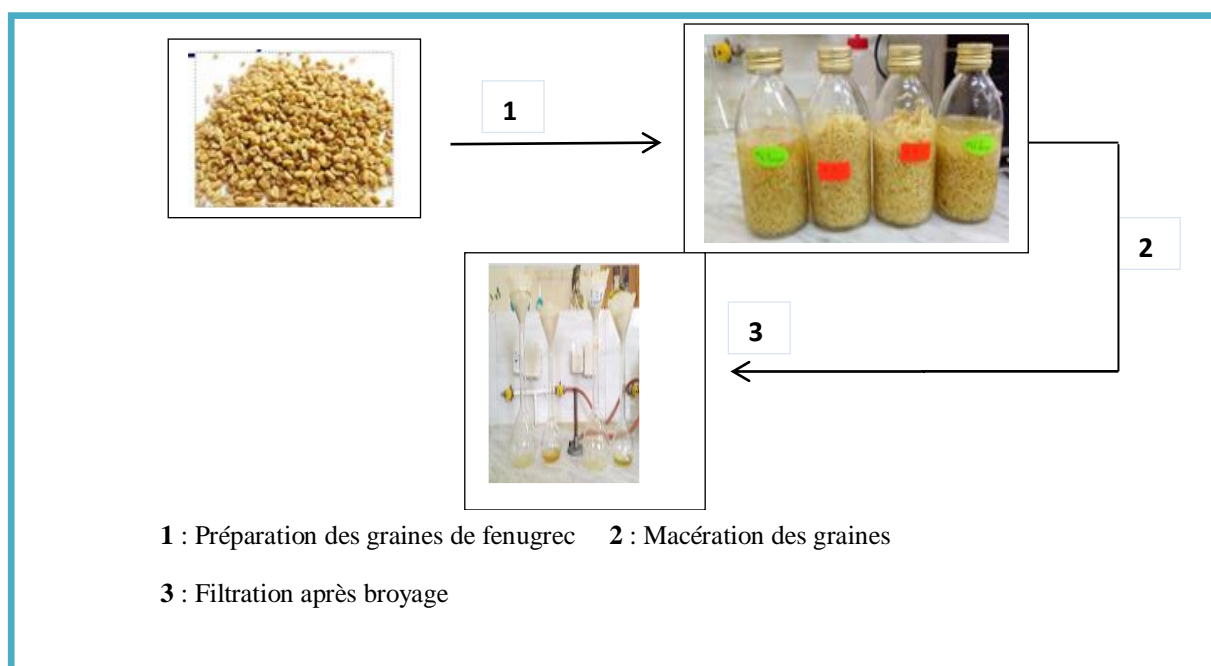


Figure N°4 : Etapes de préparation de l'extrait des graines de fenugrec

- b) **Extrait des graines de dattes** : La préparation été faite en adoptant la technique décrite par **Boubakeur et al 2016**. 5g de poudre des graines de dattes ont été macérés dans 100mL d'eau distillée, puis sonifiés à 35 KHZ pendant 45 min. Le mélange a été filtré et le filtrat est ensuite récupéré et évaporé (rotavapeur). Le culot obtenue a été pesé puis reconstitué dans un volume d'eau distillée (voir figure ci-dessous).

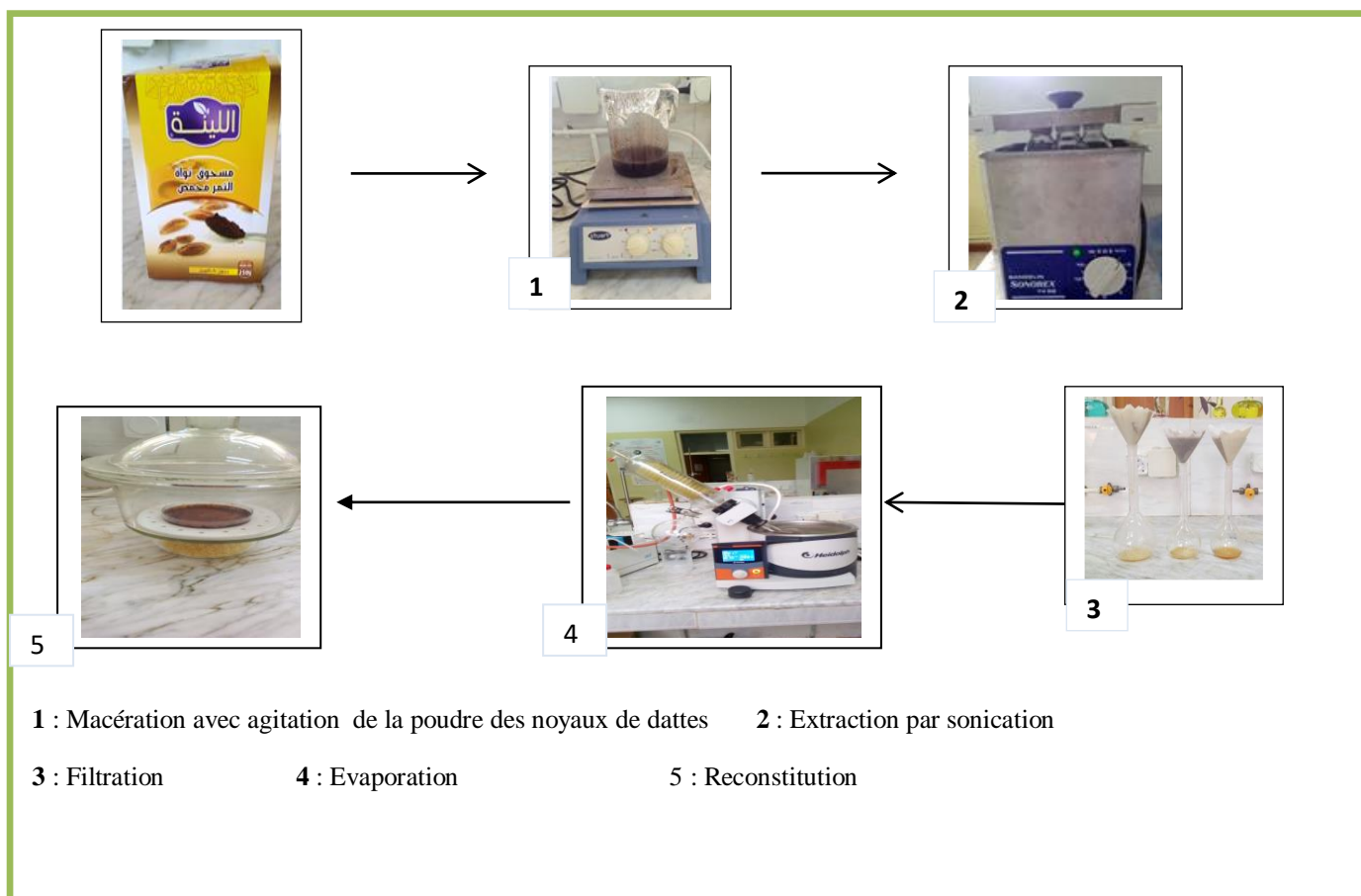


Figure N°5 : Etapes de préparations de l'extrait des noyaux des dattes

I.5.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

I.5.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le taux des polyphénols totaux dans l'extrait du fenugrec et celui des graines des dattes a été déterminé en utilisant la méthode du Folin-Ciocalteu comme décrit par **Lister et Wilson (2001)**. À 100 μl de l'échantillon, 500 μl du réactif Folin-Ciocalteu (10 fois dilué) et 1000 μl d'eau distillée sont ajoutés, cette solution est mélangée et incubée à la température ambiante pendant 1 min. Ensuite 1500 μl d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 20% sont ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 760 nm après incubation à température ambiante pendant 2 h et à l'obscurité, les résultats sont exprimés en mg d'acide gallique (GEA)/ml d'extrait de fenugrec et par mg d'acide gallique (GEA)/g du poids sec de poudre de datte.

I.5.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le taux de flavonoïdes a été déterminé en adoptant la technique décrite par **Breghente et al (2007)**. À **2 mL** de l'échantillon, **2 mL** d'une solution d'**AlCl₃** sont ajoutés, le mélange est incubé à température ambiante pendant 1h, ensuite l'absorbance est mesurée à **415 nm**. Les résultats sont exprimés en mg de catéchine (Cat).

I.5.3 Etude microbiologique**I.5.3.1 Préparation des aliquotes**

Les cultures bactériennes déjà conservées ont été repiquées sur milieux convenable (Chapman pour *S. aureus* et Mac Conkay pour *E.coli*), après une incubation de 24h, la vérification de la pureté des souches a été faite après appréciation de l'aspect des colonies sur gélose et une coloration de Gram. Les aliquotes ont été préparés en inoculant le bouillon nutritif par une colonie prévenant d'une culture pure. Les suspensions bactériennes ont été incubées par la suite et servaient d'aliquotes.

Les inocula sont préparés avant toute manipulation par standardisation à l'échelle **0.5** Mac Farland.

I.5.3.2. Evaluation de l'effet antibactérien des extraits de fenugrec et des dattes

a. Macrodilution : Cette méthode a été décrite selon le protocole de **Brantner et al (1994)** avec des modifications, quatre séries de tube ont été préparées pour tester l'effet des extraits vis-à-vis les différentes souches bactériennes, chaque tube contient au total **2000 µl** de milieu de culture- extrait et inoculé par **250µl** d'un inoculum de **10⁷ CFU/mL** dont le but d'avoir les dilutions suivantes : **0,046, 0,097, 0,216 , 0,363 , 0,551 , 0,8 , 1,14 , 1,64** , les séries de tubes ont été incubées à **37C°/24h** et les densités optiques ont été prise à 625nm pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI)

I.5.5. Effet antiadhésif des extraits de fenugrec et des dattes

a) Autoaggrégation : Les tests de l'autoaggrégation et de coaggrégation des souches bactériennes ont été réalisée en adoptant la technique de **Kos et al**

(2003) modifiée; chaque suspension bactérienne a été incubée en présence de l'extrait (CMI) à 37°C pendant 18h, elles ont été centrifugées à 5000 g pendant 15 min puis lavées trois fois au PBS, une fois récupéré le culot a été ajusté à 10⁸ cfu/mL dans le PBS. Un test contrôle a été réalisé comme décrit précédemment mais en absence de l'extrait. Le pourcentage d'agrégation a été calculé chaque heure après décantation de 5h en appliquant la formule suivante:

$$\% = (1 - A_t / A_0) \cdot 100$$

A₀ : Absorbance à t₀

A_t : Absorbance après 1h, 2h,.....5h

- b) **Coaggrégation :** Les suspensions bactériennes ont été incubées en présence et absence de l'extrait (contrôle), elles ont été traitées comme décrit précédemment puis des volumes égaux de chaque suspension ont été mélangés et la mixture a été décantée pendant 5h. Le pourcentage de Coaggrégation a été calculé en appliquant cette formule:

$$\% = [1 - ((A_{x+y}) / (A_x + A_y))] \cdot 100$$

A_X : Absorbance de la souche X

A_Y : Absorbance de la souche Y

A_{X+Y} : Absorbance du mélange des souches X et Y

- c) **Pouvoir d'éradication de biofilm**

Ce test a été réalisé selon la technique décrite par **Boubakeur et al (2016)**, elle consiste à incuber des suspensions bactériennes chacune a part en présence et absence de l'extrait. Après incubation de 24h les séries de tubes ont été colorées par le cristal violet, incubées pendant 10min puis lavées à l'eau distillée. Le taux d'éradication de biofilm a été calculé en lisant les densités optiques après traitement acide en appliquant la formule suivante:

$$\% = (A \text{ sans extrait} / A \text{ avec extrait}) \cdot 100$$

I.5.6 Analyse statistique

Chaque test a été répété deux fois, les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type.

Chapitre II :
Résultats et discussion

II.1. Identification macroscopique et microscopique

D'après les résultats de l'identification macro et microscopique, *S. aureus* est une bactérie sous forme de coque, immobile à gram positif, regroupé en chainettes ou en grappe de raisin. Cette espèce se caractérise sur gélose par des colonies de couleur jaune, rondes, lisses et à bord régulier (**voir figure N°6**). La souche est catalase positive.

L'espèce bactérienne *E.coli* se présente sous forme de coccobacille à gram négatif, en chainettes. Sur milieu solide, les colonies de *E.coli* apparaissent de couleur rose, lisses à bord et forme irrégulière, de relief plat (**voir figure N°7**). La souche est catalase positive.

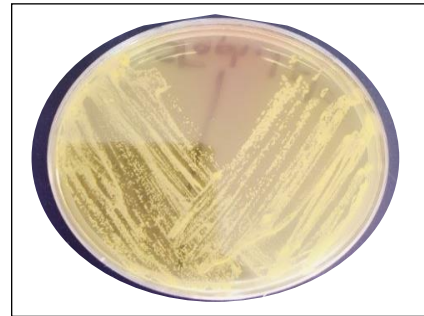
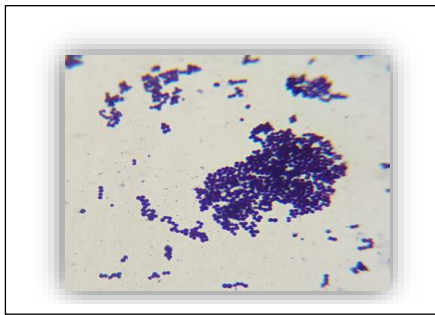


Figure N°6 : Aspect microscopique (G×100) et macroscopique de *S.aureus*

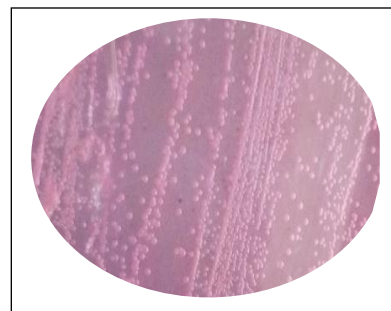
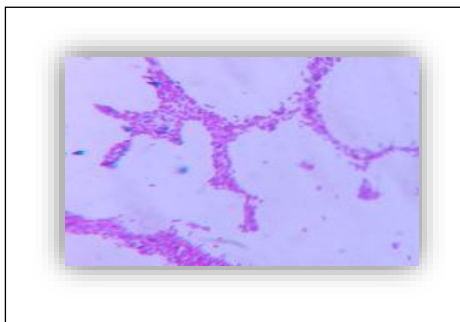


Figure N°7 : Aspect microscopique (G×100) et macroscopique de *E.coli*

II.2. Résultats de l'étude phytochimique

II.2.1. Optimisation de la matrice d'extraction et estimation du taux de poly phénols et de flavonoïdes

La figure ci-dessous présente le taux de polyphénols et de flavonoïdes des extraits aqueux (EAqGF) et méthanoïque (EMGF).

Nous remarquons que la matrice d'extraction n'avait pas un effet significatif sur la qualité de l'extrait de fenugrec ($p>0.05$). Le taux de poly phénols était de **919** Eq acide gallique/ mL d'extrait et de **877** Eq acide gallique/ mL d'extrait pour l'EAqGF et EMGF respectivement. Quant à la teneur en flavonoïdes, le taux était de **340** Eq catéchine/ mL d'extrait et de **445** Eq catéchine/ mL pour l' EAqGF et EMGF respectivement.

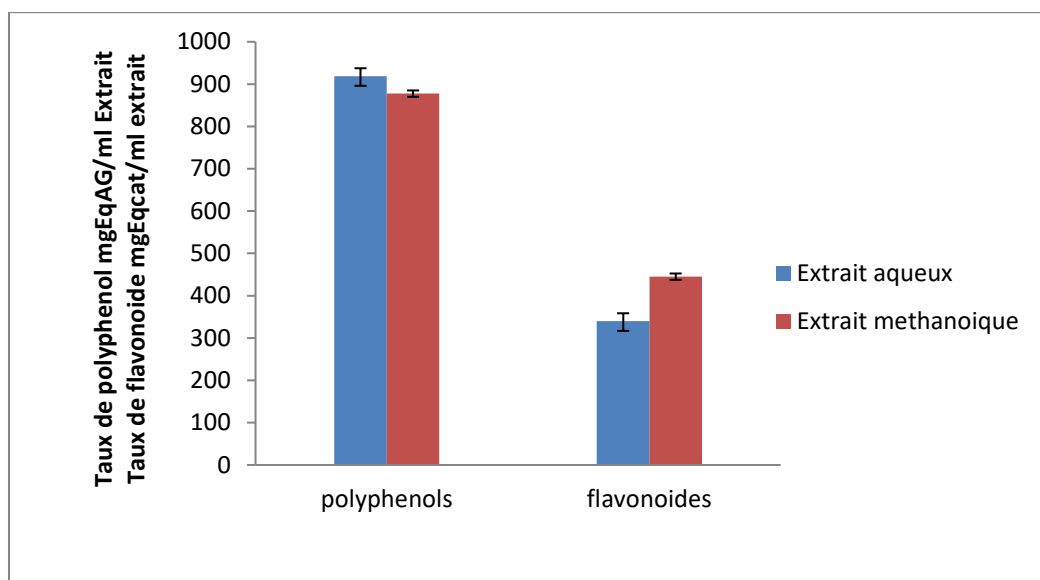


Figure N°8 : Taux de polyphénols et flavonoïdes des extraits de fenugrec

Ces résultats sont accord à ceux de **Norziah et al (2015)** ; **Sharara (2017)** **Norziah et ses collaborateurs** ont montré lors de leur étude sur l'activité antioxydante et antibactérienne des différents extraits de fenugrec que le meilleur rendement d'extraction était obtenu par l'eau par rapport à l'éthanol et le méthanol, et que le méthanol est plus efficace pour l'extraction des flavonoïdes; Cependant l'extrait aqueux de fenugrec était le plus riche en substances actives et avait une meilleure activité biologique.

La richesse de l'extrait de fenugrec pouvait être expliquée par le fait que les solvants tel le méthanol peuvent dénaturer les membranes cellulaires et faire

dissoudre certains polyphénols (antocyanes). L'eau est la matrice d'extraction la plus souhaitable grâce à ses propriétés écologiques et non toxiques, en plus les extraits préparés dans l'eau peuvent être utilisés en toute sécurité dans les formulations alimentaires (Norziah et al; 2015). Sharara (2017) a montré que la valeur nutritive des graines de fenugrec est améliorée dans certaines conditions et que la quantité d'alcaloïdes et de composés volatils est diminuée ce qui donne des graines de fenugrec mieux adaptées aux consommateurs.

II.2.2. Estimation du taux de polyphénols et de flavonoïdes dans l'extrait aqueux des graines de dattes

Le rendement d'extraction des graines de dattes a été estimé à **10 %** . La richesse de l'extrait aqueux de ces graines en polyphénols et flavonoïdes est illustrée dans l'histogramme ci-dessous. Il est remarquable qu'à la concentration de **0,363g/mL** le taux de polyphénols et de flavonoïdes était estimé à **53 mgEq** acide gallique/g d'extrait et **18 mgEq** catéchine/g d'extrait respectivement.

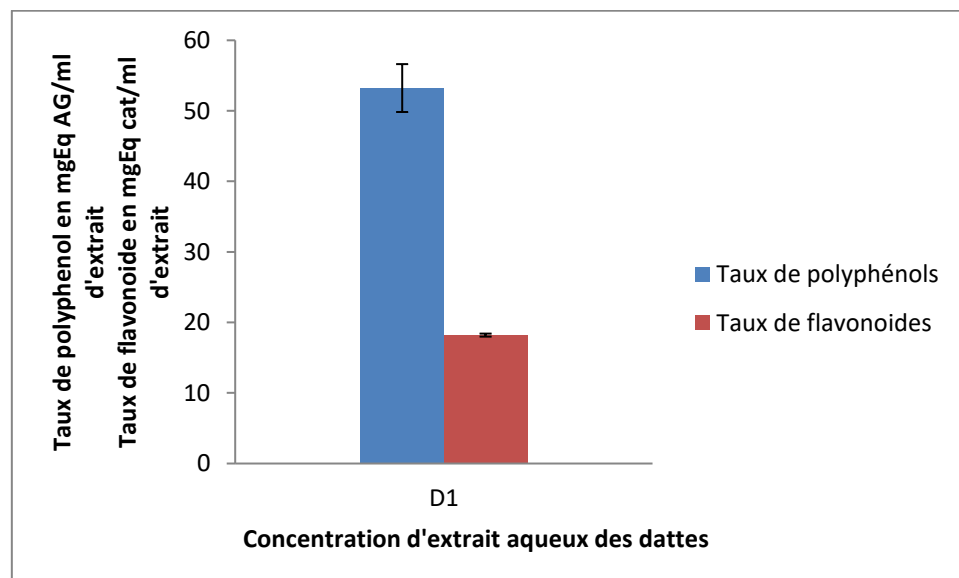


Figure N°9: Taux de polyphénols et flavonoïdes de l'extrait aqueux des graines des dattes

II.3 Activité antibactérienne des extraits aqueux de fenugrec et des graines des dattes

L'effet antibactérien des deux extraits vis à vis les deux souches pathogènes est illustré dans la figure N°9 et N°10, nous remarquons qu'on présence des concentrations croissantes en extrait aqueux de fenugrec, le taux de viabilité des deux souches était différent, il a été augmenté pour les concentrations C1, C2 et C3. La concentration minimale inhibitrice de la croissance était estimé à la dilution **0,363(C4)** pour *E. coli* et *S. aureus* avec une réduction au nombre de germes de **7,74** log₁₀ CFU contre **8,32** log₁₀ CFU pour *E. coli* et **7,92** log₁₀ CFU contre **8,05** log₁₀ CFU pour *S. aureus*..

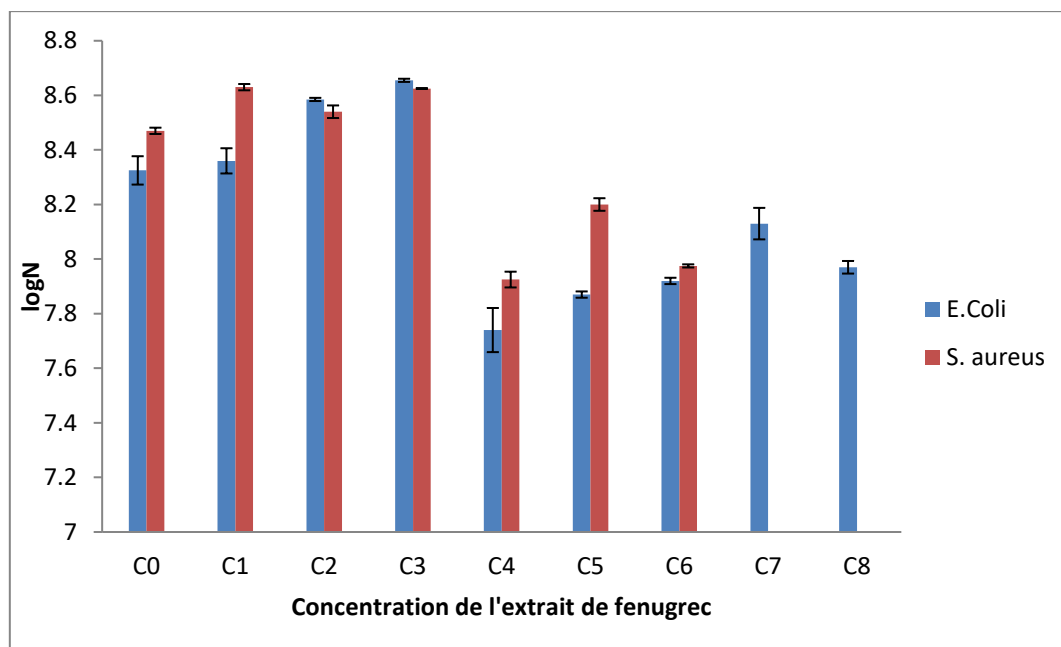


Figure N°10 : Viabilités de *S.aureus* et *E.coli* en présence de l'extrait aqueux de Fenugrec

E.coli était plus résistante à l'action de l'extrait de fenugrec même à des concentrations élevées, ce ci été décrit par **Boubakeur et al (2016)** et a été expliqué par la différence de composition de la paroi cellulaire.

Sur la **figure N° 11** sont illustrés les résultats de la viabilité des souches en présence de l'extrait aqueux des graines des dattes. Il est clairement notable qu'il y'avait réduction en nombre de germes en présence de C1 (**0,046g/mL**) mais au-delà de la C2 (**0,097 g/mL**) les

deux souches ont bien résisté à l'action de l'extrait, ce qui peut être expliqué par une adaptation déjà connue chez les souches testés. Les concentrations testées devaient être augmentées pour pouvoir déterminer la concentration minimale bactéricide.

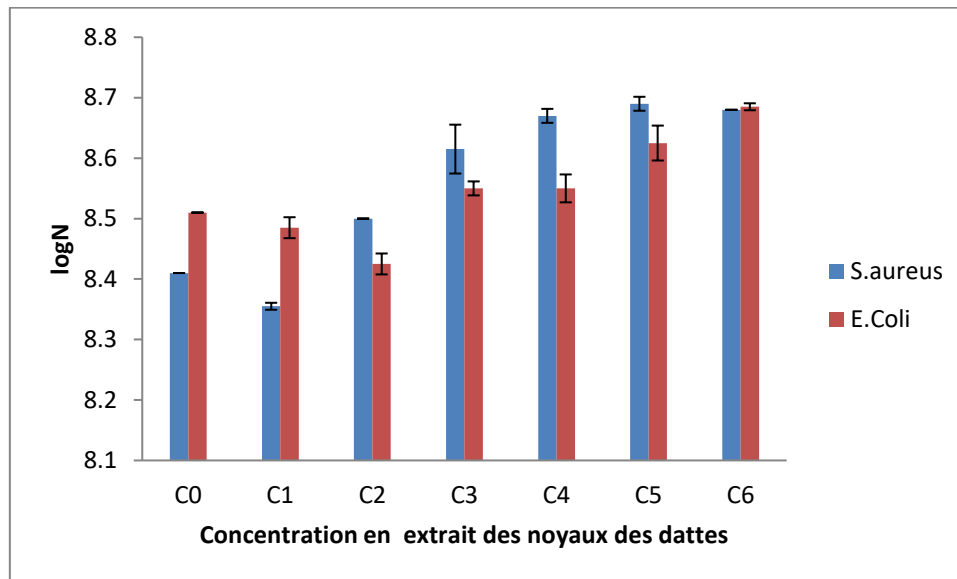


Figure N°11 : Test de viabilité en présence de l'extrait aqueux des graines des dattes

Les extraits de plantes sont connus par leur effet antimicrobien, en effet la différence dans l'activité peut être due à la composition très diverse en substances actives. **Norziah et al (2015)**, ont montré que l'extrait aqueux de fenugrec était le plus efficace par rapport aux autres extraits, ce qui pourrait être dû à la présence d'une forte teneur en phénols et autres composés bioactifs. Ainsi **Haouala et al (2008)** ont aussi suggéré que l'effet antimicrobien des graines de fenugrec est dû à la présence des composés phénoliques, alcaloïdes, tanins, etc.

Dans une autre étude menée sur les dattes, **Saleh (2016)** a montré que l'extrait des noyaux des dattes était efficace contre *E. coli* et *S. aureus*. En effet ces substances exercent leur effet antimicrobien en perturbant ou en rompant les membranes cellulaires (**Brul et al, 1999**).

L'estimation de l'effet antibactérien des deux extraits par la méthode des disques n'a donné aucune zone d'inhibition. Ce résultat est similaire à celui **Sharma et al (20017)** qui ont montré que l'extrait aqueux reste sans effet sur certaines souches pathogènes.

II.4 Evaluation de l'éradication de biofilm par l'extrait de Fenugrec et des graines de dattes

Sur la **figure N°10 et N°11** sont illustrés les pourcentages d'inhibition de biofilm des souches en présence des différentes concentrations en extrait de fenugrec et des dattes. On remarque que le % d'inhibition de biofilm était estimé à la concentration C4 (77%) et C3 (54%), ces concentrations sont considérées comme éradicatrices de biofilm. Ces résultats sont proches de ceux de **Boubakeur et al (2016)**.

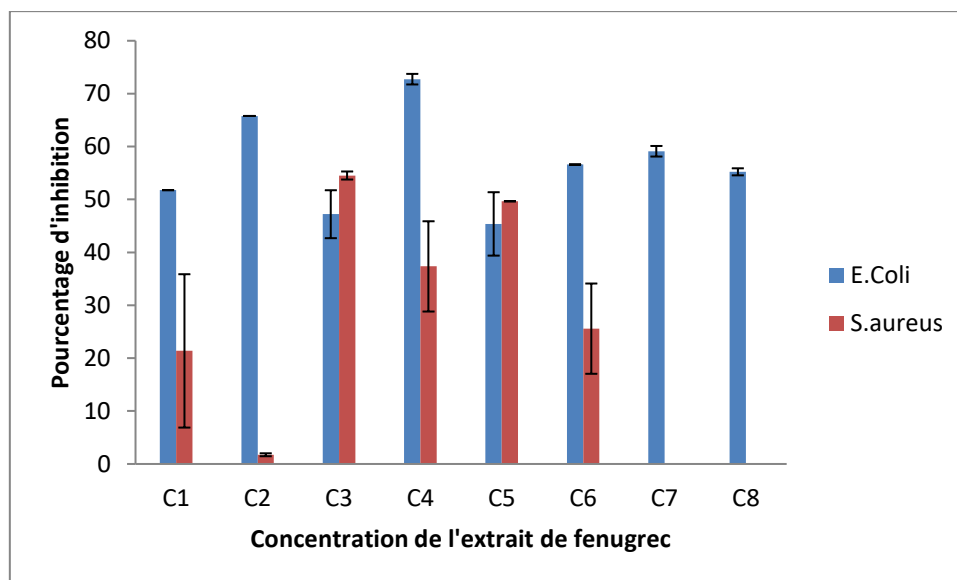


Figure N°12 : Pourcentage d'inhibition de biofilm des deux souches en présence et absence de l'extrait aqueux de fenugrec

La formation de biofilm en présence de l'extrait des graines de dattes est illustrée dans l'histogramme **N°11** il est à noter que les différentes concentrations testées n'ont pas provoqué l'éradication de biofilm, le test doit être effectué à concentrations plus élevées.

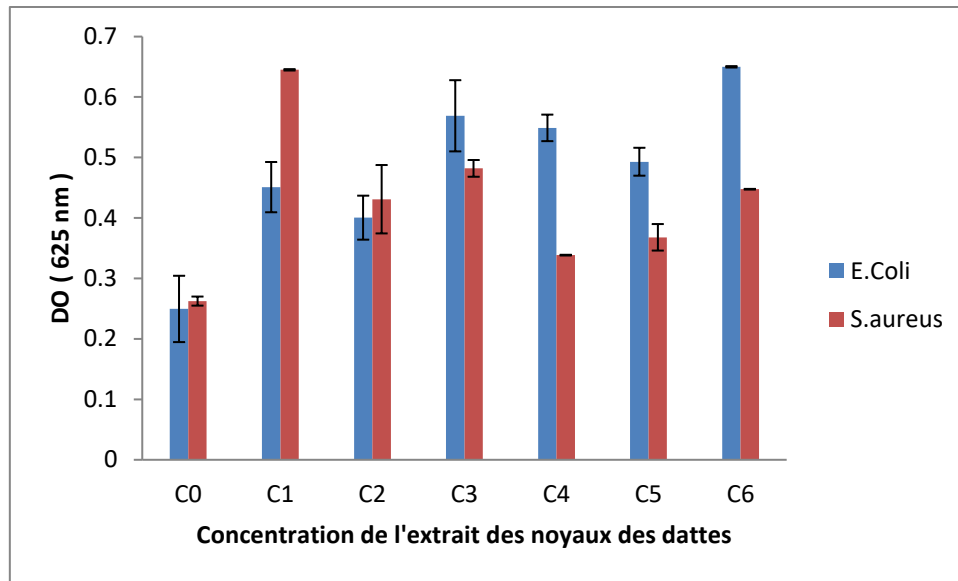


Figure N°13 : Concentration inhibitrice de biofilm d'extrait aqueux des dattes de deux souche *E.coli* et *S.aureus*

II.5. Effet de l'extrait de fenugrec sur l'adhérence

a. Autoagrégation

Le pourcentage d'agrégation des deux souches est illustré dans la figure ci-dessous, nous remarquons qu'en présence de la concentration minimale inhibitrice, les pourcentages d'agrégation ont été diminués par rapport au contrôle (sans extrait) et ceci pour *E. coli* et *S. aureus* respectivement (67% VS 88% et 58% VS 88 %).

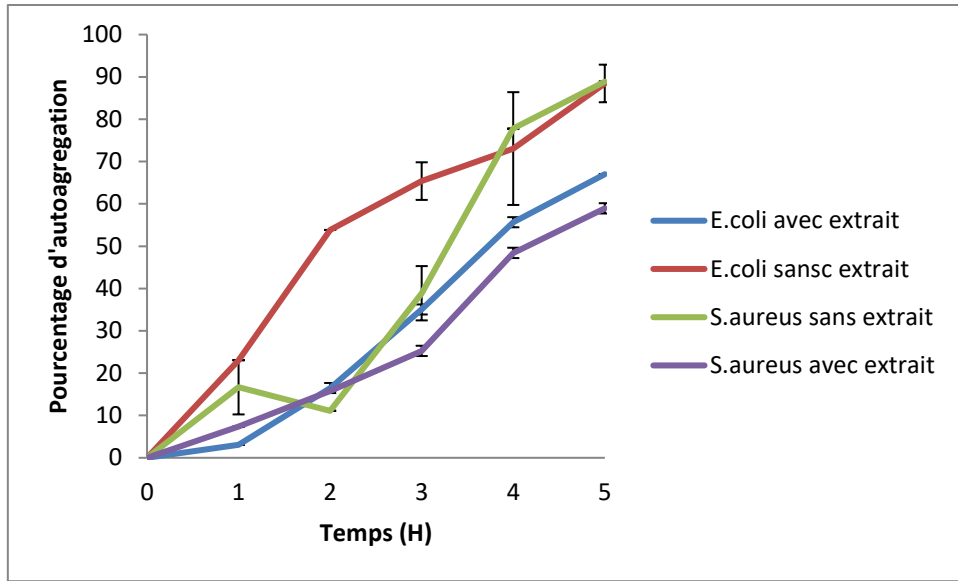


Figure N°14 : Pourcentage d’autoagrégation des deux souches en présence et absence de l’extrait aqueux de fenugrec

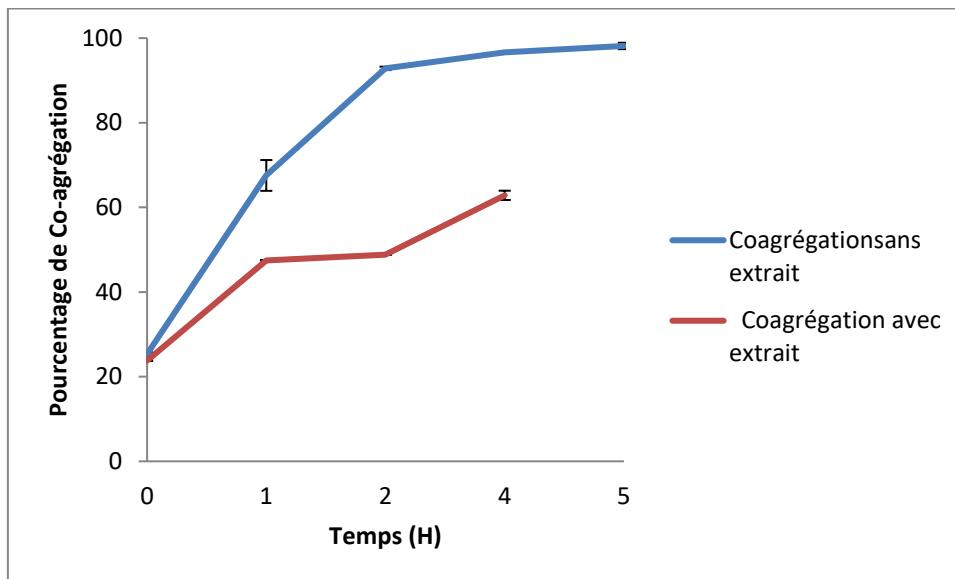


Figure N°15: Pourcentage de coagrégation des deux souches en présence et absence d’extrait aqueux de fenugrec

Ces résultats sont similaires à ceux de **John et al (2013)** qui montraient une réduction en l'auto et la congrégation de certaines souches pathogènes responsables de la carie dentaire en présence des extraits de plantes.

Conclusion

Conclusion

La présente étude avait pour objectif principale d'appliquer une approche nouvelle permettant de réduire et/ou d'éliminer certains biofilms. La stratégie adoptée consistait à l'utilisation de l'extrait des graines de fenugrec et des dattes.

A l'issue de ce travail, nous pouvons constater que l'extrait aqueux de fenugrec est très riche en substances actives que celui des graines de dattes, le taux de polyphénols et de flavonoïdes était respectivement dans EAqGF : **900 mgEqAG** et de **300 mgEq Cat/mL** d'extrait contre **53 mgEAq AG** et **18 mg Eq Cat/g** dans l'EAqD. Les deux extraits se sont avérés efficaces contre le développement de *S. aureus* et *E. coli* avec une réduction de **0,54 log₁₀CFU** et **0,58 log₁₀CFU** pour l'extrait aqueux de fenugrec.

Les extraits des graines utilisées ont aussi été efficaces concernant l'adhérence bactérienne, en effet les pourcentages de l'auto et la coagrégation ont diminués en présence de l'extrait de fenugrec, ainsi le biofilm a été réduit de **72%** chez *E. coli* et **37%** chez *S. aureus*.

Ce travail nécessite d'être complété au futur par :

- ✓ L'utilisation de nouvelles matrices d'extraction outre l'eau et le méthanol
- ✓ Comparaison de la composition des extraits des graines fenugrec et des dattes ;
- ✓ Comprendre le mécanisme d'action des substances bioactives permettant l'éradication des biofilms ;
- ✓ Compléter le travail par les graines de dattes

Référence Bibliographiques

B

Bermejo J.E. H., León J. , (Eds.). (1994). *Neglected crops: 1492 from a different perspective* (No. 26). Food & Agriculture Org.

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.*J. Appl. Environ. Biol. Sci. P 1-13

Boubakeur B., Tirtouil A., Khadem H., Meddah B.,Ahcen S. (2015). *The evaluation of the effect of synthetic flavonoids on growth of pathogenic and probiotic bacteria.* 228-236

Bourgeois C.M., Larpent J.P. (1996).*Microbiologie alimentaire.vol II:Aliments fermentés et fermentation alimentaire.*523.

Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007). *Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation.* Educagri éditions, dijon. p.131-164.

Branger A., (2007). *Microbiochimie et alimentation ;* 345-343.

Brantner A ,Gein E . ,(1994) , *Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine,* 35-40

Briandet M. , Fechner L. , Naïtali M ., Meylheuc T. , Dreanno C , (2012) *Biofilms, quand les microbes s'organisent ,*180

Brighente. ,M. Dias ., L. Verdi. , G. Pizzolatti M.G. , (2007) *Antioxidant activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species* 156 -161

Brul S. , Coote P. , (1999) *Preservative agents in foods Mode of action and microbial resistance mechanisms* 1–17

D

Djebri M., (1994). Précis de phoéniculture. FAO. P 192.

E

ElNour M . , Ammar M . , Saeed A.E., (2015) *Antimicrobial Activities and Phytochemical Screening of Callus and Seeds Extracts of Fenugreek (Trigonella foenum-graecum)*, **147-157**

G

Galié S ., Garcia-Gutiérrez C. , Miguélez E M. , Villar C J, Lombo F (2018) *Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods* **9:898**

H

Haouala R. , Hawala S ., El-Ayeb A. , Khanfir R. , Boughanmi N ., (2008) *Aqueous and organic extracts of Trigonella foenum-graecum L. inhibit the mycelial growth of fungi* **1453–1457**

J

JOHN N R., VIRAJ C.G. , SAWANT S C., (2013) *inhibitory effects of plant extracts on multi-species dental biofilm formation in-vitro* **487 - 495**

K

Kos.B ., Sukosic .J. , Vukovic.S. , Simpraga M., Frece.J. , Matosic .S., (2003) : *Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lb acidophilus M92* .Journal of applied Microbiology **94.Pp 981-987**

L

Lebeaux D. , Chauhan A. , Rendueles O. , Beloin (2013) *From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections*, 288-356

Lister .E ., Wilson P ., (2001)., *Mzasurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity*. Crop Research Institut , Lincoln , New Zealand .

N

Norziah, M. H., Fezea, F. A., Bhat, R. , Ahmad, M.,(2015) , *Effect of extraction solvents on antioxidant and antimicrobial properties of fenugreek seeds (Trigonella foenum-graecum L.)*, 1261-1271

P

Percival S L. , Walker J. , Hunter P R. , (2000) , *Microbiological Aspects of Biofilms and Drinking Water* 61-79

Premanath R., Sudisha J.N., Lakachmi D.N. , Aradhya S.M. ,(2011) . *Antimicrobial and antioxidant activities of fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.)Leavs* 695-705

Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. Roura S.I., (2003). *Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard*. 679-684

R

Roux P . , Ghigo J ., (2006) , *Les biofilms bactériens*, 261-268

S

Sharara M., Sampat A. , Good L W. , Smith A S., Porter P. , Zavala V M ., Larson R. , Runge T (2017) *Spatially explicit methodology for coordinated manure management in shared watersheds* 48-56

Sharma V., Singh P .,Rani A., (2017) *Antimicrobial Activity of Trigonella foenum-graecum L. (Fenugreek)* 2248-9215

SALEH O M , Awad N S , Soliman M M , Mansour A A , Nassan M A , (2016) *insulin-mimetic activity of stevioside on diabetic rats: biochemical, molecular and histopathological study* 156-163

Z

ZoBell, C.E., (1943). *The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriol.* 39–56.

Annexes

Annexe N°01 : Préparation des milieux de culture (1L)

Mueller-Hinton (liquide)

Infusion de viande de boeuf	300g
Hydrolysate de caséine.....	17,5g
Amidon	1,5g
Gélose.....	17,0g

Mueller Hinton (solide)

Infusion de viande de boeuf.....	0,2g
Hydrolysate de Caséine.....	17,5g
Amidon.....	1,5 g
Agar.....	10g.
pH= 7.4	

Gélose Chapman

Extrait de viande (bovine ou porcine).....	1g/L
Peptone de caséines et de viande	10g/L
Chlorure de Sodium	75g/L
D-Mannitol.....	10g/L
Agar.....	15g/L
Rouge de phénol.....	0,025g/L
pH= 7.4	

Préparation du PBS (phosphate buffer saline)

1L de PBS (pH=7,5)

Chlorure de Sodium.....	8g
Chlorure de Potassium	0,2g
Phosphate Disodique	1,44g
Phosphate Monopotassique.....	0,24g

Les biofilms bactériens sont responsables de sérieux problèmes industriels, environnementaux et de santé publique. Ces derniers doivent leur dangerosité à leur résistance accrue aux différents moyens d'élimination tels les antibiotiques, les rayons UV et les biocides chimiques. Dans le cadre clinique, on estime que les biofilms sont impliqués dans environ 80 % des infections microbiennes ; leur contrôle est donc une question importante dont le but est d'éviter la contamination et de minimiser les pertes économiques. Les biofilms font objet de nombreuses recherches qui visent à trouver une alternative aux moyens d'éradication classiques; telles l'utilisation des extraits de plantes, dont l'extrait de fenugrec et des dattes. Les graines végétales sont une source incontournable de substances actives telles que les dérivés phénoliques, les flavonoïdes. On suggère que ces dernières peuvent réduire la fixation microbienne et donc éviter la formation du biofilm.

Mots clés : biofilms- infections- résistance- contrôle- graines végétales

ملخص

تعد الاغشية الحيوية البكتيرية اول مسؤول عن المشاكل الصحية , البيئية

وتعود خطورة هذه الاخيرة الى زيادة مقاومتها لمختلف الوسائل المستعملة للتخلص منها مثل :

المضادات الحيوية و الاشعة فوق البنفسجية و المبيدات الحيوية الكيميائية في الاطار السريري تشير الدراسات الى ان الاغشية الحيوية تساهم بحوالي 80% من الالتهابات الميكروبية لذلك فان عملية الحد منها والسيطرة عليها قضية مهمة تهدف الى تجنب التلوث و تقليل الخسائر الاقتصادية

الاعشية الحيوية هي موضوع الكثير من البحوث التي تهدف الى ايجاد بديل للوسائل التقليدية للقضاء عليها مثل استخدام المستخلصات النباتية بما في ذلك استخدام مستخلص الحلبة و التمر

اذ تعتبر بذور النباتات مصدرا اساسيا للمواد الفعالة مثل المشتقات الفينولية و الفلافونويد .

نتائج هذه الدراسة تقترح ان هذه المشتقات يمكن ان تقلل من الارتباط الميكروبي و بالتالي منع تشكيل

البيوفيلم

الكلمات المفتاح : الاغشية الحيوية - الالتهابات المقاومة - التحكم - بذور النباتات

Abstract

Bacterial biofilms are responsible of serious industrial, environmental and public health problems. The latter owe their dangerousness in part to their increased resistance to different elimination methods such as antibiotics, UV radiation and chemical biocides. In the clinical context, biofilms are implicated in about 80% of microbial infections, so their control is an important issue to avoid contamination and minimize economic losses. Biofilms are the subject of a great many studies aimed for an alternative to traditional eradication methods such as the use of plant extracts, one of which is fennugreek and dates extracts. These seeds are an essential source of bioactive substances such as phenolic compounds, flavonoids... etc. At the end of this research, it was shown that seed extracts can cause biofilm eradication of the pathogenic strains, and a decrease in the rate of aggregation and coaggregation, this effect may be due to the rich active substances in extracts, thus preventing microbial fixation which can affect the biofilm formation.

Keywords: biofilms- infections- resistance- control- plant seeds