

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مصطفى اسطمبولي - معسكر -

Université Moustapha Stambouli - Mascara -

Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie



THESE

PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES

BIOLOGIQUE

OPTION : MICROBIOLOGIE

PAR : BOUBAKEUR BADRA

Intitulé

Recherche d'un effet prébiotique
des exopolysaccharides des bactéries lactiques produits
sous l'effet des polyphénols de *Thymus fontanesii*

Devant le jury composé de :

Pr MEDDAH Boumediene	Université de Mascara	Président
Pr BLABID Lakhdar	Université de Mascara	Examineur
Pr KIHAL Mabrouk	Université d'Oran 1	Examineur
Pr BOUDJEMÂA	Université de Tlemcen	Examineur
Pr AGGAD Habib	Université de Tiaret	Examineur
Pr TIRTOUIL Aicha	Université de Mascara	Directrice de Thèse

Année universitaire: 2016-2017

Remerciements

الشكر يقدم لله عز وجل

Louange à mon tout puissant Allah

Thanks offering

My almighty Allah

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti-chercheur ».

Tout d'abord, je tiens à remercier la directrice de ma thèse, **Professeur TIRTOUIL Aicha** de l'université de Mascara, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour l'aide compétente qu'elle m'a apportée, pour ses multiples conseils, pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger cette recherche et pour sa patience, son encouragement à finir un travail commencé il y a longtemps. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension. Je vous prie, chère Maitre, de trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et profonde gratitude.

Monsieur **MEDDAH Boumediene**, professeur de l'université de Mascara, je suis très sensible à l'honneur que vous m'avez fait en acceptant la présidence de jury. Veuillez croire à ma grande admiration et mon profond respect.

Monsieur **BLABID Lakhdar**, professeur de l'université de Mascara, Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'examiner cette thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

Que Mr Monsieur **KIHAL Mabrouk**, Professeur de l'université d'Oran 1, trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon estime pour l'honneur d'avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

J'exprime mes estime et mes remerciements à Mr. **MOUSSA BOUDJEMÂA Boumediene**, Professeur à l'université de Tlemcen de m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury et de m'avoir accordé de son temps.

Mes remerciements vont également à Mr. **AGGAD Habib**, Professeur à l'université de Tiaret pour avoir accepté de participer à ce jury et pour l'accueil au sein de son laboratoire de recherche « hygiène et pathologie animale » et les conditions de travail privilégiées qui m'ont été offertes. J'ai toujours admiré vos qualités professionnelles et humaines ainsi votre modestie qui reste exemplaire. Qu'il me soit permis de vous exprimer ma reconnaissance et ma grande estime.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à Mr. **BOUKRAA Laid**, Professeur à l'université de Tiaret pour son accueil chaleureux et pour l'ambiance de travail très agréable au niveau de son laboratoire de recherche « amélioration et valorisation des productions animales locales » où une grande partie de cette étude a été effectuée, pour ses conseils précieux à chaque fois que j'ai sollicité son aide, ainsi que pour ses multiples encouragements.

Mes profondes gratitude envers **Mohamed Slimane**, pour ses qualités humaines exceptionnelles, ses encouragements et son soutien tout le temps par la force et l'énergie qui lui sont disponibles.

« *L'amitié est un plaisir qui ne fait que s'accroître à mesure qu'on vieillit* »... Que Mm. **KHADEM Hafidha**, Maitre assistante A à l'université Ibn Khaldoun de Tiaret, trouve ici le témoignage de ma reconnaissance pour son amitié et son soutien tout au long de cette thèse, dans les bons moments, comme dans les périodes de découragement.

Je tiens à remercier chaleureusement, tous les membres de ma famille qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras.

Merci à vous tous...

Dédicace

A la mémoire de mon père,

A ma très chère mère,

A mes frères et sœurs bien aimés,

A tous mes proches...

Abstract

Polyphenols are a group of organic molecule ubiquitously distributed in plant kingdom. As is typical for phenolic compounds, they can act as potent antioxidants and metal chelators. They also appear to be effective against pathologic diseases such as nosocomial infection; several of these polyphenols appear to be effective antimicrobial agents. The purpose of this study was, on first time, to optimized the method of polyphenolic extraction by using of four technic of extraction (overnight maceration at room temperature, tow cycle of maceration at 70°C during 2h, extraction by Soxlet and extraction by sonification at 52 Khz during 45min); On second time we were interested on the evaluation of the effect of natural polyphenolic extract of *Thymus fontanessias* prebiotic on the growth, Exopolysaccharides production and aggregation of some isolated probiotic (*Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*) and on growth and biofilm formation of pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus* 25923, *Bacillus cereus* 11778, *Bacillus subtilis* 6633, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 and *Escherichia coli* 25922); And finely the evaluation *in vivo* of the prebiotic effect of EPS product under optimized conditions and in presence of extract of *T. fontanesii*. The extraction by sonication was found to have the most significant efficiency of extraction (41.5%) and the most content on polyphenols (156mg EAG/g of extract). This extract was exhibited a prebiotic activity and antibacterial effect; the *in vivo* tests were shown the stimulatory effect of aqueous extract and EPS. Therefore, these molecules can be used as alternative or additive agents to improve the probiotic bacterial activity and their capacity of adhesion and colonization and to prevent the pathogenic bacterial colonization.

Key words: probiotic-prébiotic- pathogens- biofilm- EPS- polyphenols- *Thymus fontanesiii*

Résumé

Les polyphénols sont un groupe de molécule organique ubiquitaire distribué dans le règne végétal. Comme il est typique pour tous les composés phénoliques, les polyphénols peuvent agir comme de puissants antioxydants et des chélateurs de métaux. Plusieurs de ces polyphénols semblent être des agents antimicrobiens efficaces. Le but de cette étude était, sur le premier plan, l'optimisation de la méthode d'extraction des polyphenols de *Thymus fontanesii* utilisant quatre technique (macération pendant une nuit à température ambiante, deux cycles de macération à 70 ° C pendant 2h, l'extraction par Soxhlet pendant 3h et l'extraction par trois cycles de sonication à 52 Khz pendant 45min); En deuxième lieu nous étions intéressés à l'évaluation de l'effet microbien de l'extrait de *Thymus fontanessi* comme prébiotique sur la croissance, la production des exopolysaccharides(EPS) et l'agrégation de certains probiotiques (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) et comme agent antibactérien sur la croissance et la formation de biofilm de bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*25923, *Bacillus cereus* 11778, *Bacillus subtilis* 6633, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 et *Escherichia coli* 25922); Et finalement l'évaluation *in vivo* de l'effet prébiotiques des EPS produits dans des conditions optimales et en présence de l'extrait de *T. fontanesii*. L'extraction par sonication était meilleure, elle permet d'obtenir le meilleur rendement d'extraction (41,5%) et la plus grande teneur en polyphénols (156 mg EAG / g d'extrait). Cet extrait a montré une activité prébiotique importante (stimulation de l'activité métabolique des probiotiques et diminution de celle des germes pathogènes); les tests *in vivo* ont montré un effet stimulateur de l'extrait et des EPS à travers la réduction du nombre de germes pathogènes et l'augmentation de celui des germes bénéfiques. Par conséquent, ces molécules peuvent être utilisées comme stratégie alternative ou additive à fin d'améliorer l'activité bactérienne des probiotiques et leur capacité d'adhésion et de colonisation et prévenir la colonisation des pathogènes.

Mots clé : probiotiques- prébiotique- pathogène- biofilm- EPS- polyphenols- *Thymus fontanesii*

الملخص

البوليفينولات هي جزيئات عضوية موزعة و متواجدة بشكل مطلق في سائر النباتات. كما هو الحال بالنسبة لجميع المركبات الفينولية, للبوليفينولات فعالية متميزة كمضاد للأكسدة و قدرة على نزع المعادن و سحبها. الكثير من هذه المركبات الحيوية اثبت نجاعة قوية ضد الفطريات و العناصر الحية الدقيقة. كان الهدف من هذه الدراسة, بداية, تحسين طريقة استخلاص البوليفينولات من نبة طبية شائعة الاستعمال في الطب البديل *fontanesii Thymus* " الزع تور" باستخدام اربعة تقنيات نمطية و حديثة (النقع على درجة حرارة معتدلة لأربع و عشرين ساعة, النقع على درجة حرارة عالية لمدة ساعتين, الاستخلاص باستخدام الجهاز الخاص باستخلاص المواد الدسمة Soxhlet لحوالي ثلاث ساعات, الاستخلاص باستخدام الموجات الصوتية العالية ultrasons لثلاث دورات, 45 دقيقة لكل دورة). المنقوع المستخلص, الذي يحتوي على اكبر كمية من البوليفينول, استخدم فيما بعد كمحفز للوظائف الحيوية (النمو, القدرة على الالتصاق و تحسين مردودية انتاج متعدد السكريات) لنوعين من بكتريا حمض اللبن ذات الاستخدام الصناعي في التكنولوجيا الحيوية *Lactobacillus bulgaricus*

و *Streptococcus thermophilus* و كمثبط لنمو, التصاق و تشكيل البيوفيلم لخمسة انواع من البكتريا الممرضة

(*Staphylococcus aureus* 25923, *Bacillus cereus* 11778, *Bacillus subtilis* 6633, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 et *Escherichia coli* 25922

في الاخير اهتمنا بتقييم مدى فعالية متعدد السكريات, المنتج تحت تاثير البوليفينول, على توزيع بكتيريا الامعاء و انتشارها لمختلف الاعضاء باستخدام نموذج حيواني مخبري .

أثبتت الدراسة أن الاستخلاص بالموجات الصوتية العالية هي الطريقة الأنجع للحصول على مردودية أفضل و تراكيز أعلى للبوليفينول. كما اثبت المنقوع المتحصل عليه بهذه الطريقة فعالية تحفيزية جيدة على بكتيريا حمض اللبن و تثبيطية عالية على أنواع البكتيريا الانتهازية و الضارة. الدراسة باستخدام النموذج الحيواني أثبتت أيضا نجاعة متعدد السكريات و البوليفينول على التوزيع السليم لبكتريا الأمعاء و مكافحة انتشارها نحو باقي الأعضاء. و بالتالي يمكن القول بأن البوليفينول (بريبوتيك نباتي) و متعدد السكريات (بريبوتيك ميكروبي) يمكنهما معا تشكيل استراتيجية بديلة او اضافية متميزة لتحفيز البكتريا النافعة و البروبيوتيك على الالتصاق و الاستقرار في الامعاء من جهة و محاربة البكتيريا الضارة و بالتالي تحسين الوظائف الحيوية لبكتيريا الأمعاء.

الكلمات المفتاحية □ البروبيوتيك- البريبوتيك- البكتيريا الضارة- البيوفيلم- متعدد السكريات- البوليفينول -

Thymus fontanesii

LISTE DES ABREVIATIONS

Ag	: Acide gallique	GDP	: Guanine diphosphate
Ag%	: Pourcentage d'agrégation	GRAS	: Generally recognized as safe
ADN	: Acide désoxyribonucléique	G₆P	: Glucose 6 phosphate
ARN	: Acide ribonucléique	GT	: Glycosyl-transférase
ARN_r	: Acide ribonucléique ribosomique	GTi	: Glycosyl-transférase initiateur
AMP_c	: Adenosine mono phosphate cyclique	HePs	: Hétéropolysaccharides
ATCC	: American type culture collection	HoPs	: Homopolysaccharides
B	: <i>Bacillus</i>	I%	: Coefficient d'inhibition
Caco-2	: Colorectal adenocarcinoma cells	K_{pb}	: Kilo pair de base
C/N	: Rapport carbone- nitrogène	KHZ	: Kilohertz
CMB	: Concentration minimale bactéricide	LAB	: Lactic acid bacteria
CMI	: Concentration minimale inhibitrice	L, Lb	: <i>Lactobacillus</i>
CO₂	: Dioxyde de carbone	NaCl	: Chlorure de sodium
Da	: Daltons	NCFB	: National Collection of Food Bacteria
DGGE	: Denaturing gradient gel electrophoresis		: Nucléotide (Uridine/ Thymidine / Guanine)
D-Glucp	: D-glucose phosphate	NDP	: 5'-diphosphate
D-Galp	: D- galactose phosphate	OHO	: Homofermentaire obligatoire
DO	: Densité optique	OHE	: Hétérofermentaire obligatoire
E	: <i>Escherichia</i>	P :	<i>Pseudomonas</i>
EMP	: Voie d'Embden- Meyerhof- Parnas	PCR	: Polymerasechainreaction
EAG	: Equivalent d'acide gallique	PEGE	: Pulse field gel electrophoresis
EG	: Equivalent de glucose	pH	: Potentiel d'hydrogène
EQ	: Equivalent de quercitine	PP	: Pentose phosphate
EPS	: Exopolysaccharides	PTS	: Système phosphotransférase
ERO	: Espèces radicalaires oxygénées	S	: <i>Sataphylococcus</i>
ETEC	: Enterotoxigenic Escherichia coli	St	: <i>Streptococcus</i>
ETF	: Extrait de <i>Thymus fontanesii</i>	SGIH	: Système gastrointestinal humain
	: Food and Agriculture Organization of the	SSCP	: Single strand conformation polymorphism
FAO	United Nation	TGGE	: Température gradient gel electrophoresis
FHO	: Homofermentaire facultative	TDP	: Thymidine diphosphate
FISH	: Fluorescence in situ hybridization		: Terminal restriction fragment length
FOS	: Fructo-oligosaccharide	T-RELP	: polymorphism
Frup (1-3):	Fuctose phosphate	UDP	: Uridine diphosphate
G+ / G-	: Gram+ / Gram-	UR	: Unité oligosaccharide répétitive
GC	: Guanine-Cytosine	Us	: Ultrasons

LISTE DES TABLEAUX.

Tableau N°01: Exemples de méthodes moléculaires utilisées dans la caractérisation des bactéries au sein des écosystèmes.	07
Tableau N°02 : Génome des bactéries lactiques, nombre des séquences complètes et partielles	09
Tableau N°03: Familles constituant le groupe phylogénétique des bactéries lactiques	10
Tableau N°04: Caractéristiques des trois groupes d'espèces du genre <i>Lactobacillus</i>	16
Tableau N°05 : Homopolysaccharides produits par les bactéries lactiques	23
Tableau N°06: Espèces de LAB productrices d'homo et hétéropolysaccharides	29
Tableau N°07 : Genres communs de LAB et leur association avec le système GI humain	36
Tableau N°08: Bactéries lactiques utilisées comme additifs alimentaires énumérés par l'autorité européenne de sécurité des aliments en tant que probiotiques	41
Tableau N°09: Localisation de certaines espèces du thymus en Algérie	46
Tableau N10: Différentes sections du genre <i>Thymus</i>	48
Tableau N°11: Principales classes de composés phénoliques	52
Tableau N°12: Exemples des effets de santé des composés phénoliques	59
Tableau N°13: Substitution des flavonoïdes aglycones du genre <i>Thymus</i>	61
Tableau N°14: Substitution des flavonoïdes glycosidés du genre <i>Thymus</i>	63
Tableau N°15: Provenance et références des souches bactériennes utilisées	66
Tableau N°16: Propriétés et distribution des lots de rats	67
Tableau N°17: Détermination de la CMI en milieu liquide	83
Tableau N°18: Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides déterminées sur un milieu liquide	84
.....	84
Tableau N °19: Différents rapports CMB / CMI	84
Tableau N°20 : Quantité d'EPS produite en par <i>S. thermophilus</i> sous l'effet de l'extrait de <i>Thymus fontanesii</i> et de l'acide gallique	98

LISTE DES FIGURES.

Figure N°01: Contraste de phase (a-e) et microphotographie électronique (f) montrant différentes morphologie cellulaire de lactobacilles	06
Figure N°02: Arbre phylogénétique représentant la relation entre les familles de l'ordre Lactobacillales basé sur la séquence du gène ARNr 16S	11
Figure N°03: L'arbre phylogénétique représentant les relations entre les espèces de <i>Lactobacillus</i> basées sur la séquence du gène ARNr 16S.....	14
FigureN°04: Voies du métabolisme du glucose. (A) la voie homofermentaire. (B) métabolisme des acides mixtes. (c) la voie heterofermentaire.....	20
Figure N°05: Aspect colonial exotique de deux cultures bactériennes productrices d'EPS	21
Figure N°06: Biosynthèse des homopolysaccharides par les trans-glycosylase chez les bactéries lactiques.....	24
FigureN°07: Exemples de structure biochimiques d'EPS de type hétéropolysaccharides identifiés chez les bactéries lactiques.	25
FigureN°08: Exemples de structure génétique d'EPS de type hétéropolysaccharides identifiés chez les bactéries lactiques.....	26
FigureN°09: Représentation schématique de la voie de biosynthèse des hétéropolysaccharides chez les bactéries lactiques	27
Figure N°10: Implications des polysaccharides dans l'adhésion aux surfaces dans un milieu aqueux	31
Figure N°11: Potentiels effets bénéfiques des EPS produits par les bactéries lactiques sur la santé	32
Figure N°12: Diagramme des systèmes protéolytiques des bactéries lactiques. (a) des composants extracellulaires.....	33
Figure N°13: Répartition du genre <i>Thymus</i> dans le monde.	45
Figure N°14: Anatomie du trichome glandulaire de <i>Thymus</i>	51
Figure N° 15: Structure de quelques polyphénols rencontrés dans les plantes	53
Figure N° 16: Voix de biosynthèse des principaux composés phénoliques	54
Figure N°17: Quelques exemples de l'implication des composés phénoliques dans le développement de la plante et dans les interactions avec son environnement.....	55
Figure N°18: Rôle de changement de contenu et de la qualité des polyphénols dans les dommages oxydatifs au sein de la plante.....	56
Figure N° 19: Sites proposes pour la chélation des ions métalliques.	57
Figure N°20: Piégeage des radicaux libres	60
Figure N°21: Variété du rat Wistar utilisée	68
Figure N°22: <i>Thymus fontanesii</i> utilisée	68
Figure N°23: Rendements d'extraction	79

Figure N°24: Taux des polyphénols et des flavonoïdes de l'extrait de <i>Thymus fontanesii</i>	80
Figure N°25 : Résultats de l'effet de l'extrait de <i>T. fontanesii</i> sur l'agrégation des probiotiques	82
Figure N°26 : Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait de <i>Thymus fontanesii</i> in vitro ..	83
Figure N°27 : Résultats de l'effet de l'extrait sur l'autoagrégation des bactéries pathogènes testées	87
Figure N°28 : Pourcentages de réduction de biofilm des différentes bactéries pathogènes testés en présence de 100µl de l'extrait de <i>Thymus fontanesii</i>	87
Figure N°29: Résultats d'optimisation du milieu de production des EPS.....	89
Figure N°30: Résultats d'optimisation de l'inoculum pour la production des EPS	90
Figure N°31: Résultats d'optimisation du rapport C/N dans la production des EPS	91
Figure N°32: Résultats d'optimisation de la température de production des EPS	92
Figure N°33: Résultats d'optimisation du pH de production des EPS	93
Figure N°34: Résultats d'optimisation des conditions d'aéro/ anaérobiose dans la production des EPS 94	
Figure N°35: Résultats d'optimisation de la durée d'incubation.....	95
Figure N°36 : Résultats de production d'EPS en présence de l'extrait de <i>Thymus fontanesii</i>	97
Figure N° 37: Expression de la croissance et la formation de biofilm par <i>S. thermophilus</i> sous l'influence de l'extrait de <i>Thymus fontanesii</i> et de l'acide gallique	99
Figure N°38: Evolution de la moyenne du poids corporel des différents groupes de rats durant quatre semaines	101
Figure N° 39: Distribution de la microflore intestinale (Microflore totale, lactobacillus, staphylocoque et entérobactéries) sous l'effet des cultures riches en EPS, polyphénols et le mélange (effet symbiotique).....	102
Figure N°40 : Résultats de l'effet des EPS, polyphénols et le mélange sur la translocation bactérienne vers les poumons durant 28 jours	105
Figure N° 41: Résultats de l'effet des EPS, polyphénols et le mélange sur la translocation bactérienne vers le foie durant 28 jours	106
Figure N° 42: Résultats de l'effet des EPS, polyphénols et le mélange sur la translocation bactérienne vers les reins durant 28 jours	106
Figure N°43 : Résultats de l'effet des EPS, polyphénols et le mélange sur la translocation bactérienne vers la rate durant 28 jours	107

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. BACTERIES LACTIQUES ET EXOPOLYSACCHARIDES

I.1. DEFINITION ET CARACTERISTIQUES GENERALES DES BACTERIES LACTIQUES	04
I.2. HABITATS	05
I.3. CARACTERISTIQUES DES BACTERIES LACTIQUES	05
I.4. GENETIQUE DES BACTERIES LACTIQUES	06
I.4.1. Techniques de biologie moléculaire appliquées à l'étude des bactéries lactiques	07
I.4.2. Séquençage des génomes des bactéries lactiques	08
I.5. TAXONOMIE DES BACTERIES LACTIQUES	09
I.5.1. Genre <i>Lactobacillus</i>	12
I.5.1.1. Caractéristiques générales	12
I.5.1.2. Position et arbre phylogénétique	12
I.5.1.3. Grands groupes du genre <i>Lactobacillus</i>	15
I.5.1.4. <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	15
I.5.2. Genre <i>Streptococcus</i>	17
I.5.2.1. Historique et caractéristiques généraux	17
I.5.2.2. Arbre et position phylogénétique	18
I.6. METABOLISME DES LAB	18
I.6.1. Métabolisme des sucres	18
I.6.2. Voie métaboliques centrales	19
I.6.4. Production des polysaccharides	21
I.6.4.1. Types des ESP produits par les LAB	22
I.6.4.2. Nature des ESP produits par les LAB	30
I.6.4.2. Activité biologiques des exopolysaccharides	30
I.6.2. Métabolisme des protéines et des lipides	32
I.6.3. Fermentation de citrate et de l'acide malique	33
I.7. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES BACTERIES LACTIQUES	34
I.7.1. Bactéries lactique et flore intestinale	34
I.8. ACTIVITE PROBIOTIQUE DES BACTERIES LACTIQUES	39

CHAPITRE II. PLANTES MEDICINALES ET COMPOSES PHENOLIQUES

II.1. GENERALITES SUR LES PLANTES MEDICINALES	42
II.2. PRESENTATION DE <i>THYMUS</i>	42
II.2.1. Origine de l'étymologie	42
II.2.2. Caractéristiques botaniques du <i>Thymus</i>	44
II.2.4. Biogéographie du genre <i>Thymus</i>	44
II.2.5. Sections du genre <i>Thymus</i>	47
II.2.6. Propriétés et utilisations	48
II.2.7. Métabolites secondaires du genre <i>Thymus</i>	49
II.2.7.1. Huile essentielle de <i>Thymus</i>	49
II.2.7.2. Composés phénoliques du genre <i>Thymus</i>	50
II.2.7.2.1. Généralité sur les polyphénols	50
II.2.8. Propriétés des polyphénols pour la cellule productrice	54
II.2.9. Utilisation des polyphénols comme antioxydants en santé humaine	55
II.2.10. Autres effets santé des polyphénols	57
II.2.11. Absorption et métabolisme des flavonoïdes	59
II.2.11. Distribution des flavonoïdes et d'autres polyphénols dans le genre thymus	61

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I. MATERIEL ET METHODES

I.1. OBJECTIFS	65
I.2. LIEU DU TRAVAIL	65
I.3. MATERIEL BIOLOGIQUE	66
I.3.1. Souches bactériennes	66
I.3.2. Dispositif expérimental	67
I.3.3. Matériel végétal	67
I.4. METHODES	69
I.4.1. Etude phytochimique	69
I.4.1. Procédure d'extraction	69
I.4.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes	70
I.4.2. Etude microbiologique <i>In vitro</i>	71
I.4.2.1. Purification, identification et caractérisation des souches lactiques	71
I.4.2.2. Préparation des inocula	71

I.4.2.3. Effet de l'extrait polyphénolique sélectionné sur la viabilité et l'agrégation des souches lactiques	72
I.4.2.4. Effet antibactérien de l'extrait de <i>Thymus fontanesii</i>	73
I.4.2.5. Optimisation des conditions de production des exopolysaccharides	75
I.4.2.6. Effet de l'extrait sur la production des exopolysaccharides.....	76
I.4.5.6. Effet de l'acide gallique sur la croissance, le biofilm et la production des EPS chez <i>S thermophilus</i>	76
I.4.3. Etude microbiologique <i>in vivo</i>	77
I.4.3.1. Evaluation <i>in vivo</i> de l'effet combiné des EPS et de l'extrait de <i>Thymus fontanesii</i>	77
I.5. TRAITEMENT DES DONNEES	78
CHAPITRE II. RESULTATS ET DISCUSSION	
II.1. RESULTATS DE L' ETUDE PHYTOCHIMIQUE.....	79
II.1.1. Résultats d'optimisation de la technique d'extraction de composés phénoliques ...	79
II.1.2. Résultats de dosage des polyphénols et des flavonoïdes	80
II.2. RESULTATS DE L'ETUDE MICROBIOLOGIQUE.....	81
II.2.1. Résultats de l'effet de l'extrait de <i>Thymus fontanesii</i> sur l'agrégation	81
II.2.2. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait	84
II.2.3. Résultats de la détermination des concentrations inhibitrices	83
II.2.4. Résultats de l'effet de l'extrait sur l'autoagrégation et la formation de biofilm négatif	86
II.2.5. Résultats de l'effet de l'extrait sur la production des exopolysaccharides	88
II.2.6. Résultats de l'étude comparative de l'effet de l'extrait polyphénolique de <i>Thymus fontanesii</i> et de l'acide gallique sur la production des exopolysaccharides et la formation de biofilm des LAB	98
II.3. RESULTATS DE L'ETUDE MICROBIOLOGIQUE <i>IN VIVO</i>	100
II.3.1. Effet de l'extrait sur l'évolution du poids corporel des rats	100
II.3.2. Effet de l'extrait sur la diversification de la flore intestinale	101
II.3.3. Effet de l'extrait sur la translocation bactérienne	107
CONCLUSION GENERALE	108
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	111
ANNEXE	133

Introduction Généralité

Les surfaces muqueuses sont hébergées par un microbiote extrêmement complexes, qui colonise rapidement les tissus à la naissance et exerce de nombreuses fonctions métaboliques, nutritionnelles et protectrices importantes dont la plupart d'entre elles sont nécessaires et bénéfiques pour le maintien de la santé de l'hôte. Les nombreuses et diverses communautés microbiennes résidentes sur la vaste surface muqueuse intestinale ont un rôle particulièrement important à jouer dans la santé humaine où tout déséquilibre peut être considéré comme un facteur impliqué dans diverses pathologies cliniques (**Eduardo et al., 2014**).

Divers facteurs sont capables d'altérer l'équilibre de la flore intestinale en favorisant la croissance des pathogènes tels que *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* de type A, *Clostridium difficile* et *Candida albicans*, qui peuvent affecter la santé de l'hôte. Une des stratégies qui permettent la modulation ou la restauration de l'équilibre intestinal est l'utilisation des probiotiques qui sont des bactéries ou des levures avec un bénéfice élevé, présentes en grande quantité dans l'intestin ou importées par l'alimentation, ces bactéries ont des propriétés bénéfiques pour le microbiote; elles permettent la réduction des germes pathogènes et l'augmentation des germes potentiellement bénéfiques (**Gomes et al., 2014 ; London et al., 2016**). Le rôle protecteur de bactéries probiotiques contre les agents pathogènes gastro-intestinaux et leurs mécanismes fondamentaux d'action a retenu une attention particulière. **Collado et al.(2009)** ont montré que l'inhibition des pathogènes par les bactéries lactiques peut améliorer de façon significative la santé humaine contre les pathogènes.

Pour que ces souches puissent exercer leurs effets bénéfiques, Il est important de garantir leur viabilité au cours du passage à travers le tractus gastro-intestinal, et le maintien de leurs caractéristiques d'adhérence qui est une capacité particulière de colonisation (**Malago et al., 2011**). L'auto-agrégation des souches probiotiques semble être une étape nécessaire pour adhérer aux cellules épithéliales intestinales, et la capacité de co-agrégation peut constituer une barrière qui prévient la colonisation par des micro-organismes pathogènes (**Kos et al., 2003**).

Le mécanisme d'augmenter le nombre de bactéries bénéfiques et d'améliorer leur implantation et leurs effets thérapeutiques dans l'intestin est l'ingestion de prébiotiques. Les prébiotiques sont définis comme des «ingrédients alimentaires non digestibles qui résistent à

l'hydrolyse et l'absorption dans le tractus gastro-intestinal. Ces substances bioactives peuvent être produites par les probiotiques et sont dite des prébiotiques d'origine microbienne, le cas de polysaccharides des bactéries bénéfiques (exopolysaccharides, fructooligosaccharides...).

Néanmoins, les fonctions physiologiques des EPS bactériens sont encore inconnus et seulement quelques EPS bactérien sont été exploités à des fins et applications industrielles (**Badel et al., 2011**). Les polysaccharides, tels que les dextrans de *Leuconostoc mesenteroides*, xanthane de *Xanthomonas campestris* sont des exemples qui ont des applications commerciales alimentaires et non alimentaires (**De Vuyst et al., 2001 ; Sutherland, 2003**).

Les EPS des bactéries lactiques ont attiré une attention particulière car la plupart de ces bactéries sont de qualité alimentaire ayant le statut GRAS (generally recognized as safe) et leur EPS sont considérés comme sûr et peuvent être utilisés dans les produits alimentaires. Ils ont été prétendus avoir une large gamme de bénéfice vis-à-vis de la santé, y compris les propriétés cardioprotecteurs tels que les activités hypocholestérolémiantes, antioxydantes et immunomodulatrices, en plus des activités prébiotiques et antitumorales (**Ahmed et al., 2013 ; London et al., 2016**). Les exopolysaccharides sont des polymères à longue chaîne et de poids moléculaire élevé qui sont sécrétés principalement par les micro-organismes et les microalgues dans leurs milieux environnants en cours de croissance (**Ismail et Nampoothiri, 2010 ; Souza et al., 2012**). Certaines bactéries lactiques, telles que celles du genre *Lactobacillus*, sont capables de produire des exopolysaccharides sur la paroi de la cellule bactérienne pour former une capsule ou les sécrétée dans le milieu de croissance environnant sous forme de slime (EPSs) qui confèrent des propriétés physico-chimiques favorables aux denrées alimentaires et/ou des effets physiologiques bénéfiques sur la santé humaine comme antioxydants (**Pan et Mei, 2010 ; Fontana et al., 2015**).

Du fait de leur haut poids moléculaire les EPS pourraient échapper à la digestion de la partie haute du système gastro-intestinal et atteindre le côlon sous leur forme native et exercer ainsi une action prébiotique au niveau de la microflore colique (**Ruas-Madiedo et al, 2002**).

Cependant, les bactéries lactiques ont une faible production des exopolysaccharides et un caractère épaississant extrêmement instable, ce qui représente un inconvénient majeur pour l'exploitation de ces molécules dans les différents secteurs industriels. Beaucoup de prébiotiques commerciaux sont obtenus à partir de matières premières végétales (**Malago et**

al., 2011 ; London *et al.*, 2016). L'intérêt scientifique pour l'étude des matières végétales comme sources de nouveaux composés pour leur transformation en agents thérapeutiques antimicrobiens et prébiotiques a considérablement augmenté. Ainsi Alberto *et al.*, (2007) indiquent que les composés polyphénoliques ont un effet stimulant sur la croissance des probiotiques. De leur part, Khalil *et al.*, (2010) ont confirmé que les flavonoïdes peuvent également affecter la croissance et le métabolisme des bactéries lactiques.

Thymus (Lamiaceae) est l'un des huit genres de plantes les plus importants en nombre d'espèces qui comprennent, environ 215 espèces, particulièrement répandue dans la région méditerranéenne (Morales *et al.*, 2003).

Ainsi, notre objectif consiste principalement à :

Evaluer, *in vitro*, l'effet de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* sur la croissance, l'agrégation et la production des exopolysaccharides (EPS) des bactéries probiotiques et sur le développement et la formation de biofilm des bactéries pathogènes qui ont une grande capacité de colonisation et d'implantation;

Etudier, *in vivo*, l'activité symbiotique de cet extrait et des EPS produits dans des conditions de culture optimales.

Partie I

Etude Bibliographique

Chapitre 1

Bactéries Lactiques

Depuis l'aube de l'humanité, les bactéries lactiques sont employées pour la fabrication et la conservation des aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levain. Au début du 20^e siècle, le terme «bactéries d'acide lactique» (LAB) a été utilisé pour se référer à "organismes acidifiants le lait". Bien que les similitudes entre ces organismes et d'autres bactéries produisant de l'acide lactique ont été rapidement observés, les critères proposés par **Orla-Jensen (1919)**, (la morphologie cellulaire, le mode de fermentation du glucose, la température de croissance, et les voies d'utilisation des sucres) constituent la base de la classification actuelle des LAB (**Novel, 1993; Wright et Axelsson, 2012**).

Le développement de l'industrie agroalimentaire et en particulier l'utilisation de matière première nouvelles, ainsi que le besoin de créer de nouveaux produits de haute qualité sans l'ajout des composés texturants et stabilisants d'origine végétale ou animale expliquent l'intérêt accru porté à ce groupe de bactéries diverses et à leur métabolites responsables de l'acquisition des propriétés nutritionnelles ou de la qualité organoleptique et sanitaire des aliments comme les polymères de type exopolysaccharides (EPS) (**Novel, 1993; Mozzi et al., 1996**).

I.1. DEFINITION ET CARACTERISTIQUES GENERALES DES BACTERIES LACTIQUES

Le terme «bactéries lactiques» ne se rapporte pas à une classe phylogénétique d'organismes, mais plutôt aux capacités métaboliques de l'espèce. Les bactéries lactiques sont historiquement définies comme une famille omniprésente et hétérogène de microbes qui peuvent fermenter divers nutriments produisant, principalement, l'acide lactique (**Holzappel et Wood, 1995**).

C'est un groupe de bactéries à coloration Gram positive, unis par certaines caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques, généralement immobiles, asporulées, dépourvues de catalase et de cytochrome oxydase. Elles constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vu taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. Ce

sont des bactéries dépourvues de nitrate réductase, anaérobies ou aérotolérantes, exigeantes en facteurs de croissances (**Schleifer et Ludwig, 1995; Pilet et al., 2005**).

Les LAB ont traditionnellement été associée à des fermentations alimentaires humaine et animale, et sont généralement classées dans les flores technologiques et considérés comme microorganismes bénéfiques (probiotiques). Cependant, certains genres (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*) contiennent également des espèces ou souches qui sont des agents pathogènes humains ou animaux reconnus (**Pilet et al., 2005; Collado et al., 2009**). Une compréhension approfondie de la taxonomie, du métabolisme et de la biologie moléculaire des LAB est donc nécessaire pour utiliser pleinement les aspects technologiques, nutritionnels et sanitaires de ces bactéries tout en évitant les risques potentiels.

I.2. HABITATS

Très ubiquistes, les bactéries lactiques colonisent de nombreux habitats. Toutes fois, il semble que chaque espèce ou groupe d'espèces ait un métabolisme bien adapté à son environnement. Ainsi l'éventail de sucres utilisables par ces bactéries comme source de carbone est en lien avec leurs niches écologiques : lait et produits laitiers, viandes et produits carnés, les muqueuses de l'Homme et des animaux et des oiseaux, la flore normale de la bouche, les intestins, le vagin des mammifères, les produits fermentés issues des végétaux... (**Novel, 1993 ; Axelsson, 2004 ; Pot, 2008; Prescott et al., 2010**).

I.3. CARACTERISTIQUES DES BACTERIES LACTIQUES

Les bactéries lactiques présentent des caractéristiques communes qui expliquent leur regroupement :

- Ce sont des cocci ou des bâtonnets de la famille de Lactobacteriaceae (figure.1.) (**Hammes et Hertel, 2009**), Leuconostocaceae (**Holzappel et al., 2009**), Streptococcaceae (**Whiley et Hardie, 2009**);
- Ce sont des bactéries Gram positif (+), non sporulantes et microaérophiles, nitrate réductase, catalase et oxydase négative, elles ne tolèrent qu'une légère tension en oxygène (**Collado et al., 2009**), et ne sont habituellement pas mobiles (**Prescott et al, 2010**);

- Les bactéries lactiques sont des procaryotes hétérotrophe chimiorganotrophes, métabolisent une série étendue de mono et oligosaccharides, des polyols, des acides variés et certains acides aminés. Ils élaborent une foule de polysaccharides complexes (Pelmont, 1995);
- Les LAB sont des organismes non pathogènes reconnus comme *Generally Recognized as Safe* (GRAS) et elles ont une activité antimicrobienne contre les germes pathogènes et une large application industrielle (Kowalczyk et al., 2012 ; Sharma et al., 2016).

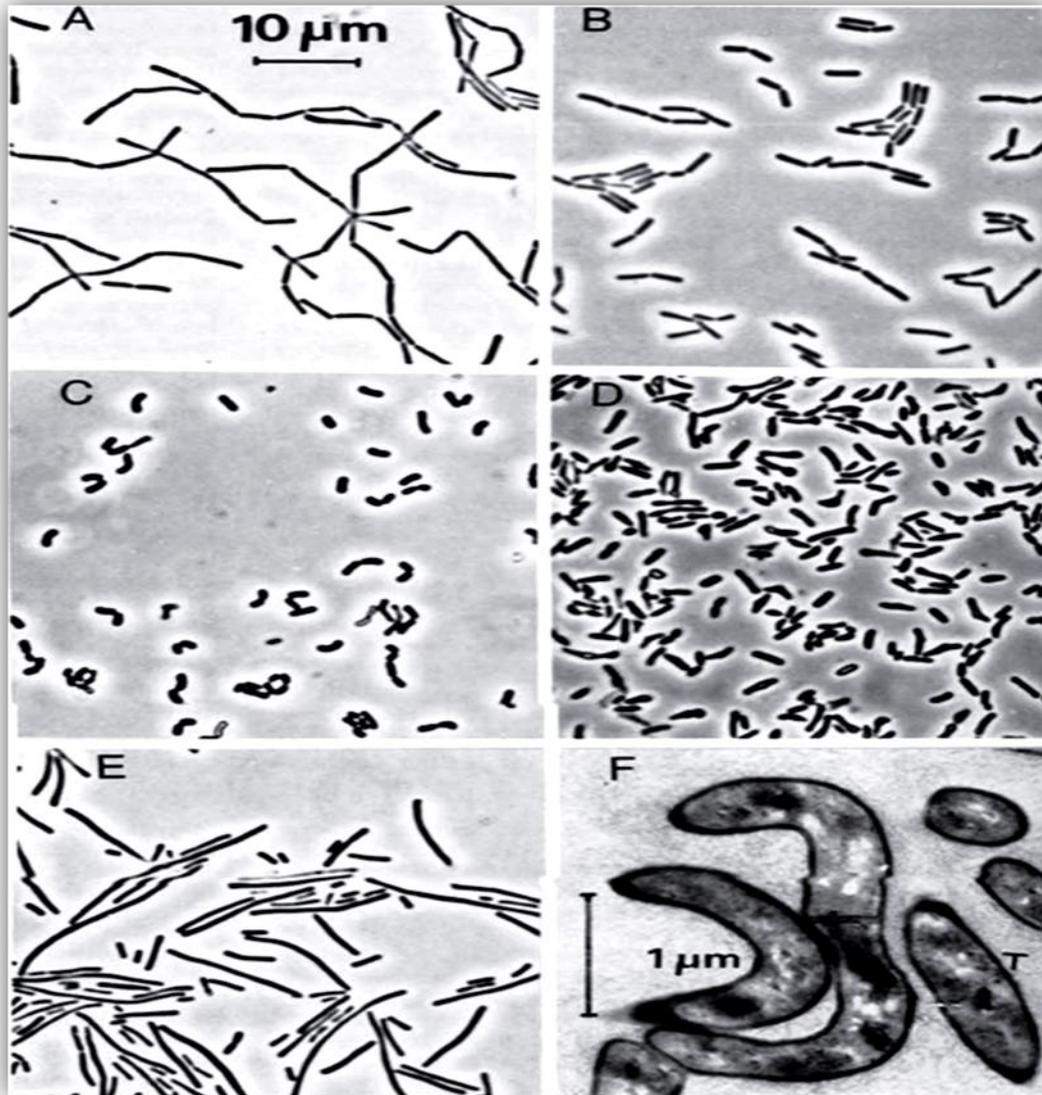


Figure N°01 : Contraste de phase (A-E) et microphotographie électronique (F) montrant différentes morphologie cellulaire de lactobacilles: **A**, *Lactobacillus gasseri*; **B**, *Lactobacillus agilis*; **C**, *Lactobacillus curvartus*; **D**, *Lactobacillus mineur*; **E**, *Lactobacillus fermentum*; et **F**, lactobacilles sous forme d'un grain de kéfir (Hammes et Hertel, 2009).

I.4. GENETIQUE DES BACTERIES LACTIQUES

Plusieurs méthodes basées sur des techniques de biologie moléculaire peuvent être appliquées pour étudier les bactéries lactiques. Ces études peuvent être réalisées à différents

niveaux, depuis l'isolement de clones et leur étude approfondie au laboratoire, jusqu'aux études, plus larges, des populations dans leurs milieux.

I.4.1. Techniques de biologie moléculaire appliquées à l'étude des bactéries lactiques

Les techniques de biologie moléculaire utilisées pour l'étude des bactéries lactiques ne présentent pas d'originalité particulière, et beaucoup d'entre elles sont adaptées à des protocoles d'étude des bactéries à Gram positif comme *Bacillus subtilis* ou des bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli* (Renault, 2008). L'ensemble de ces techniques est récapitulé dans le tableau 1.

Tableau N°01: Exemples de méthodes moléculaires utilisées dans la caractérisation des bactéries au sein des écosystèmes (Renault, 2008)

Méthode	Utilisation	Points forts	Limitations
Isolement des clones	Déterminations des espèces Etudes de spécimens représentatifs	Conservation et étude des souches représentatives des flores	Fort biais de représentativité, absence des bactéries non cultivables, relativement laborieuse
Inventaire des 16S	Détermination des espèces	Caractérisation des espèces dominantes	Non quantitative (biais dus à la PCR et au clonage). Laborieuse pour isoler les espèces minoritaires
DGGE, TGGE, SSCP	Analyse rapide de population	Facilité de mise en œuvre. Semi-quantitative	Biais dus à la PCR, Identification parfois laborieuse
PCR quantitative	Détection et quantification de différentes populations	Sensibilités, fiabilité, quantitative	Cibles prédéterminées, cout élevé, sensibilité moyenne
Puces à ADN	Détection et quantification de différentes populations	Facilité de mise en œuvre à haut débit et pour de nombreuses cibles. Semi-quantitative	Cibles prédéterminées, cout élevé, sensibilité moyenne
RFLP, PFGE	Détection et quantification de différentes populations	Distinction des souches au sein d'une même espèce	Peu approprié à l'étude des niveaux taxonomiques supérieurs à l'espèce. Mise en œuvre laborieuse
FISH	Détection et quantification de différentes populations Visualisation spatial des individus	Possibilité de mise en œuvre à haut débit. Visualisation des hétérogénéités	Cibles prédéterminées et limitées en variété. Requiert un marquage génétique pour différencier les bactéries au sein d'une même espèce.

I.4.2. Séquençage des génomes des bactéries lactiques

L'analyse des chromosomes de souches appartenant à des genres du groupe des LAB a commencé au début des années 1990, et depuis ce temps a progressé à un rythme impressionnant. L'estimation de la taille du génome et des cartes physiques ont été les premiers résultats obtenus (**Morelli et al., 2004**). La première bactérie séquencée a été *L. lactis*. Une première séquence diagnostiquée a été publiée par Bolotin et al. En 1999, et une séquence de haute qualité a été publiée en 2001. Depuis le nombre de génomes séquencés augmentent régulièrement (**Renault, 2008**). Le tableau 2 récapitule les génomes et projet répertoriés par GenBank en 2006.

La première approche pour le calcul de la taille du génome et de la variabilité intraspécifique, avant le séquençage du génome, a été basée sur l'électrophorèse en champ pulsé (ECP). Cette technique est encore largement utilisée et a donné des motifs de macrorestriction de dizaines de souches appartenant à presque toutes les principales espèces des genres de LAB (**Morelli et al., 2004**). Dans certains cas, seule la taille du chromosome a été calculée, mais les cartes physiques ont également été déduites. Des données récentes obtenues par le séquençage du génome ont confirmé l'exactitude des estimations de taille obtenues au moyen d'ECP. *Lactococcus lactis* IL1403, ECP a donné une taille de 2,42 kb tandis que dans le cas de *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323, la taille du génome a été estimée à 1,96 kpb. Les séquences génomiques ont été données pour des tailles de 2,36 et de 1,84 kpb, respectivement pour *Lactococcus lactis* IL1403 et *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323(**Morelli et al., 2004**).

Au cours des dernières décennies, une série de techniques génétiques a été mis au point et utilisé pour comparer et caractériser les propriétés des LAB. Ces dernières années, les méthodes de séquençage, à faible coût et rapide ont entraîné une explosion dans le séquençage génomique des LAB (**Dauglas et al., 2016**). Une analyse menée récemment (Mai 2015) permet de déterminer 3202 séquences (complètes et partielles), contre seulement 128 déterminés, il y a sept ans (tableau 2) (**Dauglas et al., 2016**).

Tableau N°02 : Génome des bactéries lactiques, nombre des séquences complètes et partielles (Dauglas et al., 2016).

Genre	Nombre de séquences	
	Complète	Partielles
<i>Lactobacillus</i>	70	332
<i>Weissella</i>	4	11
<i>Carnobacterim</i>	3	16
<i>Streptococcus</i>	156	1737
<i>Enterococcus</i>	15	691
<i>Lactococcus</i>	17	41
<i>Vagococcus</i>	0	1
<i>Leuconostoc</i>	9	22
<i>Oenococcus</i>	2	59
<i>Pediococcus</i>	3	9
<i>Tetragenococ</i>	1	3

I.5. TAXONOMIE DES BACTERIES LACTIQUES

D'après Pot (2008), la taxinomie polyphasique est basée sur deux techniques phénotypiques (morphologie, physiologie, sérologie..) et génotypiques (hybridation d'ADN, profil plasmidique, analyse de l'ARN 16s..) pour déduire des informations phylogénétique permettant l'amélioration de la qualité de l'identification. Le classement actuel de toutes les LAB est souvent le résultat d'une approche polyphasique accumulée.

Il est largement reconnu que la capacité de production d'acide lactique à partir d'hydrates de carbone est une caractéristique commune d'un ensemble de Bactérie à Gram (+) et n'a aucune signification phylogénétique. D'autre part, les arbres phylogénétiques constituent l'épine dorsale des systématique bactériennes modernes ainsi, taxonomiquement parlant, le groupe des bactéries formant de l'acide lactique est un groupe très hétérogène comporte une vaste gamme de genres et d'espèces distribués dans différentes lignées: la famille Bacillaceae (genre Bacillus, Zhou et al., 2013), La famille Sporolactobacillaceae (genre Sporolactobacillus, Fritze et Claus 1995), la famille Bifidobacteriaceae (genres Aeriscardovia, Alloscardovia, Bifidobacterium, Gardnerella, Metascardovia, Parascardovia et Scardovia, Mattarelli et al. 2014) et l'ordre Lactobacillales, qui sont traditionnellement considéré comme les véritables bactéries lactiques (Felis et al., 2016). Le tableau 3 représente

les différentes familles composant ce groupe phylogénétique qui est constitué d'environ 500 espèces décrites valablement.

Tableau N°03 : familles constituant le groupe phylogénétique des bactéries lactiques (**Felis et al., 2016**)

Famille	Genres
Aerococcaceae	<i>Abiotrophia, Aerococcus, Dolosicoccus, Eremococcus, Facklamia, Globicatella, and Ignavigranum.</i>
Carnobacteriaceae	<i>Alkalibacterium, Allofustis, Alloiococcus, Atopobacter, Atopococcus, Atopostipes, Carnobacterium, Desemzia, Dolosigranulum, Granulicatella, Isobaculum, Lacticigenium, Marinilactibacillus, Pisciglobus, and Trichococcus.</i>
Enterococcaceae	<i>Bavariiococcus, Catellicoccus, Enterococcus, Melissococcus, Pilibacter, Tetragenococcus, and Vagococcus</i>
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus and Pediococcus</i>
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc, Fructobacillus, Oenococcus, Weissella.</i>
Streptococcaceae	<i>Lactococcus, Lactovum, and Streptococcus</i>

D'après **Felis et al., (2016)**, les bactéries lactiques d'intérêt se trouvent dans deux phylums distincts, à savoir les Firmicutes et les Actinobactéries.

Au sein du phylum Firmicutes, les genres les plus importants des LAB sont *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus* et *Weissella*, qui appartiennent tous à l'ordre Lactobacillales (Figure2) (**Giovanna et al., 2016**). Les espèces appartenant au genre *Bifidobacterium* sont classées au sein du phylum des Actinobacteria (**Sun et al., 2014; Sharma et al., 2016**).

Au cours des dernières années, la description continue des espèces nouvelles a profondément modifié la structure phylogénétique de l'ordre, et en particulier, les familles Carnobacteriaceae et Enterococcaceae semblent être paraphylétiques par rapport à d'autres familles de l'ordre (**Felis et al., 2016**).

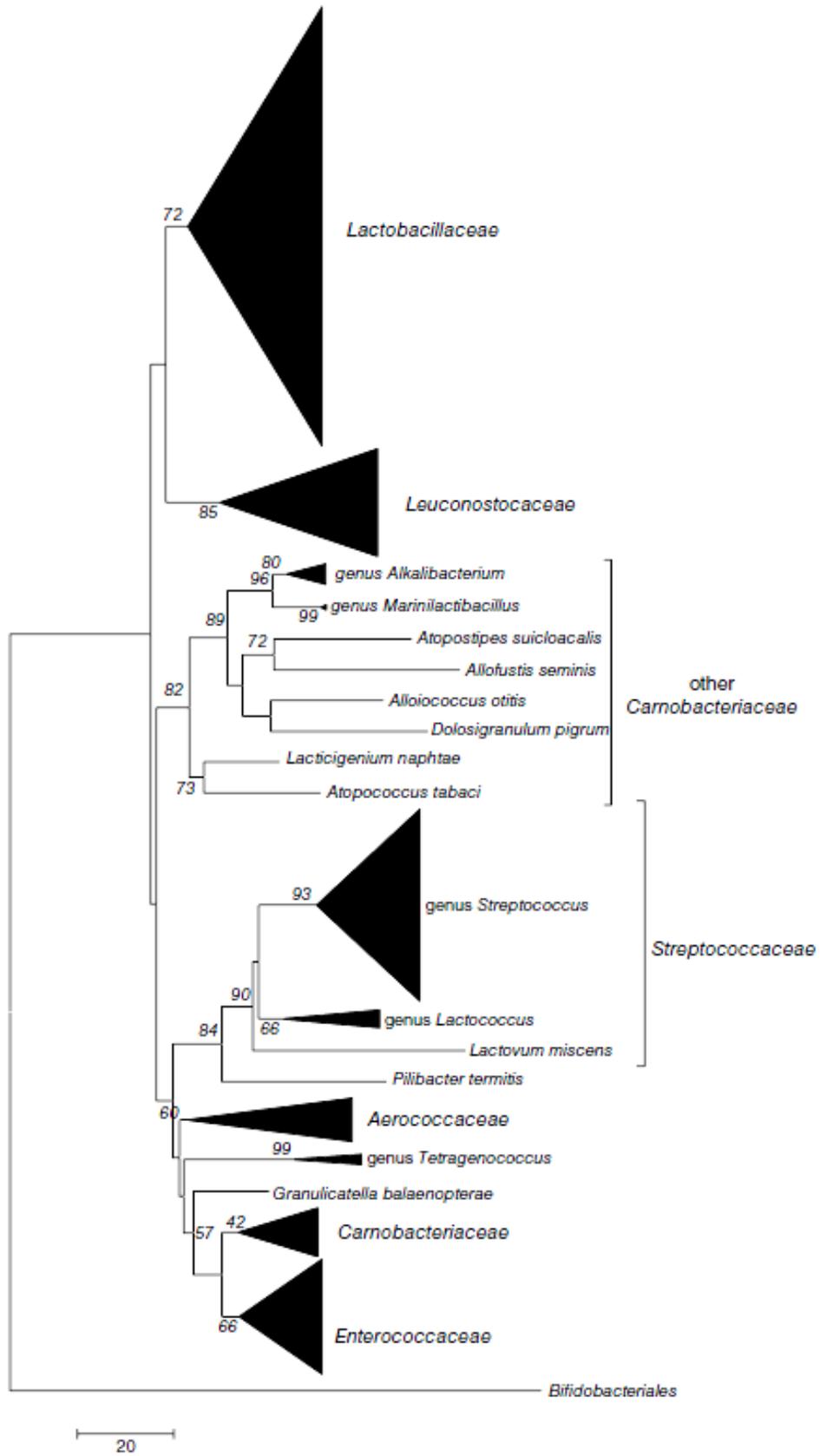


Figure N°02 : Arbre phylogénétique représentant la relation entre les familles de l'ordre Lactobacillales basé sur la séquence du gène ARNr 16S (**Giovanna et al., 2016**).

Les caractéristiques importantes utilisées dans la différenciation des genres des bactéries lactiques sont : Le mode de fermentation de glucose dans les conditions standards, la croissance à certaines températures est employée principalement pour distinguer certaines coques, les exigences vis-à-vis de certains facteurs de croissance (des acides aminés, des vitamines et des précurseurs d'acides nucléiques), la tolérance de sel (NaCl 6,5%), la tolérance des pH bas et l'arrangement des cellules. Sous telles conditions les LAB peuvent être classées en deux catégories: homofermentaire, la conversion du glucose est presque quantitativement en acide lactique et hétérofermentaire, la fermentation du glucose permet de générer l'acide lactique, l'éthanol / acide acétique et le CO₂ (**Girraud, 1998 ; Axelsson, 2004 ; Salminen et al, 2004**).

I.5.1. Genre *Lactobacillus*

I.5.1.1. Caractéristiques générales

Le genre *Lactobacillus* a été décrit par **Beijerinck (1901)**, et l'espèce Type était *Lactobacillus delbrueckii* (**Sun et al., 2014**). Il est un groupe de bactéries micro-aérophiles à Gram positif, bacille réguliers, non sporulé, catalase négative et généralement immobile (**Hammes et Hertel 2009; Sun et al., 2014**). Ces bactéries sont communément trouvées dans des environnements complexes riches en nutriments laitiers, tels que les glucides, les acides aminés, les peptides, les esters d'acides gras, les sels, les dérivés d'acides nucléiques et les vitamines. Elles se trouvent aussi dans les surfaces des muqueuses humaines et animales, ainsi que des niches écologiques naturelles telles que les plantes et le sol (**Hammes et Hertel 2009 ; Barrangouet al., 2012; Sun et al., 2014**). Les espèces de *Lactobacillus* utilisent généralement du glucose par fermentation via la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ou de la glycolyse et peuvent être homofermentaires, produisant plus de 85% d'acide lactique à partir du glucose ou hétérofermentaires, produisant de l'acide lactique, le CO₂, l'éthanol et / ou l'acide acétique en quantités équimolaires (**Sun et al., 2014**).

I.5.1.2. Position et arbre phylogénétique

Le genre *Lactobacillus* appartient au phylum Firmicutes, la classe bacilles, et l'ordre Lactobacillales. La multiplicité des niches écologiques de lactobacilles se reflète dans la diversité et la phylogénie de ce genre hétérogène qui comprend plus d'une centaine de différentes espèces, beaucoup d'entre elles sont caractérisées et considérées, biologiquement,

technologiquement et commercialement, comme souches pertinentes telle que *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* et *L. salivarius* (**Barrangou et al., 2012**).

D'après **Sun et al (2014)**, le genre *Lactobacillus* est le plus grand groupe et le plus diversifié parmi les LAB, et comprend actuellement 158 espèces validées, sept d'entre elle sont constituées de 18 sous-espèces au total.

Il est également très hétérogène, englobant des espèces avec une grande variété phénotypique, biochimiques et physiologique. L'hétérogénéité se traduit par une large gamme de pourcentage GC de l'ADN des espèces incluses dans le genre. Cette gamme est de 32-55%, le double de l'intervalle généralement acceptée pour un seul genre (**Axelsson, 2004 ; Pot, 2008**).

Le genre *Lactobacillus* se caractérise aussi par une forte dichotomie génétique entre ses différentes espèces. L'arbre phylogénétique du genre *Lactobacillus* est complexe et est divisé par d'autres genres tels que *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* qui font tous partie de l'ordre Lactobacillales (**Sun et al., 2014**) (figure3). Les progrès dans le séquençage complet du génome ont entraîné des changements dans la taxonomie du genre *Lactobacillus* ; ces dernières années, de nombreuses espèces autrefois classées comme lactobacilles ont été reclassés et maintenant appartiennent à d'autres genres, y compris *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* (**Barrangou et al., 2012**). L'espèce type de ce genre est *Lactobacillus delbrueckii*. Beijerinck 1901, 229 (*Bacillus delbrücki*) (**Hammes et Hertel, 2009**).

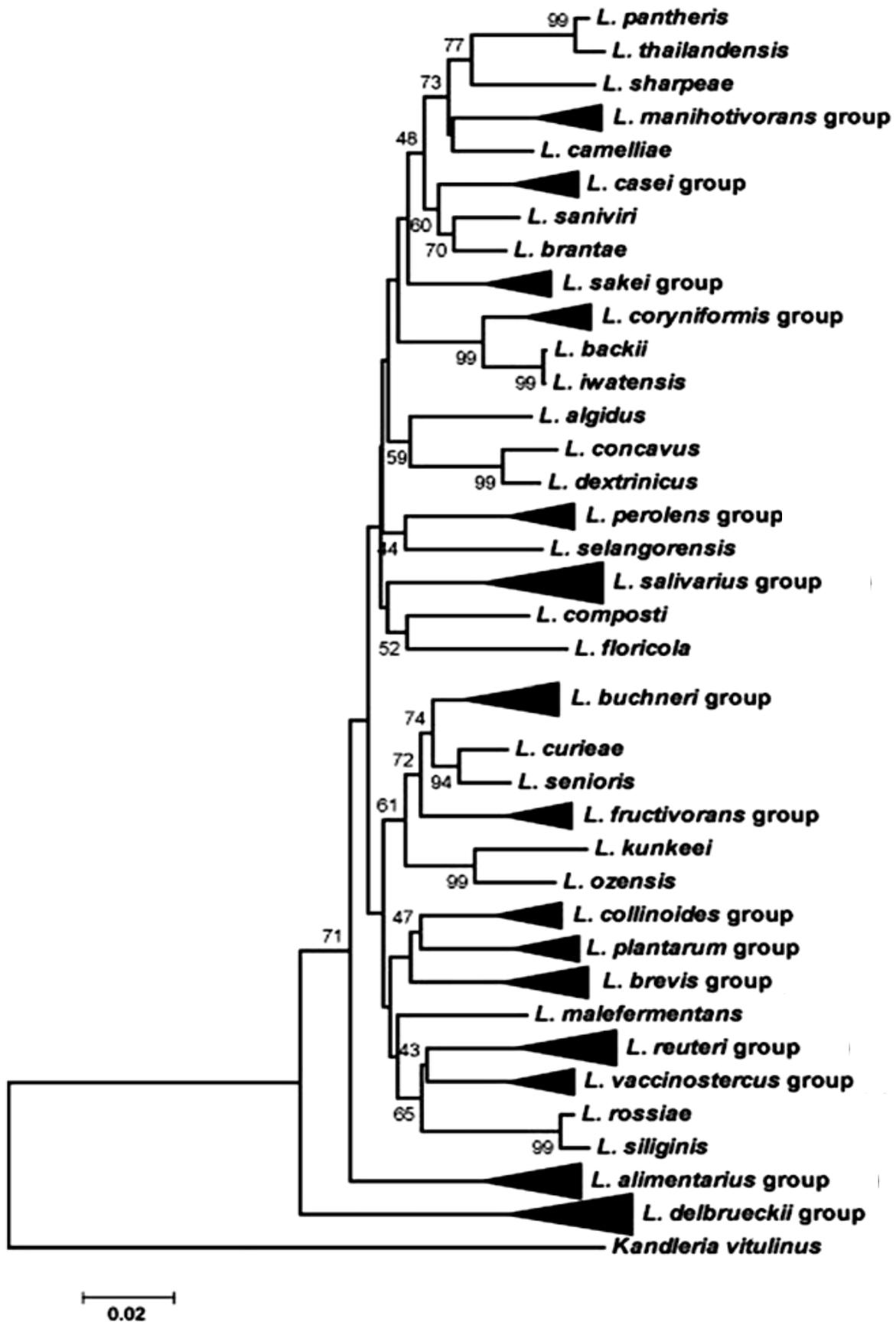


Figure N°03 : Arbre phylogénétique représentant les relations entre les espèces de *Lactobacillus* basées sur la séquence du gène ARNr 16S (Sun et al., 2014).

I.5.1.3. Grands groupes du genre *Lactobacillus*

Les espèces du genre *Lactobacillus* ont été regroupées en fonction de leur température de croissance et la capacité de fermenter les hexoses, et par la suite en fonction de leur profil homo / heterofermentatif (Carr et al. 2002). Ces subdivisions ont été révisées par Pot et al., (1994), mais la définition acceptée «moderne» est celle donnée par Hammes et Vogel (Hammes et Vogel, 1995), qui divise le genre en espèces homofermentaires obligatoires, espèces heterofermentaires facultatives et espèces heterofermentaires obligatoires, sur la base des types de sucres fermentés et le processus de fermentation utilisé.

Les espèces homofermentaires obligatoire (OHO) fermentent les hexoses presque exclusivement en acide lactique (85%) par la voie EMP de la glycolyse; les pentoses et le gluconate ne sont pas fermentés par ce groupe d'espèces. Les espèces hétérofermentaires facultatives (FHE) fermentent les hexoses en acide lactique par l'intermédiaire de la voie d'EMP, mais sous limitation de glucose, sont également capables de dégrader les pentoses et l'acide gluconique par une phosphocétolase inductible, une enzyme de la voie des pentoses phosphates (PP), ce qui entraîne la production d'acide acétique, l'éthanol et l'acide formique.

Enfin, les espèces hétérofermentaires obligatoire (OHE) qui possèdent une aldolase FDB, et n'ont pas une phosphocétolase, elles métabolisent les pentoses et les hexoses exclusivement par la voie de phosphogluconate et produisent de l'acide lactique, l'éthanol (ou acide acétique) et de CO₂ (Axelsson, 2004 ; Sun et al., 2014). Le tableau 4 illustre les caractéristiques de ces trois groupes d'espèces.

I.5.1.4. *Lactobacillus delbrueckii*

Le groupe *Lactobacillus delbrueckii* comprend 33 espèces et sous-espèces; *L. acetotolerans*, *L. acidophilus*, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp. delbrueckii*, *L. delbrueckii subsp. indicus*, *L. delbrueckii subsp. jakobsenii*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. delbrueckii subsp. sunkii*, *L. equicursoris*, *L. fornicalis*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. gigeriorum*, *L. hamster*, *L. helveticus*, *L. hominis*, *L. iners*, *L. intestinalis*, *L. jensenii*, *L. johnsonii*, *L. kalixensis*, *L. kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens subsp. kefirgranum*, *L. kitasatonis*, *L. pasteurii*, *L. psittaci*, *L. taiwanensis* and *L. ultunensis*. Taxonomiquement ceci est le groupe phylogénétique le plus important en raison de la

présence de *L. delbrueckii*, l'espèce type du genre, dont le nom *Lactobacillus* est lié en permanence à elle. Il contient principalement les espèces OHOs (27 sur 33), mais aussi quelques espèces FHEs (Sun et al., 2014).

La teneur en GC est comprise entre 33 et 51% en mole d'ADN, ce qui peut être expliqué par des changements dans les usages de codons en raison de la dégénérescence du code génétique (Hammes et Hertel 2009; Schleifer et Ludwig 1995). La majorité des espèces se caractérisent par une couche peptidoglycane de type Lys-D-Asp. Ce groupe est très hétérogène en termes de source d'isolement (Sun et al., 2014).

Tableau N°04 : Caractéristiques des trois groupes d'espèces du genre *Lactobacillus* (Axelsson, 2004).

Caractéristique	Groupe I : Homofermentaire obligatoires	Groupe II : Hétérofermentaire facultatif	Groupe III : Hétérofermentaire obligatoire
	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i>
fermentation de pentose	-	+	-
CO₂ à partir de glucose	-	-	+
CO₂ à partir de gluconate	-	+ ^a	+ ^a
Aldolase	+	+	-
Phosphoketolase	-	+	+
a : après sa fermentation			

I.1.5.2. Genre *Streptococcus*

I.5.2.1. Historique et caractéristiques générales

Le terme "Streptococcus" dérivé des noms grecs, streptos : facilement tordu comme une chaîne et Kokkos : grain ou semence. Ce terme a été utilisé pour la première fois en 1874 par Billroth pour décrire les bactéries cocci en forme de chaîne, la bactérie est couramment détectée dans les plaies et les rejets provenant des corps d'animaux et dans environ la moitié des cas de érysipèle (**Tagg et al., 2012**). Plus tard, Pasteur a présenté à l'académie française de médecine le 11 Mars 1879, un compte rendu de ses observations microscopiques de streptocoques isolés de l'utérus et le sang des femmes atteintes d'infection puerpérale et a proposé une association étiologique. Cependant, il était Rosenbach en 1884 qui a donné le nom générique Streptococcus pour décrire la cochenille en chaîne isolé à partir de lésions purulentes chez l'homme. Il a nommé cette bactérie « *Streptococcus pyogenes* ».

Des années plus tard, l'importance de certaines espèces de cette bactérie a été solidement établi (**Tagg et al., 2012**).

La famille Streptococcaceae appartient au phylum Firmicutes, classe bacilles et l'ordre Lactobacillales. Elle comprend trois genres sur la base du séquençage du gène ARNr 16S, à savoir *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum* selon la dernière addition du Manuel de Bergey de bactériologie systématique, et elle est la plus étroitement liée à la famille enterococcaceae (**Ludwig et al., 2009**). Le genre type est représenté par les streptocoques (genre type : **Streptococcus** Rosenbach 1884, 22) qui comprend actuellement 100 espèces, tandis que le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, le genre lactovum comprend une seule espèce(**Whiley et Hardie, 2009; Toit et al., 2014**).

Le genre *Streptococcus* est constitué de bactéries à Gram-positif, immobiles, sphériques ou ovoïdes de diamètre de 2µm, généralement disposées en paires ou en chaînettes, lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux liquides, Elles métabolisent les glucides par fermentation résultant principalement l'acide lactique sans gaz. Ce sont des aérobies facultatifs et chemo-organotrophe avec un métabolisme fermentatif. Une quantité faible de CO₂ est recommandée pour la croissance de certaines espèces. Leurs optima de température sont généralement autour de 37°C, les températures maximales et minimales varient quelque peu entre les espèces. Le pourcentage GC est compris entre 33-46%. Le peptidoglycane est de

groupe A avec la L-lysine comme acide aminé en position 3 de la sous-unité peptidique (Wiley et Hardie, 2009; Sun et al., 2014 ; Toit et al., 2014).

I.5.2.2. Arbre et position phylogénétique

Le genre *Streptococcus* est un membre de la famille Streptococcaceae. Sur la base de l'analyse des gènes de la séquence de l'ARN 16s, ce genre appartient à la branche «clostridium/ bacillus) du groupe Eubactérie à Gram positif avec un contenu GC de 33-46%. Suite à une révision taxonomique approfondie et la découverte de nouvelles espèces, le genre se compose actuellement de plus de 100 espèces et sous-espèces (Wiley et Hardie, 2009).

I.6. METABOLISME DES BACTERIES LACTIQUES

Les bactéries lactiques sont un groupe de microorganismes hétérotrophes exigeants de point de vue nutritionnelle, tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. La nature de ces substrats n'est pas très variée ; il s'agit principalement de sucres qu'elles trouvent dans leurs environnements animal, végétal, humain qui sont riches en substrats fermentescibles (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2006 ; Monnet et al., 2008). Aussi elles ne peuvent croître facilement que dans des milieux riches en vitamines, acides aminés et bases nucléotidiques (Leveau et Bouix, 1993 ; Endo et Dicks, 2014).

I.6.1. Métabolisme des sucres

Les sucres sont la source de carbone et d'énergie primaire pour les LAB qui sont cultivées pour la fermentation et la production d'aliments, ainsi que dans les milieux de laboratoire. De nombreux systèmes de transport différents sont impliqués dans l'absorption des glucides par les LAB, y compris les systèmes de phosphotransférase (PTS), et les transporteurs glycoside pentoside-hexuronide. Pour *Lactococcus lactis*, le glucose est importé soit par un mannose ou cellobiose PTS ou un ou plusieurs perméase (s) non-PTS. Les LAB préfèrent le glucose, mais peuvent aussi métaboliser plusieurs d'autres hexoses; Cependant, l'aptitude à fermenter des sucres autres dépend de la souche. Les LAB d'intérêt alimentaire peuvent utiliser le sucre le plus abondant de lait, le lactose, en tant que source de carbone, alors que les bactéries associées aux plantes utilisent une grande variété d'hydrates de carbone, y compris les β -glucosides (Kowalczyk et al., 2016).

I.6.2. Voie métaboliques centrales

Les bactéries lactiques ne sont capables de cataboliser qu'un nombre réduit de sources carbonées, et via des voies métaboliques linéaires relativement simples. Suivant les genres ou espèces, elles utilisent l'une de trois voies du métabolisme des sucres : la voie homofermentaire, la voie hétérofermentaire et la voie de métabolisme des acide mixte (Monnet *et al.*, 2008).

Les monosaccharides incorporés par la cellule ou libéré dans le cytoplasme par l'hydrolyse des disaccharides entrent la voie de la glycolyse au niveau de glucose-6P (G6P) ou sont traités par la voie de Leloir (figure4) (Kowalczyk *et al.*, 2016).

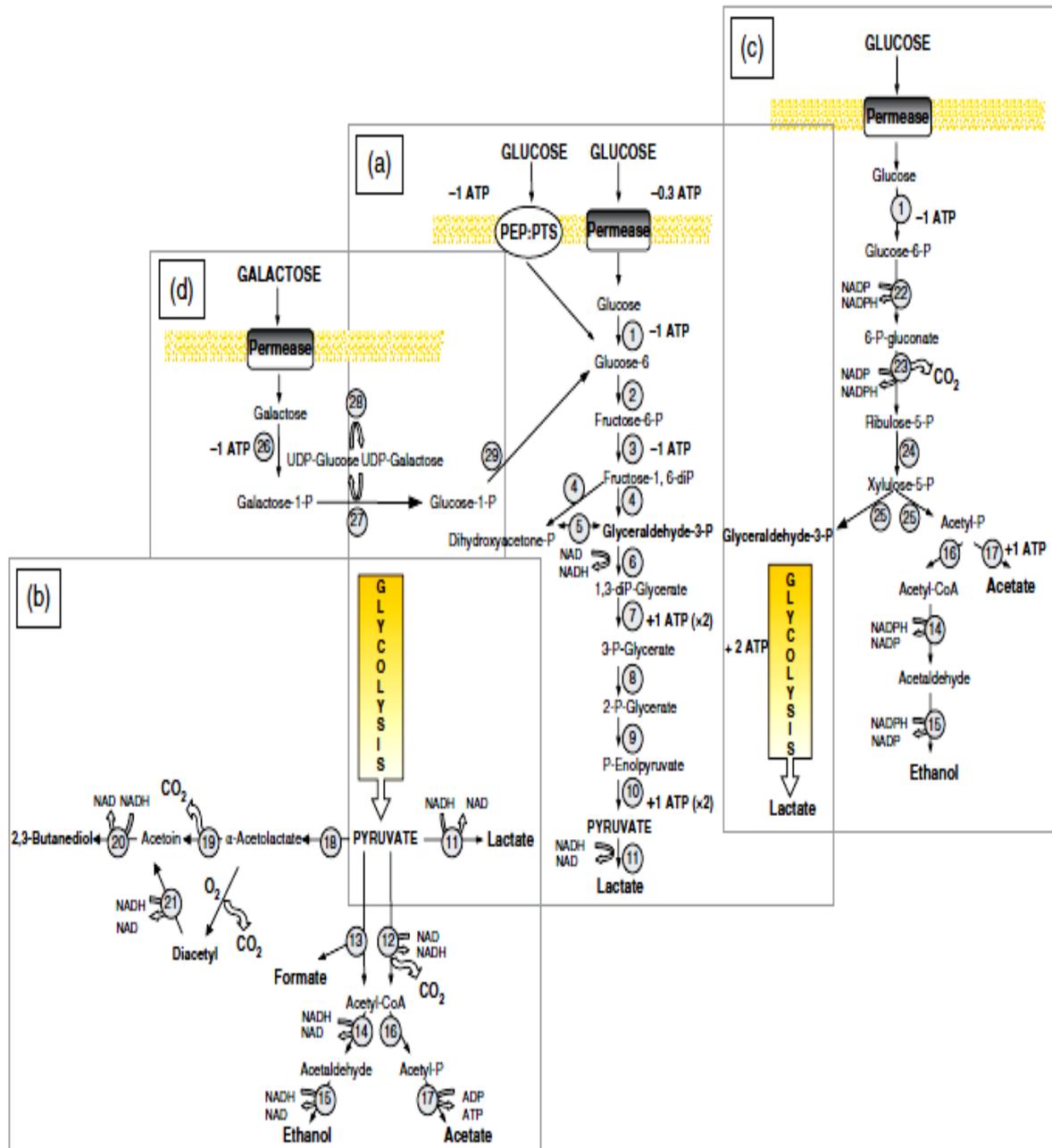


Figure N°04: Voies du métabolisme du glucose. (a) la voie homofermentaire. (b) métabolisme des acides mixtes. (c) la voie heterofermentaire. (d) la voie de Leloir. Les réactions sont catalysées par les enzymes suivantes: 1, la glucokinase (GLK); 2, le glucose-phosphate isomérase (GPI); 3, la phosphofruktokinase (PFK); 4, fructo-biphosphatealdolase (FBPA); 5, triose-phosphate isomérase (TPI); 6, la glycéraldéhyde-phosphate-déshydrogénase (GAPDH); 7, la phosphoglycérate kinase (PGK); 8, phosphoglycérate mutase (PMG); 9, énoïase (ENO); 10, la pyruvate kinase (PK); 11, la lactate déshydrogénase (LDH); 12, la pyruvate déshydrogénase (PDH); 13, formate lyase pyruvate (PFL); 14, acétaldéhyde déshydrogénase (ACDH); 15, l'alcool déshydrogénase (ADHE); 16, phosphotransacétylase (PTA); 17, l'acétate kinase (ACK); 18, α acétolactate synthase (ALS); 19, α -acétolactate décarboxylase (ALD); 20, le 2,3-butanediol déshydrogénase (BDH); 21, diacétyle réductase (DR); 22, la glucose-6-P déshydrogénase (G6PDH); 23, 6-P-gluconate déshydrogénase (6PGDH); 24, ribulose- 5-P-3-épipimérase (RPPE); 25, D-xylulose-5P phosphocétolase (XPK); 26, galactokinase (GK); 27, galactose-1-P-uridylyl-transférase (GPUDLT); 28, UDP galactose-1-épipimérase (UDPE); 29, phosphoglucomutase (PGM) (Kowalczyk et al., 2016).

La fermentation du sucre conduit à la formation d'acide lactique seul ou en combinaison avec d'autres acides organiques et de l'éthanol. Les variations dans les produits métaboliques des LAB ont donné trois catégories de fermentation: homofermentation, métabolisme d'acide mixte et heterofermentation (**Kowalczyk et al., 2016**).

I.6.4. Production des polysaccharides

Les microorganismes ont la propriété de synthétiser des polysaccharides ou polyosides, ces composés constituent jusqu'à 60% du poids sec du corps cellulaires. Les bactéries lactiques produisent ces polysaccharides en tant que composants de la paroi cellulaire et des polymères de stockage, ainsi que dans de nombreuses espèces, en tant que capsule ou du mucus. Dans l'industrie laitière, ces bactéries sont traditionnellement utilisées dans la fabrication de produits laitiers fermentés. Il a été généralement reconnu que les exopolysaccharides (EPS) sécrétés par les LAB jouent un rôle important dans le comportement rhéologique et la texture des produits (**De Vuyst and Degeest 1999 ; Torino et al., 2000 ; London et al., 2016**).

Le terme "exopolysaccharide" (EPS) ou "polysaccharide exocellulaire" 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 (figure 5). En milieu liquide, les cultures productrices d'exopolysaccharide peuvent devenir très visqueuse ou, exceptionnellement, peuvent se solidifier sous forme de gel (**Sutherland, 2003**).



Figure N°05 : Aspect colonial exotique de deux cultures bactériennes productrices d'EPS (**Sutherland, 2003**).

De par leurs propriétés stabilisantes, gélifiantes et épaississantes, ces exopolysaccharides de haut poids moléculaire ($0.5-5.0 \times 10^5$ Daltons) présentent un intérêt particulier lors de l'élaboration et la formulation des aliments en tant qu'agent texturant, émulsifiant, gélifiant et/ou stabilisant. Ils font partie de la classe des fibres alimentaire et peuvent servir des substituts aux gras dans la préparation de certains aliments à faible teneur en calories ; et ils peuvent être employés selon le produit visé et l'effet recherché. Ils sont des chaînes droites ou des chaînes ramifiées de résidus monosaccharides liés de façon glycosidique (**Ruas-Madiedo et al., 2002 ; Bremer et al., 2015 ; London et al., 2016**).

De nombreux polysaccharides d'origine microbienne sont des polymères linéaires formés d'une même sous unité répétée tout au long de la chaîne comme les levanes « polyfructose » et les dextrane « polyglucose ». Ainsi, les exopolysaccharides produits par les LAB sont des exopolysaccharides constitués de résidus monosaccharides liés par des liaisons glycosidiques α et β (**Nakajima et al., 1990 ; Monnet et al., 2008**)

I.6.4.1. Types des ESP produits par les LAB

Les longues chaînes de résidus saccharidiques constituant les EPS des bactéries lactiques présentent des masses moléculaires moyennes allant de 1×10^4 à 6×10^6 Dalton et peuvent être classés selon deux grands types en fonction de leur composition chimique : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides (**Pham et al., 2000 ; Monnet et al., 2008 ; London et al., 2016**).

- Homopolysaccharides

Les homopolysaccharides (HoPS : α -D-glucan, β -D-glucan, fructan, et les polygalactan) sont des longues chaînes saccharidiques composées d'un type de saccharide, le glucose, le fructose ou le galactose. Selon les liaisons glycosidiques présente, ces EPS ont été classés en différentes familles (Tableau5) (**Monnet et al., 2008 ; Kowalczyk et al., 2016**).

Tableau N°05 : Homopolysaccharides produits par les bactéries lactiques (**Monnet et al., 2008**)

Homopolysaccharides		Structure du polymère *	Espèces bactériennes	Références
α -D-glucanes	Dextrane Mutane Alternane	α -D-Glcp (1-6) α -D-Glcp (1-3) α -D-Glcp(1-3)/(1-6)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus</i> spp. G-77 <i>Lactobacillus reuteri</i>	(Duenas-Chasco et al., 1998 ; Monchois et al., 1997 ; van Geel-Schutten et al., 1999)
β -D-glucanes		β -D-Glcp (1-3)	<i>Pediococcus</i> <i>Lactobacillus</i> spp. G-77	(Duenas-Chasco et al., 1998 ; Liauberes et al., 1990)
Fructanes	Levane Inuline- « like »	β -D-Frup (2-6) β -D-Frup (1-3)	<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	(Korakli et al., 2002 ; van Geel-Schutten et al., 1999)
Polygalactane		α -D-Galp/ β -D-Galp**	<i>Lactobacillus lactis</i>	(Gruter et al., 1992)
* liaisons glycosidiques majoritaires (au moins 50%) ; ** les sous unités sont des pentamères de galactose.				

La synthèse des homopolysaccharides de type fructane ou glucane est réalisée à la surface cellulaire des bactéries lactiques par des trans-glycosylase (**glycane sucrase**) qui utilisent l'énergie de la liaison osidique du saccharose pour effectuer la polymérisation (figure 6) (**Monsan et al., 2001**). Les polygalactane sont synthétisé au sein du cytoplasme avant exportation, leur synthèse nécessite la participation d'un transporteur lipidique (**Monnet et al., 2008**).

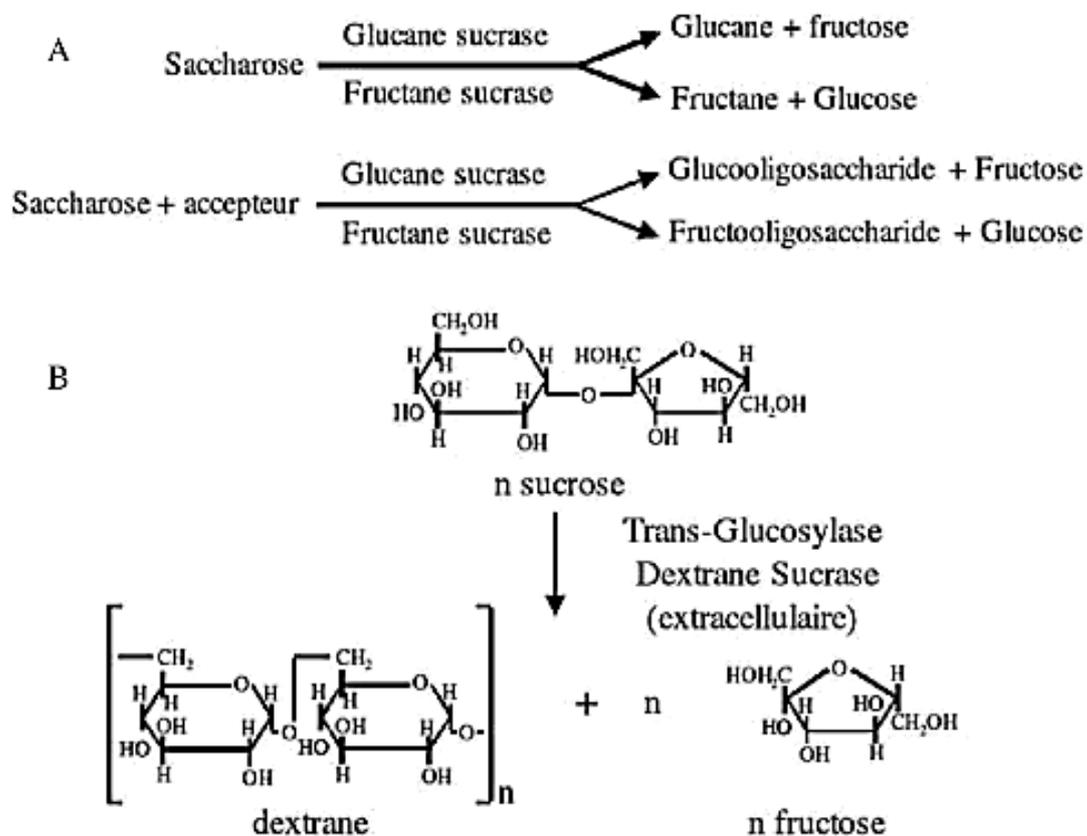


Figure N°06 : Biosynthèse des homopolysaccharides par les trans-glycosylase chez les bactéries lactiques (Monsan et al., 2001).

- *Hétéropolysaccharides*

La plupart des bactéries lactiques peuvent produire des hétéropolysaccharides (HePS), qui sont composés d'unités répétitives. Les sous unités répétées de ces EPS sont principalement constituées de: D-galactose et du D-glucose, ainsi que de petites quantités de L-rhamnose. Moins fréquemment, du N-acétyl glucosamine, du N-acétyl galactosamine, de l'acide glucuronique et du phosphate, et encore plus rarement, du D-fructose, du glycérol ou des groupements acétyles sont retrouvés dans ces structures (figure 7,8) (De Vuyst et al., 1999 ; De Vuyst et al., 2001). Les HePS sont synthétisés extracellulairement par des enzymes de glycosyltransférase très spécifiques, comme les glucan- ou fructanes-sucrases. Cette synthèse exige spécifiquement le saccharose comme substrat et l'énergie générée par l'hydrolyse (Kowalczyk et al., 2016).

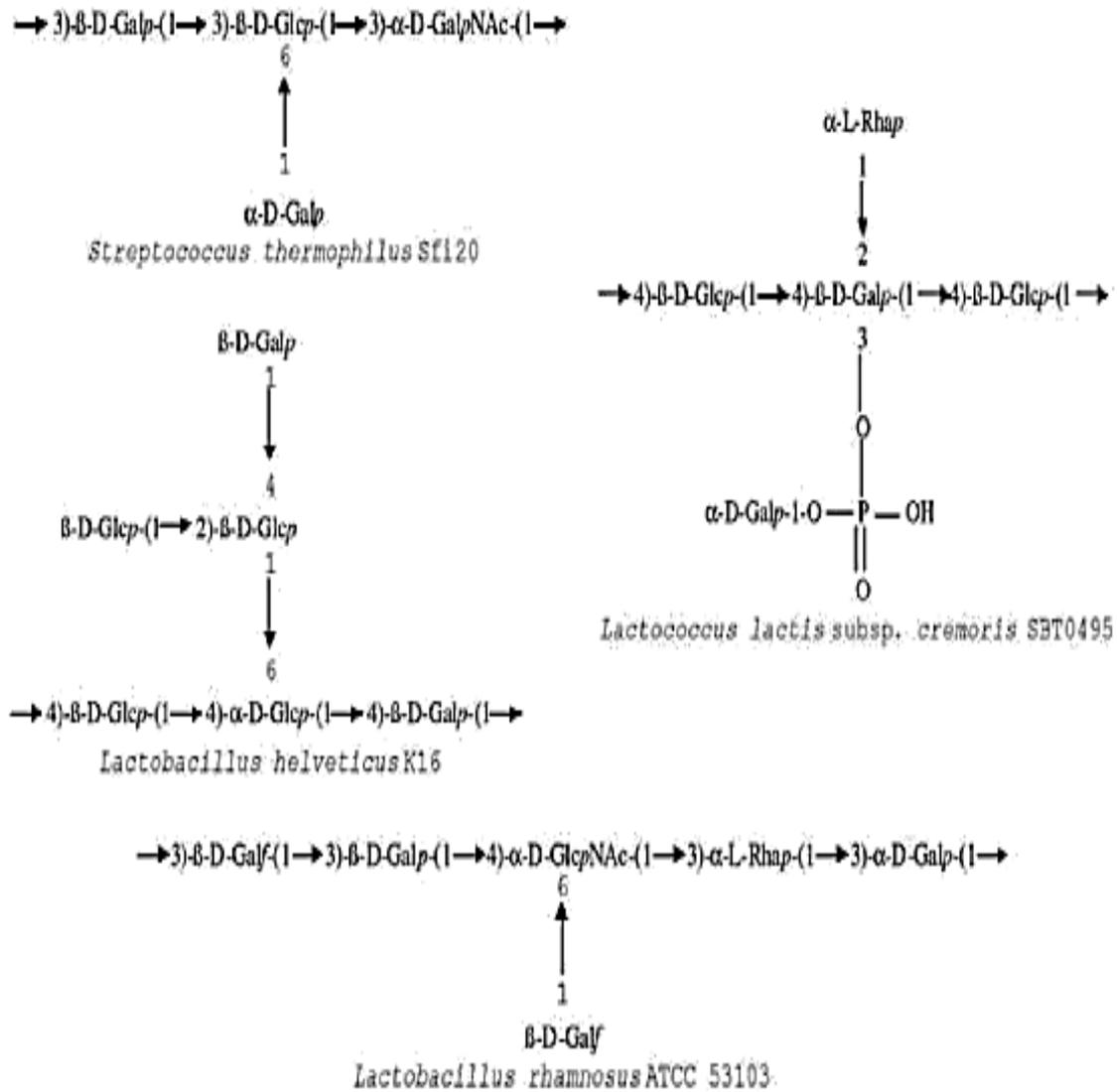


Figure N°07 : Exemples de structure biochimiques d'EPS de type hétéropolysaccharides identifiés chez les bactéries lactiques. D, L : configuration D et L des saccharides ; *p.f* : structures pyranose et furanose des sccharides ; α,β : type de liaison osidique (Kowalczyk et al., 2016) .

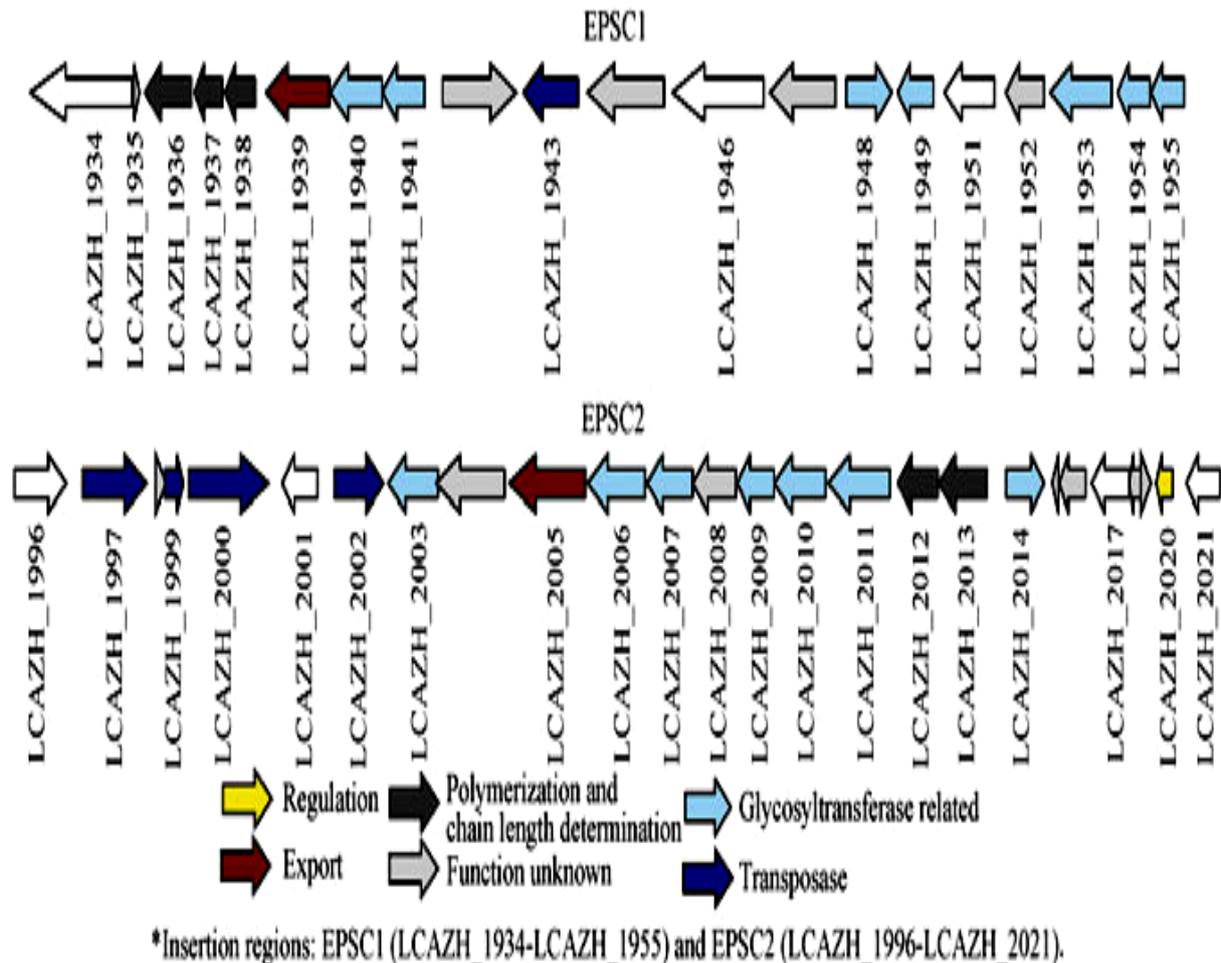


Figure N°08 : Exemples de structure génétique d’EPS de type hétéropolysaccharides identifiés chez les bactéries lactiques (Kowalczyk et al., 2016).

A la différence de celle des homopolysaccharides, la synthèse des hétéropolysaccharides s’effectue en plusieurs étapes. En effet, la biosynthèse des sous unités oligosaccharides est faite au sein du cytoplasme par l’addition successive de saccharides à partir de sucres précurseurs. Le premier saccharide étant lié à un transporteur lipidique puis les saccharides suivant étant ajoutés à cette unité lipide saccharides (figure 9). L’EPS est généré par polymérisation comme étape finale de sa formation. Les sucres précurseurs impliqués dans la production des hétéropolysaccharides sont : UDP-glucose, UDP-galactose, dTDP-rhamnose, GDP-manose, UDP-N-acétyl glucosamine, UDP-N-acétyl galactosamine (Monnet et al., 2008).

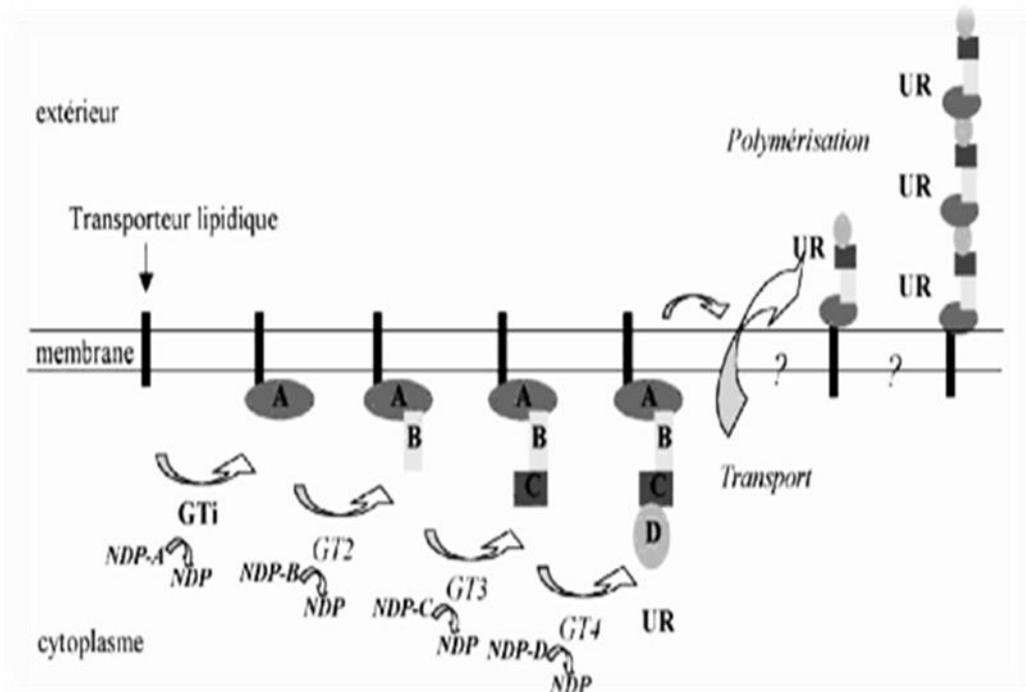


Figure N°09 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des hétéropolysaccharides chez les bactéries lactiques (Monnet *et al.*, 2008).

La capacité de lactobacilles à produire des EPS a été reconnue depuis de nombreuses années. Van caesten *et al.*, (2002) ont rapporté la structure d'un hétéropolysaccharide produit par un *L. brevis* isolée de grains de kéfir. Ce polysaccharide est constitué des unités répétitives hexasaccharidique de D-galactose et le D-glucose dans un rapport molaire 1: 1. Dans la dernière décennie, un certain nombre d'hétéropolysaccharides produits par les espèces de *Lactobacillus* ont été étudiés.

Les EPS produits par *Lb. helveticus* 776 est une répétition d'unités d'hexasaccharide contenant des motifs de D-galactose et D-glucose (Jolly *et al.*, 2001). Grobber *et al.*, (1997) ont montré que *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 a produit un EPS constitué de galactose et de petites quantités de glucose et rhamnose.

Les souches de *S. thermophilus* CNMI 733, CNMI 734 n CNMI 735 ont produit un EPS qui est composé de tétrasaccharide de D-galactose, le D-glucose, et de la N-acétyl-D-galactosamine avec un rapport molaire de : 2/1/1 (Jolly *et al.*, 2001).

Faber et al., (1998) ont montré que *S. thermophilus* Rs et Sts ont produits des EPS de motifs répétitifs identiques, mais ils avaient des masses moléculaires différentes, résultant en une différence de viscosité dans leurs environnements. **Jolly et al. (2001)** ont également montré que les EPS produits par *S. thermophilus* OU 901 avaient un motif similaire à celui des souches Rs et Sts; elles produisent un polysaccharide ramifié d'unités répétitives de D-galactose et L-rhamnose avec le même rapport molaire 5: 2.

En comparaison avec les homopolysaccharides, la production des hétéropolysaccharides par les bactéries lactiques est beaucoup plus faible (60 à 400 mg L⁻¹).

Le tableau 6 représente les espèces de bactéries lactiques productrices d'homo et d'hétéropolysaccharides.

Tableau N°06 : Espèces de LAB productrices d'homopolysaccharides et d'hétéropolysaccharides (Ruas-Madiedo et al., 2009)

EPS	Genre	Espèce
HoPSs		
α-glucan	<i>Lactococcus</i>	<i>L. Lactis</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. Reuteri, Lb. sakei, Lb. fermentatum, Lb. plantarum</i>
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leu. mesenteroides subsp. dextransicum, Leu. citreum</i>
	<i>Weissella</i>	<i>W. cibaria</i>
β-glucan	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. diolivorans</i>
	<i>Oenococcus</i>	<i>O. oeni</i>
	<i>Pediococcus</i>	<i>P. parvulus, P. damnosus</i>
Fructan	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. acidophilus, Lb. panis, Lb. plantarum, Lb. reuteri, Lb. sanfranciscensis</i>
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leu. mesenteroides</i>
Polyglycan	<i>Lactococcus</i>	<i>L. Lactis subsp. Lactis</i>
HePSs		
	<i>Lactococcus</i>	<i>L. Lactis subsp. Cremoris</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. acidophilus, Lb. delebruekii subsp. Bulgaricus, Lb. curvatus, Lb. helveticus, Lb. paracasei, Lb. rhamnosus, Lb. sakei, Lb. sanfranciscensis.</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. macedonius, S. thermophilus.</i>
	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. lactis, B. longum.</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>Pr. Acidipropionic, Pr. Freudenreichii subsp. Shermanii</i>

I.6.4.2. Nature des ESP produits par les LAB

Dans la nature, les EPS bactériens sont censés remplis des fonctions diverses qui peuvent inclure la protection des cellules contre les substances toxiques, les excellentes propriétés de rétention d'eau de ces biomolécules peuvent protéger les bactéries dans des environnements à faible humidité. Les EPS semblent aussi avoir un rôle important dans l'adhésion aux surfaces et dans la formation des biofilms chez diverses espèces bactériennes facilitant ainsi la colonisation de nombreux écosystèmes (figure10) (Monnet *et al.*, 2008 ; Ruas-Madiedo *et al.*, 2009 ; Bremer *et al.*, 2015).

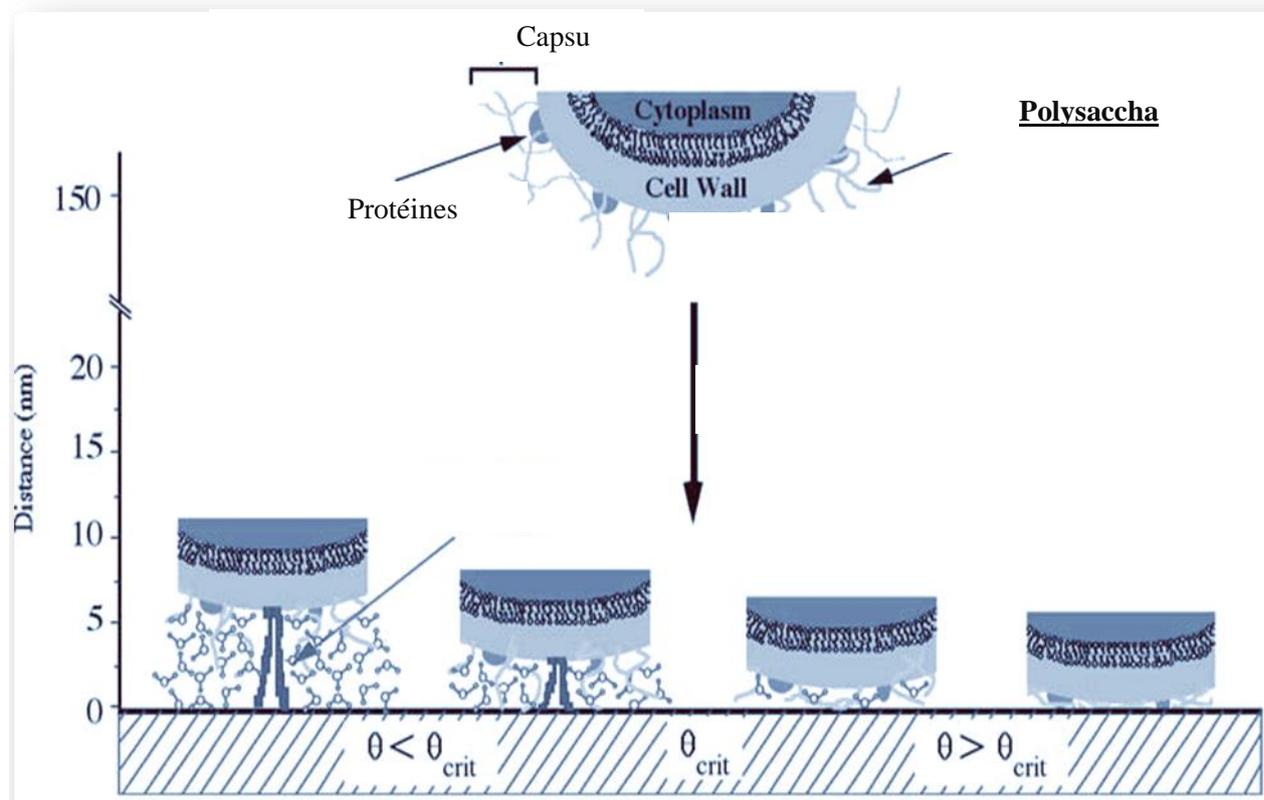


Figure N°10: Implications des polysaccharides dans l'adhésion aux surfaces dans un milieu aqueux (Vacheethasane *et al.*, 2000).

I.6.4.2. Activité biologiques des exopolysaccharides

De point de vue technologique, les exopolysaccharides peuvent agir comme viscosifiants, stabilisants, gélifiants et /ou agents de rétention d'eau (Mozzi *et al.*, 1996), adsorbants sélectifs, et additifs rhéologiques dans les aliments, les médicaments, et les produits industriels. Les EPS produits par les levains tels que *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*

sont largement utilisés dans la fabrication du yaourt, en particulier dans les pays où l'addition des additifs n'est pas autorisée (Cerning ,1994). Ainsi, la production d'exopolysaccharides par les bactéries lactiques, lors de leur développement dans le lait, évite d'augmenter le taux protéique du produit ou d'avoir recours à l'ajout d'additifs, tel que des texturants et des épaississants, lors de la production du yaourt. La présence d'exopolysaccharides a pour effet de réduire la synérèse lors du stockage au froid des produits laitiers fermentés. Le rôle principal des exopolysaccharides est d'améliorer les propriétés mécaniques des gels lactiques en augmentant leur texture et leur viscosité (Kowalczyk et al., 2016).

Les bactéries lactiques sont reconnues pour l'effet bénéfique de leur présence dans la production de nombreux produits laitiers 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 EPS. Dès lors, outre leurs propriétés techniques dans la production agroalimentaire, les EPS sont aujourd'hui associés aux propriétés physiologiques diverses ; prébiotiques, anti-tumuroales, anti-cholestérol, anti-inflammatoire, antioxydante, immuno- modulatrice, antibiofilm (figure 11)(Ben Saleh et al., 2012 ; Li et al., 2014 ; Fontana et al.,2015 ; Ruas-Madiedo et al., 2002 ; Ruas-Madiedo et al., 2009 ; Monnet et al., 2008). Les EPS faiblement attachés produits par *Lactobacillus acidophilus* 606 (Kim et al., 2010) et *Lactobacillus plantarum* 70810 (Wang et al., 2013) se sont avérés avoir des propriétés anti-tumorales considérables. Les EPS ont également montré une activité immunomodulatrice des macrophages (Liu et al., 2011; Czek et al., 2011). En outre, les EPS produits par *Lactobacillus reuteri* peuvent inhiber des espèces d'*Escherichia coli* entérotoxigène responsables de l'hémagglutination des érythrocytes porcines (Wang et al., 2010). Les EPS de *L. plantarum* 70810 ont une capacité de fixation de métal et pourraient être utilisées en tant qu'agents de biosorption potentiels pour l'élimination du plomb (Li et al., 2014).

Patel et al., (2012) ont montré que les LAB peuvent produire une grande variété d'oligosaccharides fonctionnels qui peuvent être utilisés comme prébiotiques, des nutraceutiques, des édulcorants, des agents humectants, des remèdes contre le cancer du côlon, et des stimulateurs immunitaires. Ces composés fonctionnels, y compris les FOS non digestible, les fructanes de type inuline, ou β -glucanes, stimulent la croissance des commensaux bénéfiques dans le tractus gastro-intestinal et l'amélioration de leur capacité de colonisation par leur implication directe dans les phénomènes d'adhésion et formation de

biofilm (Sutherland, 1972 ; Harvenar *et al.*, 1993 ;Sutherland, 2003 ; Ruas-Madiedo *et al.*, 2009 ; Bremer *et al.*, 2015).

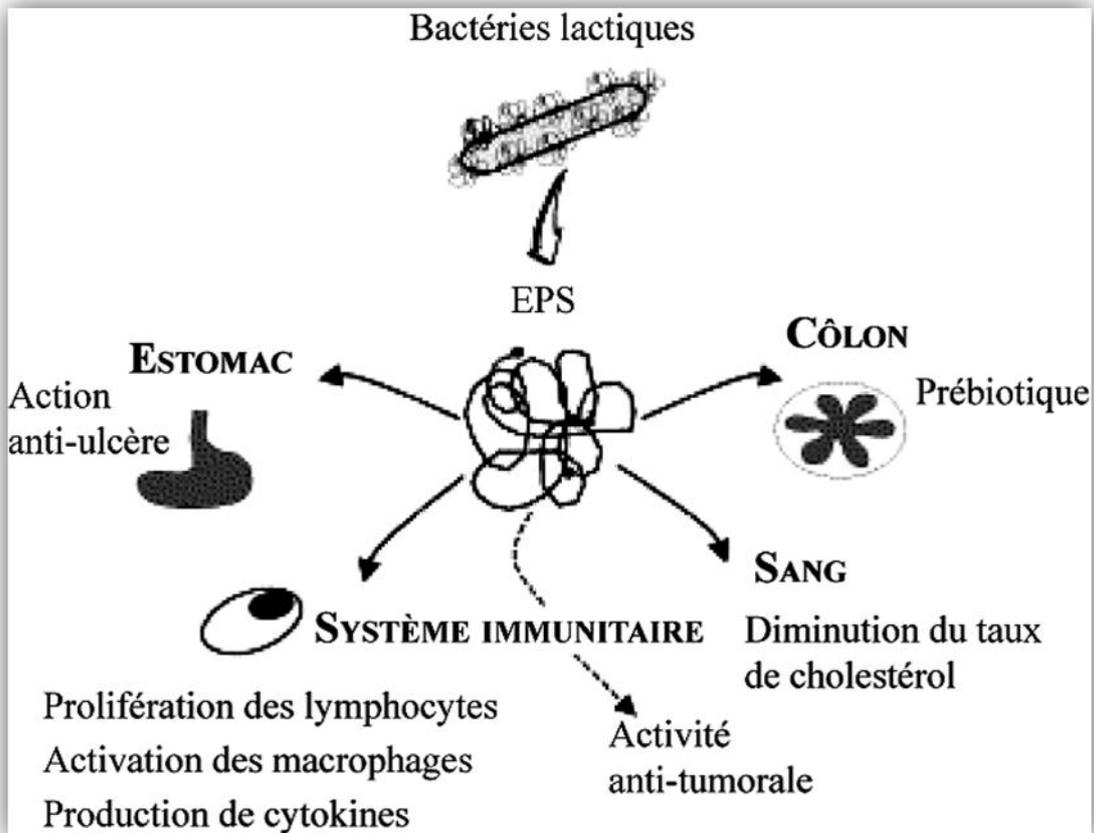


Figure N°11: Potentiels effets bénéfiques des EPS produits par les bactéries lactiques sur la santé (Ruas-Madiedo *et al.*, 2009).

I.6.2. Métabolisme des protéines et des lipides

Les bactéries lactiques ont généralement des exigences complexes en acides aminés pour leur croissance. Ces besoins en acides aminés ou auxotrophies sont variables entre les différents genres bactériens, voir au sein d'une même espèce (Monnet *et al.*, 2008).

L'utilisation des protéines de l'environnement en tant que source d'acides aminés explique l'importance de système protéolytique des bactéries lactiques. Les acides aminés sont des précurseurs de composés aromatiques, qui sont importants pour la saveur finale des produits alimentaires. L'activité protéolytique génère également d'autres molécules telles que des peptides bioactifs, qui ont des fonctions liées aux propriétés probiotiques des LAB. Le système protéolytique des LAB peut être divisé en plusieurs étapes: la dégradation des

protéines, des peptides de transport, la dégradation des peptides, et le catabolisme des acides aminés (figure. 12). L'activité protéolytique est d'une importance industrielle en raison de sa contribution aux propriétés organoleptiques des produits laitiers fermentés (Endo et Dicks, 2014).

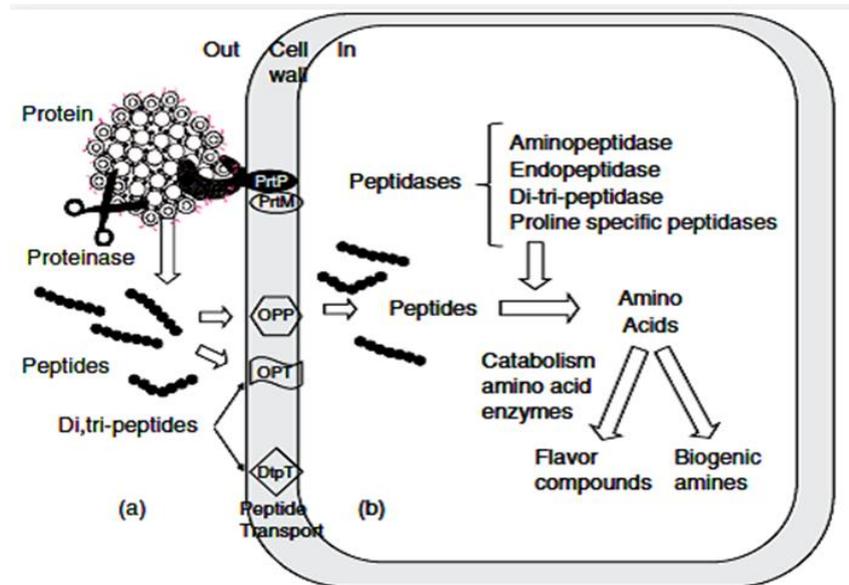


Figure N°12 : Diagramme des systèmes protéolytiques des bactéries lactiques.

(a) des composants extracellulaires: PrtP, protéinase de l'enveloppe cellulaire; PrtM, protéinase des protéines Cépées; Opp, perméase des oligopeptides; DtpT, l'ion transporteur liée pour di-et tripeptides; et Opt, le transporteur ABC pour les peptides. (b) les composants Intracellulaires: environ 20-25 peptidases, y compris les peptidases spécifiques et générales (pepN, PEPC) et (PepX, PEPQ), et les enzymes cataboliques d'acides aminés (de carboxylases, transaminases, etc.)(Kowalczyk et al., 2016).

L'activité lipolytique est importante dans le développement d'arôme des produits laitiers, en particulier dans la maturation du fromage. Plusieurs LAB laitiers, y compris *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus*, ont été signalés à avoir une activité lipolytique considérable (Cosentino et al., 1999; Di Cagno et al., 2016). Dans le fromage, cette activité, se produit généralement par l'intermédiaire des systèmes estérase / lipase des LAB, des bactéries propionique, des moisissures et des levures (Endo et Dicks, 2014).

I.6.3. Fermentation de citrate et de l'acide malique

La fermentation des acides organiques joue un rôle important dans le métabolisme énergétique de plusieurs LAB hétérofermentaires. Le métabolisme du malate est important lors de la fermentation secondaire du vin. Beaucoup de LAB du vin utilisent cette fermentation pour produire de la L-lactate et du CO₂ comme produits finis. La fermentation, définie comme

la fermentation malolactique, contribue à la désacidification du vin. Seulement L-malate est converti en L-lactate. *Oenococcus oeni* et quelques LAB (par exemple *Enterococcus faecalis* et *Lactobacillus casei*) peuvent utiliser L-malate comme seule source d'énergie (**Endo et Dicks, 2014**).

Le citrate est un précurseur du diacétyl, qui contribue à l'arôme de certains types de laits fermentés, de fromage frais ou affinés, de beurres et de crèmes fraîches. Il conduit également à la formation de CO₂, qui participe à la formation des ouvertures dans les fromages. Le métabolisme de cet acide a un rôle physiologique important chez les LAB, en permettant une génération indirecte de l'énergie ou la synthèse des composés cellulaires (**Monnet et al., 2008**).

I.7. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES BACTERIES LACTIQUES

Du point de vue de leurs caractéristiques physiologiques, les bactéries lactiques sont utilisées dans l'industrie alimentaire et génèrent un ensemble de propriétés, résumé, selon **Monnet et al., (2008)** comme suit :

- Production d'acide lactique à partir du glucose, ce qui entraîne une acidification qui, selon le produit considéré, a de nombreuses répercussions : coagulation du lait, synérèse des caillés fromagères, saveur acide, inhibition des flores d'altération ;
- Génération d'un large éventail de composés d'arômes qui contribuent à l'établissement des propriétés organoleptiques ;
- Production d'exopolysaccharides qui agissent comme des agents de texture et sont particulièrement recherchés dans l'industrie alimentaire ;
- Production de CO₂ contribuant à la formation d'ouvertures dans les fromages et au caractère pétillant des aliments fermentés.

I.7.1. Bactéries lactique et flore intestinale

La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de 10¹³-10¹⁴ cellules microbiennes. Au sein de cette communauté intestinale, environ 400 à 1000 espèces bactériennes différentes ont été recensées (**Hooper et Gordon, 2001**). Cette microflore représente 10 à 20 fois le nombre total de cellules du corps humain.

La prévalence des bactéries dans le tractus gastro-intestinal dépend des conditions qui y règnent. Deux catégories de bactéries sont distinguées : les bactéries autochtones et les bactéries allochtones (**Eckburg et al., 2005**).

De tous les groupes bactériens, les bactéries lactiques sont probablement le groupe de bactéries qui est le plus associé au mode de vie humaine (**Donohue et Gueimonde, 2012**). Parmi les genres bactériens des LAB (plus de 20), au moins sept sont couramment associés au système gastro-intestinal humain (SGIH). *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* sont les genres des LAB prédominants présents dans le SGIH, alors que *Weissella*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* sont soupçonnés d'être moins répandue (**Kwok, 2014**). Le tableau 7 récapitule les différentes bactéries lactiques rencontrées dans le système gastro-intestinal.

CHAPITRE I. BACTERIE LACTIQUES

Tableau N°07 : Genres communs de LAB et leur association avec le système GI humain (Kwok, 2015).

Famille	Genre	Signification clinique et association avec le système GI	Références
Aerococcaceae	Aerococcus	Une souche Enterococcus a été détectée dans la biopsie colique d'un individu sain par la méthode moléculaire. <i>A. urinae</i> peut résider dans le SGI humain et causer des infections des voies urinaires rares et endocardite	Nielsen et al., (2003), Christensen et al., (2006), Ebnöther et al., (2002)
Carnobacteriaceae	Carnobacterium	Deux cas cliniques rapportés dans le site de pus et de la gangrène des patients, les deux espèces impliquées sont : l'espèce <i>C. maltaromaticum</i> et <i>C. divergens</i>	Xu et al., (1997), Chmelar et al., (2002), Leisner et al., (2007)
Enterococcaceae	Enterococcus	Enterococcus sont commensaux normaux SGI humains, mais certaines espèces, par exemple, <i>E. faecalis</i> et <i>E. faecium</i> , sont connus pour causer des infections des voies urinaires, bactériémie et endocardite. Ce groupe pose également un problème clinique significatif de la résistance aux antibiotiques	Donskey (2004), Hammerum (2012)
	Tetragenococcus	Jusqu'à présent, une seule souche <i>T. solitarius</i> a été isolée à partir des sécrétions oreille humaine	Collins et al. (1989)
	Vagococcus	<i>Vagococcus fluvialis</i> a rarement été isolés à partir d'échantillons cliniques, y compris les plaies, le sang et le liquide péritonéal. Signification clinique reste inconnue	Teixeira et al., (1997)
Lactobacillaceae	Lactobacillus	<i>Lactobacillus</i> sont présents dans tout le tube digestif humain, de la cavité buccale à l'intestin. Au moins 17 espèces différentes sont associées au système GI humaine. Ils sont relativement abondants dans le SGI humain associé à la muqueuse, mais relativement faible dans les échantillons de matières fécales (seulement 0,2 à 1,0 en%). Dans la cavité buccale, ils sont à deux côtés épée qui leur protège contre les bactéries nocives, elles produisent des acides et contribuer à l'érosion dentaire. Les lactobacilles sont généralement considérés comme des bactéries probiotiques	Mueller et al., (2006), Walter (2008), Gorkiewicz et al., (2013), Yang et al., (2010)

CHAPITRE I. BACTERIE LACTIQUES

	Pediococcus	Certaines souches de <i>Pediococcus</i> ont été isolées dans la salive humaine saine, les matières fécales, et la biopsie du côlon. <i>P. pentosaceus</i> et <i>P. acidilactici</i> ont été isolés à partir d'échantillons cliniques de sang, selles diarrhéiques, les fluides péritonéale, abcès, urine. Leur rôle dans la pathogénèse est incertain. Cependant, il y avait des cas sporadiques de <i>Pediococcus</i> liée à la bactériémie, ainsi que <i>P. acidilactici</i> associé à l'endocardite (seulement 1 cas signalé), et <i>P. parvulus</i> associé à la bactériémie chez un patient atteint de cancer du testicule métastatique (seulement 1 cas rapporté).	Walter et al., (2001), Huys et al., (2011), Sanchez et al., (2010), Barros et al., (2001), Figueroa Castro et al., (2010), Iwen et al., (2011)
Leuconostocaceae	Leuconostoc	Ceci est rarement porté par l'intestin / membranes muqueuses de l'homme. <i>L. mesenteroides</i> (plus répandu) et <i>L. Argentinum</i> ont été détectés dans les échantillons de matières fécales par des méthodes moléculaires. <i>L. citreum</i> a été détectée dans la biopsie colique humaine saine. Certains membres sont liés à des infections humaines, bien que généralement un facteur prédisposant est présent, par exemple, les patients subissant une thérapie vancomycine ou les bébés prématurés	Walter et al., (2001), Nielsen et al. (2003), Huys et al., (2011), Sanchez et al., (2010), Heilig et al. (2002)
	Oenococcus	Non rapporté	
	Weissella	<i>W. cibaria</i> et <i>W. confusa</i> ont également été isolés à partir d'échantillons cliniques et intestinale humaine biopsie de la muqueuse. <i>W. confusa</i> a cependant été associé à la bactériémie et rarement à l'endocardite. Les maladies à Weissella sont habituellement associées à des causes sous-jacentes telles que résistance à la vancomycine, et immunosuppression hôte.	Walter et al., (2001), Björkroth et al., (2002) Olano et al., (2001), Harlan et al., (2011), Flaherty et al., (2003)
Streptococcaceae	Lactococcus	<i>Lactococcus garvieae</i> , un pathogène opportuniste à faible virulence, rarement impliqué dans l'endocardite ou d'autres complications. Bien que les hôtes immunocompétents peuvent également être sensibles, la plupart des patients étaient âgés ou malades avec facteurs prédisposant, par exemple, la valve cardiaque prothétique, des lésions GIT (ulcères, polypes), traitement de la toxicomanie antiacide	Li et al., (2008), Russo et al., (2012)
	Streptococcus	nombreuses espèces sont habitantes du système GI humains signalés comme résidant à différents endroits du corps, y compris la cavité buccale (<i>S. mitis</i> , <i>S. salivarius</i>) et de l'intestin (<i>S. equin</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. faecalis</i>). Les groupes pyogenes et anginosus sont considérés comme des agents pathogènes humains et des agents pathogènes opportunistes, respectivement	Tagg et al., (2011)

CHAPITRE I. BACTERIE LACTIQUES

Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	Bifidobacterium sont généralement considérés comme bénéfiques. Ils sont parmi les premiers colonisateurs de l'intestin du nourrisson humain, mais diminuent avec l'âge. <i>Cependant, B. scardovii et B. dentium</i> ont été provenaient de sang et caries dentaires humaines, respectivement. Leurs sources pourraient refléter leur rôle potentiel pathogène. Dans les échantillons de tissus de biopsie endoscopiques, les 6 principaux taxons <i>bifidobactéries</i> cultivable étaient <i>B. longum, B. pseudocatenulatum, B. adolescentis, B. pseudolongum, B. breve et B. bifidum</i> . À l'opposé, <i>B. dentium et B. animalis RPSC. lactis</i> ont été dominant dans les échantillons fécaux. Par conséquent, la composition de la population des muqueuses-fixantes diffère de celle fécale. Une variation intra-individuelle élevée a également été noté	Turroni et <i>al.</i> , (2009), Mantzourani et al. (2010), Claesson et al. (2011)
--------------------	-----------------	--	---

1.8. ACTIVITES PROBIOTIQUES DES BACTERIES LACTIQUES

Le concept de probiotique est issu des travaux de Metchnikoff (1907) qui attribuait la longévité des paysans bulgares à leur consommation de yogourt contenant des espèces de *Lactobacillus*. Selon lui, l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pouvait réduire les désordres intestinaux, améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie (**Havenaar et al., 1993**).

Le terme probiotique vient de deux mots grecs « pros » et « bios » qui signifient littéralement «pour la vie» contrairement au terme antibiotique signifiant « contre la vie ».

L'utilisation de ce terme remonte à 1965 et fait référence à toute substance ou organisme qui contribue à l'équilibre dans l'intestin, principalement chez les animaux d'élevage. Depuis, plusieurs définitions ont été données indépendamment de leurs effets sur la santé (**Lee, 2009**).

Il est actuellement accepté la définition formulée pour les probiotiques " des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates confèrent un avantage pour la santé de l'hôte. "(**FAO, 2001 ; Lee, 2009 ; Kwok, 2014**).

Pour qu'un micro-organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes (**Isolauri et Salminen, 2004**) :

1. être un hôte naturel de l'intestin,
2. être capable de persister dans le milieu intestinal,
3. adhérer aux cellules épithéliales intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des pathogènes,
4. avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H₂O₂, bactériocines...),
5. être non invasif, non carcinogène et non pathogène,
6. être capable de co-agréger pour former une flore normale équilibrée,
7. survivre aux différents procédés technologiques de production,
8. demeurer vivant dans la préparation alimentaire.

Toutefois, certains de ces critères sont maintenant remis en question, comme les propriétés d'adhérence et la notion de viabilité. Des études récentes, ont clairement démontré que même

les souches non viables de probiotiques sont capables d'exercer certains effets positifs sur la santé entre autres la stimulation de certaines fonctions immunitaires, l'inhibition de l'adhésion et de l'invasion de certains pathogènes (**Ouwehand et Vesterlund, 2003 ; Barranguou et al., 2012**).

Plusieurs genres de bactéries lactiques sont utilisés comme probiotique. Les plus couramment rencontrés sont les *Lactobacillus* (*acidophilus* ou *bulgaricus*), *Streptococcus* (*latis* ou *faecium*), *Bifidobacterium* (**Giovanna et al., 2016**). Ainsi **Marteau et al (2001)** ont observé que la survie dans l'intestin des *Lactobacillus* est différente selon les espèces.

D'autres souches de *Lactobacillus* diffèrent pour leurs propriétés d'antagonisme vis-à-vis de la souche *d'Hellicobacter pylori*. Au sein de la même espèce ont constaté des différences intrinsèques de propriété entre souches. De nombreux travaux ont rapporté des différences de propriétés antibactériennes ou d'adhésion à des cellules épithéliales et au mucus (**Ouwehand et al., 2003**).

Le tableau 8 représente les LAB conçues comme additifs alimentaires énumérés par l'autorité européenne de sécurité des aliments en tant que probiotique.

Tableau N°08 : Bactéries lactiques utilisées comme additifs alimentaires énumérés par l'autorité européenne de sécurité des aliments en tant que probiotiques (Xiao et al., 2015).

Genre	Espèce	Genre	Espèce
* <i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>
	<i>alimentarius</i>		<i>sakei</i>
	<i>amyolyticus</i>		<i>salivarius</i>
	<i>amylovorus</i>		<i>sanfranciscensis</i>
	<i>aviaries</i>		
	<i>brevis</i>	* <i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i>
	<i>buchneri</i>		<i>animalis</i>
	<i>casei</i>		<i>bifidum</i>
	<i>cellobiosus</i>		<i>breve</i>
	<i>collinoides</i>		<i>longum</i>
	<i>collinoides</i>		
	<i>coryniformis</i>		
	<i>crispatus</i>		
	<i>curvatus</i>		
	<i>delbrueckii</i>		* <i>Lactococcus</i>
	<i>farciminis</i>	* <i>Leuconostoc</i>	<i>citreum</i>
	<i>fermentum</i>		<i>lactis</i>
	<i>gallinarum</i>		<i>mesenteroides</i>
	<i>gasseri</i>	* <i>Oenococcus</i>	<i>oeni</i>
	<i>helveticus</i>		
<i>hilgardii</i>	* <i>Pediococcus</i>		
<i>johnsonii</i>		<i>acidilactici</i>	
<i>kefiranoferiens</i>		<i>dextrinicus</i>	
<i>kefiri</i>		<i>pentosaceus</i>	
<i>mucosae</i>			
<i>panis</i>	* <i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	
<i>paracasei</i>			
<i>paraplantarum</i>			
<i>pentosus</i>			
<i>plantarum</i>			
<i>pontis. reuteri</i>			

Chapitre II

***Plantes médicinales
et composés phénoliques***

Depuis la nuit des temps, les Hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Aujourd'hui encore, les tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques sous l'appellation « phytothérapie » **(De La Roque et al., 2001)**.

Le terme de « phytothérapie » a été utilisé pour la première fois par le médecin Henri Leclerc (1870-1955). D'après la définition actuellement en vigueur, la phytothérapie consiste à soigner, soulager ou prévenir les maladies, maux courants et troubles subjectifs par l'utilisation des plantes médicinales sous différentes formes **(Wernier et Braunschweig, 2005)**.

II.1. GENERALITES SUR LES PLANTES MEDICINALES

Au travers des âges, l'Homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation des plantes médicinales comme source de remède pour se soigner ou prévenir des maladies est originaires des millénaires jusqu'à la récente civilisation chinoise, Indienne et du Proche-Orient. Elle est devenue certainement un art **(Schausenberg et Paris, 2013)**.

L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites, plus de 25% des médicaments dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes **(Damintoti, 2005)**. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimiques et pharmacologiques, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents **(Daglia, 2011)**.

Les plantes médicinales sont des plantes arbustives ou herbacées cultivées ou spontanée qui contiennent une ou plusieurs substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou comme précurseurs dans la synthèse des drogues utiles **(Abayomi, 2010; Roux, 2011)**. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces peuvent avoir des actions très différentes suivant leur préparation **(Schausenberg et Paris, 2013)**.

La région méditerranéenne d'une manière générale et l'Algérie en particulier, avec son climat doux et ensoleillé est favorable à la culture des plantes aromatiques et médicinales. La flore Algérienne avec environ 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15 % endémiques, reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique (**Daglia et al., 2011**).

II.2. PRESENTATION DE *THYMUS*

La famille des Lamiacées est l'une des familles les plus répons dans le règne végétal. Elle est d'une grande importance aussi bien pour son utilisation en industrie alimentaire et en parfumerie qu'en thérapeutique. Cette famille comprend près de 4000 espèces regroupées dans environ 220 genres dont les plus cités sont : *Salvia officinalis*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum bacilicum*, ainsi de nombreuses espèces du genre thymus (**Rey et Saez, 2002 ; Naghibi, 2005**).

Au sein de cette famille, avec environ 220 genres, le genre *Thymus* est l'un des huit genres les plus importants en matière de nombre d'espèces incluses. Il regroupe plus de 200 espèces largement distribuées dans l'ère méditerranéenne et utilisées comme antibactérien et anti-inflammatoire dans la pharmacopée traditionnelle (**Saez et Stahl-Biscup, 2002; Morales, 2002**).

Thymus L. « thyme » est une plante aromatique avec une importance croissante dans l'industrie alimentaire. Les espèces du genre *Thymus* ont été utilisées depuis plus de 2000 ans comme des herbes médicinales et beaucoup d'entre elles sont encore en usage (**Brian et Arthur, 2002**).

II.2.1. Origine de l'étymologie

Thymus est l'un des genres les plus critiques de la flore euro-méditerranéenne et la plupart de ses taxons et nomenclature ont besoin de typification (**Bartolucci et al., 2013**). Plusieurs explications existent concernant l'origine du nom «Thymus». Certains auteurs supposent que le nom latin *Thymus* vient du mot grec Thyo (parfum). Une autre interprétation de son étymologie considère thymos un mot grec qui signifie courage et force. A l'origine «thymus» décrit un groupe de plantes aromatiques avec des aspects similaires qui ont été utilisés comme des stimulants de fonctions vitales (**Morales, 2002 ; Jourdain, 2002**).

II.2.2. Caractéristiques botaniques du *Thymus*

Le genre *Thymus* est très fréquent dans la région méditerranéenne, où certaines espèces forment un type spécial de la végétation buissonnante ne dépassant pas 50cm de hauteur, bien adapté aux conditions climatiques de l'été chaud et sec. Ces plantes possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur verte foncée, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leurs couleurs varient du blanc au violet en passant par le rose (Morales, 2002 ; Soto-Mendivil et al, 2006 ; Roux, 2011). Les différentes espèces de ce genre poussent dans des jardins légers et soignés, mais aussi dans une terre plus sèche, plus pierreuse et plus pauvres en substances nutritives (Friteszeche, 1993).

II.2.3. Biogéographie du genre *Thymus*

Thymus est largement distribué dans le monde (Figure 13). La région méditerranéenne peut être décrite comme le centre du genre, tout particulièrement la région ouest de la Méditerranée. Seules les espèces de deux sections se produisent en dehors de la région méditerranéenne. Sept sections sont réparties sur la péninsule ibérique et au nord-ouest d'Afrique, cinq d'entre elles sont endémiques. Dans la péninsule ibérique, 35 espèces peuvent être trouvées et 24 sont endémiques de la région (Morales, 2003 ; Roux, 2011).



Figure N°13 : Répartition du genre *Thymus* dans le monde. La ligne pointillée représente toutes les sections sauf la section « *Serpyllum* » et « *Hipodromo* » et la subsection « *Serpyllastrum* » (**Morales, 2002**).

En Algérie, ce genre regroupe 12 espèces qui sont: *Thymus capitatus* (L.) Hoffin. et Link., *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut., *Thymus commutatus* (Bali.) Batt., *Thymus dreatensis* Batt., *Thymus numidicus* Poiret., *Thymus guyonii* de Noé, *Thymus lanceolatus* Desf., *Thymus pallidus* Coss., *Thymus glandulosus* Lag., *Thymus hirtus* Willd., *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., *Thymus ciliatus* Desf. qui regroupe 3 sous-espèces qui sont: *eu-ciliatus* Maire, *coloratus* (Boiss. et Reut.) Batt. et *munbyanus* (Boiss. et Reut.) (**Quezel et Santa, 1963**). Le tableau 9 représente les espèces du thymus les plus répandues en Algérie.

Tableau N°09 : Localisation de certaines especes du Thymus en Algérie

Espece	Decouverte	Localisation	Nom local
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffiman et Link	Région de Tlemcen	Ateure
<i>Thymus fontaesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie- Tunisie	Auteure
<i>Thymus commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran	
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Sous secteur dans l'atlas tellien La grande et la petite Kabylie De Skikda à la frontière tunisienne Tell constantinois	Tizaatarte
<i>Thymus guyonii</i>	Noé	Sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais et constantinois	
<i>Thymus lancéolatus</i>	Desfontaine	Secteur de l'atlas tellien (Terni de Médéa Benchicao) et dans le sous secteur des hauts plateaux algérois,oranais (Tiaret) et constantinois	Zaateur
<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Sous secteur de l'atlas saharien et constantinois	Tizerdite
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral	Djertil Hamrya
<i>Thymus glandulosus</i>	Lag	Sous secteur des hauts plateaux algérois	
<i>Thymus algeriensis</i>	Boiss et Reuter	Sos secteur des hauts plateaux algérois et oranais	Dertil Zaitra
<i>Thymus munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur nord algérois	Dertil

L'espèce *Thymus fontanesii* est une plante endémique d'Algérie et de Tunisie, qui se trouve dans le Tel, au niveau des pelouses et des garrigues. Cette espèce a un calice à 5 dents toutes longuement subulées bien plus longue que le tube, et à lèvre supérieure divisée dans son tiers supérieur. Les tiges sont dressées et robustes qui ne dépasse pas 20 cm de hauteur, à feuilles oblongues, lancéolées recourbés sur les bords, de couleurs vertes foncés et qui sont recouvertes de poils et de glandes de 10 à 12 mm de long. Les épis florifères sont courts et étroits plus longues que le calice. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet visible d'avril à juin, à odeur très agréable et spécifiques. Très commun dans les régions montagneuses, elle est considérée comme une espèce endémique en Algérie(Quezel et Santa, 1963 ; Roux, 2011).

D'après Quezel et Santa (1963), Morales (1997), Pedersen (2000) et Guignard et Dupont (2004), la classification qu'occupe *Thymus fontanesii* dans la systématique est la suivante :

Embranchement	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Sous-classe	Astéridées
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus fontanesii</i> Boiss. et Reut

II.2.5. Sections du genre *Thymus*

Le genre *Thymus* est divisé en huit sections: Micantes, mastichina, Piperella, Teucrioides, Pseudo Thymbrée, Thymus, Hyphodronzi et serpyllum (tableau 10).

Tableau N10: Différentes sections du genre *Thymus* (Morales, 2002)

Section	Sous-section	Exemple d'espèce
1. Micantes	---	<i>T. caespititiw</i> Brot. 2n= 30 Hs Lu Az Madeira
2. Mastichina	---	<i>T. albicans</i> Hoffmanns. and Link 2n = 30 Hs Lu
3. Piperella	---	<i>T. piperella</i> L. 2n = 28 Hs
4. Teucroioides	---	<i>T. leucospermus</i> Hartvig Gr
5. Pseudothymbra	- Pseudothymbra	- <i>T. lotocephalus</i> G. Ldpez and R. Morales 2n= 30 Lu
	- Anomalae	- <i>T. antoninae</i> Rouy and Coincy 2n= 56 Hs
6. Thymus	- Thymastra	- <i>T. capitellatus</i> Hoffmanns. and Link 2n = 30 Lu
	- Thymus	- <i>T. curnosus</i> Boiss. 2n= 56 Lu Hs
7. Hyphodromi	- Subbracteati	- <i>T. algeriensis</i> Boiss. and Reuter 2n = 30, 5 6 Ma Ag Tn Li
	- Serpyllastrutm	- <i>T. aznavourii</i> Velen. Tu
	- Thymbropsis	- <i>T. bovei</i> Bentham Sinai IJ Irak SaudiArabia
8. Serpyllum	- Insulares J alas	- <i>T. bornnzuelleri</i> Velen. An
	- Kotschyani	- <i>T. ararati-minoris</i> Klokov and Shost.
	- Pseudopiperellae J alas	- <i>T. nitens lamotte</i> 2n= 28 Ga
	- Isolepides	- <i>T. coriifolius</i> Ronniger
	- AlternantesKlokov	- <i>T. ulpestris</i> Tausch ex A. Kerner 2n = 28
	- Pseudomarginati	- <i>T. nervosw</i> Gay ex Willk. 2n=28 Ga Hs
- Serpyllum	- <i>T. alatuensis</i> (Klokov and Shost.) Klokov	

II.2.6. Propriétés et utilisations

Les produits commerciaux, qui sont obtenus à partir du genre *Thymus*, comprennent les huiles essentielles, oléorésines, herbes fraîches et séchées. Le genre *Thymus* compte environ 350 espèces, mais seulement cinq ont atteint une importance économique réelle : *T. capitata* L., *T. mastichina* L., *T. serpyllum* L., *T. vulgaris* L. et *T. zygis* L (Brian et Arthur., 2002).

Cette plante est largement utilisée en qualité de plante aromatique dans les préparations culinaires tels que les soupes, les sauces et les viandes et en particulier dans la cuisine méditerranéenne (Hemingway et al., 1991).

Le thym est utilisé fréquemment par les populations autochtones grâce à ses diverses propriétés importantes. Les tiges et les feuilles fleuries ou non, sont utilisées en infusion pour calmer la toux, les irritations de l'appareil respiratoire, les rhumes et pour favoriser la digestion.

En usage externe le thym s'emploie en gargarismes, en inhalations ou en bain de bouche. Les decoction ajoutées au bain effacent les effet de la fatigue et soulagent les rhumatismes et les courbatures, il est employé depuis l'antiquité pour amboumer les morts (**Polese, 2006**).

La plante possede aussi des vertus antiseptiques particulierement indiquées dans le traitement des infections pulmonaires. Ils calme la toux en relachant les spasmes bronchiques. Il diminue les sécrétions nasales. Outre son activité pulmonaire, le thym soulage les spasmes intestinaux et ballonnements, il combat l'atonie intestinale, l'anorexie, la dyspesie, la gastrite chronique. Son action antiseptique soignera certaines diarrhées (**Roux, 2011 ; Schauenberg et Paris, 2013**).

II.2.7. Métabolites secondaires du genre *Thymus*

La phytochimie ou la chimie du végétal a énormément développé au cours des dernières décennies et cela a été dû à l'identification de plus en plus de succès de molécules organiques en petites quantités au moyen de techniques chimiques sophistiquées. Elle a aussi été due à la prise de conscience que les métabolites secondaires jouent un rôle important dans l'interaction complexe plantes - animaux ou plantes- plantes dans leur exposition à l'environnement.

Pour le genre *Thymus*, les deux principales catégories de métabolites secondaires, les huiles volatiles essentielles d'une part et les polyphénols, en particulier les flavonoïdes, d'autre part sont principalement responsables des activités pharmacologiques des plantes (**Stahl-biskup, 2002**).

II.2.7.1. Huile essentielle de *Thymus*

Beaucoup de plantes aromatiques comme le thym produisent des mélanges complexes d'alcool, d'aldéhyde, de cétone et de composés terpéniques, désignés par le terme général d'huile essentielle, sept races chimiques ou chémotypes de cette plante ont été distingués: à thymol, carvacrol, linalol, thuyanol, alpha terpinéol, géraniol, et paracymène. (**William et al, 2005**).

En Lamiacées y compris le genre *Thymus*, les huiles essentielles sont stockées dans les trichomes peltés glandulaires. Ils sont situés sur la surface de l'épiderme sur les deux faces des feuilles et présentent une anatomie typique (Figure 14) (**Stahl-Biskup, 2002**).

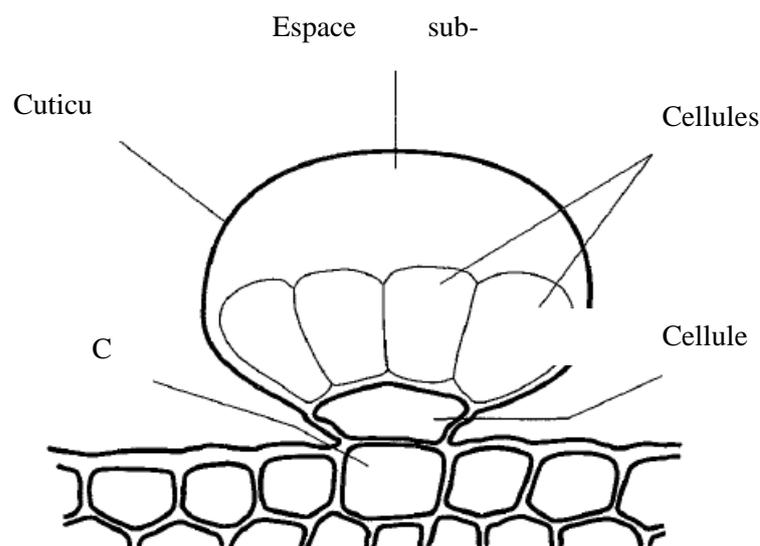


Figure N°14 : Anatomie du trichome glandulaire de *Thymus* (Stahl-Biskup, 2002).

L'activité de la plante est due en grande partie à son huile essentielle dont la composition varie selon l'origine de la plante. La teneur en huile essentielle doit être au moins égale à 1.5%, certaines espèces présentent une teneur supérieure à 2% (Roux, 2011). Le thymol est un antiseptique puissant, il est 25 fois plus actif que le phénol, sur lequel il possède l'avantage de moins irriter les muqueuses. C'est un désodorisant efficace et un vermifuge. L'essence de thym est stomatique et carminative (Schauenberg et Paris, 2013).

II.2.7.2. Composés phénoliques du genre thymus

II.2.7.2.1. Généralités sur les polyphénols

1. Découverte des polyphénols

L'intérêt nutritionnel pour les polyphénols date de la découverte de la vitamine C, à la suite des travaux de *Szent Gyorgyi* en 1938 (Sarni-manchado et Cheynier, 2006). Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de Paprika et de jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque.

Les flavonoïdes constituent l'un des principaux groupes de composés phénoliques naturels, largement répandus dans les plantes vertes, où ils peuvent être trouvés dans les différents organes: feuilles, fleurs, écorces, fruits, etc. Ces biomolécules peuvent avoir plusieurs types de structures, se sont constitués d'un noyau de 15 carbone disposés en C6-C3-C6, deux noyaux aromatiques reliés par une chaîne de trois atomes de carbone, qui peuvent constituer un troisième anneau (**Kenneth et Bloor, 1998 ; Sitthiphong et al., 2012**).

2. Localisation et structure des polyphénols

- *Localisation*

Tous les végétaux contiennent des composés phénoliques, mais comme c'est le cas pour la plupart des substances naturelles qualifiées de métabolites secondaires, leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques (**Sarni-manchado et Cheyner, 2006**).

Ce sont des substances naturelles issues des plantes, présentes dans tout le règne végétal. Ces pigments sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (**Moris et al., 1995**).

Structure des polyphénols

Le nombre des polyphénols caractérisés à l'heure actuelle est assez impressionnant. Ils ont tous en commun la présence de un ou plusieurs cycles benzéniques, portant une ou plusieurs fonctions hydroxylées (**Remesy, 1996**). Le tableau 11 et la figure 15 illustrent la structure des principales classes des composés phénoliques rencontrés dans les plantes.

Tableau N°11: Principales classes de composés phénoliques (Sarni-manchado et Cheynier, 2006).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemples)
C_6	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
$C_6 - C_1$	Acides hydroxybenzoïques	p-hydroxybenzoïque	Epices, Fraises
$C_6 - C_3$	Acides hydroxycinnamique coumarique	Acide cafeïque Scopolétine	Pomme de terre, Pomme, Citrus
$C_6 - C_4$	Naphtoquinones	Juglone	Noix
$C_6 - C_2 - C_6$	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, daïdzaine	Fruits, légumes, fleurs soja, pois
$(C_6 - C_3)_2$	Lignanes	Pinorésinol	Pin
$(C_6 - C_3)_n$	Lignines		Bois, fruits à noyau
$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Tanins condensés		Raisin, kaki

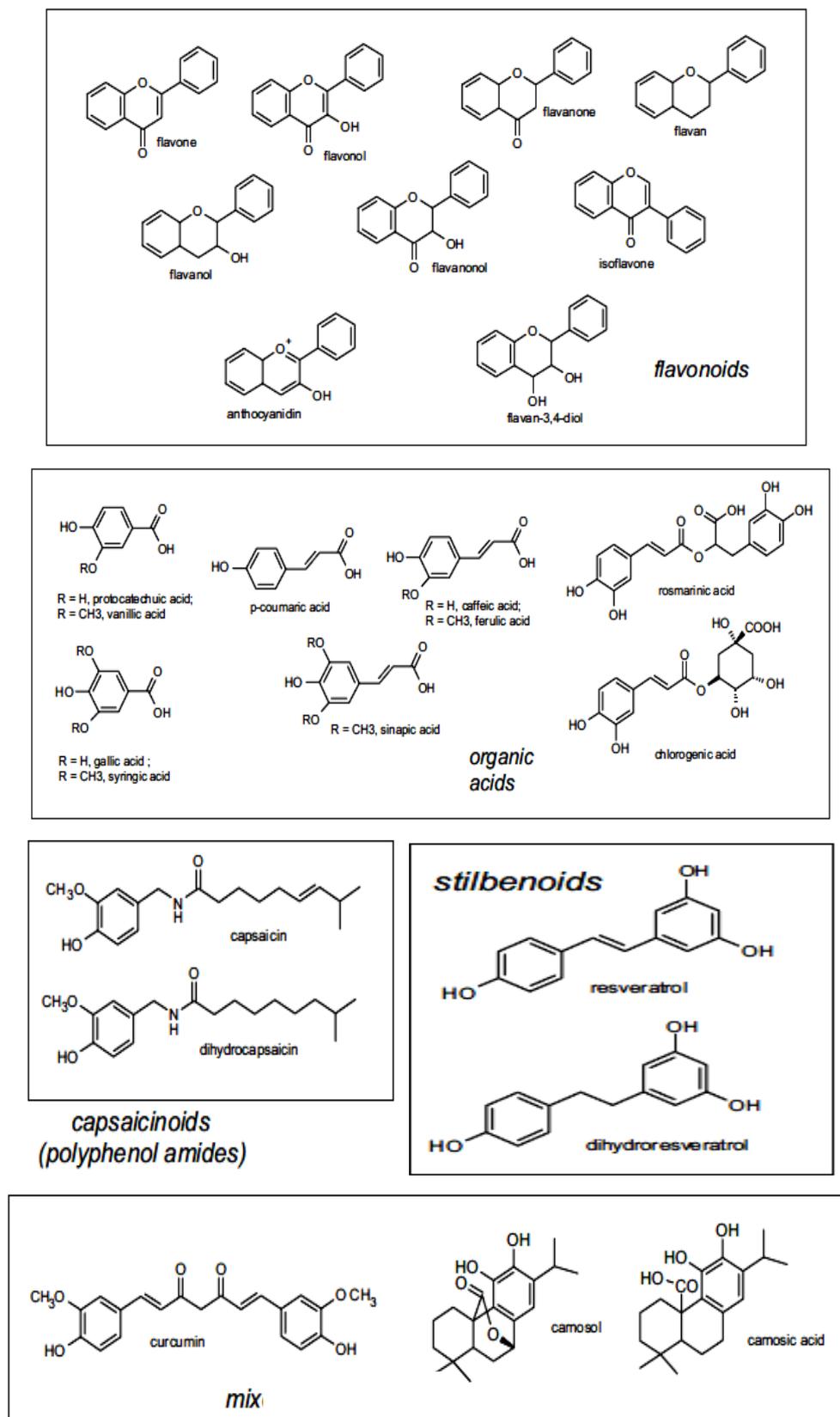


Figure N° 15: Structure de quelques polyphénols rencontrés dans les plantes (Siracusa et Ruberto, 2014).

II.2.8. Propriétés des polyphénols pour la cellule productrice

D'après Andersen *et al.*, (2006), les polyphénols sont les seules molécules du règne végétale capable de produire une vaste gamme de couleurs (jaune orangé au bleu, en passant par le pourpre et le rouge, ce qui les rend une classe de métabolite très intéressante permettant :

- De protéger les plantes contre les rayonnements solaires;
- D'exercer un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction;
- De repousser certains insectes par leur goût désagréable, en protégeant la plante.

Autres propriétés intéressantes ont été montrées dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance (figure 17) (Macheix *et al.*, 2005).

Les propriétés de molécules sont exploitées instinctivement par les abeilles pour assainir leur ruche (Anderson *et al.*, 2006).

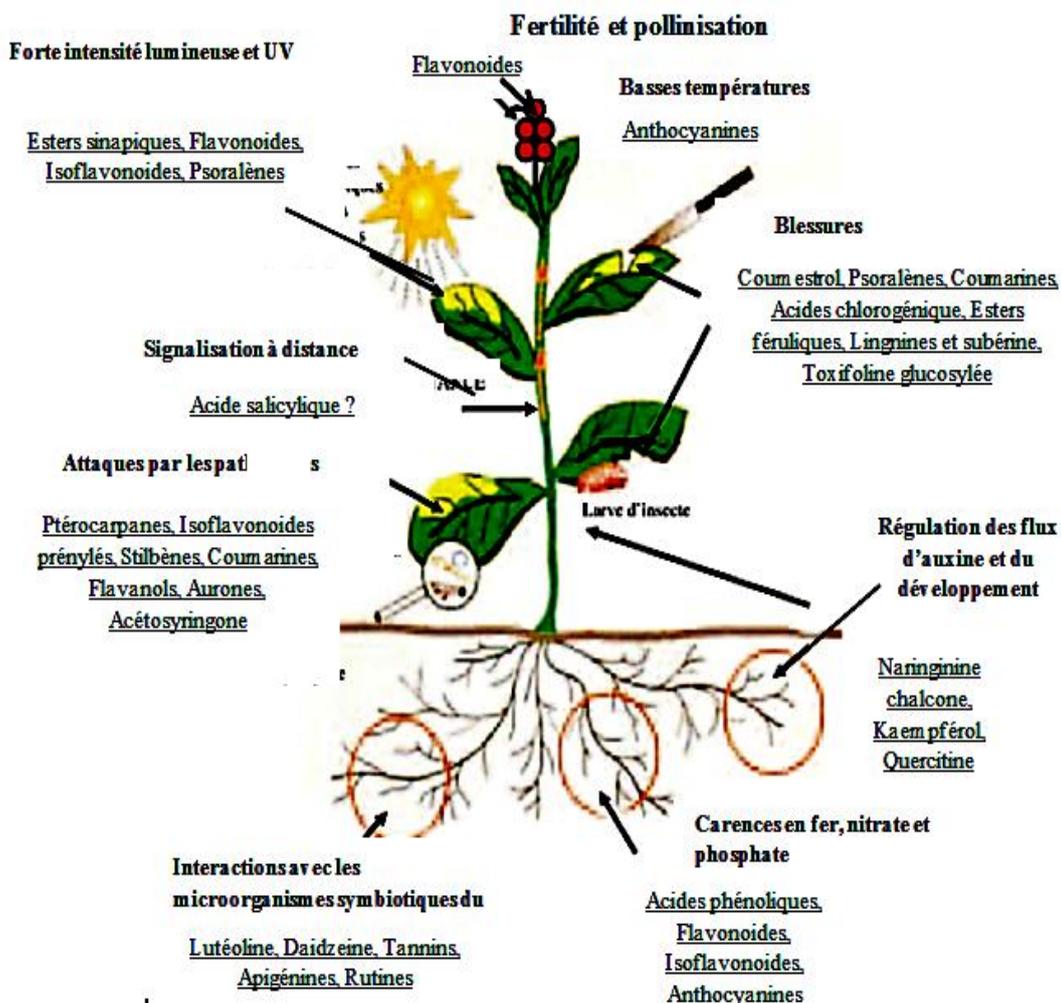


Figure N°16 : Quelques exemples de l'implication des composés phénoliques dans le développement de la plante et dans les interactions avec son environnement (Macheix *et al.*, 2005).

D'après **Rodrigo et Lubey (2014)**, les polyphénols constituent une ligne de défense intéressante contre le stress oxydatif engendré dans les plantes sous l'effet des conditions environnementales (figure 18).

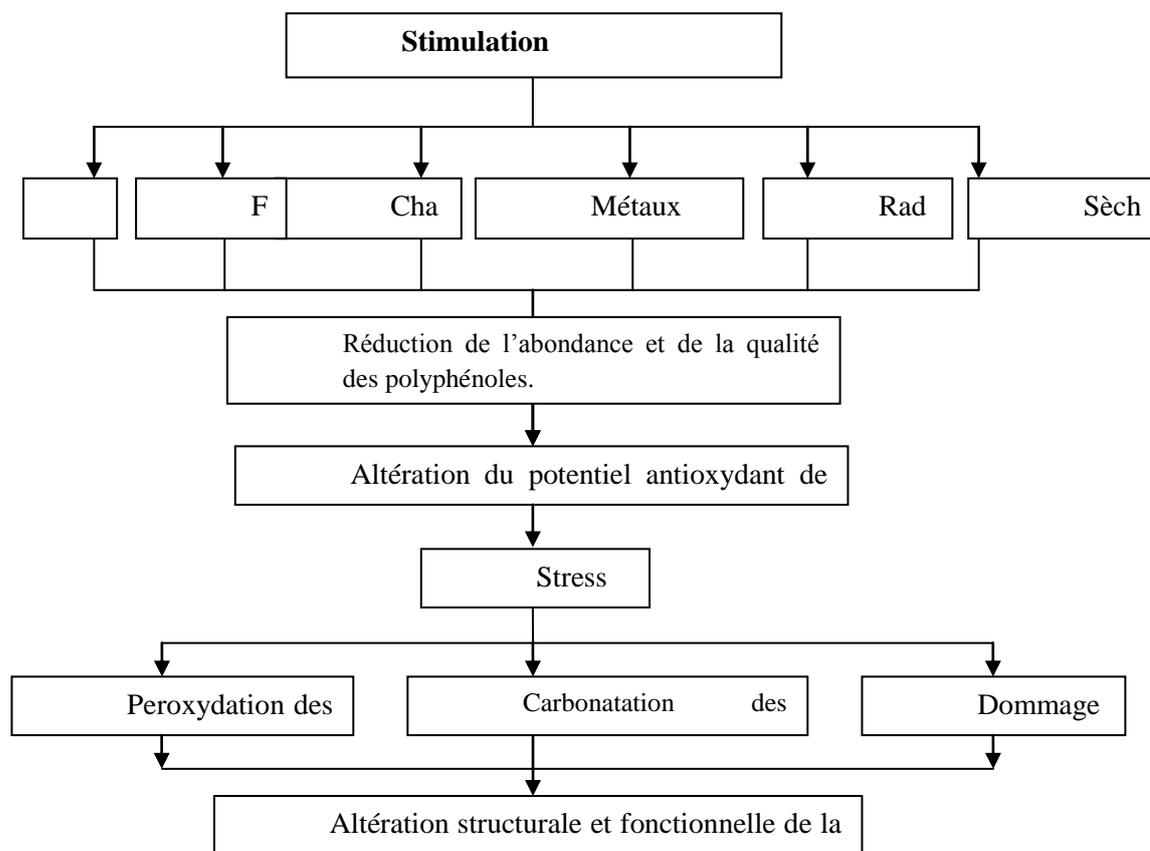


Figure N°17: Rôle de changement de contenu et de la qualité des polyphénols dans les dommages oxydatifs au sein de la plante (**Rodrigo et Lubey. 2014**)

II.2.9. Utilisation des polyphénols comme antioxydants en santé humaine

La plus parts des composés phénoliques présentent des propriétés antioxydantes responsables pour une grande part de leurs propriétés biologiques et de leur utilisation dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmacologiques. Ces composés stabilisent les radicaux libres et par la suite, ils bloquent la propagation de la chaîne radicalaire durant l'oxydation lipidique (**Jovanovic et al, 2002**)

D'après **Andersen (2006)**, les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ERO;
- L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production des ERO;
- La protection des systèmes de défense antioxydants **Edeas et al. (2006)**, dans une étude menée sur la maladie de la goutte, ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur la xanthine oxydase et par conséquent peuvent faire régresser la maladie par la réduction de la concentration d'acide urique et celles du radical superoxyde. Par ailleurs ces composés sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques tels que le Fe^{+2} et le Cu^{+} qui sont responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction de peroxyde d'hydrogène. Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sont illustrés dans la figure 19.

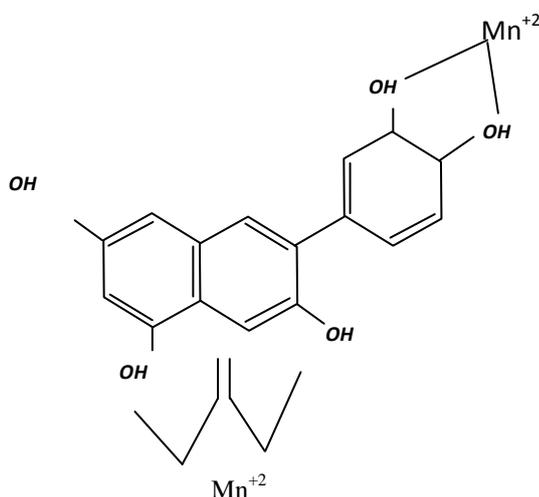


Figure N° 18 : Sites proposes pour la chélation des ions métalliques $-\text{Me}^{n+}$ (**Sarni-manchado et Cheynier, 2006**).

Grâce à leurs faibles potentiels redox, les polyphénols sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (superoxyde, peroxyde, l'alcoxyle et l'hydroxyle) par transfert d'hydrogène (**Sortor et al., 2004**).

Le radical engendré entre en réaction avec un autre radical donne ainsi une molécule stable: quinone (**Shahidi, 1997**); La figure 20 montre un exemple de complexation des polyphénols avec les radicaux libres.

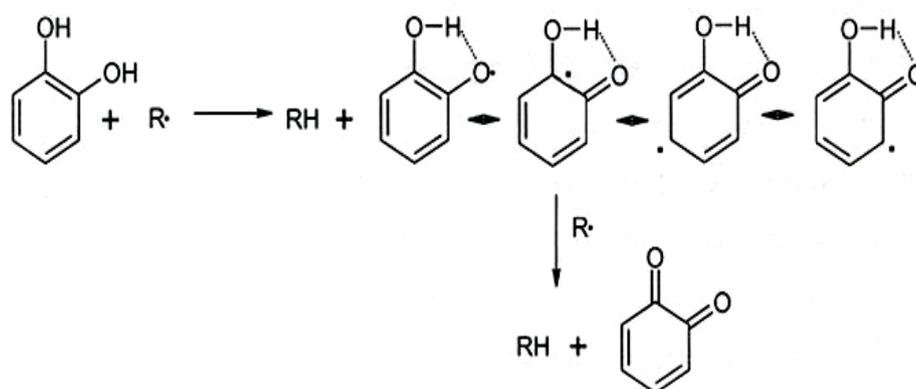


Figure N°19 : Piégeage des radicaux libres (Shahidi, 1997)

Il a été montré que les polyphénols ont *in vitro* une activité antioxydante quatre fois plus puissante que la vitamine C -un antioxydant de référence- et la vitamine E (Mélyls, 2003).

Les études sur la prévention du cancer ont évalué l'impact d'une grande variété des polyphénols particulièrement des flavonoïdes et quelques isoflavones sélectionnés pour leur efficacité dans l'inhibition de cancer dans un certain nombre de modèles animaux. Ces études ont démontré que les flavonoïdes inhibent la cancérogenèse *in vitro* et des preuves substantielles indiquent qu'ils le font aussi *in vivo* (Caltagirone et al., 2000). Les flavonoïdes peuvent inhiber la carcinogenèse en affectant les événements moléculaires dans les étapes d'initiation, de promotion, et de progression. Les études animales et des enquêtes en utilisant différents modèles cellulaires ont suggéré que certains flavonoïdes pourraient inhiber l'initiation de la tumeur ainsi que la progression tumorale (Lin et Weng, 2006).

II.2.10. Autres effets santé des polyphénols

L'effet santé des polyphénols n'est pas réduit seulement à leur rôle antioxydant, ces substances actives sont aussi impliquées dans la prévention de certaines pathologies et jouent un rôle important dans la santé humaine, Le tableau 12 présente quelques exemples des effets de santé des composés phénoliques.

Tableau N°12 : Exemples des effets de santé des composés phénoliques (Macheix *et al*, 2005).

Source	Principaux composés	Effets biologiques
Ginkgo bilobal	Flavonol : mono, di, triglycoside du kaempherol, de la quercetine et de l'isorhamnétine Aglycones de flavonols et flavone	Effet antioxydant ; Action neuroprotectrice Action positive sur la circulation cérébrale.
Soja (jeunes pousses) Glycine max L.	Phytoestrogène du groupe des isoflavonoides (génisteine, daidzaine et glyciteine et leurs dérivés glycolysés et acylés).	Action anticancéreuse Troubles de la ménopause, Diminution du cholestérol sanguin Protection contre les accidents cardiovasculaires.
Lin (graines) Linum sp.	Phytoestrogènes du groupe des lignanes	Action anticancéreuse Prévention des accidents coronariens
Houblon (cônes floraux) Humulus lupulus L. Pin maritime (ecorce) Pinus martima L.	Phytoestrogènes: 8-prénylnaringénine Proantocyanidines (dérives de la catéchine, de l'épicatéchine, de l'épigallocatechine). Proantocyanidines à base de catechine et d'épicatéchine Acide benzoïque et hydroxycyaniques libre et glycosylés	Action ostéogénique Effet antioxydant Effet antioxydant Anti-inflammatoire Inhibition de l'agrégation des plaquettes sanguines
Raisin (pépins et vin) Vitis vinifera L.	Catéchine, épicatechine Proantocyanidines oligomeres, Tannins condensés	Effet antioxydant Protection contre les affections cardiovasculaires
Raisin, vin rouge	Resveratrole	Diminution de l'agrégation des plaquettes sanguines Action anticancéreuse
Podophyllum peltatum L.	Podophyllotoxine (lignane)	Action anticancéreuse et antivirale
Tréfle des prés(jeunes pousses) Trifolium pratense L.	Isoflavones (formononétine, biochanine A)	Action phytoestrogénique voisine de celle du soja
Luzerne Medicago sativa L.	Coumestrol	Propriétés oestrogéniques
Agrumes (fruits) Citrus sp.	O- et C-glycosides de la flavones et flavonones (naringine, diomine, hespéridine) Flavones polyméthoxylés	Anti-inflammatoire Action anticancéreuse Augmentation du tonus veineux

II.2.11. Absorption et métabolisme des polyphénols

Les polyphénols sont présents dans notre alimentation sous plusieurs formes, et cette particularité va leur conférer des métabolismes différents (**Caltagirone et al, 2000 ; Aura, 2012**), dont les voies de dégradation sont déterminées par :

- La spécificité et l'activité des transporteurs ;
- La spécificité et l'activité des enzymes métaboliques ;
- La stabilité des molécules flavonoïques.

C'est ainsi que les formes libres peuvent être directement absorbés au niveau de l'intestin grêle, tandis que les formes glycosylées doivent être hydrolysées par la flore intestinale au niveau du côlon (figure 21), avant de pouvoir être absorbées (**Zhou et al, 2003 ; Barron et al., 2012**). Cependant, les formes libres issues de cette hydrolyse, peuvent aussi être dégradées par la microflore en acides phénoliques, eux-mêmes absorbés ou éliminés via les fèces (**Crespy et al, 2002**). Dans le sang, les polyphénols ne sont pas présents sous leur forme native car ils ont été transformés au niveau du foie par des enzymes dites de conjugaison qui transforment les flavonoïdes en métabolites variés.

Ces métabolites ainsi formés vont atteindre leur tissus cible pour avoir un effet biologique ou bien être éliminés définitivement dans les urines. Toutefois, une fraction peut être déversée au niveau de l'intestin via la bile (**Richelle et al., 2001**). Dans ce dernier cas, les métabolites peuvent être hydrolysés par les enzymes d'origine bactériennes, libérant de nouveau l'aglycone qui éventuellement pourra être réabsorbé, et qui constitue un recyclage entéro-hépatique des polyphénols (**Crespy et al., 2001 ; Aura, 2012**).

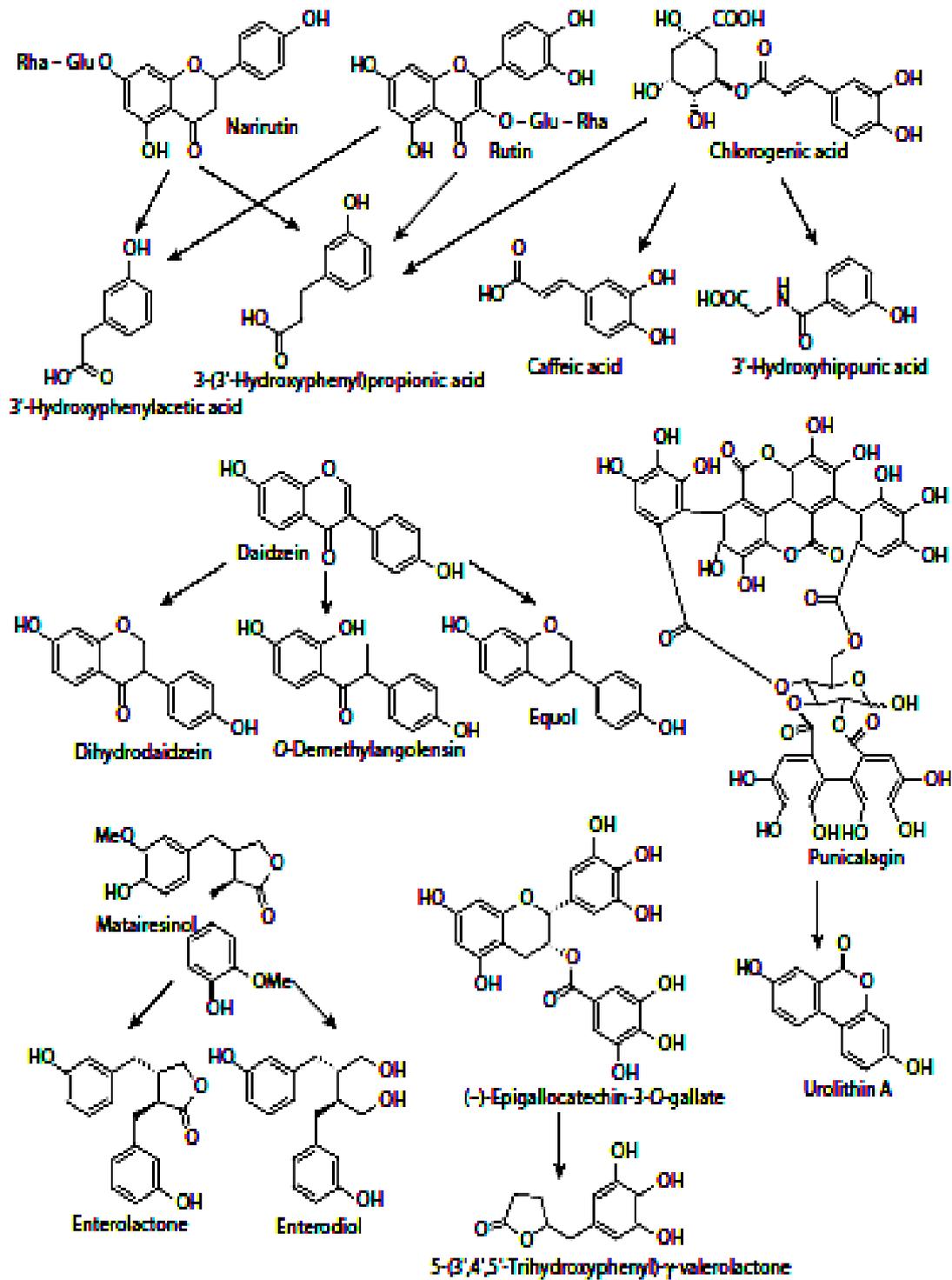


Figure N°20 : Exemple de métabolites phénoliques issus de la fermentation colique des polyphénols (Barron *et al.*, 2012).

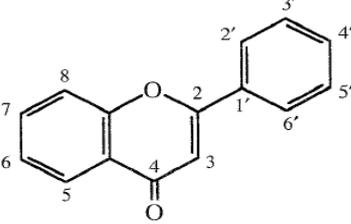
II.2.12. Distribution des flavonoïdes et d'autres polyphénols dans le genre *Thymus*
1. Flavonoïdes

Le terme «flavonoïde» est généralement utilisé pour décrire une large collection de produits naturels qui comprennent un cadre de carbone en C6-C3-C6, ou plus précisément une fonctionnalité phényle benzopyranique (Marais et al., 2006).

Les flavonoïdes sont une classe de métabolites secondaires végétaux issus de la condensation d'un acide cinnamique avec trois groupes de malonyl-CoA réductase. Cette réaction initiale est catalysée par l'enzyme chalcone synthase (Bohm et Stuessy, 2001).

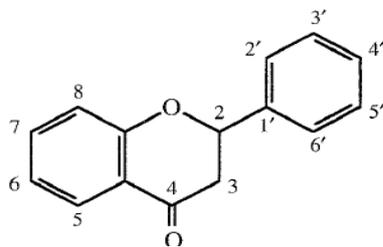
La feuille du thym contient des flavonoïdes (pigments jaunes) aux propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et anti-spasmodiques. Ce sont des dérivés de la quercétine, de l'apigénine et de la lutéoline; ils sont retrouvés dans beaucoup d'autres plantes mais dans la feuille du thym ils ne sont associés ni à des alcaloïdes ni à d'autres composés plus ou moins toxiques (hépatotoxiques ou mutagènes) (Vila, 2002). Les flavonoïdes aglycones et glycosides du genre thymus sont récapitulés respectivement dans les tableaux 13 et 14.

Tableau N°13: Substitution des flavonoïdes aglycones du genre *Thymus* (Vila, 2002)

-OH	-OMe	Nom
(A) Flavones and flavonols		
		
5,7	4'	Acacetin
5,7,4'	-	Apigenin
5,7,4'	3'	Chrysoeriol
5,4'	6,7,3'	Cirsilineol
5,3',4'	6,7	Cirsiliol
5,4'	6,7,8,3'	8-OMe-Cirsilineol
5,4'	6,7	Cirsimaritin
5	6,7,8,3',4'	5-Desmethylnobiletin

5	6,7,3',4'	5-Desmethylsinensetin
5,7,3'	4'	Diosrnetin
5	6,7,8,4'	Gardenin B
5,4'	7	Genkwanin
3,5,7,4'	-	Kaempferol
5,6	7,4'	Ladanein
5,7,3',4'	-	Luteolin
5,6,7,3',4'	-	6-OH-Luteolin
5,3',4'	7	7-OMe-Luteolin
5,3'	7,4'	Pilloin
5,6	7,8,4'	Pebrellin
3,5,7,3',4'	-	Quercetin
5	6,7,4'	Salvigenin
5,6,7,4'	-	Scutellarein
5,3',4'	6,7,8	Sideritoflavone
5,6,4'	7	Sorbifolin
5,6,4'	7,8,3'	Thymonin
5,6,4'	7,8	Thymusin
5,4'	6,7,8	Xanthomicrol
5	7,4'	4'-OMe-Genkwanin
5,4'	7,8	8-OMe-Genkwanin
5,6	7,3',4'	-
5,6	7,8,3',4'	-
5,6,4'	7,3'	-

(B) Flavanones and dihydroflavonols



3,5,7,4'	-	- Dihydrokaempferol
5,7,3',4'	-	Eriodictyol
5,7,4'	-	Naringenin
5,4'	7	Sakuranetin
3,5,7,3',4'	-	Taxifolin
5,4'	6,7,8	Dihydroxanthomicrol
(C) Anthocyanidins		
3,5,7,3',4'	-	Cyanidin

Tableau N°14 : Substitution des flavonoïdes glycosides du genre Thymus (Vila, 2002)

Aglycone	Structure
Apigenine	7-O- glucoside
Apigénine	4'-O- <i>p</i> -cumaroyl glucoside
Diosmetin	7-O- glucuronide
Luteolin	3'-O- alloside
Luteolin	galactoarabinoside
Luteolin	7-O-glucoside
Luteolin	7-O-diglucoside
Luteolin	7-O-glucuronide
Luteolin	7-O-neohesperidoside
Luteolin	7-O-rutinoside
Luteolin	7-O-sambubioside
Luteolin	7-O-xyloside
6-OH-Luteolin	7-O-glucoside
Scutellarein	glucosylglucuronide
Scutellarein	7-O-glucosyl(1- 4)rhamnoside
Apigenin	6,8-di-C-glucoside (Vicenin-2)

1. Acides phénoliques

Les neuf acides phénols présents dans la feuille de thym (**acide chlorogénique, acide caféiques, acide p-coummarique, acide 3,5- dicaffeoylquinique, acide p- hydroxybenzoïque, acide protocatechuique, acide rosmarinique, acide syringique, acide vanilique**) sont d'importants antioxydants. Ils possèdent aussi d'autres potentialités intéressantes, ce sont des inhibiteurs enzymatiques et également antiviraux et cytostatiques (**Vila, 2002**).

Partie II

Etude expérimentale

Chapitre II

Matériel et Méthodes

I.1. Objectifs du travail

Le déséquilibre de la microflore intestinale et la difficulté de sa restauration entraînent une dominance de croissance des bactéries pathogènes; Ainsi, le but de cette étude est d'appliquer une stratégie naturelle permettant la restauration de l'équilibre de la flore intestinale, l'amélioration de l'activité métabolique des bactéries probiotiques et la diminution de celle des bactéries pathogènes; Pour ce faire sept objectifs ont été fixés:

1. Optimisation de la technique d'extraction des polyphénols de *Thymus fontanesii*;
2. Evaluation *in vitro* de potentiel prébiotique de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* sur la viabilité, le développement, l'agrégation et la formation de biofilm des bactéries probiotiques et pathogènes ;
3. Optimisation des conditions de production des exopolysaccharides (EPS) des deux bactéries probiotiques et évaluation *in vitro* de l'effet de l'extrait polyphenolique de *Thymus fontanesii* sur le rendement final de ces biomolécules;
4. Etude *in vivo* de l'effet prébiotique des EPS (produits *in vitro* en présence de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii*) ;
5. Evaluation *in vivo* de l'effet combiné des EPS (EPS produits *in vitro* en présence de l'extrait polyphénolique) et de l'extrait de *Thymus fontanesii*.

Nous avons dans la logique que l'amélioration de la capacité colonisatrice du biofilm positif (croissance, propriétés adhésives et production d'EPS) pourrait permettre à ce dernier de concurer la colonisation et le biofilm du microorganisme pathogène.

I.2. Lieu du travail

La réalisation de cette étude a été accomplie au sein des laboratoires de recherche : « bioconversion, sécurité sanitaire et génie microbiologique ». Université Mustapha Stambouli de Mascara, « amélioration et valorisation des productions animales locales » et « hygiène et pathologie animale » de l'Institut des sciences vétérinaire. Université Ibn Khaldoun et les laboratoires pédagogiques de Microbiologie et de Biochimie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

I.3. MATRIELS BIOLOGIQUE

I.3.1. Souches microbiennes

Les références et la provenance des bactéries probiotiques et pathogènes utilisées dans cette étude sont indiquées dans le tableau 15.

Tableau N°15: Provenance et références des souches bactériennes utilisées

Souche	Collection	Provenance
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Lot N° 02445 (Isolées et caractérisées)	Collection industrielle de provenance de l'Italie
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Lot N° 02445 (Isolées et caractérisées)	Collection industrielle de provenance de l'Italie
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Laboratoire de recherche « amélioration et valorisation des productions animales locales ». Institut des sciences vétérinaire. Université IBN Khaldoun de Tiaret.
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	Laboratoire de recherche « amélioration et valorisation des productions animales locales ». Institut des sciences vétérinaire. Université IBN Khaldoun de Tiaret.
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Laboratoire de recherche « amélioration et valorisation des productions animales locales ». Institut des sciences vétérinaire. Université IBN Khaldoun de Tiaret.
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Laboratoire de recherche « amélioration et valorisation des productions animales locales ». Institut des sciences vétérinaire. Université IBN Khaldoun de Tiaret.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Laboratoire de recherche « amélioration et valorisation des productions animales locales ». Institut des sciences vétérinaire. Université IBN Khaldoun de Tiaret.

I.3.2. Dispositif expérimental

L'espèce animale exploitée est le rat de variété Wistar de sexe mâle et femelle âgés en moyenne de 3 à 4 mois ayant un poids moyen de 250g. Les rats sont maintenus dans les conditions favorables d'élevage (figure 21). (Température, cycle de lumière, humidité) et ils sont nourris avec un aliment standard.

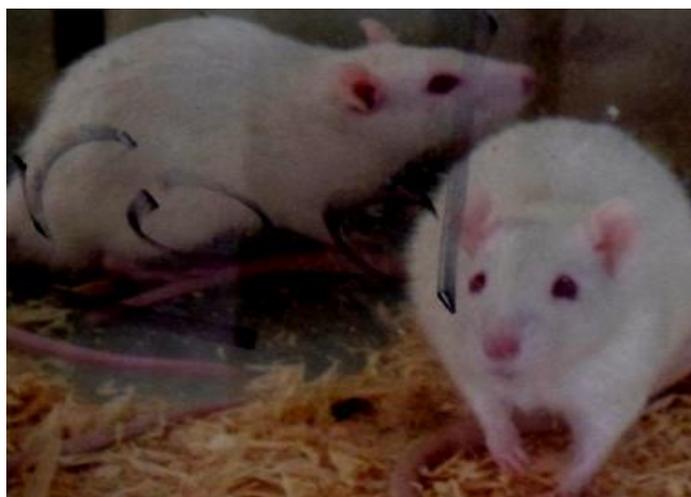


Figure N°21 : Variété du rat Wistar utilisée

Le tableau 16 indique les propriétés des lots et leur distribution.

Tableau N°16: Propriétés et distribution des lots de rats

La taille de la population		Nombre de groupes	Nombre de rats par groupe		Echantillon de sacrifice par semaine		Durée de l'étude
Mâle	Femelle		Mâle	Femelle	Mâle	Femelle	
16	16	4	4	4	1	1	28 jours

I.3.3. Matériel végétal

1. Choix de la plante

Le choix de la plante se rattache tout d'abord à ces bienfaits thérapeutiques et à la richesse de la région puis à des considérations bibliographiques et des travaux expérimentaux qui ont montré sa chimio-diversité de point de vue sa composition en polyphénols et ses activités biologiques diverses.

2. Présentation de la plante

L'espèce *Thymus fontanesii* est une plante endémique d'Algérie et de Tunisie, qui se trouve dans le Tel, au niveau des pelouses et des garrigues. Elle est une plante aromatique, spontanée appartenant à la famille des labiées (Quezel et Santa, 1963).

Appelée communément Zaâteur par les populations locales, la plante entière est très utilisée en médecine traditionnelle comme antispasmodique, carminatif, antiseptique. Elle possède des propriétés carminative, stomachique, expectorante, anthelminthique, diurétique et elle est conseillée contre le rhume, la bronchite et les troubles gastro-intestinaux (Ghannadi et al., 2004 ; Kabouche et al., 2005).

3. Récolte

La plante est récoltée de la région Ammari de Tissemsilt durant la période de floraison pendant mois de juin 2011. Les feuilles et les fleurs de la plante récoltée ont été triées et séchées à l'air libre, à l'abri de la lumière et à la température du laboratoire. Une fois séchées les feuilles et les fleurs sont broyées par un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine de 200 μ m. les échantillons sont ensuite conservés à basse température dans des flacons en verre hermétiquement fermés (figure. 22).



Figure N°22 : Echantillons de *Thymus fontanesii*

I.4. MÉTHODES

I.4.1. Étude phytochimique

I.4.1.1. Procédures d'extraction

a. Macération pendant 24h à température ambiante

Cette méthode est réalisée en adoptant le protocole de **Weihua et al (2008)**.

5g de poudre fine (0.2 mm) de *Thymus fontanesii* ont été macérés dans 100ml d'eau distillée à une température ambiante pendant 24 heures.

b. Extraction par macération à haute température

Deux cycles de macération de deux heures ont été réalisés pour obtenir un extrait phénolique à partir de 5g de plante broyée dans 100 ml d'eau distillée à une température de 70°C (**Ligang et al., 2008**).

c. Extraction par soxhlet

10 g de matière sèche finement broyée (0.2 mm) de *Thymus fontanesii* sont mise à l'extraction par 200 ml d'eau distillée dans un appareil à soxhlet pendant 3h (**Ligang et al., 2008**).

d. Extraction par ultrason

L'extraction par ultrason est réalisée en adoptant la technique décrite par **Wen Huang et al, 2009**) avec quelques modification, 5g de poudre (0.2 mm) de *Thymus fontanesii* sont d'abord macérés dans 100 ml d'eau distillée pendant 2.5 h puis placés dans un bac et exposés à une fréquence ultrasonique de 52 KHZ pendant 45 min. Après filtration, le filtrat est récupéré et le matériel végétal retenu est utilisé pour une deuxième extraction dans les mêmes conditions (volume du solvant, fréquence, température et durée d'exposition).

Après filtration des extraits obtenus par différentes techniques d'extraction et évaporation du solvant (eau distillée) par rotavapeur pour l'estimation des rendements (R) d'extraction en utilisant la formule suivante:

$$R_{(\%)} = (M/M_0) \times 100$$

M₀, M : Poids en gramme du matériel végétal traité et des extraits obtenus respectivement (**Lister et et Wilson, 2001**).

Les extraits sont ensuite reconstitués dans un volume adéquat du même solvant (Eau distillée) et conservés au réfrigérateur en vue de procéder aux différentes manipulations.

I.4.1.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

a. Détermination du taux de polyphénols totaux

Le taux des polyphénols totaux des différents extraits obtenus ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu en suivant la procédure décrite par **Lister et Wilson, (2001)**. 100µl de l'échantillon sont mélangé avec 500µl du réactif Folin–Ciocalteu (10 fois dilué) et 1000µl d'eau distillée, cette solution est mélangée et incubé à la température ambiante pendant 1 min. Ensuite 1500µl d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 20% sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à $\lambda=760\text{nm}$ après incubation à température ambiante pendant 2 h et à l'obscurité, les résultats sont exprimés en mg d'acide gallique (GEA) / g de l'extrait obtenu en utilisant une courbe d'étalonnage tracée à différentes concentrations d'acide gallique comme standard.

b. Dosage des flavonoïdes

Le taux des flavonoïdes ont été déterminés en adoptant la technique décrite par **Brighente et al., (2007)**. À 2 ml de l'échantillon, 2 ml d'une solution d' AlCl_3 sont ajoutés, le mélange est incubé à la température ambiante pendant 1 h, ensuite l'absorbance est mesurée à 415 nm.

Les résultats sont exprimés en mg de quercétine (EQ)/g d'extrait brut. La courbe d'étalonnage des flavonoïdes a été tracée à différentes concentrations de quercétine comme standard.

I.4.2. Testes microbiologiques

I.4.2.1. Purification, identification et caractérisation des souches lactiques

a. Purification et identification

Après la préparation d'une suspension microbienne par solubilisation des ferments lactiques mixtes lyophilisés dans le PBS, la séparation a été réalisée par repiquages successifs du mélange microbien dans le milieu M₁₇ pour l'isolement des *Streptococcus thermophilus* et dans le milieu MRS pour l'isolement du *Lactobacillus bulgaricus*.

Leur identification repose sur les principaux critères biochimiques caractérisant ces bactéries: coloration de Gram, test catalase, test oxydase, test ADH, test ONPG, type fermentaire... etc. Ces tests sont confirmés par l'identification biochimique en utilisant les galeries API : API 50 CHL et API 20 stret (**Gancel et al., 1997**).

b. Caractérisation

Les tests de caractérisation, ont pour but de confirmer le potentiel probiotique des souches lactiques étudiées. **Selon Zhang et al (2008)**, Les principaux critères de sélection des probiotiques étudiés sont :

- croissance et la résistance à différentes températures ;
- résistance aux bas pH ;
- résistance aux sels biliaires ;
- activité antibactérienne ;
- capacité d'agrégation et d'adhérence,
- résistance aux antibiotiques.

I.4.2.2. Préparation des inocula

En considérant que le vieillissement bactérien pourrait influencer les tests et la sensibilité des bactéries aux traitements, une culture jeune de 18h a toujours été réalisée : 100 ml de l'aliquote est étalé sur gélose appropriée et incubé pendant 18h (**Quiryne et al., 2000**).

Les inocula de différentes souches bactériennes sont préparés dans les bouillons standards pour les différents tests et standardisés aux densités optiques de 0.08 sur l'échelle 0.5 de MacFarland (**Andrew et al., 2008**). Les longueurs d'onde optimales d'absorbance sont déterminées par balayage.

I.4.2.3. Effet de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* sur la viabilité et l'agrégation des probiotiques

a. Effet de l'extrait sur la viabilité des probiotiques

L'effet de l'extrait phénolique sur la viabilité des souches a été estimé par la culture des bactéries probiotiques en présence de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* sur la gélose MRS pour *L. bulgaricus* et M₁₇ pour *S. thermophilus* (la composition des milieux est indiquée dans l'annexe).

b. Effet de l'extrait sur l'agrégation des probiotique

Selon **Kos et al., (2003)**, le test d'adhésion regroupe l'auto et la coagrégation, l'étude de l'agrégation consiste à faire décanter dans le PBS des bactéries chacune à part et en suspension mixte. Les bactéries ont été cultivées dans MRS liquide (*Lb. bulgaricus*) et M₁₇ liquide (*S. thermophilus*) et incubé à 37°C/18h. Les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation 5000g pendant 15min. Ces bactéries ont été lavées 3 fois au PBS et centrifugées à 5000g pendant 15min puis les suspensions ont été ajustées à 10⁸ germes/ml.

L'étude de l'agrégation se fait par décantation à la température ambiante et elle est mesurée en termes de cinétique de sédimentation pendant 5h et exprimée en pourcentage d'agrégation à 600nm (**Balakrishna, 2013**).

Les résultats ont été exprimés en appliquant les formules suivantes :

$$\text{Auto-aggrégation: } Ag \% = (1 - A_t/A_0) \times 100$$

A_t : Absorbance après décantation

A₀ : Absorbance avant décantation

$$\text{Co-agrégation : } Ag \% = (A_x + A_y) / 2 - (A_{x+y}) \times 1 / (A_x + A_y) / 2 \times 100$$

X, Y : Souches étudiées

A_x : Absorbance de la souche X

A_y : Absorbance de la souche Y

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

A_x + A_y : Somme des absorbances des deux souches X et Y

I.4.2.4. Effet antibactérien de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii*

L'activité antibactérienne de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* a été estimée vis-à-vis de : *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*.

a. Technique de diffusion sur gélose

La méthode de diffusion a été réalisée conformément au protocole décrit par **Karo et al (2005)**, avec quelques modifications, des boîtes Pétri de 9 cm de diamètre ont été coulées par 20ml de gélose Mueller Hinton. Chaque boîte de Pétri a été inoculée par 100µl d'une suspension bactérienne de 10⁶ germes/ml. Des puits de 8 mm de diamètre ont été réalisés dans la gélose et remplis par 50, 100, 150, 200µl d'extrait polyphénolique. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

L'activité antimicrobienne est déciliée par la présence d'une zone d'inhibition autour du puits. Les diamètres mesurés permettent de déterminer les pourcentages d'inhibition **I%** des différentes souches bactériennes (**Marzouk et al., 2012**).

$$I\% = (D_{\text{test}}/D_{\text{boîte Pétri}}) \times 100$$

D_{test} : Diamètre de la zone d'inhibition.

$D_{\text{boîte Pétri}}$: Diamètre de la boîte de Pétrie.

L'extrait induisant une zone d'inhibition autour de disque étaient considérés comme antibactérien conformément à l'échelle citée par **Mutai et al. (2009)**. Les diamètres des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne ont été classés en cinq catégories:

- Très forte réponse, zone de diamètre ≥ 30 mm
- Réponse forte, zone de diamètre 21mm - 29mm
- Réponse modérée, zone de diamètre de 16mm à 20 mm
- Faible réponse, zone de diamètre de 11mm à 16mm
- Réponse négative: zone de diamètre < 8mm

b. Détermination de CMI et CMB

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme étant la concentration la plus faible à laquelle aucune croissance visible n'a été observée après 24 h d'incubation à 37 °C et la concentration minimale bactéricide (CMB) a été enregistrée comme une plus faible

concentration en extrait qui permet de détruire 99,9 % de la population bactérienne initiale (inoculum) après 24 h d'incubation (**Marzouk et al., 2012**).

La détermination de ces concentrations a été réalisée en adoptant la méthode de (**Devienne et al., 2002 ; Das et al., 2010**), avec une légère modification, elle consiste à incorporer l'extrait aqueux de *Thymus fontanesii* à des concentrations variables (dilution de 10^{-1} à 10^{-9}) dans un volume de 2.8ml de Muller Hinton liquide, et avec un volume de 0.2ml de la suspension bactérienne. Un témoin sans extraits a été effectué pour chaque souche bactérienne. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 24 heures. L'absorbance a été prise à $\lambda = 625\text{nm}$.

Le pourcentage d'inhibition ($I\%$) des différentes souches a également été estimée selon cette formule:

$$I\% = (A - A_t / A) \times 100$$

où A est l'absorbance pour le contrôle (sans extrait), et A_t est l'absorbance de l'échantillon traité par l'extrait (**Weiduo et al., 2006**).

c. Effet de l'extrait polyphénolique sur la formation de biofilm négatif

L'effet de l'extrait sur la formation de biofilm des bactéries pathogènes (*S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* et *B. subtilis*) a été évaluée comme indiqué par **O'tool et al (2011)** et **Waters et al.,(2014)**, avec quelques modifications. Des volumes de 100 μl de chaque suspension ont été déposés dans les puits d'une microplaque à ELISA en présence de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii*. Après incubation pendant une nuit à 37°C, les cultures ont été retirées et les puits ont été rincés deux fois par le tampon phosphate saline (PBS) pour enlever les cellules non adhérentes et séchées pendant 1h. Ensuite, 125 μl de cristal violet ont été ajoutés dans chaque puits et les plaques ont été incubées à la température de laboratoire pendant 15 minutes. Après décantation, les microplaques ont été lavées 3 à 4 fois avec de l'eau distillée stérile.

Après la prise de photo, les souches bactériennes adhérentes ont été détachées par incubation à la température de laboratoire pendant 15 min en présence de 125 μl d'acide acétique (30 %). Le contenu des puits est ensuite aspiré pour mesurer la densité optique à $\lambda = 492\text{ nm}$. Un témoin sans extrait a été réalisé pour chaque germe. Le pourcentage de réduction de la formation de biofilm ($R_b\%$) de chacune des bactéries en a été calculé selon la formule suivante : (**Marino et al., 2010**).

$$R_b \% = 100 - [(DO_{492 \text{ nm}} \text{ avec extraire} / DO_{492 \text{ nm}} \text{ sans extrait}) \times 100]$$

I.4.2.5. Optimisation des conditions de production des exopolysaccharides

Selon **De Vuyst et al., (1999)**, la cinétique de production des EPS et leur rendement dépendent fortement des conditions de fermentation, et des paramètres physicochimiques (pH, température, durée d'incubation, taux d'oxygène, la composition du milieu et le rapport C/N).

L'optimisation est une étape qui permet d'évaluer le taux de production en fonction des différentes conditions de culture. Elle consiste à faire varier successivement chacun des facteurs en maintenant les autres constants (**Larpen et Sanglier, 1989**).

Les paramètres faisant objet de l'optimisation sont : inoculum, pH, température, taux d'oxygène, la durée d'incubation et la concentration en source de carbone.

Les cultures sont effectuées en batch dans des flacons de 250 ml où tous les éléments nutritifs sont introduits en une seule fois au départ de la fermentation.

1. Optimisation de l'inoculum : Selon **Larpen et Sanglier (1989)**, le succès de toute expérience et de toute production dépend de la quantité de l'inoculum. En effet, on fait varier le nombre de bactéries entre 10^5 à 10^8 dont l'écart est de 10. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 h.

2. Optimisation du milieu de production : Afin de choisir le milieu le plus convenable à la production des EPS, trois milieux ont été testés : MRS, M17 et le milieu hypersaccharosé (composition en annexe).

3. Optimisation des conditions physicochimiques : L'optimisation des facteurs physicochimiques s'effectue à des valeurs optimales de l'inoculum :

- pH

Le pH du milieu de culture synthétisé est de 4 à 4,5. Afin de déterminer l'effet du pH sur la production, le rendement a été calculé à pH 3, 4,5, 6,5. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 h (**Kimmel et al., 1998**).

-Température

La température optimale correspondante au meilleur rendement en EPS sera définie en incubant les cultures à différentes températures (25°,37°C, 45°C, 50°C) (**De Vuyst et al., 1999**). L'incubation se fait pendant 24 h en gardant l'optimum du pH obtenu précédemment.

- Durée d'incubation

En vue d'identifier la durée d'incubation optimale, les durées d'incubation testées sont : 8, 12, 24 et 48h. L'incubation des cultures s'effectue à l'optimum de la température et du pH.

- Taux d'oxygène

La production des EPS est déterminée en cultivant les deux souches aux conditions optimales de pH, température, durée d'incubation en présence et en absence d'oxygène (**De Vuyst et al, 1999**).

4. **Rapport C/N** : Afin de déterminer l'effet de la concentration en carbone sur la production des EPS, le sucre est incorporé à différentes concentrations dans le milieu de culture idéal en fixant la concentration en azote (**De Vuyst et al., 1999**). Quatre concentrations ont été testées : 30g/l ; 50 g/l ; 70 g/l ; 90 g/l.

1.4.2.6. Effet de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* sur la production des EPS

L'effet de l'extrait polyphénolique sur la production des EPS a été testé en incubant les inocula dans un milieu supplémenté par l'extrait à des concentrations croissantes 50, 100, 200 µl et dans des conditions de cultures optimales.

1.4.2.6. Production finale des EPS

La production finale des EPS a été réalisée dans les conditions de culture optimisées et en présence de l'extrait de *Thymus fontanesii* à une concentration de 1mg/ml et volume de 100µl.

1.4.2.7. Evaluation de l'effet de l'acide gallique sur le développement, le biofilm et la production des EPS chez *S. thermophilus*

Les mêmes protocoles sont adoptés pour tester une concentration de 1mg/ml d'acide gallique sur le développement, le biofilm et la production des EPS chez *S. thermophilus*.

I.4.2.8. Estimation du rendement en EPS

1. Extraction des EPS

L'extraction des EPS a été réalisée en adoptant la technique de **Ricciardi et al., (2000)** en suivant ces étapes:

- Récupération des cellules bactériennes par centrifugation (5000 g/10min) après ébullition à 80°C pendant 15min;
- Précipitation des EPS :
 - 1- Ultrafiltration du surnageant à + 4°C ;
 - 2- Addition de trois volumes d'éthanol à -20°C ;
 - 3- Centrifugation à 10.000 g/20 min à + 4°C ;
 - 4- Redissolution du culot dans trois volumes d'éthanol et centrifugation aux mêmes conditions ;
 - 5- Redissolution du culot obtenu dans de l'eau physiologique stérile.

2. Dosage et quantification des eps

La quantification des EPS a été effectuée par la méthode colorimétrique Acide sulfurique-phénol décrite par **Dubois et al (1956)** Dosage des sucres totaux.

I.5. EVALUATION *IN VIVO* DE L'EFFET COMBINÉ DES EPS ET DE L'EXTRAIT DE *THYMUS FONTANESII*

L'évaluation *in vivo* de l'effet des EPS produits en présence de l'extrait de *Thymus fontanesii* a été réalisée selon le protocole suivant:

- Culture des probiotiques en présence de l'extrait polyphénolique et dans des conditions de cultures optimales de production des exopolysaccharides ;
- Estimation des quantités des exopolysaccharides produites par les deux probiotiques ;
- Evaluation de l'effet des EPS produits en présence de l'extrait selon le protocole suivant :

1. Répartition et organisation des groupes de rats : 32 rats mâles et femelles, ont été utilisés, ils sont répartis en 4 groupes dont 8 rats chacun.

Groupe A : Témoin négatif (aucun traitement n'a été réalisé)

Groupe B : Rats traités par une culture de *S. thermophilus* contenant 0.219g/ml d'EPS (Témoin positif);

Groupe C : Rats traités par l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* à raison 1mg/ml ;

Groupe D : Rats traités par une culture de *S. thermophilus* contenant 0.826g/ml d'EPS et par l'extrait de *Thymus fontanesii*.

L'introduction de la culture et de l'extrait de *Thymus fontanesii* a été réalisée une heure avant le repas et par gavage à raison de 100 µl de chaque traitement.

2. Suivi de l'évolution du poids corporel des rats durant le mois de traitement;

3. Evaluation de la distribution de quelques bactéries font partie de la flore intestinale et de la translocation bactérienne selon les étapes suivantes :

- Sacrifice et dissection : deux rats (une femelle et un mal) de chaque groupe ont constitué l'objet de sacrifice chaque semaine durant le mois de traitement
- Observation et organisation du tube digestif
- Préparation des échantillons à partir des différents organes (colon, intestin grêle, rate, reins, foie, poumons). Les organes sont séparés, nettoyés et broyés dans une solution de Ringer et conservés à une température de congélation.
- Après filtration et dilution, des cultures bactériennes ont été réalisées dans des milieux de culture sélectifs et ordinaire: MRS, Columbia modifié, Chapman, Hektoen et gélose nutritive.

I.6. Traitement des données

Tous les tests ont été réalisés en duplique et les moyennes +/- écart-types standards sont présentés dans les graphes. La significativité des données est obtenue par le test ANOVA, une direction et le test post-hoc de **Bonferroni** et au moins une confirmation (répétition) est conduite pour chaque test.

La cinétique d'agrégation est analysée par modélisation suivant les principes décrites dans **Motulsky et Christopoulos, « Fitting model to biological data using linear and nonlinear regression »**. L'équation logistique générale $a(t) = A / (B + C * e^{-\mu t})$ à quatre paramètres a été utilisée

Chapitre II

Résultats et Discussion

II.1. RESULTATS DE L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE

II.1.1. Résultats d'optimisation de la technique d'extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée en appliquant quatre techniques (classiques et alternative). Le meilleur rendement est enregistré par la sonication (52 KHZ, 45min, 50°C) à savoir 41,5% alors que ceux obtenus par macération à la température de laboratoire (M24h), à haute température (M 2h) et par soxhlet sont respectivement : 21, 30 et 32 %. Les résultats sont présentés dans la figure 23.

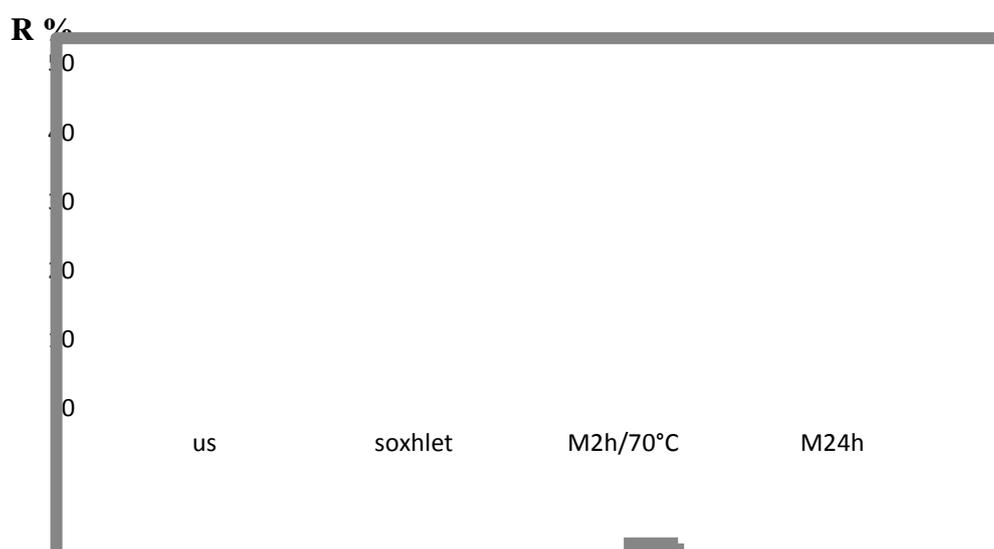


Figure N°23 : Rendements d'extraction

Lors d'une étude menée par **Wen- Huang et al.,(2009)** sur l'extraction à partir de *Folium eucommiae* en utilisant quatre méthodes, le rendement le plus élevé a été obtenu par sonication (41%). **Khan et al., (2010)** ont aussi indiqué que la forte teneur en phénols totaux, et le meilleur rendement ont été obtenues par sonication. De leur part, **Da portor et al., (2013)**, ont confirmé l'efficacité des ultrasons par rapport aux procédés classiques, pour l'extraction de substances végétales (huile / polyphénols) avec une consommation de solvant plus faible et un temps d'extraction plus court. D'après eux, l'action des vibrations ultrasoniques produisent l'effondrement des bulles et améliorent ainsi la dispersion des cellules et l'efficacité de l'extraction.

II.1.2. Résultats de dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Les résultats de la quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes sont illustrés sur la figure 24.

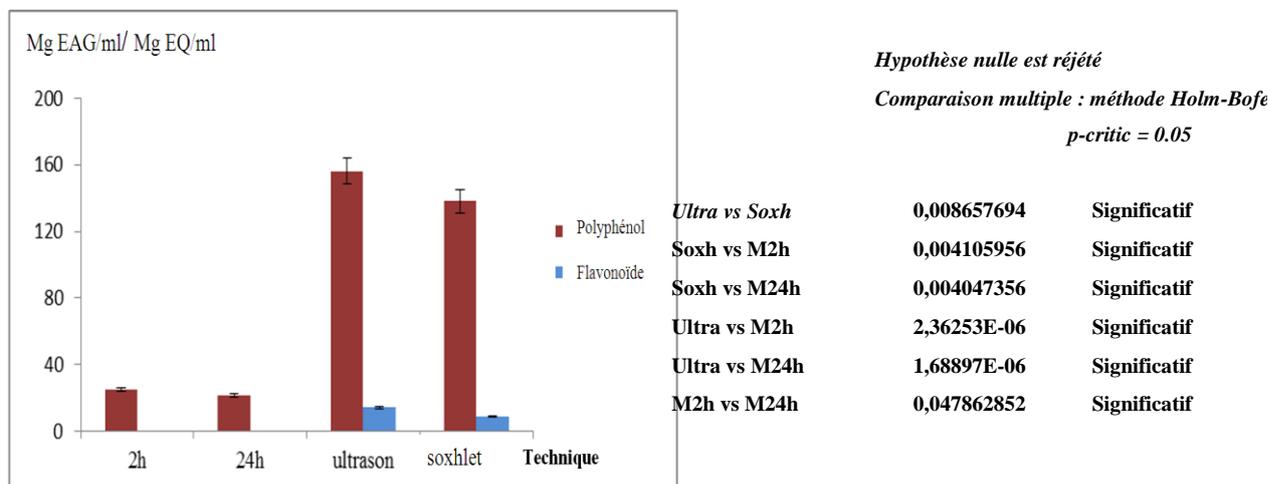


Figure N°24: Taux des polyphénols (EAG/ml) et des flavonoïdes (EQ/ml) de l'extrait de *Thymus fontanesii*

Il est évident que les taux élevés de polyphénols totaux et des flavonoïdes sont obtenus par ultrasons. Ces taux étant de 156 EAG mg / g d'extrait brut et 14 EQ mg / g d'extrait brut pour les polyphénols et les flavonoïdes respectivement.

D'autres études, ont également montré que les concentrations en composés phénoliques sont plus importantes lorsque la méthode d'extraction appliquée est la sonication. **Jordan et al. (2009)**, en utilisant cette technique ont obtenu une teneur de polyphénol de 108 à 122 mg EAG / g d'extrait sec à partir de l'espèce *Thymus zygis ssp. gracilis*. **Chemat et al., (2011)**, lors d'une extraction par macération et ultrasons, des taux de polyphenols de $89,6 \pm 2,3$ et $121 \pm 3,8$ mg EAG / g d'extrait sec ont été enregistrés. **Hossain et al., (2012)** souligne que les concentrations les plus élevées de flavonols (fait partie de la famille des polyphénols) ont été obtenues par ultrasons.

II.2. RESULTATS DES TESTS MICROBIOLOGIQUES

II.2.1. Résultats de l'effet de l'extrait polyphénolique de *T. fontanesii* sur l'agrégation des probiotiques

Le phénomène d'adhésion, qui permet aux bactéries de coloniser un habitat et de s'y maintenir, procure aux espèces un avantage écologique, en effet, les cellules bactériennes sont directement en contact avec leur substrat ce qui évite la diffusion des enzymes dans le milieu extérieur (Akers et al., 2015). Ce phénomène serait un processus dynamique complexe dont lequel de nombreux facteurs physico-chimiques peuvent être impliqués : la nature de la surface notamment sa rugosité et son hydrophobicité, les conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité du milieu, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique du fluide (Beloin et al., 2008, Auger, 2012).

La capacité des souches à s'adhérer à la muqueuse gastro-intestinale est un des principaux critères de sélection des bactéries probiotiques. Cette capacité est conditionnée par une bonne agrégation bactérienne (Kos et al., 2003).

L'effet prébiotique *in vitro* de l'extrait de *Thymus fontanesii* a été évalué sur le développement (viabilité) et l'agrégation des probiotiques (auto et coagrégation). Le test de viabilité, qui a été réalisée, a montré que l'incorporation de 100 µl de l'extrait a amélioré le développement des deux souches probiotiques et aucun effet n'a été enregistré à 200µl. Ming et al. (2012) ont montré que l'extrait phénolique de *Litsea coreana* a stimulé la croissance de *S. thermophilus*, *L. acidophilus* et *L. casei* et restait sans effet sur *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Bifidobacterium* sp. De leur part, Chine el al. (2012) ont confirmé que l'extrait polyphénolique des fleurs de *Sesbania grandiflora* riche en polyphénols a montré un effet stimulateur sur la croissance de *L. acidophilus*.

Alberto et al., (2007), ont rapporté que *L. hilgardii*, isolé à partir du vin, a montré une croissance importante en présence de l'acide gallique et la catéchine à différentes concentrations.

Engels et al.,(2011), ont rapporté que les composés polyphenoliques de *Rubus* et *Fragaria* inhibent la croissance des bactéries à Gram négatif (Salmonelles, staphylocoques,

Helicobacter, *E. coli*, *Clostridium*, *Campylobacter* et *Bacillus*) et restent sans effet sur les bactéries à Gram positif bénéfiques comme les probiotiques.

Les résultats de l'effet de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* sur l'auto et la coaggregation, présentés dans la figure 25, illustrent l'effet stimulateur de l'extrait sur l'agrégation des probiotiques où l'autoaggrégation a passé de 30.625% à 60.06% % et de 45.93 à 68,5 % pour *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* respectivement. La coaggregation entre *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* a également augmentée en présence de l'extrait polyphénolique de 72,35 % à 92,3 %.

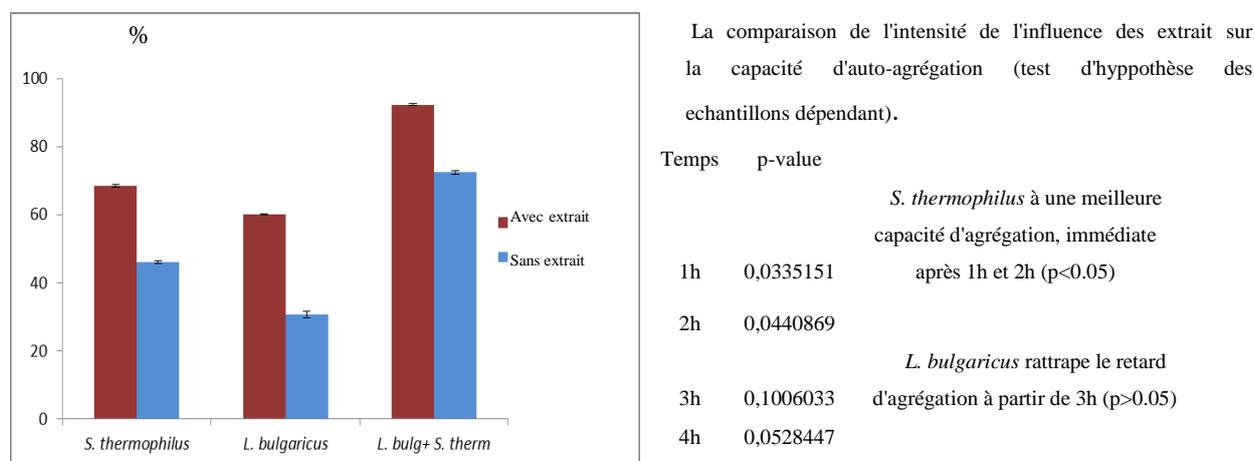


Figure N°25 : Résultats de l'effet de l'extrait de *T. fontanesii* sur l'agrégation des probiotiques

Parkar et al., (2008), ont montré que différents polyphénols extraits de fruits, y compris l'acide caféique, la catéchine, l'epicatehecin, l'acide coumarique, la phloridzine, la rutine, la naringénine, la daidzéine, la génistéine, et la quercétine, l'acide gallique ont inhibé la croissance et l'adhérence des bactéries pathogènes à des cellules humaines Caco-2 et ont amélioré la prolifération et l'adhésion d'une souche de *Lactobacillus rhamnosus*.

II.2.2. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait de *Thymus fontanesii* in vitro

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait de *Thymus fontanesii* sur cinq bactéries pathogènes (*S. aureus* 25923, *B. cereus* 11778, *B. subtilis* 3633, *E. coli* 25922 et *P. aeruginosa* 27853) a été réalisée par la méthode d'aromatogramme. La propriété antibactérienne de l'extrait a été obtenue en mesurant le pourcentage d'inhibition en utilisant les diamètres des zones d'inhibition (mm).

Les pourcentages d'inhibition des souches bactériennes testées par l'extrait polyphénolique (50 et 100µl) sont résumés dans la figure 26.

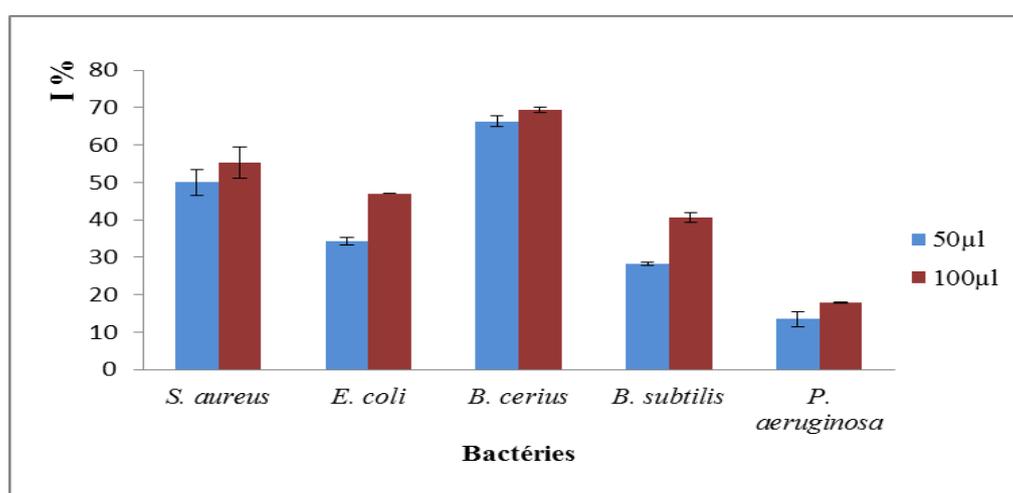


Figure N°26 : Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait de *Thymus fontanesii* in vitro

II.2.3. Résultats de détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricide

Les résultats de la détermination de la CMI et CMB de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* contre : *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* et *B. cereus* sont présentés dans le tableau 17.

Tableau N°17 : Détermination de la CMI en milieu liquide des différentes bactéries

	1mg/ml	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	Contrôle 0 mg/ml
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+++
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+++
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+++	+++

D'après le tableau 17, l'extrait a une activité inhibitrice importante contre les bactéries testées. Ainsi, *S. aureus* est avéré être la plus sensible, la souche a été complètement inhibée à partir d'une concentration de 10^{-7} mg / ml. La concentration de 10^{-6} mg / ml était suffisante pour inhiber complètement la croissance de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*. Alors qu'une concentration de 10^{-5} mg / ml était nécessaire pour inhiber complètement *E. coli*. Il a été confirmé que les bactéries entéropathogènes à **Gram Positif** tels que *S. aureus* étaient plus sensibles que les bactéries **Gram négatif** telles que *E. coli* (Parker *et al.*, 2008 ; Loziene *et al.*, 2007).

Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides sont présentées dans le tableau 18.

Tableau N°18 : concentrations minimales inhibitrices et bactéricides déterminées sur un milieu liquide

	Souches à Gram ⁺			Souche à Gram ⁻
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
CMI	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-7}
CMB	10^{-7}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-5}

En dépit de la variation des CMI et CMB d'un micro-organisme à un autre, dans certains cas elles sont égales et indiquant un puissant effet bactéricide. En effet, lorsque le rapport CMB / CMI est inférieur ou égale à 1 les polyphénols sont microbiocide, tandis que ce rapport est supérieur à 1, les polyphénols sont microbiostatique (Karou *et al.*, 2005). Le tableau 19 montre les différents rapports CMB / CMI de l'extrait de *Thymus fontanesii*.

Tableau N °19: Rapports CMB / CMI et interprétation de l'effet

Souches	CMB/CMI	Effet
<i>S. aureus</i>	10	Bacteriostatique
<i>B. subtilis</i>	10^2	Bacteriostatique
<i>B. cereus</i>	10^2	Bacteriostatique
<i>E. coli</i>	10^2	Bacteriostatique

A partir du tableau, il est notable que l'extrait de *Thymus fontanesii* a un effet bactériostatique sur toutes les souches testées.

L'analyse du tableau 19 montre que les concentrations de l'extrait de *Thymus fontanesii* qui ont des effets antibactériens (CMI et CMB), contre les bactéries à Gram négatif (*E. coli*) sont légèrement supérieures à celles des bactéries à Gram positif de *S. aureus*, *B. subtilis* et *Bacillus cereus*. Ces résultats confirment ceux obtenus en milieu solide qui ont montré que les coefficients d'inhibitions des bactéries à Gram négatif (I%) sont plus faibles.

En conclusion, la réponse des différentes souches (Gram+ et Gram-) contre l'effet toxique de l'extrait de *Thymus fontanesii* en milieu solide et liquide était légèrement différente, les bactéries à Gram positif se sont révélées plus sensibles.

Nombreuses études ont documenté l'efficacité des polyphénols contre les bactéries pathogènes en milieu solide et liquide, en particulier *S.aureus* et *E. coli*; l'étude de l'effet de polyphénols sur des bactéries G+ et G- menée par **Puupponem-Pimia et al (2001)** a confirmé que ces composés phénoliques ont pu inhiber *E. coli* et *Salmonella enterica*. **Tosi et al. (2007)** ont démontré aussi que l'extrait de propolis riche en polyphénols présentait une activité importante contre plusieurs souches d'*E. coli*. Une autre étude a rapporté que des flavonoïdes purs et des composés polyphénoliques de différents vins ont été efficaces contre plusieurs souches, parmi elles *S. aureus* (**Vaquero et al., 2007**).

D'autre part, l'influence des polyphénols sur la croissance et l'adhérence des souches commensales d'*E. coli* et d'autres bactéries pathogènes (*S. aureus* et *S. typhimurium*) du tractus gastro-intestinal humain a été confirmé (**Parkar et al., 2008**).

L'activité antibactérienne de plusieurs extraits obtenus à partir de cinq chémotypes du *Thymus pulegioides* L dépendait du chémotype des plantes, la technique de préparation de l'extrait, le solvant utilisé et enfin la sensibilité des bactéries (**Loziene et al., 2007**). Alors que l'activité antibactérienne puissante de *Thymus fontanesii* est en relation avec la teneur élevée en polyphénols (**Ettayebi et al., 2000 ; Bounatirou et al., 2007**). Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus l'efficacité antimicrobienne de l'extrait est importante (**Cosentino et al., 1999**).

Pour les deux tests réalisés (diffusion en milieu solide et la macrodilution en milieu liquide), les bactéries Gram positif étaient plus sensibles ce qui est en accord avec plusieurs travaux (**Puupponem-Pimia et al., 2001 ; Loziene et al., 2007 ; Parker et al., 2008 ; Saavedra et al., 2010**). Cette différence de sensibilité peut être expliquée par la diversité structurale de la paroi de ces différentes catégories de bactéries. La faible sensibilité de bactéries à Gram négatif est expliquée par la présence d'une seconde membrane de lipopolysaccharide agissant comme une barrière. De plus, la membrane externe des bactéries Gram négatif est plus riche en protéines qui les rendent plus hydrophile ce qui empêche les composés hydrophobes à pénétrer dans la couche de phospholipide et d'exercer leur activité antimicrobienne à l'intérieur de la cellule microbienne (**Ikigai et al., 1993**).

Différents travaux ont montré que les polyphénols présentent principalement comme hétérosides et/ou associés à différents acides organiques et/ou complexes molécules polymérisés avec un poids moléculaire élevé, telles que les tanins (**Quindeau et al., 2011 ; D'archivio et al., 2007**), ce qui explique en partie leur activité antimicrobienne (complexations avec les sucres de milieu qui font partie de la constitution physiologique et métabolique du germe).

En résumé, plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'effet inhibiteur de la croissance bactérienne par les polyphénols telle que la déstabilisation de la membrane cytoplasmique, la perméabilité de la membrane cellulaire par la formation de complexe avec les protéines et certains constituants de la paroi cellulaire menant à la lyse et l'inhibition des enzymes microbiennes extracellulaires (les enzymes menant à la formation des polysaccharides extracellulaires), les actions directes sur le métabolisme microbien, ou la privation des substrats nécessaires à la croissance microbienne, surtout les sucres et les micronutriments minéral essentiel tels que le fer et le zinc (chélation des métaux) dont l'épuisement peut limiter sévèrement la croissance bactérienne. De plus, la complexation des molécules polyphénoliques entre elles permet fortement l'inhibition de certains facteurs de virulence des microorganismes (tels que l'inhibition de la formation de biofilm, réduction des ligands d'adhérence de hôte et neutralisation de toxines bactériennes) (**Loziene et al., 2007 ; Tosi et al., 2007 ; Marino et al., 2010 ; Rodriguez et al., 2010**).

II.2.4. Résultats de l'effet de l'extrait de *Thymus fontanesii* sur l'autoagrégation des pathogènes et la formation de biofilm négatif

L'importance de l'adhésion a été clairement démontrée pour les bactéries pathogènes. Celles qui s'attachent à la surface intestinale et produisent des infections intestinales. Sous forme de biofilm, ces bactéries seraient de 50 à 500 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens que sous leur forme planctonique (**Bjarnsholt, 2013**).

Les résultats de l'effet de l'extrait de *Thymus fontanesii* sur l'autoagrégation et la formation de biofilm de *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *B. subtilis* sont indiqués dans les figures 27 et 28.

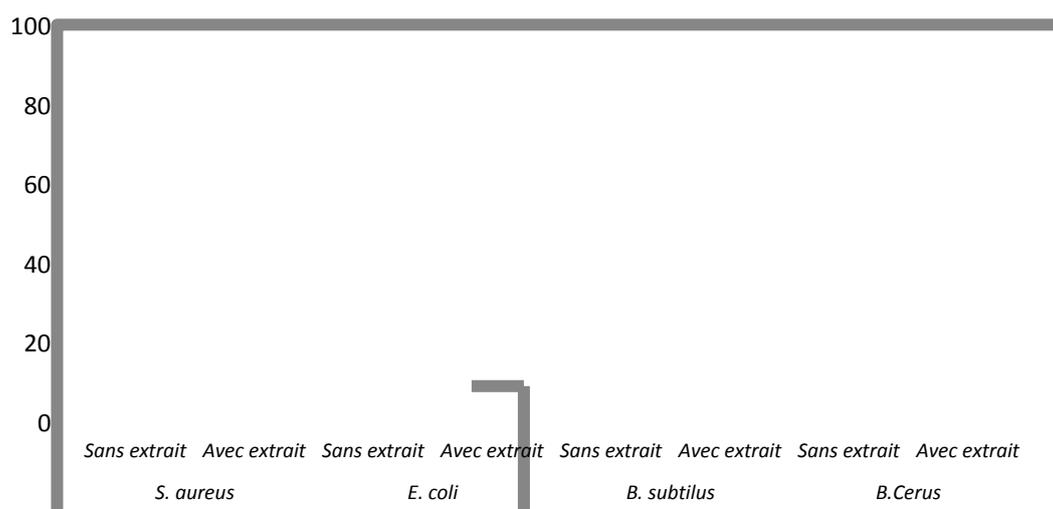
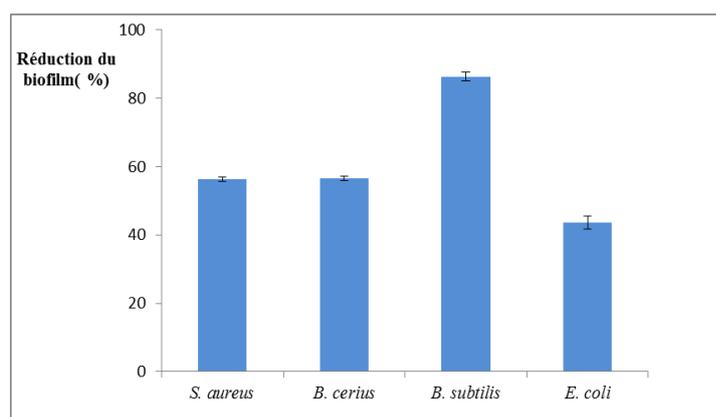


Figure N°27 : Résultats de l'effet de l'extrait de *Thymus fontanesii* sur l'autoagrégation des bactéries pathogènes testées



Comparaison multiple par la methode Holm-Bonferroni. p-critique 0.05

<i>S aureus</i> vs <i>E coli</i>	4,41995E-06	Significatif
<i>S aureus</i> vs <i>B subtilis</i>	1,65252E-06	Significatif
<i>S aureus</i> vs <i>B cereus</i>	4,6388E-05	Significatif
<i>E coli</i> vs <i>B subtilis</i>	0,086708872	No significatif
<i>E. coli</i> vs <i>B cereus</i>	0,001265899	Significatif
<i>B subtilis</i> vs <i>B cereus</i>	0,001832106	Significatif

Figure N°28 : Pourcentages de réduction de biofilm des différentes bactéries pathogènes testés en présence de 100µl de l'extrait de *Thymus fontanesii*

L'autoagrégation et la formation de biofilm des souches pathogènes testées ont été réduites en présence de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii*.

Les pourcentages de réduction des biofilms négatifs sont: 43,54, 56,31, 56,59 et 86,36 % respectivement pour *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* et *B. cereus* après 24h d'incubation.

Marino et al., (2010) ont montré que l'extrait polyphénolique de *Juniperus* réduit la formation de biofilm de *S. aureus* (ATCC 6538) avec des pourcentages de 12 et de 30% après 7 et 24h d'incubation. De leur part, **Verhelst et al., (2010)** ont indiqué que des extraits polyphénoliques exercent des effets inhibiteurs sur la toxine thermolabile et réduisent fortement la fixation d'ETEC. **Verhelst et al., (2013)** ont confirmé que trois polyphénols sur

sept ont inhibé efficacement la liaison de LT à GM1 et freinent l'induction de l'AMPc dans des cellules

II.2.5. Résultats de l'effet de l'extrait de *Thymus fontanesii* sur la production des exopolysaccharides

II.2.5.1. Résultats d'optimisation des conditions de culture

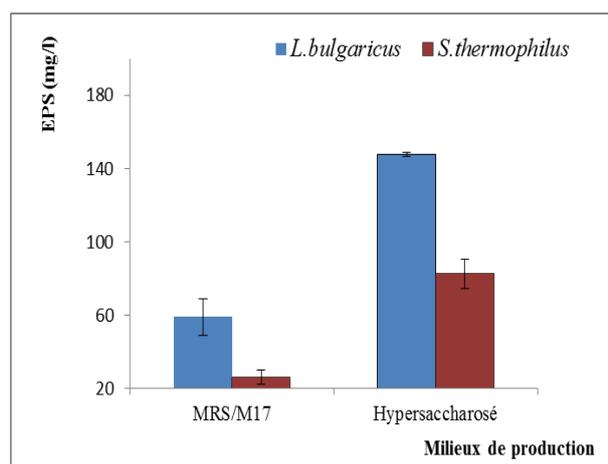
Plusieurs études ont rapporté que la production des EPS par les bactéries lactiques varie énormément et dépend des conditions de culture et la composition de milieu de culture (Kimmel *et al.*, 1998 ; Patel *et al.*, 2012 ; Haj-Mustafa., 2015 ; Li *et al.*, 2016), ce qui rend l'optimisation des paramètres de production une démarche importante pour un rendement maximal.

Les paramètres faisant partie de l'optimisation dans plusieurs études publiées sont souvent: l'inoculum, la température, le pH, la tension oxygénique, la durée d'incubation et le rapport C/N (Aslim *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2012).

Les résultats d'optimisation des conditions physicochimiques et organiques pour la production des EPS par les ferments étudiées sont élucidés dans cette partie.

1. Optimisation du milieu de production

Rappelons que la production d'EPS été évaluée dans des milieux différents : MRS/M17 et un milieu hypersaccharosé. Les résultats d'optimisation de milieu de production sont présentés dans la figure 29, qui montrent que le milieu hypersaccharosé était le plus convenable pour la production des EPS pour les deux souches (148 mg /L contre 58 mg /L dans le milieu MRS pour *L. bulgaricus* et 82 mg/L contre 26 mg/L dans M17 pour *S. thermophilus* respectivement). Il est également intéressant de noter que la production des EPS est plus importante chez *L. bulgaricus* que chez *S. thermophilus*.



$\Delta P_{bulg} = 88,9801$ p-value = 0,00323815
 $\Delta P_{therm} = 56,4508$ p-value = 0,00601143
 p-value (therm vs bulg)MRS = 0,02501273

L. bulgaricus a une meilleure capacité de synthèse des EPS ($p=0.2501$) et cela est encore plus amélioré par le milieu ($\Delta P_{bulg}=88,9801$ (p -value= 0,0032) vs $\Delta P_{therm}= 56,4508$ (p -value=0,0060)

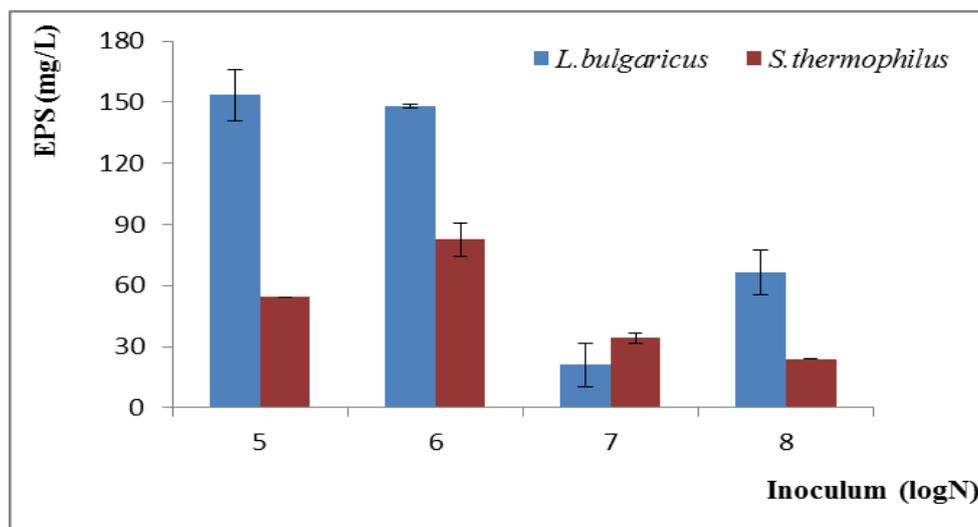
Figure N°29: Résultats d’optimisation du milieu de production des EPS

Selon **Cerning et al., (1994)**, la source de carbone et le type de sucre (glucose, galactose, lactose, mannose, fructose etc.) a une influence majeure sur la biosynthèse des EPS par les LAB. ainsi le rendement et la composition d’EPS dépendent de la source de carbone présente dans le milieu.

Dans le même contexte, **Van Geel- Schutten et al., (1998)**, dans leur étude de sélection des souches de *Lactobacillus* productrices d’EPS en présence des concentrations élevées (100 g / L) de différents sucres y compris le glucose, le fructose, le maltose, le raffinose, le saccharose, le galactose, ou le lactose ont montré que dix-sept d’entre elles ont une meilleure production d’EPS en présence de 100 mg/l de saccharose ; et ils indiquent que le saccharose est un excellent substrat pour une synthèse abondante des EPS et que plus la concentration de sucre est élevé dans le milieu liquide plus la quantité des EPS de bactéries lactiques soit importante. **Hongpattarakere et al (2012)** ont montré aussi que le saccharose semble être la meilleure source de carbone pour le criblage de bactéries lactiques productrices d’EPS.

2. Optimisation de l'inoculum

La figure 30 regroupe les résultats de la production d’EPS à différentes concentrations en inoculum, on constate que les plus faibles quantités d’EPS ont été enregistrées à des concentrations de 10^7 et 10^8 germes/ml pour les deux souches. Par ailleurs, l’optimal de production après 24h d’incubation était obtenu à 10^5 et à 10^6 germes/ml avec *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* respectivement.



L'hypothèse null est rejeté,

Inoculum	p-value		inoculum	p-value	
5 vs 6	0,29406516	no-signicatif	5 vs 6	0,01912448	significatif
5 vs 7	0,00387543	Significatif	5 vs 7	0,00432507	significatif
5 vs 8	0,00900357	Significatif	5 vs 8	9,0808E-09	significatif
6 vs 7	0,00180815	Significatif	6 vs 7	0,00743085	significatif
6 vs 8	0,00457595	Significatif	6 vs 8	0,00460749	significatif
7 vs 8	0,02676791	no-signicatif	7 vs 8	0,01680705	significatif

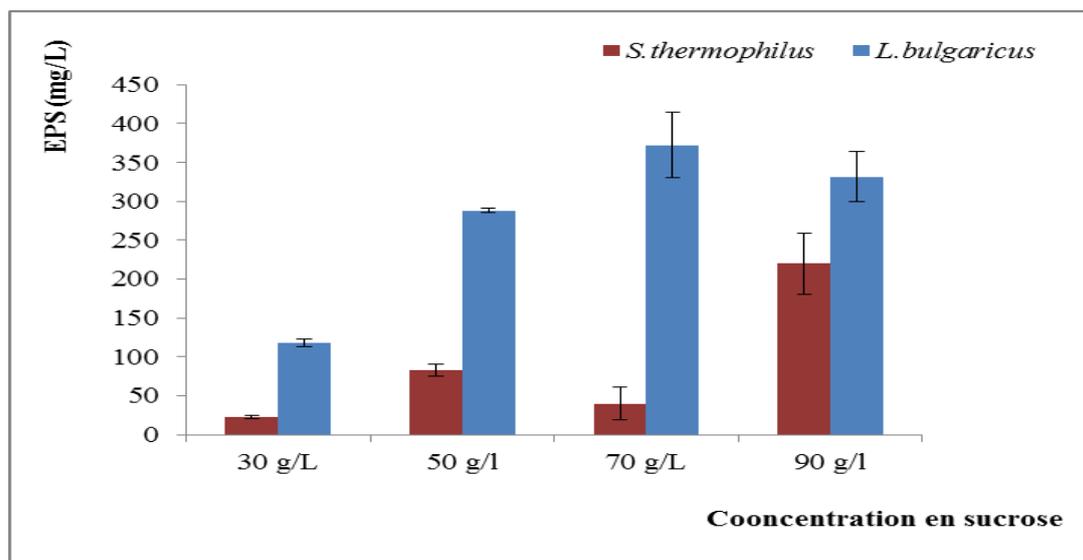
Figure N°30: Résultats d'optimisation de l'inoculum pour la production des EPS

Il est évident que la quantité de l'inoculum a un effet important sur le rendement en EPS. En effet, une forte inoculation entraîne une diminution du rendement, ce qui est probablement dû à la compétition au substrat et à l'épuisement rapide du milieu de production.

3. Optimisation du Rapport C/N

En plus de type de sucre, sa concentration peut avoir un effet stimulant sur la production. Les résultats de l'effet de saccharose incorporé à différentes concentrations sur la production d'EPS sont enregistrés dans la figure 31, il apparaît que le rendement en EPS de *Lactobacillus bulgaricus* est optimal en présence d'une concentration de 70g/L de saccharose, alors qu'il est moins important lorsque cette concentration est modifiée. Toute

fois pour *S. thermophilus*, l'optimum de production était enregistré à la concentration la plus élevé de saccharose (90g/l).



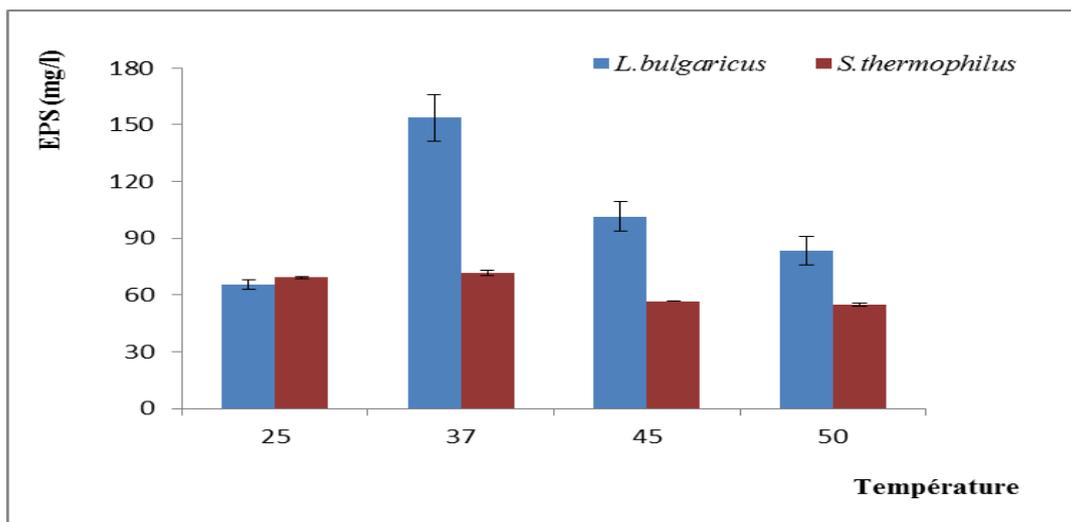
L'hypothèse null est rejeté, test

Taux de sucre	p-value: 0.0167		Taux de sucre	p-value	
30 vs 50	0,000282563	Significatif	30 vs 50	0,00458212	Significatif
30 vs 70	0,006950228	Significatif	30 vs 70	0,17802574	No-significatif
30 vs 90	0,005618115	Significatif	30 vs 90	0,00946905	Significatif
50 vs 70	0,053897844	No-significatif	50 vs 70	0,05860386	No-significatif
50 vs 90	0,096997578	No-significatif	50 vs 90	0,01974677	No-significatif
70 vs 90	0,196533387	No-significatif	70 vs 90	0,01453818	No-significatif

Figure N°31 : Résultats d'optimisation du rapport C/N dans la production des EPS **Sandrine et al., (2000)** ont montré que la concentration en glucose n'affecte pas de la même façon le rendement en EPS chez deux souches de *Lactobacillus delbreckii* subsp *bulgaricus*, chez la première souche, une concentration de 10g/l a donné le meilleur rendement. Alors que chez la deuxième, la concentration en glucose n'affecte pas le rendement en EPS, ce qui montre la variation du mécanisme de synthèse et de régulation d'EPS chez les différentes souches. Contrairement à ce qui a été obtenu par **Petry et al (2000)** qui ont montré que l'excès de sucre dans le milieu de fermentation avait un effet activateur sur la production d'EPS chez *L. casei* et *L. rhamnosus*. **Korakli et al (2003)** ont également démontré que l'augmentation de la concentration de saccharose dans le milieu entraine une augmentation d'EPS produits par *L. sanfranciscensis*.

4. Optimisation de la température

Il est bien connu maintenant que la température est un facteur important qui influe la croissance des bactéries lactiques et la production de leur EPS. L'effet de la température sur la production des EPS est élucidé dans la figure 32, où les taux optimaux en EPS (154mg/l et 71mg/l pour *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* respectivement) ont été enregistré à une température de 37°C, par contre les plus faibles taux ont été obtenus à 25°C



Temperature	p-value		Température	p-value	
25 vs 37	0,005030528	Signicatif	25 vs 37	0,07199066	no-Signicatif
25 vs 45	0,012288006	Significatif	25 vs 45	0,00031975	Significatif
25 vs 50	0,042292017	No-significatif	25 vs 50	0,00092449	significatif
37 vs 45	0,018551247	No-significatif	37 vs 45	0,02246894	no-significatif
37 vs 50	0,010184717	Significatif	37 vs 50	0,01962905	no-significatif
45 vs 50	0,069215091	no-signicatif	45 vs 50	0,03349015	no-signicatif

Figure N°32 : Résultats d'optimisation de la température de production des EPS

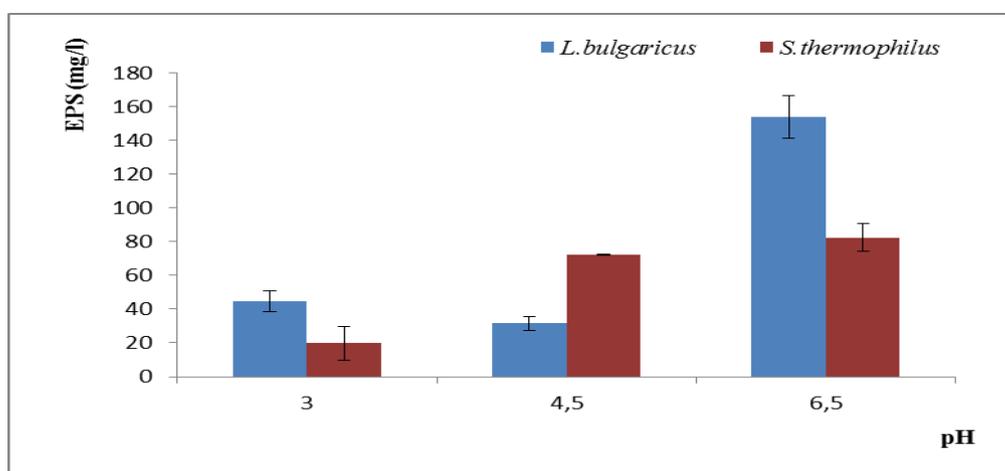
Contrairement aux bactéries lactiques mésophiles qui produisent plus d'EPS à des températures basse (25°C), les meilleurs rendements en EPS chez les thermophiles ont été enregistrés à la température optimale de leur croissance, (Cerning *et al.*, 1990).

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux trouvés par Kanmani *et al.*, (2011), qui ont montré une amélioration de la production des EPS d'une bactérie lactique (*Streptococcus*

phocae) à des températures comprise entre 31 et 37°C. De leur part, **Li et al., (2014)** ont montré que la biomasse cellulaire et la production des EPS de *Lactobacillus helveticus* sont augmentées avec l'élévation de la température, le maximum est atteint à 37°C.

5. Optimisation du pH sur la production d'EPS

Les résultats de l'effet du pH sur la production des EPS sont présentés dans la figure 33. Il est clair que la variation du pH affecte directement le rendement en EPS. En effet l'optimum de production (154 mg/L) a été enregistré à un pH de 6,5 pour *L. bulgaricus*. Un pH de 4,5 est retenu pour *S. thermophilus*(comparaison par le test post-hoc) (82mg/L).



L. bulgaricus : L'hypothèse null est rejeté, test post-hoc

pH	p-value	0.05
4.5 vs 3	0,06396216	No-significatif
6.5 vs 3	0,00415441	Significatif
6.5 vs 4.5	0,00291474	Signicatif

S. thermophilus : L'hypothèse null est rejeté, test post-hoc

pH	p-value	p-critic=0,05
4,5 vs 3	0,00900866	Significatif
3 vs 6.5	0,01023879	Significatif
4.5 vs 6.5	0,10715329	No-signicatif

Figure N°33 : Résultats d'optimisation du pH de production des EPS

Il a été rapporté que la production des EPS dans des cultures de croissance continue avec un pH contrôlé est plus productive que dans les cultures de lots acidifiés (**Ayala-Hernández et al., 2008 ; Muigei et al., 2014**) ; **Kimmel et al., 1998**), ont montré que chez deux souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, le rendement en EPS lorsque le pH est

contrôlé était trois à quatre fois plus élevé que dans un milieu à pH non contrôlé. Ainsi le pH de production des EPS est souvent proche de celui nécessaire pour la croissance.

Gassem et al., (1997) ont confirmé qu'un pH de 6,5 favorisait la production des EPS (comparé à un pH de 5.2 et de 5.8). Inversement, **Kimmel et al** (1998) ont trouvé une production considérablement plus élevée à un pH 5, comparée à pH 4 et 6. De plus, pour des cultures de *L. sakei*, il a été observé qu'un pH plus bas (5.8) favorise la conversion de sucre en EPS, tandis qu'un pH plus élevé stimule plutôt sa conversion en biomasse (**Kimmel et al**, 1998). Un pH optimal de 6,2 à 7,2 a améliorée la production des EPS de *L. rhamnosus* C83 dans un milieu défini chimiquement (**Gamar-Nouranietal.**, 1998). De sa part **Aslam et al.**, (2005) ont trouvé que les rendements les plus élevés d'EPS de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ont été obtenus à un pH de 6,2. Ce pH idéal est spécifique pour chaque espèce et varie selon les espèces bactériennes, mais il reste toujours au voisinage de 6,0 (**Muigei et al**, 2014).

6. Optimisation des conditions d'aéro/anaerobiose sur la production d'EPS

Les résultats de l'effet de l'oxygène sur la production des EPS sont présentés dans la figure 34 qui révèlent qu'en anaérobiose les concentrations des EPS étaient faibles, alors que les optima du rendement ont été enregistrés en aérobiose avec un taux de production de 288 mg /L pour *L. bulgaricus* et 82 mg/L pour *S. thermophilus*, il est remarquable que l'oxygène n'a pas d'effet remarquable sur la production des EPS par les deux probiotiques testés.

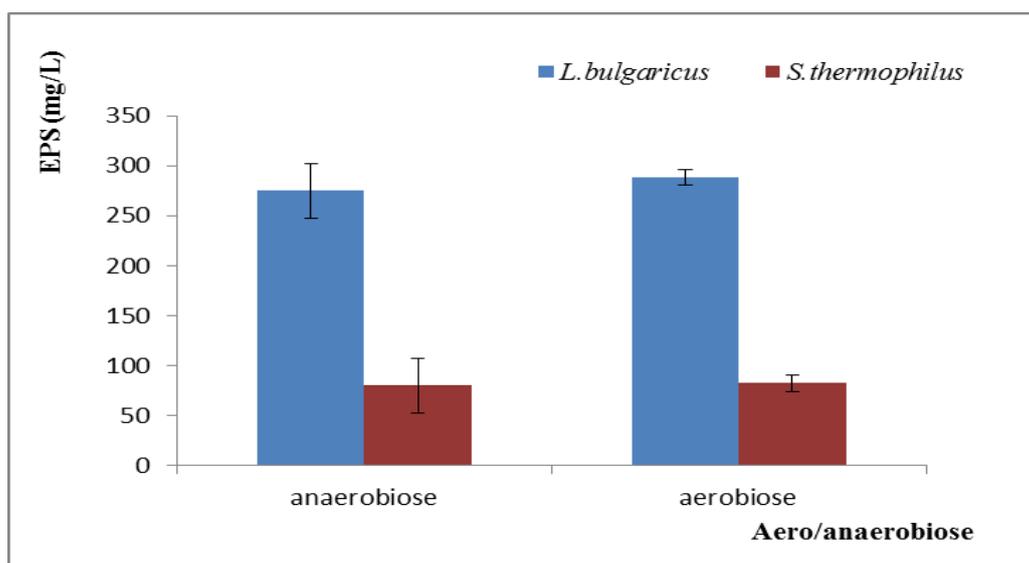
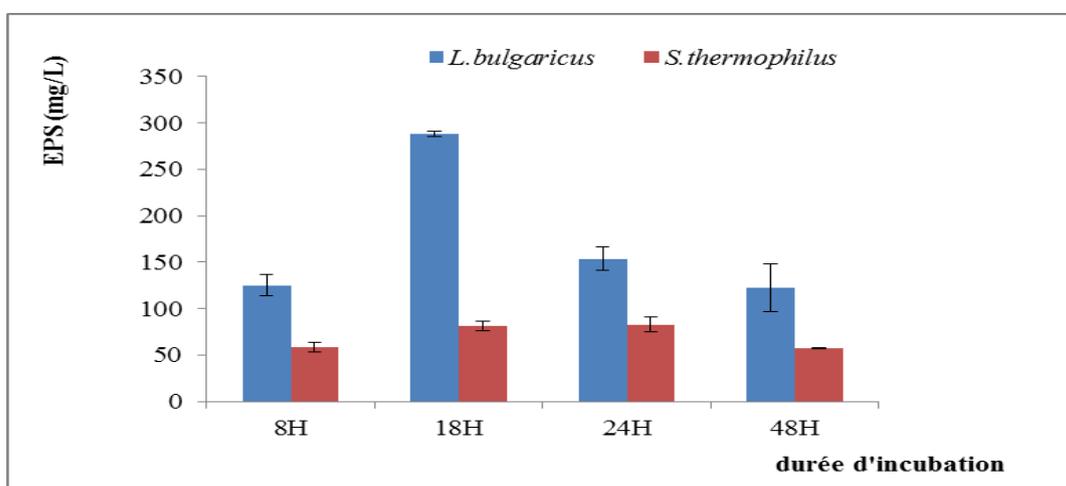


Figure N°34 : Résultats d'optimisation des conditions d'aéro/ anaérobiose dans la production des EPS

De Vuyst et al., (1998) ; Looijesteijn et Hugenholtz (1999), ont montré qu'une basse tension en oxygène stimule la production; **Gamar-Nourani et al (1998)** ont identifié une concentration de 10% en O₂ comme étant optimale pour la production des EPS par *Lb. rhamnosus*. Cependant, **Pham et al (2000)** ont montré que l'oxygène n'a pas d'effet sur la production des EPS. Ce qui permet de conclure que des conditions de stress peuvent induire la production d'EPS.

7. Optimisation de la durée d'incubation sur la production d'EPS

Le temps de fermentation reste un des facteurs les plus importants qui affectent la production d'EPS (**Haj-Mustafa et al., 2015**). Les résultats de l'optimisation de la durée d'incubation sont présentés dans la figure 35.



L. bulgaricus: L'hypothèse null est rejeté, il faut donc passé au test post-hoc

temps incubation	p-value	Significatif
8h vs 18 h	0,00127481	Signicatif
8h vs 24h	0,06846692	No-signicatif
8h vs 48h	0,44646288	No-signicatif
18h vs 24h	0,00221681	Signicatif
18h vs 48h	0,00584734	Signicatif
24h vs 48h	0,12729606	No-signicatif

S. thermophils: L'hypothèse null est rejeté, il faut donc passé au test post-hoc

temps incubation	p-value	Significatif
8h vs 18 h	0,025659186	No-signicatif
8h vs 24h	0,01568918	No-signicatif
8h vs 48h	0,406405239	No-signicatif
18h vs 24h	0,419789607	No-signicatif
18h vs 48h	0,027045653	No-signicatif
24h vs 48h	0,023543427	No-signicatif

Figure N°35 : Résultats d'optimisation de la durée d'incubation

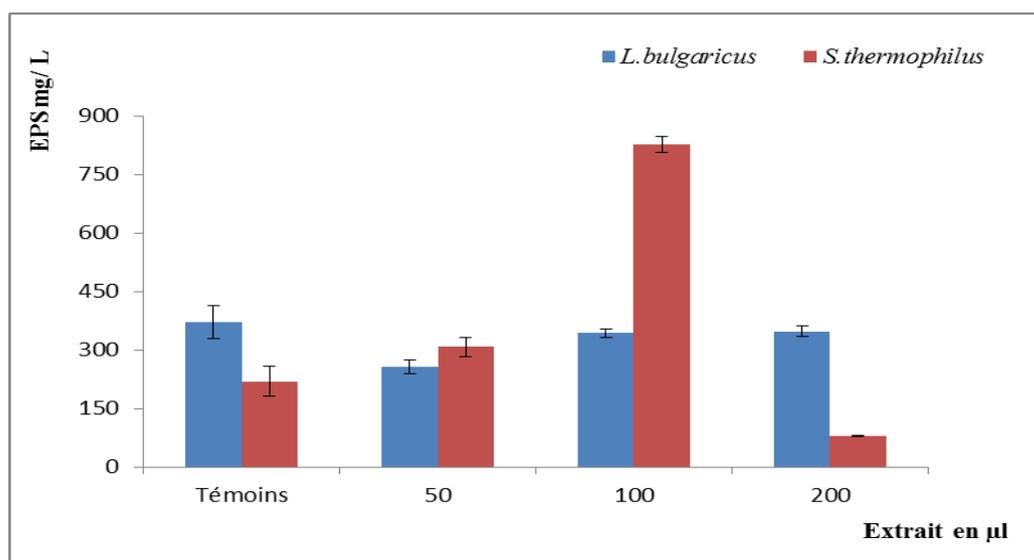
La figure 35 révèle que les meilleurs rendements d'EPS ont été obtenus après une incubation de 18 et 24 heures respectivement pour *L. bulgaricus* et *S. thermophilus*. Ces résultats montrent bien que ces rendements sont obtenus à la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire, ce qui permet de conclure que la production des EPS est en parfaite corrélation avec la croissance bactérienne de ces deux souches lactiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Haj-Mustafa et al., (2015)** qui ont montré que la production des EPS de *Lactobacillus rhamnosus* semble être associée à la croissance et a été synchronique avec la croissance et que les EPS ont été produit pendant la phase exponentielle et atteint son maximum à la phase stationnaire précoce. **Abdi et al., (2012)** ont aussi montré que la production des EPS de *Lactobacillus bulgaricus* est associée à la croissance bactérienne. De nombreuses études ont montré une réduction de la quantité des EPS en prolongeant la durée d'incubation du fait de sa possible dégradation enzymatique (**Degeest et al., 2001; Muigei et al., 2014**).

De leur part **Pham et al., (2000)** ont attribué la chute de la concentration en EPS à la présence des enzymes hydrolytiques (α -D-glucosidase, β -D-glucosidase, β -D-glucuronidase et α -L- rhamnosidase) qui ont été détectées dans l'extrait cellulaire des bactéries ou par le changement des conditions de production (composition chimique, pH, température...). Il a été clairement révélé que la quantité d'EPS a été diminuée après la prolongation de durée de la fermentation au-delà de 24h.

D'après ces résultats, il est à conclure que les effets des différents paramètres sur la production d'EPS sont spécifiques pour chaque souche étudiée.

II.2.5.2. Résultats de l'effet de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* sur la production des exopolysaccharides

La figure 36 regroupe les résultats de la production des EPS dans un milieu supplémenté en composés phénoliques à des concentrations différentes (0.01, 0.02, 0.04mg/ml μ l). Il est remarquable que la production d'EPS chez *S. thermophilus* s'est améliorée en présence de l'extrait de *T. fontanesii*, elle était trois fois plus élevée (826 mg/L) que celle du témoin (219 mg/L, production sans extrait). Par contre chez *L. bulgaricus*, la présence des composés phénoliques de *Thymus fontanesii* avait un effet négatif sur le rendement en EPS sans qu'il soit notable.



L. bulgaricus: L'hypothèse null est rejeté, test post-hoc

extrait	p-value	0.0083
T vs 50	0,03609424	No-significatif
T vs 100	0,22446454	No-significatif
T vs 200	0,25602489	No-significatif
50 vs 100	0,01504598	No-significatif
50 vs 200	0,0158211	No-significatif
100 vs 200	0,39223628	No-significatif

S. thermophilus: L'hypothèse null est rejeté, test post-hoc

Extrait	p-value	0.05
50 vs T	0,057088784	No-significatif
100 vs T	0,00128937	Significatif
200 vs T	0,018248536	Significatif
50 vs 100	0,000931395	Significatif
50 vs 200	0,002921787	Significatif
100 vs 200	0,000175991	Significatif

Figure 36 : Résultats de production d'EPS en présence de différentes concentrations de l'extrait de *Thymus fontanesii*

De Vuyst et Degeest (1999) ont montré que la production d'EPS intracellulaire synthétisés par différentes souches de LAB varie de 0,045 à 0,350 g / l, ce qui confirme nos résultats (rendement d'EPS sans extrait).

A l'heure actuelle, aucune étude n'a été publiée sur l'effet des extraits polyphénoliques sur la production des EPS des bactéries lactiques ; Par ailleurs très peu d'études ont été publiées et qui portaient sur l'effet des polyphenols sur la croissance des germes bénéfiques particulièrement du genre *Lactobacillus* et *Bifidobactérium*.

Les flavonoïdes par leur non digestibilité et leur dégradation par la flore intestinale aurait possiblement un effet prébiotique sur le corps humain en améliorant la croissance, l'activité et la viabilité des bifidobactéries et des lactobacilles font partie de cette flore.

Alberto et al., (2007), suggèrent que la croissance de différentes souches de *Lactobacillus* a été améliorée en présence des flavonoïdes.

Une autre étude menée par **Ming et al (2012)** a montré une amélioration significative de la croissance et de l'activité de certaines bactéries du genre *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et de l'espèce *Streptococcus thermophilus* en présence des flavonoïdes purs extraits du thé. Conformément à l'étude de **Khalil et al., (2010)**, la croissance et la production des EPS par *St. thermophilus* est améliorée significativement en présence de l'acide gallique et de la catéchine, abondants polyphénols des plantes et des aliments. Il défend que l'acide gallique interfère avec le métabolisme, pouvant impliquer une plus grande synthèse des EPS, et déstabilise la membrane cellulaire donnant une plus grande excrétion. **Borges et al., (2013)** ont indiqué que l'acide gallique s'adsorbe à la surface des cellules et interagit avec les composants en modifiant leurs caractéristiques physicochimiques, ensuite il pénètre et induire l'expression de nouveaux facteurs de surface.

II.2.6. Résultats de l'étude comparative de l'effet de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* et de l'acide gallique sur la production des exopolysaccharides et la formation de biofilm des LAB

L'acide gallique est un composé phénolique qui exprime une diversité d'activités antimicrobiennes, prébiotiques et **antibiofilm (Khalil et Rowayd, 2010 ; Borge et al., 2012 ; Lister et Horswill, 2014)**.

Les quantités d'EPS produites par *S. thermophilus* sous l'effet de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* et de l'acide gallique sont résumées dans le Tableau 20.

Tableau N°20: Quantité d'EPS produite en par *S. thermophilus* sous l'effet de l'extrait de *Thymus fontanesii* et de l'acide gallique.

Traitement	[EPS] mg EG/ml
Témoins	219.697 ± 38.91
Extrait de <i>Thymus fontanesii</i>	826.744 ± 19.81
Acide gallique	292.8 ± 18.2

La production d'EPS de *S. thermophilus* est maintenu modeste pour *S. thermophilus* en présence de l'acide gallique ; une légère augmentation est observée (témoin [219.697mg/ml] vs d'acide gallique [292.8]). Cependant, **Khalil (2010)** décrit une

augmentation notable de rendement d'EPS de *S. thermophilus* sous l'influence de l'acide gallique. Cette différence peut être justifiée par la différence des souches, une grande variabilité métabolique s'observe au sein de l'espèce *S. thermophilus* (Khalil, 2010 ; Tuncer et Tuncer, 2014).

En revanche, l'espèce a donné une très grande performance de production d'EPS sous l'effet de l'extrait de *Thymus fontanesii* ([826mg équivalent de glucose/ml] vs acide gallique [292.8mg équivalent de glucose/ml]). Cela peut être justifié par la composition de l'extrait riche en polyphénols y compris l'acide gallique.

La production d'EPS chez *S. thermophilus* est corrélée avec sa croissance et sa capacité de formation de biofilm en présence de l'extrait et de l'acide gallique. La figure 37 illustre les résultats de l'effet de l'extrait et de l'acide gallique sur la croissance et la formation de biofilm de *S. thermophilus*.

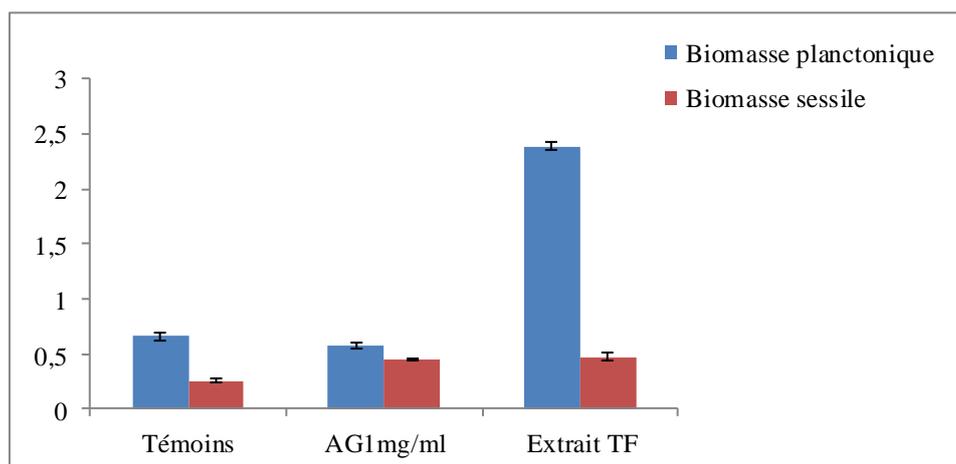


Figure N° 37: Expression de la croissance et la formation de biofilm par *S. thermophilus* sous l'influence de l'extrait de *Thymus fontanesii* et de l'acide gallique

Dans ce test, *S. thermophilus* réponds très différemment à l'extrait de *Thymus fontanesii* et l'acide gallique. La croissance de la forme planctonique et la biomasse du biofilm sessile indiquées dans la Figure 37 montrent que cette souche a présenté une forte tolérance à l'acide gallique. Résultats en accord avec ceux obtenus par Khalil et al., (2010) qui ont montré que cette espèce est fortement tolérante à l'acide gallique, même à des concentrations fortes. Une réduction très légère de la croissance en présence de l'acide gallique par rapport au Témoin a été enregistrée. Par contre, une nette amélioration de la croissance a été marquée en présence de l'extrait de *Thymus fontanesii*.

La capacité de formation du biofilm sessile est de tendance opposée. Plus les conditions sont favorables, moins les bactéries trouvent d'intérêt à s'établir en biofilm (**Lister et Horswill, 2014**). Cela s'exprime par une meilleure croissance et la réduction de la capacité, déjà faible, de *S. thermophilus* à former le biofilm en présence de l'extrait de *Thymus fontanesii* et de l'acide gallique.

Dans le milieu extracellulaire, il interfère avec les composants de la communication intercellulaire (par exemple le quorum sensing) (**Huber et al., 2003**). Par conséquent, il altère le potentiel d'adhésion et de dispersion et la physiologie des cellules et du biofilm, avec des effets pro- ou anti-biofilms (**Meltem, 2015 ; Huber et al., 2003 ; Borges et al., 2013**).

II.3. RESULTATS DE L'EFFET SYMBIOTIQUE DES EPS ET DE L'EXTRAIT DE THYMUS FONTANESII IN VIVO CHEZ LE RAT WISTAR

Dans la présente partie, l'effet synergique de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* (concentration de 1mg/ml / volume de 100µl) et des cultures de probiotique *S. thermophilus* préalablement préparées dans des conditions optimale de production des EPS sans extrait (contenant environ 0.200g/ml d'EPS) et avec l'extrait (contenant environ 0.819g/ml d'EPS), a été évalué sur le développement du poids corporels, la diversification de la flore intestinale et sur la translocation bactérienne en utilisant des rats Wistar comme modèle animal.

Au cours du mois de l'expérimentation, les quatre groupes de rats consomment en moyenne les mêmes quantités d'aliment.

II.3.1. Effet sur l'évolution du poids corporel des rats

Les résultats de l'évolution du poids (la moyenne du poids pour chaque groupe) des différents groupes de rats durant un mois de traitement sont présentés dans la figure 38.

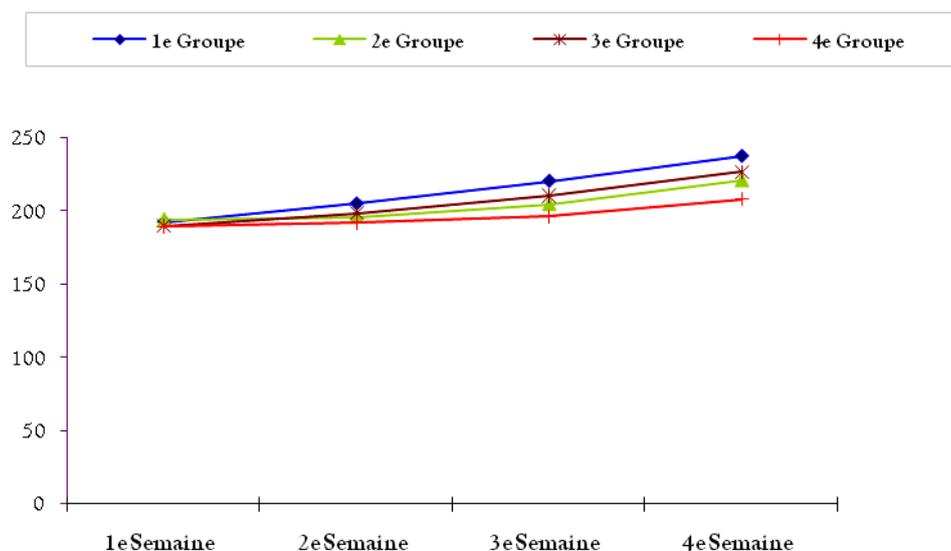


Figure N°38 : Evolution de la moyenne du poids corporel des différents groupes de rats durant quatre semaines.

Une très légère réduction du poids de l'animal a été constatée au cours de la première semaine chez les trois groupes de rats traités par les cultures contenant 0.819g/ml d'EPS produits en présence des polyphénols de *Thymus fontanesii* et du mélange (culture d'EPS-Extrait). A partir de la deuxième semaine, une correction continue du poids a été enregistrée pour ces mêmes groupes de rats. Une augmentation considérable du poids des rats du groupe traité par les cultures de probiotiques, contenant 0.2g/ml d'EPS produits sans polyphénols de *Thymus fontanesii*, a été enregistrée.

De sa part **Larrosa et al., (2009)**, ont montré que la consommation préventive d'un composé polyphénolique pur tel que le resvératrol pendant 20 jours à une dose de 1 mg/kg/j permet de maintenir la consommation alimentaire et la prise de poids des animaux.

II.3.2. Effet de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* sur la distribution de quelques germes de la flore intestinale

Les résultats de l'effet de l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* sur la distribution de quelques germes de la flore intestinale des différents groupes de rats sont illustrés dans la figure 39.

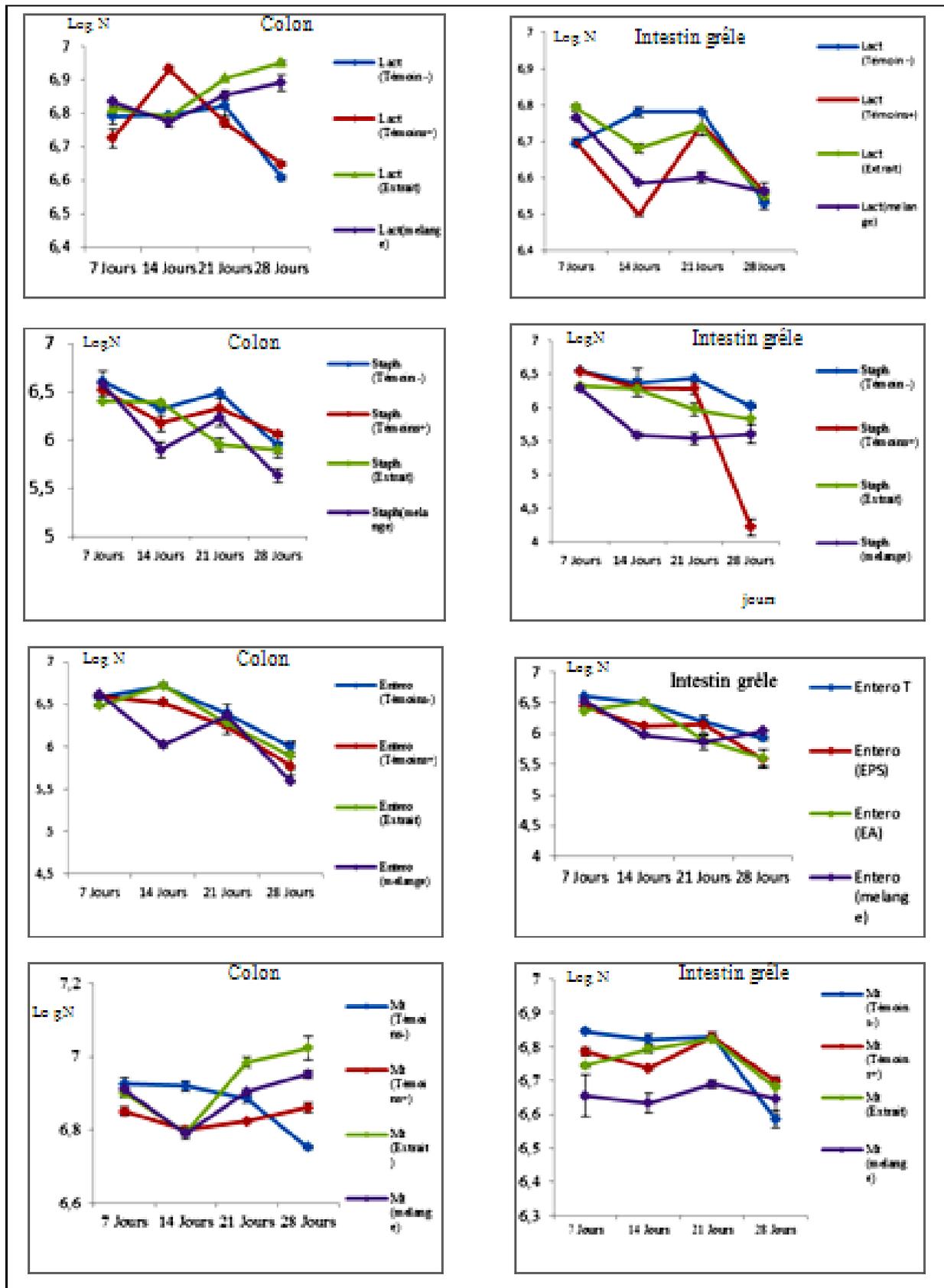


Figure N° 39: Distribution de la microflore intestinale (Microflore totale, lactobacillus, staphylocoque et entérobactéries) sous l’effet des cultures riches en EPS, polyphénols et le mélange (effet symbiotique).

La surface de la muqueuse du tube digestif est particulièrement sensible à l'adhésion et la colonisation d'agents pathogènes d'origine alimentaire par les bactéries commensales et les probiotiques. L'adhérence bactérienne à l'épithélium intestinal influe sur le temps de résidence et la capacité des bactéries à exercer ses effets et fonctions dans l'intestin. La capacité d'adhérer au mucus et les cellules épithéliales est considéré comme un critère de sélection important pour les souches probiotiques. Cette capacité varie selon les souches, en fonction des propriétés de la surface cellulaire telles que l'hydrophobicité et la production de slime (EPS libres), les profils de protéine extracellulaire, les hémagglutinines et l'acide lipotéichoïque (**Van Halbeek et al., 1994**).

Les résultats de l'effet symbiotique (le mélange Extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* - des cultures de probiotiques préalablement réalisées dans des conditions optimales de la production des EPS et en présence de l'extrait contenant 0.826g/ml d'EPS) sur la diversification de la flore intestinale des différents groupes de rats montrent une augmentation notable du nombre des germes bénéfiques par rapport au nombre de germes pathogènes dans les deux segments d'intestin. Les cultures contenant 0.219 g/ml d'EPS (EPS produits sans polyphénols) avaient aussi un effet prébiotique remarquable mais moins important que celui observé en présence de l'extrait de *Thymus fontanesii*.

Certains EPS de bactéries lactiques ont été déclarés avoir des bienfaits de santé (**Muigei et al., 2014**), mais peu d'étude ont mis l'accent sur leur effet prébiotique *in vivo*. **Hongpattarakere et al., (2012)** dans une étude en utilisant un modèle simulant les conditions du colon, un changement remarquable de la composition de la flore fécale sous l'effet des EPS de certaines bactéries lactiques a été noté. Les auteurs ont montré que les EPS de *W. cibaria* ont amélioré sélectivement la croissance de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus/Enterococcus* dans V1, V2 et V3 qui représentent les régions proximales, transversale et distales du côlon humain après une prise de 10 jours de ces EPS. *Clostridium* a été légèrement diminué dans la région proximale. A travers cette investigation, ils ont conclu que les EPS de bactéries lactiques pourrait modifier les populations bactériennes du colon en favorisant la prolifération et la colonisation des germes bénéfique (*Bifidobacterium* et *Lactobacillus/Groupes d'Enterococcus*) et inhibant les bactéries pathogènes tels que le groupe de *Clostridium*. En fait les EPS pourraient agir comme source de carbone pour les bactéries du côlon, s'ils ont atteint le côlon intact.

Plusieurs études ont été portées sur l'effet prébiotique *in vitro* des EPS. **Dal Bello et al. (2001)** ont montré que la population de *Bifidobacterium* était corrélée avec la concentration des EPS produits par *Lactobacillus sanfranciscensis*.

Dans le même sens, il a été prouvé que les exopolysaccharides (EPS_{slime}) des bactéries lactiques peuvent modifier l'adhérence des bactéries pathogènes aux mucus intestinal, modifiant ainsi la composition de la microflore intestinale de l'hôte (**Vesterlund et al., 2006**). De leur part, **Ruas-Madiedo et al., (2006)** ont suggéré une exclusion compétitive importante du probiotiques en présence des EPS qui sont fortement impliqués dans l'adhérence au mucus. Dans une autre étude **Ruas-Madiedo et al., (2006)** sur l'effet des EPS sur des bactéries probiotiques et pathogènes, ont montré que les EPS produits par *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* ont réduit l'adhésion des probiotiques commensals et ont resté sans effet sur les bactéries pathogènes. Cela pourrait indiquer que des facteurs impliqués dans l'adhérence des probiotiques et des agents pathogènes de mucus pourraient être différents. **Gorska-Fraczek et al.,(2011)** ont indiqué que la structure des EPS peut jouer un rôle important comme un des facteurs qui affectent l'activité des EPS.

Une autre étude menée par **Kim et al., (2009)** a montré une diminution de 87% de biofilm de *E. coli* entérohémorragique en présence de 1,0 mg / ml d'EPS libères (EPSs). En outre, ils ont constaté que l'ajout des EPSs a réprimé d'une manière significative la formation de biofilm en affectant les gènes liés à la production et le chimiotactisme dans l'analyse du transcriptome, ils ont aussi indiqué que les EPSs ont inhibé la fixation initiale et l'auto-agrégation de cellules bactériennes par l'affaiblissement et la modification de la surface cellulaire ou par la réduction des interactions cellules - cellules.

Les bactéries probiotiques hautement productrices d'EPS peuvent avoir des propriétés physicochimiques distinctes de leur paroi et une capacité d'adhérence plus importante, cet effet dépend très étroitement de la structure des EPS (**Gorska-Fraczek et al., 2011**). Dans leur étude, **Li et al., (2014)** ont constaté que les EPS de *Lactobacillus helveticus* avaient une activité antibiofilm à large spectre contre plusieurs bactéries pathogènes (Gram+ et Gram-).

A notre connaissance aucune étude n'a été réalisé sur l'effet symbiotique des polyphénols et des probiotiques producteurs d'EPS ou es EPS purs. **Del Rio et al., (2010)**, ont rapporté que l'absorption des polyphénols au niveau de l'intestin grêle est faible, tant que large partie de

ces composés est retrouvée dans la lumière du côlon. Ces composés ainsi que leurs sous-produits issus du métabolisme par la microflore intestinale sont donc en contact direct avec la muqueuse intestinale où ils peuvent améliorer la croissance des bactéries bénéfique constituant la microflore intestinale.

II.3.3. Effet combiné des exopolyscharides et de l'extrait de *Thymus fontanesii* sur la translocation bactérienne

La translocation des bactéries est définie comme étant le passage de bactéries vivantes du tractus gastro-intestinal à travers l'épithélium jusqu'à d'autres sites comme les ganglions lymphatiques mésentériques. Une multitude de facteurs peuvent stimuler cette translocation comme une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal. Une augmentation de populations de bactéries dans la lumière intestinale ou une diminution des défenses immunitaires de l'hôte. Les résultats sont présentés dans les figures, 40, 41, 42 et 43.

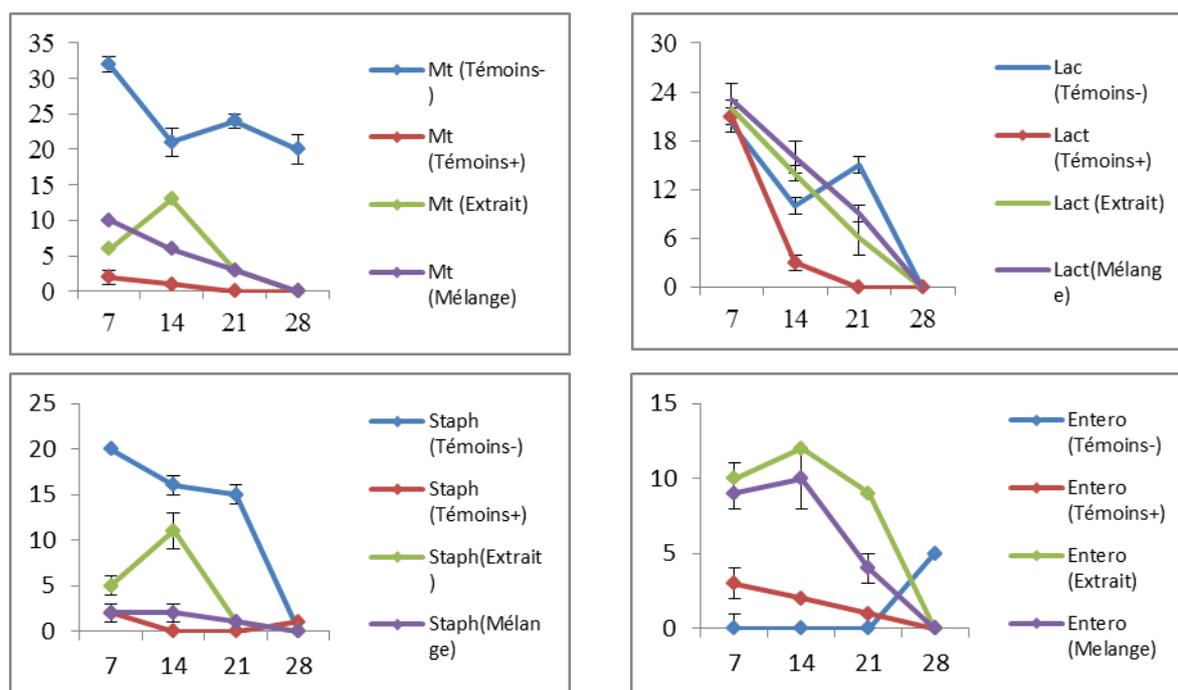


Figure N°40 : Résultats de l'effet des EPS, polyphénols et le mélange sur la translocation bactérienne vers les poumons durant 28 jours

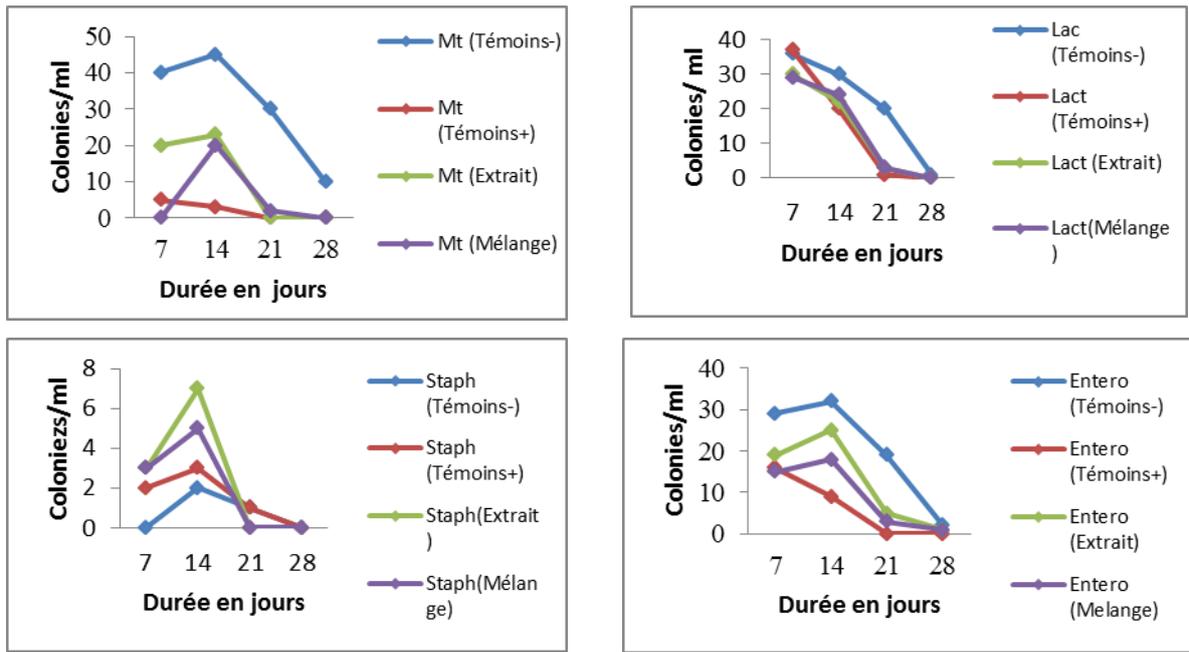


Figure N° 41: Résultats de l'effet des EPS, polyphénols et le mélange sur la translocation bactérienne vers le foie durant 28 jours

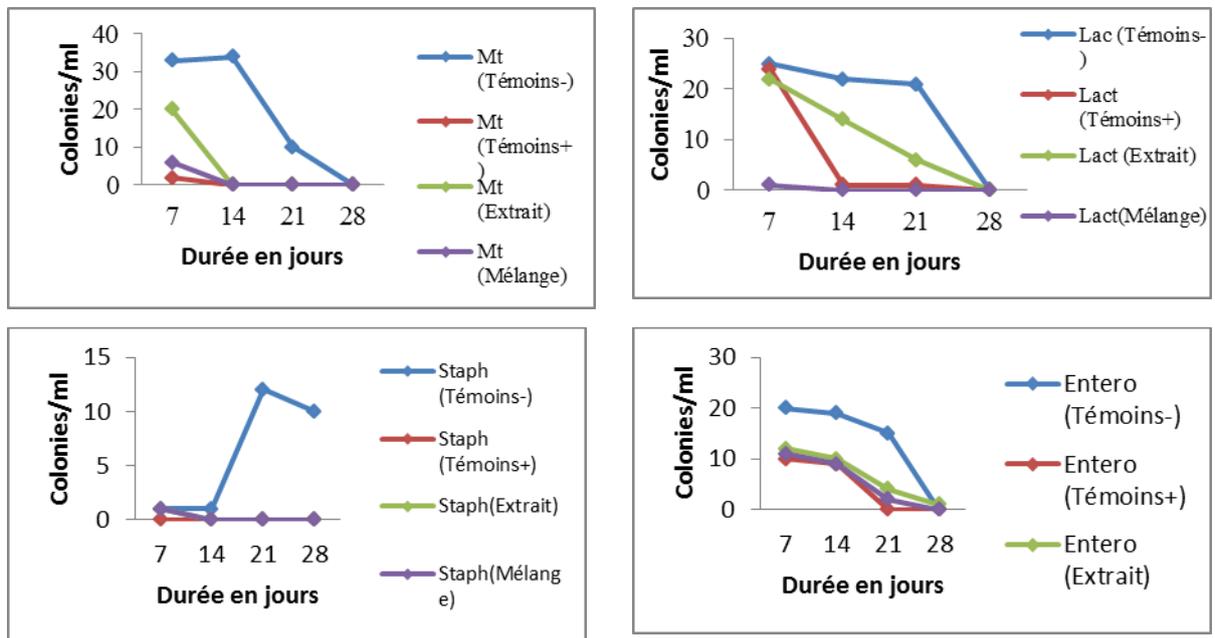


Figure N° 42: Résultats de l'effet des EPS, polyphénols et le mélange sur la translocation bactérienne vers les reins durant 28 jours.

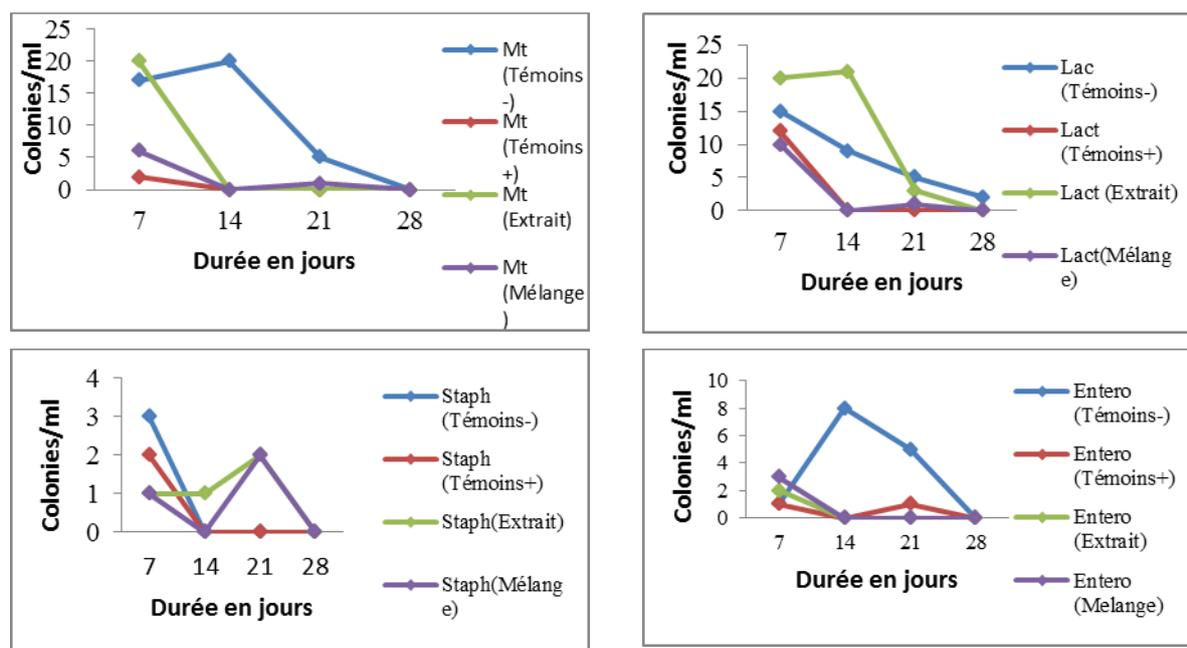


Figure N°43 : Résultats de l'effet des EPS, polyphénols et le mélange sur la translocation bactérienne vers la rate durant 28 jours.

La translocation bactérienne a été déclenchée durant la première semaine et régularisée à partir de la deuxième semaine d'expérimentation pour les trois groupes de rats traités par rapport au groupe de contrôle (réduction plus remarquable pour le groupe traité par le mélange).

Dans l'étude de **Mao *et al* (1996)**, il a été démontré que chez des animaux traités par les probiotiques *Lactobacillus reuteri* ou *Lactobacillus plantarum*, 03 jours avant et après l'administration de méthotrexate, il y avait une diminution significative de la perméabilité ainsi que de la translocation des bactéries. Aucune étude n'a été faite sur l'effet des polyphénols sur la translocation pour pouvoir interpréter ou discuter nos résultats.

De nombreux travaux ont souligné l'activité antimicrobienne des polyphénols dans différents contextes pathologiques et l'importance de la microflore intestinale pour leur dégradation ainsi que les bienfaits de ces biomolécules pour la redistribution des différents constituants de la microflore. Cependant, afin de comprendre les effets biologiques de ces composés, il est nécessaire de connaître leur devenir et leur disponibilité dans l'organisme. Les connaissances actuelles permettent la mise en place d'un schéma global de l'absorption ainsi que du métabolisme de ces micronutriments.

Conclusion Générale

Les exopolysaccharides des bactéries lactiques ont des fonctions biologiques multiples pour la cellule productrice comme le stockage de l'énergie, la communication cellulaire, formation de biofilm et la colonisation de différentes surfaces et niches : denrées alimentaires, sol, surface marine et solution aqueuses, système gastro-intestinal. Divers effets santé ont été attribués aux exopolysaccharides des bactéries lactiques dont hypocholestérolémiant, immunomodulateur, antitumoral, antioxydants, anti-adhésifs et antimicrobiennes *in vitro*. Il a été démontré que les EPS sont très fortement impliquées dans l'adhésion des bactéries aux couches intestinale et à coloniser la paroi intestinale. Cependant, la faible quantité d'EPS produites par la plupart des LAB est un obstacle pour l'exploitation de ces biomolécules à des fins industrielles et pharmaceutiques. Le but de ce travail était d'évaluer l'effet des polyphénols de *Thymus fontanesii* sur le rendement de la production des EPS chez *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* et d'évaluer *in vivo* l'effet prébiotique des EPS produits en présence de l'extrait de *Thymus fontanesii* et d'étudier leur impact sur la diversification et la translocation bactérienne.

Les usages du genre *Thymus* en phytothérapie, en médecine traditionnelle, dans l'alimentation montrent que ses espèces possèdent des utilisations multiples et variées, parfois très anciennes. La science a permis de mieux définir certaines de ces activités, d'en identifier d'autres et de s'intéresser à sa composition. *Thymus fontanesii* possède une composition chimique complexe, pas encore totalement bien définie. Certains de ses composés sont tout de même très bien connus : les polyphénols qu'ils sont à l'origine des activités les plus connues et les plus recherchées en thérapeutique. Il a été démontré que les quantités de polyphénols extraites de plantes sont fortement influencées par la technique d'extraction. Ainsi, en appliquant quatre techniques (macération couplé à la thermisation pendant deux heures, la macération froide pendant 24h, Soxhlet et sonication), nous avons obtenu le meilleur rendement (41,5%) et les meilleures concentrations en polyphénols (de 156 EAG mg / g) et en flavonoïdes (14 EQ mg/g) par sonication (ultrasons). Une optimisation de l'ensemble des conditions (Fréquence, température, solvant, cycle d'extraction..) d'extraction par cette technique est fortement recommandée.

Il ressort de ce travail que l'utilisation des polyphénols devrait être jugée 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 (cas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et les bactéries pathogènes testés).

Des concentrations équilibrées de l'extrait polyphénoliques de *Thymus fontanesii* qui améliorent l'agrégation, la co-agrégation et le biofilm, convoité, de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* sans provoquer un stress inducteur de leur développement a été notée. A l'opposé, la croissance, l'agrégation et la capacité de formation de biofilm des bactéries pathogènes testées (*S. aureus* 25923, *B. cereus* 11778, *B. subtilis* 6633, *E. coli* 25922 et *P. aeruginosa* 2785) sont fortement réduites sous l'influence de l'extrait polyphénolique. Ainsi, cet effet peut être associé à l'activité prébiotique des polyphénols, qui donnent une plus grande force compétitive de probiotiques contre les germes pathogènes et opportunistes.

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 à fin de comprendre l'impact de ces biomolécules végétales sur la propension des bactéries à s'organiser en biofilm.

L'optimisation des conditions de culture permet une amélioration considérable de rendement des EPS produits par *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*. Une spécificité d'action de ces conditions a été notée.

L'amélioration de la production des EPS chez *S. thermophilus*, en présence de 100 µl d'extrait de *Thymus fontanesii* à une concentration de 1mg/ml, est bien notable ; la quantité d'EPS produite est de 826mg/ml. Le rendement de production d'EPS chez *L. bulgaricus* n'a pas subi une modification. Il a été rapporté que la quantité d'EPS produites par les bactéries lactiques dépend de plusieurs conditions physico-chimiques. Elle est généralement faible, mais la récupération est également dépendante de la méthode d'extraction. Il est recommandé de tester plusieurs protocoles et de les optimiser à fin d'extraire le maximum d'EPS produits par le germe.

L'adjonction de l'acide gallique à une concentration de 1mg/ml améliore légèrement la formation de biofilm de *S. thermophilus* par rapport au contrôle mais reste sans effet notable sur la production des EPS. Il ne présente pas un effet apparent par rapport à celui exprimé par l'extrait de *Thymus fontanesii*.

Une activité appréciable des EPS produit sous l'effet de l'extrait de *Thymus fontanesii*, d'une part et d'autre part du mélange EPS- Extrait a été enregistré, *in vivo*, sur la diversification et la translocation bactérienne. Cette partie du travail reconnaît la limite de la reproductibilité. Cependant elle soulève une plus grande conscience sur l'utilisation plus informée des différents polyphénols et des EPS comme stratégies antimicrobiennes et antibiofilms *in vivo*.

Les résultats de cette étude laissent suggérer que l'extrait polyphénolique de *Thymus fontanesii* et les EPS des LAB peuvent être requis pour influencer la croissance et les propriétés adhésives des germes sélectivement ce qui permet d'améliorer la colonisation et l'implantation des probiotiques et prévenir l'implantation des pathogènes et améliore par conséquent les fonctions physiologique de la microflore intestinale.

Pour appréhender les effets santé de ces biomolécules, il est essentiel de disposer suffisamment de données sur leur devenir dans l'organisme, et notamment d'étudier l'absorption intestinale et leur métabolisme dans la sphère splanchnique qui est composée de l'intestin et du foie. Les données de la littérature et les travaux expérimentales réalisés ont permis de dresser un schéma général de leur biodisponibilité sans détailler le rôle important joué par la flore intestinal et l'impact de ces biomolécules sur l'activité microbienne des différents constituants de cette flore.

Références Bibliographiques



- ❖ Abayomi, S. 2010. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Ed. Karthalla. Suisse, p.79, pp. 13-25.
- ❖ Abdi, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Soleimanian-Zad, S. 2012. Efficiency of modified skimmed milk base media to achieve high exopolysaccharide/cell ratios by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SZ2 in optimized conditions defined by their response surface methodology. *Int.J.Food Sci.Technol.*47, 768–775.
- ❖ Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A et Khan, S. T. 2013. A characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir e part II. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 343-350.
- ❖ Akers, K.S., Cardile, A. P., Wenke, J. C et Murray, C. K. 2015. Biofilm Formation by Clinical Isolates and Its Relevance to Clinical Infections. In: *Biofilm-based Healthcare-associated Infections Volume I* (ed. G. Donelli), p. 193, pp. 1-28.
- ❖ Alam, M., Midtvedt, T. 1994. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats." *Scand J Gastroenterol*, 29(5), 445-51.
- ❖ Alberto, M.R., Mario, E., Arena, B.C., Maria, C et Manca de Nadra. 2007. Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: Effect of phenolic compounds. *Food Control*. 18, 898–903.
- ❖ Alvesalo, J., Vuorela H., Tammela P., Leinonen M., Saikku P., Vuorela P. 2006. Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures. *Biochem Pharmacol* 71:735-741.
- ❖ Andrew, J.M. 2008. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62: 256-278.
- ❖ Andersen, O. M., Kenneth R. 2006. *Flavonoids-chemistry, biochemistry and applications*. Ed Markham-medical. Pp. 574-812.
- ❖ Aslim, B., Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y., Mercan, N., 2005. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions. *World J. Microbiol. Bio-technol.* 21,673–677.
- ❖ Auger, M. 2012. Formation de biofilm *in vitro* par des souches cliniques d'*Escheichia coli* : impact de la modification des conditions expérimentales. Université de Nantes, faculté de pharmacie. France. P. 83.
- ❖ Axelsson. L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (3rd eds S. Salminen., A.V. Wright et A. Ouwehand) p.628, pp.1-65. Marcel Dekker, Inc.

❖ Ayala-Hernández, I., Hassan, A., Goff, H. D., Mirade Orduña, R., Corredig, M., 2008. Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. cremoris JFR1 and their interaction with milk proteins: effect of pH and media composition. *Int. Dairy J.* 18, 1109–1118.

B

❖ Balakrishna, A. 2013. *In vitro* Evaluation of Adhesion and Aggregation Abilities of Four Potential Probiotic Strains Isolated from Guppy (*Poecilia reticulata*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, p.793-800.

❖ Barrangou, R., Lahtinen S. J., Ibrahim, F et A Ouwehand, A.O. 2012. Genus *Lactobacillus*. In: *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (4th eds. S. Lahtinen, A. C. Ouwehand, S. Salminen, A. V. Wright), p. 775, pp. 77-86.

❖ Bartolucci, F; Peruzzi, L; Passalacqua, N. 2013. Typification of names and taxonomic notes within the genus *Thymus* L. (Lamiaceae). *Taxon*, Volume 62, Number 6, 20, pp. 1308-1314(7).

❖ Beloin, C., Roux, A., Ghigo, G.M. 2008. *Escherichia coli*, fimbriae. *curr Top Microbial immunology*. P249-289.

❖ Ben Salah, I. Trabelsi, R. Ben Mansour, S. Lassoued, H. Chouayekh, S. 2012. *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Bejar, Anaerobe*. 18 436–444.

❖ Bergmaier, D., C. Lacroix, M. G. Macedo, and Champagne, P. 2001. New method for exopolysaccharide determination in culture broth using stirred ultrafiltration cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:401–406.

❖ Bernalier-Donadille, A. 2008. Principales fonctions métaboliques de la flore intestinale de l'homme. In: *Flore microbienne intestinale. Physiologie et pathologie digestives*, pp. 61-80.

❖ Bjarnsholt, T. 2013. Role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS by Wiley Backwell*. DOI 10.1111/apm.12099 (p.2).

❖ Bohm, B.A., Stuessy, T.F. 2001. Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae): Introduction to flavonoids. Springer-Verlag Wien, p.837, pp.47-135.

❖ Bonnet, P., B. Koletzko. 2002. "The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002." *Am J Clin Nutr* 78(4): 675-683.

❖ Borges A., Ferreria C., Saavedra M. J., Simões M. 2013. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial drug resistance*. A. Méndez-Vilas, Ed.p.10.

- ❖ Borges, A., Saavedra M. J., Simões M. 2012. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*. 28 (7): 755-767.
- ❖ Bornet, F., Brouns, F., Tashiro, Y et Duvillier, V. 2003. Nutritional aspects of short-chain
- ❖ Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M.G., Faleiro L., Rejeb, M.N., Neffati, M., Costa M. M., Figueiredo AC., Barroso JC et Pedro L.G. 2007. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils from Tunisian *Thymus capitatus*. *Food chemistry*: 105: 146-155.
- ❖ Bremer, P., Flint, S., Brooks, J et Palmer, J. 2015. Introduction to Biofilms: Definition and Basic Concepts. In: *Biofilms in the Dairy Industry* (ed.K. H. The., S. Flint.,J. Brooks et G. Knight), John Wiley & Sons, Ltd. P. 290, pp.1-16.
- ❖ Brian, M. L et Arthur, T. 2002. The Genus *Thymus* as a source of commercial products. In: *Thyme: The genus Thymus* (eds E. Stahl-Biskup and F. Saez) p.346, pp.252-262. LLC Taylor and Francis group.
- ❖ Brighente, I., M. Dias., L. Verdi et M. Pizzolatti, 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharm. Biol.* 45: 156–161.

C

- ❖ Caltagirone, S., Poggi, A et Rossi, C. 2000. Flavonoids apeginin and quercetin on inhibition of melanomagrowth and metastatic. *Int J Cancer*. 87 (4): 595-600.
- ❖ Carr, F. J., Chill D et Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol*. 28(4), pp. 281–370. doi:10.1080/1040-840291046759.
- ❖ Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharide produced by lactic acid bacteria. *Microbiol Rev* 87: 113-130.
- ❖ Cerning, J. 1994. Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. Pages 309-329 dans I.H. Roissart, Luquet, F.M., ed. *Bactéries Lactiques*, Grenoble, France.
- ❖ Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J. 1986. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol Lett* 8: 625-628.
- ❖ Cerning, J., Bouillanne, C et Desmazeaud, M.J. 1988. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol Lett* 10: 255-260.
- ❖ Cerning, J., Bouillanne M., Landon, M et Desmazeaud, M.J. 1990. Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Sci Aliments* 10: 443-451.
- ❖ Cerning, J., Bouillanne, M., Landon, M et Desmazeaud, M.J. 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 75: 692-699.

- ❖ Cerning, J. 1994. Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. Pages 309-329 dans I.H. Roissart, Luquet, F.M., ed. Bactéries Lactiques, Grenoble, France.
- ❖ Collado, C. M., 2009. Role of probiotic in health and diseases. In: Handbbok of probiotic and prebiotic (2nd ed. Y.K Lee and S. Salminen) p. 608, pp. 257-350. John Wiley et Sons.
- ❖ Collins, J. K. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. American Journal of Clinical Nutrition, 73,
- ❖ Collins, M.D. and Gibson, G.R. 1999 Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am. J. Clin. Nutr., 69.
- ❖ Conway, P.L. 1995. Microbioal ecology of the human large intestine. In Gibson, G.R et Macfarlane, G.T. (eds.), Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology. CRC Press, 1-24.
- ❖ Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiological Review, 12(4), 564–582.
- ❖ Chemat, F., Z. Huma et M. Khan, 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry. 18: 813–835.
- ❖ China, R., S. Mukherjeea., S. Sena., S. Bosea., S. Dattab., H. Koleyc ., G. Santinath et Pubali, D. 2012. Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on somepathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism Lactobacillus acidophilus. Microbiological Research. 167: 500-506.
- ❖ Campeotto, F., Waligora-Dupriet, A. J., Doucet-Populaire, F., Kalach, N., Dupont, C. et Butel, M. J. 2007. Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. Gastroenterol Clin Biol 31: 533-542.
- ❖ Cosentino, S., Tubero, C.I.G., Pisano, B., Santa, M., Mascia, V., Arzedi, E et Palmas, F.1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oil. lett appl microbial, 29(2), 130-135.
- ❖ Crespy, V et Morand, C. 2001. Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phorsen and their glycosides in rats.J.Nutr.132 (8): 2109-2114.
- ❖ Czek, S G., Sandstrom, C., Kenne, L Rybka, J, Strus, M., Heczka, P., Gamian, A. 2011. Structural studies of the exopolysaccharide consisting of an onasaccharide repeating unit isolated from *Lactobacillus rhamnosus* KL37B. Carbohydrate Research 346, pp. 2926–2932.

D

- ❖ Daglia, M. 2011. Polyphenols as antimicrobial. Agents Current Opinion in Biotechnology, 23,174–181

- ❖ Dal Bello, F., Walter, J., Hertel, C et Hammes, W. P. 2001. *In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 232–237.
- ❖ Da Portor, C., E. Poretto and D. Decorti, 2013. Comparaison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20: 1076-1080.
- ❖ D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability.
- ❖ Das, K., Tiwari, R. K. S et Shrivastava, D. K. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(2): 104-111.
- ❖ Dauglas, G. L., Azcarate-Peril, M. A et Klaenhammer, T. R. 2016. Genomic Evolution of Lactic Acid Bacteria: From Single Gene Function to the Pan-genome. In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* (2nd eds F. Mozzi, R. R. Raya, and G. M. Vignolo), p. 395, pp. 32-54.
- ❖ Degeest, B., Vaningelgem, F., DeVuyst, L. 2001. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 747–757.
- ❖ De La Roque, R., De La Roque, O., Vican, P., Ybert, E., Delesalle-Féat, T., Biaujeaud, M., Ringuet, J., Bloch, J et Botrel, A. 2001. *Encyclopedia of Medicinal Plants*. 2nd Edition. Larousse / VUEF, p. 334, pp. 10-17.
- ❖ Del Re, B., B. Sgorbati, M. Miglioli et Palenzona, D. 2005. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* 31, 438–442.
- ❖ Del Rio, D.L., Costa, G., Lean, M.E. 2010. Polyphenols and health: what compounds are involved?, *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20, 1-6.
- ❖ Delzenne, N. 2003. Oligosaccharides: state of the art. *Proceedings of the nutrition society* 62:177-182.
- ❖ Devienne, K, F et Raddi, M, S, G. 2002. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Brazilian Journal of Microbiology*. vol.33 no.2.
- ❖ De Vuyst, L., et Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 153–177.

- ❖ De Vuyst, L., D V F., Vaningelgem, F et Degeest, B. 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria *International Dairy Journal*. Volume 11, Issue 9, P. 687–707.
- ❖ Di Cagno, R., Filannino, P et Gobbetti, M. 2016. Vegetable and Fruit Fermentation by Lactic Acid Bacteria. In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* (ed. F. Mozzi, R. R. Raya, and Gr. M. Vignolo), John Wiley et Sons, Ltd.P.395, pp. 216-230.
- ❖ Dixon, R. A., Xie, D.Y., Sharma, S.B. 2005. Proanthocyanidins: a final frontier in flavonoid research. *New Phytol*, 165, 9-28.
- ❖ Donohue, D. C et Gueimon, M. 2012. Some Considerations for the safety of novel Probiotic Bacteria. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (4th ed S Lahtinen, A.C. Ouwehand, S. Salminen and A.V Wright) p.775, pp. 423-438.
- ❖ Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Pebers, P. A., et Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- ❖ Dubos, R., R. W. Schaedler, I. 1965. "Indigenous, Normal, and Autochthonous Flora of the Gastrointestinal Tract." *J Exp Med* 122: 67-76.
- ❖ Ducluzeau, R. 1969. Influence of the zoological species on the microflora of the gastrointestinal tract. *Rev Immunol Ther Antimicrob* 33(6): 345-83.
- ❖ Duobos, R et Schaedler, R. W.1963. Composition, Alteration, and Effects of the Intestinal Flora. *Fed Proc* 22: 1322-1329.
- ❖ Duncan, S. H., Lobley, G. E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A. M., Louis, P et Flint, H. J. 2008. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)* 32: 1720-1724.

E

- ❖ Eckburg, P. B et Bik, E. M. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308(5728): 1635-1638.
- ❖ Edéas, M. 2006. *Les secrets de la santé du thé*. Ed alpen, p. 37.
- ❖ Eduardo, J., Schiffrin, P. M., Dominique, B. 2014. *Intestinal Microbiota in Health and Disease: Modern Concepts*. Taylor and Francis group, p: 345.
- ❖ Endo, A et Dicks, L.M.T. 2014. Physiology of LAB. In: *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy* (eds W. H. Holzapfel et B.J.B. Wood), p. 632, pp. 13-30. John Wiley et Sons, Ltd.

- ❖ Engels, C., Schieber, A., Ganzle, M. G. 2011. Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.). *Appl Environ Microbiol*, 77, 2215-2223.
- ❖ Ettayebi, K., El Yamani, J., Rossihassani, B.D. 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS microbial Lett*, 183, 191-195.

F

- ❖ Faber, E. J., P. Zoon, J. P. Kamerling et Vliegthart, J. F. G. 1998. The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydr. Res.* 310:269-276.
- ❖ FAO/WHO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation.
- ❖ Felis, G. E., Salvetti, E et Torriani, S. 2016. Systematics of Lactic Acid Bacteria: Current Status. In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* (2nd eds F. Mozzi, R. R. Raya, and G. M. Vignolo), p. 395, pp. 25-31.
- ❖ Fontana, C., Shengyu, Li., Zhennai, Y et Widmalm, G. 2015. Structural studies of the exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* C88 using NMR spectroscopy and the program CASPER. *Carbohydrate Research* 402, 87–94.
- ❖ Freitas, M., Tavan E., Thoreux K., Cayuela C et Sapin C., G. T. 2003. *Lactobacillus casei* DN-114 00 and bacteroides thetaiotamicron VPI-5482 inhibit rotavirus infection by modulating apical glycosylation pattern of cultured human HT29-MTX cells. *Gastroenterology*.
- ❖ Friteszeche, H. 1993. Les plantes médicinales et condimentaires au jardin. 2^{ième} ed. Eugen-Ulmer, p. 128, pp. 113-115.

G

- ❖ Gamar-Nourani, L., Blondeau, K et Simonet, J.M., 1998. Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *J. Appl. Microbiol.* 85, 664-672.
- ❖ Garcia garibay, M et Marshall, V.M.E. 1991. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Applied microbiology* 70 325–328. Gancel, F and G. Novel, 1994. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. *J. Dairy Sci.* 77: 685–688.
- ❖ Gassem, M. A., K. A. Schmidt J. F et Frank. 1995. Exopolysaccharide production in different media by lactic acid bacteria. *Cultured Dairy Prod. J.* 30:18–21.

- ❖ Gérard, P. et Benalier-Donadille, A. 2009. Les fonctions majeures du microbiote intestinal. Cah Nutr Diét 42: 28-36.
- ❖ Ghannadi, A., Sajjadi S. E., Kabouche A et Kabouche Z. 2004. *Thymus fontanesii* Boiss et Reut. A Potential Source of thymol-rich essential oil in North Africa. Zeitschrift Natur for schung C. Journal of biosciences. 59 (3-4): 187-189.
- ❖ Gibson, G.R et Roberfroid. M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. J. N°124. Pp. 1401-1412.
- ❖ Giovanna, E. Felis, Elisa Salvetti et Sandra Torriani. 2016. Systematics of Lactic Acid Bacteria: Current Status. In: Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications (2nd Ed. F Mozzi, R R. Raya, and G M. Vignolo). John Wiley et Sons, Ltd, P. 395, pp. 25-31.
- ❖ Gomes, A. M., Pintado M. M., Freitas A. C et Sousa e Silva J. P., 2014. Gastrointesnal Tract: Microflora and Transit Aspects. In: Probiotic bacteria: Fundamentals, Therapy, and Technological Aspects (eds J.P. Sousa e Silva and A.C. Freitas) p. 310, pp. 7-33. CRC Press Taylor and Francis Group.
- ❖ Grobgen, G.J., Smith M.R., Sikkema J et de Bont J.A.M. 1997. Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymesinvolved in the suar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. Appl Microbiol Biotechnol 46: 279-284.
- ❖ Guignard, J. L et Dupont F. 2004. Botanique: Systématique moléculaire. 13^{ème} éd. Masson, p. 237.
- ❖ Guiraud, J.P. 1998. Microbiologie alimentaire. Edition française. P. 7.

H

- ❖ Haj-Mustafa, M., Abdi, R., Sheikh-Zeinoddin, M et Soleimanian-Zad, S. 2015. Statistical study on fermentation conditions in the optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* 519 in skimmed milk base media. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 4, 521–527.
- ❖ Hammes, W. P et Hertel. C. 1995. Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd eds W. B. Whitman), p. 1450, pp.465-532. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- ❖ Hammes, W. P et Hertel. C. 2009. Family I. Lactobacillaceae Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, familia. In: Bergey's manual of Systematic

Bacteriology. V3: Firmicutes (2nd Eds B. Whitman), p.1422, pp. 465-532 . Bergey's Manual Trust. Athens. USA.

❖ Hammes, W.P et Vogel. R.F. 1995. The genus *Lactobacillus*. In: The Genera of Lactic Acid Bacteria (ed. Wood et Holzapfel). P. 413, pp. 19-54. Blackie Academic et Professional London.

❖ Hao, W. L. and Y. K. Lee.2004. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol Biol* 268: 491-502.

❖ Havenaar, H., Ten Brink, B et Huisin't Veld, J.H.J., 1993. Selection of strains for probiotic use. In: *Probiotics: The scientific basis* (eds R. Fuller) p.405, pp. 209-224. Chapman et Hall. London.

❖ Hemingway, R., Laks, P.E et Branham S. J.1992. Plant polyphenols: Synthesis, Properties, Significance. Plenum Press, New York, p. 1026.

❖ Holzapfel, W.H. et Wood, B.J.B., 1995. Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In: *The Genera of Lactic Acid Bacteria* (eds B.J.B. Wood et W.H. Holzapfel) p-413, pp. 1-7. Chapman et Hali.

❖ Holzapfel, W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U et Huis in't Veld J. H. J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41.

❖ Holzapfel, W. H., Björkroth. J. A et Dicks. L.M. T.2009. Family V. *Leuconostoc aceae* fam. nov. In: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology. V3: Firmicutes* (2nd eds B. Whitman),p.1422, pp. 624-654. Bergey's Manual Trust. Athens. USA.

❖ Hongpattarakere, T., Chertong, N, Wichienchot, S, Kolida, S et Rastall, R, A. 2012. In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers* 87: 846– 852.

❖ Hossain, B., P. Brunton., B. Tiwari., A. Patras., O'Donnell, B. Diana Martin et C. Barry-Ryan, 2012. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*. 19: 582–590.

❖ Hooper, L. V. et J. I. Gordon 2001. "Commensal host-bacterial relationships in the gut." *Science* 292(5519): 1115-8.

❖ Huber, B., Eberl L., Feucht W et Polster J. 2003. Influence of Polyphenols on Bacterial Biofilm Formation and Quorum-sensing. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen*, p. 879-884.

I

❖ Ikigai, H., T. Nakae., Y. Hara et Shimamura, T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta*, 1147: 132–136.

- ❖ Ismail, B et Nampoothiri, K. M.2010. Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Archives of Microbiology*, 192(12), 1049-1057.
- ❖ Isolauri, E et S. Salminen. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics.*" *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18(2): 299-313.

J

- ❖ Jordan, M., Martinez. M. R., Martinez. C., Monino. I et Sotomayor.A. 2009. Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels. *Industrial crops and products.* 29, 145–153.
- ❖ Jolly, L et Stinglele .F. 2001. Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. *Int Dairy Journal*. N° 11. Pp. 733-745.
- ❖ Jourdain, D. 2002. *Dictionnaire des plantes médicinales*. Ed. Quebecor, p. 186, pp.11-19, pp. 180-181.
- ❖ Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G et Hara, Y. 1998. Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reaction of flavonoids. In: *Flavonoids in health and disease* (ed. Rice- Evans et Packer), vol 07, p. 545, pp. 137-162.

K

- ❖ Kabouche, Z., Boutaghane, N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z et Benlabed K. 2005. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The international of Aromatherapy*, 15: 129-133.
- ❖ Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V et Arul, V. 2011. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresource Technology*, 102(7), 4827- 4833.
- ❖ Karo, D, K., H. Mamoudou., D. Simpore et Traore, A. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology.*, 4 (8):823-828.
- ❖ Kenneth, R. M et Bloor, S.J. 1998. Analysis and identification of flavonoids in practice. In: *Flavonoids in health and disease* (ed. Rice- Evans et Packer), vol 07, p. 545, pp. 1-34.
- ❖ Khalil, S.K et A. Rowayd 2010. Influence of gallic acid and catechine polyphenols on probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 strain. *Word journal of Microbiology and Biotechnology*. 11: 2069-2079.
- ❖ Khan, M, K., M. ABERT-Vian et F. Chemat, 2010. Ultrasound assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L). *Peel. Food .Chem.* 2: 851-858.

- ❖ Kim, Y., O, S., et Kim, S. H. 2009. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 324- 329.
- ❖ Kimmel, S.A et Roberts, R.F., 1998. Development a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR. *Int. J.Food Microbiol.*40, 87–92.
- ❖ Korakli, M., Pavlovic,M.,Gänzle,M.G et Vogel,R.F. 2003. Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2073–2079.
- ❖ Kos, B., J. Suskovic., S. Vukovic., M. Simprag., J. Frece et Matosic, S.2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92.*Journal of Applied Microbiology.* 94: 981-987.
- ❖ Kowalczyk, M., Mayo B., María Fernández et Aleksandrzak-Piekarczyk. T. 2016. Updates on Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Light of “Omic” Technologies. In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications (2nd F. Mozzi, R. R. Raya, and G. M. Vignolo)*, p. 395, pp. 1-24. John Wiley & Sons, Ltd.
- ❖ Kwok, L. 2015. Lactic Acid Bacteria and the Human Gastrointestinal Trac. In: *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice* (eds. H. Zhang et Y. Cai). Springer Dordrecht Heidelberg New York London, p. 536, pp. 375-442.

L

- ❖ Larpent, J.P et Sanglier, J. 1989. *Biotechnologie des antibiotiques*. Ed. Masson. Paris, p. 481, pp
- ❖ Larrosa, M., Yanez-Gascon, MJ., Selma, MV... Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSSS-induced colitis rat model. *Journal of agricultural*
- ❖ Lay, C., Rigottier-Gois, L., Holmstrom, K., Rajilic, M., Vaughan, E.E et De Vos, W.M.2005. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol* 71: 4153-4155.
- ❖ Leclerc, M., Juste, C., Blottière, H. et Doré, J. 2007. Microbiote intestinal : un univers méconnu. *Cah Nutr Diet*, 42, 22-27.
- ❖ Lee, Y. K. 2009. Probiotic microorganisms. In: *handbook of probiotics and prebiotics (2nd ed. Y. K. Lee et S. Salminen)*, John Wiley et Sons, Inc. P. 606, pp. 1-176.
- ❖ Leveau, J. Y et Bouix. M. 1993. *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel*.p. 612. Pp. 170-331. Tec et Doc. Lavoisier.

- ❖ Li, W., Juan, J, Xin, R, Jiaojiao ,Y, Weizhi, T, Xiaohong, Jiang, C, M et 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, D., Li, J., Zhao, F., Wang, G., Qin, Q et Hao,Y. 2016. The influence of fermentation condition on production and molecular mass of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 in milk-based medium. Food Chemistry 197, 367–372.
- ❖ Ligang, C., J. Hayan., D. Lan., Z. Huarong., L. Juan., Q. Chenling et Z. Hanqi, 2008. Dynamic microwave- assisted extraction of flavonoids from herba Epemedii. Separation and purification technology. 59:50-57.
- ❖ Lister, J. L et Horswill A. R. 2014. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 178:1-9.
- ❖ Lister, E et Wilson, P. 2001. Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity. Lincoln, New Zealand: Crop Research Institute.
- ❖ Lin, J.K. et Weng, M.S.2006. Flavonoids as Nutraceuticals. In: The Science of Flavonoids (ed. E. Grotewold) Springer Science_Business Media, pp. 213-239.
- ❖ Liu, W, Pang H, Zhang H et CaiY. 2014. Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. In: Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice (Ed. H Zhang et Y Cai). Springer Dordrecht Heidelberg New York London, p. 536, pp. 103-204.
- ❖ Looijesteijn, P.J., Trapet L., de Vries E., Abee T et Hugenholtz J. 2001. Physiologicalfunction of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. Int J Food Microbiol N° 64. Pp. 71-80.
- ❖ London, L.E.E; Ross,R.P; Fitzgerald,G.F. Fergus ShanahanNoel Caplice, M et Stanton, C. 2016. Probiotics as cell factories for bioactive ingredients: focus on microbial polysaccharides and health beneficial effects. In: Advances in Probiotic Technology (ed, P. Foerst et C. Santivarangkna), Taylor et Francis Group, p. 380, pp. 77- 103.
- ❖ Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailiene, A et Labokas, J. 2007. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. Food Chemistry. 103, 546-559.
- ❖ Ludwig, W., Schleifer, K.H et Whitman, W.B. 2009. Revised road map to the phylum *Firmicutes*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3: *The Firmicutes* (2nd eds. De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D. *et al*), p. 1450, pp. 1-13. New York: Springer.

M

- ❖ Macfarlane, S., Macfarlane, G. T., .2000. "Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract." Aliment Pharmacol Ther 24(5), 701-714.

- ❖ Macheix, J.K et Jay-Alemand, C .2005. Composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presse polytechniques et universitaires Romande. Pp. 18- 27; P. 40.
- ❖ Malago, J. J. Jos F.J. Konink, X et Marinsek-Logar R, 2011. Probiotic Bacteria and Enteric Infections Cytoprotection by Probiotic Bacteria. Springer Science, p. 487.
- ❖ Mao, Y., Yu, J.L., Lungh, A et Molin, G. 1996. Response to oral administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC, *Lactobacillus plantarum* DSM 9843, pectin and oatbase on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Microbial ecology in health and disease*, 6: 261-269. (en ligne: 2009).
- ❖ Marais, J.P.J. Deavours, B. Dixon, R.A et Ferreira, D.The Stereochemistry of Flavonoids. In: *The Science of Flavonoids* (ed. E. Grotewold) Springer Science_Business Media, pp. 1-47.
- ❖ Marshall, V. M., H. Dunn, M. Elvin, N. McLay, Y. G et Laws, A. P. 2001. Structural characterisation of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EU20. *Carbohydr. Res.* 331:413–422.
- ❖ Marino, A., V. Bellinghieri., A. Nostro., N. Miceli., M. Fernanda Tviano., A. Guvenç et Bisignano, G. 2010 *In vitro* effect of branch extracts of *Juniperus* species from Turkey on *Staphylococcus aureus* biofilm. *Research Articles. FEMS.* 59: 470-476.
- ❖ Marteau, P.R., De Vrese, M., Cellier, C.J et Schrezenmeir J.2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr*;73:430S-436S.
- ❖ Marzouk, B., E. Haloui., N. Akremi., M. Aouni., Z. Marzouk et Fenina, N. 2012. Antimicrobial and anticoagulant activities of *Citrulluscolocynthis*Schrad. leaves from Tunisia (Medenine). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.*6 (26): 1982-1988.
- ❖ Maslov, A. 2014. Modeling statistics of the natural aggregation structures and processes with the solution of generalized logistic equation. Corneyl University library
- ❖ Mattila-Sandholm, T., Matto, J et Saarela, M. 1999. Lactic acid bacteria with health claimsinteraction and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, 9.
- ❖ Matthias ullrich. 2009. Bacterial polysaccharides: current innovations and future trends. ed horizon scientific press. p 81,82.
- ❖ McCracken, V. J et Lorenz, R. G. 2001. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol* 3(1), 1-11.
- ❖ Meltem, Y.A et Tugba, K. 2015. The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. *International Journal of Food Science and Technology.* 50 (7), 1666–1672.
- ❖ Melys. 2003. Thé et santé : les effets bénéfiques du thé et des antioxydants sur la santé. *Revue.*

- ❖ Meskin, R et Mark, S. 2003. Phytochemicals-Mechanisms of action. Boca raton: CRC Press. Pp. 22- 28; Pp. 51-54
- ❖ Ming, Ye, L. Dong., Rong, Z., Liu, Y et Jing, W. 2012. Effect of hawk tea (*Litsea coreana*) L on the numbers of lactic acid bacteria and flavour compounds of yoghurt. 23: 68-71.
- ❖ Monnet, V., Atlan, D, Béal, C., Champomier-Vergès, M.C., Chapot- Chartier, M.P., Chouyakh. H., Coccagn- bousquet, M., Deghoran, M., Gaudu, P., Gilbert, C., Guédon, E., Guillouard, I., Goffin, P., Guzzo, J., Hols, P., Juillard, V., Ladero, V., Lindley, N., Lortal, S., Loubière, Maguin. E., Monnet, C., Rul, F etTourdot-Maréchal, R. 2008. Métabolisme et ingénierie métabolique. In: Bactéries lactique. De la génétique aux ferments (eds G. Corrieu et F.M. Luquet),p 849,pp 271-449. Tec et Doc. Lavoisier.
- ❖ Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.M., Remaud-Siméon, M.2001.Homopolysaccharides from lactic acid bacteria.International Dairy JournalVolume 11, Issue 9, P. 675–685.
- ❖ Morales, R. 1997. Synopsis of the genus *Thymus* L. in the mediterranean area. *Logascalia*, 19:249-262.
- ❖ Morales, R. 2002. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Thyme: The genus *Thymus* (eds E. Stahl-Biskup and F. Saez) p.346, pp.1-43. LLC Taylor and Francis group.
- ❖ Morelli, L., Vogensen, F. K et Wright, A.V. 2004. Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (3rdeds S. Salminen., A.V. Wright et A. Ouwehand) p.628, pp.246-290. Marcel Dekker, Inc.
- ❖ Morris, C.J.; Earl, J.R.; Trenam, C.W et Blake, D.R. 1995. Reactive oxygen species and iron: a dangerous partnership in inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27: 109-122.
- ❖ Motulsky, H et Christopoulos, A. 2003. Fitting biological data with linear and nonlinear regression. Version 4.0 GraphPad Prism guide.
- ❖ Mozzi, F., G. Savoy de Giori, G. Oliver et Font de Valdez , G. 1996. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* in milk under different growth conditions. *Milchwissenschaft* 51:670–673.
- ❖ Muigei, S.C., Shitandi, A., Muliro,P., 2014. Effect of incubation period and growth medium composition on exopolysaccharides yield with indigenous fermented Kenyan Mursik milk. *Int.J.Biol.Pharm.AlliedSci.*3, 248-271.
- ❖ Mutai, C., C. Bii., D. Abatis et Roussis, V. 2009. Antimicrobial actevity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*. 10: 86-95.

N

- ❖ Naghibi, F., Mosaddegh, M et Mohammadi, M. 2005. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. N°2: 63-79.
- ❖ Nakajima, H., Toyoda S., Toba T., Itoh T., Mukai T., Kitazawa H et Adachi S. 1990. A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* SBT 0495. J Dairy Sci 73: 1472-1477.
- ❖ Nauta, A., Bakker-Zierikzee M et Schoterman M. H. C., 2008. Galacto-Oligosaccharides. In Handbook of probiotic and prebiotic ingredients (eds S. Sangsoo cho et E.T. Finocchiaro) p.455, pp.75-76. E- CRC press. New York.
- ❖ Novel, G. 1993. Les bactéries lactiques. In : Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel (ed J.Y Leveau et M. Bouix), p 591, pp. 170-331.. Tec et Doc. Lavoisier.

O

- ❖ O'Hara, A. M et Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. EMBO Rep 7: 688-693.
- ❖ O'Toole, G, A. 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. Journal of visualized experiments. (47), e2437, doi:10.3791/2437.
- ❖ Ouwehand, A. C et Vesterlund S. 2003. Health aspects of probiotics. IDrugs, 6(6):573-80.

P

- ❖ Pan, D et Mei, X. 2010. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. Carbohydrate Polymers, 80(3), 908e914.
- ❖ Parkar, S, G., Stevenson, D, E et Skinner, M, A. 2008. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. International Journal of Food Microbiology. 124, 295–298.
- ❖ Patel, S., Majumder, A., Goyal, A. 2012. Potential of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Indian J. Microbiol. 53, 3-12.
- ❖ Pham, P.L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G et Cerning, J. 2000. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2302–2310.
- ❖ Pedersen, J. A. 2000. Distribution and taxonomy implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochem. Syst. Ecol.*, 28: 229 - 253.
- ❖ Petry, S., Furlan S., Crepeau M.J., Cerning J., Desmazeaud M. (2000): Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. Appl Environ Microbiol 66: 3427-3431.

- ❖ Pilet, M. F., Magras. C., Federighi. 2005. Bactéries lactiques. In: Bactériologie alimentaire: compendium d'hygiène des aliments (2eds M. Federighi) p. 292, pp. 219-242.
- ❖ Piskula, M.K. 2000. Soy isoflavone conjugation differs in fed and food-deprived rats. Ed J-Nutr. P.136.
- ❖ Polese, J. 2006. Culture des plantes aromatiques. Ed Artemis. P.83.
- ❖ Poole, D. 2012. Modeling statistics of the natural aggregation structures and processes with the solution of generalized logistic equation
(http://www.cs.ubc.ca/~davidbuc/population_growth.pdf).
- ❖ Pot B, Ludwig W, Kersters K et Schleifer K-H. 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria. In: Bacteriocins of lactic acid bacteria (1steds L. D Vuyst et E. J Vandamme), p. 538, pp. 13–90. Springer. London.
- ❖ Pot, B. 2008. Taxonomy of lactic acid bacteria. In: Bactéries lactique. De la génétique aux ferments (eds G. Corrieu et F.M. Luquet), p 849,pp 1-109. Tec et Doc. Lavoisier.
- ❖ Prescott, L.M., . Sherwood, L. M et Woolverton C.J. 2010. Microbiologie. 3^{ème} eds. eboeck. P. 1086, pp. 1049-1086.
- ❖ Puupponem-Pimia, R., L. Nohynek., C. Meier., M. Kahkonen., M. Heinonen et Hopia, A.2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. Journal of Applied Microbiology, 90(4): 494–507.

Q

- ❖ Quezel, P et Santa, S. 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, p. 377.
- ❖ Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C et Pouysegou, L. 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Chem Int Ed, 50,586-621.
- ❖ Quirynen, M, Dierickx, K et Steenberghe, D. V.2000. Effects of Surface Roughness and Free Energy on Oral Bacterial Adhesion. In: Handbook of bacterial adhesion: Principles, methods and applications (ed. Yuehuei, H. A., Richard, J. F). *Friedman in Humana Press, Jersey*. P. 666, p. 91.

R

- ❖ Rambaud, J.C., Bouhnik, Y., Marteau, P et Pochart, P. 1993. Manipulation of the human gut microflora. *Proc Nutr Soc*; 52:357-66.
- ❖ Remesy, C., Manach, C., Demigne, C., Texier, O et Regeat, F. 1996. Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Med. Nut.* 32 (1) :17-27.
- ❖ Renault, P. 2008. Génétique des bactéries lactiques. In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (eds. G. Corrieu et F. M. Luquet), p. 847, pp. 153-269.

- ❖ Rey, C et Saez, F. 2002. Field culture, *in vitro* culture and selection of *Thymus*. In: Thyme: The genus *Thymus* (eds E. Stahl-Biskup and F. Saez) p.346, pp.177-196. LLC Taylor and Francis group.
- ❖ Ricciardi, A., Clementi, F. 2000. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. *Ital J Food Science* 12: 22-45.
- ❖ Richelle, M, Pridmore, M, Enslin, S. 2001. Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by β glycosidase. *J-Nutr.* 132 (9): 2587-2592.
- ❖ Rodrigo, R et Libuy, M. 2014. Modulation of plant endogenous antioxidant systems by polyphenols. In: *Polyphenols in plants: Isolation, purification and extract preparation* (ed. R. R. Watson), Academic Press. Elsevier, p. 334, pp. 65-78.
- ❖ Rodriguez Vaquero, M.J., Aredes Fernandez, P.A., Manca deNadra, M.C., Strasser de Saad, A.M.2010. Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. *J Agric Food Chem*, 58, 6048-6052.
- ❖ Round, J. L et Mazmanian, S. K. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 313-323.
- ❖ Roux, D et Ctier. O. 2007. Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. Ed. Porphyre. P. 13.
- ❖ Roux, D. 2011. Les nouvelles plantes qui soignent. Ed. Alpen. Monaco, p.95, pp. 12-27, p. 54.
- ❖ Ruas-Madiedo, P., Tuinier, R., Kanning, M et Zoon, P. 2002. Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *International Dairy Journal* 12: 689-695.
- ❖ Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; Margolles, A.; de los Reyes-Gavilan, C. G et Salminen, S. 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *S. J. Food Prot* 69, 2011–2015.
- ❖ Ruas-Madiedo, P, Salazar, N et de los Reyes-Gavilán, C G. 2009. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in food and probiotic applications in: *Microbial glycobiology: Structures, relevance and applications* (Ed. Holst O, Brennan J P, Itezstein M V). Elsevier. London NW1 7BY, UK, p982, pp. 884-902.

S

- ❖ Saavedra, MJ ., Borges, A., Dias, C., Aires A., Bennett, RN., Rosa, E et Simoes, M. 2010. Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Med Chem* 6:174-183.

- ❖ Saez, F et Stahl-biskup, E. 2002. Essential oil polymorphism in the genus *Thymus*. In: Thyme: The genus *Thymus* (eds E. Stahl-Biskup and F. Saez) p.346, pp.125-143. LLC Taylor and Francis group.
- ❖ Salminen, S. Gorbach, S Lee, Y.K et Benno, Y 2004. Human Studies on Probiotics: What Is Scientifically Proven To day? In: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects (3rd ed. S Salminen, A V Wright, A Ouwehand). Marcel Dekker, Inc, p. 628, pp. 515-509.
- ❖ Salminen, S et Isolauri, E. 2006. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. *Journal of pediatric*.
- ❖ Sanders, M. E. 2000. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *Journal of Nutrition*, 130, 384-390.
- ❖ Sandrine, P., Sylviane, F., Marrie-Jeanne, C., Cerning, J et Miche, D. 2000. Factors affecting exopolysaccharides production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in chemically defined medium. *applied and environmental microbiology*, 66, 3427-3431.
- ❖ Sarni-machado, P et Cheynier, V. 2006. Les polyphénols en agro-alimentaire. Tec et DOC. Pp. 106- 117; 234-245.
- ❖ Schausenberg, P et Paris, F. 2013. Les plantes médicinales. Delachaux et Niestlé, Paris, p. 396, pp. 7-17, p. 197.
- ❖ Schleifer, K.H. et Ludwig, W. 1995. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria (1st eds W.H. Holzappel and B.J.B. Wood), p 413, pp. 7-17. Chapman & Hall.
- ❖ Schwiertz, A., Taras, D., Schafer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C. & Hardt, P. D. 2009. Microbiota and SCFA in Lean et Overweight Healthy Subjects. *Obesity* (Silver. Spring).
- ❖ Shahidi, F. 1997. Natural antioxidants: Chemistry health effects and applications. Champaign: AOCS Press. Pp 174- 176.
- ❖ Sharma, D., Saharan, B.S et Kapil, S. 2016. Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria. Eds. Springer Nature, p. 96, pp. 1-10.
- ❖ Shreiner, A., Huffnagle, G. B et Noverr, M. C. 2008. The Microflora Hypothesis of allergic disease. *Adv Exp Med Biol* 635: 113-134.
- ❖ Siracusa, L et Ruberto, G. 2014. Plant Polyphenol Profiles as a Tool for traceability and valuable support to biodiversity. In: Polyphenols in plants: Isolation, purification and extract preparation (ed. R. R. Watson), Academic Press. Elsevier, p. 334, pp. 15-27.
- ❖ Sitthiphong, P., Klinder, A., Lampe, J et Rowland, I. 2012. Flavonoids and Cancer: Effects on DNA Damage. In: Flavonoids and related compounds Bioavailability and Function (ed. J. P. E. Spencer et A. Crozier), Taylor & Francis Group, p. 474, pp. 425-444.

- ❖ Smith, H. W. 1965. Observations on the Flora of the Alimentary Tract of Animals and Factors Affecting Its Composition." J Pathol Bacteriol 89: 95-122.
- ❖ Sortor, L., Pezzato, E et Dona, M. L. 2004. Prostate carcinoma and green tea. Revue.
- ❖ Soto-Mendivil, E.A., Mreno-Rodriguez, J.F., Estarron- Espinozan, M., Garcia-Fjardo, J.A et Obledo-Vazquez, E.N. 2006. Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus Vulgaris* against *Alternaria citris*- E Gnoisis Vol 4, N° 16.
- ❖ Souza, B. W., Cerqueira, M. A., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Martins, J. T et Teixeira, J. A., 2012. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. Food Hydrocolloids, 27(2), 287e292.
- ❖ Spears, R. W et Freter, R.. 1967. Improved isolation of anaerobic bacteria from the mouse cecum by maintaining continuous strict anaerobiosis. Proc Soc Exp Biol Med 124(3): 903-9.
- ❖ Stahl-biskup, E. 2002. Thyme as a herbal drug - pharmacopoeias and other product characteristics. In: Thyme: The genus *Thymus* (eds E. Stahl-Biskup and F. Saez) p.346, pp.293-316. LLC Taylor and Francis group.
- ❖ Sun, Z., Yu J., Dan, T., Zhang, W et Zhang, H. 2014. Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria. In: Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice (eds. H. Zhang et Y. Cai). Springer Dordrecht Heidelberg New York London, p. 536, pp. 1-102.
- ❖ Sutherland, I.W. 1972. Bacterial exopolysaccharides. Advances in Microbial Physiology. Academic Press, New York, NY, USA. P.171, pp 1-5
- ❖ Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. Trends Biotechnol. 16:41–46.
- ❖ Sutherland, I.W.2003. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Ed, Press Syndicate of the University of Cambridge, p. 171, pp. 12-38, 82-102.

T

- ❖ Tagg, J.R., Wescombe, P.A et Burton, J.P.2012. *Streptococcus*: A Brief update on the Current taxonomic status of the genus. In : Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (3rd eds S. Salminen., A.V. Wright et A. Ouwehand) p.628, pp.123-146. Marcel Dekker, Inc.
- ❖ Tuncer, B. O., Tuncer, Y. 2014. Exopolysaccharide producer *Streptococcus thermophilus* st8.01 strain; a potential probiotic culture. *The Journal of Food*. 195-202
- ❖ Tannock, G.1997. Normal microbiota of the gastrointestinal tract of rodents. . Gastrointestinal microbiology. R. I. Mackie and B. A. White. New York, N.Y., Chapman and Hall Microbiology series.

- ❖ Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C et Furet, J.P. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol* 11: 2574-2584.
- ❖ Toba, T., Uemura, H et Itoh, T. 1992. A new method for the quantitative determination of microbial extracellular polysaccharide production using a disposable ultrafilter membrane unit. *Lett Appl Microbiol* 14: 30-32.
- ❖ Toit, M., Huch, M, Cho, G.S et Franz, C.M.A.P. 2014. Section VI The family Streptococcaceae. In: *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy* (eds W. H. Holzapfel et B.J.B. Wood), p. 632, pp. 445-476. John Wiley et Sons, Ltd.
- ❖ Torino, M. I., F. Mozzi, F. Sesma et de Valdez, G. F. 2000. Effect of stirring on growth and phosphopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in milk. *Milchwissenschaft* 55:204–206.
- ❖ Tosi, E, A., R. Edmundo, E. Marta, F., Ortega Ampelio et Cazzoli, 2007. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. 104: 1025–1029.

V

- ❖ Vacheethasane, K et Marchant, R, E. 2000. Nonspecific *Staphylococcus epidermidis* Adhesion: Contributions of Biomaterial Hydrophobicity and Charge. In: *Handbook of bacterial adhesion: Principles, methods and applications* (ed. Yuehuei, H. A., Richard, J. F). *Friedman in Humana Press, Jersey*. P. 666, p. 86.
- ❖ Välimaa, A.L., Honkalampi-Hämäläinen, U, Suvi Pietarinen, Stefan Willför, Bjarne Holmbom, Wright, A.V. 2006. Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 235–243.
- ❖ Van Calsteren, M.R; Pau-Roblot, C; Begin A., Roy D. 2002. Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. *Biochem J* 363: 7-17.
- ❖ Van, Halbeek, H. 1994. NMR developments in structural studies of carbohydrates and their complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 4 (5), 697–709.
- ❖ Van Geel-Schutten, G. H., Flesch, F., Ten Brink, B., Smith, M. R et Dijkhuizen, L. 1998. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 697–703.
- ❖ Van Kranenburg, R., J. D. Marugg, I. I. van Swam, N. J. Willem, and W. M. de Vos. 1997. Molecular characterisation of the plasmid encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 24:387–397.

- ❖ Vaquero, M, J., Alberto, M. R et Manca de Nadra, M. C. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18: 93–101.
- ❖ Vázquez, A. 2014. Modeling of chemical inhibition from amyloid protein aggregation kinetics. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 15:9.
- ❖ Verhelst, A, C, M., B,C. Schroyen., B,C,T. Buys et Niewold, A, C. 2010. The effects of plant polyphenols on enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesion and toxin binding. *Livestock Science*. 133: 101–103.
- ❖ Verhelst, A, C, M., B,C. Schroyen., B,C,T. Buys., A, C. Niewold, 2013. *E. coli* heat labile toxin (LT) inactivation by specific polyphenols is aggregation dependent. *Veterinary Microbiology*. 163: 319-324.
- ❖ Vesterlund, S.; Karp, M.; Salminen, S.; Ouwehand, A. C. *Microbiology*. 2006. *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. *Microbiology*, 152, 1819–1826.
- ❖ Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Cornelissen, A et van Sinderen, D. 2015. Structural investigation of cell wall polysaccharides of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 17. *Carbohydrate Research* 413 pp. 93-99.

W

- ❖ Wang, Y., Gänzle, M. G et Schwab, C. 2010. EPS synthesized by *Lactobacillus reuteri* decreases binding ability of enterotoxigenic *Escherichia coli* to porcine erythrocytes. *Appl. Environ. Microbiol.*doi:10.1128/AEM.03137-09, 1-16.
- ❖ Wang, H. H., Mee M. T et Church G. M. 2013. Applications of Engineered Synthetic. *Ecosystems. Synthetic Biology*. P317-325
- ❖ Wang, J., B. Sun., Y. Liu et Zhang, H. 2014. Optimisation of ultrasound- assisted enzymatic extraction of arabinoxylant from wheat bran. *Food chemistry*. 150: 482-488.
- ❖ Waters, E. M., McCarthy, H., Hogan, S., Zapotoczna, M., O'Neill, E., O'Gara, J. P. 2014. Rapid quantitative and qualitative analysis of biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* under static growth conditions. *Springer Science*. P157-166.
- ❖ Weiduo, Si, A., J. Gong., A. RongTsao., A. MiloshKalab., A. Raymond Yang et Yulong Yin, B. 2006. Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography*. 1125: 204-210.
- ❖ Weihua, X., Lujia, H et Bo, S. 2008. Microwave-assisted extraction of flavonoides from *Radix Astragali*. *Separation and purification technology*. 62: 614-618.

- ❖ Wen-Huang, A., B. An Xue., C. Hai Niu., B. Zhen Jia et Wanga, J.2009. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. *Food Chemistry* 114:1147-1154.
- ❖ Wernier, M et Braunschweig, R. V. 2008. *L’Aromathérapie*. Ed Vigot. France, p334, pp. 2-6, pp. 212-213.
- ❖ William, G. Hopkins et Charl-Marie, E. 2005. *Physiologie végétale*. Edition de boeck. P. 248. Pp. 276-280.
- ❖ Whiley, R.A., Hardie, J.M. 2009. Genus I. *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22 AL. In: *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3: The Firmicutes. (2ndeds B. Whitman), p.1422, pp. 655-711. Bergey’s Manual Trust. Athens. USA.
- ❖ Wright, A et Axelsson, L. 2012. Lactic acid bacteria: An introduction. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and fonctionnal aspects* (4th ed S Lahtinen, A.C. Ouwehand, S. Salminen and A.V Wright) p.775,pp. 2-14. CRC Press Taylor and Francis groupe.

X

- ❖ Xiao, J., Zhang, Y. et Yang, Z. 2015. Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. In: *Lactic Acid Bacteria. Fundamentals and Practice* (ed. H. Zhang et Y. Cai), Springer Science+Business Media Dordrecht. Pp. 303-375.

Z

- ❖ Zhang, M.,Fan, X., Li,X et Yang,H. 2008.Characterization and selection of lactobacillus strains for their effect on bil tolerance,taurocholate deconjugation and cholesterol removal. *World journal of microbiology and biotechnology*,24, 7-14.
- ❖ Zhang, J., Rui, X., Wang, L., Guan, Y., Sun, Y et Dong, M. 2014. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Food Control*, 42, 125e131.
- ❖ Zhao, Q., Liu,Y., Wang, C., Wang,S., Peng N et Jeynes, C.2008. Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. *Medical Engineering and Physics*, 30, 341–349.
- ❖ Zhou, J. R et Blackburn, G.L. 2003. Soy phytochemicals and tea bioactive compounds. *J. Nut.* 133 (2): 516-521.

Annexes

Annexe 01 : Composition des milieux de culture et solutions utilisés

1. Bouillon M₁₇	
Peptone de soja	5g
Peptone de viande	2,5g
Tryptone	2,5g
Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5g
Lactose	5g
Acide ascorbique	0,5g
Glycerophosphate de sodium	19g
Sulfate de Mg	0,25g
2. Bouillon MRS	
Peptone	
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	10g
Glucose	5g
Tween 80(= polysorbate 80)	20g
Phosphate dipotassique	1ml
Acétate de sodium	2g 5g
Citrate triammonique	2g
Sulfate de magnésium	200m
Sulfate de manganèse	g
	50mg
3. Bouillon nutritif	
Peptone	5g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Chlorure de sodium	5g
pH=7,4	
4. Bouillon hypersaccharosé	
Tryptone	10g
KH ₂ PO ₄	5g

Saccharose	5g
pH=6,5	50g
5. Chapman	
Chlorure de sodium	10g
Extrait de viande	1g
Manitoln	10g
Rouge de phénol	0.002
Agar	5g
pH=7,4	12g
6. Citrate de Simmons	
Citrate de sodium	2g
Chlorure de sodium	5g
Sulfate de magnésium	0.2g
Phosphate monoamoniaque	1g
Phosphate bipotassique	12g
Bleu bromothymol	0.08g
Agar	15g
pH= 7,2	
7. Eau peptonnée alcaline:	
Peptone bactériologique exempte d'indole	10g
Na cl	5g
pH= 8.6	
8. Éosine bleue de méthylène (EMB)	
Peptone	10g
Lactose	10g
Bleu de méthylène	0.065
Éosine	g
Hydrogénophosphate de potassium	0.4g
pH= 7.2	2g
9. Gélose M17	
Il s'agit de la mémé composition que celle de bouillon M17	

additionné de 13g/l d'agar.	
10. Gélose MRS Il s'agit de la même composition que celle de bouillon MRS additionné de 15g/l d'agar.	
11. Gélose nutritive	
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
pH = 7.4	
12. Hektoen (gélose):	
Protéose – peptone	12g
Extrait de levure	3g
Lactose	1.5g
Saccharose	0.5g
Salicine	1g
Citrate de fer III et d'ammonium	0.065
Sels biliaires	g
Fuchsine acide	12g
Bleu de bromothymol	12g
Chlorure de sodium	2g
Thiosulfate de sodium	9g
Agar	5g
pH = 7.5	13g
13. Mannitol- Mobilité- Nitraté	
Hydrolysate tryptique de caseine	10g
Mannitol	7.5g
Rouge de phénol	0.4m
Nitrate de potassium	g
Agar	1g
pH = 7.6	3.5g

14. Mueller-Hinton	
Infusion de viande de bœuf	300m
Peptone de caséine	1
Amidon de maïs	17.5g
Agar	1.5g
pH =7.4	17g
15. PBS (phosphate buffer saline)	
Chlorure de sodium	8g
Chlorure de potassium	0,2g
Phosphate disodique	1,15g
Phosphate monopotassique	0,2g
pH=7,3	
16. TSI	
Peptone	15g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3g
Peptone pepsique de viande	5g
Glucose	10g
Lactose	0.024
Saccharose	g
Rouge de phénol	5g
Chlorure de sodium	0.2g
Sulfate de fer	1g
Thiosulfate de sodium	10g
Agar	0.3g
pH = 7.5	11g

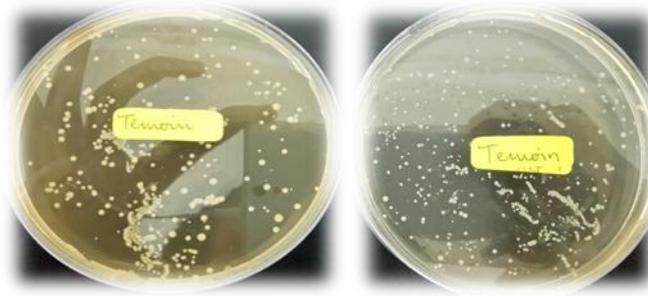
17. Urée - tryptophane (Urée indole)	
Urée	2g
L – tryptophane	0.3g
Ethanol à 0.95	1ml
Rouge de phénol	2.5m
Chlorure de sodium	g
Dihydrogénophosphate de potassium	0.5g
Hydrogénophosphate de potassium	0.1g
pH = 7	0.1g

Annexe 02 : Quelques résultats d'identification biochimique des ferments lactiques

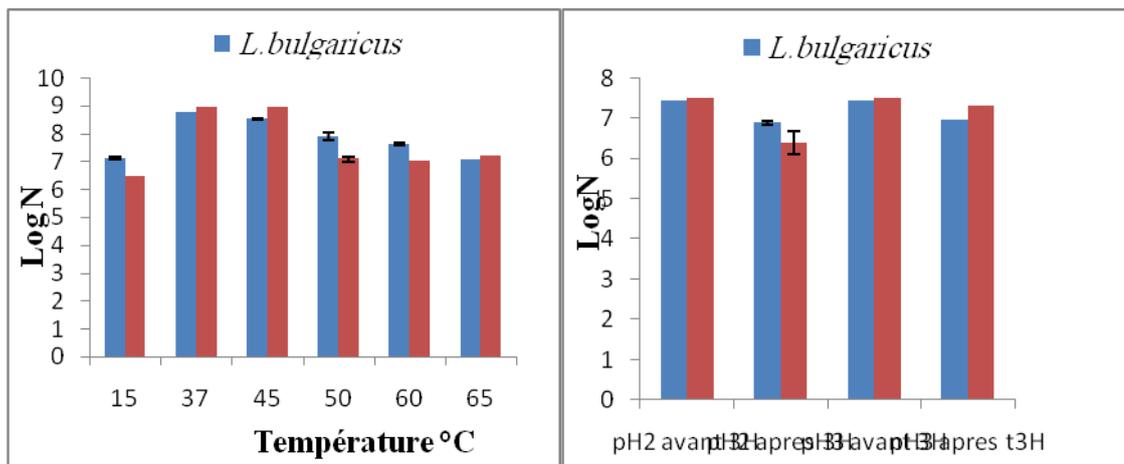
Tests	<i>L.bulgaricus</i>	<i>S.thermophilus</i>
Manitol mobilité	-	-
TSI	+	+
Citrate de simmons	-	-
Disque oxydase	-	-
Disque catalase	-	-
Disque ONPG	-	+
LDC	-	-
ODC	+	-
ADH	-	+
Type fermentaire	homofermentaire	Homofermentaire



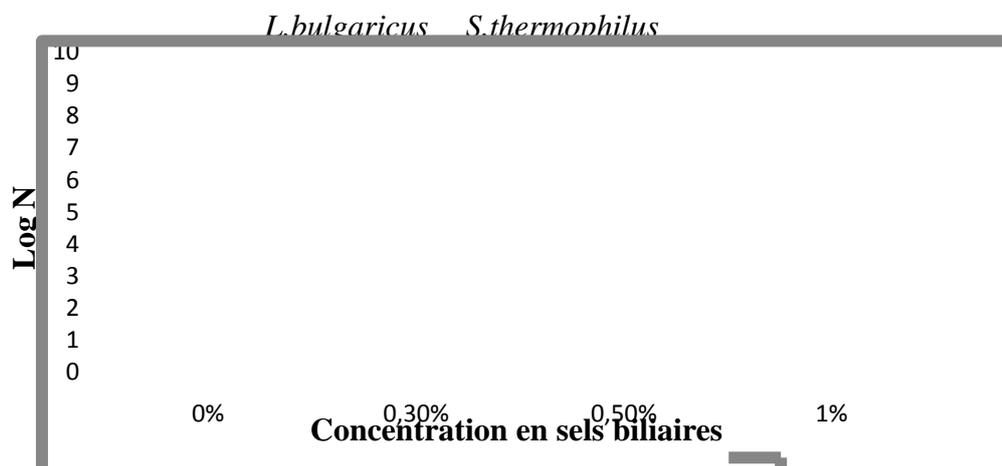
Annexe 03 : Résultats de screening des ferments lactiques



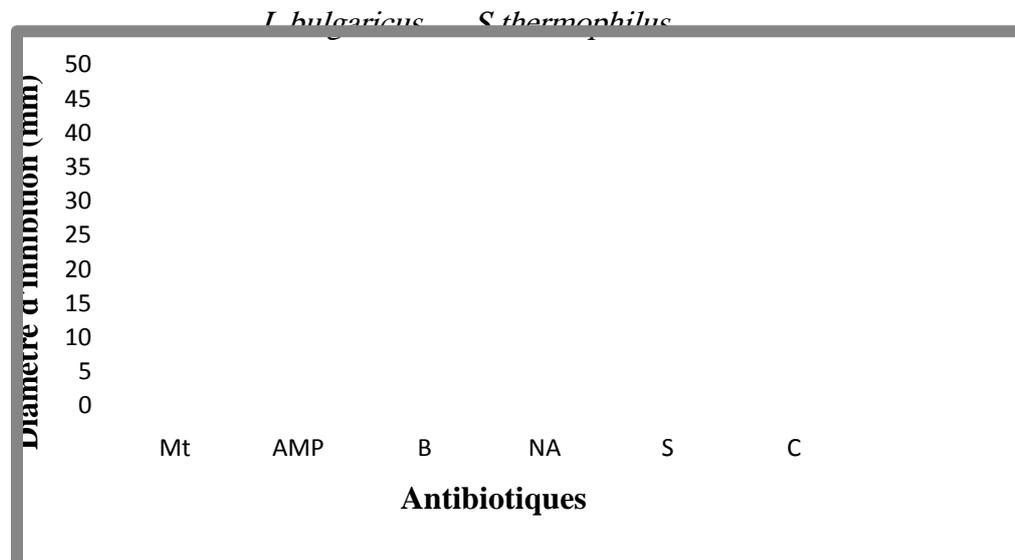
1. Croissance à différentes températures et aux bas pH



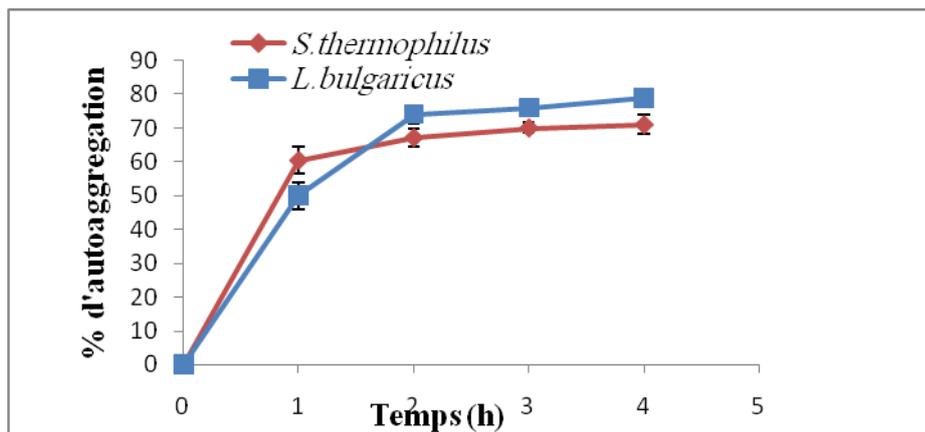
2. Croissance en présence des sels biliaries



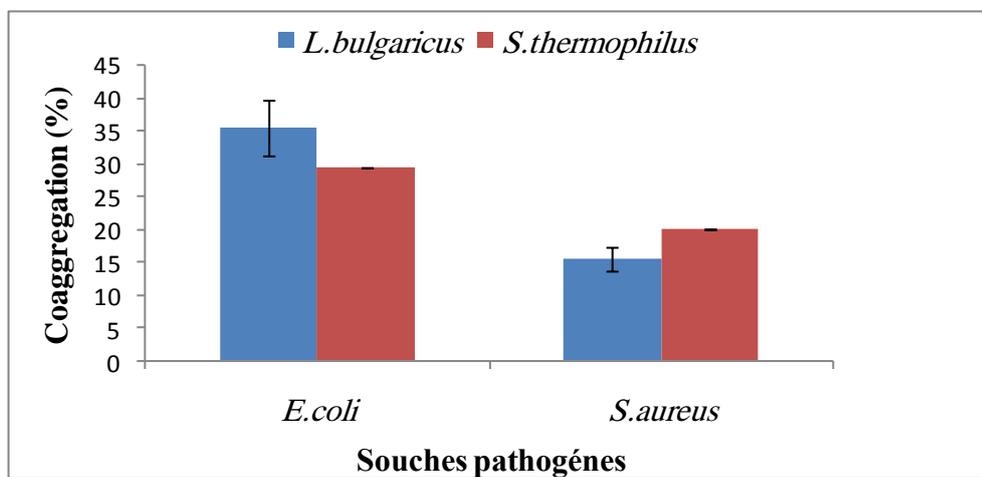
3. Résistance aux antibiotiques



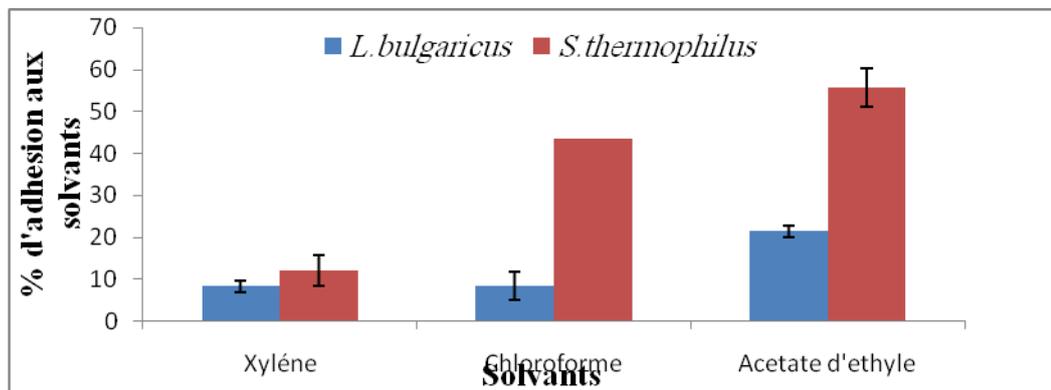
4. Capacité d'autoagrégation



5. Coagrégation avec les germes pathogènes



6. Hydrophobicité et propriétés physicochimiques de la paroi

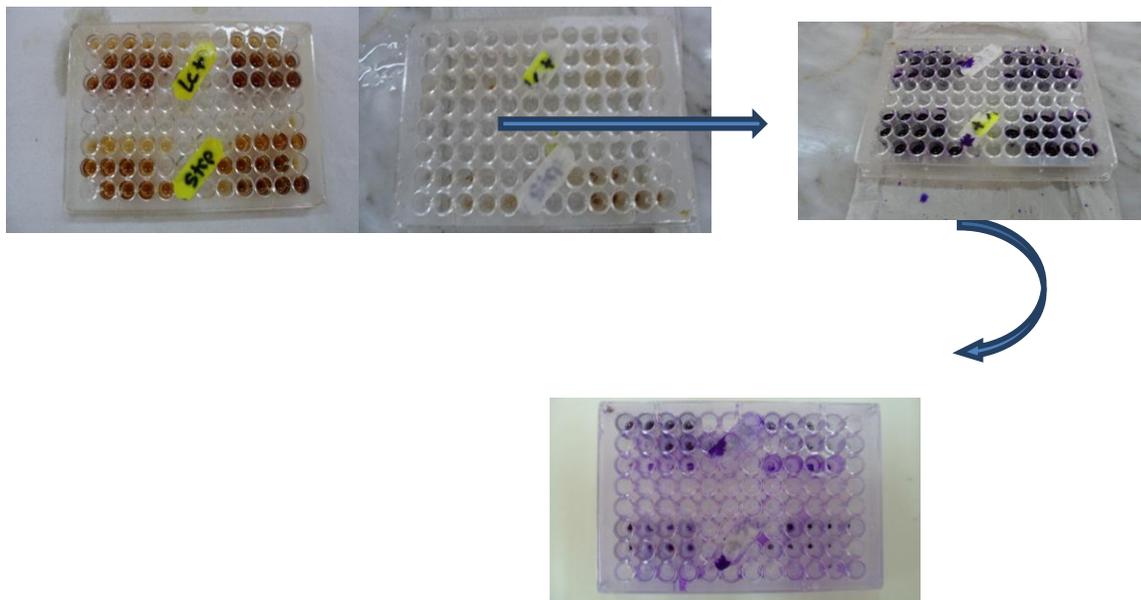


Annexe 04 : Résultats de l'effet prébiotique de l'extrait de *Thymus fontanesii*

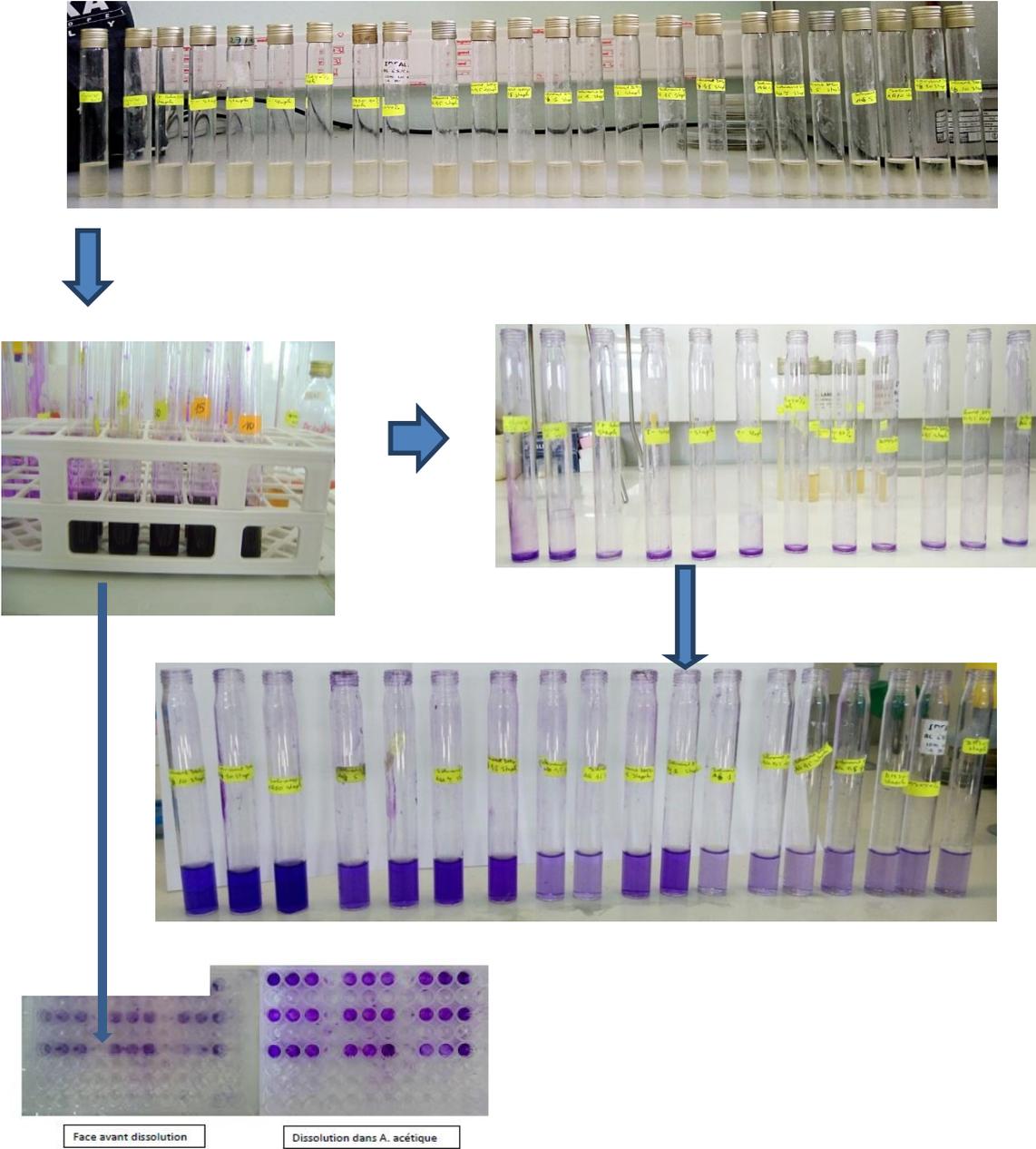
1. Activité antibactérienne



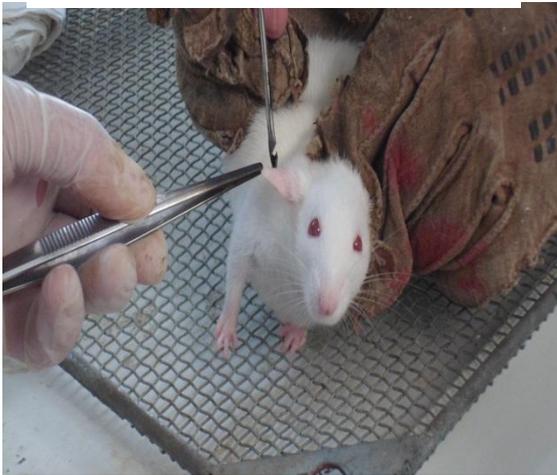
2. Effet sur l'aggrégation et la formation biofilm des probiotiques



3. Effet sur le biofilm négatif



Annexe 05 : Photos de manipulation des rats



Marquage et organisation des groupes



Introduction du traitement par gavage



Prise de poids

Annexe 06 : Courbe d'étalonnage

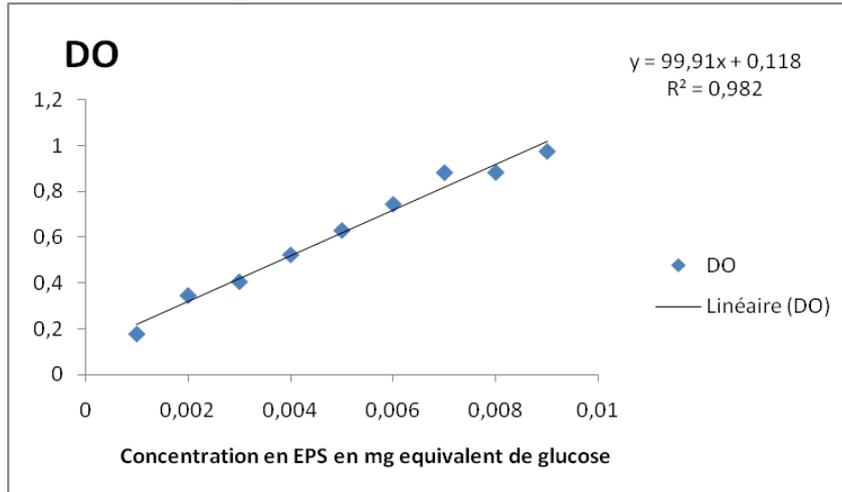


Figure N°31 : Courbe d'étalonnage des EPS

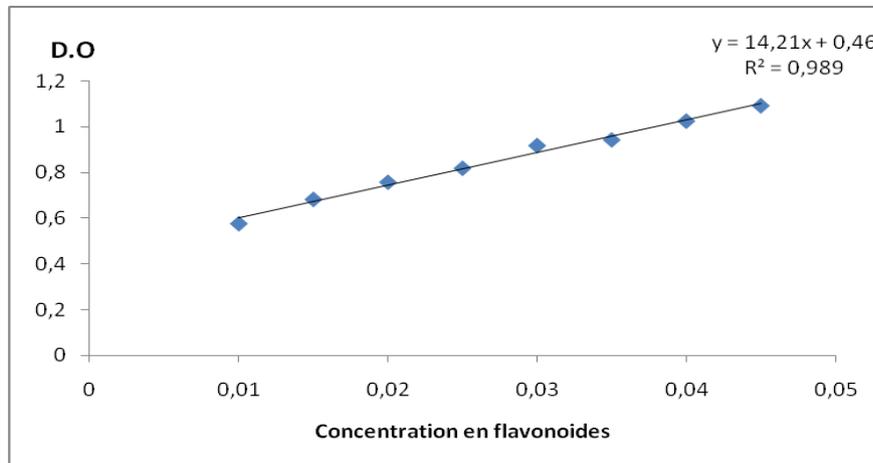


Figure N° 32 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

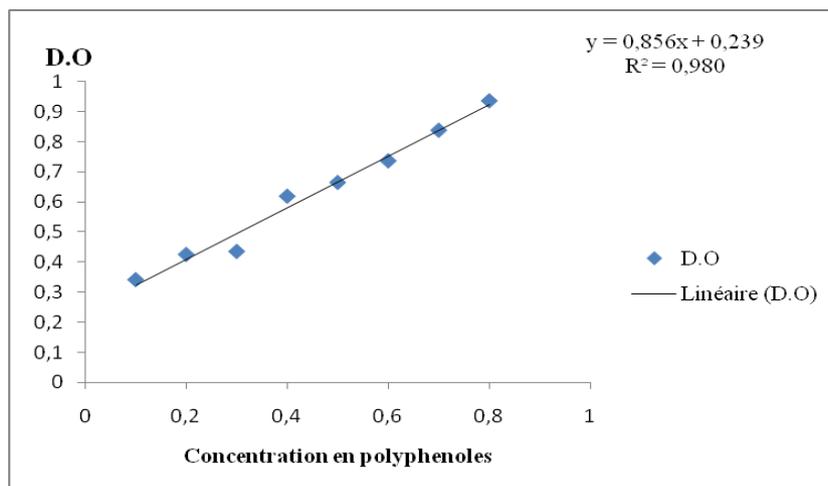


Figure N° 33 : Courbe d'étalonnage des polyphénols

Annexe 07 : Publication et présentation aux congrès

Communication orale présentée dans le cadre des 15iemes Journées Nationales de Microbiologie. Bejaia. Algérie. Novembre 2009

Boubakeur. B., Tirtouil Meddah. A., Meddah. B: Optimisation de la production des exopolysaccharides des ferments lactiques: Effet de l'extrait méthanoïque d' *Anacyclus valentinus*.

Poster présenté dans le cadre du colloque international de chimie verte et développement durable. Mostaganem. Algérie. 2010.

Boubakeur. B., Tirtouil Meddah. A., Meddah. B: Evaluation de l'effet des flavonoïdes sur l'activité probiotique.

Poster présenté dans le cadre des 16iemes Journées Nationales de Microbiologie. Chelf. Algerie. Octobre 2010.

Boubakeur. B., Tirtouil Meddah. A., Meddah. B: Propriétés prébiotiques et activité antibactérienne des flavonoïdes naturels et synthétiques.

Poster présenté dans le cadre du congrés Internationale des plantes médicinales et aromatique. Cagliari. Italie. Avril 2011.

Boubakeur.B., Meddah., Tir touil Meddah: Effect of Natural and synthetic flavonoïdes on growth and agregation of probiotic and pathogenic bacteria .

Communication affiché présentée dans le cadre du congrés Internationale des plantes médicinales et aromatique. Cagliari. Italie. Avril 2011.

Boubakeur.B., Meddah., Tirtouil Meddah: Improving of the production of exopolyssacharid of lactic acid bacteria by natural and synthytic flavonoïdes.

Poster présenté dans le cadre des 17iemes Journées Nationales de Microbiologie. Sétif. Algerie. Novembre 2011

Boubakeur. B., Khadem. H., Tirtouil Meddah. A: Evaluation de l'effet des flavonoides sur l'activité probiotique de *Streptococcus thermophilus*.

Poster présenté dans le cadre des Journées Internationales des Substances naturelles et Développement durable.Faculté des Sciences. Université Mohammed V-Agdal . Rabat. Maroc Juin 2012.

Boubakeur. B., Ahcen.S. Khadem. H., Tirtouil Meddah. A: Optimisation de la technique d'extraction des polyphénols de *Thymus fontanesii* et évaluation de leur activité microbienne.

Poster présenté dans le cadre du 5éme Syposium International Des Plantes Aromatiques et Médicinales. Université Cadi Ayyad. Marrakech.

Boubakeur. B., Khadem. H., Tirtouil Meddah. A., Meddah. B : Etudes comparative de l'activité prebiotique des Flavonoides Synthétique et naturels.

« Le don d'une plante utile me paraît plus précieux que la découverte d'une mine d'or et d'un monument plus durable qu'une pyramide »

Bernardin de Saint-Pierre (1737-1814)