



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 Alimentaire"

Présenté par :

- DOUMA Mohamed Larbi
- NOUGAL Feth
- MEHDAOUI Amina

Thème

Investigation de l'activité prébiotique des extraits polyphénolique des graines de fenugrec: Effet sur les caractéristiques membranaires et adhésives des bactéries lactiques

Soutenu publiquement le 02/07/2019

Jury

Président: KHADEM Hafidha
Encadrant: BOUBAKEUR Badra
Co-encadrant: DRABO Moustapha
Examineur : BELMOKHTAR Rahma

Grade

MAA
MCB
Thésard
MAA

Année universitaire 2018- 2019

Remerciement

Grâce à **ALLAH**, le tout puissant, le miséricordieux, pour la force, le courage, la volonté, la santé qu'il nous a donné pour la réalisation de ce travail ainsi pour l'opportunité qui nous a offert de trouver toutes les compétences humaines et matérielles au cours de notre recherche. *Louange à notre tout puissant ALLAH.*

A l'issue de la rédaction de cette recherche, nous sommes convaincus qu'un mémoire est loin d'être un travail solitaire. En effet, on n'aurait jamais pu réaliser ce travail du master sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de notre recherche nous ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti-chercheur ».

Tout d'abord, On tient à exprimer toute notre reconnaissance à **Mme BOUBAKEUR Badra**, et à **Mr Drabo moustapha** pour la confiance qu'ils nous ont accordés en acceptant d'encadrer ce travail, pour l'aide compétente qu'ils nous ont apportés, pour leurs multiples conseils, pour toutes les heures qu'ils ont consacrées à diriger cette recherche et pour leur patience, leurs encouragements à finir un travail commencé dans une période transversale de pression et de bouleversement.

À **Mme Khadem Hafidha**, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous avez fait en acceptant la présidence de notre jury. Veuillez croire à notre grande admiration et mon profond respect.

À **Mme Belmokhtar Rahma**, vous nous avez fait l'honneur d'accepter d'examiner ce mémoire. On vous remercie de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre sincère gratitude.

*Que Mr Monsieur **Toufik Benaïssa**, trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre estime pour son aide précieuse et ses sages conseils durant notre cursus universitaire.*

*Nos remerciements vont également à **Mm Soualemí khaïra, zahra, karima**, et **Mr Benhalima** pour leur suivi et conseils lors de toute la durée d'expérimentation, pour l'ambiance de travail très agréable au niveau du laboratoire et les conditions de travail privilégiées qui nous ont été offertes.*

On tient à remercier chaleureusement, tous les membres de nos familles qui nous ont permis de continuer nos études dans les meilleures conditions et qui nous ont appris à ne jamais baisser les bras.

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

Ma chère maman, mon cher papa et mon cher oncle préféré Samir

*Je souhaite que vous restiez toujours près de moi et que DIEU vous
protège et vous donne santé et longue vie*

Mes chers sœurs et frères

Sabrina, Rabea, Hakim et Abderrahmane

toujours une place dans mon cœur et mes pensées.

Aussi à mon petit neveu Ali que j'aime beaucoup

À ma famille universitaire

Fateh, Amina, Riad, Maamar, Kader, Ahmed, Tarek, Rabea, Ali,

Kadirou, Taher, Amira, Chahrazed, Souad, Sarah, Nihed, Wafaa,

Wahiba, Nabila...

Et à tous mes Amis sans exception.

Douma Mohamed Larbi

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

*Ma chère maman, mon cher papa Je souhaite que vous restiez
toujours près de moi et que DIEU vous protège et vous donne santé
et longue vie*

Mes chers sœurs et frères

toujours une place dans mon cœur et mes pensées.

Aussi à ma petite nièce Marwa que j'aime beaucoup

À ma famille universitaire

Et à tous mes Amis sans exception.

À tous mes proches...Boulahya , Ilyas, Samadou, Nadji larbi sumia amina

Feteh Nougat

DEDICACE

Je dédie ce travail à

*Ma très chère maman bien aimée pour tout son sacrifice,
amour, tendresse, son soutien et ses prières tout au long de mes
études*

Mon père Atef

Mes grands-parents que j'ai souhaité leur présence

Mes ancêtres mohamed et nour eddine

Mes sœurs imen et mokhtaría

Mes frères adel et afif

Ma famille universitaire feteh, larbi, souhila, fatiha

*Et toute personne que je n'ai pas mentionnée j'aimerais vous dire
que vous resterez toujours dans mon cœur*

Mehdaoui Amina

SOMMAIRE :

Liste des figures	I	
Liste des tableaux	II	
Introduction		
CHAPITRE I : Notions bibliographique		
I.1	Notion scientifiques sur le biofilm	03
I.1.1	Définition	03
I.1.2	Etape de formation	03
I.1.3	Biofilm et santé humaine	04
I.1.4	Caractéristique écologique des biofilms	04
I.2	Données scientifiques sur le fenugrec	05
CHAPITRE II : Matériels et méthodes		
II.1	Objectif du travail	08
II.2	Lieu et période du travail	08
II.3	Matériels utilisés	08
II.3.1	Matériel végétal : graines du fenugrec	08
II.3.2	Souches lactiques	08
II.3.3	Matériel du laboratoire	08
II.4	Méthodes	10
II.4.1	Protocole expérimental	10
II.4.2	Partie phytochimique	11
II.4.2.1	Entretien des graines	11
II.4.2.2	Désinfection des graines	11
II.4.2.3	Préparation des extraits	11
II.4.2.4	Dosage des polyphénols et des flavonoïdes	11
II.5	Propriétés bioactives de l'extrait aqueux du fenugrec	12
II.5.1	Standardisation de l'inoculum	12
II.5.2	Effet sur la viabilité en milieu liquide des souches	12
II.5.3	Effet de l'extrait sur la perméabilité membranaire	12

II.5.4	Effet de l'extrait sur l'agrégation	13
II.5.5	Effet de l'extrait sur la formation de biofilm total	14
II.5.6	Effet de l'extrait sur le pouvoir antibactérien des bactéries lactique	14

CHAPITRE III : Résultats et discussions

III	Résultats	16
III.1	Partie phytochimique	16
III.2	Activité prébiotique de l'extrait aqueux du fenugrec	17
III.3	Effet sur la croissance des bactéries lactiques	17
III.4	Perméabilité membranaire	19
III.5	Effet sur l'agrégation	20
III.6	Biofilm	22
III.7	Effet de l'extrait sur le pouvoir antibactérien des bactéries lactique	24
	Conclusion	25
	Référence	26

Annexe

Liste des figures

Figure 01	Etapes de formation de biofilm	04
Figure 02	Démarches expérimentales	10
Figure 03	Quantité des polyphénols et des flavonoïdes présente dans les deux extraits aqueux et méthanolique	16
Figure 04	Croissance d' <i>Enterococcus durans</i> et <i>streptococcus thermophilus</i> en présence de l'extrait aqueux de fenugrec	18
Figure 05	Agrégation de la souche <i>Enterococcus durans</i> en présence de l'extrait aqueux	20
Figure 06	Agrégation de <i>Streptococcus thermophilus</i> en présence de l'extrait aqueux	21
Figure07	Co-agrégation mixte des deux souches <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Enterococcus durans</i> en présence et en absence (témoin) de l'extrait aqueux	22
Figure08	Effet de l'extrait sur la formation du biofilm des LAB testées	23
Figure 09	Activité antibactérienne en présence et en absence de catalase	24

Liste des tableaux

Tableau 01	Matériel de laboratoire utilisé lors de l'expérimentation	09
Tableau 02	Effet de l'extrait aqueux sur la perméabilité membranaire	19

Résumé

À la lumière de l'effet considérable que les plantes ont sur la santé, La thématique de recherche innovatrice proposée pourrait offrir une solution au problème de la santé intestinale à travers le développement des stratégies naturelles sélectives permettant l'amélioration des activités physiologiques des germes bénéfiques d'intérêt probiotique, cas des bactéries lactiques. Nous avons dans la logique que l'enrichissement des cultures de bactéries lactiques par des extraits du végétal, pourrait permettre à ces microorganismes de garantir leur viabilité au cours du passage à travers le tractus gastro-intestinal et d'acquérir des caractéristiques recommandées pour une bonne activité physiologique des probiotiques. Nous étions intéressés à l'évaluation de l'effet prébiotique de l'extrait polyphénolique du fenugrec sur la croissance, l'adhésion et la formation de biofilm total de deux bactéries lactiques d'intérêt probiotiques. L'extraction aqueuse était meilleure, elle permet d'obtenir le meilleur rendement d'extraction et la plus grande teneur en polyphénols et flavonoïdes (910,957 mg équivalent d'acide gallique (EAG)/ ml d'extrait et 225,868 mg équivalent de quercitrine (EQ)/ml d'extrait respectivement). Cet extrait a montré une activité prébiotique importante (sur la croissance, l'adhésion, la perméabilité et le biofilm total) à des concentrations de 0.8 et 0.09 de respectivement pour *Streptococcus thermophilus* et *Enterococcus durans*. Les résultats générés laissent suggérer que cette stratégie innovante pourra avoir une incidence sur l'amélioration de la valeur des probiotiques et leur propension à s'organiser en biofilm et donc à coloniser ainsi la surface épithéliale.

Mots clés : Probiotique- Biofilm – Bactéries lactique

Abstract

In light of the considerable effect that plants have on health, the proposed innovative research theme offers a solution to the problem of intestinal health through the development of selective natural strategies to improve the physiological activities of beneficial germs with probiotic interest, such as lactic acid bacteria. We have in the logic that the enrichment of lactic acid bacteria cultures with plant extracts, in the case of polyphenolic extracts, could allow these microorganisms to guarantee their viability during the passage through the gastrointestinal tract and to acquire characteristics recommended for a good probiotic physiological activity. We were interested in evaluating the prebiotic effect of the extract from fenugreek on the growth, adhesion and total biofilm formation of two lactic acid bacteria with probiotic interest.

The extraction occurred by water as solvent was better, it allows obtaining the best extraction efficiency and the highest content of polyphenols and flavonoids (910.957 mg EAG / ml extract and 225.868 mg EQ/ml extract respectively). This extract showed significant prebiotic activity (on bacterial growth, adhesion and total biofilm) at concentrations of 0.8 and 0.09 respectively for *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus durans*. The results generated suggest that this innovative strategy may have an impact on improving the value of probiotics and their propension to organize themselves into biofilm and thus colonize the epithelial surface.

Key words: Probiotic- Biofilm- Lactic acid bacteria

المخلص

على ضوء التأثير المعتبر للنباتات الطبية على الصحة، قد يتيح موضوع البحث المقترح تقديم حل لمشكلة الصحة المعوية من خلال تطوير استراتيجية طبيعية انتقائية تسمح بتحسين الأنشطة الفسيولوجية للبكتيريا اللبنية المفيدة ذات الأهمية البروبيوتيكية. انطلاقاً من مبدأ أن إثراء وسط النمو البكتيري بتراكيز مدروسة من المستخلصات النباتية، قد يسمح للبكتيريا المفيدة ضمان بقائها أثناء المرور عبر الجهاز الهضمي والحفاظ على الخصائص المطلوبة للنشاط الفسيولوجي للبروبيوتيك، انصبت الدراسة في اطار تقييم التأثير البريبيوتيكي للمستخلص على النمو والالتصاق وتشكيل الفيلم البيولوجي الحيوي الكلي لسلاطين من بكتريا حمض اللبن. كان الاستخلاص المائي ذا مردودية أفضل سمح بالحصول على عائد استخلاص مهم وعلى نسب أعلى من البوليفينول والفلافونويد ب قيمة 910.957 و 225.868 لكليهما على التوالي. من جهة أخرى أظهر هذا المستخلص نشاطاً معتبراً على الخصائص البروبيوتيكية للسلاطين معا (النمو، الالتصاق، النفاذية الغشائية والبيوفيلم الكلي) بتراكيز متفاوتة 0.8 بالنسبة ل *Streptococcus thermophilus* و 0.09 بالنسبة ل *Enterococcus durans*.

النتائج المتحصل عليها تشير الى أهمية الاستراتيجية المبتكرة في تحسين القيمة البروبيوتيكية للبكتيريا اللبنية المفيدة و قدرتها على التوضع على شكل بيوفيلم وبالتالي امكانية قصوى في استعمار السطح المعوي.

الكلمات المفتاحية بروبيوتيك- بيوفيلم-بكتيريا حمض اللبن

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif. En phylogénétique, elles appartiennent à la branche clostridiale des bactéries Gram (+), avec C+G% inférieur à 55% (**Federight, 2005**).

De point de vue technologique, les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme une flore industrielle non pathogène, qualitativement connues comme GRAS (Generally Regarded As Safe). Elles sont utilisées empiriquement depuis des siècles dans la fabrication de nombreux aliments fermentés comme les produits laitiers (yaourts et fromages).

Ces bactéries interviennent également dans la fabrication des salaisons, des ensilages... etc et dans la conservation des aliments. L'action de la flore lactique sur la conservation d'un aliment est liée à l'abaissement du pH consécutif à la production d'acide lactique. Les bactéries lactiques peuvent aussi produire de nombreux agents anti-bactériens tels que les bactériocines qui contribuent à inhiber la croissance de flores indésirables. Enfin elles ont une action déterminante sur les qualités organoleptiques des produits fermentés (texture et arôme par exemple) (**Roual et Orthier, 2001**).

Sur le plan sanitaire et pharmaceutique, les bactéries lactiques sont reconnues pour l'effet bénéfique de leur présence dans la production de nombreux produits alimentaire depuis de nombreuses années. Il a été suggéré que les effets bénéfiques sur la santé humaine des laits fermentés pourraient être attribuables à certains composants de la paroi cellulaire des bactéries, en particulier aux exopolysaccharides (EPS) et la production des agents antimicrobiens et modulateurs du système immunitaire. Dès lors, outre leurs propriétés technologiques dans la production agroalimentaire, ces bactéries sont aujourd'hui associées aux propriétés physiologiques diverses ; probiotiques, antitumuroales, anti-cholestérol, anti-inflammatoire, antioxydante, immuno- modulatrice, antibiofilm négatif (**Lindgren et al., 1990 ; Li et al., 2014 ; Fontana et al., 2015**).

La résistance, la croissance et l'adhérence à l'épithélium intestinal influent sur le temps de résidence et donc sur la capacité de ces germes à exercer leurs effets et fonctions dans l'intestin.

Ces trois phénomènes sont considérés comme des critères de sélection importants pour les souches probiotiques (**Van Halbeek et al., 1994**). Toutefois, les critères d'implantation des bactéries lactiques sont maintenant remis en question, particulièrement les propriétés d'adhérence, la notion de viabilité et de formation de biofilm total. Cependant, la capacité d'établir le biofilm

est plus accrue chez les bactéries néfastes que chez les bactéries commensales, inoffensives ou celles à intérêts biotechnologiques et sanitaire (**Morikawa, 2006**). Ce qui rend plus délicat le contrôle des biofilms négatifs et l'exploitation des biofilms positifs.

La présente thématique propose une stratégie permettant d'augmenter les performances des deux bactéries lactiques d'intérêt probiotiques (*Streptococcus thermophilus* et *Enterococcus durans*) par rapport aux agents microbiens pathogène. Elle vise l'amélioration des capacités physiologiques de ces bactéries par une stratégie naturelle, extrait polyphénolique des graines du fenugrec, sur les attributs probiotiques des deux bactéries.

I. Notions bibliographiques

I. 1. Notions scientifiques sur le biofilm

I.1. 1. Définition

Les biofilms sont définis comme des populations bactériennes encastrées dans des matrices qui s'adhèrent les unes aux autres et/ou aux surfaces ou interfaces. Cette définition comprend les agrégats et les flocules microbiens ainsi que les populations adhérentes dans les espaces interstitiels des milieux poreux (Costerton *et al.*, 1995). Bjarnsholt (2013) a défini le biofilm comme « *Une agrégation cohérente de cellules bactériennes enchâssées dans une matrice, qui est plus tolérante à la plupart des antimicrobiens et au système immunitaire par rapport aux cellules bactériennes planctoniques.* ». Ce mode de développement des bactéries serait le plus répandu dans la nature (Mann et Wozniak, 2012). En effet, le biofilm confèrerait aux bactéries de nombreux avantages comme la résistance aux stress environnementaux, aux antibiotiques et aux défenses de l'organisme (Simoes *et al.*, 2010).

I.1.2. Etapes de formation

Selon Stoodley *et al.* (2002), le biofilm passe par 5 étapes pour sa formation :

1. Création d'un film de conditionnement, ainsi que l'attachement et le transport des cellules vers un substrat;
2. Communication cellulaire et adhésion des micro-organismes de façon réversible ;
3. Production de la matrice et évolution de l'architecture du biofilm avec le développement des micro-colonies primaire;
4. Maturation du biofilm avec le développement des colonies;
5. Détachement microbien ou détachement de colonies de biofilm en réponse aux conditions hydrodynamiques (Cecilia *et al.*, 2017). La figure N°01 illustre l'ensemble de ces étapes.

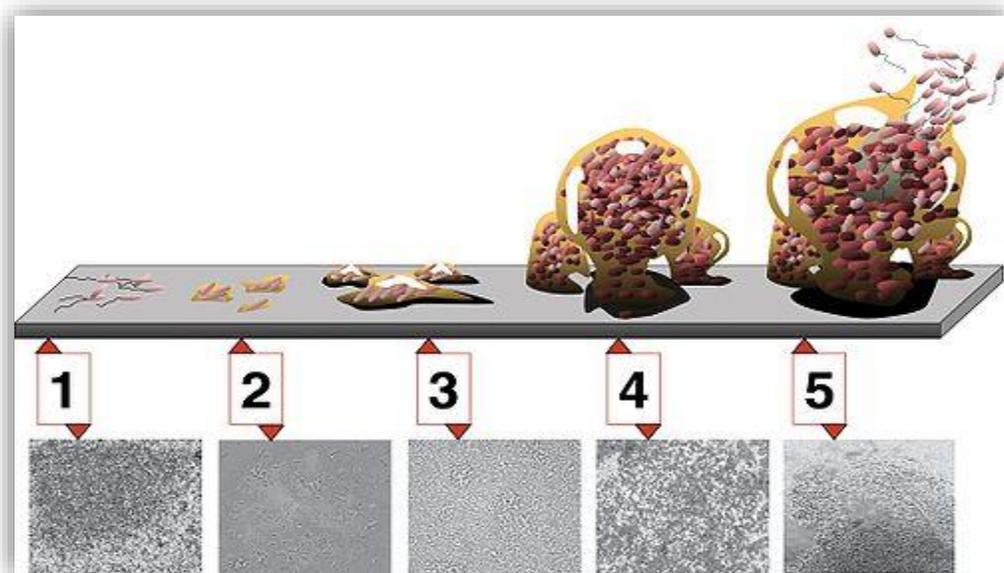


FIGURE 01 : Etapes de formation de biofilm (Stoodley *et al.*, 2002)

I.1.3. Biofilm et santé humaine

Mi- ange mi- démon exprime la dualité du comportement du biofilm particulièrement si l'on considère leur impact sur la santé. Prenons l'exemple du tractus digestif.

Côté ange : les micro-organismes co-évoluent avec leur hôte et jouent un rôle dans la digestion, surtout chez les ruminants.

Côté démon : Les biofilms implantés sur la muqueuse colique sont responsables de pathologies inflammatoires de l'intestin et du colon (Briandet *et al.*, 2012).

I.1.4. Caractéristique écologiques des biofilms

Les exopolysaccharides (polymères biosynthétiques ou bio polymères), sont considérés comme une caractéristique principale pour les bactéries formatrices de biofilm. Le terme "exopolysaccharides" (EPS) ou "polysaccharide exo-cellulaire" a été proposé par **Sutherland (1972)** et **Cerning (1994)** comme appellation générale pour ce groupe de polymères. La présence d'exopolysaccharides associés aux cellules microbiennes cultivées sur des surfaces solides est souvent reconnaissable de la morphologie des colonies mucoïdes. En milieu liquide, les cultures productrices d'exopolysaccharides peuvent devenir très visqueuse ou, exceptionnellement, peuvent se solidifier sous forme de gel (Sutherland, 2003).

L'organisation des micro-organismes dans des biofilms crée des gradients de concentration d'accepteurs d'électrons (oxygène en particulier), de substrats, de produits et du pH. Ainsi, des micro-environnements aérobies et anaérobies peuvent se créer conjointement, ce qui permet le développement dans un espace très réduit d'un très grand nombre d'espèces bactériennes très différentes phylogénétiquement (**Cerning, 1994**)

Dans de telles microniches où les cellules sont très proches physiquement les unes des autres et où l'ADN peut être libéré, des transferts horizontaux de gènes peuvent être facilités.

Quelques travaux ont permis de mettre en évidence des échanges de gènes et de transferts de plasmides entre cellules qui conduisent à des changements phénotypiques des micro-organismes (**Lisle and Rose, 1995**).

Au sein des biofilms, il existe une autre forme de transfert d'information qui correspond à une sorte de communication entre les cellules par l'intermédiaire de « molécules de signal » de faibles poids moléculaire. Ces molécules correspondent à des lactones N-acyl-L-Hormoserine (AHLs) (**Stickler et al., 1998**).

I.2. Données scientifiques sur le fenugrec

Le Fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L) est une plante annuelle herbacée appartenant à la famille des légumineuses (Fabacées). Elle peut atteindre 40 à 60 cm de hauteur. Il produit des gousses longues et minces qui renferment jusqu'à deux dizaines de minuscules graines (**Altuntas, 2005**).

Ils sont en forme d'un disque, constitué d'un embryon jaune central entouré d'une couche cornée et relativement importante de blanc, d'endosperme semi-transparent contenant de la gomme de galactomannane. Une enveloppe tenace et brune foncée entoure l'endosperme (**Madhava et al., 2011**). Plusieurs activités biologiques ont été attribuées aux graines du fenugrec :

- **Propriétés antioxydantes** : retarder l'oxydation des lipides dans une variété des produits alimentaires (**Madhava et al., 2011**) ;
- **Propriétés anti-inflammatoires et hépatoprotective** : Les graines de *Trigonella foenum-graecum* L. agissent comme un agent protecteur contre les anomalies induites dans le foie (**Öner**

et al,2008). De plus, ses graines sont utilisées pour soulager les inflammations, les rhumatismes, les muscles endoloris (**Yasoubi et al., 2011**) :

- **Propriétés antimicrobiennes** : Les graines de Fenugrec ont des propriétés antimicrobiennes avec un large spectre d'action. Elles agissent contre les bactéries. Elles produisent des huiles à propriétés toxiques qui empêchent la croissance de ces bactéries (**Thomas et al., 2006**) ;
- **Propriétés anti-tumorales** : L'extrait de Fenugrec a montré qu'il pourrait améliorer la numération des cellules macrophages chez les rats. Lorsque ces rats ont ensuite été inoculés avec des cellules tumorales, la croissance de ces cellules tumorales a été significativement inhibée (**Snehlata, 2011**).

Ces activités biologiques ont été attribuées à la richesse de ces graines en composés polyphénolique tel que les flavonoïdes et les groupes phénoliques (**Subhashini, 2011**).

II. Matériel Et Méthodes

II.1. Objectif du travail

L'objectif de ce travail est l'évaluation des propriétés bioactives prébiotiques de l'extrait des graines de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) vis-à-vis de *Streptococcus thermophilus* et *Enterococcus durans*.

II.2. Lieu et période du travail

Ce travail a été réalisée à partir du 10 février 2019 jusqu'au 02 mai 2019 au sein des laboratoires pédagogiques (microbiologie, biochimie, technologie alimentaire) et le laboratoire de recherche « valorisation et amélioration des productions animales locales » de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret.

II.3. Matériel utilisé

II.3.1. Matériel végétal : graines du fenugrec

Les graines de fenugrec ont été utilisées pour ce travail, elles ont été achetées du marché.

II.3.2. Souches lactiques

Deux bactéries lactiques ont été utilisées :

- ✓ *Streptococcus thermophilus* CNRZ447 (provenance de France).
- ✓ *Enterococcus durans* NCBI 53345 isolé du blé fermenté et identifié par l'ensemble des tests biochimiques et par une empreinte moléculaire : MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight) .

II.3.3 Matériel du laboratoire

Le matériel du laboratoire utilisé lors de cette étude est récapitulé dans le tableau N°01

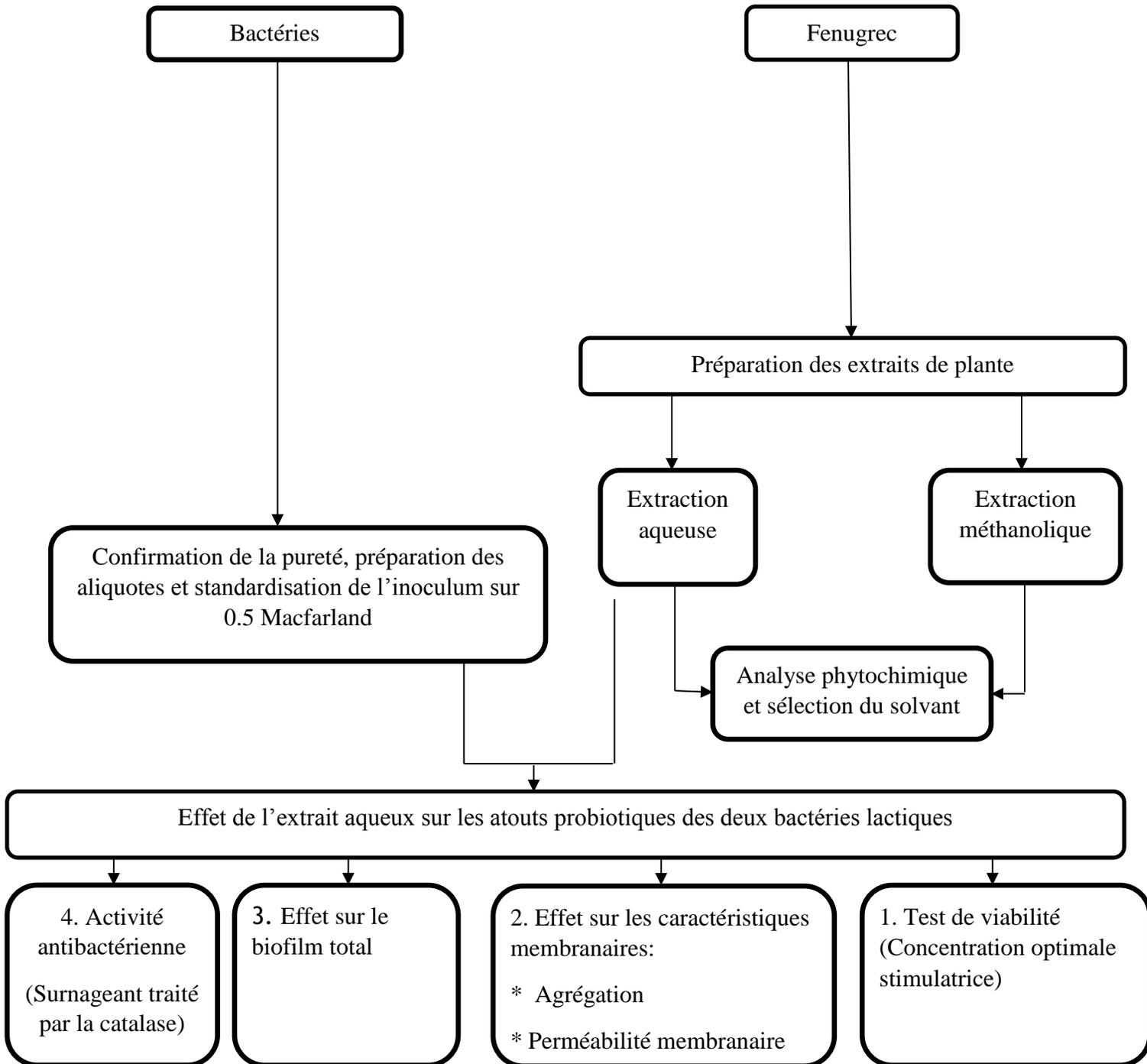
Tableau N°01 : Matériel de laboratoire utilisé lors de l'expérimentation

Appareils	Verreries et consommables	Milieux de culture	Produits chimiques et colorants	Autres
-Agitateur magnétique - Autoclave -Balance -Centrifugeuse -Chronomètre -Congélateur -Etuve -Microscope optique -Réfrigérateur -Spectrophotomètre uv-visible -Vortex	-Béchers -Eprouvettes graduées -Erlenmeyers - Lames -Pipettes graduées -Pipettes Pasteur -Tubes à essai -Boîtes pétries	-Gélose Mueller Hinton -Gélose et bouillon M17 -Gélose et bouillon MRS	-Acide gallique poudre - quercitrine -Cristal violet à 1% -Eau distillée -Eau oxygénée à 100% -Ethanol à 99% -Fushine -Lugol -Méthanol à 99% -Tampon phosphate -PBS -Violet de gentiane -Glycérine	-Barreaux magnétiques -Becs Bunsen -Embouts - Filtres -Micro-filtre -Gants -Micropipettes -Porte tubes -Poires -Seringues jetables stériles. -Bocaux

II.4. Méthodes

II.4.1. Protocole expérimental

Démarches expérimentales suivies lors de cette étude sont illustrées dans la figure N°02



II.4.2. Partie phytochimique

II.4.2.1. Entretien des graines

Les graines du fenugrec achetées ont été nettoyées, triées et conservées par réfrigération.

II.4.2.2. Désinfection des graines

Les graines du fenugrec ont été plongées dans une solution d'eau oxygénée (H_2O_2) pendant 10 minutes pour leur désinfection puis lavées avec de l'eau distillée.

II.4.2.3. Préparation des extraits

- Préparation des solvants d'extraction

Deux solvants d'extraction ont été utilisés ; eau distillée et un mélange méthanol/ eau distillée.

-Extraction

Les extraits ont été préparés par macération de 50g de graines du fenugrec dans 100ml du solvant d'extraction. Après l'écoulement de la durée de macération, les macéras sont récupérés par filtration et conservés par réfrigération.

NB : le protocole d'extraction et les pourcentages de différentes matrices d'extraction ont été choisis suite à une optimisation faite par Boubakeur et ses collaborateurs (données non publiées).

II.4.2.4. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

- Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux de deux extraits a été déterminée en adoptant la technique du Folin- Ciocalteu décrite par **Lister et Wilson (2001)**; 100 μ l de chaque dilution (D2, D4, D5) sont mélangés avec 500 μ l d'une solution 1/10 du réactif Folin–Ciocalteu et 1000 μ l d'eau distillée. Après 1min d'incubation à la température de laboratoire, 1500 μ l d'une solution de carbonate de sodium ($Na_2 CO_3$) à 20% sont ajoutés au mélange. L'absorbance a été mesurée à $\lambda=760$ nm après incubation à la température de laboratoire pendant 2 h et à l'abri de la lumière.

Les résultats sont exprimés en mg d'acide gallique (GEA)/g de l'extrait obtenu en utilisant une courbe d'étalonnage établie par **Boubakeur et al. (2016)** dont l'équation est :

$$Y = 0.856X + 0.239$$

- Dosage des flavonoïdes

Le taux des flavonoïdes a été déterminé par la technique **Brighente et al. (2007)**; 2 ml de chaque dilution (D2, D4, D5) sont mélangés à 2 ml d'une solution de 2%, d' $AlCl_3$. Après incubation à la température de laboratoire à l'abri de la lumière pendant 1 h, l'absorbance du mélange a été prise à 415 nm. Les résultats sont exprimés en mg de quercitine (EQ)/g de l'extrait obtenu selon la courbe d'étalonnage de **Boubakeur et al. (2016)** dont l'équation est :

$$Y = 14.21X + 0.46$$

II.5. Propriétés bioactives de l'extrait aqueux du fenugrec

II.5.1. Standardisation de l'inoculum

Avant chaque test, l'inoculum bactérien a été standardisé sur l'échelle 0.5 MacFarland à partir d'une culture jeune (**Andrew et al., 2008**). La taille de l'inoculum est variable selon le test.

II.5.2. Effet sur la viabilité en milieu liquide des souches

L'effet de l'extrait sur la viabilité des deux bactéries lactiques a été évalué selon le protocole décrit par **Boubakeur et al., (2015)**, une gamme de concentrations croissantes a été testée.

Les cultures ont été incubées à une température de 42°C pendant 18 heures. Les densités optiques ont été lues à 558 nm et converties en nombre du germe selon la corrélation de **Lambine et German (1969)** : 70% de lumière absorbée est l'équivalent de $1,5 \cdot 10^8$ germes/ml pour les bactéries à Gram positif.

II.5.3. Effet de l'extrait sur la perméabilité membranaire

Pour tester l'effet de l'extrait sur la perméabilité bactérienne, des cultures bactériennes de *Enterococcus durans* et de *Streptococcus thermophilus* avec et sans extrait ont été préparées avec un inoculum de 10^8 et incubées à 42°C pendant 18h.

Les cultures sont ensuite récupérées et centrifugées à 3000 rpm/20min pour récupérer le surnageant. Après dilution, les densités optiques (DO) ont été lues à 260 et 280nm pour quantifier respectivement les protéines et l'acide désoxyribonucleique (ADN) excrétés par les bactéries dans leurs milieux.

II.5.4. Effet de l'extrait sur l'agrégation

Des cultures de *Enterococcus durans* et *Streptococcus thermophilus*, à un inoculum de 10^8 , ont été préparées en présence de l'extrait à des concentrations de C6 et de C2 respectivement pour *S. thermophilus* et *E. durans*, puis elles sont incubées durant 18h à une température de 42°C.

Les tubes sont récupérés et une première centrifugation est réalisée à 5000g pendant 15min pour récupérer la biomasse. Cette dernière a été lavée trois fois par le PBS.

Après la 4^{ème} centrifugation le culot est solubilisé dans 10 ml de PBS. Après homogénéisation, la biomasse est ajustée pour avoir un nombre de 10^8 sur 0.5MacFarland à 578nm pour chaque suspension bactérienne.

Pour évaluer l'effet de l'extrait sur l'auto-agrégation, une série de tubes est remplie avec 7ml de PBS et 3ml de l'inoculum pour chaque bactérie. La densité optique a été lue après 1,4 et 5 heures de décantation à la température de laboratoire. Les résultats sont exprimés en pourcentage en appliquant la formule de **Kos et al. (2003)** :

$A\% = (1 - A_t/A_0) * 100$; soit A_t : absorbance après décantation, A_0 : absorbance avant décantation.

Pour l'effet de l'extrait sur la co-agrégation, une série de tube est remplie avec 2ml de chaque suspension bactérienne pour avoir une co-culture de 4ml. Les densités optiques sont lues après 1, 4 et 5heures de décantation à la température de laboratoire. Les résultats sont exprimés en pourcentage en appliquant la formule de **Kos et al. (2003)** :

$\% = [2 - [(A_x + A_y)] / [(A_{x+y}) * 1] / [(A_x + A_y) / 2]] * 100$; soit A_x : absorbance de *S. thermophilus*, A_y : absorbance de *E. durans*.

II.5.5. Effet de l'extrait sur la formation de biofilm total

L'effet de l'extrait sur la propension des deux bactéries à s'organiser en biofilm a été effectué en adoptant le protocole de **Boubakeur et al. (2016)** ; une série de culture a été effectuée en présence de concentration croissante de l'extrait.

Après incubation à 42°C pendant 18h et centrifugation à 5000g/15min, les cultures ont été récupérées et lavées trois fois avec de l'eau distillée.

La formation du biofilm a été révélée par coloration au cristal violet (durée d'exposition au colorant est de 15min).

Après la prise de photo, les tubes sont décolorés par exposition à l'acide acétique à 30% pendant 15min. Les résultats ont été exprimés en densités optiques qui ont été prise à 578 nm.

II.5.6. Effet de l'extrait sur le pouvoir antibactérien des bactéries lactique

L'effet antibactérien des deux bactéries lactiques a été déterminé en présence de l'extrait selon le protocole de **Das et al. (2010)** ; des cultures jeunes de probiotiques (*S.thermophilus* et *E. durans*) et pathogènes (*S. aureus* et *E. coli*) ont été préparées en présence de l'extrait et incubées à 37°C pendant 18h.

Après incubation, le surnageant de chaque bactérie probiotique a été récupéré par centrifugation à 15000g/10min à 4°C et traité à la catalase pour supprimer l'effet de l'H₂O₂.

L'interaction entre le surnageant des probiotiques, traité ou non à la catalase, avec les bactéries pathogènes a été faite selon deux méthodes : spots et disques ; 0.5ml de l'inoculum de chaque bactérie pathogène en culture pure sont étalés sur la gélose Muller Hinton, après 10 minutes l'excès de la suspension a été jeté.

Pour la méthode des spots 10µl du surnageant des deux souches bénéfiques sont déposés. Alors que pour la méthode des disques ; des disques contenant 35µl du surnageant sont déposés.

Les cultures sont ensuite incubées à 37°C/18h. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition en utilisant la formule de **Marzouk et al. (2012)** :

- **Coefficient d'inhibition (I%)** $= (D_z / D_{BOITE}) * 100$; D_z : diamètre de la zone d'inhibition, D : diamètre de la boite utilisée.
- **Activité du germe (A%)** $= 100 - I$

III. Résultat

Et

Discussion

III. Résultat

III.1. Partie phytochimique

Le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum L.*) est une riche plante herbacée annuelle bien connue qui est largement répandue dans le monde entier, et très largement consommé sous forme de graines ou macérât pour ses caractéristiques hypoglycémiques et hypercholestérolémiques évidentes. Cette matrice végétale est le support d'importantes biomolécules fonctionnelles, cas des polyphénols. Cependant, le procédé d'extraction reste un facteur déterminant de cette riche.

L'extraction des composés phénoliques, qui a été réalisée en utilisant deux solvants : eau distillée et mélange méthanol/eau distillée, a montré que le solvant d'extraction a un effet hautement significatif (comparaison interne par test posthoc : Sig=0.377^{E5}) sur les teneurs en composés phénoliques; l'extraction aqueuse permet d'obtenir les meilleures teneurs en polyphénols, soit 910,957 mg d'EAG/ml d'extrait et 225,868 respectivement pour les polyphénols et les flavonoïdes (**FIGURE 03**).

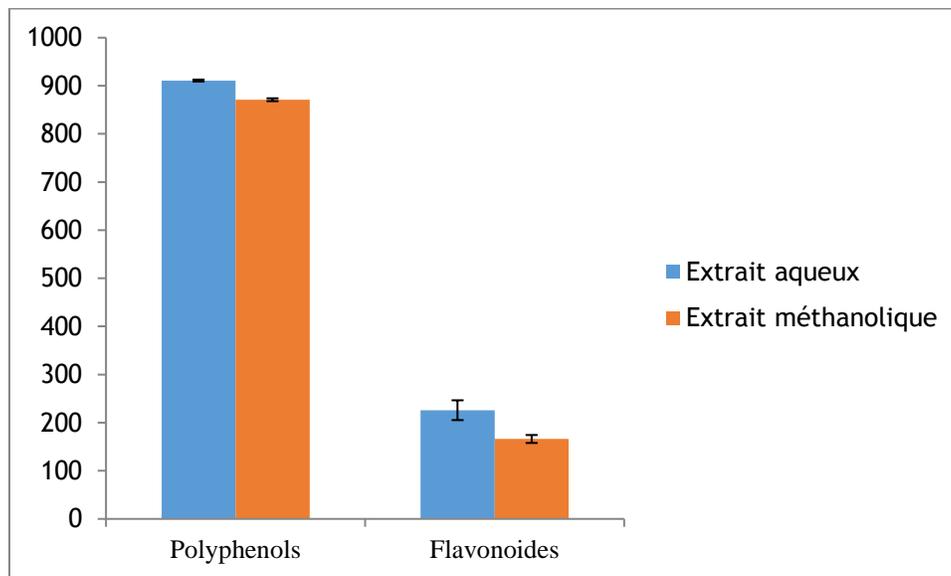


FIGURE N°03: Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits du fenugrec

Cette richesse en composés phénoliques est justifiée par plusieurs travaux, ainsi **Li et al. (2018)** ont montré que les graines du fenugrec sont une source de polyphénols (stilibènes) à

activités biologique importante. **Muhson et Mashkor (2014)** ont montré que la teneur des extraits des graines du fenugrec est fortement influencée par le solvant d'extraction.

Norziah et al. (2015) affirment que l'utilisation d'eau comme solvant d'extraction est plus souhaitable que l'utilisation de solvants organiques en raison de ses caractéristiques écologiques et non toxiques et que d'après leur résultat il est évident que l'eau est un bon solvant pour extraire une quantité non négligeable de composés phénoliques et flavonoïdes à partir de graines de fenugrec germées.

III.2. Activité prébiotique de l'extrait aqueux du fenugrec

Les bienfaits-santé et les propriétés médicinales des produits alimentaires à base de plantes sont connus depuis l'antiquité. Le fenugrec est une épice de graines utilisée pour améliorer la saveur, la couleur et la texture des aliments, elle est utilisée à des fins médicinales dans plusieurs systèmes traditionnels. Un certain nombre d'études épidémiologiques et de recherches en laboratoire ont mis en évidence l'action biologique du fenugrec (**Yadav et Baquer, 2014**).

III.3. Effet sur la croissance des bactéries lactiques

La figure N°04 montre l'effet des différentes concentrations de l'extrait aqueux de fenugrec sur le développement des deux souches *Enterococcus durans* et *Streptococcus thermophilus* en milieu liquide. La croissance des deux souches a été améliorée significativement à ces différentes concentrations (C6 - *S. thermophilus* Sig= 0,0080687 C2- *E. durans* Sig= 0,0147149), la meilleure croissance a été enregistrée à une concentration de C6 pour *S. thermophilus* et de 22,22mg/ml pour *E. durans*.

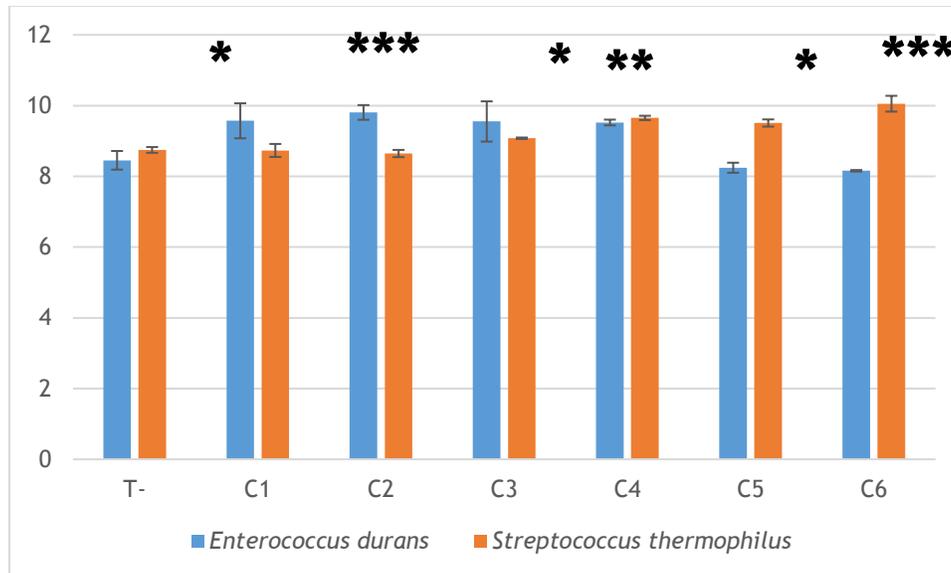


FIGURE N°04: Croissance d'*Enterococcus durans* et *streptococcus thermophilus* en présence de l'extrait aqueux de fenugrec

Plusieurs travaux ont discuté l'effet stimulateur des composés phénoliques purs et en extraits sur les bactéries lactiques. Dans leurs études, **Alberto et al. (2007)** ont démontré la capacité des bactéries lactiques à modifier la concentration des polyphénols dans les milieux de culture, ils confirment que la variabilité d'effet des composés phénoliques sur la croissance bactérienne observée chez différentes espèces et souches de bactéries lactiques est liée à la physiologie de la bactérie elle-même et sa capacité de métabolisation des polyphénols.

De leur part **Boubakeur et al. (2015, 2016, 2018)** ont montré l'action prébiotique intéressante des polyphénols sur la croissance des bactéries lactiques *in vitro* et *in vivo*.

L'effet positif des extraits de plante sur la croissance des bactéries lactiques est attribué à leur richesse en polyphénols. Ainsi **Alberto et al (2007)** ont montré que les polyphénols sont utilisés comme substrats permettant l'ajustement du pH et le maintien de l'équilibre osmotique pendant la fermentation microbienne. **Khalil et al. (2010)** et **Borge et al. (2013)** ont montré que les polyphénols, cas d'acide gallique, peuvent affecter le métabolisme bactérien ; ils s'adsorbent à la surface bactérienne, diffuse passivement dans le cytoplasme et forme des complexes solubles avec les protéines.

D'autres biomolécules peuvent être aussi impliquées. **Malago et al (2011)** ont montré que nombreuses plantes comestibles contiennent des fibres alimentaires jouant un rôle prébiotique, la plupart de ces fibres sont détectés dans des extraits aqueux de matière première végétales.

III.4. Perméabilité membranaire

L'établissement du quorum sensing est une étape primordiale pour déclencher le processus de la formation de biofilm chez les bactéries. Certaines voies de détection du quorum nécessitent la diffusion passive des molécules de signalisation à travers les membranes cellulaires, cette diffusion est fortement influencée par la perméabilité membranaire (**Fitzgerald et al., 2018**).

Le tableau N°02 représente les résultats de l'effet de l'extrait aqueux du fenugrec sur la perméabilité membranaire. Ces résultats montrent que la perméabilité membranaire des protéines chez la souche *Enterococcus durans* est très importante 85.42% par rapport à la perméabilité membranaire de la souche *Streptococcus thermophilus* ce qui explique sa forte capacité de s'organiser en biofilm. **Kamaraju et al. (2011)** ont montré que la sécrétion de petites molécules autoréducteurs (AI-1 : N-(3-oxodecanoyl) -L-homoserine lactone) à forte concentration est la conséquence d'une bonne perméabilité membranaire par rapport aux protéines, ces auto-inducteurs de nature protéique sont très essentielles pour le phénomène de la communication cellulaire chez les bactéries.

Cependant la perméabilité membranaire de l'ADN des deux souches est très faible voir négligeable chez les deux souches, ça peut expliquer l'effet protecteur des polyphénols sur l'altération de la membrane chez les bactéries lactiques.

Tableau N°02: Résultats de perméabilité membranaire

	Perméabilité des protéines	Perméabilité de l'ADN
<i>E. durans</i>	85.42%±2.95%	(-----) trace
<i>S.thermophilus</i>	4.86%±1%	(-----) trace

L'effet des polyphénols sur la perméabilité membranaire n'a pas été élucidé clairement. Par contre plusieurs travaux ont signalé la forte relation entre la perméabilité et la communication cellulaire (**Hegde et al., 2011 ; Kamaraju et al., 2011 ; Yap et al., 2013**).

Toutefois un traitement physique sublétal, tel qu'une sonication, ou chimique, traitement au lysozyme, est recommandé pour augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire des bactéries probiotiques et donc maximiser la libération de la concentration de Al-1 (Hor et al., 2014).

III.5. Effet sur l'agrégation

L'agrégation des souches microbiennes entre elles est une étape essentielle qui conditionne la formation de biofilm (Kos et al., 2003 ; Thomas et al., 2018), pour une meilleure adhésion aux cellules épithéliales intestinales, une auto-agrégation est nécessaire (del Re et al., 2005). Les deux souches lactiques *S. thermophilus* et *E. durans* regroupées en chaînette, sont reconnues pour leurs capacités agrégatives (Tuncer et Tuncer, 2014 ; Sesal et Kekeç, 2014). Sous l'effet de l'extrait du fenugrec, l'amélioration de l'autoagrégation de *E. durans* est plus notable chez *E. durans* (FIGURE N°05) ou une autoagrégation considérable (Sig= 0,02085077) a été observée vers 4h de décantation 63.78% vs 41.4%. Cependant, *S. thermophilus* a perdu certaines capacités d'autoagrégation en présence de l'extrait, 45.50% vs 59.08% après cinq heures de décantation, une perte significative après 4heures (Sig= 0,00074677) (FIGURE N°06).

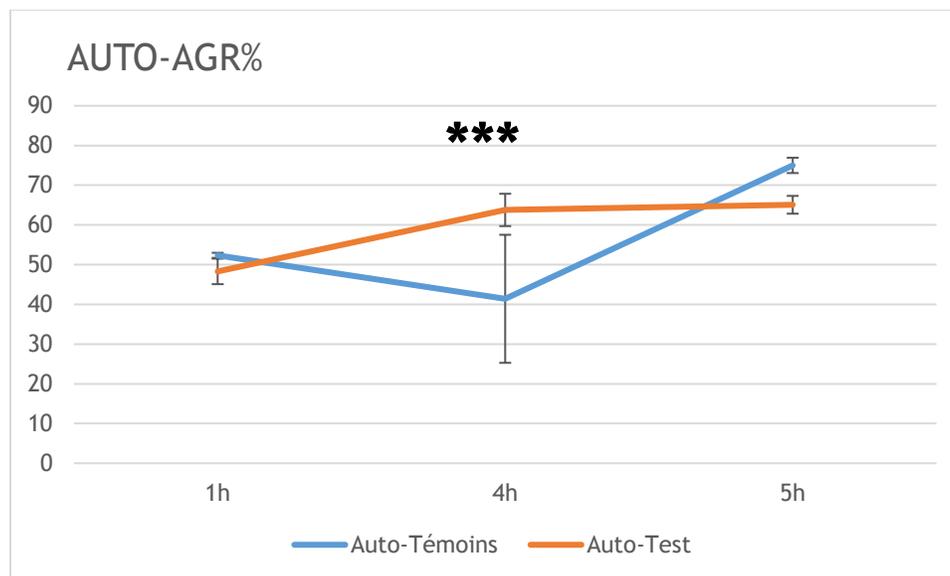


FIGURE N°05 : Résultats d'agrégation de la souche *Enterococcus durans* en présence de l'extrait aqueux

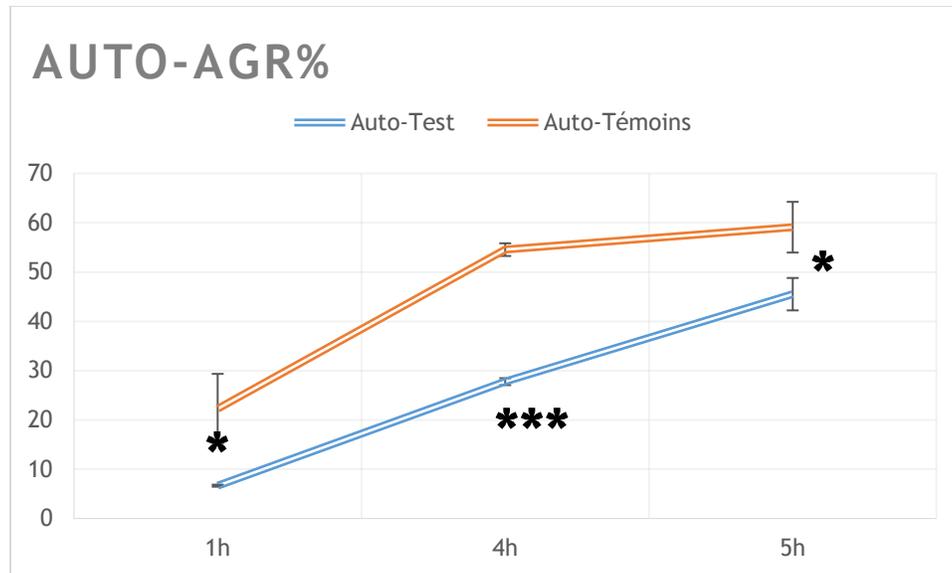


FIGURE N°06 : Résultats d'agrégation de *Streptococcus thermophilus* en présence de l'extrait aqueux

Ces résultats ne concordent pas avec les travaux de **Boubakeur et al., (2016)** qui ont montré que l'extrait méthanolique de *Thymus fontanesii* a un effet positif considérable sur l'auto agrégation. Cette différence d'effet pourrait être expliquée par la différence de la partie végétale utilisée pour la préparation de l'extrait et donc les concentrations en polyphénols de ces derniers. Par nos résultats sont accord avec ceux obtenus par la même équipe en utilisant l'acide gallique pur, ces résultats indiquent que l'effet de l'acide gallique sur l'agrégation reste variable selon la fermeté de la paroi cellulaire des différentes bactéries lactiques (données non publiées). Les travaux de Cho *et al.* (2010) rapportaient aussi l'effet des polyphénols de l'extrait de thé sur la capacité d'agrégation bactérienne, ils ont indiqué que la résistance des parois des Gram + à la modification de ses propriétés physicochimiques sous l'effet des polyphénols est à l'origine de stabilité de son agrégation.

La co-agrégation des deux souches a été améliorée en présence de l'extrait, le meilleur taux est enregistré après 5 heures de décantation (Sig= 0,0004768) (**FIGURE 07**). Ces résultats sont en accord avec les travaux de **kos et al. (2003)** et **Boubakeur et al. (2016)** qui ont noté une augmentation considérable de la coagrégation entre les bactéries lactiques en présence de l'acide gallique et l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* respectivement.

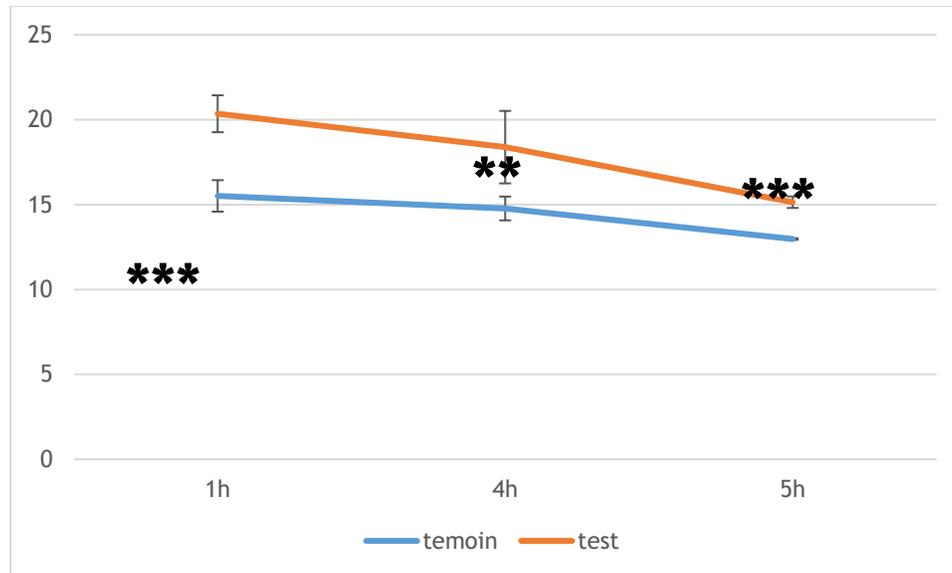


FIGURE N°07 Co-agrégation mixte des deux souches *Streptococcus thermophilus* et *Enterococcus durans* en présence et en absence (témoin) de l'extrait aqueux

III.6. Biofilm

La formation des biofilms part du principe que les matrices bactériennes s'adhèrent les unes aux autres aux surfaces ou interfaces (**Costerton et al., 1995**), cette formation est une étape clé de la colonisation des supports par les micro-organismes (**Pratt et Kolter, 1998**).

La **FIGURE N°08** illustre l'effet des différentes concentrations en extrait aqueux de fenugrec sur la formation de biofilm des deux souches *Enterococcus durans* et *Streptococcus thermophilus* en milieu liquide. Ces résultats montrent que l'extrait a exercé un effet négatif apparent sur la formation de biofilm total chez les deux bactéries, une réduction significative a été notée (*S. thermophilus*-C6 Sig=0,00502525 ; *E. durans*- C2 Sig= 0,00426993).

Cet effet peut être expliqué par la faible production des exopolysaccharides en présence de l'extrait, ces polysaccharides sont des constituants essentiels et majeur du biofilm bactérien (**Tremblay et al., 2014 ; Payne et Boles, 2015**). Ainsi **Borges et al. (2013)** ont signalé une faible production d'exopolysaccharide en présence des polyphénols.

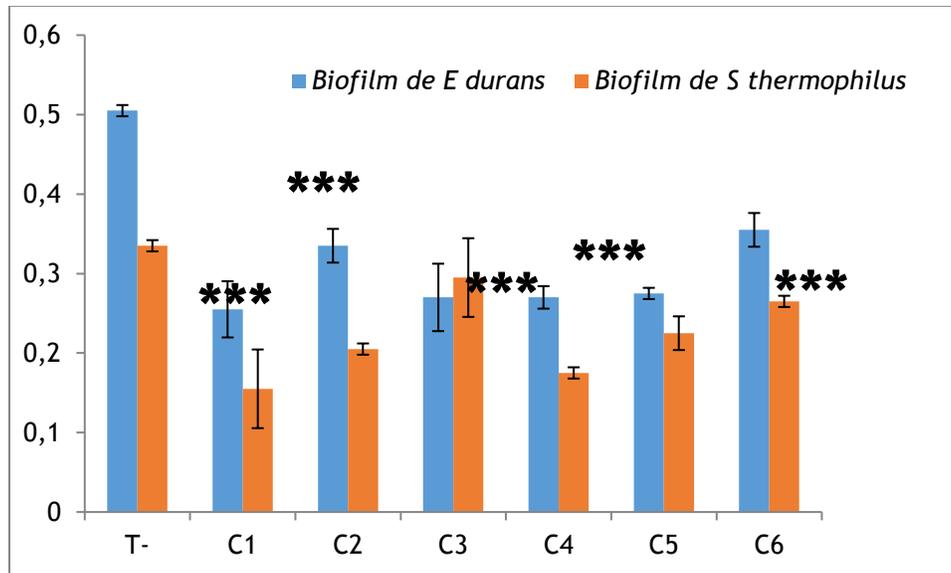


FIGURE N°08 : Effet de l'extrait sur la formation du biofilm des LAB testées

Selon **GHIGO et ROUX (2006)**, la formation et la résistance accrue des biofilms revient aux conditions défavorables où se trouvent les bactéries afin de faire face aux différentes agressions de l'environnement. On suggère que la formation élevée du biofilm des souches probiotiques en absence d'extrait aqueux revient à son état de stress qui est lié au milieu alors que l'addition de l'extrait aqueux permet au deux souches d'être dans un milieu enrichi et adéquat ce qui conduit à une faible formation de biofilm.

III.7. Effet de l'extrait sur le pouvoir antibactérien des bactéries lactique

La (FIGURE N°09) représente l'activité antibactérienne (en pourcentage I%) en présence de l'extrait aqueux après neutralisation par la catalase, sans neutralisation les deux bactéries ont une activité antibactérienne notable vis-à-vis de *S. aureus* tout particulièrement. *S. thermophilus* reste sans effet contre *E. coli*. Par contre la neutralisation à la catalase permet aux deux souches lactiques d'inhiber les deux bactéries pathogènes testées. Pour comprendre et pouvoir interpréter l'effet de la catalase, un travail complémentaire approfondi doit être établi. Un témoin sans extrait est aussi recommandé pour bien cerner l'effet des polyphénols sur l'amélioration de l'activité antibactérienne des LAB.

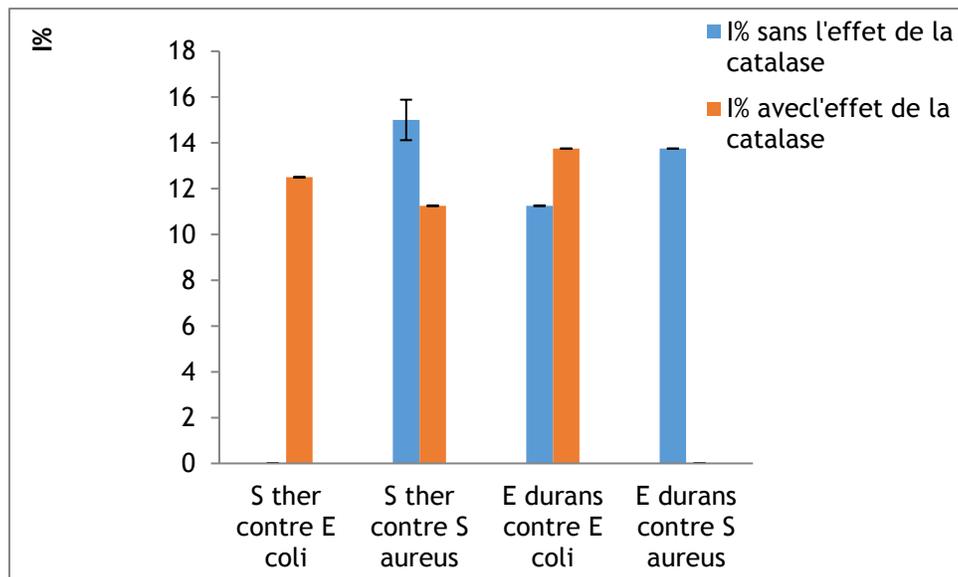


FIGURE N°09: Activité antibactérienne en présence et en absence de catalase

Conclusion

Conclusion

Les bactéries lactiques ont un intérêt croissant en technologie et en pharmacie ; elles ont diverses fonctions biologiques importantes. Mais leurs effets santé restent limités par leur capacité d'implantation. Ainsi notre propos était d'utiliser des prébiotiques d'origine végétale, polyphénols extraits de bourgeons de fenugrec, afin d'améliorer leurs atouts probiotiques.

Il ressort de ce travail que des concentrations équilibrées de l'extrait de fenugrec améliorent l'agrégation, la co-agrégation et la croissance des germes. Le biofilm, convoité, de *Streptococcus thermophilus* et *Enterococcus durans* a été réduit sans provoquer un stress inducteur de leur développement ou leur performance à former le biofilm. Ainsi, cet effet peut être associé à l'activité prébiotique des polyphénols, qui donnent une plus grande force compétitive de probiotiques.

L'utilisation des polyphénols devrait être jaugée en prenant en compte que l'objectif premier de leurs applications concerne des niches (exemples du système digestif, des implants, des produits alimentaires) partagées autant par les germes cibles et leurs colocataires.

Les résultats de cette étude laissent suggérer que l'extrait peut être requis pour influencer la croissance et les propriétés adhésives des bactéries lactiques ce qui permet d'améliorer la colonisation et l'implantation de ces bactéries et par conséquent améliorer leurs fonctions physiologiques.

L'agrégation et la formation de biofilm sont dépendantes des structures de surface des cellules où l'incorporation des prébiotiques dans le milieu peut améliorer ou altérer la physiologie métabolique du germe. Il est intéressant d'étudier le mécanisme moléculaire d'action des polyphénols sur l'hydrophobicité et les propriétés physicochimiques de la paroi cellulaire et de déterminer la consistance et la structure chimique de biofilm sous microscope électronique afin de comprendre l'impact de ces biomolécules végétales sur la propension des bactéries à s'organiser en biofilm. Une caractérisation moléculaire de l'extrait est aussi recommandée pour bien comprendre ses mécanismes d'action.

Références bibliographiques

Références

A

Altuntas, E, (2005) *Some physical properties of fenugreek (Trigonella foenum-graceum L .) seeds*, 37–43.

Andrew, J, M,(2008) BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7).*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 256-278.

Alberto, M,R., Mario E., Arena, B., Maria, C., De-Nadra ,M,(2007) Effect of phenolic compounds, *Food Control Putrescine production from agmatine by Lactobacillus hilgardii* , 898–903.

B

Boubakeur, B., Tirtouil, A., Meddah, B., & Khadem, H, (2015) the evaluation of the effect of synthetic flavonoids on growth of pathogenic and probiotic bacteria, 228–236.

Bjarnsholt, T, (20.13) *The Role of Bacterial Biofilms in Chronic Infections* (n.d.).

Basli, A., Chibane, M., Madani, K., Oukil, N,(2012) *Activité antibactérienne des polyphénols extraits d ' une plante médicinale de la flore d ' Algérie : Origanum glandulosum Desf.* 2–9.

Brighente,I., Dia ,M., Verdi,L., Pizzolatti, M,(2007).Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species,156-161

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.* 6(7), 51–60.

Borges A, Saavedra M. J, Simoes M (2012). The activity of ferulic and gallic acids in

Références

biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*, P755-767

Borges A, Ferreria C, Saavedra M. J, Simoes M (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial drug resistance*, pp10

C

Coudeyras, S ,(2010)*Microbiote et probiotiques : impact en santé humaine,*”.N°08.france

Costerton J., W., Zbigniew, L (1995), “Microbial Biofilms,” *Annu. Rev. Microsc.*, vol. 49, pp. 711–745, .

Cecilia A, Pinho D.A (2017) Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées. Université grenoble alpes : France

Cerning, J. (1994) Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques, *Bactéries Lactiques* Pages 309-329

D

Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends, pp104-111

Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D (2005) Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*, *Letters in Applied Microbiology* 31, pp438–442.

F

Fontana C, Shengyu Li, Zhennai Y, Widmalm G (2015).Structural studies of the exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* C88 using NMR spectroscopy and the program CASPER. *Carbohydrate Research* 402, pp87–94

Federight M (2005) bactériologie alimentaire In *compendium d'hygiène des aliments*, 2e ed. 49,

Références

rue héricart, paris: economica

Fitzgerald Matt F. Simcik Paige J, Novak Nicole J. M. (2018) Perfluoroalkyl Substances Increase the Membrane Permeability and Quorum Sensing Response in *Aliivibrio fischeri* pp. 26-31

G

Garrodi F, Michel C, Morin D (2002) Les Exopolymères Bactériens,pp39

GHIGO J.M, Agnès R (2006) Les biofilms bactériens, pp261-268

Geesey G.G. (1982) Microbial exopolymers: ecological and economic considerations, pp9-14

K

Kos.B, kovic J. S. Us, Vukovic S, SImpraga M, Frece J, Matosic S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus*, pp981–987

Khalil S, Rowaida K (2010). *Influence of gallic acid and catechin polyphenols on probiotic properties of Streptococcus thermophilus CHCC 3534 strain.* 2069–2079.

Kaviarasan S, Viswanathan P, Anuradha C.V (2007) Fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum*) polyphenols inhibit ethanol-induced collagen and lipid accumulation in rat liver, pp. 373–383

L

LISLE J. T, ROSE J. B (1995). Cryptosporidium contamination of the water in the USA and UK: A minireview. *Aqua* 44, pp103-117

Lindgren S. E, Dobrogosz W. J. (1990). *Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations,* pp87

Références

Lister E, Wilson P (2001) Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity (personal communication). Lincoln, New Zealand: Crop Research Institute

Lambin J.P, German A (1969) Précis de microbiologie, pp629-635.

Li W, Juan J, Xin R, Jiaojiao Y, Weizhi T, Xiaohong, Jiang M, Dong M (2014) Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro*, *Food Science and Technology* 59, pp. 732-739.

Li G, Luan G, Yanfeng H, Tie F, Wang Z, Suo Y, Ma C, Wang H (2018) Polyphenol Stilbenes from Fenugreek (*Trigonella foenum- graecum* L .) Seeds Improve Insulin Sensitivity and Mitochondrial Function in 3T3-L1 Adipocytes, pp09

M

Madhava-Naidu M, Shyamala B, Pura J, Naik G, Sulochanamma, Srinivas P(2011) Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds, *LWT-Food Science and technology*, 44, pp451-456.

Morikawa M. (2006), Beneficial Biofilm Formation by Industrial Bacteria *Bacillus subtilis* and Related Species, pp1–8.

Mann E. E, Wozniak D. J (2012) *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology, pp1–24.

Mutai C, Bii C, Vagias C, Abatis D, Roussis V. (2009) Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes, pp143–148

Marzouk B, Haloui E, Akremi N, Aouni M, Marzouk Z, Fenina N (2012) Antimicrobial and anticoagulant activities of *Citrullus colocynthis* Schrad. leaves from Tunisia (Medenine). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, pp1982-1988.

N

Naidu M. M, Shyamala B.N, Naik J. P, Sulochanamma G, Srinivas P (2011) Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds, *LWT - Food Science and Technology*, pp451–456

Références

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.), pp1261–1271.

O

Öner A.C, Mercan U, Öntürk H, Cengiz N, Erten R, Özbek H (2008) Anti inflammatory and hepatoprotective activities of *Trigonella foenum graecum* L. *Pharmacologyonline*, pp126-132.

P

Pratt L.A, kolter R (1998) Genetic Analysis of *Escherichia coli* Biofilm Formation—Roles of Flagella, Motility, Chemotaxis and Type I Pili, *Molecular Microbiology*, pp285-294

R

Rouault S. D, Orthier G.C (2001) Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé, pp. 101–117

Romain B, fechner L, naitali M, dreanno C (2012) Quand Les Microbes s’organisent, Biofilms, rue des grands-augustins, paris, Quae

S

Snehlata H. et Payal D. (2011). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)An Overview

Subhashini, N., Thangathirupathi, A., & Lavanya, N. (2011). *Antioxidant activity of trigonella foenum graecum using various in vitro and ex vivo models.* 3(2).

Stickler .D. J, Morris N. S, Lean R. J. C. M. C, Fuqua C (1998) Biofilms on Indwelling Urethral Catheters Produce Quorum- Sensing Signal Molecules In Situ and In Vitro, pp3486–3490

Stoodley P, Sauer K, Davies D. G, Costerton J. W (2002) Biofilms as Complex Differentiated Communities, pp187–209.

Références

Simoes M, Simoes L. C, Vieira M. J (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT food of science and technology*, pp573-583

Sutherland I.W (1972) Bacterial exopolysaccharides, *Advances in Microbial Physiology*, pp 1-5

Sutherland I.W (2003) Biotechnology of microbial exopolysaccharides, pp. 12-38, 82-102.

T

Thomas J., S. Basu et S. Acharya (2006). Identification of *Trigonella* accessions which lack antimicrobial activity and are suitable for forage development. *Canadian journal of plant science*, 86, 727-732.

Tremblay Y.D, Hathroubi S, Jacques M.(2014) Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique

Thomas T.,Hawzeen S.Khalil.,jack C.Leo (2018). *Bactérienne auto-agrégation*.

V

Van, Halbeek, H, (1994) NMR developments in structural studies of carbohydrates and their complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 697–709

Y

Yacoubi L., Rabaoui L., HédiHamdaoui M., Fattouch S., Serairi R., Kourda N., Ben Khamsa S (2011). Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Trigonella foenum-graecum* Linnaeus, 1753 (Fenugreek) seed extract in experimental pulmonary fibrosis.

Yadav U. C. S, Baquer N. Z (2014) Pharmacological effects of *Trigonella foenum-graecum* L. in health and disease, pp. 243–254

Références

Yap, T Soo, Thiba K, Beow C.Y, Cai P.H, Kok-Gan C, Swee H.E.L (2014) Membrane disruption and anti-quorum sensing effects of synergistic interaction between, pp27

ANNEXE

Annexe

Préparation des milieux de culture et solution chimiques

M17 (solide)

Tryptone	2,5 g
Peptone papainique de soja	5,0 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g
Extrait de viande	5,0 g
Extrait autolytique de levure	2,5 g
Béta-Glycérophosphate de sodium	19,0 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Lactose	5,0 g
Acide ascorbique	0,5 g
Agar-agar bactériologique	15,0 g
pH à 25 °C	7,1 ± 0,2

MRS (Gélose de Man, Rogosa, Sharpe), (solides)

peptone	10,0 g
Extrait de viande	8,0 g
Extrait de levure	4,0 g
Glucose	20,0 g
Acétate de sodium trihydraté	5,0 g
Citrate d'ammonium	2,0 g
Tween 80	1,0 ml
hydrogénophosphate de potassium	2,0 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05 g
Agar	10,0 g
PH	6,2

Mueller Hinton (solide)

Infusion de viande de bœuf	0,2g
Hydrolysate de Caséine	17.5g
Amidon	1,5 g
Agar	10g
pH	7.4

ANNEXE

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

ANNEXE

Photos des appareils utilisés



Microscope optique



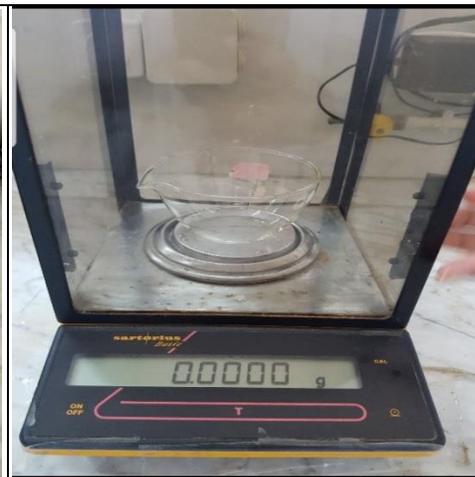
Centrifugeuse



Incubateur



Spectrophotomètre



Balance