



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie

Département des Sciences Alimentaires

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRE

Spécialité : Production et transformation laitière

Par

BENCHENNI Aicha

Thème :

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE LACTOBACILLUS AUTOCHTONES ET EVALUATION DE LEUR POTENTIEL TECHNOLOGIQUE ET PROBIOTIQUE

Soutenu le 04./10/2023 devant le jury composé de :

President	TAHLAITI H	MCA	Université de Mostaganem
Promotrice	HOMRANI. M	MCB	Université de Mostaganem
Examinateur	DAHOU A.E.A	MCA	Université de Mostaganem

Thème réalisée au Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

Avant tout je remercie ALLAH le tout puissant, de m'avoir donné la force, le

Courage, la volonté et la patience pour mener à bien ce travail.

En second lieu, mes plus vifs remerciements vont à

Ma directrice de mémoire, Dr HOMRANI Mounia pour son encadrement,

Son aide et ses orientations tout le long de la réalisation de ce mémoire, Ainsi que pour ses conseils judicieux, qui ont contribué à alimenter ma réflexion et surtout le temps qu'elle m'a consacrée.

Je tiens également à remercier profondément Madame TAHLAITI Hafida, Maître de conférence A à l'université de Mostaganem, pour avoir accepté de présider le jury de soutenance.

J'exprime aussi ma gratitude à Monsieur DAHOU Abdelkader, Maître de conférence A à l'Université de Mostaganem et directeur du laboratoire « LSTPA » pour avoir accepté d'examiner ce travail

Un remerciement très particulier à notre ingénieur de laboratoire

BENHARRATE Noureddine pour son Soutien et son infinie gentillesse.

Enfin, à tous ceux qui m'ont donné la force pour réaliser ce travail, je présente

Mes remerciements, mon respect et ma gratitude.



Dédicace

*Je dédie ce travail de fin d'étude,
A mes très chers parents qui m'ont toujours
Soutenu pendant mes études.*

A mon mari

A mes frères

A ma sœur

A toute ma famille

A tous mes amis

A tous ceux qui ont toujours cru en moi

Et qui m'ont soutenue

Résumé

L'objectif de la présente étude est l'évaluation des caractères biochimiques et physiologiques ainsi que les aptitudes technologiques et probiotiques et de certains isolats de *Lactobacillus* autochtones.

Dans un premier temps nous avons confirmé l'appartenance de ses bactéries au genre *Lactobacillus* par l'observation de l'aspect macroscopique, le test de catalase et la coloration de Gram. Par la suite, nous avons étudié leurs caractéristiques biochimiques et physiologique puis leurs aptitudes technologiques (pouvoir acidifiant, pouvoir protéolytique et lipolytique, production d'arômes et d'EPS) et enfin afin d'évaluer leur potentiel probiotique nous avons testé le pouvoir antibactérien de certaines de ces isolats vis-à-vis d'une souches pathogènes «*S. Aureus*» isolée à partir de prélèvement urinaire provenant d'un malade atteint d'infection urinaire. Les résultats ont révélé que la majorité des isolats sont homofermentaires, capable de croître dans des conditions hostiles. Les lactobacilles présentent par ailleurs une bonne acidification, un pouvoir protéolytique et lipolytique. Ils produisent des arômes ainsi que des EPS et montrent un fort pouvoir antibactérien.

En conclusion, on peut dire que les isolats de *Lactobacillus* testés révèlent de bonnes propriétés technologiques et pourraient donc être exploités dans l'industrie agroalimentaire. De plus, leur utilisation dans un traitement probiotique et plus particulièrement dans les traitements d'infection urinaire peut représenter une alternative à l'utilisation des antibiotiques.

Mots clés : Activité antibactérienne, Bactéries lactiques, *Lactobacillus*, effets probiotiques, aptitudes technologiques

Abstract

The aim of the present study is to evaluate the biochemical and physiological characters, technological aptitudes and probiotic potential of some isolates of autochthonous *Lactobacillus*.

First, we confirmed that these bacteria belong to the *Lactobacillus* genus, by observing their macroscopic appearance, using the catalase test and Gram staining. We then evaluated their biochemical and physiological characters as well as their technological aptitudes. Finally, in order to evaluate their probiotic potential, we tested the antibacterial power of some of these isolates against a pathogenic "*S. Aureus*" strains isolated from a urine sample taken from a patient suffering from a urinary tract infection. The results revealed that the majority of isolates are homofermentative, capable of growing in hostile conditions. Lactobacilli also exhibit good acidification, proteolytic and lipolytic power. They produce aromas as well as EPS and show strong antibacterial power.

In conclusion, it can be said that the *Lactobacillus* isolates tested show good technological properties and could therefore be exploited in the agri-food industry, particularly the dairy industry. What's more, their use in probiotic therapy, and more specifically in the treatment of urinary tract infections, could represent an alternative to the use of antibiotics.

Keywords : Antibacterial activity, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, Probiotic effects, Technological properties

المخلص

الهدف من عملنا هو تقييم الكائنات الحية المجهرية والقدرات التكنولوجية لبعض السلالات (*Lactobacillus*).

أولاً، تأكدنا من انتماء بكترياها إلى جنس *Lactobacillus* من خلال ملاحظة المظهر العياني واختبار الكاتلاز وصيغة جرام. بعد ذلك، قمنا باختبار قدراتها التكنولوجية وهي: التحمض، والتركيب، والنكهة، والتحلل البروتيني، وقوة التحلل الدهني وإنتاج EPS، وأخيراً من أجل تقييم إمكاناتها الحيوية، قمنا باختبار القوة المضادة للبكتيريا لبعض هذه العزلات ضد سلالة ممرضة "S". . "المكورات العنقودية الذهبية" المعزولة من عينات بول لمريض يعاني من التهاب المسالك البولية. أظهرت النتائج أن العزلات المدروسة أظهرت حموضة جيدة. جميع العزلات التي تم اختبارها تنتج الروائح و EPS، وتظهر قوة التحلل البروتيني ونشاط التحلل الدهني. وأظهرت العصيات اللبنية التي تم اختبارها أيضاً قوة مضادة للجراثيم.

وفي الختام يمكن القول أن عزلات بكتيريا *Lactobacillus* التي تم اختبارها أظهرت خصائص تكنولوجية جيدة وبالتالي يمكن استغلالها في الصناعات الغذائية الزراعية وخاصة صناعة الألبان. علاوة على ذلك، فإن استخدامها في العلاج بالبروبيوتيك، وبشكل أكثر تحديداً في علاج التهابات المسالك البولية، يمكن أن يمثل بديلاً لاستخدام المضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للبكتيريا، بكتيريا حمض اللاكتيك، العصيات اللبنية، تأثيرات البروبيوتيك، القدرات التكنولوجية

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumés	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1

Partie I: Synthèse bibliographique

I.1. introduction des bactéries lactiques.....	2
I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques.....	2
I.3. Taxonomie des bactéries lactiques.....	2
I.4. Métabolisme azoté des bactéries lactiques :.....	3
I.5. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	5
I.5.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	5
I.5.1.1. Caractéristiques culturelles et besoins nutritionnels.....	5
I.5.1.2. Habitat des lactobacilles	6
I.5.1.3. Taxonomie et classification des lactobacilles	6
I.5.1.4. Identification.....	7
I.5.1.5. Adhésion des Lactobacilles.....	8
I.5.3. Le genre <i>Streptococcus</i>	8
I.5.4. Le genre <i>Enterococcus</i>	8
I.5.5. Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	8
I.5.6. Les genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	9
I.5.7. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	9
I.5. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques.....	9
I.5.1. La voie homofermentaire ou EMP	10
I.5.2. La voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate	10
II.1. Effets probiotiques des bactéries lactiques.....	12
II.1.1. Historique de la définition des probiotiques.....	12
II.1.2. Principales espèces de bactéries lactiques à potentiel probiotique.....	12

II.1.3. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques :.....	12
II.1.3.1. La résistance à l'acidité gastrique.....	13
II.1.3.2. La résistance aux sels biliaires.....	13
II.1.3.4. La production de substances antimicrobiennes.....	13
II.1.3.6. Critères technologiques.....	14
II.1.4. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé.....	14
II.1.5. Mécanisme d'action des probiotiques.....	15
II.1.6. Applications des probiotiques	15
II.2. Aptitudes technologiques	16
II.2.1. Aptitude acidifiante.....	16
II.2.2. Aptitude protéolytique.....	16
II.2.3. Aptitude lipolytique	16
II.2.4. Aptitude aromatisante	17
II.2.5. Aptitude texturante.....	17
II.2.6. Activité antimicrobienne	17
II.3. Applications industrielles des bactéries lactiques	18

Partie II : Partie Expérimentale

<i>Chapitre III : Matériels et méthodes</i>	20
1. Lieu du travail.....	20
2. Objectifs de l'étude	20
3. Appareillage.....	20
4. Produits chimiques et réactifs.....	20
5. Matériel Biologique.....	20
5.1. Les isolats de <i>Lactobacillus</i>	20
5.2. Les souches indicatrices	21
5.3. Les Milieux de culture	21
6. Méthodes.....	21
6.1. Revivification et purification des lactobacilles	21
6.2. Etude de caractères morphologiques.....	21
6.2.1. Caractéristique macroscopique	21
6.2.2. Caractérisation microscopique	21
6.3. Caractères biochimiques et physiologiques	22
6.3.1 Test de production de catalase	22
6.3.2. Croissances dans les conditions hostiles	22

6.3.2.1. Test de croissance à différentes températures.....	22
6.3.2.2. Test de croissance à différents pH.....	22
6.3.2.3. Test de croissance en milieu hypersalé.....	22
6.3.3. Test de la thermo-résistance.....	22
6.3.4. Le type fermentaire.....	22
6.4. Etude des aptitudes technologiques des <i>Lactobacillus</i>	23
6.4.1. Pouvoir acidifiant	23
6.4.2. Pouvoir protéolytique	23
6.4.3. Activité lipolytique	23
6.4.4. Pouvoir texturant (Production d'exopolysaccharides ou EPS) :	24
6.4.5. Pouvoir aromatisant (Production d'acétoïne) :	24
6.6. Etude du pouvoir antibactérien.....	24
<i>Chapitre IV : Résultats et discussions</i>	25
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annexe.....	

Liste des figures

Figure 01	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997)
Figure 02	Schéma du système protéolytique de <i>Lactococcus lactis</i> (Atlan et al., 2008).
Figure 03	Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008).
Figure 04	Aspect macroscopique des cultures bactériennes de <i>Lactobacillus</i> sur le milieu MRS après 48 heures d'incubation à 30°C.
Figure 05	Aspect macroscopique des colonies d'un isolat de <i>Lactobacillus</i> « LB1 » purifié sur milieu MRS après 48 heures d'incubation à 30°C.
Figure 06	Observation microscopique de <i>Lactobacillus</i> après coloration de Gram (x1000).
Figure 07	Résultats obtenus pour les tests de croissance des lactobacilles à différentes température après 48 heures d'incubation.
Figure 08	Résultats obtenus pour les tests de croissance des isolats de lactobacilles à différents pH.
Figure 09	Résultat du test de Thermo-résistance.
Figure 10	Résultats obtenus pour le type fermentaires de certains isolats de lactobacilles sur bouillon MRS sans citrate après incubation à 30°C pendant 48 h.
Figure 11	Variation du pH en fonction du temps des isolats de lactobacilles
Figure 12	Cinétique d'acidification des isolats de lactobacilles.
Figure 13	Observation des résultats obtenus de l'activité protéolytique chez certains lactobacilles.
Figure 14	Observation des résultats obtenus de l'activité lipolytique chez certains lactobacilles.
Figure 15	Aspect des colonies d'une culture de lactobacille « LB 16 » sur milieu hypersaccharosé
Figure 16	Effets des lactobacilles sur la croissance de <i>S. aureus</i> par la méthode des spots

Liste des tableaux

Tableau 01	Répartition du genre <i>Lactobacillus</i> (Axelsson, 2004).
Tableau 02	Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Patterson, 2008).
Tableau 03	Résultats de l'activité antibactérienne des lactobacilles vis-à-vis des de <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode des spots .
Tableau 04	Récapitulative des résultants des conditions hostiles

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de micro-organismes qui produisent de l'acide lactique comme métabolite principal. Ils habitent de nombreux aliments, dont les produits laitiers, et font partie de la flore intestinale et vaginale des humains ou des animaux (**Stiles *et al.*, 1997 ; Klaenhammer *et al.*, 2005**). Ils comprennent plusieurs genres de bactéries, dont *Lactobacillus*. Ce dernier est le plus grand groupe de bactéries lactiques, comprenant au moins 145 espèces reconnues, présentant une extrême diversité phylogénétique, phénotypique et écologique (**Corrieu et Luquet, 2008 ; Barinov *et al.*, 2011**).

Ces dernières années, face à l'émergence des souches pathogènes multirésistantes aux antibiotiques, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation des bactéries lactiques et plus particulièrement les lactobacilles dans un traitement «probiotiques» comme alternative aux méthodes conventionnelles. En effet, plusieurs études ont démontré la capacité de certaines espèces de *Lactobacillus* à inhiber la croissance des bactéries pathogènes, telles que la *Salmonella* et le *Staphylococcus aureus* grâce à leur capacité de produire de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le d'acétyle et les bactériocines et les acides gras (**Huttunen *et al.*, 1995**). Par ailleurs, les lactobacilles sont largement utilisées dans l'industrie laitière comme ferments acidifiants et comme producteur d'arôme. De plus, ces bactéries sont également utilisés en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés en raison de leur capacité à développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter leur durée de conservation (**Abee, 1995**).

La présente étude a pour objectifs d'évaluer les caractères biochimiques et physiologiques ainsi que les aptitudes technologiques et probiotiques de certains isolats de *Lactobacillus* autochtones.

Partie I :

Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Généralités sur les bactéries

lactiques

I.1. Description des bactéries lactiques

Décrite pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène mal défini d'un point de vue taxonomique. Ils rassemblent un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production à un métabolisme entièrement fermentatif, produisant de grandes quantités d'acide lactique à partir de sucres. On considère la fermentation homolactique si l'acide lactique est effectivement le seul produit formé, ou hétérolactique si d'autres composés sont également présents (acide acétique, éthanol, CO₂, etc.) (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet *et al.*, 2005). Elles sont Gram-positifs, généralement immobiles, sans asporulées, catalase-négatifs, oxydase-négatifs, généralement nitrate-réductase-négatifs, et ce sont des anaérobies facultatifs. Ils ont des besoins nutritionnels complexes en acides aminés, peptides, vitamines, sels, acides gras et glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Hogg, 2005).

I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001).

I.3. Taxonomie des bactéries lactiques

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. La recombinaison effectuée permet de combiner des espèces en une seule, ou d'identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

La classification des bactéries lactiques peut être effectuée à l'aide de méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique /biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes, selon des critères phylogénétiques. Certains traits phénotypiques sont utilisés pour identifier les espèces au sein du genre, tels que la capacité de fermenter les glucides, de tolérer des concentrations variables de bile, de produire des polysaccharides extracellulaires, de nécessiter des facteurs de croissance, de produire de l'acétoïne et de synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, La composition en lactate déshydrogénase, la composition en acide gras et la mobilité électrophorétique sont d'autres critères

qui acides gras et la mobilité électrophorétique sont d'autres critères qui peuvent être étudiés pour identifier les espèces de lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho *et al.*, 2007). La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classer les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être arbitrairement divisées en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et cocci (Tous les autres genres). Le genre *Weissella* récemment décrit est le seul genre avec à la fois des bacilles et des cocci. Ce groupe de bactéries lactiques appartient à plusieurs genres, comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (Stiles et Holzopfel, 1997 ; Pot, 2008). Des nouveaux genres tels que *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera* ont également été décrits, dont des souches présentant des liens physiologiques et phylogénétiques avec le groupe de bactéries lactiques (Broadbent, 2001 ; Axelsson, 2004). Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme caractéristique d'un genre de bactéries lactiques, bien qu'il ait un pourcentage G + C de 55%, ce qui est beaucoup plus élevé que les autres genres, et une voie métabolique spécifique de fermentation du sucre. Des études phylogénétiques basées sur l'analyse de la séquence d'ARN ribosomique ont confirmé que ces genres distincts appartiennent au même groupe, qui comprend également *Clostridium*, *Bacillus* et *Propionibacterium* (figure 01) (Stiles et Holzopfel, 1997 ; Pilet *et al.*, 2005).

I.4. Métabolisme azoté des bactéries lactiques :

En raison de leur forte auxotrophie en acides aminés, la croissance des bactéries lactiques dépend de leur système protéolytique. Ces systèmes comprennent des protéases intracellulaires, des systèmes de transport spécifiques de peptides et diverses peptidases intracellulaires. En termes de composition et de mode d'action (Law et Haandrikman, 1997 ; Savijoki *et al.*, 2006). Les systèmes protéiques de *Lactococcus* et *Lactobacillus* sont très similaires. L'étude des systèmes protéolytiques a principalement été réalisée sur *Lactococcus spp.*, permettant de modéliser la protéolyse en trois étapes (Figure 02). La première étape implique une protéase ancrée à la surface bactérienne, appelée protéase de paroi (ou PrtP). Les peptides sont portés à travers l'enveloppe bactérienne par deux systèmes de transport oligopeptidiques (Opp et Opt). Les dipeptides et les tripeptides peuvent également être transportés par deux autres systèmes (DtpT et Opt). Les acides aminés sont transportés par des systèmes de transport spécifiques. Enfin, dans le cytoplasme bactérien, une série de peptidases aide à l'hydrolyse complète

des peptides en acides aminés (Savijoki *et al.*, 2006 ; Atlan *et al.*, 2008 ; Picon *et al.*, 2010). Le catabolisme des acides aminés est la principale voie de formation des molécules aromatiques, car il peut servir de source d'énergie pour certaines bactéries lactiques dans des conditions limitées en nutriments (Williams *et al.*, 2001).

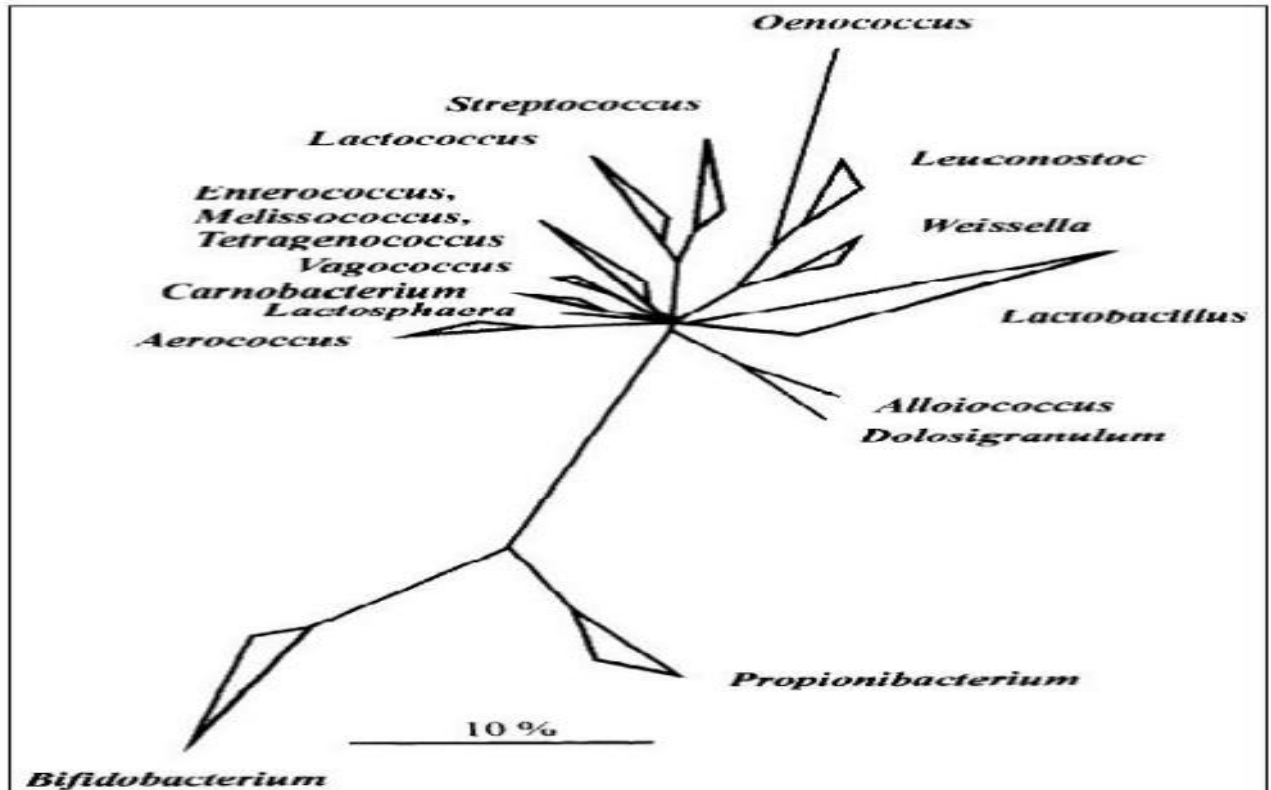


Figure 01 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzappel, 1997).

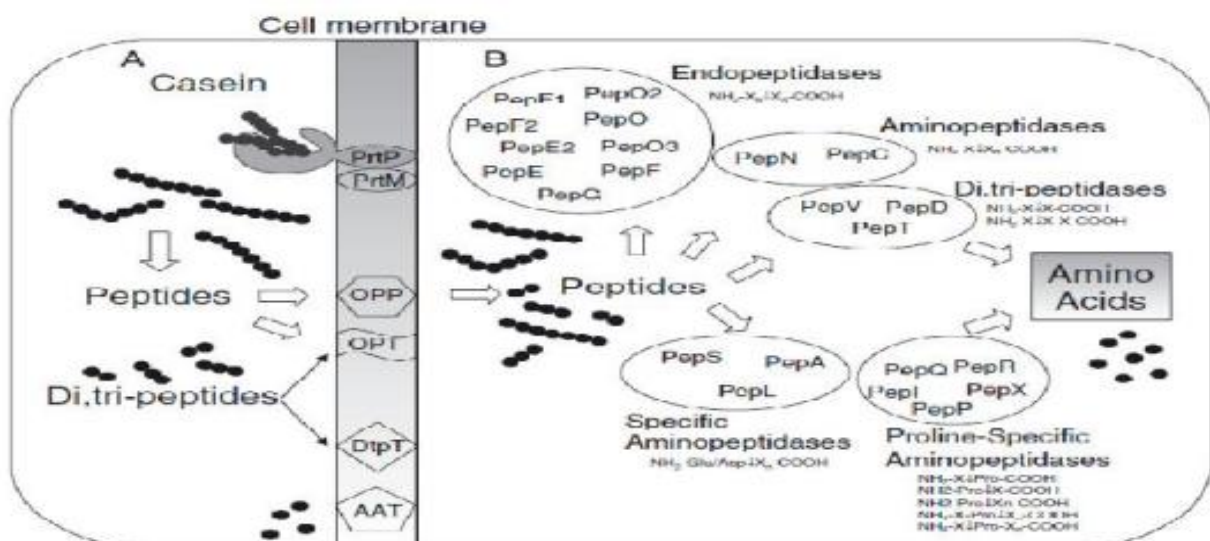


Figure 02 : Schéma du système protéolytique de *Lactococcus lactis* (Atlan *et al.*, 2008).

I.5. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

I.5.1. Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, qui comprend de nombreuses espèces, impliquées dans les levains lactiques dans de nombreuses industries ou rencontrées comme polluants.

L'assemblage des espèces de *Lactobacillus*, comprenant actuellement au moins 145 espèces reconnues, présente une extrême diversité phylogénétique, phénotypique et écologique (Corrieu et Luquet, 2008 ; Barinov *et al.*, 2011). Ce sont des bactéries Gram positif, de forme allant de bacilles longs et minces aux coccoïdes qui sont des bâtonnets courts ou légèrement incurvés, généralement agrégés en chaînes, ne forment pas de spores et sont généralement immobiles (Siegumfeldt *et al.*, 2000 et Singh *et al.*, 2009). Les lactobacilles sont catalase négatif cependant certains ont une pseudo-catalase et sont généralement négatives à la nitrate réductase ainsi qu'à la gélatinase (Prescott *et al.*, 2003).

I.5.1.1. Caractéristiques culturelles et besoins nutritionnels

La plupart des lactobacilles se développent de manière optimale à des températures comprises entre 30 et 40°C. Certaines souches de *Lactobacillus* dites "thermophiles" survivent à 55°C (Adams et Moss, 2000 ; Tailliez, 2004). Ils poussent mieux dans des conditions acides, lorsque le pH est d'environ 4,5 à 6,4 mais leur croissance s'arrête lorsque le pH est d'environ 3,5 (De Vos *et al.*, 2009). Les lactobacilles sont microaérophiles ou anaérobies et ont des besoins nutritionnels très complexes en acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides, glucides et minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc *et al.*, 1994). Ces bactéries ont été classées selon De Man *et al.* (1960) ; DeVos *et al.* (2009) comme suit :

I.5.1.1.1. Exigences en vitamines

Les vitamines telles que l'acide pantothénique (B5), la niacine (B3) et la cobalamine (B12) sont absolument nécessaires à toutes les espèces. Une carence en vitamine B12 entraîne une diminution de la synthèse d'ADN et entraîne des changements morphologiques et des cellules filamenteuses. Un tel allongement cellulaire a été observé avec *Lb. helveticus sp jugurti* dans le cas de carence en cobalamine (B12) ou en acide folique.

I.5.1.1.2. Exigences en bases azotées

Dans les milieux synthétiques, les lactobacilles nécessitent la présence d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile. Ces exigences varient selon les espèces.

I.5.1.1.3. Exigences en cations

Les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} ou Fe^{2+} sont nécessaires à la croissance des bactéries lactiques. Il a été démontré que le manganèse et le magnésium agissent comme activateurs de nombreuses réactions enzymatiques et comme stabilisateurs de la structure des acides nucléiques, de l'intégrité ribosomique et des membranes cellulaires des lactobacilles.

I.5.1.2. Habitat des lactobacilles

Ces microorganismes sont présents dans de nombreux habitats : humains, animaux, plantes, eau, sol, lait et produits laitiers, produits carnés, bière, vin, fruits et jus, etc.) (Stiles et Holzapfel, 1997). Le lactobacille est l'un des composants importants du microbiote humain et animal. Chez une personne en bonne santé, on les retrouve dans tout le système digestif : de la bouche au côlon. Les espèces les plus courantes sont : *Lb. Salive*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, groupe *Lb. casei*, *Lb. gasseri*, *Lb. Roytree* (Reuter, 2001 ; Eckburg *et al.*, 2005 ; Walter, 2008 ; Ozgun et Vural, 2011).

I.5.1.3. Taxonomie et classification des lactobacilles

Les caractéristiques qui distinguent les trois groupes, ainsi que certaines des espèces les plus connues de chaque groupe.

D'après la classification d'Orla-Jensen (1919) le genre *Lactobacillus* est subdivisé en trois groupes selon leur type fermentaire :

- **Groupe I** « *Thermobacterium* » : Ce groupe rassemble des espèces homofermentaires obligatoires. Il est constitué d'espèces thermophiles impliquées dans la fermentation des produits laitiers, par exemple : *Lb. delbrukii* et *Lb. helveticus*, et ceux présents chez l'homme et les animaux qui contribuent à l'équilibre de la microflore de l'organisme, tels que : *Lb. acidophilus* et *Lb. Gasseri*. Ces bactéries ont été cultivées à 45°C.
- **Groupe II** « *Streptobacterium* » : Ce groupe comprend les espèces hétérofermentaires facultatives. Ces espèces métabolisent les sucres hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire (EMP) et dégradent les sucres pentoses en acide lactique par la voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose, mais le font lors de la fermentation du gluconate.

Ce groupe est constitué d'espèces mésophiles impliquées dans la fermentation des produits carnés et céréaliers, par exemple : *Lb. curvatus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*.

- **Groupe III** « *Betabacterium* » : Ce sont des Lactobacilles hétérofermentaires obligatoires. C'est un groupe qui englobe des espèces relativement hétérogènes, notamment des espèces mésophiles telles que : *Lb. de fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. Buchneri* fait partie de la levure de panification et de la flore *Lb. Kéfir* isolé des grains de kéfir. L'hétérogénéité se reflète dans le type de molécule d'ADN pourcentage GC% des espèces du genre. Les séries varient de 32 à 55 % (Schleifer et Ludwig, 1995 ; Axelsson, 2004 ; Hammes et Hertel, 2006).

Tableau 01 : Répartition du genre *Lactobacillus* (Axelsson, 2004). *a*: pendant la fermentation, *b* : inductible par les pentoses.

Caractéristiques	Groupe I : homofermentaires obligatoires (<i>Thermobacterium</i>)	Groupe II : hétérofermentaire facultatif (<i>Streptobacterium</i>)	Groupe III : hétérofermentaires obligatoires (<i>Betabacterium</i>)
Fermentation du pentose	-	+	-
CO ₂ à partir du glucose	-	-	+
CO ₂ à partir du gluconate	-	+ ^a	+ ^a
FDP aldolase présente	+	+	-
Phosphokétolase présente	-	+ ^b	+
Exemple d'espèces	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrückii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i>

I.5.1.4. Identification

L'identification des espèces de lactobacilles peut être difficile à réaliser par les méthodes biochimiques en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Elle repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres. La galerie API 50 CH avec l'utilisation du milieu pour les lactobacilles est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (Roissart et Luquet, 1994 ; Ozgun et Vural, 2011).

I.5.1.5. Adhésion des lactobacilles

L'adhésion est un comportement caractérisé par l'ensemble des phénomènes physico-chimiques et biologiques permettant aux bactéries de se fixer sur les surfaces de manière durable (**Quirynen et Bollen, 1995**). Celle-ci dépend de :

- l'environnement (température, pH)
- l'aspect et de la rugosité de la surface
- l'hydrophilie ou de l'hydrophobicité des bactéries
- la charge de surface voire de la force ionique du milieu
- la présence de structures spécifiques à la surface des bactéries.

I.5.2. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est généralement divisé en trois groupes : pyogènes (espèces les plus pathogènes et hémolytiques), oraux (par exemple, *S. salivarius*, *S. bovis*) et autres streptocoques (**Scheilfer, 1987**). La seule espèce de streptocoque utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*, qui est classée dans le groupe "Autres Streptocoques". *Streptococcus thermophilus* se distingue par son habitat (lait et produits laitiers) et ses propriétés non pathogènes. La thermotolérance, la capacité de croître à 52°C et un nombre limité de glucides permettent de distinguer *S. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (**Haddie, 1986 ; Pilet et al., 2005**).

I.5.3. Le genre *Enterococcus*

Le genre comprend des streptocoques fécaux représentant les types lambda et bêta hémolytiques et appartenant au groupe D. Ce sont des symbiotes de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement en excréments et espèces apparentées. Les entérocoques sont des coquilles mobiles, homofermentaires, qui se distinguent généralement par la fermentation de l'arabinose et du sorbitol, qui se développent entre 10°C et 45°C. (**Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007**).

I.5.4. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils ressemblent à des coquilles lenticulaires, se présentent par paires ou en chaînes, et ont un caractère hétérofermentaire prononcé, produisant de l'acide lactique (isomère D), du CO₂ et de l'éthanol. Des caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'escine, la formation de glucane, les conditions de croissance, la capacité à se développer à différents pH et températures, l'absorption de citrate et/ou de malate peuvent distinguer *Leuconostoc* de *Weissella* (**Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007**).

Actuellement, il existe quatorze espèces de *Leuconostoc*, qui sont également des anaérobies facultatifs, ont des besoins nutritionnels élevés et ont toujours une croissance lente. Le développement de *Leuconostoc* se traduit souvent par un milieu visqueux dû à la production d'exopolysaccharides.). Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée du vin a été assignée à un nouveau genre *Oenococcus oeni*, et certaines espèces de *Lactobacillus* hétérofermentaires ont été regroupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzapfel, 1997).

I.5.5. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les pédiocoques sont des coquilles homofermentaires dont la particularité réside dans leur agrégation en tétrades. Ils sont mésophiles, généralement incapables d'utiliser le lactose, et nécessitent la présence de divers facteurs de croissance pour leur développement. Certaines espèces sont connues pour leur capacité à se développer à des niveaux de sel très élevés, comme *Pediococcus halophilus*, rebaptisé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus*, qui peut tolérer jusqu'à 18 % de NaCl (Pilet *et al.*, 2005). Les espèces de *Tetragenococcus* jouent un rôle crucial dans la production d'aliments riches en sel comme la sauce soja, tandis que *Pediococcus* est parfois utilisé comme entrée pour les aliments cuits (Guiraud et Rosec, 2004 ; Tosukhowong *et al.*, 2005).

I.5.6. Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie des bactéries lactiques car il a des propriétés physiologiques et biochimiques similaires et existe dans le même habitat écologique, tel que le tractus gastro-intestinal. Ces microbes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces derniers. Ils sont plus étroitement liés au *Phylum actinobacteria* (anciennement connu sous le nom d'Actinomycètes). Ce sont des bactéries Gram-positif et ont une teneur plus élevée en G + C dans leur ADN. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière, généralement en forme de V, mais peuvent aussi être sphériques, et la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, qui leur permet de se fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson *et al.*, 2004 ; Pilet *et al.*, 2005 ; Ho *et al.*, 2007).

I.6. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception. Ils sont hétérotrophes, puisant leur énergie dans la fermentation de substrats carbonés. Les glucides

fermentés par les bactéries lactiques en acide lactique peuvent être des monosaccharides tels que les hexoses (glucose, galactose), les pentoses (xylose, ribose, arabinose), les hexitols et les pentitols (mannitol, sorbitol, alcools de sucre de la xylose) ou les disaccharides (lactose, saccharose, cellobiose), tréhalose). La fermentation des sucres se déroule en trois étapes principales (**Atlan et al., 2008**) :

- Transport des sucres à travers les membranes cellulaires
- Décomposition intracellulaire des sucres Métabolisme
- Formation et excrétion extracellulaire des métabolites terminaux.

Selon le genre ou l'espèce, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux principales voies du métabolisme des sucres (Figure 03). Ce sont des voies homofermentaires (EmbdenMeyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (**Atlan et al., 2008**).

I.6.1. La voie homofermentaire ou EMP

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent *Lactococcus*, *Pediococcus* et certains lactobacilles. Dans des conditions de croissance optimales, cette voie conduit à la production de deux molécules de lactate et de deux molécules d'ATP pour chaque molécule de glucose consommée. Le fructose 1,6-diphosphate aldolase (FBA) est une enzyme clé nécessaire au fonctionnement de la voie EMP (**Thompson et Gentry-Weeks, 1994**) .

I.6.2. La voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO₂ en plus de l'acide lactique sont considérées comme hétérofermentaires. Les principaux groupes bactériens présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* et certains *Lactobacilles*. Ces micro-organismes sont dépourvus des systèmes de transport FBA et PTS (**Thompson et GentryWeeks, 1994**).

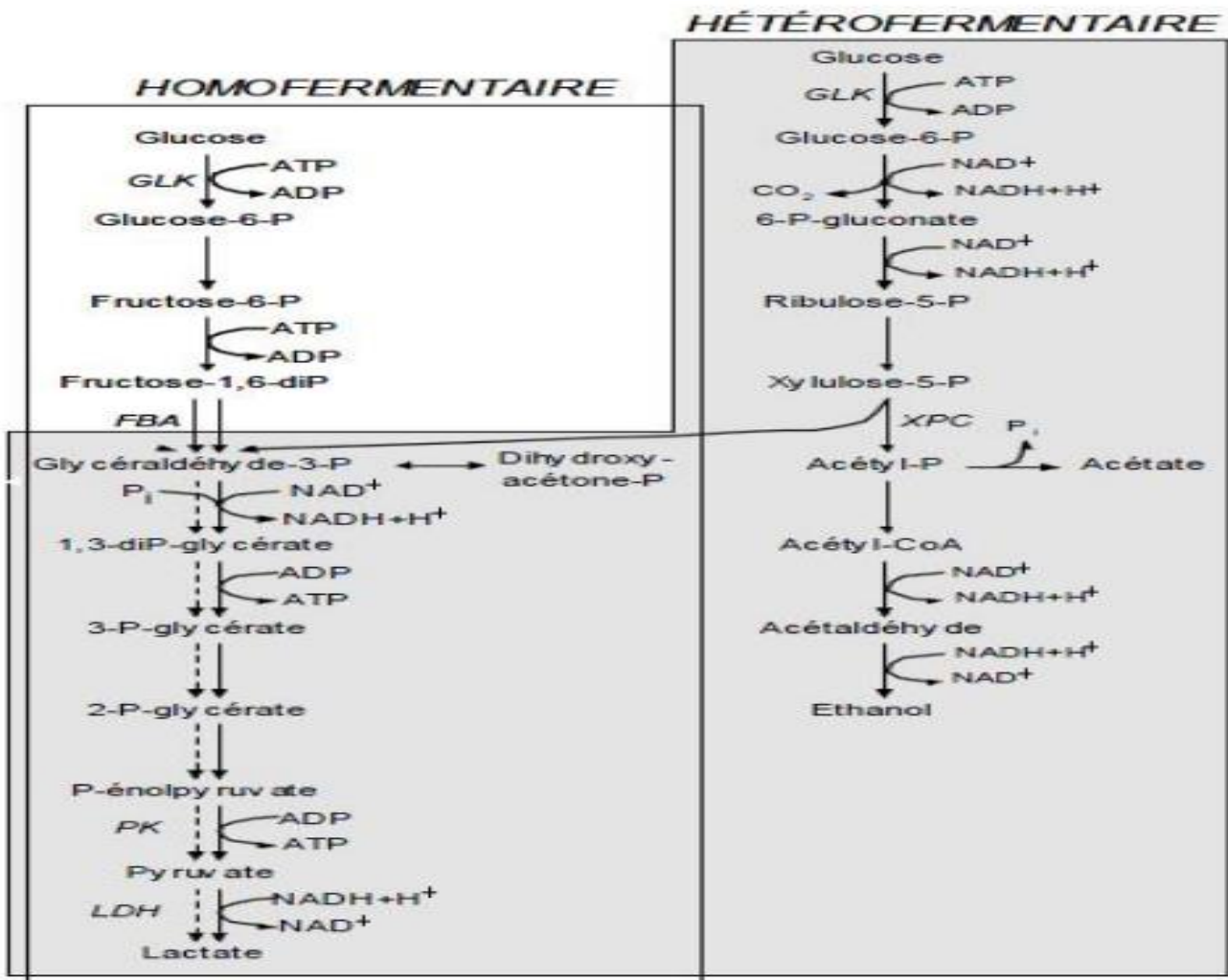


Figure 03 : Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008). [GLK : glucokinase, FBA : fructose-1,6- bisphosphate aldolase, XPC : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase].

Chapitre II :

**Potentiel probiotique et
aptitudes technologiques des
bactéries lactiques**

II.1. Effets probiotiques des bactéries lactiques

II.1.1. Historique de la définition des probiotiques

Le terme probiotique a bénéficié d'une variété de définitions qui ont évolué au fil du temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. Le concept de probiotiques est en grande partie dû aux travaux de Metchnikoff, qui a proposé que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes pourrait prolonger la durée de vie en réduisant le nombre de bactéries putréfactives ou productrices de toxines dans le tube digestif. En 1965, Lilly et Stillwell ont proposé la première définition des probiotiques en tant que "facteurs de croissance produits par des microbes". Depuis, la définition du terme probiotique a été révisée à plusieurs reprises (**Lamoureux, 2000 ; Ait-Belgnaoui et al., 2005**). En 1989, Roy Fuller a souligné l'exigence de viabilité des probiotiques et avancé l'idée que les probiotiques sont bénéfiques pour l'hôte (**Guarner et al., 2008**). La FAO et l'OMS (2002) ont récemment élaboré des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et ont élaboré la définition suivante : « Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantités suffisantes, confèrent un avantage pour la santé à l'hôte qui affecte qui les ingère ».

II.1.2. Principales espèces de bactéries lactiques à potentiel probiotique

Les espèces les plus courantes et rapportées dans la littérature sont *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, mais il faut également mentionner les souches *d'Enterococcus* et *de Streptococcus* (**Gbassi et al., 2011 ; Rokka et Rantamaki, 2010**).

II.1.3. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques

Les propriétés des probiotiques varient selon les espèces ou les souches microbiennes. Il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée, car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne. La non-pathogénicité (non nocive) de la souche est un critère très important, et les souches ayant le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) seront également privilégiées. Cependant, le critère de viabilité ou de survie reste essentiel dans la sélection des probiotiques, qui doivent atteindre leur site d'action, l'intestin, vivants et ainsi résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte. Les bactéries étant administrées par voie orale, elles doivent surmonter des obstacles majeurs au transit digestif : pH acide, sels biliaires, enzymes pancréatiques, etc. (**Percival, 1997 ; Lamoureux, 2000 ; Millette et al., 2008**).

II.1.3.1. La résistance à l'acidité gastrique

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer un pH bas. Le temps de pause peut aller d'une à quatre heures, selon l'individu et son régime alimentaire. Par conséquent, certains auteurs suggèrent que les souches probiotiques devraient pouvoir tolérer un pH de 2,5 pendant 4 heures dans un milieu (Ammor et Mayo, 2007).

II.1.3.2. La résistance aux sels biliaires

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important favorisant la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (Ammor et Mayo, 2007 ; Gu *et al.*, 2008).

II.1.3.3. L'adhésion aux cellules épithéliales

La capacité à adhérer à la couche intestinale est un critère de sélection recommandé pour la sélection des probiotiques, car c'est une condition de la colonisation intestinale. L'adhésion est la première ligne de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Elle repose sur une série de tests *in vitro* et *in vivo* utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine (Palomares *et al.*, 2007 ; Reyes-Gavilan *et al.*, 2011). En plus de leur capacité à adhérer aux cellules épithéliales intestinales, les probiotiques peuvent également se fixer au mucus qui recouvre les cellules intestinales ou à divers micro-organismes présents dans le tractus gastro-intestinal (Lamoureux, 2000).

II.1.3.4. La production de substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules aux effets bactéricides/bactériostatiques telles que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été utilisés pour améliorer la conservation des aliments (Titiek *et al.*, 1996 ; Labioui *et al.*, 2005).

II.1.3.5. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure et physiologie. Les travaux de Temmerman *et al.* (2003) ont montré que 68,4 % des probiotiques isolés étaient résistants à un ou plusieurs antibiotiques. Les souches de *Lactobacillus* se sont révélées résistantes à la kanamycine (81%), à la tétracycline (29.5%), à l'érythromycine (12%) et au chloramphénicol (8.5%). Dans la plupart des cas, la résistance n'est pas transmissible, cependant, les plasmides codant pour la résistance aux antibiotiques peuvent être transférés à d'autres espèces et

genres. C'est une raison importante pour sélectionner des souches qui n'ont pas le potentiel de transfert de résistance (Denohue, 2004). Les autorités européennes ont récemment conclu que certaines bactéries utilisées dans la production alimentaire peuvent présenter un risque pour la santé humaine et animale en raison de souches contenant des gènes de résistance héréditaires. Par conséquent, avant d'initier des cultures probiotiques, il est important de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne portent pas de gènes de résistance aux antibiotiques transmissibles (Ammor et Mayo, 2007).

II.1.3.6. Critères technologiques

Outre la sécurité et les propriétés fonctionnelles, des critères techniques sont également pris en compte lors de la sélection des souches probiotiques. Selon Saarela *et al.* (2000), ces normes :

- Bonnes propriétés sensorielles
- Résistance aux phages
- Viabilité durant le traitement technologique
- Stabilité dans le produit et durant le stockage.

II.1.4. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation de probiotiques (tableau 02).

Tableau 02 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Salminen *et al.*, 2004 ; Patterson, 2008).

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autres effets
Contrôle des troubles suivants : - Mauvaise digestion du lactose - Diarrhée due aux rotavirus et diarrhée-associée aux antibiotiques - Syndrome du côlon irritable - Constipation - Infection par <i>Helicobacter pylori</i> - Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle - Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin Prévention de l'entérocolite nécrosante du nouveau-né	- Modulation immunitaire - Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation - Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>)	Réduction du risque de : - Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein) - Coronaropathie - Maladie des voies urinaires - Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle

II.1.5. Mécanisme d'action des probiotiques

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer les principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, substances antimicrobiennes) à leur cible dans le tube digestif. Les mécanismes d'action des probiotiques sur l'hôte sont complexes, souvent divers et dépendants de la souche bactérienne en cause ; ils agissent entre autres en inhibant les bactéries indésirables, en neutralisant les produits toxiques, en améliorant la digestibilité des aliments et en stimulant l'immunité. Ces probiotiques avec divers composants de la barrière intestinale est nécessaire, tels que la microflore endogène, le mucus intestinal, les cellules épithéliales. Ils sont également une source de vitamines (essentiellement du groupe B), et de sels minéraux assimilables (**Robin et Rouchy, 2001 ; Ait-Belgnaoui et al., 2005**).

II.1.6. Applications des probiotiques

Divers produits commercialisés comme probiotiques pour l'homme ou l'animal sont constitués d'un seul microorganisme (produits dits monosouches) ou d'une combinaison de plusieurs espèces (produits dits multisouches). Aujourd'hui, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formats (**Patterson, 2008**) :

- Concentrés de culture ajoutés aux aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales.
- Ingrédients ajoutés au lait ou aux aliments à base de soja qui peuvent être fermentés à des concentrations élevées.
- Cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsules ou en feuilles.

Les probiotiques sont souvent associés aux produits laitiers de culture. La gamme de produits probiotiques comprend maintenant du fromage, de la crème glacée et du yogourt glacé ainsi que des produits non laitiers et des boissons (**Patterson, 2008**). La survie des probiotiques dans les produits est affectée par divers facteurs lors de la transformation et du stockage. De nouvelles technologies telles que la micro encapsulation et la technologie des cellules immobilisées offrent une protection supplémentaire aux probiotiques et offrent de nouvelles façons d'ajouter des probiotiques aux aliments. Les fabricants commercialisent de nouveaux véhicules d'administration de probiotiques, tels que des pailles et des bouchons de bouteilles, qui peuvent administrer des doses thérapeutiques de probiotiques dans les aliments lorsqu'ils sont perforés ou brisés (**Kailasapathy, 2002 ; Patterson, 2008**).

II.2. Aptitudes technologiques

II.2.1. Aptitude acidifiante

L'acidification est la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans l'industrie alimentaire. Il se manifeste dans la fermentation des glucides pour produire de l'acide lactique lors de la croissance bactérienne (MäyräMäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet *et al.*, 2008). Les résultats de la séquence physico-chimique et microbiologique peuvent être résumés comme suit (Béal *et al.*, 2008) :

- accumulation d'acide lactique impliqué dans la saveur des aliments fermentés
- abaissement progressif du pH du milieu de culture et de la matrice alimentaire
- limitation du risque de développement de flore pathogène et d'altération du produit final.
- instabilité du faisceau de colle de caséine, coagulation du lait et participation à la synérèse.

Pour une fermentation donnée, le but est de permettre des taux d'acidification élevés et/ou d'atteindre un niveau d'acidité final prédéterminé. Les niveaux d'acidité dépendent de la spécification du produit, qui conditionner le choix de la souche (Monnet *et al.*, 2008).

II.2.2. Aptitude protéolytique

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'exercer des fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de réagir à tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques présentent différents potentiels, liés à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de groupements azotés. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (Donkor *et al.*, 2007 ; Monnet *et al.*, 2008 ; Roudj *et al.*, 2009).

II.2.3. Aptitude lipolytique

La capacité lipolytique des bactéries lactiques est généralement faible, et *Lactococcus* est considéré comme meilleur pour décomposer les graisses que *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus*. Cependant, ils peuvent présenter un intérêt pour certaines applications fromagères. De manière générale, les estérases se différencient en ce qu'elles hydrolysent préférentiellement les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (Béal *et al.*, 2008 ; Serhan *et al.*, 2009).

II.2.4. Aptitude aromatisante

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement dérivés du lactose, du citrate, des acides aminés et des graisses. Cette propriété est particulièrement importante lors de la fabrication de laits fermentés, de fromages frais, de crèmes et de beurres, car la saveur principale de ces produits est associée à cette activité microbienne (**Bourgeois et Larpent, 1996 ; Gerrit *et al.*, 2005 ; Cholet, 2006**).

II.2.5. Aptitude texturante

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important dans la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. delbrueckii ssp. Bacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* producteurs d'EPS sont utilisés dans la fabrication du yaourt pour améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité du produit fini.

L'EPS produit par la souche *Lc* a été utilisé. La bactérie lactique cremoris est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (**Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho *et al.*, 2007**).

II.2.6. Activité antimicrobienne

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la conservation biologique des aliments (**Labioui *et al.*, 2005**). Les acides organiques comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés pendant la fermentation des glucides inhibent les levures, les moisissures et les bactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains micro-organismes. Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur produit des effets anaérobies toxiques pour certains microorganismes aérobies présents dans les aliments. Le diacétyl peut inhiber la croissance des bactéries Gram-négatives, des levures et des moisissures (**Alakomi *et al.*, 2000 ; Ammor *et al.*, 2006**), et les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des substances antibactériennes de différents poids moléculaires. Ils ont une activité inhibitrice contre les bactéries proches de la souche de productrice et leur spectre d'action est généralement étroit. Les plus connues sont : la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (**Ogunbanwo *et al.*, 2003 ; Dortu et Thonart, 2009**). La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (**De Vuyst et Leroy, 2007 ; Kumari *et al.*, 2009**).

II.3. Applications industrielles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent une diversité considérable d'activités métaboliques et la capacité de s'adapter à différents environnements. Cette diversité est la raison de sa large gamme d'applications à l'échelle industrielle (**Streit *et al.*, 2007**). Dans l'industrie alimentaire, ces microbes transforment une grande variété de matières premières en de nombreux produits : charcuterie, lait fermenté, fromage, olives fermentées et certains vins. Parmi ces applications, l'industrie laitière est sans aucun doute le plus grand utilisateur de la fermentation lactique commerciale (**Axelsson, 2004 ; Streit *et al.*, 2007**).

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement des dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides). Ils sont également utilisés dans la production de bactériocines et de protéines thérapeutiques (**Rodriguez *et al.*, 2003**).

Partie *II* :

Partie expérimentale

Chapitre III :
Matériel et méthodes

Chapitre III : Matériel et méthodes

1. Lieu du travail

Ce travail a été entièrement réalisé au niveau du Laboratoire de Recherche des Sciences et Techniques pour les Productions Animales (LSTPA), situé à la ferme expérimentale de Hassi-Mamèche affiliée à l'Université Mostaganem Abdelhamid Ibn Badis.

2. Objectifs de l'étude

Les objectifs assignés à ce présent travail s'articulent autour des points suivants :

- Etude des caractères biochimiques et physiologiques des lactobacilles
- Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des lactobacilles.

3. Appareillage

L'ensemble des équipements utilisés lors de nos travaux sont mentionnés en **Annexe 2**.

4. Produits chimiques et réactifs

- **Les colorants** : Violet de gentiane, fuschine
- **Les réactifs** : réactifs de Vogues Proskauer (VP1 et VP2), poudre de lait 0%
- **Les acides et bases** : Lugol, La soude doronic (NaOH) N/9, acide chloridrique 1N, Ethanol
- **Autres** : Phénophtaléine, Eau distillée, saccharose.

5. Matériel Biologique

5.1. Les isolats de *Lactobacillus*

Afin de réaliser ce travail, Vingt-deux (N=22) bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* ont été testés (LB01, LB02, LB03, LB04, LB05, LB06, LB07, LB08, LB09 , LB10, LB11, LB12 , LB13, LB14, LB15, LB16, LB17, LB18, LB19, LB20, LB21, LB22)(**annexe 5**). Ces bactéries ont été isolées à partir de miels crus dans le cadre d'un travail de thèse effectuée au niveau du Laboratoire des sciences et technologies de la transformation laitière (LSTPA).

5.2. Souche indicatrice :

Le test d'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisé contre une souche pathogène « *Staphylococcus aureus* ». Il s'agit des bactéries prélevée chez une patiente atteinte d'infections urinaires et qui nous a été fourni par le laboratoire LSTPA.

5.3. Les Milieux de culture :

Plusieurs milieux ont été utilisés dans cette étude expérimentale, à savoir :

Les Géloses : MRS (Man Rogosa et Scharpe, 1960), MSE (Mayeux *et al.*, 1962, Zarour *et al.*, 2017), MRS additionné de tween 80 et PCA additionné du lait écrémé pour l'étude des aptitudes technologiques, Gélose nutritive (G.N) pour la culture de la souche pathogène, Gélose nutritive semi-solide pour l'évaluation de l'activité antibactérienne. (Annexe 1)

Les bouillons : Clark et Lubs pour : pour l'étude du pouvoir aromatisant, MRS pour la revivification, les repiquages ainsi que la croissance des lactobacilles.

6. Méthodes

6.1. Revivification et purification des lactobacilles :

L'ensemble des isolats de *Lactobacillus* sélectionnés ont été revivifiés par ensemencement de 800 µl de la suspension conservée pour chaque bactérie dans des tubes contenant 5 ml de bouillon MRS, suivi d'une incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures. Les résultats de revivification sont appréciés par l'apparition d'un trouble dans le milieu. Les cultures bactériennes sont ensuite ensemencées en strie sur le milieu MRS (pH= 5,5) et incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures. Cette opération a été répétée par repiquage successif jusqu'à l'obtention d'un résultat uniforme de point de vue morphologique.

6.2. Etude de caractères morphologiques

6.2.1. Caractéristique macroscopique

La détermination des propriétés macroscopiques, se fait à l'œil nu. Les suspensions bactériennes de lactobacilles ont été cultivées sur milieu gélosé MRS. Cette analyse renseigne sur la forme, la couleur, l'aspect, la taille, la consistance, l'opacité et l'odeur des isolats testés. L'aspect du trouble obtenu après culture sur milieu liquide est également observé.

6.2.2. Caractérisation microscopique

Cet examen a été effectué après coloration de Gram (Annexe 3), sur une culture jeune. Il permet de décrire la forme et le mode d'association des cellules des souches lactiques utilisées à l'aide d'observation au microscope optique, après réalisation des frottis colorés.

6.3. Caractères biochimiques et physiologiques

6.3.1 Test de production de catalase

La plupart des bactéries lactiques sont anaérobies et ne nécessitent pas la synthèse de peroxydase (Larpent, 1997). Pour confirmer que les bactéries testées appartiennent au groupe des lactates, un test de production de catalase a été réalisé en émulsionnant la colonie à tester dans 10 volumes de solution fraîche de peroxyde d'hydrogène. Le dégagement gazeux important reflète la décomposition du peroxyde d'hydrogène par les enzymes testées (Guiraud, 2003).

6.3.2. Croissances dans les conditions hostiles

6.3.2.1. Test de croissance à différentes températures

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des thermophiles. Après ensemencement des isolats sur milieu MRS liquide, les tubes sont incubés pendant 24h à 48h aux températures 10°C, 30°C et 45°C. La croissance est appréciée par l'apparition de trouble.

6.3.2.2. Test de croissance à différents pH

Ce test est réalisé en bouillon MRS ajusté à pH 4,5 et 9,6. Des cultures témoins ont été préparées sur milieu MRS à pH 5,5. La croissance a été évaluée après 48 h d'incubation à 30°C.

6.3.2.3. Test de croissance en milieu hypersalé

Ce test est réalisé par l'ensemencement des isolats sur milieu liquide MRS contenant une concentration de 6,5 % de NaCl. L'incubation s'effectue à 30°C pendant 24h à 48 h. L'aptitude à croître sur ce milieu se traduit par l'apparition d'un trouble. Le test ne donne aucune indication sur l'identité des bactéries, mais il permet de les caractériser.

6.3.3. Test de la thermo-résistance

Ce test permet d'isoler ou identifier les souches résistantes à une température de 60°C pendant 30 minutes. Chaque culture bactérienne de lactobacille est ensemencée sur milieu liquide MRS, les tubes sont ensuite introduits dans un bain marie à 60°C pendant 30 minutes. Après refroidissement les tubes sont incubés à 30°C pendant 48h. un résultat positif se traduit par un trouble (Rouissat *et al.*, 2006).

6.3.4. Le type fermentaire

Ce test permet de classer les bactéries comme hétérofermentaires ou homofermentaires. Il est effectué dans un milieu dépourvu de citrate pour éviter la formation de CO₂ liée à ce métabolisme particulier (Dicks *et al.*, 1987). L'ensemencement des lactobacilles à tester s'effectue dans un milieu liquide MRS

(sans citrate) contenant le glucose comme source de carbone, menu au préalable d'une cloche de Durham. Le bouillon est, par la suite, mis à incuber à 30°C. Les tubes sont observés dans un délai de 3 jours en fonction de l'aspect du milieu (trouble) et la production du gaz. (Garvie, 1986; Schillinger et al., 1989).

6.4. Etude des aptitudes technologiques des *Lactobacillus*

6.4.1. Pouvoir acidifiant

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH de différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser l'acidité titrable par la soude (NaOH, N/9) en présence d'un indicateur coloré de pH la phénolphthaléine (Larpent, 1997). L'acidité titrable mesurée est assimilée à des degrés Dornic (°Dornic) où 1°Dornic équivaut à 0.1g d'acide lactique/l de lait. Pour réaliser ce test, 100µL de culture jeune de chaque souche lactique a étéensemencée dans un tube contenant 10ml de lait écrémé stérile reconstitué à 12,5%. Après agitation, les mesures sont prises à intervalles de temps 3h, 6h, 24h, et 48h d'incubation à 37°C. Puis titrer par la soude Dornic en présence de quelques gouttes de phénolphthaléine, jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes (Larpent, 1990). L'acidité est déterminée par la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

Où : V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans 10ml de lait.

6.4.2. Pouvoir protéolytique

Pour déterminer l'activité protéolytique des lactobacilles, la gélose MRS additionnée de lait écrémé à 10% a été coulée, solidifiée et séchée puis des spots de 5µl contenant la culture jeune sont déposés sur les boîtes. Après une incubation à 30° C pendant 24h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des colonies. Les halos les plus larges indiquent que les souches ont une activité protéolytique plus importante.

6.4.3. Activité lipolytique

La lipolyse est mise en évidence sur milieu MRS tamponné à pH 7 et additionné de 3% de Tween 80 (sources lipidiques artificielles). Les bactéries à tester ont étéensemencée en touche à la surface de ce milieu de culture à l'aide d'une anse. Après une incubation à 30°C pendant 48 heures, la lipolyse

est révélée par une zone d'éclaircissement autour des touches ou bien en formant des précipités autour des colonies bactériennes (Guiraud, 2003).

6.4.4. Pouvoir texturant (Production d'exopolysaccharides ou EPS) :

La production d'EPS à partir de saccharose a été mise en évidence sur milieu solide MSE (Mayeux *et al.*, 1962) riche en saccharose (supplémenté avec 10% de saccharose). Les 22 isolats de *Lactobacillus* ont été striés sur une gélose hyper-saccharosé. Après 24 à 48 heures d'incubation à 30°C, la production d'exopolysaccharide (dextrane) a été détectée par l'apparition de grandes colonies collantes visqueuses (Mayeux *et al.*, 1962 ; Benhoua *et al.*, 2019).

6.4.5. Pouvoir aromatisant (Production d'acétoïne) :

La capacité des souches à produire des composés aromatisants au cours de leur croissance a été mise en évidence dans le milieu de Clark et Lubs. Chaque tube contenant ce milieu a été ensemencé par une des cultures de lactobacilles. Après incubation à 30°C pendant 24h à 48h environ 4 gouttes de chacun des réactifs VP1 « réactif α - naphтол à 6% dans l'alcool absolu » et VP2 « solution de soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillée » ont été ajoutés suivis d'une agitation rigoureuse. Après 10 minutes, un résultat positif se traduit par l'apparition d'un anneau rouge en surface (McCance, 1976 ; Zourari *et al.*, 1991).

6.5. Etude du pouvoir antibactérien

La méthode de double couche (Fleming *et al.*, 1975) a été utilisée pour étudier l'activité inhibitrice des lactobacilles vis-à-vis de la souche indicatrice. Ce test consiste à ensemencer en touche un volume de 5 μ l de chaque culture fraîche, de bactéries lactiques testées, sur une gélose MRS. Les boîtes sont laissées à la température ambiante pour permettre aux spots de sécher, avant de les incuber à 30°C pendant 24 heures. En parallèle, une culture fraîche de la bactérie pathogène à tester est préparée dans 9 ml du bouillon nutritif et incubée à 37°C pendant 18 heures. Après incubation, 8 ml de gélose nutritive semi-solide (G.N) en surfusion sont inoculés par la souche cible. Ensuite, le mélange est coulé sur la couche de MRS, en contact direct avec les spots. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 48h. L'activité antibactérienne est révélée par l'apparition de zones claires autour des spots. Au terme de l'incubation, les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés.

Chapitre IV :
Résultats et discussion

Chapitre IV : Résultats et discussion

III.1 Examen macroscopique

D'après les résultats obtenus Les caractères culturaux des lactobacilles se présentent comme suit :

- Sur milieu MRS bouillon : Les isolats présentent un trouble homogène parfois surmonté d'une zone claire qui caractérise le groupe de Bactéries lactiques.
- Sur milieu MRS gélosé : les colonies sont de couleur blanchâtre, rondes, circulaires, lisses, ayant un contour régulier et avec un diamètre variant entre 2 et 5mm.

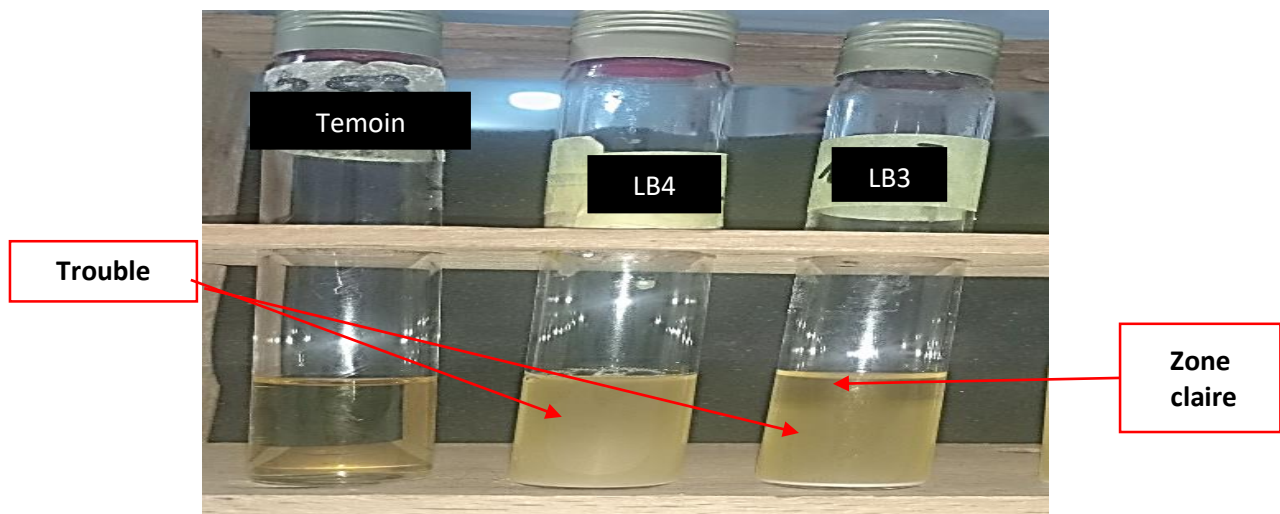


Figure 4 : Aspect macroscopique des cultures bactériennes de *Lactobacillus* sur le milieu MRS après 48 heures d'incubation à 30°C.

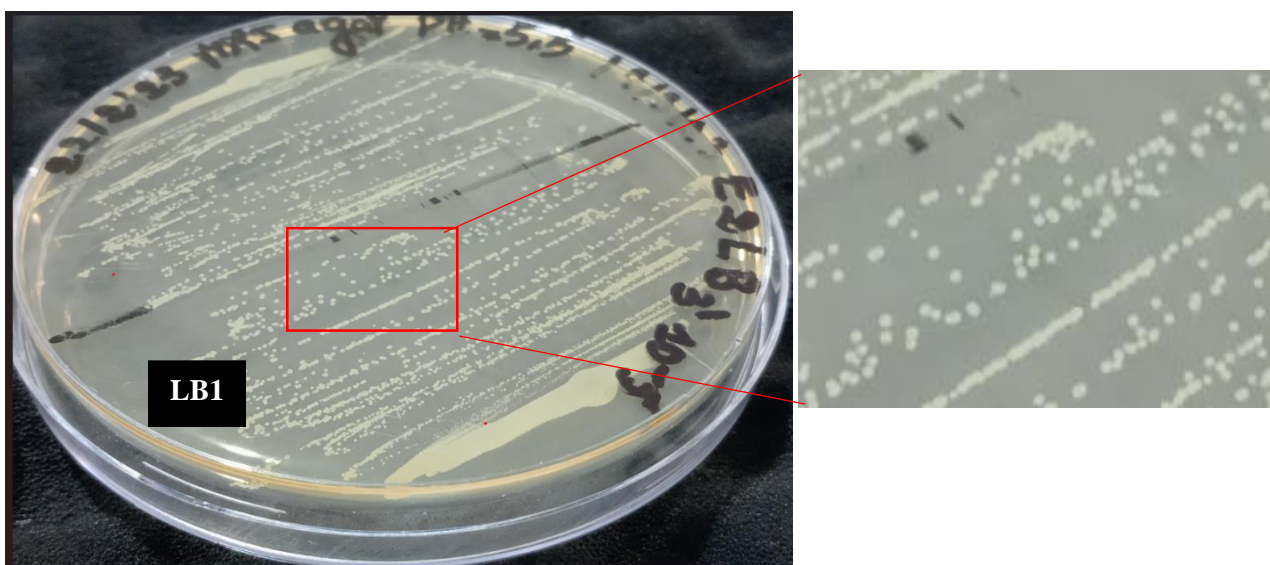


Figure 5 : Aspect macroscopique des colonies d'un isolat de *Lactobacillus* « LB1 » purifié sur milieu MRS après 48 heures d'incubation à 30°C.

III. 2 Examen microscopique

L'observation microscopique des isolats étudiés montre des cellules de couleur violette (Gram positif) de forme bacillaires, courtes, isolées ou disposées en paire (**Figure 6**).

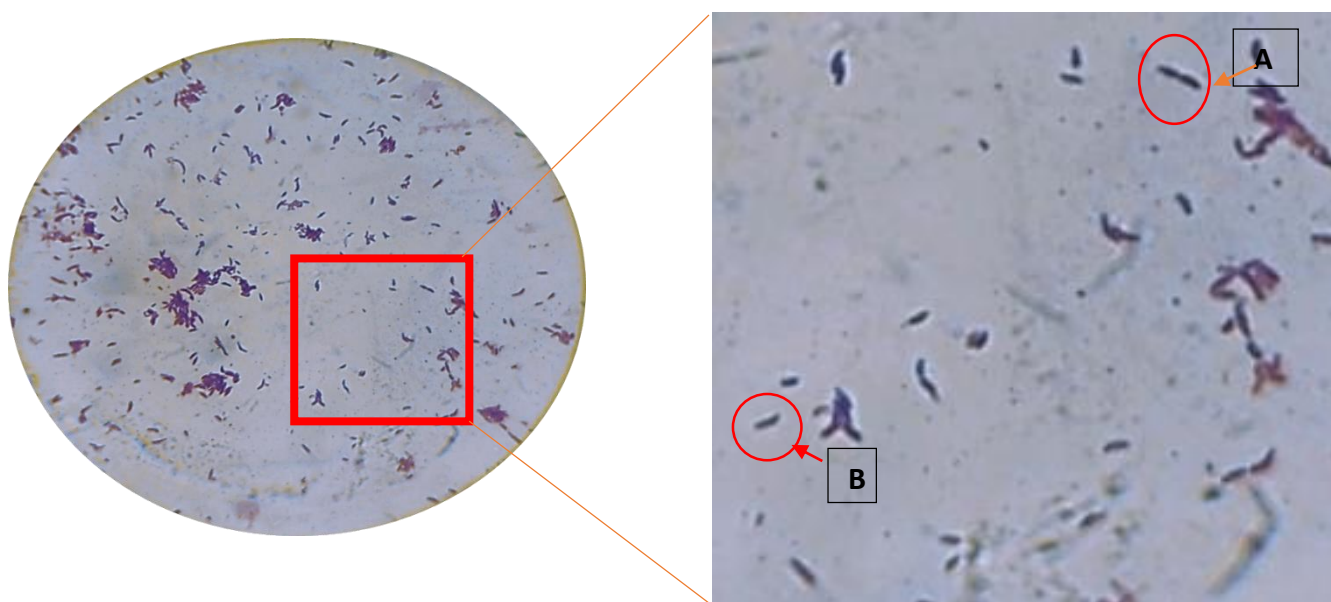


Figure 6 : Observation microscopique de *Lactobacillus* après coloration de Gram (x1000). A : Bacille disposé en paire, B: bacille isolé

III.3 Test de production de catalase :

Ce test a révélé que toutes les bactéries étudiées sont négatives pour la réaction de la catalase.

L'ensemble des résultats obtenus de l'aspect macroscopique et microscopique, coloration de Gram ainsi que le test de catalase confirmer l'appartenance de ses souches au genre *Lactobacillus* (Hensyl, 1994). Ces dernier sont catalase négatif Gram positif et de forme bâtonnet.

III.4 Etude des caractères physiologiques

L'ensemble des résultats des tests physiologiques est rassemblé dans le tableau 4.

III.4.1. Croissance à différentes températures (10 , 30, 37 et à 45°C)

Ce test est très important, car il permet de différencier les bactéries lactiques thermophiles des mésophiles. La totalité des lactobacilles testés poussent très bien à 10, 30, 37 et 45 après 48 heures d'incubation (**tableau 04, figure 07**).

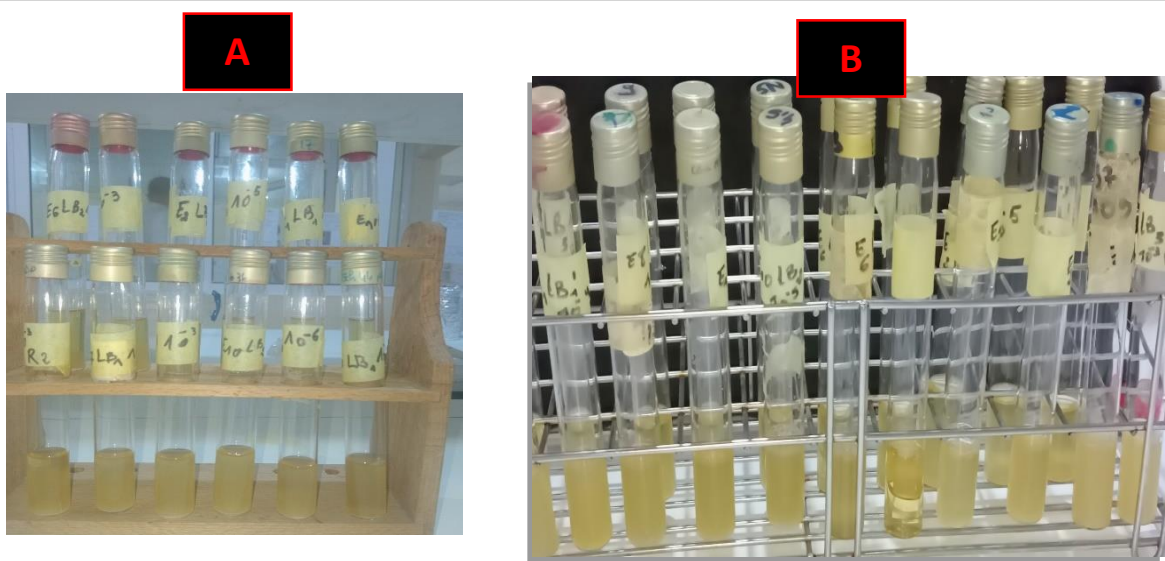


Figure 07 : Résultats obtenus pour les tests de croissance des lactobacilles à différentes température après 48 heures d'incubation. A : Test de croissance à 45°C, B : Test de croissance à 10°C.

III.4.2 Test de croissance à pH 4,5 et 9.6

Les résultats sont illustrés dans le **tableau 4** en (**annexe 4**) ainsi que dans la figure 8, On remarque une croissance de tous les isolats sur le bouillon MRS à pH 4,5 et 9,6.

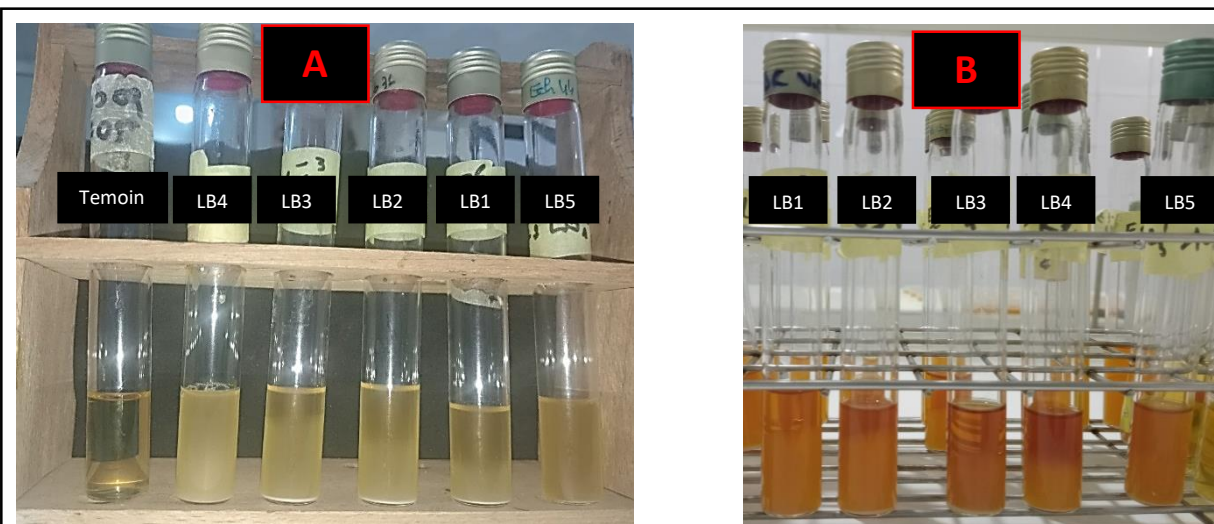


Figure 8 : Résultats obtenus pour les tests de croissance des isolats de lactobacilles à différents pH. A : Test de croissance à pH 4,5 ; B : Croissance à pH 9,6

III.4.3 Croissance en milieu hypersalé à 6.5% NaCl

Ce test est décrit comme donnant des résultats variable chez les lactobacilles c'est-à-dire qu'il va nous permettre juste de caractériser nos isolats en évaluant leur tolérance au NaCl. Tous les isolats testés ont montré une capacité de croître en milieu hyper-salé accepté les bactéries (LB 11, LB 15 et LB 19). Les résultats de ce test sont mentionnés dans **le tableau 4 (annexe 4)**

III.4.4 Test de thermorésistante

Tous les isolats testés ne survivent pas après leur exposition à 60° pendant 30 min (**Figure 09, Tableau 4**)

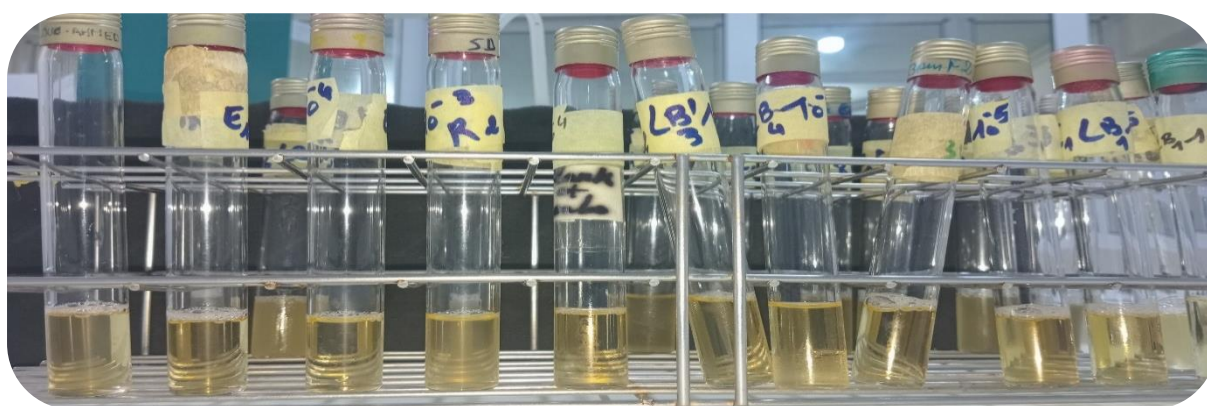


Figure 09 : Résultat du test de Thermo-résistance.

III.4.5 Test du type fermentaire

Les résultats du test du type fermentaire indiquent que tous les isolats testés sont homofermentaire excepté pour les bactéries (LB 03, LB 08, LB 16 et LB 21) qui ont été caractérisé comme hétérofermentaire en raison de leur production de gaz. Les résultats de ce test sont mentionnés dans **le tableau 4 (annexe 4)**.

Le genre *Lactobacillus* est subdivisé en 3 groupes qui sont :

- Groupe I homofermentaires
- Groupe II homofermentaires ou hétéro fermentaires facultatifs.
- Groupe III dont les bactéries sont Hétéro fermentaires obligatoires.

La majorité de nos isolats appartiennent donc aux groupes I ou II des lactobacilles.

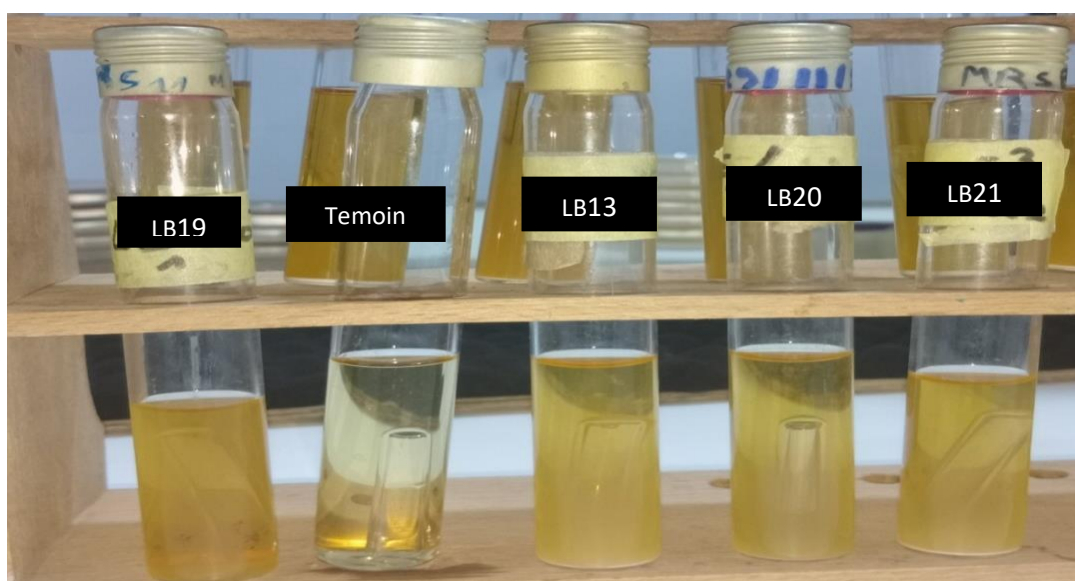


Figure 10: Résultats obtenus pour le type fermentaires des lactobacilles sur bouillon MRS sans citrate après incubation à 30°C pendant 48 h.

Généralement, les méthodes classiques d'identification des bactéries lactiques reposent essentiellement sur des tests phénotypiques et ou biochimiques. Il existe plusieurs critères pour identifier les bactéries lactiques au niveau phénotypique : la forme des cellules bactériennes, la température de la croissance, la fermentation des sucres, les activités physiologiques et biochimiques, la production des exopolysaccharides (**Wood et Holzappel, 1995**). Dans notre cas, les résultats obtenus des tests physiologiques et biochimiques effectués nous donnent seulement une identification au niveau du genre pour les lactobacilles et sont souvent difficile à réaliser au niveau de l'espèce comme, en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Ils permettent cependant de connaître certaines de leurs caractéristiques. L'identification au niveau de l'espèce repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres, dont la galerie API 50 CH avec l'utilisation du milieu pour lactobacilles, est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (Roissart et Luquet, 1994 ; Ozgun et Vural, 2011). Cette technique permet une identification biochimique rapide des bactéries. Par ailleurs, l'utilisation de nouvelles techniques avec une identification de très haute précision ont connu un essor considérable, représentant une alternative puissante à l'identification des microorganismes par des approches classiques. Parmi ces méthodes il y a les techniques génomiques (la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR, séquençage) et les techniques protéomiques (spectrométrie de masse du type « MALDI-Tof »).

IV Etude des aptitudes technologiques des isolats de lactobacilles :

IV.1 Cinétique d'acidification :

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. C'est également l'une des critères technologiques les plus recherchés en technologie laitière (Hassaine, 2013). En effet, la production d'acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme agent coagulant et antimicrobien. Les résultats de l'évolution de l'acidité Dornic et les variations de pH au cours de la croissance sur le lait écrémé pour dix isolats testés (LB03, LB07, LB10, LB11, LB13, LB15, LB17, LB19, LB20, LB22) sont présentés dans le tableau 5 en Annex 5, les figures 11.

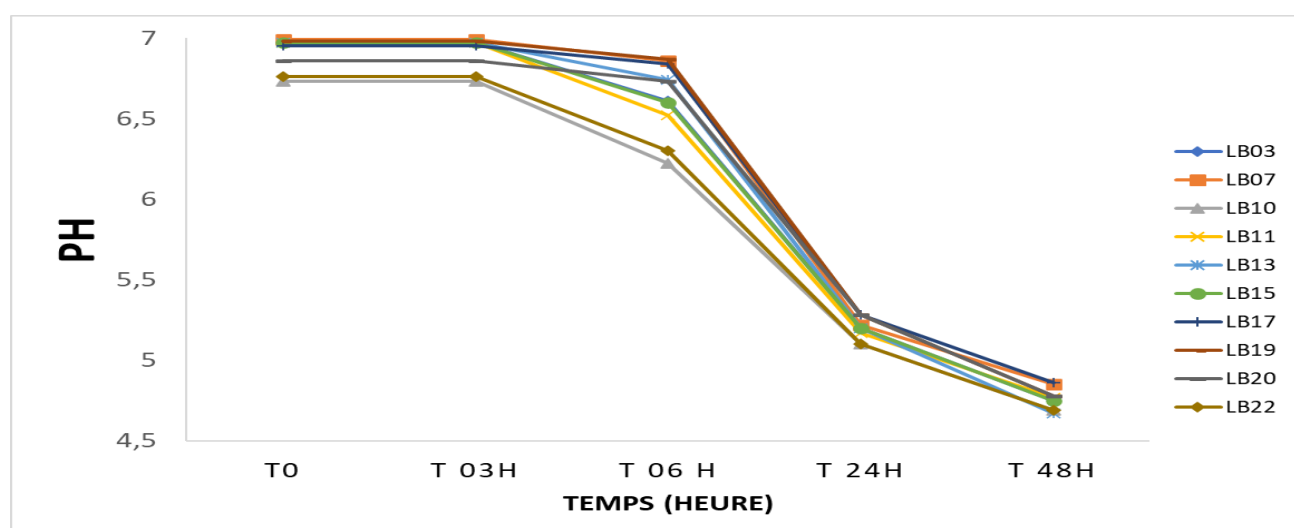


Figure 11: Variation du pH en fonction du temps des isolats de lactobacilles

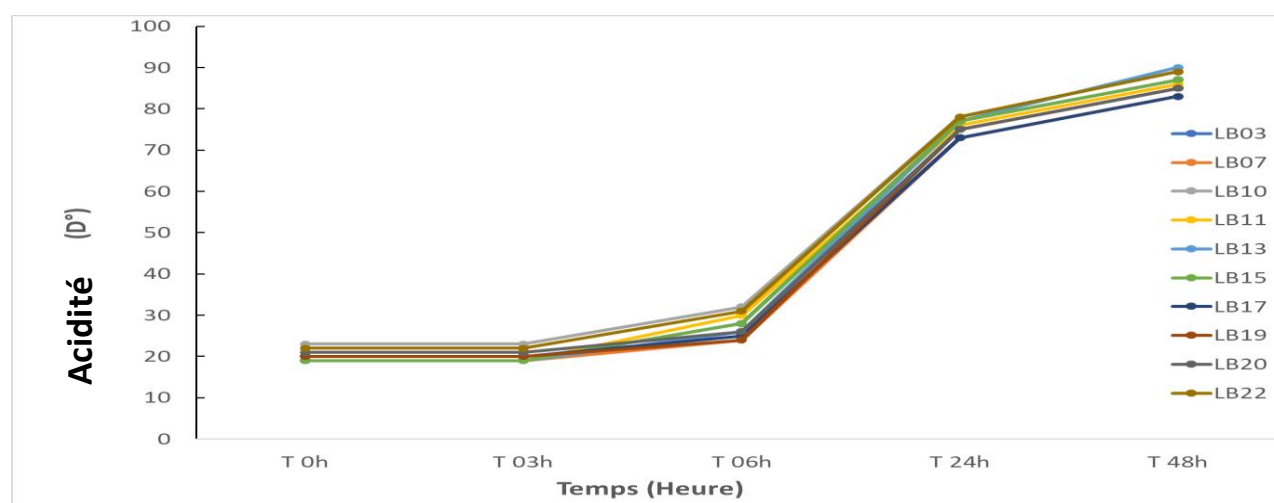


Figure 12: Cinétique d'acidification des isolats de lactobacilles

Nous remarquons que la totalité des cultures bactériennes de lactobacilles étudiées présentent une production progressive en acide lactique et que ce dernier est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu. Après 3 heures d'incubation, les valeurs de pH varient entre pH 6,73 et pH 6,99, en parallèle la quantité de l'acide Dornic produite se situe entre 19 et 23°D. Au bout de 6 h d'incubation la variété de pH reste relativement stable. Après 24 h d'incubation ces valeurs de pH diminuent et se trouvent situées entre pH 5,1 et pH 5,28, de même la quantité de l'acide lactique produite se situe entre 73 et 78 °D. Au bout de 48 h d'incubation ces valeurs trouvent entre pH 4,69 et pH 4,75 de même la quantité de l'acide lactique produite se situe entre 90 et 83° D.

La diminution rapide du pH durant les premières heures est d'une importance cruciale lors de la fabrication de certains produits laitiers tel que le fromage. Dans notre étude l'ensemble des isolats testés ont montré une vitesse d'acidification lente ($\Delta\text{pH} / \Delta\text{T} < 1$) après 6 heures d'incubation dans le lait écrémé. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvé par plusieurs auteurs qui a révélé que les bactéries du genre *Lactobacillus* sont faiblement acidifiantes (**Bennatia, 2021 ; Maflah, 2022 ; Laouaze, 2022**). Cependant la recherche menée par Maghnia (2011) a révélé que les lactobacilles présentent une très importante acidification (acidité $\geq 79^\circ\text{D}$). Par ailleurs, les résultats obtenus pour la capacité d'acidification des différents isolats testés nous ont permis de classer ces derniers comme moyennement acidifiant en raison de leur capacité à produire au bout de 24 heures de fermentation une quantité moyenne d'acide lactique, comprise entre 7,3 g/L et 7,8 g/L. L'isolat LB13 est le plus acidifiant avec une quantité d'acide lactique produites de 9 g/l après 48h d'incubation dans le lait écrémé. De ce fait, nous pouvons dire que les bactéries lactiques testés ne semblent pas être de bons candidats pour les utiliser en tant que culture starter en industrie laitière, cependant leur utilisation en tant que culture mixte est possible.

IV.2 Pouvoir protéolytique :

La protéolyse se traduit par l'apparition d'un halo claire du a la dégradation de la caséine autour des cultures bactériennes ensemencées sur le milieu PCA additionnée du lait écrémé 0 % après 24h d'incubation. Les résultats obtenus lors de la réalisation de ce test sont présenté dans la (**figure 13**). Il en ressort que tous les lactobacilles testés se sont révélés protéolytique à 10 % de lait écrémé. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Dahou *et al.* (2016), qui ont démontré que les bactéries du genre *Lactobacillus*, présentent un caractère protéolytique. L'activité protéolytique sur les caséines du lait est une des propriétés les plus rechercher dans les souches (Cogan *et al.*, 1997, Widyastuti et Febrisiantosa, 2014). En effet, La capacité d'une bactéries lactiques à dégrader les caséines du lait est

essentielle dans la fabrication fromagère durant la maturation que dans le développement des propriétés organoleptique (Veuillemard, 1986 ; Beresford et al., 2001).

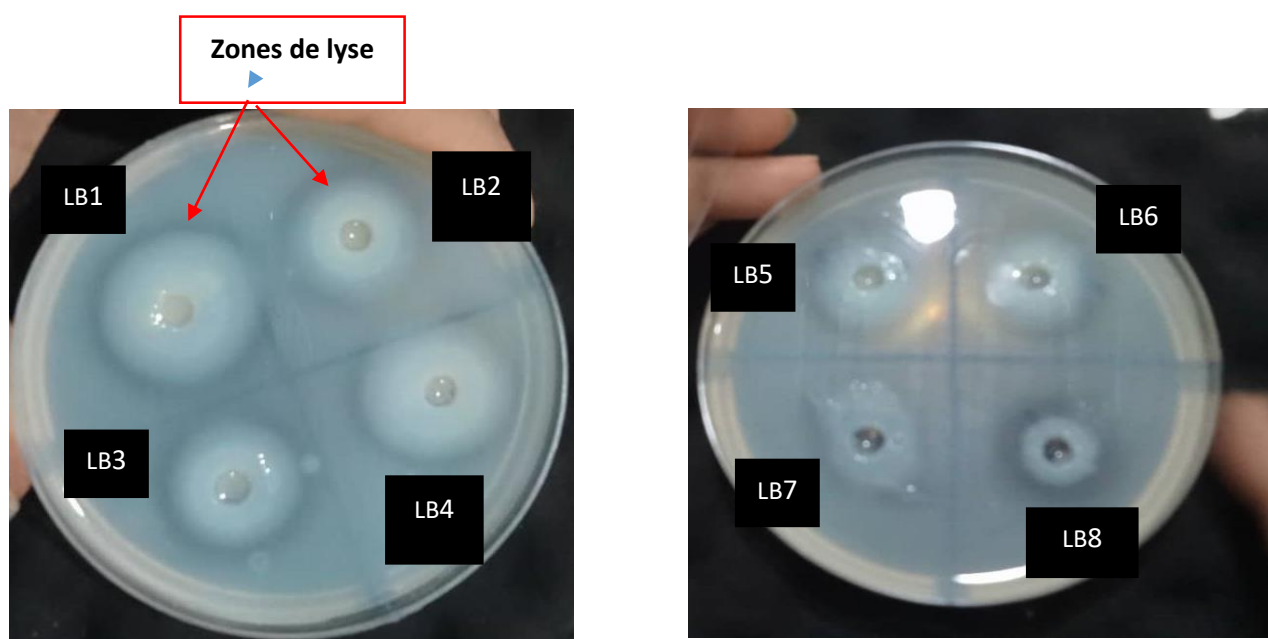


Figure 13 : Observation des résultats obtenus de l'activité proteolytique chez certains lactobacilles « LB1, LB2, LB3, LB4, LB5, LB6, LB7, LB8 »

IV.3 Activité lipolytique :

L'activité lipolytique des culture bactériennes testés a été recherchée sur le milieu MRS supplémenté d'un substrat artificiel «tween 80». La lipolyse se manifeste par la formation d'une zone clair autour des souchesensemencées du a la dégradation de triglycérider autour des souchesensemencées ou un précipite autour de la colonie du a la dégradation complète des acides gras(Janda, 2005). Les résultats obtenus de l'activité lipolytique sont illustrés dans la **figure 14, tableau 4** . D'après ces résultats, il apparaît que les bactéries lactiques testées ont présenté une légère activité lipolytique en formant des faibles précipités autour des colonies bactériennes. Selon (**De Roissard et Luquet, 1994**), les bactéries lactiques sont considérées comme faiblement lipolytiques par comparaison avec d'autres espèces bactériennes. La capacité d'une souche à hydrolyser les lipides est un facteur essentiel contribuant à la maturation, l'aromatisation et la texturisation de certains produits laitiers tel que le fromages mais ne sont pas nécessaires pour leur croissance dans le milieu Lopes *et al.*, 2017).

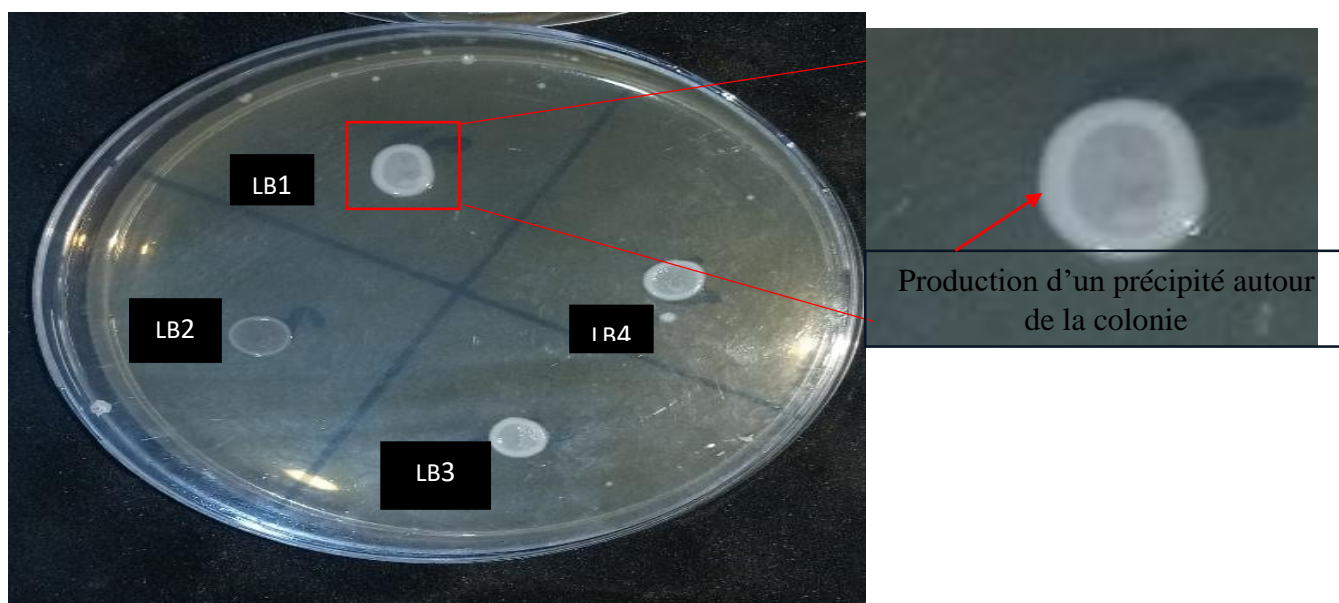


Figure 14 : Observation des résultats obtenus de l'activité lipolytique chez certains lactobacilles « LB1, LB2, LB3, LB4, LB5 »

IV.4 Pouvoir texturant :

La capacité de production des EPS par nos souches a été testée sur milieu MSE additionné de 10% de saccharose. Les résultats sont illustrés dans la (**figure 15**). La production des exopolysaccharides est traduite par l'apparition de colonies larges visqueuses et gluantes. Toutes les souches étudiées ont pu se développer dans le milieu MSE additionné de 10% de saccharose en formant des colonies à aspect gluant témoignant une production d'un agent épaississant, « Les exopolysaccharides ». Ces biopolymères jouent un rôle important dans l'industrie laitière, en particulier dans la fabrication des produits laitiers fermentés tels que les yaourts et les fromages en permettant d'améliorer leur apparence, leur stabilité ainsi que leurs propriétés rhéologiques (**Zarour, 2018**). Nos résultats se concorde avec les nombreux travaux (**Cerning et al., 1990 ; De vuyst et al., 2001 ; Bekar et Dalaa, 2019**) qui ont démontré que les lactobacilles sont capables de produire des EPS. D'après **Benhouana et al. (2019)** les EPS peuvent être utilisées en remplacement de certains additifs alimentaires et stabilisants tels que les protéines de lait, l'amidon, les pectines et autres hydro-colloïdes.

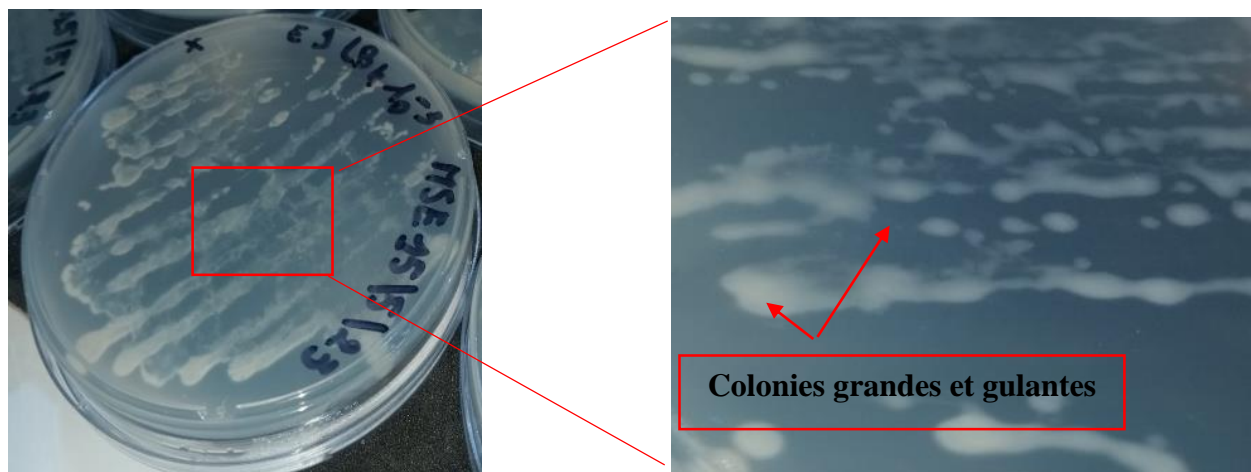


Figure 15 : Aspect des colonies d'une culture de lactobacille «LB 16» sur milieu hypersaccharosé

IV.5 Pouvoir aromatisant :

Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 4**. Tous les lactobacilles testés par la réaction de Vogues Proskauer arrivent à produire des arômes comme l'acétoïne, détecté par l'apparition une coloration rose-rouge intense du milieu Clark et Lubs. Ces bactéries ont donc un pouvoir aromatisant qui pourra contribuer aux caractéristiques organoleptiques des produits fermentés. Nos résultats se rapprochent de ceux de **Montville *et al.*, (1987)**, qui ont montré la production d'acétoïne par les bactéries du genre *Lactobacillus*. La production de composés aromatique est une fonctionnalité technologique importante dans la fabrication des produits laitiers fermentés.

IV.6 Pouvoir antibactérien

Parmi les critères les plus importantes de sélection des micro-organismes probiotiques est leur capacité à ralentir et à inhiber la croissance des bactéries pathogènes par la production de facteurs inhibiteurs (Dib *et al.* 2013). Dans notre étude nous avons testé l'activité antibactérienne *in vitro* de six (N=05) de bactéries du genre *Lactobacillus* (LB 01, LB 02, LB 03, LB 04, LB 05) vis-à-vis d'une souche pathogène *Staphylococcus aureus* prélevée d'une patiente atteinte d'infection urinaire. Pour cela, nous avons utilisé la méthode des touches sur milieu gélosé et les résultats exprimés en taille (mm) de la zone d'inhibition autour des colonies sont présentés dans le tableau 3, figure14 . Les données obtenues ont démontré que toutes les cultures bactériennes présentent un effet antimicrobien. Ils ont produit des zones d'inhibition de différents diamètres allant de 30 mm «LB 01» à 40 mm «LB 03, LB 05 ». Plusieurs études confirment l'activité antagoniste des lactobacilles contre les bactéries pathogènes (Pato *et al.*, 2022 ; Homrani *et al.*, 2022 ; Othman *et al.*, 2017).

Staphylococcus aureus est un agent pathogène important en raison d'une combinaison de virulence Médie par la toxine, d'invasivité et de résistance aux antibiotiques (Yves le Loir *et al.*, 2003). Ce microorganisme fait partie des principales bactéries multirésistantes et fait partie de la catégorie des agents pathogènes responsable des infections urinaires (Matta *et al.*, 2018). L'utilisation des lactobacilles dans un traitement probiotique et plus particulièrement dans les traitements d'infection urinaire peut représenter une alternative à l'utilisation des antibiotiques. Les propriétés antibactériennes de ces microorganismes dépendent de plusieurs critères: le pH, le milieu de croissance et la production de substances antibactériennes comme les bactériocines, les acides organiques, les acides gras et le peroxyde d'hydrogène (Huttunen *et al.*, 1995).

Tableau 3 : Résultats de l'activité antibactérienne des lactobacilles vis-à-vis des de *Staphylococcus aureus* par la méthode des spots.

Code lactobacilles	Diamètre des zones d'inhibition (mm)
LB 01	30
LB 02	32
LB 03	40
LB 04	32
LB 05	40



Figure 14: Effets des lactobacilles sur la croissance de *S. aureus* par la méthode des spots

Conclusion

Conclusion

Les objectifs visés de cette étude étaient l'étude des caractéristiques biochimiques et physiologiques de certains isolats de lactobacilles autochtones ainsi que l'évaluation de leurs aptitudes technologiques et probiotiques.

La majorité des isolats ont présentés les mêmes caractéristiques biochimiques et physiologique à avoir, homofermentatif, capable de croître à 10 et 45 °C, en présence de NaCl à 6,5 % ainsi que dans les deux milieux alcalin pH 9,6 et acide pH 4,5 et incapable de résister à une température de 60°C durant 30 minutes. Quatre isolats se sont révélés hétérofermentaire (LB 03, LB 08, LB 16 et LB 21) et trois n'ont pas pu croître dans le milieu hypersalé (LB 11, LB 15 et LB 19).

L'évaluation des aptitudes technologiques nous ont permis de caractériser les lactobacilles comme moyennement acidifiant en raison de la quantité moyenne d'acide lactique produite, mais ont présenté une faible vitesse d'acidification pendant les premières 6 heures. De ce fait ces bactéries ne semblent pas être de bonnes candidates pour les utiliser en tant que culture starter en industrie mais peuvent être utilisées en culture mixte. Par ailleurs, tous les lactobacilles testés produisent des substances aromatiques et présentent une activité protéolytique et lipolytique, ainsi qu'un pouvoir texturant. Ces sont des facteurs très importants au développement des propriétés organoleptiques des produits fermentés et plus particulièrement laitiers.

Les résultats fournis par l'étude *in vitro* de l'activité antibactérienne ont démontré que toutes les cultures bactériennes testées présentent un fort effet inhibiteur vis-à-vis de la souche pathogène *S. aureus* avec des zones d'inhibition de différents diamètres allant de 30 « LB 01 » à 40 mm « LB 03 et LB 05 ». L'utilisation des lactobacilles dans un traitement probiotique et plus particulièrement dans les traitements d'infection urinaire peut représenter une alternative à l'utilisation des antibiotiques.

Au final, on peut dire que la majorité des lactobacilles étudiés sont de bonnes candidates pour application en industrie agroalimentaire et plus particulièrement laitière car elles montrent des comportements remarquables vis-à-vis de tous les tests réalisés lors de ce travail. Cependant, il est important de compléter ce travail par des études plus approfondies, afin de confirmer l'effet probiotique de ces bactéries notamment leur résistance vis-à-vis des conditions hostiles ou encore leurs aptitudes à se fixer au niveau des cellules épithéliales intestinales. Il serait également intéressant de faire un essai de fabrication d'un lait fermenté avec les souches ayant montré de bonnes propriétés technologiques.

Références bibliographiques

Adams MR, Moss MO. (2000). Food Microbiology. Second Edition, The Royal Society of Biochemistry éd. Cambridge. UK. pp. 318-323.

Ait-Belgnaoui A., Lamine F., Han W., Eutamene H., Fioramonti J., Bueno L. et Theodorou V., 2005. A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. Nutr. Ali. Fonct. 3: 59-63.

Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. et Helander I.M., 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negatif bacteria by disrupting the outer membrane. App. Env. Microbiol. 66(5) : 2001-2005.

Ammor M.S. et Mayo B., 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. Meat. Science. 76 : 138-146.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. & Chevallier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food control, 17, 454-461.

Axelsson L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Lactic acid bacteria, Microbiological and Functional Aspect. Third Edition. Marcel Dekker, 18p.

Axelsson L., 2004. Classification and physiology. In : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66

Barefoot, S.F., Kleanhammer, T.R. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, lactacin. Antimicrobial.Agents chemother. 26 : 328- 334.

Barinov A. Bolotin A. Langella P. Maguin E. Van De Guchte, (2011). Genomics of the genus *Lactobacillus*. In « Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research » Sonomoto and Yokota/ Caister Academic Presséd. Norfolk. United Kingdom. pp. 3-32.

Bath K. Roos S. Wall T., and Jonsson H. (2005). The cell surface of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 highlighted by identification of 126 extracellular proteins from the genome sequence. FEMS Microbiol Lett. 253, 75–82.

Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J.P., 2008. Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 661-765.

- Bekar I et Dalaa A. 2019.** Contribution a l'étude d'aptitudes technologique des bactéries lactique isolées a partir de lait de chèvre. Mémoire de master, Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'AïnTémouchent.66p.
- Benhoua, I. S., Heumann, A., Rieu, A., Guzzo, J., Kihal, M., Bettache, G., Champion, D., Coelho, C. & Weidmann, S. 2019.** Exopolysaccharide produced by *Weissella confusa*: Chemical characterisation, rheology and bioactivity. *International Dairy Journal*, 90, 88-94.
- Bourgeois C.M. et Larpent J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 432-704.
- Busscher H. J. et Weerkamp A. H. (1987).** Specific and non-specific interaction in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 165-173.
- Cerning, J., Bouillanne, M., London, M., Deslazeaud, M.J. 1990.** Comparaison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Sci Aliments*.10:443-451.J.challenges for industrial applications. *Eur. Food Res. Technol*, p1-12.
- Cholet O., 2006.** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.
- Corrieu G. Luquet FM. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : « Bactérieslactiques, de la génétique aux ferments ». TEC&DOC/ Lavoisier éd. Paris. France. 19-106.
- De Man, JC. Rogosa M. Sharpe, ME. (1960).** A medium for the cultivation of. *J. App. Bacteriol.* 23 (1): 130-135.
- De Roissard H et Luquet FM. (1994).** Bactéries lactiques. *LoricaUriage*.1, 25-116.
- De Vos P. Garrity GM. Jones D. Krieg NR. Ludwig W. Rainey FA. Schleifer KH. Whitmanet WB. (2009).** Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In : « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Springer éd., New York. pp.19-511.
- De vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., Degeest, B. 2001.** Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria *Int. Dairy J.*, 11 pp. 687-707.

- Dellaglio F., de Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D., 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). Loriga, Uriage. 1: 25-116.
- Denohue D.C., 2004.** Safety of novel probiotic bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 531-546.
- Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. et Shaha N.P., 2007.** Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. INRA, EDP Sciences. 86 : 21-38.
- Dortu C. et Thonart P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agron. Soc. Env. 13(1): 143-154.
- Eckburg PB. Bik EM. Bernstein CN. Purdom E. Dethlefsen L. Sargent M. Gill SR. Nelson KE. Relman DA. (2005).** Diversity of the human microbial flora. Science. 308, 1635-1638.
- Ferain T. Hobbs J. N. Richardson J, Bernard N. Garmyn D. Hols P. Allen N. E. and Delcour J. (1996).** Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. 178, 5431– 5437.
- Fernandez, L., Beerthuyzen, MM, Brown J., Coolbear, T., Holland R et Kuipers OP. 2000.** Cloning, Characterization, controlled overexpression and inactivation of major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. App. Env. Microbiol. 66,1360-1368.
- Gbassi K.G., Vandamme T., Yolou S.F. et Marchioni E., 2011.** In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. Int. Dairy J. 21: 97-102.
- Giaouris E. Chapot-Chartier M. P. et Briandet R. (2009).** Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. Int J Food Microbiol. 131(1), 2-9.
- Guarner F., Khan A.G., Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A., Krabshuis J. et Le Mair T., 2008.** Recommandation Pratique : Probiotiques et Prébiotiques. WGO Practice Guidelines.
- Hammes. W. P. et Hertel. C. (2006).** The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Prokaryotes. 4, 320–403.

- Handwerger S. Pucci M. J. Volk K. J. Liu J. and Lee M. S. (1994).** Vancomycin resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *J. Bacteriol.* 176, 260–264.
- Hassaine O, 2013.** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien. Thèse de doctorat en biotechnologie : l'université d'Oran-Essenia, p. 57-102
- Hogg T., 2005.** Essential microbiology. John Wiley & Sons, Ltd. 188-190.
- Homrani M. 2020.** Caractérisation physico-chimique, spectre pollinique et propriétés biologiques de miels algériens crus de différentes origines florales. Thèse de doctorat. Univ Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. P253.
- Homrani, M, Dalache, F, Bouzouina, M, Nemmiche, S, Homrani, AEK. 2019.** Antibacterial Activities of Algerian raw Honeys and Isolated *Lactobacillus* against Gram- negative Bacteria. : *Advances in bioresearch*, 1(10). 31-39.
- Kailasapathy K., 2002.** Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* 3 : 39-48.
- Karam N., 1995.** Constitution d'un soucier de bactéries lactiques à intérêt biotechnologique : étude biochimique et moléculaire. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie. 212
- Khalid N. M et Marth E. H. (1990).** Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73, 158-167.
- Klaenhammer, T.R. 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMSMicrobiology Reviews.* 12 : 39-86.
- Kumari A., Makeen K., Garg A.P., Marotta F., Gupta1 C. et Divya., 2009.** Effet of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCSUB202, on mode of action of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MTCC3038. *Int. J. Prob. Preb.* 4(3) : 1-6.
- Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., 2005.** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 144 : 237-250.
- Lamoureux L., 2000.** Exploitation de l'activité β -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. National Library of Canada. 23-47.

- Larsen, A.G., Vogensen, F.K., Josephsen J. 1993.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus*smi401. J Appl Bacteriol. 75 : 113-122.
- Lashani, E., Davoodabadi, A., Soltandallal, M.M. 2018.** Antimicrobial Effects of *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Paracasei* Isolated from Honey against *Staphylococcus Aureus*. J Babol Univ Med Sci. 20 (3): 44-49.
- Leveau J.Y. et Bouix M., 1993.** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 85-87.
- Liu, SQ., Holland, R., Crow, VL. 2001.** Purification and properties of intracellular esterases from *Streptococcus thermophilus*. International Dairy Journal, vol 11: 27-35.
- Maghnia D., 2011.** Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels algériens. Mémoire de magister en microbiologie alimentaire. Université d'Oran-es-senia. 126p
- Mäyrä-Mäkinen A. et Bigret M., 2004.** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 73-102.
- Millette M., Luquet F.M. et Ruiz M.T., 2008.** Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. Dairy Sci. Technol. 88 : 695-705.
- Monnet V., Latrille E., Béal C. et Corrieu G., 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 512-592.
- Montville T.J., Meyer M.E., Hsu A.H.M. And Huang G.T.C., 1987.** High-pressure liquid chromatography and wide bore capillary gas-liquid chromatography methods for quantification of acetoin and diacetyl from bacterial cultures. Journal of microbiological methods 7: 1- 8.
- Mounia H, Dalache F, Bouzouina M, Nemmiche S, Homrani AEK. 2018.** Antibacterial activity of *Lactobacilli* detected in Algerian raw honeys against gram-negative bacteria. SAJEB, 3(8).
- Navarre W.W. and Schneewind O. (1999).** Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol Mol Biol Rev. 63,174–229.

- Nousiainen J. Et Setälä J. (1998).** Lactic acid bacteria as animal probiotics. In Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. Edited by S. Salminen and A. Von Wright. Marcel Dekker, Inc., New York. 437–473.
- Nousiainen J., Javanainen P., Setälä J. et Wright A.V., 2004.** Lactic acid bacteria as animal probiotics. In : Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 547-560.
- Ogunbanwo S.T., Sanni A.I., et Onilude A.A., 2003.** Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. African J. Biotechnol. 2(8) : 219-227.
- Ozgun D.Vural HC. (2011).** Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. J.M.G.G. 3(3),46-49.
- Palomares I.C., Pérez-Morales R. et Acedo-Félix E., 2007.** Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. Rev. Latinoam. Microbiol. 49(3-4): 46-54.
- Pilet M.F., Magras C., Federighi M., 1998.** Bactéries lactiques. In : Manuel de bactériologie alimentaire (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). Polytechnica. Paris. 235-260.
- Quirynen M. and Bellon C. M. 1995.** The influence of surface roughness and surface free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. J Clin Periodontol. 22 (1), 1-14.
- Reuter G. (2001).** The *Lactobacillus* and Bifidobacterium Microflora of the Human Intestine: Composition and Succession. Curr. Issues. Intest. Microbiol.2(2), 43-53.
- Reyes-Gavilan C.G., Suarez A., Fernandez-Garcia M., Margolles A., Gueimonde M. et Ruas-Madiedo P., 2011.** Adhesion of bile-adapted Bifidobacterium strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. Res. Microbiol. 162 : 514-519.
- Robin J.M. et Rouchy A., 2001.** Les probiotiques. CEDN. Nutrithérapie. Info.1-4
- Rodriguez J.M., Martínez M.I., Horn N. et Dodd H.M., 2003.** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 80 : 101-116.
- Rogers H. (1984).** Bacterial Cell Structure. Aspects of Microbiology 6. American Society for Microbiology, Washington D.C. 494p.

- Roissart H. Luquet FM. (1994).** Méthodes d'Identification des Bactéries Lactiques. In :« Bactéries Lactiques ; Aspects fondamentaux et technologiques ». Vol 2. Coquand éd., Grenoble. France. pp. 141-167.
- Rokka S. et Rantamaki P., 2010.** Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. Eur. Food Res. Technol. 213 : 1-12.
- Rosenberg M. et Doyle R.J. (1990).** Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement, and significance. In Doyle R. J. and Rosenberg M. (Ed.). American Society for Microbiology, Washington, D. 1-38.
- Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N.E., 2009.** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud-Ouest Algérien. European. J. Sci. Res. 34 (2) : 218-227
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Matto J., et Mattila-Sandholm T., 2000.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84 : 197-215.
- Salminen S., Gorbach S., Lee Y.K. et Benno Y., 2004.** Human studies on probiotics: what is scientifically proven today. In : Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 515-530.
- Savage D. C. (1992).** Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. Appl. Environ Microbiol. 58, 1992-1995.
- Schillinger U. Guigas C. Et Holzapfel WH. (2005).** In vitro adherence and other properties of Lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. Int Dairy J. 15, 1289-1297.
- Schleifer K. H. Et Ludwig W. (1995).** Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. System Appl Microbiol. 18, 461-467.
- Shah N.P., 2007.** Functional cultures and health benefits. Int. Dairy J. 17: 1262-1277. Percival M., 1997. Choosing a probiotic supplement. Clin. Nutr. Insights. 6(1): 95-100.
- Siegmund H. Rechinger K. B. et Jakobsen M. (2000).** Dynamic changes of intercellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2330-2335.
- Sleytr U. B. Messner P. Et Sára M. (1993).** Crystalline bacterial cell surface layers: general principles and application potential. J. Appl. Bact. 74(Suppl), 21-32.

Stiles Michael E., Holzapfel Wilhelm H., 1997. Lactic Acid Bacteria of foods and their current taxonomy. Inter .J.food Microbiol,36:1-29.

Stiles, M. E. Et Holzapfel, W. H. (1997). Review article lactic acid bacteria of foods and current taxonomy, int. J. Microbiol. 36, 1-19.

Tailliez P (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitat, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. Antibiotiques. 6(1), 35-41

Temmerman R., Pot B., Huys G. et Swings J., 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. Int. J. Food Microbiol. 81: 1-10.

Teuber Michael, Geis Arnold 2006. The Genus lactococcus .prokaryotes 4:2005-228.

Titiek F.D., Endang S.R., Djoko W. et Slamet S., 1996. Antimicrobial substance produced by *Lactobacillus* sp. TGR-2 isolated from Growol. Indonesian. Food Nutr. Prog. 3(2) : 29-34.

Veuillemard, J.C. 1986. Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Tec & doc, lavoisier. Paris. 3 :1-65.

Vinod Kumar, J., Somesh, S., Neerja, S. 2006. Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables. Food technology and Biotechnology, 44 (3) : 435- 439.

Walter J. (2008). Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract:Implications for Fundamental and Biomedical Research. Appl. Environ, Microbiol. 74,4985-4996.

Zarour, K. 2018. Etude de la diversité phénotypique, génotypique et aptitudes technologiques des souches de *Leuconostoc* isolées localement, Thèse Doctorat, Université Oran 1.

Annexes

Annexe 1

Les milieux de culture :

Milieu MRS gélose (Man et al ,1960)

• Peptone	10 g
• Extrait de viande	10 g
• Extrait de levure	5 g
• Glucose	20 g
• Tweenn80	1 ml
• Phosphate di potassique	2 g
• Acétate de sodium	5 g
• Citrate d'ammonium	2 g
• Sulfate de magnésium	0.2 g
• Sulfate de Maganése	0,5 g
• Agar- agar	15 g
• Eau distillée	1 L
• Stérilisation par autoclavage à 120 C° Pendant 15 min	

Milieu MRS bouillon (sans citrate) (Man et al ,1960)

• Peptone	10 g
• Extrait de viande	10 g
• Extrait de levure	5 g
• Glucose	20 g
• Tweenn80	1 ml
• Phosphate di potassique	2 g
• Acétate de sodium	5 g
• Sulfate de magnésium	0.2 g
• Sulfate de Maganées	0,5 g
• Eau distillée	1 L
• Stérilisation par autoclavage à 120 C° Pendant 15 min	

Milieu MRS (ManRogosa et Sharpe, 1960) : Pour l'isolement des bactéries lactiques

• Extrait de levure	5 g
• Extrait de viande	10 g
• Peptone	10 g

• Acétate de sodium	5 g
• Citrate de sodium	2 g
• Glucose	20 g
• KH ₂ PO ₄	2 g
• MgSO ₄	0, 2 g
• MnSO ₄	0, 05 g
• Agar	15 g
• Eau distillée q.s.p	1 L
• pH=5,5 / Autoclavage : 120°C pendant 20minutes	

Milieu Bouillon Nutritif : Pour les cultures jeunes des bactéries pathogènes

• Extrait de viande	1 g
• Extrait de levure	2 g
• Peptone	5 g
• Chlorure de sodium	5 g
• Eau distillé q.s.p	1 L
• pH=7 / Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes	

Milieu PCA au lait écrémé

• Peptone de caséine	5 g
• Extrait de levure	2,5 g
• Glucose	1 g
• Agar	20 g
• Eau distillée q.s.p	1 L
• pH=7 / Autoclavage 120°C pendant 20 min	

Milieu Clark et Lubs

• Peptone	5 g
• Glucose	5 g
• KH ₂ PO ₄	5 g
• Eau distillée q.s.p	1000 ml
• pH =7 / Autoclavage 120°C pendant 20min	

Milieu MSE hypersaccharosé

• Extrait de levure.	5 g
• Tryptone.	10 g
• Saccharose.	100 g
• Glucose	2.5 g
• Citrate de sodium	1g
• Azide de sodium	0.0075 g
• Eau distillée q.s.p	1000 ml
• Agar	18g
• pH=6,5 /Autoclavage 121°C pendant 15 min	

Annexe 2

Matériel utilisé:

Agitateur magnétique	Béchers
Autoclave	Boîte de Pétri
Balance analytique	Burette graduée
Bec Bunsen	Eprouvette
Bain marie	Pipettes graduée
Micropipette	Spatules
Etuve	Tubes à essais
pH-mètre	Plaque chauffante
Thermomètre électronique	Vortex
Erlenmeyer	Ance de platine
Microscope optique	

Annexe 3

Les étapes de coloration de Gram :

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes
- Laver à l'eau
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique avec huile d'immersion
(×100)
- Les bactéries à Gram positif apparaissent

Annexe 4

Tableau 4. Récapitulative des résultants des conditions hostiles

Isolat	Gram	Catalase	Forme	Nacl + 6,5 %	PH		Thermo Résistance	T°		Type fermentaire
					4,5	9,6		10 °	45°	
LB 1	+	-	<i>Bacille</i>	+	4,5	9,6	-	10 °	45°	Homo
					+	+		+	+	
LB 2	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	homo
LB 3	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	hétro
LB 4	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	homo
LB 5	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	homo
LB 6	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	homo
LB 7	+	-	<i>Bacille</i>	+	-	+	-	+	+	homo
LB 8	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	hétro
LB 9	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	homo
LB 10	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	homo
LB 11	+	-	<i>Bacille</i>	-	+	+	-	+	+	homo
LB 12	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	homo
LB 13	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	homo
					+	+				
LB 14	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	homo
LB 15	+	-	<i>Bacille</i>	-	-	+	-	+	+	homo
LB 16	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	hétro
LB 17	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	homo
LB 18	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	homo
LB 19	+	-	<i>Bacille</i>	+	-	+	-	+	+	homo
LB 20	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	homo
LB 21	+	-	<i>Bacille</i>	+	+	+	-	+	+	hétro
LB 22	+	-	<i>Bacille</i>							homo

- **Homo:** homofermentaire
- **Hétro:** hetrofermentaire
- **+** : Croissance positive
- **-** : Croissance négative

Annexe 5

Tableau 5

Isolats	T 0h		T 03h		T 06h		T 24h		T 48h	
	pH	Densité "°D"	pH	Densité "°D"	pH	Densité "°D"	pH	Densité "°D"	pH	Densité "°D"
LB03	6,97	19	6,97	19	6,61	28	5,2	77	4,75	87
LB07	6,99	19	6,99	19	6,86	24	5,22	73	4,85	83
LB10	6,73	23	6,73	23	6,22	32	5,1	78	4,69	89
LB11	6,97	19	6,97	19	6,52	30	5,17	76	4,77	86
LB13	6,97	19	6,97	19	6,74	26	5,2	77	4,67	90
LB15	6,97	19	6,97	19	6,6	28	5,2	77	4,75	87
LB17	6,95	20	6,95	20	6,84	25	5,28	73	4,86	83
LB19	6,98	20	6,98	20	6,87	24	5,28	75	4,78	85
LB20	6,86	21	6,86	21	6,73	26	5,28	75	4,78	85
LB22	6,76	22	6,76	22	6,3	31	5,1	78	4,69	89