

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB – Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département De Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière Sciences Biologiques

Option : Microbiologie

Thème :

***Etude du pouvoir probiotique de bactéries lactiques
isolées de produits laitiers***

Présenté par :

☆ **Ramdane Chaima**

☆ **Djenadi Wafia**

Date de soutenance :

13/ 07/ 2021

Devant le jury :

- | | | |
|---------------------------|-------------------|---------------------|
| • Mme Lounaci L. | MCB / USDB | Présidente |
| • Mme Ait Saadi N. | MCB/ USDB | Examinatrice |
| • Mme Benhoua I. | MCB/ USDB | Promotrice |

Année universitaire: 2020/2021

Remerciements

*Nous tenons à remercier tout d'abord le «Dieu
Le tout puissant» qui nous a donné du courage
et de la volonté pour avoir terminé ce travail*

*Nous tenons tout particulièrement à remercier chaleureusement notre
promotrice Mme **Benhouana.I** pour nous avoir proposé ce sujet
intéressant et consacré autant de temps pour nous, pour sa
bienveillance, ses conseils et ses orientations mais surtout sa
disponibilité permanente suscite notre administration et pour sa
gentillesse et sa sympathie.*

*Nous remercions les membres de jury d'avoir accepter
d'évaluer ce modeste travail.*

- A Mme **Lounaci. L** nous adressons nos remerciements les
plus sincères pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant
de présider ce jury.*
- A Mme **Ait Saadi. N** qui nous a fait l'honneur de bien
vouloir accepter de juger ce travail.*

*Nos remerciements vont également A Mme Zerrouki responsable
de laboratoire d'hygiène de Tipaza à son précieux aide lors de
l'entretien des souches pathogènes.*

*Sans oublier d'adresser nos sincères remerciements à Mme **Fella**
ingénieure de laboratoire au niveau du département vétérinaire pour
son précieux aide et à toutes les ingénieures de laboratoire de
microbiologie de la station expérimentale de l'université de BLIDA.*

*A tous ce qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de
ce mémoire et à tous ceux qui nous ont soutenus moralement par leur
affection et qui nous ont permis par leurs conseils et leur aide
quotidien de toujours avancer.*

Dédicaces

Je tiens à remercier le bon Dieu de m'avoir donné du courage et de patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :

L'âme de mon père.

Ma chère maman Aïcha qui a su habilement guider mes premiers pas dans ce monde, la lumière de ma vie qui guide mes routes et qui m'emmènes aux chemins de la réussite c'est grâce à toi que je dois toute ma réussite.

Mes sœur Hadjira, Leïla, et Hana qui m'ont poussé à travailler et à réussir et m'ont encouragé et soutenu dans les moments les plus difficiles.

Mon seul frère Mohamed El Hadi la force de ma vie.

A tous les membres de la famille (Ramdane et Benchama) et toutes mes amies.

Mon binôme Wafia avec qui j'ai partagé des moments agréables le long de ce travail.

Et la promotion microbiologie 2020.

Et tous ceux qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin.

Chaïma.



Dédicaces

Tout d'abord, je tiens à remercier le bon Dieu de m'avoir donné le courage et la patience de terminer ce modeste travail que je dédie à :

A mon cher papa Brahim

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuit pour mon éducation, ma formation et mon bien être.

A ma chère maman Zoulikha

Merci pour ton soutien, ton encouragement et tes sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance.

Je vous dois ma réussite, sans vous je n'aurais pas pu aller si loin.

A mon adorable frère waniss, que dieu te protège et que ton chemin soit pleins de succès.

A mes grands-parents et à toute ma famille sans exception (Djenadi et Bennabi)

Particulièrement à ma chère tante sisi

A mon fiancé Billel, pour ton soutien moral et ta gentillesse

A mon cher binome chaïma, merci pour tous les moments agréables partagés.

Wafia



المخلص

تحتوي البكتيريا اللبنية على العديد من الخصائص التكنولوجية التي تعطيها دورا ملحوظا في صناعة الأغذية لأنها تستخدم في التخمر والحفظ الحيوي للغذاء بفضل قدرتها على إنتاج مجموعة متنوعة من المواد المضادة للميكروبات القادرة على القضاء على الكائنات الدقيقة الممرضة.

وبالإضافة إلى ذلك، تستخدم البكتيريا اللبنية حاليا في صورة بروبيوتيك تعمل كمضافات غذائية لها تأثير إيجابي على صحة الإنسان.

خلال دراستنا، تم اختبار تسع سلالات من بكتيريا حمض اللاكتيك التي تم عزلها وتنقيتها في عمل سابق للتحقق من إمكاناتها الحيوية.

وقد أجريت دراسة النشاط المضاد للميكروبات ضد الجراثيم المسببة للأمراض (موجبة الجرام وسلبية الجرام) من خلال الاتصال المباشر بين السلالات المثبطة والسلالات المؤشرة:

(*Listeria monocytogenes*، *Staphylococcus aureus*، *E.coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *klebsiella*)

في حين أن التحقيق في البكتريوسين تم بواسطة طريقة نشر الأبار، وتم اختبارها على المواد الطافية للسلالات المدروسة. وخضعت ست سلالات فيما بينها لاختبارات السلامة لتقييم إمكانية وجود خاصية البروبيوتيك: تحمل الحواجز البيولوجية (الأحماض المنخفضة والأملاح الصفراوية)، والتحلل المائي في الدم، ومقاومة المضادات الحيوية.

أظهرت نتائج النشاط المضاد للميكروبات أن السلالات التسع المختارة تفرز في وسط الاستزراع مواد مثبطة قادرة على تثبيط نمو البكتيريا الممرضة، مع اختلاف مناطق تثبيط التي يتراوح قطرها بين 10 إلى 27 ملم.

من ناحية أخرى، أعطى البحث عن البكتريوسينات بطريقة الانتشار نتيجة سلبية لجميع السلالات المدروسة، مما يدل على عدم قدرة السلالات على إنتاج البكتريوسينات

أظهرت دراسة البروبيوتيك قدرة السلالات على البقاء في الظروف القاسية للقنوات الهضمية (درجة الحموضة الحمضية والأملاح الصفراوية وعدم قدرتها على تحليل دم الانسان)

بالنسبة لاختبار المضادات الحيوية، يتم ملاحظة الحساسية في السلالات للمجموعة الكاملة من المضادات الحيوية المختبرة، باستثناء حمض الفوسيديك، الذي تختلف حساسيته حسب السلالة.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية، البروبيوتيك، النشاط المضاد، البكتريوسين

Résumé

Les bactéries lactiques possèdent de nombreuses propriétés technologiques qui leur donnent un rôle remarquable dans l'industrie agro-alimentaire car ils sont utilisés en fermentation et bioconservation des aliments. Grace à leur capacité de produire une variété de substances antimicrobiennes capables d'éliminer les microorganismes pathogènes.

De plus, actuellement, les bactéries lactiques sont utilisées sous forme de probiotiques jouant le rôle d'additifs alimentaires qui agissent positivement sur la santé de l'homme.

Au cours de notre étude, neuf souches de bactéries lactiques déjà isolée purifiées et identifiées dans un travail antérieur ont été testé pour leur potentiel probiotique. L'étude de l'activité antimicrobienne vis-à-vis des germes pathogènes (Gram+ et Gram-) a été réalisée par contact direct entre les souches inhibitrices et les souches indicatrices (*listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Pseudomonas aëroginosa* et *klebsiella*). Tandis que la recherche des bactériocines été effectué par la méthode de diffusion par puits, testé sur les surnageant des souches étudiées.

Six souches entre elles ont été soumises à des tests d'évaluation de sécurité du potentiel probiotique : la tolérance aux barrières biologiques (acide bas et sels biliaries), l'hydrolyse du sang, et la résistance aux antibiotiques.

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont révélé que les neuf souches sélectionnées excrètent dans le milieu de culture des substances inhibitrices capable d'inhiber la croissance d'*E.coli*, *S.aureus*, *P.aëroginosa*, *L.monocytogenes* et *Klebsiella*, avec des zones d'inhibition varient entre 10 à 27 mm de diamètre.

Par contre la recherche des bactériocines par la méthode de diffusion en puits a donné un résultat négatif pour toutes les souches étudiées témoignant l'incapacité des souches à produire des bactériocines.

L'étude du profil probiotique a montré la capacité des souches à résister aux barrières biologiques du tube digestif (pH acide et sels biliaries et les souches n'étaient pas capables d'hydrolyser le sang humain.

Pour le test d'antibiogramme la sensibilité chez les souches est observée pour toute la gamme des antibiotiques testés, sauf pour l'acide fusidique dont la sensibilité est variable selon les souches.

Mots clés : Bactéries lactiques, probiotique, activité antimicrobienne, bactériocines

Abstract

Lactic acid bacteria have many technological properties, which give them a remarkable role in the food industry because they are used in the fermentation and biopreservation of food. Thanks to their ability to produce a variety of antimicrobial substances capable of eliminating pathogenic microorganisms.

In addition, currently, lactic acid bacteria are used in the form of probiotics acting as food additives, which have a positive effect on human health.

During our study, nine strains of lactic acid bacteria already isolated purified and identified in previous work were tested for their probiotic potential.

The study of antimicrobial activity against pathogenic germs (Gram + and Gram-) is carried out by direct contact between inhibitory strains and indicator strains (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella*). While the search for bacteriocins has been demonstrated by the well diffusion method, tested on the supernatants of the strains studied.

Six strains between them were subjected to safety assessment tests for probiotic potential: tolerance to biological barriers (low acid and bile salts), blood hydrolysis, and resistance to antibiotics.

The results of the antimicrobial activity revealed that the nine selected strains excreted in the culture medium inhibitory substances capable of inhibiting the growth of *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *L.monocytogenes* and *Klebsiella*, with zones of inhibition varying between 10 to 27 mm in diameter.

On the other hand, the search for bacteriocins by the diffusion method then gave a negative result for all the strains studied, testifying to the inability of the strains to produce bacteriocins.

The probiotic profile study showed the ability of the strains to resist biological barriers in the digestive tract (acidic pH and bile salts and the strains were not able to hydrolyze human blood.

For the antibiogram test, the sensitivity in the strains is observed for the entire range of antibiotics tested, except for fusidic acid, the sensitivity of which varies depending on the strain.

Key words : Lactic acid bacteria, probiotic, antibacterial activity, bacteriocin

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

DO : Densité optique.

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection.

GRAS : Generally Regarded As Safe (généralement considérées comme sûres)

MRS : De Man- Rogosa et Sharp.

MH : Mueller Hinton.

GN : Gélose nutritive

BL : Bactérie lactique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

FAO : Food and Agriculture Organization.

EPS : Exopolysaccharides

GC%: Pourcentage en Guanine et Cytosine.

E.coli: *Escherichia.coli*

S. auerus : *staphylococcus auerus*

pH : Potentiel d'Hydrogène.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

BSH : bile salt hydrolase (hydrolase des sels biliaires)

UFC : Unité Formant Colonie.

LB : Lactobacillus

LC : Leuconostocs

W : Weissella

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques	4
Figure 2 : Mécanismes d'action des bactériocines produites par les BL	14
Figure 3 : Mécanisme d'inhibition d'adhésion des pathogènes (a) compétition spécifique (b) compétition non spécifique	23
Figure 4 : Les principaux mécanismes d'action des probiotiques	24
Figure 5 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode spots sur agar.....	32
Figure 6 : Schéma du test de l'activité antimicrobienne (a) méthode directe (b) méthode indirecte.....	33
Figure 7 : Conservation des souches lactiques à long terme	36
Figure 8 : Conservation des souches pathogènes	36
Figure 9 : L'observation macroscopique des colonies de la souche LB1 (A) et LC1 (B) cultivée sur milieu solide MRS.....	38
Figure 10 : La croissance des souches lactiques sur milieu MRS liquide.....	39
Figure 11 : Observation au microscope optique de la forme des cellules et leur mode d'association (A) Souche LC1 (B) Souche LB1 (Grx40).....	39
Figure 12 : Résultat négatif du test catalase.....	41
Figure 13 : Résultat test catalase des témoins positifs	41
Figure 14 : Croissance d'E.coli sur bouillon nutritif (a) , témoin bouillon nutritif sans bacterie (b).....	42
Figure 15 : L'observation microscopique d'E. coli après coloration de Gram au microscope optique(Gx1250)	42
Figure 16 : Activité antimicrobienne des souches lactiques envers des souches pathogènes par la méthode directe. (A) klebsiella (B) Staphylococcus.....	44
Figure 17 : Resultat de l'effet antibacterien par methode directe des souches testées.	45
Figure 18 : L'activité antimicrobienne des souches lactiques après neutralisation du surnageant	46
Figure 19 : Résultat négatif d'hydrolyse des sels biliaire	49
Figure 20 : l'aspect des colonies des souches lactiques sur milieu gélose au sang avec 0.5 % de sang humain	49
Figure 21 : Résultat de la sensibilité aux antibiotiques	51

Liste des tableaux

Tableau 1 Bactériocines des classe III produites par des bactéries lactiques	14
Tableau 2 Les souches lactiques utilisées au cours de ce travail.	28
Tableau 3 Liste des antibiotiques utilisés.....	35
Tableau 4 Résultats de l'observation microscopique et du test catalase des souches lactiques.	40
Tableau 5 Résultats de l'acticité antimicrobienne diamètres des zones d'inhibition en (mm) .	43
Tableau 6 L'effet du pH (pH 2, pH3) sur la viabilité des souches de <i>L.mesenteroides</i> et <i>L.plantarum</i>	47
Tableau 7 Viabilité (log ufc/ml) et taux de survie des souches de <i>L.plantarum</i> et <i>L.mesenteroides</i> en présence de 0,3% et 1 %de sels biliaires.	48
Tableau 8 Résultats de test de sensibilité aux antibiotiques.	50

Table des matières	
Remerciements	
Dédicaces	
الملخص	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1	Les bactéries lactiques	3
I.1.1	Généralités :.....	3
I.1.2	Classification :.....	3
I.1.2.1	<i>Les lactobacillus</i> :.....	4
I.1.2.2	Les entérocoques :	5
I.1.2.3	Les leuconostocs :.....	6
I.1.2.4	Le genre Weissella :	6
I.1.2.5	Les lactocoques :	6
I.1.2.6	Les bifidobactéries :.....	7
I.1.2.7	Les streptocoques :	7
I.1.2.8	Genres Pediococcus et Tetragenococcus :.....	7
I.1.2.9	Genre Oenococcus :.....	8
I.1.3	Utilisation des bactéries lactiques :	8
I.1.3.1	Dans le secteur alimentaire :.....	8
I.1.3.1.1	Conservation et sécurité des aliments :.....	8
I.1.3.1.2	Amélioration de la texture :	9
I.1.3.1.3	Production d'arôme et de saveur :	9
I.1.3.2	Dans le domaine de la santé :	10
I.1.4	Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques :	11
I.1.4.1	Acides organiques (acide lactique et acide acétique) :	11
I.1.4.2	Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) :	11
I.1.4.3	Production de bactériocines :.....	12
I.1.4.3.1	Définition :.....	12
I.1.4.3.2	Classification :	12
I.1.4.4	Applications des bactériocines	15
I.1.4.4.1	Dans le secteur alimentaire :.....	15

I.1.4.4.2	Dans le secteur sanitaire :	15
I.2	Evaluation du potentiel probiotique :	15
I.2.1	Définition et historique :	15
I.2.2	Les principaux microorganismes probiotiques :	16
I.2.2.1	Les ferments lactiques :	16
I.2.2.2	Les bifidobactries :	17
I.2.2.3	Les levures du genre Saccharomyces :	17
I.2.2.4	Escherichia coli Nissle :	17
I.2.2.5	Les bactéries sporulées :	17
I.2.2.6	Autres bactéries lactiques :	18
I.2.3	Critères de sélection de souche probiotique :	18
I.2.3.1	Critères fonctionnels :	19
I.2.3.2	Critères technologiques :	20
I.2.3.3	Critères de sécurité :	20
I.2.4	Mécanisme d'action des probiotiques :	21
I.2.5	Rôle de probiotique :	24
I.2.6	Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine :	25
I.2.6.1	Amélioration de l'intolérance au lactose :	25
I.2.6.2	Réduction des diarrhées :	25
I.2.6.3	Infection à Helicobacter pylori :	25
I.2.6.4	Constipation :	25
I.2.6.5	Maladies inflammatoires de l'intestin :	26
I.2.6.6	Maladies allergiques :	26
I.2.6.7	Cancer :	26
II.	Matériel et méthodes :	28
II.1	Provenance des bactéries utilisées :	28
II.1.1	Les bactéries lactiques :	28
II.1.2	Les souches pathogènes :	28
II.2	Revivification des souches lactiques :	29
II.3	Vérification de la pureté des souches :	29
II.3.1	Étude macroscopique :	29
II.3.2	Étude microscopique :	29
II.3.3	Caractéristique biochimique :	30
II.4	Etude de l'activité antimicrobienne :	31
II.4.1	Méthode direct (spot agar test):	31
II.4.2	Méthode indirect (diffusion par puits) :	32
II.5	EVALUATION DU POUVOIR PROBIOTIQUE DES SOUCHES LACTIQUES :	33

II.5.1	Résistance à l'acidité :.....	33
II.5.2	Résistance aux sels biliaires :.....	33
II.5.3	Hydrolyse des sels biliaires :.....	34
II.5.4	Activité hémolytique :.....	34
II.5.5	III.5. La résistance aux antibiotiques.....	34
III.	Résultat et interprétation	38
III.1	Résultat et interprétation.....	38
III.1.1	Vérification de la pureté des souches :.....	38
III.1.1.1	Caractérisation macroscopique et microscopique.....	38
III.1.1.2	Résultat test catalase :	40
III.1.2	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches lactiques :.....	42
III.1.2.1	L'activité antimicrobienne directe (Spot Agar Test) :	42
III.1.2.2	L'activité antimicrobienne Indirect (Méthode par puits).....	45
III.1.3	Evaluation du potentiel probiotique :	46
III.1.3.1	Tolérance à l'acidité :.....	46
III.1.3.2	Tolérance aux sels biliaires :.....	47
III.1.3.3	Hydrolyses sels biliaires :	48
III.1.3.4	Activité hémolytique :.....	49
III.1.3.5	Antibiogramme :	49
III.2	Discussion.....	53

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction :

Les bactéries lactiques sont des microorganismes largement utilisées dans l'industrie alimentaire dans une variété de fermentations tels que le développement de produits à base de viande, de légumes et des produits laitiers, y compris de nombreux laits, fromage, yaourt ou le beurre (**Dortu et Thonart, 2009**). Il est aujourd'hui possible de sélectionner, identifier et cultiver des germes pour toute sorte d'usage : alimentaire (starters de fermentation), médicaux (probiotiques) ou biotechnologiques (bactériocine, exopolysaccharides). (**Djerdir, 2018**).

Les (BL) constituent un groupe bactérien dont la taxonomie est régulièrement remise à jour avec la progression des données moléculaires (**Federighi, 2005**). Elles regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Elles appartiennent à divers genres comme *Bifidobacterium*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostocs*....etc.

On les trouve essentiellement dans les produits laitiers (yaourt, fromage, leben...), mais aussi dans d'autres niches écologiques en étant seules ou en association avec d'autres microorganismes bénéfiques comme les levures (**Novel, 1993**). Elles sont utilisées de différentes manières, on cite les starters de fermentation (**Mugula et al., 2003**). Les agents de bioconservation (**Vermeiren et al., 2004**) et les probiotiques (**Fuller, 1989**). Les aliments fonctionnels dans lesquels sont incorporées des bactéries lactiques probiotiques connaissent depuis une dizaine d'années un très gros essor commercial (**Mugula et al., 2003**).

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starter dans le procédé de fermentation. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques (diacétyl, acétaldéhyde et acétate et ce à partir du citrate). La flore lactique fermente les glucides en acide lactique, d'où une diminution du pH favorable à la bio-conservation des aliments. (**Allouche et al., 2016**)

Les probiotiques sont définis comme étant des microorganismes vivants qui une fois ingérés en quantités adéquates exercent des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte. (OMS, 2001)

Ces effets positifs sont le soulagement des maladies d'origine digestive (comme l'intolérance au lactose), l'amélioration du transit intestinal, la prévention de certaines maladies comme l'augmentation du taux de cholestérol dans le sang, les diarrhées, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, ainsi que d'autres infections d'origine microbienne (infections à *Clostridium difficile* et à *Campylobacter*) (**Rastall et al., 2005**). Elles sont surtout employées dans de nombreux aliments fermentés dont le principal but est d'améliorer la qualité

technologique et organoleptique et l'inhibition de la flore d'altération et les germes pathogènes **(O'Sullivan *et al.*, 2002).**

Le criblage d'un grand nombre de bactéries pour identifier des souches probiotiques est de plus en plus effectué du fait de la demande accrue en nouvelles souches probiotiques pour le développement de nouveaux produits probiotiques par les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques **(Motyl *et al.*, 2009)** .

Dans le cadre de choisir des bactéries probiotiques qui ont un effet bénéfique sur l'homme, notre étude a été consacrée, à évaluer le potentiel probiotique de neuf souches de bactéries lactiques déjà isolées à partir de lait de chamelle, de vache et du beurre traditionnelle.

I.1 Les bactéries lactiques

I.1.1 Généralités :

Le terme «bactéries lactiques » (BL) décrit un groupe de microorganismes gram positif qui produisent de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme.

Ce groupe est assez hétérogène et ses genres présentent des variations dans les caractéristiques à l'exception de deux caractères principaux qui ne peuvent pas être contestés : le gram-positif et la non sporulation. En général, les bactéries lactiques sont des microorganismes asporulées, non mobiles, oxydase négative et anaérobies facultatives : micro aérophiles. Ces bactéries sont non pigmentées, catalase négative à l'exception de certains genres à pseudocatalase, tolérant des pH acides, généralement mésophiles mais largement représentées au sein du groupe des psychotrope (Ahmed-GAID, 2018).

En générale ces bactéries ne possèdent ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (Salminen et al., 2004, Ababsa, 2012)

Les BL sont des fermentatives, qui produisent de l'acide lactiques comme principal produit de la fermentation du sucre ces derniers sont appelés homofermentaires. Tandis que les BL hétérofermentaires produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, du diacétyle et du CO₂. (Mokdad, 2020)

I.1.2 Classification :

La classification des bactéries lactiques est basée sur des caractéristiques phénotypiques et biochimiques qui avec le temps sont devenus insuffisantes pour l'identification des espèces.

Cependant, avec l'apparition de nouvelles technologies de PCR et de séquençage de l'ADN du gène de l'ARNr 16s l'identification est devenus pratique, simple et précise (Holzapfel & Wood, 2014).

Plus récemment, l'identification s'est basée sur des outils protéomiques comme (MALDI-TOF) qui est une méthode simple, rapide et peu couteuse et qui donne des pourcentages élevés des identifications correctes (Benmechernene et al., 2014 ;Mokdad, 2020).

Actuellement les BL se trouvent dans deux embranchements distincts : Firmicutes et Actinobacteria. L'embranchement des Firmicutes renferme les genres les plus importants : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Weissella* qui appartiennent à l'ordre des Lactobacillales, caractérisé par une faible teneur en

GC (31 - 49%). L'embranchement des Actinobacteria renferme le genre *Bifidobacterium*, qui est caractérisé par une teneur élevée en GC (58-61 %). Elles sont groupées en six familles : *Aerococcaceae* (7 genres) ; *Carnobacteriaceae* (16 genres) ; *Enterococcaceae* (7 genres) ; *Lactobacillaceae* (3 genres) ; *Leuconostocaceae* (4 genres) ; *Streptococcaceae* (3 genres) (Klaenhammer et al., 2005; Horvath et al., 2009; Holzappel & Wood, 2014).

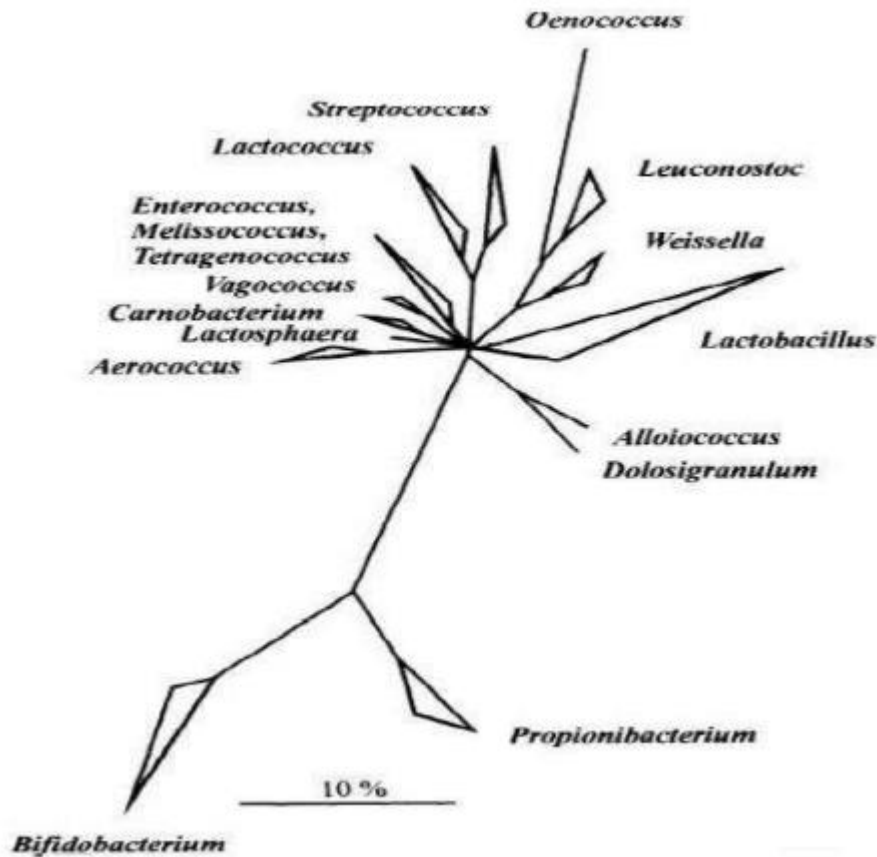


Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Holzapfel et al., 2011)

I.1.2.1 Les lactobacillus :

Ils appartiennent à l'embranchement des Firmicutes, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae* (Felis et Dellaglio, 2007 ; Behera et al., 2018). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. (Gaucher et al., 2019), découvert pour la première fois par Beijerinck en 1901, il comprend actuellement plus de 200 espèces reconnues (Diaz et al., 2020), qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême (Zhang et al., 2014).

Ils sont caractérisés par l'hétérogénéité de la composition de leur ADN : le GC% varie de 30 à 55% et leur capacité à inhiber la croissance de divers agents pathogènes, ils sont utilisés comme probiotique depuis des décennies (**Kumar et al., 2011**). Ils se présentent sous forme de bacilles longs et fins ou de coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux souvent allongés, Gram positif, isolés ou en chaînettes, non sporulés et immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche (**Singh et al., 2009 ; Bousmaha-Marroki et Marroki, 2015 ; Ahirwar et al., 2017**). Le milieu le plus adapté à leur culture est celui de Man Rogosa et Sharpe (MRS), il favorise la croissance des bactéries lactiques y compris le genre *Lactobacillus*. (**Hayek et al., 2019**)

Elles sont généralement de petites tailles, lisses ou rugueuses, brillantes, arrondies ou lenticulaires, non pigmentées et souvent opaques.

La plupart des *Lactobacillus* se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55°C (**Tailliez, 2004 ; Pot et al., 2014**). Ils se développent au mieux dans des conditions acides, quand le pH optimum de croissance est de 5.5 (**Gaucher et al., 2019**), mais leur croissance s'arrête lorsque le pH avoisine 3.5 (**Kumar et Kumar, 2014**).

I.1.2.2 Les entérocoques :

Les *Enterococcus* représentent le groupe des entérocoques, ils sont composés de streptocoques fécaux (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*) sont toutes les deux utilisées comme probiotiques (Devriese et al., 2006 ; Hanchi et al., 2018). Ce genre est constitué d'organismes Gram positif, anaérobies facultatives, comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires (Švec et Franz, 2014 ; Zhong et al., 2017). Il se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, au pH 9.6 et par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C. De plus, les *Enterococcus* sont très résistantes au séchage (**García-Solache et Rice, 2019**).

L'utilisation des entérocoques chez l'homme reste controversée car ces microorganismes sont associés à la contamination fécale, aux maladies nosocomiales, ils possèdent des gènes de résistances aux antibiotiques ainsi que des facteurs de virulence. C'est pour cette raison que la sélection correcte et l'innocuité totale de ces microorganismes est d'une grande importance. (**Švec et al., 2014**).

I.1.2.3 Les leuconostocs :

Les cellules de *Leuconostoc* sont des coques disposées en paires ou en chaîne, ces bactéries sont hétérofermentaires obligatoires produisant de l'acide D (-) lactique, de l'éthanol et du CO₂ après la fermentation de glucose, ses espèces sont exigeantes du point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente (**Björkroth et Holzapfel, 2006 ; Yehia et al., 2017**).

Leur température optimum de croissance est comprise entre 20°C et 30°C, mais certaines sont capables de croître à 5°C. Presque aucune croissance ne se produit au-dessus de 40°C. Elles ne sont pas des bactéries acidophiles, le pH optimum de croissance est compris entre 6 et 7, certaines peuvent croître à pH 4.5 (**Johanna Björkroth et al., 2014 ; Holzapfel, Björkroth, et al. 2015 ; ; Cholakov et al., 2019**). Les espèces de *Leuconostoc* participent dans la fermentation, l'amélioration d'aliment par la production de composés aromatiques et l'amélioration de la texture par la production de dextrane (**Zarour et al., 2018**).

I.1.2.4 Le genre Weissella :

Les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à bout ronds qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont hétérofermentaires et sont généralement immobiles (**Jang et al., 2002 ; Fusco et al., 2015**). Les espèces du genre *Weissella* sont connues pour produire divers exopolysaccharides (EPS).

I.1.2.5 Les lactocoques :

Les cellules de *Lactococcus* sont sphériques ou ovoïdes, isolées, en paires ou en chaînes de longueur variable (**Teuber, 2015**). Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+) à partir du glucose (**Kim, 2014**), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyl (Teuber et Geis, 2006). Elles sont toutes mésophiles, la température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C, certaines peuvent croître à une température inférieure à 7°C après une incubation de 10 à 14 jours. Elles se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4.5 (**Mofredj et al., 2007 ; Kim, 2014 ; Yu et al., 2017**). Les plantes sont l'habitat typique de ce genre, ils sont présents ainsi chez les animaux et leurs produits (**Odamaki et al., 2011**).

I.1.2.6 Les bifidobacteries :

Le genre *Bifidobacterium* est un groupe probiotique essentiel dans les produits laitiers (Issa et Tahergorabi, 2019). Il produit de l'acide lactique et de l'acétate ce qui entraîne une baisse du pH qui est défavorable et inhiberait la croissance d'autres germes (**Delcenserie et al., 2002**).

Ces bactéries ont la particularité de coloniser l'intestin. Leurs présences durables donne une bonne santé intestinale et le renforcement du système immunitaire (**Bottacini et al., 2010 ; Alegría et al., 2012**). Ce sont des bâtonnets à Gram positif, anaérobies strictes, immobiles, non sporulantes, ils sont hétérofermentaires, avec un pourcentage de bases GC compris entre 46 et 67% et les compositions en peptidoglycanes sont très variables. Leur forme est très irrégulière, en forme de V, X ou Y dont la forme Y est la plus caractéristique, ressemblant à des branches mais pouvant être coccoïdes (**Jian et al., 2001 ; Turroni et al., 2011**). Ils ont généralement un pH optimal de croissance autour de 6.5 à 7 et une température de croissance comprise entre 37°C et 41°C (**Axelsson, 2004 ; Biavati et Mattarelli, 2015**).

I.1.2.7 Les streptocoques :

Ce genre est globalement divisé en trois groupes : pyogène (la plupart des espèces pathogènes éthémolytiques), oral (tel que *S. salivarius*, *S. bovis*) et les autres streptocoques (**Richards et al., 2014 ; Toit et al., 2014**). Ces bactéries sont des cocci sphériques ou ovoïdes regroupées en paires ou en chainettes, Gram positif, catalase négative, en général immobiles et homofermentaires (**Toit et al., 2014 ; Patel et Gupta, 2018 ; Park et al., 2019**). Leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables à se développer à 15°C et à pH 9.6 (**Badis et al., 2005**). Ce sont des commensales ou pathogènes chez l'homme et les animaux, la seule espèce de streptocoques utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* (**Chandan et al., 2017**).

I.1.2.8 Genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* :

Le genre *Pediococcus* peut soit améliorer, soit diminuer la qualité de nombreux aliments et boissons. Il rassemble des coques uniformément sphériques ou ovoïdes mais jamais allongés dont la particularité qui les différencie des autres genres est le regroupement en paires ou en tétrades mais jamais les chaînes (**Holzappel, Franz, et al., 2015**).

Ils sont Gram positif, non mobiles, catalase négative, oxydase négative, ne forment pas de spores et se développent dans des conditions facultativement aérobies à microaérophiles (**Gil-Sánchez et al., 2019**). Ce genre est mésophile, leur métabolisme est homofermentaire, ne produisant pas de CO₂ à partir du glucose, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose et incapable de réduire les nitrates, leur développement nécessite la présence de divers facteurs de

croissance. Poussant à un pH voisin de 5 mais non à pH 9 sauf *Pc. stilesii*. Leur température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C (Holzapfel, Franz, *et al.*, 2006 ; Gil-Sánchez *et al.*, 2019). Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pédiocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Tosukhowong *et al.*, 2005).

I.1.2.9 Genre *Oenococcus* :

Le genre *Oenococcus* est composé de deux espèces, *Oenococcus oeni* et *Oenococcus kitaharae* (Badotti *et al.*, 2014). Ce sont des bactéries immobiles, asporulées de forme ellipsoïdale à sphérique avec un arrangement en paires ou en chaînes. Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance (Endo et Dicks, 2011). Leur température optimale est de 20°C à 30°C, acidophiles, poussant à un pH initial de 4.8 ou non acidophile (croissance à pH 5-7.5, pH 6-6,8 comme optimum), selon l'espèce (Dicks et Holzapfel, 2015).

Ce genre de bactérie est spécialement retrouvé dans les vins ou dans les préparations similaires, à fermentation malolactique (*Oenococcus oeni*). Avec un métabolisme hétérofermentaire, chimio-organotrophe, anaérobie facultatif, ces bactéries ne sont ni protéolytiques, ni homolytiques (Dicks *et al.*, 1995 ; Björkroth et Holzapfel, 2006, Mermouri, 2018).

I.1.3 Utilisation des bactéries lactiques :

I.1.3.1 Dans le secteur alimentaire :

I.1.3.1.1 Conservation et sécurité des aliments :

Les additifs alimentaires chimiques tels que les nitrites, les sulfites, l'acide propionique, l'acide ascorbique, et l'acide benzoïques sont couramment utilisés en technologie de conservation des aliments. Cependant l'utilisation des bactéries lactique peut aussi contribuer à la préservation des aliments en produisant divers agents antimicrobiens naturels tel que les acides organiques (acide lactique ,acides acétiques..) du dioxyde de carbone , du peroxyde d'hydrogène ,de l'éthanol, bactériocines, reutrine et reutricycline qui peuvent contribuer à l'arôme tout en préservant l'aliment contre la détérioration (Reis *et al.*, 2012 ; Favaro *et al.*, 2015 ; Mir et Masoodi, 2018).

La production in situ des bactériocines peut croître la compétitivité de la souche dans la matrice alimentaire et contribue à la préservation des aliments (Ries *et al.*, 2012 ; Tumberaski *et al.*, 2018)

Par exemple, une bactérie lactique produisant des bactériocines peuvent être utilisée comme alternative au nitrate de potassium pour prévenir la perte tardive de fromage due à la contamination par les clostridium (**Thomas et Delves –Broughton, 2005**).

I.1.3.1.2 Amélioration de la texture :

En industrie laitière et plus précisément lors de la production de yaourt, on ajoute fréquemment du lait écrémé en poudre ou lactosérum pour avoir la texture et la sensation en bouche souhaitées, bien que le consommateur ne considère pas cela comme contre nature, cela représente un coût supplémentaire pour le producteur.

Dans certains pays la gélatine, l'amidon, la pectine, la gomme de guar et l'alginate ou d'autres polysaccharides d'origine microbienne telle que xanthane et le gellane sont ajoutés vu qu'ils augmentent la viscosité et la fermeté, améliorent la texture, réduisent la sensibilité à la synérèse et contribuent à la sensation en bouche des produits faibles en gras. Certains polysaccharides, par exemple les glucides végétaux, le xanthane et le gellane présentent l'avantage supplémentaire d'être adaptés à la modification chimique pour améliorer leurs propriétés rhéologiques (**Patel, Ami et Prajapar ,2013**). Cependant, les molécules modifiées sont perçues par le consommateur comme non naturel et que la réglementation alimentaire de plusieurs pays européens interdit l'utilisation d'additifs, comme dans le cas du yaourt.

De ce fait, l'utilisation des bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides comme culture starter permettrait donc de répondre aux attentes des consommateurs pour des produits bio sans additifs alimentaires et d'éviter à l'industrielle des étapes de purification d'EPS issus d'organismes qui n'ont pas l'appellation GRAS (généralement reconnu étant comme sans danger) (**Benhouna, 2019**)

I.1.3.1.3 Production d'arôme et de saveur :

Les bactéries lactiques contribuent à l'arôme et à la saveur des produits fermentés. Ils acidifient les aliments, entraînant un goût acidulé d'acide lactique, en plus d'avoir des activités protéolytiques et lipolytiques et produisant des composés aromatiques à partir d'acides aminés qui contribuent à l'arôme de produit final (**Favaro et al., 2015**).

Le contrôle des activités des peptidases de BL est une clé de la technologie d'affinage du fromage (**Law, 2001**) par exemple, la surexpression de certaines peptidases de *L.lactis subsp .cremoris* améliore la qualité sensorielle de fromage (**Guldfeldt et al., 2001**)

Les cultures starters et les cultures non starter (NSLAB) jouent un rôle important dans la formation des arômes car ils ont une grande capacité de biosynthèse et produisent des composés

aromatiques intéressantes (**Randazzo et al., 2008 ; Settanni et Moschetti , 2010**). Par exemple les fromages au lait de brebis italien comme le picorino sicillion (PS). Se caractérisent par une flore de bactéries lactiques non starter (NSLAB) très hétérogène, influencées par des facteurs géographiques et pouvant être responsable de la diversité des fromages (**De Angelis et al., 2001; Randazzo et al,2008**) par ce que ces souches constituent une base important pour l'innovation des produits , des recherches sont en cours pour étudier leur applications dans l'industrie de fermentation alimentaire . l'ajoute de (NSLAB) entant que culture auxiliaire pour la fabrication du fromage augmente le niveau d'acides aminés libre et des acides gras libres .ce qui entraine une intensité de la saveur et une accélération du processus d'affinage du fromage (**Crow et al., 2001 ; Settani et Moschetti, 2010**).

Les LB homofermentaires convertissent presque complètement la source d'énergie disponible (sucre) en acide lactique via le pyruvate peut entrante la génération de plusieurs métabolites tel que l'acétate, l'éthanol, le diacétyle et l'acétaldéhyde. De cette manière les LB produisent des substances volatiles qui contribuent au gout typique de certains produits fermentés tel que le kéfir et le koumiss (l'éthanol). Le beurre et le babeurre (diacétyle) et le yarout (l'acétaldéhyde.). La production de CO₂ par les LB hétérofermentaires suite à, la fermentation du lactose et l'utilisation du citrate est un caractère très utilisé en industrie fromagère .dans le cas de fromage de Roquefort le CO₂ produit est à l'origine de la formation de cavité dans le caillé, qui seront ensuit peuplées par *Penicillium roqueforti* (**Bourel et al., 2001**) le CO₂ donne aussi l'aspect légèrement effervescent et onctueux du beurre.

I.1.3.2 Dans le domaine de la santé :

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus* sp pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant la flore intestinale. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques (**Boumediene, 2013**)

Dans des études récentes, les bactéries lactiques ont démontré leur potentiel à promouvoir la santé cutanée et à exercer une réponse immunitaire cellulaire nécessaire à la défense cutanée (**Yan yan et al., 2014**). Ensuite les utiliser dans un procédé semi industriel pour obtenir d'autres produits fermentés avec une meilleure qualité hygiénique et à caractère thérapeutique très poussé, surtout que ces dernières années ; des recherches se sont accentuées pour trouver des voies de thérapies à base des probiotiques pour le traitement de diverses maladies chroniques (**Lairini et al., 2014**).

I.1.4 Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines, qui sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments (**Labioui et al., 2005 ; Benyoucef, 2018**).

I.1.4.1 Acides organiques (acide lactique et acide acétique) :

Les BL produisent des acides organiques pendant la croissance ; L'acide lactique et l'acide acétique sont deux des acides qui jouent un rôle important dans l'inhibition de la croissance des microorganismes (**Cabo et al., 2002**). Les BL ont la capacité de produire de l'acide organique à partir d'hydrates de carbone grâce au processus appelé fermentation. Le système de fermentation de BL est divisé en trois groupes basés sur la fermentation des hydrates de carbone dans des conditions illimitées ; homofermentaires, hétérofermentaires et hétérofermentaires facultatives (**Hutkins, 2006**).

Les BL transforment le sucre en acide lactique à travers le processus de fermentation dans des conditions anaérobies. L'acide lactique est un composé naturel, à faible pH, efficace et conservateur.

La fermentation du sucre, suivie d'une réduction du pH de 4,5 ou moins (**Holzappel, 1997**) en raison de la production d'acides lactiques et autres acides organiques, est un facteur important pour l'inhibition de la croissance de micro-organismes indésirables. Le faible pH rend les acides organiques liposolubles, leur permettant de percer la membrane cellulaire et d'atteindre le cytoplasme des pathogènes en libérant des lipopolysaccharides (Haller et al., 2001). Comme les acides lactiques et acétiques sont tous deux lipophiles, ils peuvent diffuser rapidement dans la cellule et se dissocier au pH quasi neutre du cytoplasme en libérant des protons et des anions jusqu'à ce qu'un équilibre entre les concentrations externes et internes soit atteint. De cette manière, la croissance cellulaire peut être inhibée si l'accumulation de protons à l'intérieur du cytoplasme dépasse la capacité tampon de la cellule ou sa capacité à pomper des protons par des porteurs de H^+ -ATPase (**Corsetti et al., 2015 ; Benyoucef, 2018**).

I.1.4.2 Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :

Les BL ont la capacité de produire du peroxyde d'hydrogène en présence d'oxygène lors de l'action de certaines enzymes comme le nicotinamide adénine hydroxyle di nucléotideoxydase (NAHD), la flavonoprotéine oxydase et le glycérophosphate oxydase (**Ross et al., 2002**). BL ne produira pas de catalase pour l'élimination du peroxyde d'hydrogène. (**Benyoucef, 2018**)

I.1.4.3 Production de bactériocines :

La dissémination rapide de bactéries multi-résistantes continue de se développer mondialement, ce qui menace la longévité des antibiotiques dans le secteur médical et agroalimentaire. Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains micro-organismes grâce à la synthèse de molécules antibactériennes parmi lesquelles se trouvent les bactériocines. Les bactériocines, toxines peptidiques produites par les bactéries, offrent un potentiel prometteur comme substituts ou conjugués aux composés bioconservateurs et thérapeutiques actuels. Ces peptides non toxiques présentent une puissance significative contre certaines bactéries (y compris les espèces multi-résistantes), tandis que les souches productrices restent insensibles aux peptides bactéricides (Meade et al., 2020). Ces bactériocines sont des divers groupes de peptides antimicrobiens et sont une caractéristique importante dans la sélection de souches probiotiques (Malik et al., 2012).

I.1.4.3.1 Définition :

Les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomique d'origine chromosomique ou plasmidique, généralement par des bactéries à Gram positif appartenant au groupe des bactéries lactiques. Les bactériocines sont des peptides avec des poids moléculaires faibles avec une activité antimicrobienne ciblant les bactéries phylogénétiquement proches de la bactérie productrice (spectre étroit) ou ciblant des bactéries d'autres genres (large spectre) inhibant une grande variété de bactéries, et ayant un mode d'action bactéricide, ou bactériostatique. Ces petites molécules cationiques (30 à 60 acides aminés), en raison de leurs hélices amphiphiles, diffèrent par leur spectre d'activité, leur mode d'action, leur poids moléculaire et leurs propriétés biochimiques.

La souche productrice produit une protéine d'immunité pour se protéger des effets délétères de la bactériocine qu'elle produit (Meade et al., 2020).

I.1.4.3.2 Classification :

La classification des bactériocines est principalement basée sur différents critères premièrement le spectre d'action. De plus, sur leurs structures, leur poids moléculaire et les mécanismes d'action des bactériocines.

Cette classification se décompose actuellement en quatre classes distinctes. (Mokdad, 2020)

➤ Classe 1 : Les lantibiotique :

Sont des peptides de petite taille hydrophobes, thermostables et cationiques composés d'acides aminés cationiques inhabituels, qui sont formés post-traductionnellement (Elayaraja et al.,

2004). Un de ces acides aminés est lanthionine d'où le nom lantibiotique des bactériocines appartenant à la classe I. Leur poids moléculaire est inférieur à 10 kDa.

Cette classe comprend les protéines susceptibles de subir certaines modifications par leur biosynthèse, en raison de la présence d'une séquence de peptides signaux cela permettra la reconnaissance, le transport et le maintien du peptide inactif (**Gonzalez et al., 2018**).

Mécanisme d'action des lantibiotiques

Les lantibiotiques se lient à la membrane cellulaire par des liaisons ou récepteurs tel que le lipide 1, précurseur de peptidoglycane, ou par des réactions électrostatiques.

Les lantibiotiques augmentent la perméabilité membranaire, en formant des pores larges et non spécifiques au niveau de la membrane cytoplasmique, ce qui résulte l'efflux des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, l'acide aminé, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort cellulaire. (**Mokdad, 2020**)

➤ **Classe II**

Cette classe regroupe les petites bactériocines (< 10 KDa) thermostables et ne subissant pas de modification post-traductionnelle ; cependant elles sont généralement synthétisées sous forme d'un pré-peptide qui sera mûré lors de son excrétion dans le milieu extracellulaire. (**Meade et al., 2020**).

Mécanisme d'action des bactériocines de classe II :

Le mécanisme d'action de cette classe de bactériocines est divisé en 3 étapes. La première étape repose sur la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. Pendant cette étape le peptide atteint sa conformation tridimensionnelle lui permettant d'exprimer son activité. La deuxième étape est l'insertion du bactériocine dans la membrane cytoplasmique assurée par des peptides antibactériens pour former un pore. La dernière étape est la formation du pore qui conduit à la fuite des composés intracellulaires provoquant un ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne allant jusqu'à la mort cellulaire (**Jasniewski, 2008**).

➤ **Classe III**

Les bactériocines de classe III sont caractérisées par leur grande taille, Elle contient les protéines de taille supérieure à 30kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques (**Abid, 2020**). Leur mécanisme d'action est distinct de celui des bactériocines car ils fonctionnent par la lyse des cellules sensibles en catalysant l'hydrolyse de la paroi cellulaire. (**Mokdad, 2020**)

Tableau 1 : Bactériocines des classe III produites par des bactéries lactiques (Luquet et Corrieu, 2005)

Bactériocines	Producteurs
Hélvéticine J	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481
Milléricine B	<i>Streptococcus milleri</i> NMSCC 061
Zoocine A	<i>Streptococcus zooepidermicus</i> 4881

Mécanisme d’action des bactériocines de classe III :

Cette classe de bactériocine diffère totalement des autres classes par son mode d’action. L’entérolysine A, la zoocine A et la milléricine B agissent par l’hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycane des cellules sensibles. La zoocine A a un spectre d’action étroit alors que l’entérolysine A et la milléricine B ont un spectre d’action large. L’hélvéticine J a un mode d’action bactéricide (Dortu & Thonart, 2009 ; Nilsen et al., 2003).

➤ **Classe IV**

Ce sont des protéines complexe requérant une partie carbohydratee ou lipidique pour avoir une activité. Ces bactériocines sont aussi reclassées comme des bactériolysines qui sont des polypeptides hydrolytiques. Cependant, cette classe est très peu représentée voire éliminée (Drider et al., 2006).

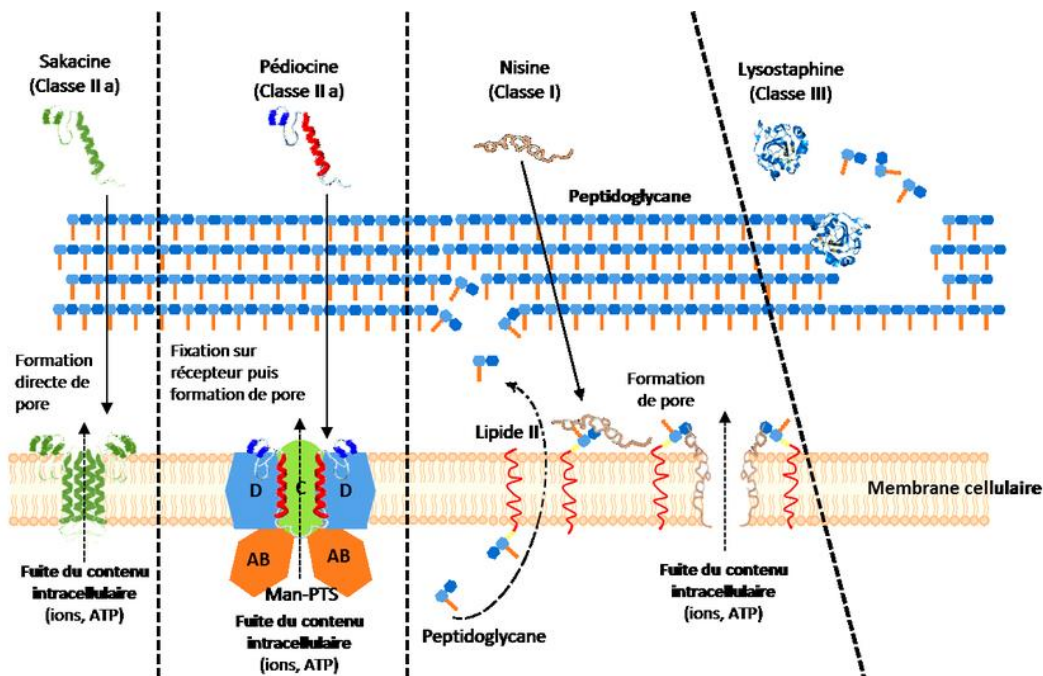


Figure 2 Mécanismes d’action des bactériocines produites par les BL (Fernandez, 2014)

I.1.4.4 Applications des bactériocines

I.1.4.4.1 Dans le secteur alimentaire :

Les bactériocines peuvent être utilisées comme additifs alimentaires, actuellement, Lanisine est un agent de conservation, dans lequel il est utilisé dans une variété de produits, y compris le fromage, les aliments en conserve et la viande salée (**Duhan et al., 2013**). La production de bactériocines améliore la capacité du LAB à contrôler la croissance des bactéries pathogènes et des bactéries alimentaires dans les produits alimentaires et les rend particulièrement intéressantes pour l'industrie alimentaire, offrant des alternatives naturelles aux additifs chimiques pour améliorer la sécurité et la qualité des produits alimentaires (**Kondrotiene et al., 2018**). Il a été trouvé que la poudre LAB lyophilisée contenant de la bactériocine inhibe la *Listeria* chez les hotdogs (**Wan, 2017**).

I.1.4.4.2 Dans le secteur sanitaire :

L'usage des bactériocines n'est pas restreint au domaine alimentaire. Celles-ci servent aussi comme agents de thérapie naturelle alternatifs aux antibiotiques (**Smaoui, 2010**). Suite à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance manifesté par plusieurs bactéries pathogènes (parmi lesquelles certaines sont résistantes à plusieurs antibiotiques à la fois) qui menace la santé publique, les études sont actuellement orientées vers la recherche de nouvelles substances antibiotiques naturelles pouvant résoudre ce problème (**Mkrtchyan et al., 2010**). Les bactériocines de la classe II a présentent un groupe important de peptides antimicrobiens qui peuvent être utilisés en médecine avec les antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses ou comme des agents antiviraux. Ces molécules ont une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif nuisibles et pathogènes comme *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (**Dridier et al., 2006**).

I.2 Evaluation du potentiel probiotique :

I.2.1 Définition et historique :

L'histoire de probiotique remonte à des centaines d'années avec la consommation des aliments fermentée, leur bienfaits sur la santé ont été connu depuis longtemps, Hippocrate et d'autre scientifiques ont rapporté que le lait fermenté pourrait guérir certains troubles du système digestif. (**Ranadheera et al., 2010 ; Gharib, 2020**).

En 1907 le chercheur russe Metchnikoff a proposé pour la première fois le concept des probiotique (**Ranadheera et al., 2010**). Il a émis l'hypothèse que la longévité de paysans Bulgares était liée à la consommation de grandes quantités de produits laitiers fermentés par

des bactéries lactiques qui remplacent les microorganismes pathogènes intestinaux, réduisant ainsi la production des toxines qui conduit à la maladie. (Singh et al., 2011 ; Gharib, 2020).

Le mot «probiotique» est dérivé de grec qui signifie « pour la vie » à l'opposé des « antibiotiques », au fil des années il a eu plusieurs significations. Kollath en 1953 et la Vierge en 1954 ont été probablement les premiers à introduire le terme « probiotique ». (Otlés, 2013 ; Belhamra, 2017). Il a été utilisé par Lilley et Stilwell en 1965 pour décrire les substances secrétées par un microorganisme stimulant la croissance de l'autre à l'opposé des antibiotiques, Sperty (1971) a utilisé le mot probiotique pour décrire des extraits de tissus qui ont stimulé la croissance microbienne. En 1989, Fuller a redéfini les probiotiques comme des « suppléments alimentaires contenant des bactéries vivantes qui peuvent être bénéfiques pour l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale », cette définition a souligné la nécessité d'un probiotique d'être viable. Havenaar et Hisin't Veld (1992) ont décrit un probiotique comme « une mono ou culture mixte de microorganisme vivants bénéfiques pour l'homme et l'animal en améliorant les propriétés de la microflore indigènes (Rusch, 2002).

Ces microorganismes sont généralement des bactéries qui influent la santé humaine et animale et protègent de certaines infections intestinales, participent au premier lieu à la digestion et influencent le système immunitaire (Zheng et al., 2017 ; Malikova et al., 2020)

I.2.2 Les principaux microorganismes probiotiques :

Les microorganismes probiotiques principalement utilisés appartiennent aux genres : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*. (Rayavarapu et Tallapragada, 2019) Bien que d'autres espèces des genres : *E. coli*, *Bacillus*, et également de levure, *Sacharomyces* ont fait l'objet d'application sur le marché de probiotique. (Socol et al., 2014 ; Prado et al., 2015) Ainsi des *Pediccoccus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* et *Streptococcus*. (Shah, 2007 ; Ranadheera et al., 2010)

I.2.2.1 Les ferments lactiques :

Ce sont des microorganismes capables de produire de l'acide lactique par la fermentation de certains sucres comme le lactose ; ils sont regroupés en deux catégories :

- a. **les lactobacilles** : *Lactobacilles bulgaris*, *Lactobacillus acidiphilus*, *Lactobacillus caséi*.
- b. **Les lactocoques** : *Entéroccoccus*, *streptococcus*. (Mermouri, 2018)

I.2.2.2 Les bifidobactéries :

Les bifidobactéries possèdent une bonne résistance aux sucs gastriques (Mermouri, 2018). Les bifidobactéries sont des bâtonnés en formes variées dont la forme Y est la plus caractéristique. Elles sont gram positives, non sporulées, strictement anaérobies, hétérofermentaires produisent l'acide lactique ou acétique. Bien que les bactéries du genre de bifidobactérium partagent des caractéristiques phénotypiques avec des bactéries lactiques, il est regroupé dans la subdivision des bactéries ayant un pourcentage (G+C) supérieur ce qui lui inclut dans le phylum des Actinobactéries (Lee et Salminen, 2009, Belhamra, 2017).

I.2.2.3 Les levures du genre *Saccharomyces* :

Utilisée dans l'industrie agroalimentaire (Mermouri, 2018) *Saccharomyces boulardii* a été utilisée au cours des 30 dernières années pour la prophylaxie et le traitement des maladies diarrhéiques causées par des bactéries et d'autres troubles gastro-intestinaux provoqués par l'administration d'un agent antimicrobien. (Kelesidis et Pothoulakis, 2012)

I.2.2.4 *Escherichia coli* Nissle :

Escherichia coli Nissle 1917 est une bactérie Gram négative non pathogène appartenant à la famille entérobactéries (Schultz, 2008 ; Belhamara, 2017). C'est une souche probiotique bien connue avec multiples effets bénéfiques sur l'hémostase intestinale. Contrairement à d'autres souches d'*E. coli* elle ne produit pas de facteurs de virulence. Donc elle est incapable d'induire des dommages à la surface de l'épithélium intestinal (Grozdanov, 2004), elle peut stimuler la production de bêta-défensine 2 humaine, une molécule qui se révèle être circulaire dans la protection de la barrière muqueuse contre l'adhérence et l'invasion par des bactéries pathogènes. (Schlee et al., 2007 ; Belhamara, 2017) Elle peut sécréter des facteurs (microcines, adhésines, protéase) qui améliorent la production de l'adénosine triphosphate (ATP). Améliorent ainsi la disponibilité de l'énergie. Ainsi qu'elle peut moduler la réponse inflammatoire de la muqueuse par une action directe sur les lymphocytes T activés. (Schlee et al., 2007)

I.2.2.5 Les bactéries sporulées :

Représentées essentiellement par *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* (Mermouri, 2018). Les spores de *B. clausii* sont utilisées comme suppléments médicaux commercialisés sous le nom Enterogermina®, il est indiqué pour aider à prévenir la gastro-entérite chez les nourrissons et les enfants. (Cutting, 2011 ; Belhamra, 2017)

I.2.2.6 Autres bactéries lactiques :

- ***Pediococcus* :**

Les *Pediococcus* sont des bactéries Gram positif, catalase négative et oxydase négative, anaérobie facultative ou micro aérophile, produisent de l'acide lactique en tant que produit final majeur de la fermentation du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof, elles sont homofermentatives, ne produisent pas de CO₂ à partir du glucose, et nitrate négatives. Elles se distinguent des autres bactéries lactiques par forme sphérique des cellules et qui se divisent en deux directions perpendiculaires formant des tétrades. Elles sont immobiles et ne forment pas de spores ou de capsule. (Belhamra, 2017)

- ***Entéroccocus* :**

Les entérocoques sont des cocci ovoïdes Gram positif isolées, en paires et en chaînes courtes, non sporulées, non mobiles à l'exception d'*Entrococcus gallinarum* et *Enterococcus casseliflavus*, homofermentaires produisant de l'acide lactique avec dominance comme produit finale de fermentation des carbohydrates (Svec et Franz, 2004)

Les entérocoques probiotiques sont utilisés comme des compléments alimentaires sous forme de préparations pharmaceutiques. Les deux espèces les plus connus, étudiés et commercialisées sont particulièrement *E.faecium* et *E.faecalis*. Elles sont utilisées pour le traitement des diarrhées aiguës, les diarrhées associées à l'antibiothérapie, traitement du côlon irritable et pour réduire le taux du cholestérol sérique. (Franz et al., 2011)

L'utilisation des entérocoques chez l'homme reste controversée (Izquierdo, 2009; Belhamara, 2017). Car ces microorganismes sont associés à la contamination fécale, aux maladies nosocomiales, ils possèdent des gènes de résistances aux antibiotiques ainsi que des facteurs de virulence (Holzapfel et Wood, 2012)

I.2.3 Critères de sélection de souche probiotique :

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Le choix des probiotiques dépend de ces propriétés et du type d'utilisation. Pour qu'un produit soit reconnu comme étant probiotique, une évaluation du produit basée sur plusieurs critères doit être effectuée suivant les recommandations de la FAO/OMS. (Li et al., 2019)

I.2.3.1 Critères fonctionnels :

❖ La survie au cours du transit digestif :

Afin d'attendre le site d'action et exercent leurs effets bénéfiques, les probiotiques doivent d'abord surmonter un certain nombre de barrières physiques et chimiques dans le tractus gastro-intestinal. **(Huckle et Zhang, 2011)**

La capacité de survie des probiotiques est variable d'une souche à l'autre. Certains sont détruits dès leur passage dans l'estomac par contre, d'autre peuvent résister et survivent tout au long du transit. Au niveau de l'estomac, plus de deux litres de suc gastrique avec un pH aussi bas que 1.5 est secrété chaque jour, tout microorganisme probiotique doit avoir une tolérance élevée à l'acidité pour qu'il puisse survivre les microorganismes qui survivent dans des conditions acides de l'estomac doivent faire face à l'action détergente des sels biliaries libérés dans le duodénum. Des modelés *in vitro* stimulants les conditions gastro-intestinales sont utilisées pour la sélection des souches probiotiques.

❖ Activité hydrolase des sels biliaries :

Les BSH sont généralement des enzymes intracellulaires, insensibles à l'oxygène qui catalysent l'hydrolyse des sels biliaries. Un certain nombre de BSH (hydrolase des sels biliaries) ont été identifiés et caractériser chez des bactéries probiotiques, la capacité des souches probiotiques à produire des BSH a été souvent considéré comme critère de sélection des souches probiotiques **(Lahmer et al., 2020)**.

❖ Adhésion au mucus et/ou cellules épithéliales humaines :

La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale est l'un des principaux critères de la sélection des souches probiotiques ; elle est considérée comme une condition préalable à la colonisation **(Ouwehand et al., 1999)**. Plus la bactérie passe dans les tractus gastro-intestinales plus elle aura la chance d'exercer un effet bénéfique pour la hôte. **(Izquierdo, 2009)**

L'adhésion des souches au mucus ou à l'épithélium est habituellement étudiée *in vitro* en utilisant des mucus humain ou animal et des cultures cellulaires comme le Caco2 ou HT29. **(Servin et Coconnier, 2003)**.

❖ Activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne est l'une des critères de la sélection des souches probiotiques. Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricides ou bactériostatiques comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. **(Belhamra, 2017)**.

I.2.3.2 Critères technologiques :

❖ Identification des souches :

Les souches probiotiques doivent être identifiées par des méthodes moléculaires fiables de la détermination du phénotype et du génotype. (**Jayashree et al., 2014**)

❖ Innocuité :

Un microorganisme probiotique doit présenter une innocuité totale pour le consommateur et ne présenter aucune propriété indésirable possible comme la résistance aux antibiotiques, cytotoxicité, activité hémolytique (**Dalli et al., 2017**), ainsi l'absence de transfert des gènes entre les probiotiques et les bactéries de macrobiote.....etc. (**Burgain, 2011**).

❖ Origine :

Les souches probiotiques d'origine humaine sont compatibles avec le tractus intestinal humain. Elles peuvent être d'une origine autre qu'humaine (animal, alimentaire, ou végétale). Tant qu'elles ne sont pas reconnues comme étant dangereuses (**Kosin et Rakshit, 2006**).

I.2.3.3 Critères de sécurité :

- ✓ Les bactéries susceptibles d'être produites et utilisées comme ferments lactiques ne doivent évidemment pas présenter de caractère pathogène et ne pas générer des substances toxiques comme amines biogènes. C'est le cas de la plupart des espèces de bactéries lactiques, qui ne possèdent le statut GRAS à l'exception de certains Entérocoques. (**Dib, 2015**).
- ✓ Viabilité et stabilité des microorganismes. (**Harzallah et Belhadje, 2013**).
- ✓ Conservation des propriétés probiotiques dans le produit fini et les souches probiotiques doivent rester stables lors de la conservation de produit et doivent être fournies en dosage appropriés jusqu'à la date d'expiration (**Ahmadova, 2013**)
- ✓ Attribution des propriétés organoleptiques qui attirent le consommateur. Les produits à base de probiotiques doivent posséder de bonnes propriétés organoleptiques, surtout le goût. (**Bahri et al., 2014**).
- ✓ Résistance aux phages. (**Mattila-Sandholm et al., 2002**).

I.2.4 Mécanisme d'action des probiotiques :

➤ Renforcement de la barrière épithéliale :

La barrière intestinale présente un mécanisme de défense majeur impliqué dans le maintien de l'intégrité épithéliale et dans la protection de l'organisme contre les agressions de l'environnement. Les défenses de la barrière intestinale sont constituées par la couche muqueuse, les peptides antimicrobiens IgA sécrétoire et le complexe d'adhérence de jonction épithéliale. **(Bermud-Brito et al., 2012)**

Il a été rapporté que l'incubation des cellules intestinales avec *Lactobacillus* influe de façon différentielle la phosphorylation des protéines de jonction d'adhérence et l'abondance de protéine kinase C (PKC), modulant ainsi positivement la fonction de barrière épithéliale. **(Himmel et al., 2012, Bermud-Brito et al., 2012)**

L'utilisation des probiotiques, prévient l'altération de l'épithélium induit par les cytokines qui caractérisent les maladies inflammatoires de l'intestin, peut également contribuer au renforcement de la barrière muqueuse. Les mucines (Glycoprotéine) sont les principaux constituants macromoléculaires de mucus épithéliaux. Les probiotiques peuvent favoriser la sécrétion de mucus comme un mécanisme pour améliorer la fonction de la barrière et l'exclusion des agents pathogènes. **(Bermud-Brito et al., 2012)**

➤ Production de substances antimicrobiennes :

Les acides organiques, en particulier l'acide acétique et l'acide lactique, ont un effet inhibiteur pour les Gram négatives, ils ont été considéré comme les principaux composés antimicrobiens responsables de l'activité inhibitrice des probiotiques contre les agents pathogènes **(Bermud-Brito et al., 2012)**.

L'acide organique pénètre dans la cellule bactérienne à travers la membrane bactérienne. Il se dissocie à l'intérieur de son cytoplasme. L'éventuelle diminution de pH intracellulaire ou l'accumulation intracellulaire de la forme ionisée de l'acide organique peut conduire à la mort de l'agent pathogène (Ouwehand, 1998, Russell et Diez-Gonzalez, 1998), certains probiotiques sont capables de générer de peroxyde d'hydrogène en présence d'hydrogène. L'effet bactéricide de peroxyde d'hydrogène est du à son effet oxydant sur la surface cellulaire bactérienne, le dioxyde de carbone est produit par les bactéries hétérofermentaires, et son activité antimicrobienne est due à l'inhibition de décarboxylation enzymatique et son accumulation dans la membrane

provoquant un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire.(**Callado et al., 2010**).

Un grand nombre de bactéries lactiques produisent des peptides antibactériens qui sont les bactériocines inhibant la croissance des bactéries altérantes ou pathogènes. Les bactériocines agissent au niveau de la membrane cellulaire par un mécanisme comme comprend la destruction des cellules cibles par la formation des pores et/ou l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire. (**Bermudez-Brito et al., 2012**).

➤ **Exclusion compétitive des microorganismes pathogènes :**

Les mécanismes utilisés par une espèce pour exclure ou réduire la croissance d'une autre espèce sont variés, y compris ; la création d'une micro-écologie hostile pour rendre l'environnement moins adapté à leurs concurrents, l'élimination des sites récepteurs bactériens disponibles, la production et la sécrétion de substances antimicrobiennes et des métabolites sélectifs, l'épuisement compétitif des nutriments essentiels (**Rolfe, 1991 ; Bermudez-Brito et al., 2012**).

Les propriétés d'adhésion spécifiques qui sont due à l'interaction entre les protéines de surface et les mucines peuvent inhiber la colonisation des bactéries pathogènes et sont les résultats d'une activité antagoniste par certaines souches probiotiques contre l'adhésion des pathogènes gastro-intestinaux. (**Servin, 2004**).

➤ **Compétitions pour les nutriments :**

L'inhibition de pathogène peut également s'effectuer par un processus de compétition pour les nutriments. (**Oleschlaeger, 2010**). La compétition pour les nutriments est très intense, l'interaction dépendant de la vitesse d'absorption des nutriments et la vitesse métabolique inhérent, du taux de croissance, et de la sécrétion des inhibiteurs spécifiques. (**Luis Balcàzar et al., 2006**).

➤ **Augmentation de l'adhésion à la muqueuse intestinale :**

L'adhésion à la muqueuse est indispensable pour la colonisation et elle est importante pour l'interaction entre les souches probiotiques et l'hôte. La plupart des infections intestinales sont initiées par l'adhésion des pathogènes aux cellules entérocytaires de l'hôte.

Les bactéries lactiques présentent divers déterminants de surface impliqués dans leur interaction avec les cellules épithéliales intestinales (**Servin, 2004**). Les cellules épithéliales intestinales produisent la mucine qui est un mélange complexe de glycoprotéines qui constitue un composant principale de la muqueuse, empêchant ainsi

l'adhésion des bactéries pathogènes. (Callado et al., 2005, Bermudez-Brito et al., 2012).

Les bactéries présentent des adhésines de surface qui assurent la fixation à la muqueuse, l'exemple le plus étudiée des adhésines bactériennes ciblant le mucus est une protéine produite par *Lactobacillus reuteri* (Buck et al., 2005, Bermudez-Brito et al., 2012)

Les probiotiques telles que *L.plantarum*, ont la capacité d'induire MUC2 et MUC3 et d'inhiber l'adhérence d'*E.coli enteropathogène*. Cette observation indique que l'amélioration des couches muqueuses et du glycocalyx recouvrant l'épithélium intestinale, ainsi que l'occupation des sites de liaison microbienne par *Lactobacillus spp.* Fournir une protection contre l'invasion par des agents pathogènes (Bermudez-Brito et al., 2012). Le processus d'adhésion microbienne des bactéries lactiques comprend également des interactions non spécifiques électrostatiques, hydrophobes et des forces stériques. De même certaines souches de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* ont la capacité d'adhésion sur la surface de la muqueuse intestinale et favorisent l'amélioration d'un effet barrière fonctionnel contre l'invasion des pathogènes (Khalighi et al., 2016)

Les mécanismes de compétition de l'adhésion se font généralement de deux façons :

- Compétition spécifique par l'intermédiaires des adhésines (Gueimonde et al., 2006, Lahmer et al., 2020).
- Compétition non spécifique en impliquant des interactions de faibles liaisons (Shanahan, 2011, Lhmer et al., 2020).

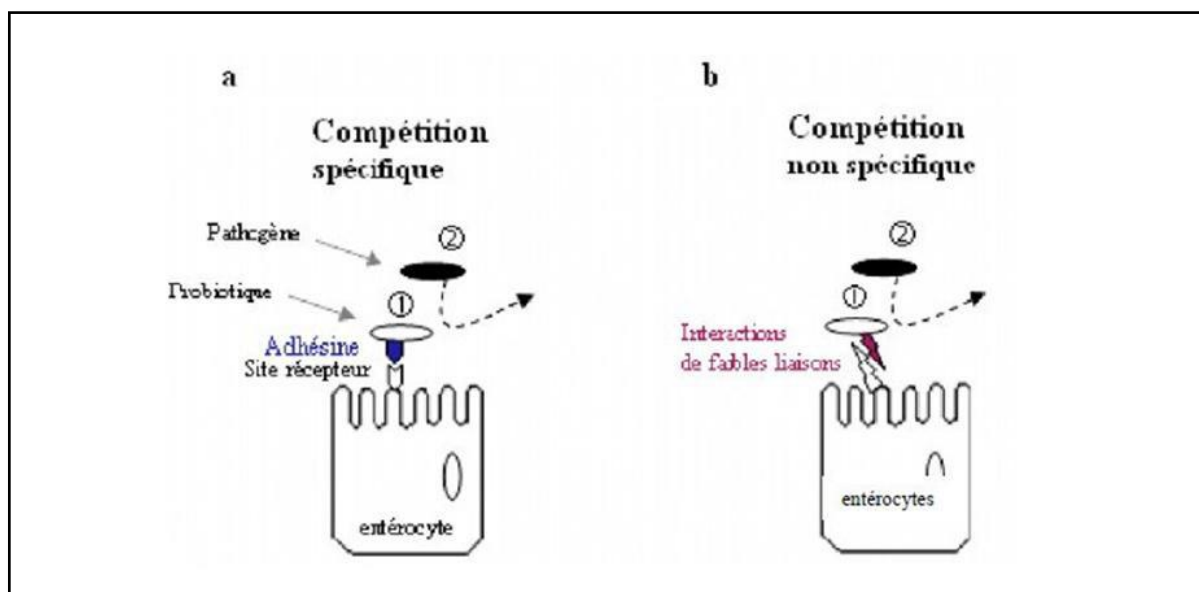


Figure 3 : Mécanisme d'inhibition d'adhésion des pathogènes (a) compétition spécifique (b) compétition non spécifique (Servin et Cocconnier, 2003)

➤ Modulation du système immunitaire :

Les probiotiques peuvent procurer des effets bénéfiques en stimulant l'immunité non spécifique et en modulant la réponse immunitaire humorale et cellulaire. (Fong et *al.*, 2016) . Ce mécanisme porte sur l'interaction des probiotiques avec le système immunitaire pour accroître la réponse immune de l'hôte contre les pathogènes de manière dépendant de la souche. (Lee et Mazmanian, 2010). La modulation de système immunitaire se fait par différents mécanismes parmi ces mécanismes le renforcement de la réponse immunitaire non spécifique contre les infections, la stimulation de l'activité des cellules phagocytaires avec l'amélioration des productions de l'immunoglobuline intestinale IgA et l'induction de la synthèse des cytokines. (Holzapfel, Goktepe, et *al.*, 2006).

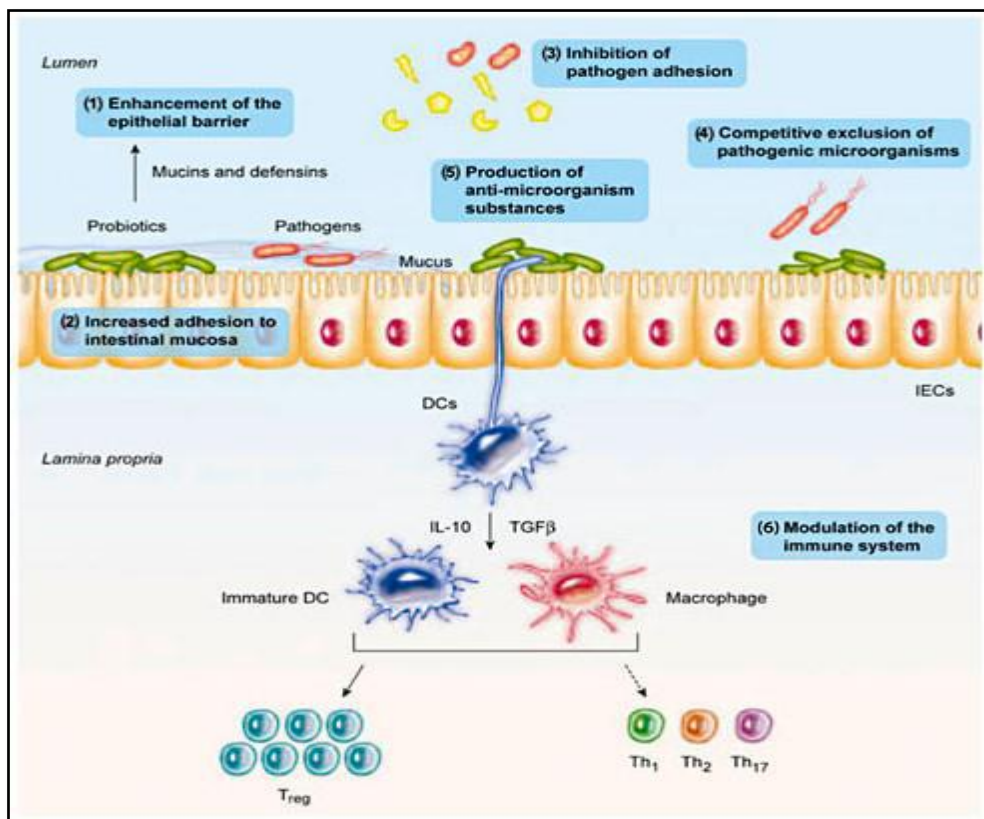


Figure 4 : Les principaux mécanismes d'action des probiotiques (Bermudez-Brito et *al.*, 2012)

I.2.5 Rôle de probiotique :

La consommation régulière de probiotique permet de créer un équilibre entre les microorganismes bénéfiques et les mauvaises bactéries.

Aussi les probiotiques participent à l'activation de l'immunité et la réduction de l'allergie chez les sujets à risque. Ils survivent au niveau du tube digestif où réside une partie de l'immunité grâce à leur résistance à l'acide gastrique et à la bile.

Les probiotiques ont un rôle important dans le développement du système immunitaire chez le nourrisson et dans son amélioration chez les personnes âgées par l'augmentation du nombre de phagocytes et de lymphocytes natural killer, première défense contre un agent exogène. (**Abid, 2020**).

Ils colonisent le tractus intestinal en formant une barrière contre les mauvais germes, et agissent également par l'amélioration de l'utilisation du lactose, par la réduction du cholestérol sanguin et du niveau de substances carcinogènes, et par l'inactivation de composés toxiques à la stimulation du système. (**De vrese et al., 2001**).

I.2.6 Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine :

I.2.6.1 Amélioration de l'intolérance au lactose :

Le lactose est un disaccharide présent exclusivement dans le lait et ses dérivés, la digestion de lactose nécessite une lactase qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose.

L'hypolactasie conduit à une digestion incomplète du lactose et qui a pour conséquence une intolérance au lactose qui se traduit par des symptômes digestifs après l'ingestion de lait : ballonnements, digestion difficile, diarrhée. Ce problème touche près de 70% de la population mondiale (**Singh et al., 2011**).

I.2.6.2 Réduction des diarrhées :

De nombreuses études cliniques visant le traitement ou la prévention des maladies diarrhéiques par l'utilisation des probiotiques ont été publiées. Le soulagement des symptômes et le raccourcissement des infections sont les effets probiotiques les plus importants (**Fung et al., 2011**).

I.2.6.3 Infection à *Helicobacter pylori* :

H. pylori a été associée en tant qu'agent majeur de la gastrite et ulcère peptique et également considérée comme un facteur de risque pour le cancer de l'estomac. L'utilisation de probiotiques pour l'inhibition de *H. pylori* a été explorée. Les données in vitro et in vivo obtenues, rapportent un effet inhibiteur des probiotiques sur l'adhésion de *H. pylori* aux cellules gastriques et la réduction de viabilité (**Pintado et al., 2014**).

I.2.6.4 Constipation :

Les bifidobactéries et les lactobacilles produisent l'acide lactique, acétique et d'autres acides conduisant à un abaissement du pH dans le côlon, qui peut améliorer le péristaltisme et diminuer ensuite le temps de transit colique (**Salvatore et Vandenplas, 2010**).

I.2.6.5 Maladies inflammatoires de l'intestin :

Le mécanisme d'action qui prend en charge les effets positifs des probiotiques sur les MII est encore peu claire. Cependant, il est bien évident que les différentes bactéries probiotiques agissent par des voies multiples plutôt que, par un seul mécanisme commun. Les principaux mécanismes d'action possibles des probiotiques comprennent l'antagonisme contre les agents pathogènes via la sécrétion de composés bactéricides, la suppression des médiateurs pro-inflammatoires, l'induction des facteurs de protection, l'amélioration de la prolifération des cellules épithéliales et l'inhibition de l'apoptose (**Pintado et al., 2014**).

I.2.6.6 Maladies allergiques :

Les maladies atopiques comme l'eczéma, la rhinite allergique et l'asthme sont des troubles allergiques chroniques dont la prévalence a augmenté considérablement au cours des 20 dernières années. Nombreuses preuves suggèrent que les souches probiotiques vivantes sélectionnées peuvent être efficaces dans la prévention des maladies allergiques (**Lahtinen et Endo, 2012**).

Certaines études suggèrent qu'il existe une relation entre les maladies allergiques et la composition de la microflore intestinale. Sepp et al. (2005) ont constaté que les bifidobactéries ont été moins détectés chez les enfants souffrant de maladies allergiques que chez les enfants en bonne santé (**Brunser et Gotteland, 2010 ; Belhamra, 2017**).

I.2.6.7 Cancer :

L'effet anticancéreux des bactéries probiotiques est rapporté comme étant dû à la suppression des sources de procarcinogène ou les enzymes qui conduisent à leur formation, l'amélioration de l'équilibre de la microflore intestinale, la normalisation de la perméabilité intestinale conduisant à la prévention ou le retardement de l'absorption des toxines, le renforcement des mécanismes de barrière intestinale, et l'activation des facteurs cellulaires non spécifiques (telles que les macrophages et les cellules naturel killer par l'intermédiaire de la régulation de la production d'interféron- γ) (**Shah, 2007**).

Matériels et méthodes

II. Matériel et méthodes :

Ce travail a été réalisé dans la station expérimentale au laboratoire de microbiologie de la Faculté de Science de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahleb, Blida 1, sur une période de deux mois. L'objectif de notre travail consiste à l'évaluation de l'activité antimicrobienne des souches et la mise en évidence du potentiel probiotique de bactéries lactiques isolées de produits laitiers du territoire.

II.1 Provenance des bactéries utilisées

II.1.1 Les bactéries lactiques

Les neuf (09) souches de bactéries lactiques sélectionnées pour l'étude proviennent du travail de notre promotrice réalisé dans le cadre de sa thèse de doctorat (Benhoua, 2019), ces souches ont été isolées de différents produits laitiers, purifiées et identifier par voie moléculaire PCR, elles sont notées par des codes selon le tableau ci- dessous (**Tableau 2**)

II.1.2 Les souches pathogènes :

Les souches bactériennes pathogènes utilisées dans nos expérimentations proviennent du laboratoire d'hygiène de Tipaza. *Pseudomonas aeruginosa* CNR ISPA PS20, *E .coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 19095, *Listeria monocytogène* ATCC 9525, *Klebsiella*.

Tableau 2 : Les souches lactiques utilisées au cours de ce travail.

Les souches	origine	Séquençage de l'ADN 16S
LB1	Lait de chamelle (Naama)	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LB2	Lait de vache (Oran)	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LC1	Lait de chamelle (Bechar)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
LC 2	Lait de chamelle (Naama)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
LC 3	Beurre traditionnel (Oran)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
LC4	Lait de vache (Oran)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
W1	Lait de vache (Oran)	<i>Weissella confusa</i>
W 2	Beurre traditionnel (Oran)	<i>Weissella confusa</i>
W 4	Formage traditionnel (klila)	<i>Weissella confusa</i>

Les résultats de l'identification des espèces par PCR ont révélé que les neuf souches sélectionnées appartiennent à *Leuconostoc mesenteroide*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus plantarum* avec pourcentage de similitudes de 99%. (Benhoua, 2019)

II.2 Revivification des souches lactiques :

Les souches lactiques étant conservées dans du milieu lait glycérol à -80°C, Leur revivification est réalisée sur milieu liquide (MRS bouillon) **De Man, Rogosa et sharp, 1960**. C'est un milieu adapté à la recherche spécifique des bactéries lactiques, L'incubation des souches a été faite à 30°C pendant 24h à 48h. Le repiquage a été réalisé sur MRS solide et incubée à 30°C pendant 24h à 48h.

Pour les souches pathogènes, la revivification a été faite dans de bouillon nutritif puis une incubation à 37°C pendant 24heures. Après incubation, les cultures sontensemencées dans des boites Pétri contenant de la gélose nutritive et l'incubation se fait pendant 24 h à une température de 37 ° C.

II.3 Vérification de la pureté des souches :

La pureté des souches a été confirmée par l'observation de l'aspect des colonies sur gélose MRS, la coloration de Gram ainsi que par la réaction de catalase.

La pureté des souches pathogènes a été vérifiée par l'aspect des colonies sur gélose, coloration de Gram et la réaction de catalase.

II.3.1 Étude macroscopique :

Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité). L'observation macroscopique est faite après 24heures d'incubation à 30°C sur gélose MRS pour les bactéries lactiques et gélose nutritif à 37 °C pour les bactéries pathogènes.

II.3.2 Étude microscopique :

L'observation microscopique au grossissement (G x1250) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 1996**).

Ces caractères sont déterminés selon la méthode de coloration de Gram qui consiste à :

- **Préparer un frottis :**

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique puis prélever à l'aide d'une pipette pasteur stériles une fraction d'une colonie isolée.
- Réaliser le frottis de façon à obtenir un étalement mince et homogène.
- Sécher à l'air libre puis fixer le frottis par 3 passages rapides et brefs de la lame au-dessus d'une flamme d'un bec bunsen.

- **Etape de la coloration différentielle de Gram :**

- Recouvrir la lame de violet de gentiane pendant 1 minute.
- Rejeter le violet de gentiane et recouvrir de Lugol pendant 1 minute.
- Rejeter le lugol, et décolorer à l'alcool 95° pendant 30 secondes et rincer immédiatement à l'eau.
- Recouvrir la lame à la fuchsine diluée 1/10 pendant une minute puis rincer.
- Sécher à la chaleur et examiner à l'immersion (**Denis *et al.*, 2011, Fares *et al.*, 2020**)
La lecture se fait ($\times 100$) avec l'huile à immersion.

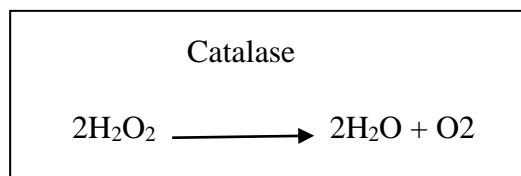
II.3.3 Caractéristique biochimique :

Test de catalase :

- Principe :

L'enzyme catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée (H_2O_2) qui résulte de l'oxydation mise en évidence par contact de la culture bactérienne avec l'eau oxygénée (Guiraud, 2003).

Selon la réaction suivante :



- Technique :

Une goutte de H₂O₂ est déposée sur une lame qui contient une colonie prélevée à partir de la gélose MRS. La décomposition de H₂O₂ est traduite par un dégagement gazeux sous forme de mousse et de bulles (Guiraud, 2003).

II.4 Etude de l'activité antimicrobienne :

Les souches lactiques sélectionnées ont été testées pour leur activité antagoniste contre les bactéries indicatrices (*Pseudomonas aeruginosa* CNR ISPA PS20, *E. coli* ATCC 9525, *Staphylococcus aureus* ATCC 19095, *Listeria monocytogène* ATCC 9525, *Klebsiella*) en utilisant deux méthodes : Interaction par méthode directe (Spot Agar Test) selon (Fleming *et al.*, 1975), et la deuxième qui consiste à réaliser une interaction par méthode **indirecte** (Well Diffusion Assays) décrite par (Tagg *et al.*, 1976).

II.4.1 Méthode direct (spot agar test (Fleming et al., 1975)):

Ce test d'antagonisme est réalisé dans le but de révéler la production ou non des substances antibactériennes par les souches de bactéries lactiques envers les souches pathogènes.

A partir d'une pré-culture de souches lactiques sélectionné obtenus après 18 heures d'incubation à 30°C, 5µl ont été ensemencées sous forme de spots sur gélose MRS de façon à obtenir quatre spots par boîtes de même taille et identiques.

L'incubation se fait en Aérobiose à 30°C pendant 24 heures. Après l'incubation les boîtes sont ensuite recouvertes de 10 ml de gélose MH (Muller Hinton) inoculé par 1ml d'une pré-culture de 18h (Do₆₀₀:0.08-0.1) de chaque bactérie pathogène (*Pseudomonas aeruginosa* CNR ISPA PS20, *E. coli* ATCC 9525, *Staphylococcus aureus* ATCC 19095, *Listeria monocytogène* ATCC 9525, *Klebsiella*).

Après 24 heures d'incubation à 37 °C des souches inhibitrices (souches lactiques) et indicatrices (souches pathogènes), les boîtes ont été examinées en vue de détecter les zones d'inhibition autour des spots et le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré. (Fleming *et al.*, 1975) . Les résultats positifs se manifestent par l'apparition d'une zone claire ≥ 6 mm autour des souches inhibitrices sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes.

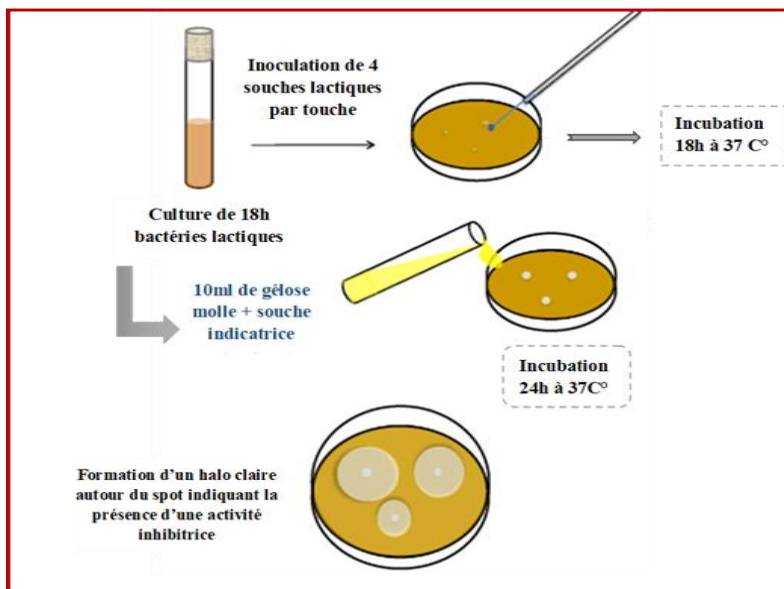


Figure 5 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode spots sur agar (Fleming et al., 1975)

II.4.2 Méthode indirect (diffusion par puits) :

Selon la méthode de diffusion en puits de Barefoot et Kaenhammer(1983) un volume du milieu Mueller-Hinton agar est coulé dans des boîtes de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les boîtes sont ensemencées en surface par la suspension de la souche pathogène (100µl, DO₆₀₀= 0,1 à 0,08), puis des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce sur la gélose et seront remplis par 60 à 80µl de surnageant filtré par les membranes millipores et neutralisé avec NaOH, obtenu après centrifugation à 8000 rpm pendant 10 min à 4°C d'une culture de la souche lactique (dans le bouillon MRS).

Les boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C/2 h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures et l'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits (**Tabak et Bensoltane, 2011**).

Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits seront mesurés, le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2 mm. La mesure du diamètre d'inhibition ZDI est effectuée selon la formule suivante :

$$\text{ZDI en (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits (6 mm)}$$

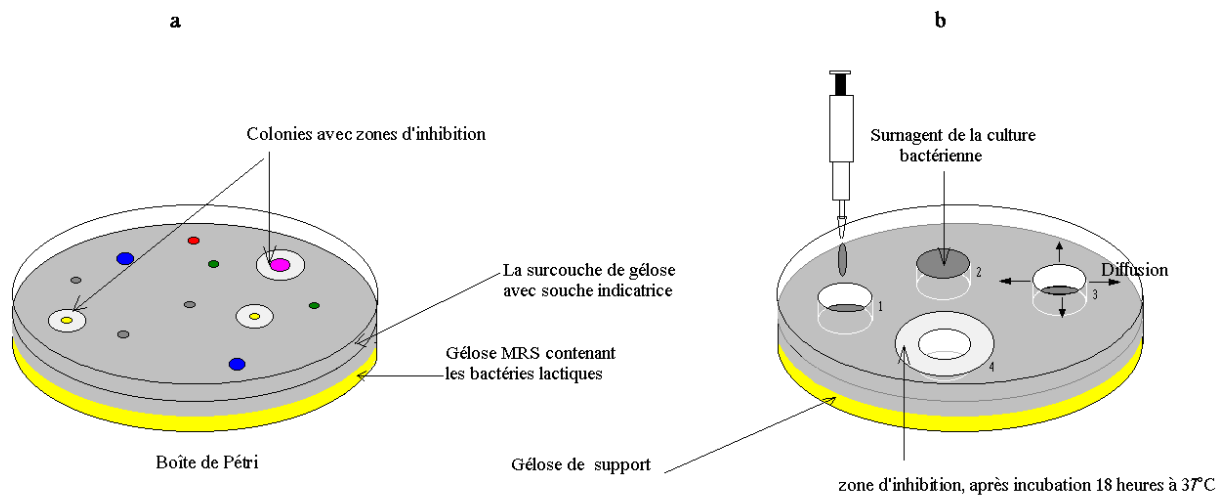


Figure 6 : Schéma du test de l'activité antimicrobienne (a) méthode directe (b) méthode indirecte

II.5 EVALUATION DU POUVOIR PROBIOTIQUE DES SOUCHES LACTIQUES :

II.5.1 Résistance à l'acidité :

L'aptitude des bactéries lactiques de résister à l'acidité gastrique, a été recherchée vu que l'acidité de l'estomac est la première barrière à la survie des microorganismes. Les cellules bactériennes des souches (10^8 UFC/mL) provenant d'une culture jeune de 18h, ont été récupérées par centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min. Le culot a été rincé par le PBS stérile (solution tampon phosphate) à pH 6,8. La procédure centrifugation/rinçage a été répétée trois fois. Les cellules bactériennes ont été remises dans tubes MRS ajusté à différents pH : 2, 3, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 3heures. Des dénombrements bactériens sur milieu MRS ont été effectués au moment de l'inoculation (t0h) et après 3 h d'incubation (t3h). Après incubation à 37 ° C pendant 48 h les valeurs ont été exprimées en log UFC / ml. **(Benmechernene et al., 2013 ; Mokdad, 2020) avec modification.**

$$\text{Taux de survie (\%)} = (\log \text{ufc à T3h} / \log \text{ufc à T0h}) \times 100$$

II.5.2 Résistance aux sels biliaires :

Les sels biliaires ont pour rôle de faciliter la digestion des lipides mais aussi d'inhiber la prolifération des bactéries dans la partie haute de l'appareil digestif. Pour cela, l'aptitude des souches de Leuconostoc et lactobacilles à résister à la bile a été recherchée.

Les cellules bactériennes d'une culture jeune de 18h (10^8 UFC/ml) ont été récupérées par centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min, le culot a été rincé par du PBS à (pH 6.8). Une autre centrifugation a été établie puis du PBS (pH 6.8) a été ajouté en additionnant 0.3% et 1% (w/v) de sels biliaries (Oxgall, Oxoid Ltd., England).

Les tubes ont été incubés 3 heures à 37°C après une agitation vigoureuse. Des dénombrements bactériens sur milieu MRS ont été effectués au moment de l'inoculation (t_{0h}) et après 3 h d'incubation (t_{3h}) (**Benmechernene et al., 2013 ; Mokdad, 2020**) avec **modification**.

$$\text{Taux de survie (\%)} = (\log \text{ ufc à } T_{3h} / \log \text{ ufc à } T_{0h}) \times 100$$

II.5.3 Hydrolyse des sels biliaries :

Le test de sel de bile d'hydrolyse est basé sur la détermination de l'enzyme hydrolase biliaire qui catalyse l'hydrolyse du sel biliaire. Sur les boîtes de Pétri contenant du MRS modifié préparé avec 0,5% de sel biliaire, 0,1 ml de la culture de la souche a été inoculé à la surface et incubé à 37 ° C pendant 48 h.

L'hydrolyse bactérienne des sels biliaries est observée comme une altération dans la morphologie des colonies en comparant avec les cellulesensemencées sur les boites MRS control (Sans sel biliaire).

II.5.4 Activité hémolytique :

Des cultures fraîches sont étalées en stries sur gélose GN (gélose nutritive) additionnée de 5% du sang humain, incubées pendant 48 h à 37°C. Les zones au contour des colonies vont définir le type de l'hémolyse : zone verte pour α - hémolytique (digestion partielle des hématies), zone claire pour β -hémolytique (digestion complète des hématies) et pas de zone pour γ -hémolytique. (**Bougeurra, 2020**).

II.5.5 III.5. La résistance aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques et la mesure des diamètres d'inhibitions. Après l'ajustement de la densité de l'inoculum à celle de l'étalon 0,5 Mac Farland (correspond à 10^6 UFC/mL) le milieu MRS estensemencée, laisser sécher, puis 4 différents disques d'antibiotiques commercialisés par l'Institut Pasteur sont déposés.

Les diamètres des zones d'inhibition observés autour des colonies classent les bactéries comme chimiquement sensibles (S) (≥ 21 mm), intermédiaires (I) (16-20 mm) ou résistantes (R) (≤ 15 mm) à un antibiotique précis (Vlková *et al.*, 2006). Les antibiotiques utilisés sont : Gentamicine (10 μ g), Erythromycine (15 μ g), L'acide fusidique (10 μ g) et Amoxicilline (25 μ g). Après incubation à 30°C pendant 24h en aérobiose, des zones d'inhibitions peuvent être observées autour des disques, le diamètre de la zone d'inhibition est alors mesuré. Les résultats sont exprimés en Sensible (S) ou Résistante (R). *E. coli* ATCC 8739 a été utilisé comme souche de référence pour le contrôle des antibiotiques. (Chemlal kherraz, 2012)

Tableau 3 : Liste des antibiotiques utilisés.

Antibiotiques	Famille	Mode d'action
Amoxicilline	Béta- lactamine	Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
Gentamicine	Aminosides	Inhibition de la synthèse des protéines
Acide fusidique	Fusidanines	Inhibition de la synthèse des protéines
Erythromycine	Macrolides	Inhibition de la synthèse des protéines

➤ **Conservation des souches à longue durée :**

Pour des périodes de conservation plus prolongées, les souches sont gardées -20°C ; A partir des cultures jeunes de 18h sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 3000 t / min pendant 10 min. Une fois le surnageant est éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot, qui contient 50% de lait écrémé et 50% de glycérol. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans du lait écrémé à 0,5 % d'extrait de levure, deux fois avant utilisation (**Figure20**) (Badis *et al.*, 2005)

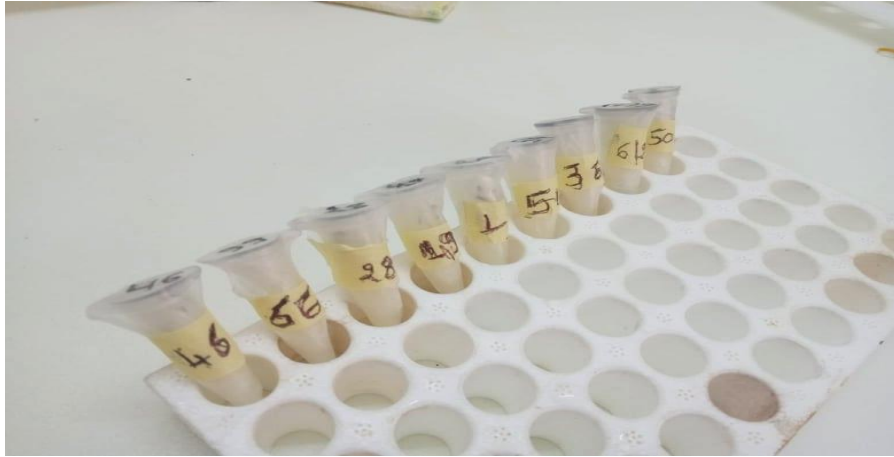


Figure 7: Conservation des souches lactiques à long terme

➤ **Conservation des souches de bactéries pathogènes :**

Une culture des souches a conservé est effectuer en bouillon nutritif. Après croissance des bactéries, un volume de glycérol stérile est ajouté à un volume de la culture, la suspension bactérienne à 50 % glycérol est ensuite répartie dans des éppendorffs puis congelé à -20°C. (Figure21)

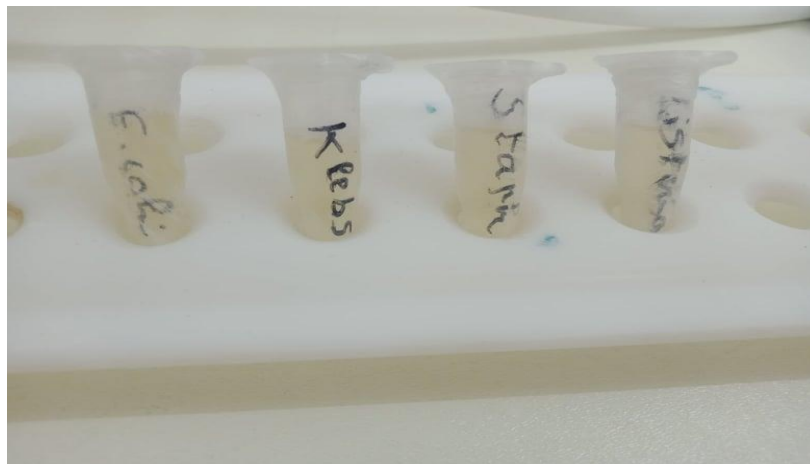


Figure 8 Conservation des souches pathogènes

Résultats et discussion

III. Résultat et interprétation

III.1 Résultat et interprétation

Les bactéries lactiques possèdent des atouts technologiques remarquables pour la bioconservation des aliments, grâce à la production d'une grande variété de substances antimicrobiennes qui inhibent la croissance des microorganismes pathogènes. Parmi les facteurs responsables de cette inhibition, la production des acides organiques, la diminution du pH et la production des bactériocines (Dib, 2015)

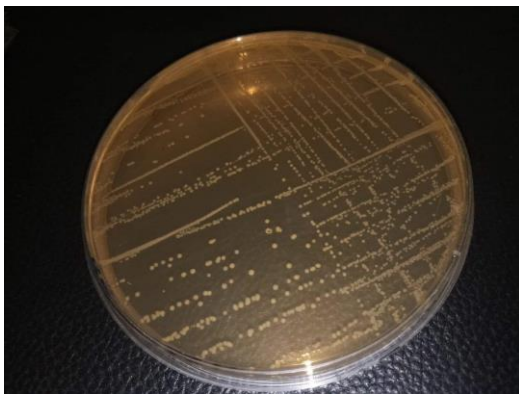
De plus, les bactéries lactiques sont de plus en plus utilisées sous forme de probiotiques qui sont des préparations contenant des microorganismes et leurs métabolites, utilisés comme additifs alimentaires et qui affectent de façon bénéfique l'organisme de l'hôte (Schaafsma, 1996).

III.1.1 Vérification de la pureté des souches :

III.1.1.1 Caractérisation macroscopique et microscopique

L'aspect macroscopique des souches sélectionnées a révélé des petites colonies arrondis, bombées et lisses de couleur blanchâtre, ayant un contour régulier. (La fig. 7 représente l'aspect macroscopique de la souche LB1 et LC1 sur milieu MRS)

A)



B)



Figure 9 : L'observation macroscopique des colonies de la souche LB1 (A) et LC1 (B) cultivée sur milieu solide MRS.

➤ **Sur milieu liquide**

La croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble homogène sur milieu MRS liquide (figure8)

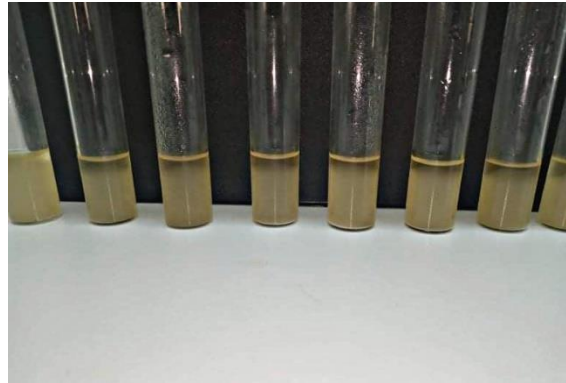


Figure 10: La croissance des souches lactiques sur milieu MRS liquide.

➤ **Examen microscopiques (coloration de Gram) :**

L'observation microscopique a révélé une forme de cellules en Cocci ou bacilles. Les coques sont disposées en paires ou en petites chaînettes alors que les bacilles étaient des bacilles pas trop longs. La figure 9 représente l'observation microscopique de quelques souches retenues.

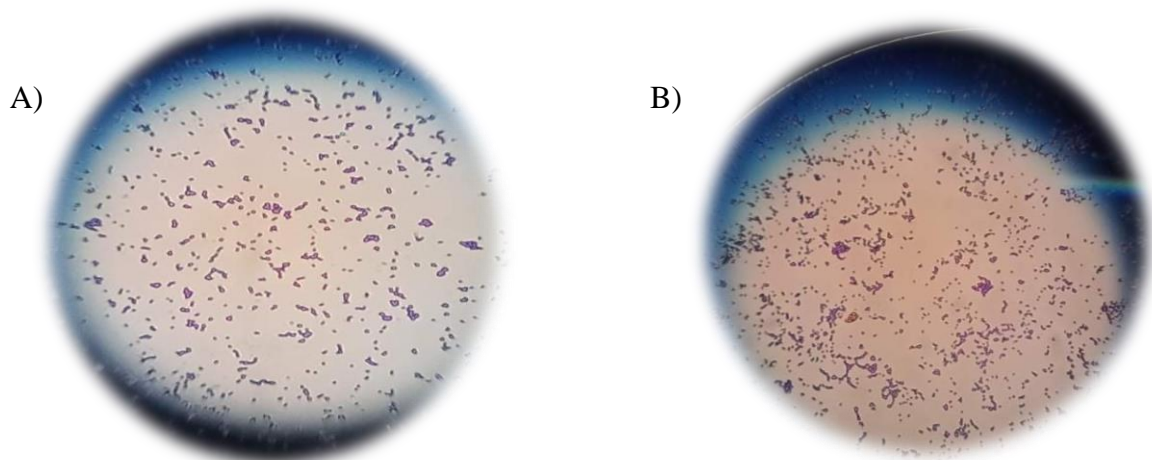


Figure 11: Observation au microscope optique de la forme des cellules et leur mode d'association (A) Souche LC1 (B) Souche LB1 (Grx40)

Tableau 4 : Résultats de l'observation microscopique et du test catalase des souches lactiques.

Les souches	Gram	forme	catalase
LB1	+	Coccobacille	-
LB2	+	Coccobacille	-
LC1	+	Cocci	-
LC 2	+	Cocci	-
LC 3	+	Cocci	-
LC4	+	Cocci	-
W1	+	Coccobacille	-
W 2	+	Coccobacille	-
W 4	+	Coccobacille	-

(+) : positif, (-) : négatif

III.1.1.2 Résultat test catalase :

Le test de catalase a révélé l'absence de l'enzyme ce qui reflète l'incapacité des souches à dégrader le peroxyde d'hydrogène. La majorité des bactéries lactiques sont des anaérobies facultatifs et n'ont pas besoin de synthétiser la peroxydase (Larpent, 1997).

L'analyse de ces résultats démontre que toutes les souches appartiennent au groupe des bactéries à Gram positif et à catalase négative, caractéristique des bactéries lactiques.

L'absence des bulles d'air après le dépôt d'une goutte de l'eau oxygénée sur les colonies cibles montre que toutes les souches sont catalase négative (**Figure 10**), les souches de *Staphylococcus*, *Klebsiella* et *Pseudomonas* ont été utilisé comme témoin positif pour vérifier le H₂O₂ utilisé (**Figure 11**).

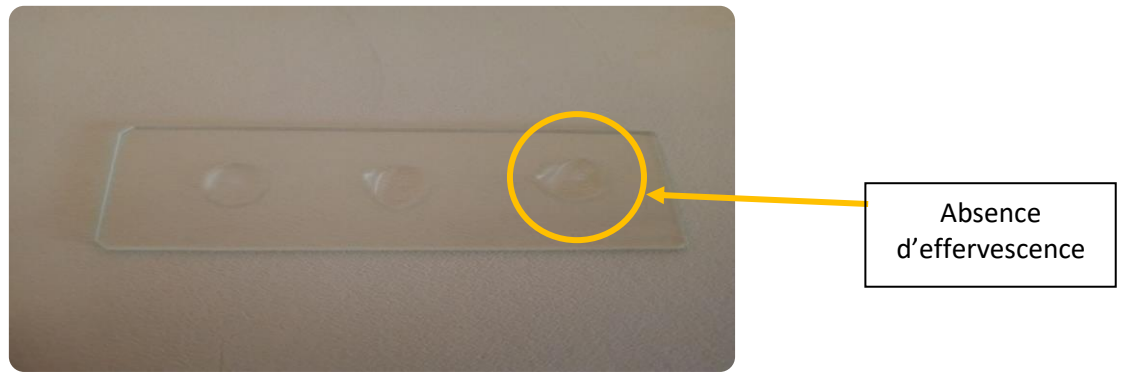


Figure 12 : Résultat négatif du test catalase.



Figure 13 : Résultat test catalase des témoins positifs

La coloration de Gram a confirmé que les souches sont Gram positif et le test de catalase était négatif. Ces caractéristiques confirment l'appartenance des souches aux bactéries lactiques. Les résultats de la caractérisation microscopique sont résumés dans le **tableau 4**.

➤ **Les souches pathogènes :**

Cinq souches bactériennes pathogènes (*Pseudomonas aeruginosa* CNR ISPA PS20, *E .coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 19095, *Listeria monocytogène* ATCC 9525, *Klebsiela*) ont été utilisées lors de notre travail.

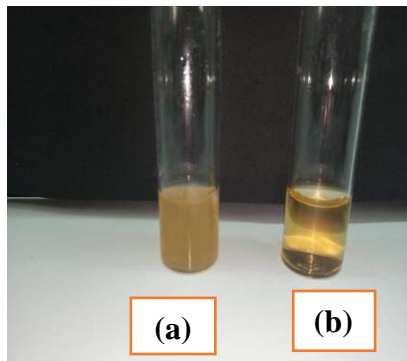


Figure 14: Croissance d'*E.coli* sur bouillon nutritif (a) , témoin bouillon nutritif sans bacterie (b)

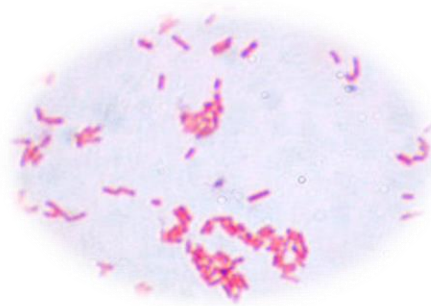


Figure 15 L'observation microscopique d'*E. coli* après coloration de Gram au microscope optique(Gx1250)

III.1.2 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches lactiques :

III.1.2.1 L'activité antimicrobienne directe (Spot Agar Test) :

Le pouvoir antagonique des bactéries lactiques envers les bactéries à potentiel pathogène, notamment celles qui existent aux environnements laitiers, est un caractère très recherché autant qu'un caractère crucial dans la bio-conservation alimentaire. L'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes montre une activité antagonisme, qui se manifeste par l'apparition des halots d'inhibition (**Fleming et al., 1975**).

Les résultats des interactions bactériennes par méthode directe entre les souches inhibitrices (bactéries lactiques) et les souches indicatrices (*Pseudomonas aeruginosa* CNR ISPA PS20, *E. coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 19095, *Listeria monocytogène* ATCC 9525, *Klebsiela*) témoignent que toutes les souches lactiques possèdent la capacité d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes avec des diamètres qui varie en fonction de la bactérie indicatrice et en fonction de la bactérie lactique.

La mesure du spectre d'inhibition démontre que les souches sélectionnées ont presque la même performance en matière d'inhibition de la croissance des bactéries indicatrices (spectre d'inhibition de 10-27mm), les résultats ont révélé que la souche W2 est la plus performante car elle a témoigné le spectre d'inhibition le plus élevé où on a noté un spectre d'inhibition de 26mm contre la souche *E. coli* et *Staphylococcus aureus* suivi par celui contre *Listeria* (25 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (20mm) et 16mm contre *Listeria*. Le spectre d'inhibition le plus faible été constaté contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* par LC4 qui témoigne également d'une bonne activité antimicrobienne.

Les résultats indiquent également que les deux souches de lactobacilles ont fortement inhibé la croissance de *L.monocytogène* (25 mm), alors que les *Leuconostoc* et *Weissella* ont une forte activité antibactérienne contre *E.coli* avec de zones d'inhibition de (19_26mm) et (16_27mm) respectivement. (Le **tableau 5**) et la (**figure 14**) représente le diamètre des spectres d'inhibitions des souches envers les cinq souches pathogènes.

Tableau 5 : Résultats de l'activité antimicrobienne diamètres des zones d'inhibition en (mm)

<i>Souches</i>	<i>Gram (-)</i>			<i>Gram (+)</i>	
	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Klebssila</i>	<i>Staphyloccocus aeurus</i>	<i>Listeria monocytogène</i>
<i>LB1</i>	20	20	13	16	25
<i>LB2</i>	27	12	11	17	25
<i>LC1</i>	22	18	18	20	14
<i>LC2</i>	26	20	16	26	25
<i>LC3</i>	19	16	19	23	11
<i>LC4</i>	20	10	12	24	14
<i>W1</i>	23	17	13	18	21
<i>W2</i>	27	15	11	15	17
<i>W4</i>	16	20	13	20	16

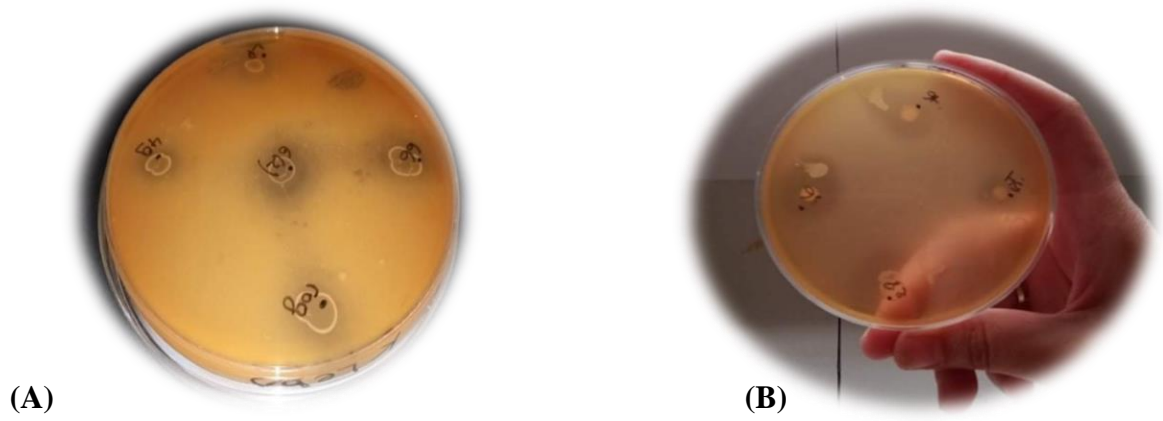
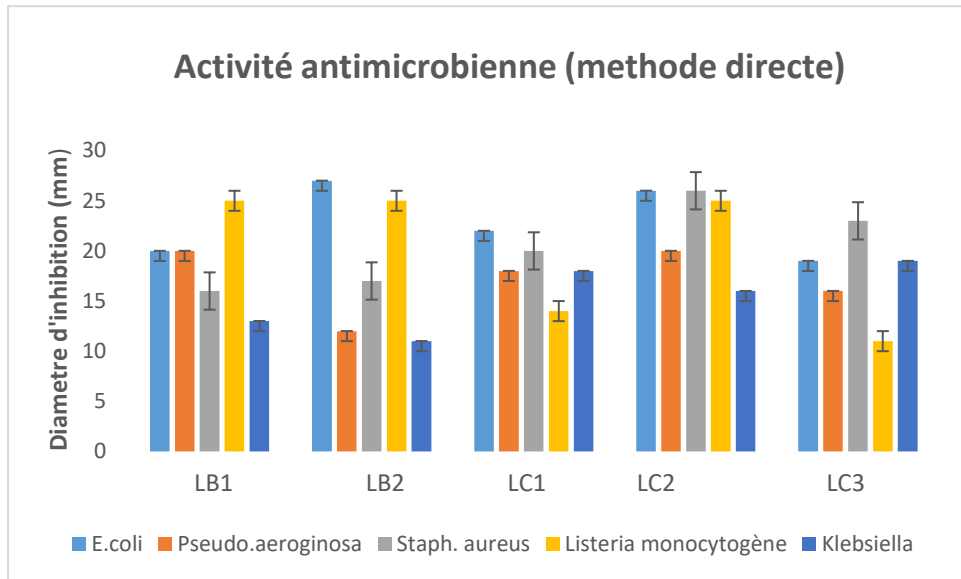
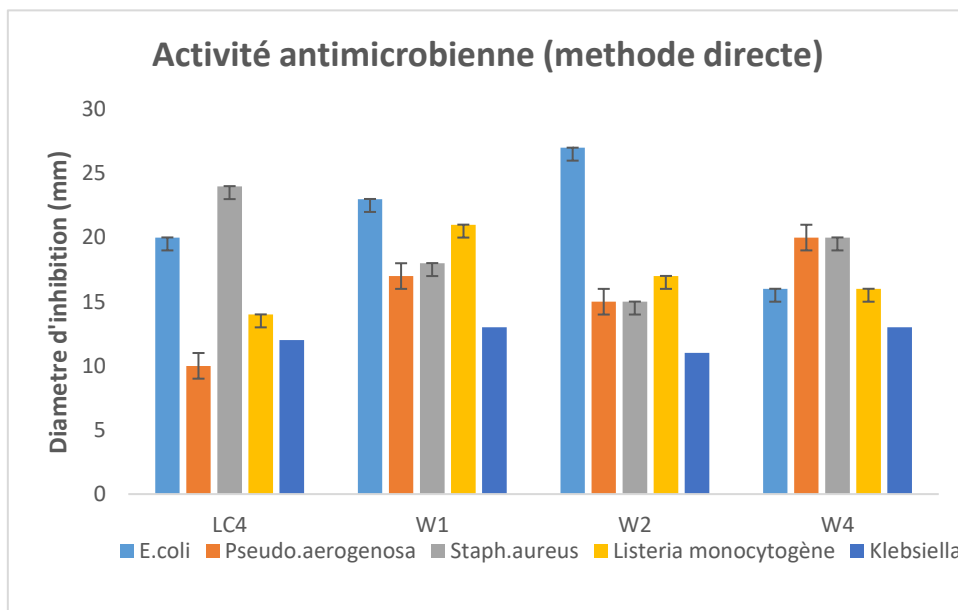


Figure 16 : *Activité antimicrobienne des souches lactiques envers des souches pathogènes par la méthode directe. (A) klebsiella (B) Staphylococcus*



A



B

Figure 17 : Resultat de l'effet antibacterien par methode directe des souches testées.

(A) l'activité antibactérienne des souches LB1, LB2, LC1, LC2, LC3, (B) L'activité (B) antibactérienne des souches LC4, W1, W2, W4

III.1.2.2 L'activité antimicrobienne Indirect (Méthode par puits)

Le but de ce test est de savoir si nos souches lactiques ont le pouvoir de sécréter des substances de nature protéiques (bactériocine) contre les souches pathogènes testées.

Toutes nos souches testées se sont avérées négatives pour cette technique aucune zone d'inhibition constatée (les résultats obtenus sont représentés dans (la figure 16)).

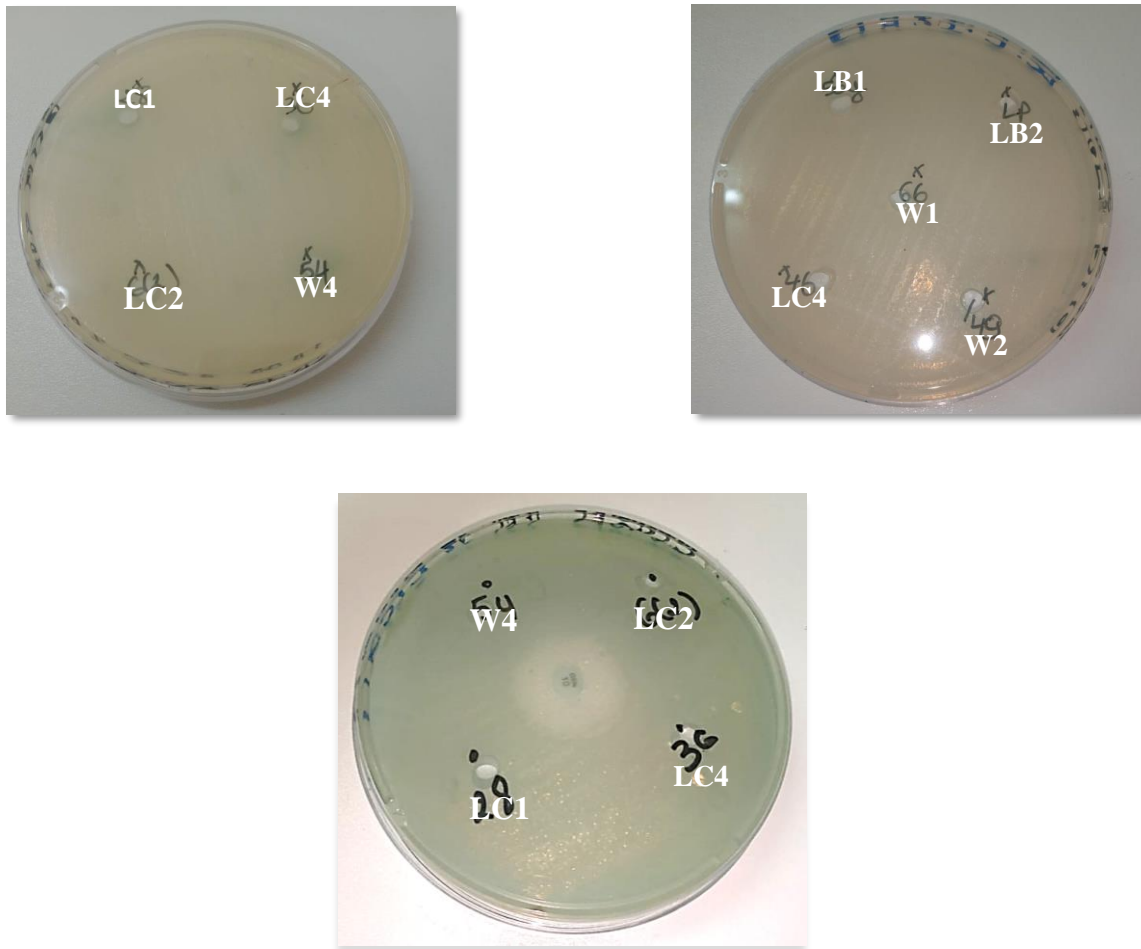


Figure 18 : L'activité antimicrobienne des souches lactiques après neutralisation du surnageant

III.1.3 Evaluation du potentiel probiotique :

Six souches de *Lactobacillus* et de *leuconostoc* identifiées en tant que *Lactobacillus plantarum* ; et *leuconostoc mesenteroides* présentant les meilleurs diamètres de l'activité antibactérienne vis à vis les cinq bactéries pathogènes, ont été sélectionnées afin d'étudier leur potentiel probiotique.

III.1.3.1 Tolérance à l'acidité :

La tolérance à l'acide des bactéries est importante non seulement pour l'étape gastro-résistantes, mais aussi pour leur utilisation en tant que compléments alimentaires qui permet aux souches de survivre plus longtemps dans les aliments riche en acide (Prasad *et al.*, 1998, Benyoucef, 2018).

Les résultats de la tolérance des souches ont témoigné que nos souches n'ont pas pu résister au pH 2. Cependant, une grande viabilité a été observée après l'exposition au pH 3, La souche LB2 a montré une grande viabilité avec un taux de survie 78,37% et une diminution de log t_{0h} de 4,3 à 3,37 pour t_{3h}, les souches LC1 et LB1 ont montrées la plus faible viabilité 54.04% avec diminution de log t_{0h} de 3,7 à 2 pour t_{3h} (**Tableau 6**).

Tableau 6 : L'effet du pH (pH 2, pH3) sur la viabilité des souches de *L.mesenteroides* et *L.plantarum*

Souches	pH 2			pH3		
	Log t ₀	Log t _{3h}	Le taux de survie%	Log t ₀	Log t _{3h}	Le taux de survie%
LB1	3	00	00	3,7	2	54.04
LB2	00	00	00	4,3	3.37	78.37
LC1	00	00	00	3,7	2	54.04
LC2	00	00	00	3,4	2	58.82
LC3	4	00	00	4,2	3.19	75.95
LC4	3	00	00	4,6	3.20	69.56

Les résultats du dénombrement sont exprimés en log UFC/ml

III.1.3.2 Tolérance aux sels biliaires :

La résistance à la bile est l'une des caractéristiques recherchées lors de la sélection des bactéries probiotiques pour que le plus grand nombre possible de bactéries traversent le duodénum en direction de leur site d'action, tout en restant viables et capables de se multiplier (Izquierdo, 2009).

Les résultats obtenus (**tableau7**) ont montré que Les six souches testées présentent une résistance différente à l'exposition aux sels biliaires à différentes concentrations 0,3% et 1% et que le pourcentage de survie diminue avec l'augmentation de la concentration des sels biliaires. Toutes les souches ont pu croître en présence de 0,3% de sels biliaire après 3h d'incubation. Cependant, une diminution de viabilité a été constatée à 1% de sels. Les souches LB1 et LC2 ont montré la résistance la plus élevée avec une réduction de viabilité en présence de 1% de SB.

Cependant, les souches LB2 et LC4 n'ont pas pu tolérer 1 % de SB après 3h d'incubation avec un taux de survie égale à 0.

Tableau 7 : Viabilité (log ufc/ml) et taux de survie des souches de *L.plantarum* et *L.mesenteroides* en présence de 0,3% et 1 % de sels biliaires.

<i>souches</i>	0,3%			1%		
	<i>Log t0</i>	<i>Log t3h</i>	<i>Taux de survie%</i>	<i>Log t0</i>	<i>Log t3h</i>	<i>Taux de survie%</i>
<i>LB1</i>	2	2	100	4	2	50
<i>LB2</i>	3,77	2	53,05	00	00	00
<i>LC1</i>	3,17	2	63,09	4,97	2,77	55,73
<i>LC2</i>	6,32	4,43	70,09	4	2	50
<i>C3</i>	5,41	3,70	68,39	00	00	00
<i>LC4</i>	3,64	2	54,94	3,17	1,37	43,21

Les résultats du dénombrement sont exprimés en log UFC/ml

III.1.3.3 Hydrolyses sels biliaires :

Le résultat de l'hydrolyse des sels biliaires par nos souches a montré que toutes nos souches sont incapables d'hydrolyser les sels biliaires, aucune altération dans la morphologie des colonies en comparant avec les cellulesensemencées sur les boites MRS control (Sans sel biliaires) n'a été constaté (**Figure 17**).

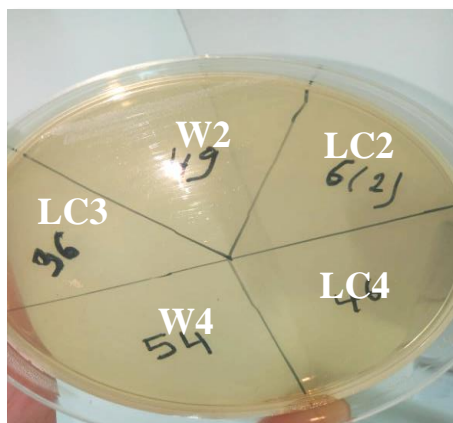


Figure 19 : Résultat négatif d'hydrolyse des sels biliaire

III.1.3.4 Activité hémolytique :

Pour s'assurer de l'absence du pouvoir pathogène d'un probiotique, son activité hémolytique doit être vérifiée (El-Jeni *et al.*, 2016)

Les résultats obtenus montrent qu'aucune des souches lactiques sélectionnées n'a été capable d'hydrolyser le sang humain sur le milieu gélose au sang contenant 5% de sang humain indiquant que toutes les souches sont des bactéries non-hémolytiques (Figure 18)



Figure 20 :l'aspect des colonies des souches lactiques sur milieu gélose au sang avec 0.5 %de sang humain

III.1.3.5 Antibiogramme :

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (Botes *et al.*, 2008). Il est nécessaire avant de lancer une culture probiotique de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne contiennent pas des gènes de résistance aux antibiotiques (Ammor et Mayo., 2007).

Les résultats de la résistance et la sensibilité des souches aux antibiotiques sont groupés dans le (tableau8). Les zones inhibitrices émergentes après 24 h d'incubation ont été mesurées.

L'activité a été évaluée comme étant sensible, S (≥ 21 mm) ; intermédiaire, I (16-20 mm) et résistant, R (≤ 15 mm), comme décrit précédemment par (Liasi *et al.*, 2009)

Les résultats ont révélé des zones d'inhibition presque similaires pour toutes les souches. Toutes les souches se sont révélées sensibles à trois antibiotiques testés, amoxicilline, érythromycine l'acide fusidique, à l'exception des souches LC1, LC3 et LC4 qui ont montré une résistance modérée contre A. Fusidique.

Cependant, une résistance modérée a été noté par toutes les souches contre la gentamycine.

Les résultats de l'antibiogramme sont représentés dans la (figure 19)

Tableau 8 : Résultats de test de sensibilité aux antibiotiques.

	Gentamycine	Amoxicilline	A. fusidique	Erythromycine
LB1	I	S	S	S
LB2	I	S	S	S
LC1	I	S	I	S
LC2	I	S	S	S
LC3	I	S	I	S
LC4	I	S	I	S

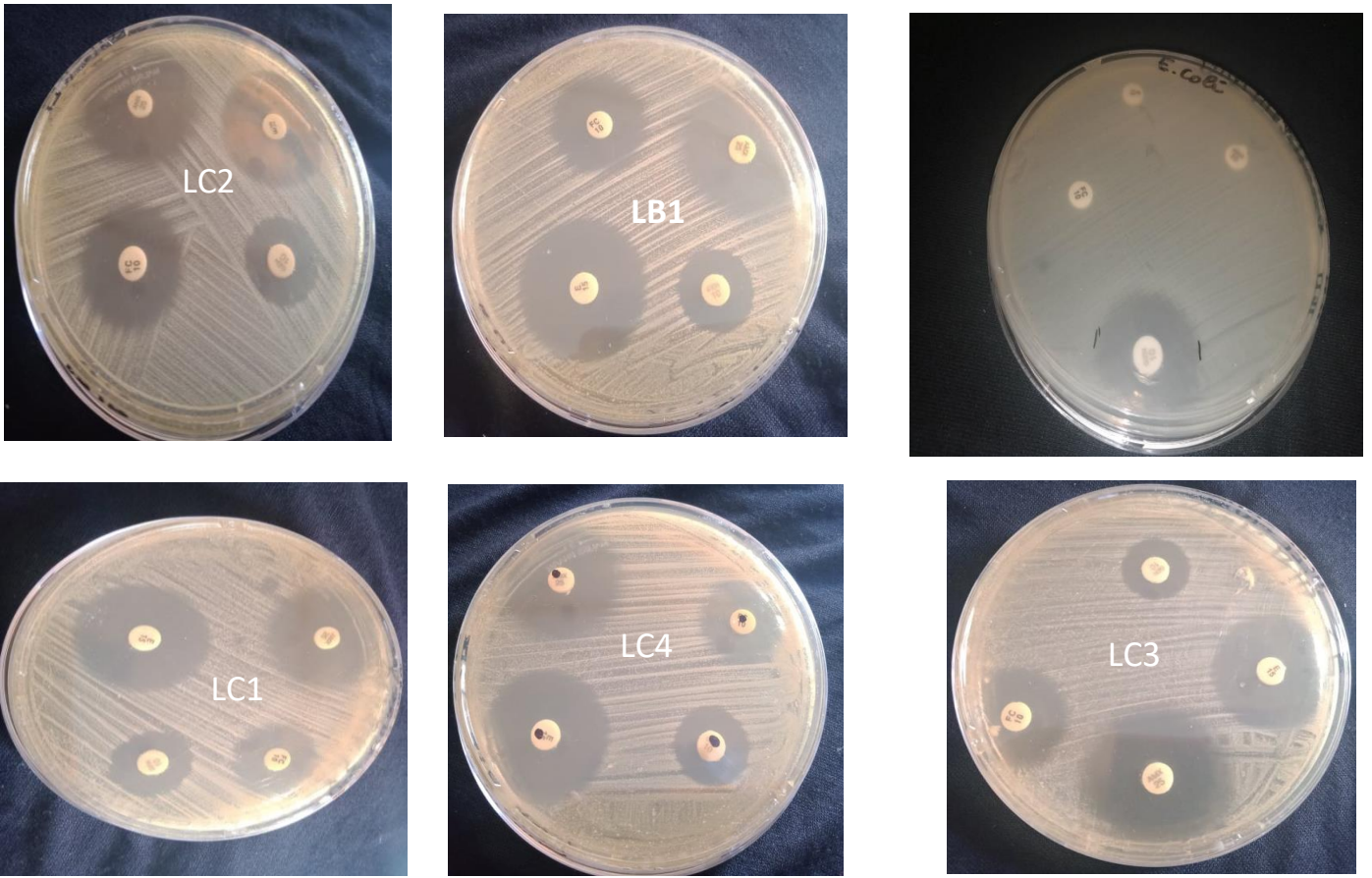


Figure 21 : *Résultat de la sensibilité aux antibiotiques*

Discussion

III.2 Discussion :

Notre étude consiste à étudier le pouvoir antimicrobien et évaluer le potentiel probiotique des souches sélectionnées à partir des échantillons de lait de vache, de chamelle et de beurres traditionnels.

Les bactéries lactiques sélectionnées sont des bactéries à Gram positif, généralement immobiles, sporulées, catalase négatives, oxydase négatives généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. (Hogg, 2005).

L'examen microscopique et physiologique ont prouvé que toutes les souches étaient Gram +, catalase négatif, l'observation au microscope a démontré que nos souches sont des coques ou des coccobacilles ce qui correspond aux mêmes résultats obtenus par (Benhoua, 2019) ce qui témoigne que ces souches n'ont pas été contaminées après conservation.

La deuxième étape de notre étude a permis de recenser des souches possédant une activité antimicrobienne. Le pouvoir antagonique des bactéries lactiques envers les bactéries à potentiel pathogène, notamment celles qui existent aux environnements laitiers, est un caractère très recherché autant qu'un caractère crucial dans la bio-conservation alimentaire. L'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes montre une activité antagonisme, qui se manifeste par l'apparition des halots d'inhibition (**Fleming *et al.*, 1975**). Toute souche présentant un diamètre d'inhibition supérieur à 6 mm est considéré comme positif vis-à-vis de la souche test (Dembelle *et al.*, 1998).

L'activité antimicrobienne directe est une propriété très importante dans la sélection des probiotiques, permettant ainsi la conservation des aliments et la prévention des infections gastro-intestinales (**Champomier-vergès *et al.*, 2020**). Les résultats des interactions bactériennes par la méthode directe entre les souches inhibitrices (**bactéries lactiques**) et les souches indicatrices (**bactéries pathogènes**) témoignent que toutes les souches lactiques possèdent la capacité d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes avec des diamètres qui varient en fonction de la bactérie indicatrice et en fonction de la bactérie lactique. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Bougeurra, (2020)** et **Mokdad, (2020)** qui ont constaté que les isolats lactiques étaient actifs contre toutes les bactéries indicatrices à Gram (+) et à Gram (-) et l'effet inhibiteur diffère d'une souche à une autre.

La mesure de spectre d'inhibition démontre que les souches sélectionnées ont presque la même performance en matière d'inhibition de la croissance des bactéries indicatrices

(spectre d'inhibition de 10-27 mm), ou elles ont révélé leur capacité à inhiber la croissance des cinq souches indicatrices.

Nos résultats ont démontré que le spectre d'inhibition vis-à-vis d'*E. coli* par les lactobacilles varie entre (20-27mm) et par les leuconostocs entre (19- 26 mm) et pour les weissella entre (16- 27 mm). Cependant la souche *S. aureus* a été inhibée fortement par les leuconostocs avec un diamètre qui varie entre (20 et 26 mm) suivi par les weissella avec des zones comprises entre (15 et 20 mm) et les lactobacilles entre (16 et 17 mm) ces résultats sont similaires à ceux constatés par **Mermouri, (2018)**.

En ce qui concerne l'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* par les weissella avec un diamètre (15 - 20 mm) suivi par les lactobacilles avec un diamètre entre (12 - 20mm) et les leuconostocs (10- 20mm.). Ces résultats concordent avec ceux de **Djedir et Nasri, (2018)** qui se sont intéressés à l'effet antagoniste des lactobacilles sur *Pseudomonas* sp.

Nos résultats ont montré que les lactobacilles ont une forte activité antibactérienne contre les *Listeria monocytogenes* avec un diamètre de 25 mm suivi par les leuconostocs (11- 25 mm) et les weissella entre (17- 21 mm) nos résultats sont compatibles avec ceux d'**Abidi, (2015)** qui ont rapporté des zones d'inhibition variant entre (10 et 25 mm).

Nos résultats d'inhibition d'*E. coli* et *P. aeruginosa* par *L. mesenteroide* sont compatibles avec ceux de **Mokdad (2020)** avec des zones d'inhibition (17 et 21mm) et (15 et 20 mm) respectivement.

La présence des zones d'inhibition en cas d'utilisation d'une culture lactique entière est due au métabolisme du lactose en acide lactique qui abaisse le pH et crée un environnement défavorable au développement des bactéries pathogènes (**Fleming et al., 1975 ; Barefoot et Klaenhammer, 1983**), au peroxyde d'hydrogène (**Barefoot et Klaenhammer, 1983**) ou aux bactériocines (**Klaenhammer, 1993; Benyoucef, 2018**)

Plusieurs études ont montré l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes suite à la libération des substances de nature protéique, (les bactériocines).

Il serait donc utile d'identifier la nature (bactériocine ou autre) et le nombre de molécules bioactives responsables de cette activité, afin d'étudier les possibilités de leur utilisation dans la bio-préservation des aliments. De ce fait lors de cette étude, nous avons entamé la recherche des bactériocines par la méthode de diffusion (puits).

En travaillant dans les conditions expérimentales permettant d'éliminer l'influence des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène, l'activité d'inhibition due aux molécules bioactives de surnageant des neuf souches appartenant à trois espèces *Lactobacillus plantarum* (LB1, LB2),

Leuconostoc mesenteroides (LC1, LC2, LC3, LC4) et *Weissella confusa* (W1, W2, W3) n'a révélé aucun spectre d'inhibition contre les cinq souches pathogènes testés. Les résultats obtenus témoignent que nos souches ne sont pas capables de produire des bactériocines.

La tolérance à l'acidité :

La tolérance à l'acide des bactéries est importante non seulement pour l'étape gastro-résistantes, mais aussi pour leur utilisation en tant que compléments alimentaires qui permet aux souches de survivre plus longtemps dans les aliments riche en acide (**Prasad et al., 1998 ; Benyoucef, 2018**). Bien que le pH stomacale fluctue entre (1.5 et 6) le pH 3 est souvent considéré comme optimal pour la sélection des probiotiques. (**Muller et al., 2009 ; Azate et al., 2016**). Pendant la transformation des aliments les bactéries probiotiques passent par l'estomac avant d'atteindre l'intestin grêle. Une perte de viabilité peut survenir à la suite d'une exposition à l'acide gastrique et à l'acidité protéolytique de la pepsine dans l'estomac (**Muller et al., 2009**).

L'étude de l'exposition prolongée de nos souches aux conditions acides similaires à celles de l'estomac a été réalisée par l'exposition à différents pH (2 et 3) pendant 3h.

Les résultats de la tolérance de l'acidité *in vitro* des 6 souches lactiques (2 *Lactobacilles* et 4 *Leuconstocs*) ont montré que le pH 2 était létal pour toutes les souches, certaines au moment de l'inoculation (LB2, LC1, LC2) et d'autres après 3h d'exposition (LB1, LC3, LC4). Ces résultats étaient en corrélation avec des données antérieures qui rapportaient l'absence de viabilité bactérienne à un pH2 (**Huang et Adams, 2004 ; Paramithiotis et al., 2006 ; Benyoucef, 2018 ; Bougeurra, 2020**)

Dans notre étude les six souches ont affiché une bonne tolérance et une résistance significative au pH 3 après 3h d'incubation avec un taux de survie variant entre (54.04% et 78.37%). Cependant, LB2 a montré une meilleure tolérance avec un taux de survie le plus élevé qui est 78.37 % suivi par LC3 avec un taux de survie 75.95 % et le faible taux de survie est marqué chez LB1 et LC (54.04%) qui est également un bon taux de survie.

Nos résultats se concordent avec ceux de **Bougeurra (2020)** et **Mokdad (2020)**.

Le pH 3 n'a pas un effet significatif sur la viabilité de la plupart des souches, par conséquent les souches lactiques testées sont considérées comme acidotolérantes. Cette résistance peut être associée à l'effet protecteur d'EPS (exopolysaccharides) produits par les cellules. (**Denkova et al., 2017 ; Bougeurra, 2020**).

La tolérance aux sels biliaires :

La résistance aux sels biliaires est l'un des critères importants pour la sélection des souches probiotiques, car l'intestin grêle et le côlon sont les premières niches de colonisation de l'organisme hôte par les souches probiotiques (Aynur Ahmadova *et al.*, 2013). L'exposition des cultures de nos souches à différentes concentrations de sel biliaire a modérément affecté la viabilité des souches. Les six souches ont très bien survécu en présence de 0,3 % d'oxgall. Ces résultats sont similaires à ceux constaté par **(Benyoucef, 2018)**

La souche de lactobacillus LB1 a montré la résistance la plus élevée en présence de 0,3 % d'oxgall avec une viabilité de 100. % Les deux souches de leuconostocs LC1 et LC4 pourraient bien survivre à différentes concentrations d'oxgall (0,3% et 1%) avec une certaine perte de viabilité. Cependant, une diminution significative de viabilité a été constatée (0%) pour les deux souches LB2 et LC3.

Dans notre étude, aucune activité d'hydrolyse de sels biliaires n'a été constatée pour aucune des souches testées. Notre résultat se concorde avec ceux rapportés par **Benyoucef *et al.*, (2017)** et **Hansal *et al.*,(2019)** où toutes les souches de *L.mesenteroides* n'ont pas pu hydrolyser les sels biliaires. Il convient de mentionner que la présence de l'activité de l'hydrolase des sels biliaires dans les bactéries lactiques pourrait être préjudiciable et indésirable et donc elle est controversée. Cette activité déconjugue les sels biliaires, qui sont ensuite facilement excrétés du tractus gastro-intestinal. Hypothétiquement, cela augmente la demande de cholestérol pour la synthèse de nouveau des sels biliaires, et conduit ainsi à une baisse des taux de cholestérol sérique dans le sang **(Franz *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2003 ; Mokdad *et al.*, 2020).**

L'étude du potentiel probiotique in vitro menée par Zarour *et al.* (2018) a montré que les souches de *L. mesenteroides* ne peuvent résister que partiellement (moins de 50%) sous les conditions de stress présentes dans le tractus gastro-intestinal (acidité, stress biliaire et passage duodénal de l'estomac). Ils ont expliqué cette diminution du taux de survie était due à des mécanismes de régulation de l'acide qui n'ont pas réussi à maintenir le pH intracellulaire ce qui réduirait l'activité enzymatique en endommageant certaines protéines et l'ADN.

Par conséquent, les souches probiotiques qui peuvent tolérer un pH bas ainsi le stress des sels biliaires comme le cas des souches de *L. mesenteroides* testées dans cette étude, signifient qu'ils ne peuvent pas seulement transiter par l'estomac et être actifs dans l'intestin, mais aussi sont capables d'être viables et de survivre dans des conditions de stress.

Activité hémolytique :

Pour s'assurer de l'absence du pouvoir pathogène d'un probiotique, son activité hémolytique doit être vérifiée (**El-Jeni et al., 2016**)

Les résultats obtenus montrent qu'aucune des souches lactiques sélectionnées n'a été capable d'hydrolyser le sang humain sur le milieu gélose au sang contenant 5% de sang humain indiquant que toutes les souches sont des bactéries non-hémolytiques. Nos résultats sont similaires avec celui de (**Bahri, 2014 ; Bouguerra, 2020 ; Mokdad et al., 2020 et Benmechernene et al., 2013**) qui ont également isolé des souches de *leuconostoc mesenteroides* à partir de lait de chamelle et de chèvre exemptes du caractère hémolytique.

Selon **Holzappel et al., (2009)** *leuconostoc mesenteroides* n'est pas une espèce hémolytique. En outre il a été mentionné qu'à l'exception de certaines souches de *E.faecalis* l'hémolyse est rarement rencontrée chez les bactéries lactiques d'origine alimentaire (**Margkoudakis et al., 2009 ; Bouguerra, 2020**).

Sensibilité aux antibiotiques :

Les probiotiques devraient être sûrs et, par conséquent, ne pas être pathogènes ou toxigènes ou administrer des gènes de résistance aux antibiotiques qui peuvent être transférés. Ces derniers sont connus pour avoir une longue durée d'utilisation sécurisée et peuvent être formulés dans de nombreux types de produits, y compris les aliments, les médicaments et les suppléments diététiques. En raison de leur consommation humaine, la sécurité de ces organismes est primordiale car leur résistance aux antibiotiques peut constituer l'une des menaces possibles (**Zarour et al., 2018**). Pour cela, dans cette étude, différents groupes d'antibiotiques ont été mis en test. Toutes les souches étaient sensibles à l'Erythromycine et l'amoxicilline. Tandis, qu'elles variaient entre sensible et intermédiaire envers l'acide fusidique.

Cependant, toutes les souches ont montré une résistance modérée à la gentamycine.

Nos résultats se rapprochent de ceux de **Mokdad et al., (2020)**. Il convient de noter que la résistance aux antibiotiques des bactéries de la culture de démarrage ne présente pas de risque direct pour les consommateurs car elles ne sont pas pathogènes. Cependant, ils peuvent agir comme des réservoirs environnementaux de déterminants de la résistance aux antibiotiques (**Zarzecka et al., 2020**).

Conclusion

Notre travail s'intéresse aux bactéries lactiques à potentiel probiotique isolées de différents produits laitiers du territoire.

Les neuf (09) souches de bactéries lactiques sélectionnées pour l'étude proviennent du travail de notre promotrice réalisé dans le cadre de sa thèse de doctorat Mme Benhouna 2019. Ces souches ont été isolées de différents produits laitiers, purifiées et identifiées par voie moléculaire PCR, Les résultats de l'identification des espèces par PCR ont révélé que les neuf souches sélectionnées appartiennent à *Leuconostoc mesenteroide*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus plantarum* avec pourcentage de similitudes de 99%, sur la base de la coloration de Gram et du catalase nous avons confirmé cette identification.

Ces dernières sont les plus étudiées parmi les bactéries Gram + en particulier à cause de leur importance dans l'industrie agro-alimentaire, en produisant des composés antibactériens leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes mais aussi d'être utilisée en tant que bio conservateurs.

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont montrées que les neufs souches ont le pouvoir d'inhibition de pathogènes précisément (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogène*, et *Klebsiella*) avec un meilleur spectre d'inhibition marqué contre *E. coli*, tandis que nos souches ne sont pas des producteurs de bactériocines.

L'étude de profil probiotique suggère que nos souches pourraient être exploitées comme probiotique en raison de leur viabilité et leur tolérance à divers barrières biologiques telle que les acides (pH 2 et 3) et les sels biliaires (0.5 % et 1 %), ces derniers ont confirmé leur capacité à survivre dans des conditions extrêmes du tubes digestif.

Le spectre sécuritaire de nos souches sélectionnées s'est avéré non hémolytique alors que l'étude de l'antibiorésistance de ces bactéries a montré une sensibilité totale contre l'Amoxicilline et l'Erythromycine tandis qu'elles variaient entre intermédiaire et sensible contre la gentamycine et l'acide fusidique.

Les résultats obtenus doivent être complétées par une séries d'autre testes à savoir :

- ✓ La résistance à la pepsine.
- ✓ L'étude de l'hydrophocité et auto agrégation.
- ✓ Etude des propriétés technologiques (la protéolyse, la lipolyse, le pouvoir acidifiant, aromatisant, texturant...).
- ✓ Evaluation in vivo de profil probiotique et effet antioxydant.

Références bibliographiques



- **Ababsa, A. (2012).** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait, thèse de magister, université Ferhat Abbas Sétif.
- **Abidi Zoulikha. (2015).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches des bactéries lactiques isolées d'un produit laitier traditionnel Lben. Thèse de master. Université Abou Bekr Belkaid Témcen
- **Ahirwar, S. S., Gupta, M., Gupta, G., & Singh, V. (2017).** Screening, isolation and identification of Lactobacillus species from dental caries of children. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(1), 497-503.
- **Ahmed-Gaid, K. (2018).** Valorisation de sous-produits d'abattoir en vue de leur utilisation comme substrats pour la formulation de milieux de culture pour certains lactobacilles, thèse de doctorat, université Badji Mokhtar Annaba
- **Ahmadova, Aynur, et al.** "Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain Enterococcus faecium AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese." *Food Control* 30.2 (2013): 631-641.
- **Alegría, Á., Szczesny, P., Mayo, B., Bardowski, J., & Kowalczyk, M. (2012).** Biodiversity in Oscypek, a traditional Polish cheese, determined by culture-dependent and-independent approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1890-1898.
- **Allouch F. N., Hellal A. et Laraba A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacillus thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Revue Nature et Technologie*, 30, 13-20.
- **Axelsson, L. (2004).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S., Wright, A. v. & Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects* (Vol. 139, pp. 1-66). UAS: Marcel Dekker, Inc

- **Azat, R., Liu, Y., Li, W., Kayir, A., Lin, D., Zhou, W., Zheng, X. (2016).** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 17(8), 597–609.

B

- **Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R. (2005).** Caracterisation phenotypique des bacteries lactiques isolees a partir de lait cru de chevre dedeux populations caprines locales" arabia et kabyle". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 23, 30-37
- **Badotti, F., Moreira, A. P. B., Tonon, L. A. C., de Lucena, B. T. L., Gomes, F. d. C. O., Kruger, R., Thompson, C. C., et al. (2014).** *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(6), 1259-1267.
- **Bahri, F., Lejeune, A., Dubois-Dauphin, R., Elmejdoub, T., Boulahrouf, A., & Thonart, P. (2014).** Characterization of *Lactobacillus* strains isolated from Algerian children faeces for their probiotic properties. *African Journal of Microbiology Research*, 8(3), 297-303.
- **Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018).** *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*, 2018, 18.
- **Belhamra Zineb.(2017).** Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des aditifs alimentaire.Thèse doctorat.Université Ferahet Abes Sétif.
- **Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012).** Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition Metabolism*, 61(2), 160-174.
- **Benhoua I. (2019).** Recherche et exploitation des exopolysaccharides produits par les bactéries lactiques et leur application. Thèse de doctorat. Université Ahmed Ben Bela Oran.

- **Benmechernene, Zineb, et al.** "Genomic and proteomic characterization of bacteriocin-producing *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from raw camel milk in two southwest Algerian arid zones." *BioMed Research International* 2014 (2014).
- **Benmechernene, Z., Chentouf, H. F., Yahia, B., Fatima, G., Quintela-Baluja, M., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2013).** Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. *BioMed Research International*, 2013.
- **Benyoucef Amel. (2018).** Etude de propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques produisant des substances antibactériennes. Thèse de doctorat.. Université Ahmed Ben Bela Oran.
- **Biavati, B., & Mattarelli, P. (2015).** *Bifidobacterium*. In: Whitman, W., Kämpfer, FRP, Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., Dedysh, S., Eds (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-57).
- **Björkroth, J., Dicks, L. M., & Endo, A. (2014).** The genus *Weissella*. In: Holzapfel, W. H. & Wood, B. J. B. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (pp. 417-428): John Wiley & Sons, Ltd.
- **Björkroth, J., & Holzapfel, W. (2006).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *The prokaryotes*, 4, 267-319.
- **Bottacini, F., Medini, D., Pavesi, A., Turrone, F., Foroni, E., Riley, D., Giubellini, V., et al. (2010).** Comparative genomics of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology*, 156(11), 3243-3254.
- **Bousmaha-Marroki, L., & Marroki, A. (2015).** Antibiotic susceptibility and heterogeneity in technological traits of lactobacilli isolated from Algerian goat's milk. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4708-4723.
- **Bouguerra Asma. (2020).** Evaluation de potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle. Thèse de doctorat. Université Ferahet Abes Sétif.
- **Boumediene, k. (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes, thèse de magister, université de Tlemcen.
- **Bourel, G., Henini, S., Krantar, K., Oraby, M., Diviès, C. & Garmyn, D. (2001)** Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. *Le Lait*, 81, 75-82.
- **Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. (2005).** Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCNCFM. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 8344–8351.

- **Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011).** Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467-483.
- **Brunser O, Gotteland M.2010.** Probiotics and Prebiotics in Human Health: An Overview. *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*, 73

C

- **Chandan, R. C., Gandhi, A., & Shah, N. P. (2017).** Chapter 1 - Yogurt: Historical Background, Health Benefits, and Global Trade. In: Shah, N. P. (Ed.), *Yogurt in Health and Disease Prevention* (pp. 3-29): Academic Press.
- **Cholakov, R., Tumbarski, Y., Yanakieva, V., Dobrev, I., Salim, Y., & Denkova, Z. (2019).** Antimicrobial activity of *Leuconostoc lactis* strain BT17, isolated from a spontaneously fermented cereal beverage (Boza). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2019, 47-49.
- **Collado M C, Gueimonde M, Salminen S. 2010.** Probiotics in adhesion of pathogens: mechanisms of action. *Bioactive Foods in Promoting Health*. 23: 353-370.
- **CROW, V., CURRY, B. & HAYES, M. (2001).** The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*, 11, 275-283.
- **Cutting SM. (2011).** *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*. 28(2): 214-220.

D

- **Dalli, S. S., Uprety, B. K., & Rakshit, S. K. (2017).** Industrial production of active probiotics for food enrichment. In: Roos, Y. & Livney, Y. (Eds.), *Engineering Foods for Bioactives Stability and Delivery* (pp. 85-118). New York: Springer
- **DE ANGELIS, M., CORSETTI, A., TOSTI, N., ROSSI, J., CORBO, M. & GOBBETTI, M. (2001).** Characterization of non-starter lactic acid bacteria

from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2011-2020.

- **Delcenserie, V., China, B., Gavini, F., Beerens, H., & Daube, G. (2002).** Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments: le genre *Bifidobacterium*. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 146, 279-294.
- **Dembélé, Tiécoura, Vlastimil Obdrálek, and Miroslav Votava.** "Inhibition of bacterial pathogens by lactobacilli." *Zentralblatt für Bakteriologie* 288.3 (1998): 395-401.
- **Denis, F., Poly, M. C., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R. (2011).** *Bactériologie médicale Techniques usuelles* Ed. Elsevier Masson, Paris 75p.
- **Denkova, R., Goranov, B., Teneva, D., Denkova, Z., Kostov, G. (2017).** Antimicrobial activity of probiotic microorganisms : mechanisms of interaction and methods of examination. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs* (A. Méndez Vilas, Ed.), p. 201-2012.
- **Djerdir et Naseri (2018).** Criblage de souche de bactéries lactiques douées d'activité antimicrobienne. Thèse de master. Université A. Amira. Béjaia.
- **De Vrese, Michael, et al.** "Probiotics—compensation for lactase insufficiency." *The American journal of clinical nutrition* 73.2 (2001): 421s-429s
- **Devriese, L., Baele, M., & Butaye, P. (2006).** The genus *Enterococcus*: taxonomy. *Prokaryotes*, 4, 163-174.
- **Diaz, M., Sayavedra, L., Atter, A., Mayer, M. J., Saha, S., Amoa-Awua, W., & Narbad, A. (2020).** *Lactobacillus garii* sp. nov., isolated from a fermented cassava product. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(5), 3012-3017.
- **Dib, W. (2015).** Caractéristiques et rôle probiotiques des bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre : Effet immuno-modulateur chez la souris Balb/thèse de doctorat. Université d'Oran.
- **Dicks, L. M., & Holzapfel, W. H. (2015).** *Oenococcus*. In: Trujillo, M. E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey, F. A. & Whitman, W. B. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-16): John Wiley & Sons, Inc.

- **Dortu, C., & Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 349–356.
- **Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., & Prévost, H. (2006).** The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(2), 564–582.
- **Duhan, J. S., et al.** "Bacteriocins from lactic acid bacteria." *Biotechnology: Prospects and Applications* (2013): 127-141

E

- **El-Jeni, R., El Boura, M., Calo-Mata, P., Böhme, K., Fernández-Nod, I., C., Barros-Velázquez, J. , Bouhaouala-Zahar, B. (2016).** In-vitro probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(1), 60-71.
- **Endo, A., & Dicks, L. M. (2011).** The genus *Oenococcus*. In: Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S. & von Wright, A. (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (pp. 405-415): Crc Press.

F

- **Favaro, L., Penna, A. L. B. & Todorov, S. D. (2015).** Bacteriocinogenic LAB from cheeses– application in biopreservation? *Trends in Food Science & Technology*, 41, 37-48.
- **Federighi M. (2005).** *Bactériologie Alimentaire*, Edition ECONMICA, 2eme édition, p 28.
- **Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007).** Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 44.
- **Fleming, H.P., etchells, J.L., et Costilow, R.N. (1975).** Microbiol Inhibition by an Isolate of *Pediococcus* from Brines. *Applied Microbiology*. vol.30, N°. 6. p.10401042.
- **Fong, F. L. Y., Shah, N. P., Kirjavainen, P., & El-Nezami, H. (2016).** Mechanism of action of probiotic bacteria on intestinal and systemic immunities and antigen-presenting cells. *International Reviews of Immunology*, 35(3), 179-188.

- **Franz, C. M. A. P., Specht, I., Haberer, P., & Holzapfel, W. H. (2001).** Bile salt hydrolase activity of enterococci isolated from food: screening and quantitative determination. *Journal of Food Protection*, 64(5), 725–729.
- **Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A.(2011).** Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International journal of food microbiology*. 151(2), 125-140.
- **Fuller, R .(1989).** Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66:365- 78.
- **Fung WY, Lye H S, Lim T J, Kuan C Y, Liong M T. (2011).** Roles of Probiotic on Gut Health. In *Probiotics*. Springer Berlin Heidelberg. 139-165
- **Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G.-S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., et al. (2015).** The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 6, 155.



- **García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019).** The Enterococcus: a model of adaptability to its environment. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), e00058-00018.
- **Gaucher, F., Bonnassie, S., Rabah, H., Marchand, P., Blanc, P., Jeantet, R., & Jan, G. (2019).** adaptation of beneficial Propionibacteria, lactobacilli, and Bifidobacteria improves tolerance toward technological and digestive stresses. *Frontiers in Microbiology*, 10, 841.
- **Gonzalez, C., Aispuro, E., Vargas, I., et Martinez, M. (2018).** Induction of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria, a Strategy to Improve the Safety of Fresh Fruits and Vegetables, *Agricultural Research and Technology: Open Access Journal*, 14(4), 1,5.
- **Gharib, S. A. (2020).** Antimicrobial activity and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Fermented Dairy Products. *Journal of Modern Research*, 2, 40- 48.
- **Gil-Sánchez, I., Bartolomé Suáldea, B., & Victoria Moreno-Arribas, M. (2019).** Chapter 6 - Malolactic FWade, M., Strickland, M. T., Osborne, J. P., & Edwards, C. G. (2019). Role of *Pediococcus* in winemaking. *Australian Journal of Grape and Wine*

Research, 25(1), 7-24 fermentation. In: Morata, A. (Ed.), Red Wine Technology (pp. 85-98): Academic Press.

- **Gueimonde, M., Jalonen, L., He, F., Hiramatsu, M., & Salminen, S. (2006).** Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Research International*, 39(4), 467-471.
- **Guldfeldt, L. U., Sørensen, K. I., Strøman, P., Behrndt, H., Williams, D. Johansen, E. (2001).** Effect of starter cultures with a genetically modified peptidolytic or lytic system on Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 373-382.



- **Hanchi, H., Mottawea, W., Khaled, S., & Hammami, R. (2018).** The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1791.
- **Hansal, N., Benmchernene, Z., & Kihal, M. (2019).** Potential probiotic evaluation on in vitro of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Algerian raw goat milk. *Il Ponte*, 75(9), 95–115. <https://doi.org/doi : 10.21506/j.ponte.2019.9.7>
- **Harzallah, D., & Belhadj, H. (2013).** Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. In: Marcelino, K. J. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (pp. 197- 216). Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia: InTech
- **Hayek, S. A., Gyawali, R., Aljaloud, S. O., Krastanov, A., & Ibrahim, S. A. (2019).** Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Journal of Dairy Research*, 86(4), 490-502.
- **Holzappel, W. H., Björkroth, J., Dicks, L. M. T. (2009).** Genus I. *Leuconostoc*. In : De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K-H., Whitman, W. B. (eds.). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* 2 ed., Vol. 3, Springer, pp. 624-634.
- **Holzappel, Wilhelm H., and Brian JB Wood.** "Introduction to the LAB." *Lactic Acid Bacteria : Biodiversity and Taxonomy* (2014) : 1-12.
- **Holzappel, W. H., Franz, C. M., Ludwig, W., & Dicks, L. M. (2015).** *Pediococcus*. In: Trujillo, M. E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey, F. A. &

Whitman, W. B. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-15): John Wiley & Sons, Inc.

- **Holzapel, W. H., Goktepe, I., Juneja, V., & Ahmedna, M. (2006).** Introduction to prebiotics and probiotics. *Probiotics In Food Safety Human Health*, 35(2), 109-116.
- **Holzapel W H, Wood B J. (2014).** Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. (Ed), John Wiley & Sons.
- **Huckle, B. D., & Zhang, Z. (2011).** Maintenance and protection of probiotics. In: Liong, M. (Ed.), *Probiotics, Biology, Genetics and Health Aspects* (pp. 87-108). Springer, Berlin, Heidelberg: Springer
- **Huang et Adams, M.C.(2004).** In vitro assessment of the upper gastero intestinal tolérance of potentail probiotic dairy propionibacteria. *International Jornal of Food Mocrobiology*, 91, 253-260.
- **Hummel, S., Veltman, K., Cichon, C., Sonnenborn, U., & Schmidt, M. A. (2012).** Differential targeting of the E-cadherin/ β -catenin complex by Gram-positive probiotic lactobacilli improves epithelial barrier function. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1140-1147.

J

- .
- **Issa, A. T., & Tahergorabi, R. (2019).** Milk Bacteria and Gastrointestinal Tract: Microbial Composition of Milk. In: Watson, R. & Preedy, V. (Eds.), *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases* (pp. 265-275): Academic Press, Elsevier
- **Izquierdo Alegre E. (2009).** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de doctorat. Institut pluridisciplinaire Hubert Curie, Strasbourg.

L

- **Jang, J., Kim, B., Lee, J., Kim, J., Jeong, G., & Han, H. (2002).** Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 212(1), 29-34.
- **Jasniewski, J. (2008).** Étude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe IIa. Institut National Polytechnique de Lorraine.

- **Jayashree, S., Pooja, S., Pushpanathan, M., Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2014).** Identification and characterization of bile salt hydrolase genes from the genome of *Lactobacillus fermentum* MTCC 8711. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(2), 855-866.
- **Jian, W., Zhu, L., & Dong, X. (2001).** New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1633-1638.



- **Kelesidis T, Pothoulakis C. (2012)** . Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic advances in gastroenterology*. 5(2): 111-125.
- **Khalighi, A., Behdani, R., Kouhestani, S., & Health. (2016).** Probiotics: A comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition. *Probiotics Prebiotics in Human Nutrition*, 10, 63646.
- **Kim, W. (2014).** The genus *Lactococcus*. In: Holzapfel, W. H. & Wood, B. J. B. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (pp. 429-444): John Wiley & Sons, Ltd.
- **Klaenhammer, Todd R., et al.** "Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health." *FEMS Microbiology Reviews* 29.3 (2005) : 393-409.
- **Kondrotiene, K., Kasnauskyste, N., Serniene, L., Golz, C., Alter, T., Kaskoniene, V., Maruska, A. et Malakauskas, M. (2018).** Characterization and application of newly isolated nisin producing *Lactococcus lactis* strains for control of *Listeria monocytogenes* growth in fresh cheese, *Food Science and Technology*, 87, 507-514.
- **Kosin, B., & Rakshit, S. K. (2006).** Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 371-379.
- **Kumar, A., & Kumar, D. (2014).** Isolation and characterization of bacteria from dairy samples of Solan in Himachal Pradesh for identification of *Lactobacillus* spp. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 25(2), 110-114.
- **Kumar, R., Grover, S., & Batish, V. K. (2011).** Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague–Dawley rats. *British Journal of Nutrition*, 105(4), 561-573.

- **Labioui,H., Elmoualdi,L., El Yachioui, M &Ouhssine, M.(2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux, 144,237-250
- **Lairini, S., Beqqali, N., Bouslamti, R., Belkhou, R., Zerrouq, F.(2014).** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnel Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir, Afrique SCIENCE, 10(4), 267-277.
- **Lahmer Rania et al. (2020).** Importance des critères d'hydrophobicité et autoagrégation des souches lactiques à propriétés probiotiques.Thèse master. Université Mohamed El Sadik Ben Yahia Jijel.
- **Lahtinen S J,& Endo A. (2012).** Health effects of nonviable probiotics.in: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 4th Ed, 671-688
- **Larpent S.P.(1997).**Microbiologie alimentaire. Technique de laboratoire. *Ed. tech et Doc*, Lavoisier,Paris
- **LAW, B. A.(2001) .** Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technology.*International Dairy Journal*, 11, 383-398.
- **Lee, Y. K., & Mazmanian, S. K. (2010).** Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*, 330(6012), 1768-1773.
- **Lee, Y. K., & Salminen, S. (2009).** Handbook of probiotics and prebiotics: John Wiley & Sons. Lefevre, M., Racedo, S. M., Denayrolles, M., Ripert, G., Desfougères, T., Lobach, A. R., Simon, R., et al. (2017). Safety assessment of Bacillus subtilis CU1 for use as a probiotic in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 83, 54-65.
- **Li, Y., Liu, T., Zhao, M., Zhong, H., Luo, W., & Feng, F. (2019).** In vitro and in vivo investigations of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese traditional sourdough. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(4), 1893-1903.
- **Luis Balcázar, J., Decamp, O., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., & Disease. (2006).** Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. *Microbial Ecology in Health Disease*, 18(2), 65-70.

- **Luquet, F. M., and G. Corrieu.** "Lactic acid and probiotic bacteria." *Lactic acid and probiotic bacteria.* (2005).



- **Malik, Deepak Kumar, et al.** "Lactic acid bacteria and bacteriocin: a review." *J. Pharm. Res* 5.5 (2012): 2510-2513.
- **Maragkoudakis, P. A., Mountzouris, K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D., Tsakalidou, E. (2009).** Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International journal of food microbiology*, 130(3), 219–226.
- **Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002).** Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 173-182.
- **Meade, E., Slattery, M. A., & Garvey, M. (2020).** Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance Is Futile? *Antibiotics*, 9(1), 32.
- **Mermouri Lamia. (2018).** Etude de l'effet de souches probiotiques de bactéries lactiques (*Lactobacillus spp*) isolées de produit fermentées sur la valeur nutritive de fourrages conservés par ensilage. thèse de doctorat. Université Mohamed Boudaife Oran.
- **MIR, S. A. & MASOODI, F. A.(2018) .** Use of organic acids for preservation and safety of traditional meat products. *Journal of Food Safety*, 38, e12514.
- **Mkrтчyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. (2010).** Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int,J, Antimicrobial Agents*, 35: 255-260.
- **Mofredj, A., Bahloul, H., & Chanut, C. (2007).** *Lactococcus lactis*: un pathogène opportuniste? *Médecine et Maladies Infectieuses*, 37(4), 200-207.
- **Mokdad, F. H., Benmechernene, Z., Benyoucef, A., Russo, N. (2020).** Characterization of bioactive *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin strains isolated from camel's and goat's Algerian raw milks. *Il Ponte*, 76(3/1), 32-61.

- **Mokdad Fayeza. (2020).** Influence des leuconostocs produisant des bactérocinés sur les caractéristiques industrielles des produits laitiers. Thèse de doctorat.. Université Ahmed Ben Bela Oran.
- **Motyl I, Klewicka E, Libudzisz, Z .(2009).** New strain of lactic acid bacteria *Lactobacillus casei*. *Polish Patent Application* 147-160
- **Muller, J. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2009).** Manufacture of probiotic bacteria. In: Charalampopoulos, D., Rastall, R. A. (eds.). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer, New York, NY. 725-760.
- **Mugula J K., Nnko S A M, Narvhus J A, Sørhaug T .(2003).** Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *International journal of food microbiology* **80**: 187-199.

N

- **Naseri et Djerdir (2018).** Criblage de souche de bactéries lactiques douées d'activité antimicrobienne. Thèse de master. Université A.Amira.Béjaia.
- **Nilsen, T., Nes, I. F., & Holo, H. (2003).** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5), 2975–2984.
- **Novel G .(1993).** Les bactéries lactiques. In Leveau JY et Bouix M (ed.), *Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel*. 170-3310.

O

- **Odamaki, T., Yonezawa, S., Kitahara, M., Sugahara, Y., Xiao, J. Z., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., et al. (2011).** Novel multiplex polymerase chain reaction primer set for identification of *Lactococcus* species. *Letters in Applied Microbiology*, 52(5), 491-496.
- **Oelschlaeger, T. A. (2010).** Mechanisms of probiotic actions—a review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57-62.
- **OMS .(2001).** Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). *Working Group Report*.

- **Otles S. (2013)** . Probiotics and prebiotics in food, nutrition and health.(ed). CRC Press.
- **Ouwehand AC. (1998)**. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, in: Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects Salminen S, von Wright A (eds).. New York, Dekker, 139–159.
- **Ouwehand, A C, Kirjavainen P V, Shortt C, Salminen S. (1999)**. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*. 9(1): 43-52.
- **O'sullivan L., Ross R.P. ET Hill C. (2002)**. Potential of bacteriocin-producing lactic acidbacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, **84**, 593-604.



- **Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., Angelis, M. De, Gobbetti, M., Kleerebezem, M., ... Kok, J. (2016)**. Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 (3), 837–890.
- **Parada, J.L, Caron, C.R., Medeiros, A B P., & Socolo, C R (2007)** . Bactériocins frome lactic and bacteria : Purification, properties, and use as biopresarevatives *Brazilian Archive of biologie and technology* , 50(3), 521-542.
- **Park, S.-N., Lim, Y. K., Shin, J. H., Chang, Y.-H., Shin, Y., Paek, J., Kim, H., et al. (2019)**. Streptococcus gwangjuense sp. nov., Isolated from Human Pericoronitis. *Current Microbiology*, 76(7), 799-803.
- **Patel, S., & Gupta, R. S. (2018)**. Robust demarcation of fourteen different species groups within the genus Streptococcus based on genome-based phylogenies and molecular signatures. *Infection, Genetics and Evolution*, 66, 130-151.
- **Patel, A. & Prajapat, J.(2013)**. Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, 1-8.
- **Pereira, D. I. A., McCartney, A. L., & Gibson, G. R. (2003)**. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing Lactobacillus fermentum strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4743–4752.
- **Pintado M M, Gomes A M, Freitasb A C. (2014)**. Probiotics and Their Therapeutic Role. In: Probiotic Bacteria: Fundamentals, Therapy, and Technological Aspects,e Silva J P S, Freitas A C. (Ed). CRC Press

- **Pot, B., Felis, G., De Bruyne, K., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., & Vandamme, P. (2014).** The genus *Lactobacillus*. In: Holzapfel, W. H. & Wood, B. J. B. (Eds.), *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy* (pp. 249–353): John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ.
- **Prado, F. C., Lindner, J. D. D., Inaba, J., Thomaz-Soccol, V., Brar, S. K., & Soccol, C. R. (2015).** Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 12, 489-497.



- **RANDAZZO, C., PITINO, I., DE LUCA, S., SCIFÒ, G. & CAGGIA, C. (2008).** Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 269-278.
- **Ranadheera, R. D. C. S., S. K. Baines, and M. C. Adams.** Importance of food in probiotic efficacy. *Food research international* 43.1 (2010): 1-7.
- **Rastall R A, Gibson G R, Gill H S, Guarner F, Klaenhammer T R, Pot B, Sanders M E .(2005).** Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS microbiology ecology* 52: 145-152.
- **Rayavarapu, B., & Tallapragada, P. (2019).** Evaluation of Potential Probiotic Characters of *Lactobacillus Fermentum*. *Scientific Study Research. Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 20(2), 183-197
- **REIS, J., PAULA, A., CASAROTTI, S. & PENNA, A. (2012).** Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4, 124-140
- **Richards, V., Palmer, S., Pavinski Bitar, P., Qin, X., Weinstock, G., Highlander, S., Town, C., et al. (2014).** Phylogenomics and the Dynamic Genome Evolution of the Genus *Streptococcus*. *Genome Biology and Evolution*, 6.
- **Rolfe RD.(1991).** Population dynamics of the intestinal tract; in Blankenship LC (ed) : *Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry*. San Diego, Academic Press, pp 59–75.

- **Rozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U.(2004).** Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Journal of bacteriology*. 186(16): 5432-5441.
- **Russell J B, Diez-Gonzalez F. (1997).** The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in microbial physiology*, 39: 205-234.
- **Rusch V. (2002).** Probiotics and definitions: a short overview. *Herborn Litterae*..

S

- **Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004).** Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
- **Salvatore S, Vandenplas Y. (2010).** Prebiotics and Probiotics in Therapy and Prevention of Gastrointestinal Diseases in Children. in: *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*, 181.
- **Schaafsma, G.** "State of the art concerning probiotic strains in milk products." *IDF Nutr Newsl* 5 (1996): 23-24
- **Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger T A, Stange E F, Fellermann K.(2007).** Induction of human β -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infection and immunity*. 75(5): 2399-2407
- **Schultz M. (2008).** Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 14(7): 1012-1018.
- **SETTANNI, L. & MOSCHETTI, G. (2010).** Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27, 691-697.
- **Servin AL. (2004).** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS microbiology reviews*. 28: 405–440.
- **Servin A L, Coconnier M H. (2003).** Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 17(5): 741-754.
- **Shah N P. (2007).** Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 17(11): 1262-1277.
- **Shanahan, F. (2011).** Molecular mechanisms of probiotic action: it's all in the strains! *Gut*, 60(8), 1026-1027.

- **Sherman, P. M., Ossa, J. C., & Johnson-Henry, K. (2009).** Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutrition in Clinical Practice*, 24(1), 10-14.
- **Smaoui, S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés, Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
- **Singh K, Kallali B, Kumar A, Thaker V. (2011).** Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1(2): 287-S290.
- **Singh, S., Goswami, P., Singh, R., & Heller, K. J. (2009).** Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 42(2), 448-457.
- **Singhal, N., Singh, N. S., Mohanty, S., Singh, P., & Viridi, J. S. (2019).**
- **Soccol, C., Prado, M., Garcia, L., Rodrigues, C., Medeiros, A., & Soccol, V. (2014).** Current developments in probiotics. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 7, 11-20.
- **Švec P C, Franz M AP.(2004).** The genus *Enterococcus*. In: *Lactic Acid Bacteria biodiversity and taxonomy*. 3 edition. P 175-211.
- **Švec, P., Franz, C. J. L. A. B., Biodiversity, Taxonomy, e. W. H., & Wood, B. (2014).** The genus *Enterococcus*. 175-211
- **Švec, P., & Franz, C. M. A. P. (2014).** The genus *Enterococcus*. In: Holzapfel, W. H. & Wood, B. J. (Eds.), *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy* (pp. 175-211): John Wiley & Sons



- **Tailliez, P. (2004).** Les lactobacilles: propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques*, 6(1), 35-41.
- **Teuber, M. (2015).** *Lactococcus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-21. **Teuber, M., & Geis, A. (2006).** The genus *Lactococcus*. *The prokaryotes*, 4, 205-228.
- **THOMAS, L. V. & DELVES-BROUGHTON, J. (2005).** 7 Nisin. *Antimicrobials in Food*, 237.

- **Toit, M. d., Huch, M., Cho, G. S., & Franz, C. M. A. P. (2014).** The genus Streptococcus. In: Holzapfel, W. H. & Wood, B. J. B. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (pp. 457-505): John Wiley & Sons, Ltd
- **Tosukhowong, A., Nakayama, J., Mizunoe, Y., Sugimoto, S., Fukuda, D., & Sonomoto, K. (2005).** Reconstitution and function of Tetragenococcus halophila chaperonin 60 tetradecamer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(1), 30-37.
- **TUMBARSKI, Y., LANTE, A. & KRASTANOV, A. (2018).** Immobilization of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria and Possibilities for Application in Food Biopreservation. *The Open Biotechnology Journal*, 12, 25-32.
- **Turroni, F., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2011).** Genomics and ecological overview of the genus Bifidobacterium. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 37-44.

T

- **Vermeiren L, Devlieghere F, Debevere J. (2004).** Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International journal of food microbiology* 96 :149-164.

W

- **Wan, X. (2017).** Leuconostoc bacteriocins and their application in genome editing, Academic Dissertation in Microbiology, 1-53.

Y

- **Yan yan, H., Mintez, L. (2014).** Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen Staphylococcus aureus, *Dermatologica Sinica*, 32, 141-147.
- **Yehia, H. M., Ghanem, S., Elobeid, T., Mosilhey, S. H., & Savvaidis, I. N. (2017).** In vitro characterization of a vancomycin-resistant strain of Leuconostoc lactis isolated from chicken carcasses and its activity against some foodborne pathogens. *African Journal of Food Science*, 11(10), 337-345.

- **Yeo, S., Shin, H. S., Lee, H. W., Hong, D., Park, H., Holzapfel, W., Kim, E. B., et al. (2018).** Determination of optimized growth medium and cryoprotective additives to enhance the growth and survival of *Lactobacillus salivarius*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 718-731.
- **Yu, J., Song, Y., Ren, Y., Qing, Y., Liu, W., & Sun, Z. (2017).** Genome-level comparisons provide insight into the phylogeny and metabolic diversity of species within the genus *Lactococcus*. *BMC Microbiology*, 17(1), 1-10.

Z

- **Zarour, K., Benmechernene, Z., Hadadji, M., Moussa-Boudjema, B., Henni, J. E., & Kihal, M. (2013).** Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nature & Technology*(8), 39A
- **Zarzecka, Urszula, Anna Zadernowska, and Wioleta Chajęcka-Wierzchowska.** "Starter cultures as a reservoir of antibiotic resistant microorganisms." *LWT* 127 (2020) : 109424.
- **Zhang, H., Chen, X., Dan, T., & Dong, J. (2014).** Traditional Chinese fermented dairy foods *Lactic Acid Bacteria* (pp. 493-535): Springer.
- **Zheng, H., Gao, M., Ren, Y., Lou, R., Xie, H., Yu, W., Liu, X., et al. (2017).** An improved pHresponsive carrier based on EDTA-Ca-alginate for oral delivery of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *Carbohydrate Polymers*, 155, 329-335.

Annexes

Annexe 01 : La composition des solutions utilisées.

- **Tableau 01** : La composition de solution de NAOH 1N.

Composants	Quantité
Eau distillé	100ml
NAOH	40g

- **Tableau 02** : La composition de solution HCL 1N.

Composants	Quantité
Eau distillé	100ml
HCL	4ml

- **Tableau 03** : La composition d'eau physiologie 9/ml.

Composants	Quantité
Eau distillée	1000ml
Peptone	1g
NaCl	9g

- **Tableau 04** : La composition d'eau physiologique peptone.

Composants	Quantité
Na₂HPO₄	1.44 g
KH₂PO₄	0.24g
NaCl	8 g
KCl	0.2g
Eau distillée	1000 ml
pH	6.8
Autoclavage 120°C pendant 20 min	

- **Tableau 05** : La composition de Tampon phosphate PBS.

Composants	Quantité
Eau distillé	1000ml
NaCL	9g

Annexe 02 : Les réactifs et colorant utilisée

➤ **Tableau 06** : La composition de Violet de gentiane ou cristal.

Composants	Quantité
Violet de gentiane	10g ou (5g)
Phénol	5g
Ethanol à 0.95	20 cm ³
Eau distillé	1 dm ³

➤ **Tableau 07** : La composition de Lugol.

Composants	Quantité
Iode	5
Iodure de potassium	10
Eau distillé	1 dm ³

➤ **Tableau 08** : La composition de Fuchsine de Ziehl.

Composants	Quantité
Fuchsine basique	10g
Phénol	50g
Ethanol	0.5 cm ³
Eau distillée	1 dm ³

Annexe 03 : la composition des milieux de culture

- **Tableau 10** : La composition de bouillon nutritif

Composants	Quantité
Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1000 ml
pH finale	7.2
Autoclave 120°C pendant 20 min	

- La composition de **la gélose nutritive** bouillon nutritif plus 15g d'agar.
- **Tableau 11** : La composition de bouillon MRS.

Composants	Quantité
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 20	1 ml
Phosphate bi potassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.05g
Eau distillée	1000ml
pH finale	6.5+/- 0.1

Autoclave 120°C pendant 20 min

- La composition de **la gélose MRS** bouillon MRS plus 15g d'agar

➤ **Tableau 12** : La composition de milieu Mueller Hinton.

Composants	Quantité
Extrait de viande	2g
Hydrolysate acide de caséine	17.5g
Amidon	1.5
Agar	10
pH finale	7.4

Annexes 03 : Matériels non biologique



Balance



Agitateur



Plaque chauffante



Etuve



Bain marie



Autoclave



Ph mètre



vortex



Centrifugeuse



Spectrophotomètre



Bec bunsen



Microscope



Membrane millipores 0,22 μ m