

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
Département de Biologie

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : Sciences Biologiques

Option : Nutrition et Santé

Présentée par

Mme. KOUADRI BOUDJELTHIA Nacima

Intitulé :

Etude de l'adaptation des probiotiques au tractus digestif et détermination de leurs effets bénéfiques

Soutenue le 15/04/2024

Devant le Jury

Président	Mme. Ziar Hasnia	Pr	U. Mostaganem
Directeur de thèse	Mr. Riazi Ali	Pr	U. Mostaganem
Examineur	Mr. Moussa Boudjema Boumedine	Pr	U. Tlemcen
Examineur	Mr. Abbouni Bouziane	Pr	U. Sidi Bel Abbas
Examineur	Mme. Meziane Malika	Pr	U. Chlef
Examineur	Mr. Chaalel Abdelmalek	MCA	U. Mostaganem

Année universitaire : 2023/2024

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été réalisée dans sa plus grande part au sein du laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem dirigé par le Pr Ali Riazi. L'identification Génotypique des isolats lactiques a été réalisée à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA de Jouy-En-Josas, Paris, France). L'analyse MALDI-TOF MS a été réalisé au centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) de Bousmail à Alger. L'étude histologique a été effectuée au niveau du laboratoire vétérinaire de Mostaganem.

Je tiens, tout d'abord, à témoigner ma profonde reconnaissance à mon directeur de recherche, Mr. **RIAZI Ali**, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem, pour m'avoir accepté dans son laboratoire, initiée à la recherche et pour avoir consacré tout son temps et ses moyens à la bonne conduite de ce travail.

Mes respectueux remerciements sont adressés aux membres du jury :

- **Mme. ZIAR Hasnia**, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem, pour avoir bien voulu présider le jury de ma thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

-Le **Pr. ABBOUNI Bouziane**, de l'université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbes pour avoir accepté d'apporter ses critiques de microbiologiste à ce travail

-Le **Pr. MOUSSA BOUDJEMAA Boumedine** de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen pour m'avoir honoré de sa présence à cette soutenance

-La **Pr. MEZIANE Malika** de l'université Hassiba Ben Bouali de Chlef pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

- Le **Dr. CHAALEL Abdelmalek**, Maître de conférences classe A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour sa participation à l'examen de ce travail. Soyez tous assurés de ma profonde reconnaissance et veuillez recevoir mes sincères remerciements.

J'adresse toute ma reconnaissance à **Mr. Philippe GERARD** et **Mme. Magalie MONNOYE**, respectivement directeur de recherche et chargée de recherche à l'INRA de

Kouadri Boudjelthia N. (2024). Etude de l'adaptation des probiotiques et détermination de leurs effets bénéfiques. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques, Université de Mostaganem.

Jouy-en-Josas (France), pour m'avoir initiée aux techniques de biologie moléculaire d'identification des souches. Je les remercie également pour les précieux conseils pratiques qu'ils m'ont prodigué durant mon séjour dans leur laboratoire.

Je tiens également à remercier mon amie et collègue le **Dr. BEKENNICHE Nahla**, d'avoir été présentes avec ces conseils, ces encouragements, et son aide. Je remercie aussi Dr. **BELABES Meriem** pour son aide.

Je remercie également **Mr. KEBIR Ahmed**, Directeur du Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem, pour m'avoir permis d'accéder librement au laboratoire pour réaliser mes manipulations dans les meilleures conditions possibles. Je témoigne mon respect également à **Mr. BENMAHDI Tarek, responsable** du service d'histopathologie à l'hôpital Che Guevara de Mostaganem, pour m'avoir permis d'approfondir mes connaissances en histologie, je le remercie pour tous ses efforts, ses explications, ses précieuses suggestions et sa disponibilité malgré sa charge de travail.

Je remercie également Dr. **Ait Saada Djamel** Directeur du Laboratoire de technologie alimentaire et de nutrition, Département de biologie, Faculté des sciences naturelles et de la vie, pour ces conseils et ces encouragements.

Un grand merci à tous mes étudiants que j'ai encadré pour avoir travaillé avec moi et faire avancer mes recherches, ainsi que pour leur dévouement et le respect qu'ils m'ont témoigné.

Mes respects s'adressent aussi aux Dr. Sraiech, Dr. Lahouel et Dr. Ben Aïssa, Médecins vétérinaires, je les remercie vivement pour leur soutien, leur aide et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je salue chaleureusement mes tous mes collègues enseignants des départements de Biologie, Sciences Alimentaires et Halieutique pour leurs encouragements ainsi que toute l'équipe du laboratoire des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de santé.

Enfin merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail

KOUADRI BOUDJELTHIA Nacima

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents qui ont fait de moi ce que je suis maintenant. . . , qui m'ont beaucoup épaulé pour finaliser cette thèse malgré ma responsabilité familiale, je leurs suis très reconnaissante ; et je n'oublie pas aussi leur amour, leur présence, leur soutien et leurs encouragements tout au long de mes études.

Que dieu les préserve en bonne santé et leur accorde longue vie

Merci Maman et Merci Papa

*A ma fille **NOUSSAIBA**, mon cœur et mon bonheur*

Je remercie Dieu de t'avoir eu ma chérie,

T'es mon cadeau du ciel !

A mes chers frères et leurs femmes

Abderraouf et Mohamed, Zohor et Samira

Mercie pour vos encouragements

A Mes neveux et ma nièce

MEHDI, NABIL ET SARAH

A mes amies

Fatima, Amel, Manar, Maha et ma cousine Soumia

Nacima

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are known as beneficial bacteria due to their probiotic properties which they exert in the host if they manage to overcome the gastrointestinal hostility of the digestive tract. This study goals the screening of new LAB from local cow's milk in order to be assessed for their probiotic properties. To do so; phenotypic, genotypic and MALDI-TOF mass spectrometry methods were used to identify the isolates which were furtherly in vitro essayed for their survival to the gastrointestinal conditions (pH 2, 0.3% pepsin, 0.5% bile salts, 0.1% trypsin, and 0.1% pancreatic amylase), their antimicrobial and antioxidant activities. The comparison of sequencing with GenBank database showed high similarity with Lactobacilli bacteria. Eight isolates were identified as *Lactiplantibacillus plantarum* (100%) and one isolate as *Lacticaseibacillus rhamnosus* (95.75%). The MALDI-TOF MS analysis of the isolates confirms that strains belong to the group of lactobacilli bacteria, particularly *Lactiplantibacillus plantarum*. The notable tolerance of the isolated strains to the in vitro host simulated gastrointestinal conditions was evidenced by their highly significant ($P < 0.001$) survival rate. All bacteria exhibit an antibacterial activity against food borne pathogenic strains with inhibition zone diameters ranging from 4.9 mm for *Aspergillus niger* ATCC 106404 to 17.47mm for *Candida albicans* ATCC 10231. There is a very high significant inter-species difference ($P < 0.001$) in the antioxidant activity of the isolated bacteria. The highest DPPH scavenging activity (92.15%) was obtained with LbN09 strain. A significant preventive effect of the *Lactiplantibacillus plantarum* LbN14 strain against Dextran Sodium Sulfate salt induced colitis in male Wistar rats was observed, protecting Wistar rats against flare-ups of inflammation. The probiotic strain *Bifidobacterium animalis* sub sp *lactis*: Bb12; and the ultra-biotic complex have shown a similar protection especially on preventive administration before the development of the disease, unlike the drug sulfasalazosporin used for the treatment of ulcerative colitis. In the light of these results, some of the strains isolated from raw milk of the local Algerian breed cows have probiotic properties giving them a possible use in preserving food from microbial spoilage and oxidation during storage.

Key words: Lactic Acid Bacteria (LAB), raw cow's milk, probiotic, antioxidant, antibacterial.

Résumé

Les bactéries lactiques (LAB) sont qualifiées de bactéries bénéfiques en raison de leurs propriétés probiotiques qu'elles exercent chez l'hôte si elles parviennent à vaincre l'hostilité gastro-intestinale du tube digestif. Cette étude vise l'isolement de nouvelles souches de bactéries lactiques afin d'évaluer leurs propriétés probiotiques. Des méthodes phénotypiques, génotypiques et de spectrométrie de masse MALDI-TOF ont été utilisées pour identifier les isolats qui ont ensuite été testés in vitro pour leur survie aux conditions gastro-intestinales (pH 2, 0.3 % de pepsine, 0.5 % de sels biliaires, 0.1 % de trypsine et 0.1 % d'amylase pancréatique), leurs activités antimicrobienne et antioxydantes ont également été évaluées. La comparaison du séquençage avec la base de données Genbank a montré une grande similitude avec les *Lactobacilli*. Huit isolats ont été identifiés comme *Lactiplantibacillus plantarum* (100 %) et un isolat comme *Lacticaseibacillus rhamnosus* (95.75 %). L'analyse MALDI-TOF MS des isolats confirme que les souches appartiennent au groupe des lactobacilles, en particulier *Lactiplantibacillus plantarum*. La bonne tolérance des souches isolées aux conditions gastro-intestinales de l'hôte simulées in vitro a été démontrée par leur taux de survie significativement élevé ($P < 0.001$). Toutes les bactéries présentent une activité antibactérienne contre les souches pathogènes d'origine alimentaire avec des diamètres de zone d'inhibition allant de 4.9mm pour *Aspergillus niger* ATCC 106404 à 17.47mm pour *Candida albicans* ATCC 10231. Il existe une différence inter-espèces significativement très élevée ($P < 0,001$) pour l'activité antioxydante des bactéries isolées. L'activité de piégeage du DPPH la plus élevée (92.15 %) a été obtenue avec la souche LbN09. L'étude in vivo est réalisée en utilisant un modèle murin d'inflammation intestinale par le Dextran sulfate de sodium (DSS) à 3% (P/V) chez des rats Wistar. Un effet préventif important de la souche *Lactiplantibacillus plantarum* LbN14, administrée avant le développement de la maladie, vis-à-vis des poussées de l'inflammation similaire à celui de la souche probiotique *Bifidobacterium animalis* sub sp *lactis* (Bb12) et du complexe Ultrabiotique, et plus élevé que celui de la sulfasalazosporine utilisée dans le traitement de la rectolite hémorragique (RCH) a été observé. À la lumière de ces résultats, certaines des souches isolées du lait cru des vaches de race locale algérienne ont des aptitudes probiotiques leur donnant une utilisation possible dans la préservation des aliments contre les altérations microbiennes, l'oxydation pendant le stockage, et une utilisation comme alicament à titre préventif contre certaines inflammations intestinales.

Mots clés : Bactéries lactiques (BL), lait cru de vache, probiotique, antioxydant, activité antibactérienne.

ملخص

تهدف دراستنا إلى عزل بكتيريا لبنية ذات مؤهلات بروبيوتيك المفيدة لصحة الإنسان وضمن هذا الإطار قمنا بعزل البكتيريا اللبنية من حليب البقر الطازج و تم تصنيف تسعة عزل التي تميزت من خلال التحليل البيوكيميائي بموجبها بشكل عصوي، غرام موجب وكتلاز سالب؛ ثم التحليل التسلسلي الجيني للحمض النووي والتحليل البروتيني بتقنية الطيف الكتلي للبكتيريا المعزولة اظهر تواجد نوعين من سلالات البكتيريا اللبنية و مقارنتها مع بيانات بنك الجينات حددت نسبة توافق ب 100% لثمانية عزل على أنه *Lactiplantibacillus plantarum* وعزلة واحدة بتوافق 95.75%

من صنف *Lacticaseibacillus rhamnosus*

وقد تم إثبات التحمل الجيد للسلالات المعزولة تجاه الظروف المعوية المعوية منها الحموضة، الأملاح الصفراوية و الإنزيمات الهاضمة كما سجلت نتائج النشاط المضاد للبكتيريا المسببة للأمراض التي تنتقل عن طريق الأغذية أقطار منطقة تثبيط تتراوح من 4.9 ملم إلى 17.47 ملم، كما يوجد فرق معنوي (<0.001) بين السلالات في النشاط المضاد للأكسدة أثبت كذا الوجود تأثير وفانيكبيرضد التهاب القولونالناجم عن ملاحديكسترا نكبريتاتالصوديوم عند ذكور فئران ويستار عند السلالة المنتقاة (LbN14) والتي كان تأثيرها ايجابي خاصة قبل تطور المرض على عكس العقار المستخدم لعلاج التهاب القولون التقرحي. السلفاسالازوسبورين وفي ضوء هذه النتائج فإن السلالات المعزولة من حليب البقر الطازج تعد سلالات محلية جزائرية تتمتع بخصائص بروبيوتيك مما يتيح لها استخدامات في حفظ الغذاء من الفساد الميكروبي والأكسدة أثناء التخزين

الكلمات المفتاحية:

بكتيريا حمض اللاكتيك (LAB)، حليب البقر الخام، بروبيوتيك، مضاد للأكسدة، مضاد للجراثيم.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN16s: Acide ribosomique 16s
ATP: Adénosine triphosphate
BET : Bromure d'éthidium
dNTP : Nucléotides triphosphates contenant le désoxyribose
DO : Densité optique
DSS : Dextrane Sulfate Sodium
EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HCl : Chlorure d'hydrogène
MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
NCBI: National Center for Biotechnology Information
P/V: Poids / volume
pb: Paire de base
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
pH : Potentiel d'hydrogène.
PNN : polynucléoneutrophiles
QSP : Quantité suffisante pour
RNA : Acide ribonucléique
RNase : Ribonucléase
rpm: Revolution per minute
TAE : Tris, Acétate, EDTA
TBE : Tris Borat Acide éthylène diamine tétra acétique buffer
TE : Tris EDTA
Tris : Tris hydroxy méthyl aminométhane
UFC : Unité Formant Colonie
UV : Ultra-Violet
V/V: Volume / volume

Liste des tableaux et des figures

Liste des Tableaux

N° Tableau	N° page
<u>Tableau 1</u> : Modèles cellulaires in vitro pour l'étude des maladies inflammatoires intestinales.....	10
<u>Tableau 2</u> : Conditions d'étude des souches bactériennes dans des modèles d'inflammations intestinales chez la souris (Kechaou, 2012)	11
<u>Tableau 3</u> : Méthodes d'identification conventionnelles (cultures dépendantes) et génotypiques des lactobacilles (Temmerman <i>et al.</i> , 2004)	18
<u>Tableau 4</u> : Milieux de culture utilisés.....	20
<u>Tableau 5</u> : Séquences des amorces utilisées.....	28
<u>Tableau 6</u> : Composition du milieu réactionnel pour un échantillon PCR.....	28
<u>Tableau 7</u> : Milieu réactionnel pour l'électrophorèse.....	30
<u>Tableau 8</u> : Interprétation standard des scores obtenus par le logiciel du MALDI-TOF.....	33
<u>Tableau 9</u> : Bactéries lactiques utilisées.....	37
<u>Tableau 10</u> : Produits pharmaceutiques utilisés.....	37
<u>Tableau 11</u> : Milieux de cultures et leur utilisation.....	38
<u>Tableau 12</u> : Score histologique des atteintes inflammatoires (Lenoir <i>et al.</i> , 2011)..	45
<u>Tableau 13</u> : Caractères phénotypiques des isolats lactiques.....	51
<u>Tableau 14</u> : Profil fermentaire des neuf isolats réalisés sur galerie API 50CHL (Bio Mérieux, France)	52
<u>Tableau 15</u> : Innocuité des neuf isolats de lactobacilles	54
<u>Tableau 16</u> : Propriétés technologiques des neuf isolats de lactobacilles.....	55
<u>Tableau 17</u> : Scores de similarité (%) des souches identifiées par ARNr 16S.....	66
<u>Tableau 18</u> : Scores d'identification et meilleures correspondances d'identification adaptées par MALDI-TOF MS	70

Tableau 19 : Listes d'identification proposées par la base de données de l'analyse MALDI-TOF MS des souches LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14, et LbN15, respectivement.....	71
Tableau 20 : Evaluation de l'adhésion des isolats lactiques aux cellules épithéliales.....	79
Tableau 21 : Activité antimicrobienne des souches LAB isolées.....	83
Tableau 22 : Evaluation des atteintes macroscopiques de l'inflammation.....	93

Liste des Figures

<u>Figure N°</u>	<u>Page</u>
Figure 1 : Anatomie et physiologie du tu digestif de l'homme (Walter et Ley, 2011)	3
Figure 2 : Coupe histologique d'intestin humain (X200) (Ballouhey, 2018)	6
Figure 3 : Description du microbiote digestif humain (Ouwehand and Vesterlund, 2003)	8
Figure 4 : Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques destinées à l'usage humain (FAO–WHO, 2002)	13
Figure 5 : Modèle de structure secondaire d'ARNr 16s des procaryotes (Neefs et al., 1993)	15
Figure 6 : Analyse phylogénétique des principaux genres constituant les BL basées sur les séquences des ARNr 16S (Schleifer et Ludwig, 1995)	15
Figure 7 : Arbre phylogénétique des principales espèces du genre <i>Lactobacillus</i> basé sur les ARNr 16S (Amann <i>et al.</i> , 1995)	19
Figure 8 : Le spectrophotomètre NanoDrop (Thermos Scientific, Wilmington, DE, USA)	27

<u>Figure 9</u> : Appareils utilisés pour l'extraction de l'ADN bactérien des isolats.....	27
<u>Figure 10</u> : Thermocycleur et le programme PCR pour l'amplification du gène ADNr16s.....	29
<u>Figure 11</u> : Appareils utilisés pour l'électrophorèse sur gel d'agarose.....	30
<u>Figure 12</u> : Etapes du protocole d'identification des isolats par la méthode MALDI-TOF MS.....	32
<u>Figure 13</u> : Etapes du test d'adhésion aux cellules épithéliales.....	35
<u>Figure 14</u> : Les cages d'élevage des rats Wistar.....	39
<u>Figure 15</u> : Protocole expérimental	40
<u>Figure 16</u> : Etapes de préparation des échantillons de colon pour l'examen histologique.....	43
<u>Figure 17</u> : Etapes de coloration des lames à l'hématoxyline et à l'éosine.....	44
<u>Figure 18</u> : Aspect macroscopique des colonies de l'isolat lactique (LbN14) observé après purification par méthode des stries.....	47
<u>Figure 19</u> : Aspect microscopique des neuf isolats de lactobacilles après coloration de Gram (×100)	48
<u>Figure 20</u> : Production d'acétoïne par les neuf isolats lactiques.....	56
<u>Figure 21</u> : Mise en évidence de la production d'exopolysaccharides (EPS) par l'aspect des colonies larges et gluantes des isolats sur milieu hyersaccharosé.....	58

<u>Figure 22</u> : Mise en évidence de la protéolyse sur milieu agar au lait écrémé chez les neuf isolats LbN 1, LbN5, LbN9, LBN 10, LbN11, LbN12, LbN13, Lb14, et LBN 15.....	59
<u>Figure 23</u> : Mise en évidences de l'activité lipolytique sur gélose nutritive (GN) avec émulsion de jaune d'œuf (10% : V/V).	60
<u>Figure 24</u> : Production d'acide lactique exprimée en % d'acide lactique par les isolats de lactobacilles LbN1 ; LbN5 ; LbN9 ; LbN13 ; LbN10 ; LbN11 ; LbN12 ; LbN13 et LbN14.....	62
<u>Figure 25</u> : pH des monocultures de 24h à 37°C d'isolats lactobacilles.....	63
<u>Figure 26</u> : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1%	64
<u>Figure 27</u> : Dendrogramme basé sur les séquences génétiques de l'ARNr 16S.....	75
<u>Figure 28</u> : Taux de survie des souches aux conditions gastro-intestinales simulées	78
<u>Figure 29</u> : Taux de survie des souches aux enzymes digestives.....	79
<u>Figure 30</u> : Observation microscopique de l'adhésion des souches lactiques aux cellules épithéliales.....	84
<u>Figure 31</u> : Activité antioxydante des souches de <i>L. plantarum</i> estimée par l'activité de piégeage des radicaux DPPH (ANOVA, $p < 0,001$).a, b, c, d, e : groupes homogènes	89
<u>Figure 32</u> : Dénombrement du microbiote intestinal	90
<u>Figure 33</u> : Evolution du poids des rats par lot ($P < 0.0001$)	90
<u>Figure 34</u> : Poids moyen d'aliment consommé par les rats de chaque lot.....	93

<u>Figure 35</u> : Evolution des longueurs des colons par lot (P<0,05).....	96
<u>Figure 36</u> : Scores d'évaluation des atteintes histologiques chez les rats des différents lots d'expérimentation (P<0,05)	97
<u>Figure 37</u> : Observation microscopique de coupes histologiques des colons de rats Wistars (Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine)	97
<u>Figure 38</u> : Antagonisme contre, <i>Aspergillus Niger</i> ATCC106404A. LbN9 (9,00 ± 0,50 mm) / B. LbN14 (6,23 ± 1,12 mm)	Annexe
<u>Figure 39</u> : Antagonisme contre <i>Candida albicans</i> ATCC10231A. LbN9 (14,17 ± 0,28 mm) / B. LbN14 (17,47 ± 0,45 mm)	Annexe

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
Chapitre I. Synthèse Bibliographique	
I.1. Le système digestif humain.....	3
I.1.1. Organisation du tractus digestif.....	3
I.1.2. Les organes annexes du tube digestif.....	4
I.1.2.1. Les glandes salivaires.....	4
I.1.2.2. Le pancréas.....	4
I.1.2.3. Le foie	4
I.1.3. Les enzymes digestives.....	4
I.1.4. Histologie du tube digestif.....	5
I.1.5. Le microbiote intestinal.....	6
I.1.5.1. Formation du microbiote intestinal.....	6
I.1.5.2. Rôle du microbiote intestinal.....	7
I.2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) : cas de la rectocolite chronique hémorragique (RCH)	9
I.2.1. Modèles d'étude des inflammations de l'intestin.....	9
I.2.1.1. Modèles <i>in-vitro</i>	9
I.2.1.2. Modèles <i>in-vivo</i>	9
I.3. Probiotiques et bactéries lactiques.....	12
I.3.1. Les probiotiques.....	12
I.3.1.1. Le concept probiotique.....	12
I.3.1.2. Critères de criblage des bactéries à potentiel probiotique.....	12
I.3.1.3. Effets bénéfiques des probiotiques.....	12
I.3.2. Les bactéries lactiques.....	14
I.3.2.1. Définition.....	14
I.3.2.2. Taxonomie.....	14

I.3.2.3. Les Lactobacilles	16
I.3.2.4. Classification des lactobacilles.....	16
I.3.2.5. Méthodes de caractérisation et d'identification des Lactobacilles.....	17
I.3.2.5.1. Méthodes conventionnelles.....	17
I.3.2.5.2. Méthodes d'identification génotypique.....	17
I.3.2.5.3. Méthode d'identification protéomique MALDI-TOF MS.....	17

Chapitre II. Matériels et Méthodes

II. Matériels et Méthodes.....	20
II.1. Matériel Biologique.....	20
II.1.1. Souches lactiques et souches indicatrices.....	20
II.1.2. Milieux de cultures.....	20
II.2. Méthodes.....	21
II.2.1. La collecte des échantillons de lait	21
II.2.2. Isolements, purification et conservation des souches	21
II.2.3. Caractérisation phénotypique et biochimique des isolats.....	22
II.2.3.1. Caractérisation phénotypique.....	22
II.2.3.1.1. Examen macroscopique.....	22
II.2.3.1.2. Examen microscopique.....	22
II.2.3.2. Caractérisation biochimique	22
II.2.3.2.1. Recherche de la catalase.....	22
II.2.3.2.2. Croissance à différentes températures.....	23
II.2.3.2.3. Croissance sur milieux hypersalés.....	23
II.2.3.2.4. Croissance à pH acide.....	23
II.2.3.2.5. Recherche de l'oxydase.....	23
II.2.3.2.6. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH).....	24

II.2.3.2.7. Profil fermentaire.....	24
II.2.3.3. Caractères sécuritaires des isolats.....	24
II.2.3.3.1. Test d'hémolyse	24
II.2.3.3.2. Antibiorésistance.....	24
II.2.3.4. Caractères technologiques des isolats	25
II.2.3.4.1. Production d'acétoïne.....	25
II.2.3.4.2. Production d'exopolysaccharides.....	25
II.2.3.4.3. Activité protéolytique	25
II.2.3.4.4. Activité lipolytique.....	25
II.2.3.4.5. Pouvoir acidifiant	25
II.2.4. Identification moléculaire des isolats.....	26
II.2.4.1. Extraction de l'ADN bactérien.....	26
II.2.4.2. Amplification d'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	28
II.2.4.3. Electrophorèse sur gel d'agarose	28
II.2.4.3.1. Préparation du gel d'Agarose à 1%	28
II.2.4.3.2. Le dépôt sur gel	28
II.2.4.3.3. Purification des produits de PCR	30
II.2.4.3.4. Séquençage des produits PCR purifiés	31
II.2.5. Identification par MALDI-TOF	32
II.2.6. Sélection <i>in Vitro</i> des souches à potentiel probiotique	33
II.2.6.1. La résistance aux conditions hostiles du tube digestif	33
II.2.6.1.1 Résistance au suc gastrique simulé	33
II.2.6.1.2. Résistance aux sels biliaires	33
II.2.6.1.3. Résistance aux enzymes digestives	34
II.2.6.2. L'adhésion des souches isolées aux cellules épithéliales.....	34
II.2.6.2.1. Préparation des cellules épithéliales	34

II.2.6.2.2. Test d'Adhésion	34
II.2.6.3. Détermination des activités biologiques des souches	36
II.2.6.3.1. Activité antibactérienne	36
II.2.6.3.2. Détermination de l'activité antioxydante	36
II.2.7. Expérimentation exploratrice de l'effet anti-inflammatoire in vivo chez le modèle murin d'étude de rectocolite induite au sulfate de Dextrane sodique (DSS).....	36
II.2.7.1. Matériel biologique	37
II.2.7.1.1. Souches bactériennes et produits utilisés	37
II.2.7.1.2. Animaux d'expérimentation	38
II.2.7.1.3. Milieux de cultures	38
II.2.7.2. Condition d'élevage des rats Wistar	39
II.2.7.3. Protocole d'induction de l'inflammation au DSS.....	39
II.2.7.4. Dénombrement de la flore intestinale	41
II.2.7.5. Collecte du sang et prélèvement des organes	41
II.2.7.6. Etude histologique	41
II.2.7.6.1. Préparation des échantillons de colon	41
II.2.7.6. 2. Préparation des coupes histologiques sur lame.....	42
II.2.7.6.3. La coloration a l'hématoxyline et éosine	42
II.2.7.6.4. Evaluation des atteintes histologiques	44
II.2.8. Analyse statistique	45

Chapitre III. Résultats et Discussion

III. Résultats et Discussion	46
III.1. Identité phénotypique des isolats	47
III.1.1. Aspect macroscopique et microscopique des isolats.....	47
III.1.2. Caractères physiologiques et biochimiques	49
III.1.3. Caractères sécuritaires et technologiques des isolats	53
III.1.3.1. Innocuité.....	53
III.1.3.2. Thermorésistance.....	54

III.1.3.3. Production d'acétoïne.....	55
III.1.3.4. Production des exopolysaccharides (EPS)	57
III.1.3.5. Activité protéolytique	58
III.1.3.6. Activité lipolytique	60
III.1.3.7. Production d'acide lactique	61
III.2. Identification moléculaire et protéomique des souches de <i>Lactiplantibacillus</i> isolées	64
III.2.1. Identification des isolats par PCR de L'ADN r 16s, séquençage et construction d'arbre phylogénétique.....	64
III.2.2. Identification par MALDI-TOF MS	69
III.3. Potentiel probiotique des souches lactiques isolées.....	73
III.3.1. Tolérance des souches aux conditions gastro-intestinales simulées in vitro.....	73
III.3.1.1. Acidité gastrique et sels biliaires	73
III.3.1.2. Tolérance aux enzymes digestives	76
III.3.2. Adhésion des souches isolées aux cellules épithéliales	77
III.3.3. Evaluation des activités biologiques des souches isolées.....	80
III.3.3.1. L'activité antimicrobienne.....	80
III.3.3.2. L'activité antioxydante	82
III.4. Etude <i>in vivo</i> de l'effet de la souche <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LbN14 sur le modèle murin d'inflammation intestinale.	85
III.4.1. Effet de la souche LbN14 sur la modulation du microbiote intestinal	85
III.4.2. Effet anti-inflammatoire de la souche LbN14	88
Conclusion	98
Références bibliographiques.....	100
Annexes et publication	

Introduction Générale

Un grand intérêt est porté à l'utilisation des probiotiques en alimentation humaine pour compléter et promouvoir les différentes fonctions du microbiote intestinal. En effet, les probiotiques, définis comme des bactéries administrées vivantes et en quantités adéquates, procurent des bienfaits pour la santé de l'hôte tels que l'atténuation de l'intolérance au lactose (Boukezzoula *et al.*, 2019), modulation et stimulation de la fonction immunitaire, et la thérapie de certaines maladies intestinales inflammatoires (Fedorak et Madsen, 2004 ; Mileti *et al.*, 2009 ; Lee *et al.*, 2015).

Les premières utilisations de bactéries vivantes, notamment celles ayant le statut probiotique comme les bactéries lactiques, par l'être humain comme moyen de conservation des aliments remontent à bien longtemps, et se poursuivent encore de nos jours car la consommation d'aliments fermentés procure des effets positifs sur la santé (Lee et Salminen, 1995 ; Bintsis, 2018, Ayaash *et al.*, 2021). En effet, les bactéries lactiques, assurent un rôle important en industrie alimentaire dans la diversification des caractères organoleptiques des aliments par la fermentation lactique des matières premières alimentaires (Von Wright et Axelsson, 2011 ; Hayek et Ibrahim, 2013).

Les lactobacilles représentent un genre important dans le groupe des bactéries lactiques ; ils sont très utilisés en fermentation alimentaire pour leurs aptitudes fermentaires et leurs effets bénéfiques sur la santé et la nutrition humaine (De Vos *et al.*, 2009 ; Widyastuti *et al.*, 2014). En effet, les espèces de *L. plantarum* sont des lactobacilles ubiquistes potentiellement fermentaires, utilisées en industrie alimentaire en tant que starters (Siezen et Hylckama, 2011), et en tant que probiotique dans les aliments fonctionnels et thérapeutiques (De Vriesa *et al.*, 2006). Ces espèces sont également retrouvées dans le microbiote naturel de l'homme et des animaux (Molain *et al.*, 1993)

Actuellement , les nouvelles études de recherches visent l'isolement de nouvelles souches lactiques potentiellement probiotiques à partir de plusieurs niches écologiques en particulier le lait cru de vache et d'autres produits laitiers qui constituent une source hautement riche en bactéries lactiques surtout les lactobacilles ayant des effets probiotiques importants comme la production de métabolites fonctionnels et d'intérêt santé (Zago *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2016; Ait Abdeslam *et al.*, 2019).

Les bactéries lactiques au statut probiotique doivent avoir une multitude de propriétés leur permettant de survivre tout au long du tractus digestif de l'hôte ; ainsi que des capacités de production des substances antagonistes. À cet effet, plusieurs chercheurs ont établi les effets bénéfiques procurés chez l'hôte par des espèces de *Lactobacillus plantarum* isolées du lait et des aliments fermentés, et dont le potentiel probiotique a été démontré par l'évaluation de leur résistance aux hostilités digestives (acidité, sels biliaires, etc...), par la recherche d'activité antioxydante et antagoniste, ainsi que leur pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales (Chaalel *et al.*, 2017 ; Aguilar-Toala *et al.*, 2018 ; Mohamad *et al.*, 2020 ; Iorizzo *et al.*, 2022).

Par ailleurs, grâce à leur pouvoir antioxydant, les probiotiques contribuent à la diminution du stress oxydatif qui est impliqué dans de nombreuses pathologies comme l'inflammation gastro-intestinale, l'obésité et le développement de tumeurs. C'est pourquoi différentes bactéries lactiques ont été sélectionnées pour lutter contre l'impact du stress oxydatif sur la santé et traiter les toxi-infections alimentaires (Lee *et al.*, 2015 ; Cai *et al.*, 2021).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail qui vise l'isolement de nouvelles souches lactiques à partir du lait cru de vaches de race locale algérienne, de les identifier, de les caractériser sur le plan des propriétés technologiques et biologiques, ainsi que de tester leur capacité à survivre à la barrière gastro-intestinale.

La présente thèse est structurée en trois chapitres. Le Chapitre I est consacré à une revue de la littérature sur le sujet. Le Chapitre II détaille le protocole expérimental adopté en décrivant la méthodologie utilisée. Il comporte une étude *in Vitro* et une autre *in Vivo*. L'étude *in Vitro* a pour objectif l'isolement, la caractérisation phénotypique, l'identification moléculaire, la sélection des isolats à potentiel probiotique, et la détermination des activités biologiques des souches lactiques sélectionnées. L'étude *in vivo* a consisté à évaluer l'effet santé d'une souche LbN14 en utilisant un modèle murin d'inflammation intestinale. Le Chapitre III présente et analyse les résultats obtenus pour en tirer les points forts mis en relief dans la conclusion.

CHAPITRE I.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Le système digestif humain

L'épithélium gastro-intestinal est le siège de l'activité de la flore microbienne et du système immunitaire naturel de défense qui coexistent dans un équilibre permanent dont la rupture induit des pathologies et détruit les fonctionnalités du microbiote intestinal. C'est ainsi qu'une dysbiose peut être à l'origine ou en être la conséquence des pathologies immunitaires et/ou inflammatoires. L'équilibre du système digestif est l'une des conditions d'une très bonne immunité pour la prévention et l'élimination des agents pathogènes impliqués dans les toxi-infections afin d'assurer et préserver la santé de l'hôte (Blander *et al.*, 2017 ; khan *et al.*, 2019)

I.1.1 Organisation du tractus digestif

Le tractus gastro-intestinal est constitué de différents compartiments digestifs : la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le gros intestin (côlon ascendant, côlon transversal et côlon descendant) puis le rectum et l'anus (fig.1). Ces compartiments sont liés à des organes connexes (les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas), responsables des différentes sécrétions digestives (enzymes, électrolytes et sels biliaires) qui participent à la digestion des aliments (Ebel., 2012).

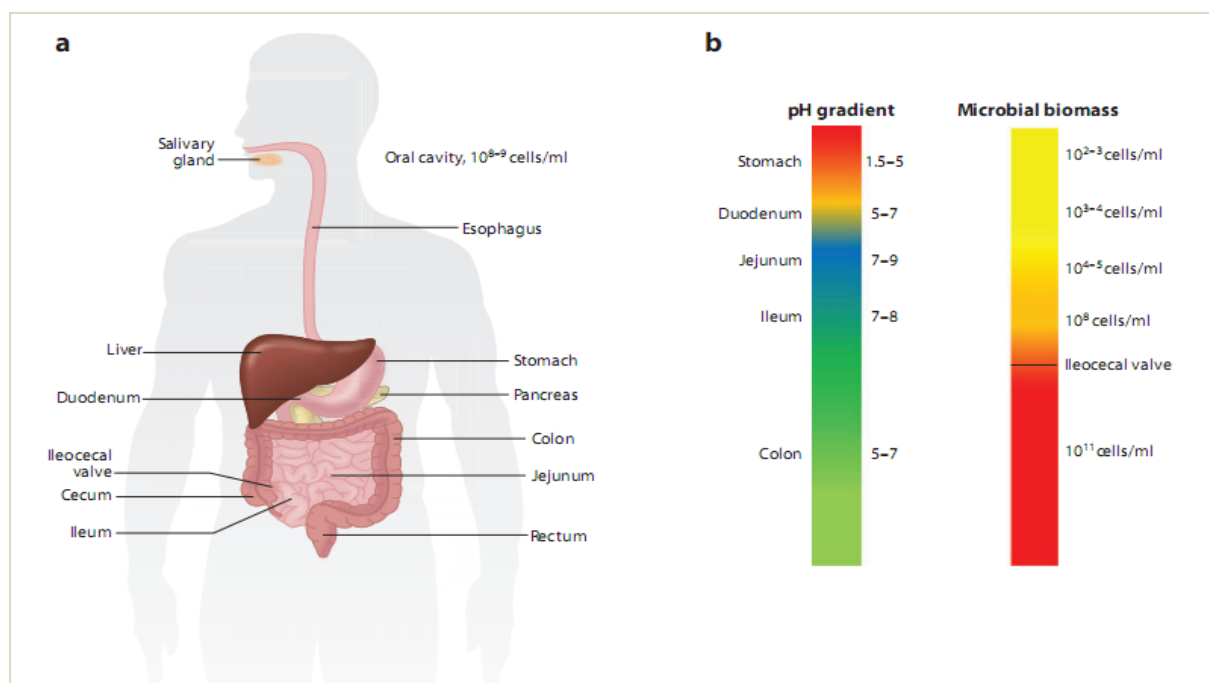


Figure 1 : Anatomie et physiologie du tu digestif de l'homme (Walter et Ley, 2011).

a/ les majeurs sections du tractus digestif, b/ Biomasse cellulaires du microbiote ainsi que les pH des différentes sections.

I.1.2. Les organes annexes du tube digestif

I.1.2.1. Les glandes salivaires

Ces glandes salivaires exocrines sont associées à la langue et retrouvées dans la bouche. Elles assurent une sécrétion salivaire continue pour garder la cavité buccale humidifiée ainsi que pendant la mastication des aliments ingérés (Dupin, 1992 ; Devoize et Dallel., 2010). La salive produite par ces glandes salivaires, constitue un mélange de sécrétions organiques et inorganiques représentées par de nombreux électrolytes et d'enzymes salivaires qui contribuent au fractionnement de la nourriture ingérée ainsi que des immunoglobulines et d'autres protéines du système immunitaire (Lacour et Belon, 2015).

I.1.2.2. Le Pancréas

Le pancréas est un organe annexé au tube digestif situé dans la partie haute de l'intestin grêle, composé de glande endocrine qui assurent la sécrétion de l'insuline ainsi que d'autres hormones pancréatiques dans le sang, et de glande exocrine qui sécrètent des enzymes pancréatiques vers le duodénum en communication avec les voies biliaires. Les sécrétions exocrines assurent la digestion des aliments, quant aux sécrétions endocrines, elles jouent un rôle important dans le contrôle de la glycémie de l'organisme (Bessaguet et Desmoulière, 2021).

I.1.2.3. Le Foie

Le foie est un grand organe, situé dans l'abdomen, lié au tube digestif, et constitué de structures vasculaires biliaires exocrine permettant la production de la bile (sels biliaires) dans la vésicule biliaire facilitant l'émulsion et l'absorption des corps gras par l'organisme ; le foie participe également à d'autres fonctionnalités telles que le métabolisme des glucides, la protéolyse, l'activation de la vitamine D, l'élimination des toxines et des médicaments grâce à des enzymes spécifiques (Guénard, 2001).

I.1.3. Les enzymes digestives

Les enzymes digestives constituent une part importante dans le suc gastrique et pancréatique et sont produites par de nombreux types cellulaires. En effet, La digestion enzymatique du bol alimentaires débute dans la bouche par la salive riche en alpha amylase salivaire qui est sécrétée directement sous forme active chez tous les organismes ; elle hydrolyse les glucides en clivant les liaisons glycosidiques α -(1,4) des polysaccharides

(Jancek, 1997). Au niveau de l'estomac, le suc gastrique constitué d'eau, de mucus, d'acide chlorhydrique, de pepsine qui passe d'une forme inactive (pepsinogène) à une forme active (pepsine) en milieu acide crée par l'HCl gastrique (Lecleire, 2008), et de facteur intrinsèque, et de lipase pour la digestion des graisses. Dans l'intestin grêle, il y a la bile et le suc pancréatique contenant les enzymes : amylase pancréatique, la lipase, les protéases (trypsine, chymotrypsine etc....), dont l'action enzymatique contribue à la réduction des grandes molécules alimentaires en nutriments absorbables (Heda et al, 2022).

La trypsine compte parmi les protéases les plus importantes du suc pancréatique qui permet le clivage des protéines au niveau du carboxyle des acides aminés basiques, et appartient à la famille des protéases à sérine. La forme inactive, le trypsinogène, doit être activée en trypsine pour être fonctionnelle (Whitcomb et Lowe, 2007). La chymotrypsine une autre protéase qui agit au niveau du carboxyle des acides aminés aromatiques par hydrolyse des liaisons peptidiques. Elle est stockée dans le pancréas sous forme inactive, le chymotrypsinogène, qui doit être activé par la trypsine au niveau duodénal (Silbernagl et Despopoulos, 2008).

Parmi les lipases synthétisées sous forme active, il y a la triacylglycérol hydrolase et la cholestérol hydrolase. La triacylglycérol hydrolase hydrolyse les triacylglycérols en acides gras et glycérol ; alors que la cholestérol hydrolase clive les esters de cholestérol en acides gras et cholestérol (Sui *et al.*, 2020). Par ailleurs, les phospholipases hydrolysent les phospholipides.

I.1.4. Histologie du tube digestif

Sur toute sa longueur, le tube digestif est tapissé par quatre couches histologiques (Figure 2) concentriques qui sont de la lumière du tube vers l'extérieur : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et l'adventice (Tomas et Sansonetti, 2017). La muqueuse est structurée en trois couches : le revêtement épithélial, le chorion ou tissu conjonctif de soutien (la lamina propria) et une fine couche de muscle lisse (la musculaire muqueuse) qui produit les mouvements locaux et les replis de la muqueuse (Kühnel, 1998).

La sous-muqueuse est constituée d'un tissu conjonctif lâche supportant la muqueuse qui contient du collagène, des fibrilles d'élastine, des vaisseaux de gros calibre, des vaisseaux lymphatiques et dans certains endroits des glandes sous-muqueuses (Pocock *et al.*, 2004).

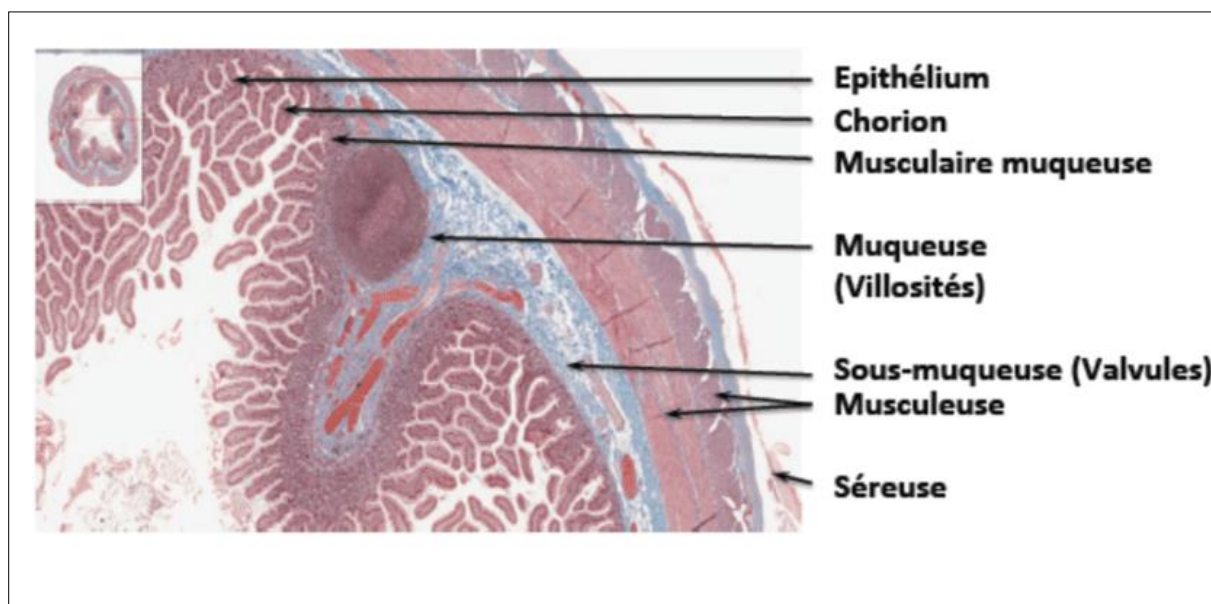


Figure 2 : Coupe histologique d'intestin humain (X200) (Ballouhey, 2018)

La musculature externe est formée d'une couche longitudinale et d'une couche circulaire de fibres musculaires lisses permettant la contraction de l'organe et ainsi le mélange et la migration des aliments le long du tube digestif. Entre les deux couches de la musculature se trouve le plexus nerveux mésentérique d'Auerbach et des cellules de Cajal (cellules « pacemaker » qui contrôlent le rythme du péristaltisme) (Reed et Wickam, 2009). La séreuse ou l'adventice est la couche la plus externe de la paroi intestinale formée de tissu conjonctif recouvert d'un épithélium simple squameux rattaché aux tissus environnants et supportant les organes ou adjacent à la cavité péritonéale (Da Silva, 2013).

Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale est constitué par plusieurs types de cellules à fonction immunitaire ayant pour rôle la régulation de la réponse immunitaire de la muqueuse intestinale en relation avec le microbiote de la lumière intestinale pour empêcher la translocation et propagation des bactéries pathogènes chez l'hôte (Mörbe *et al*, 2021).

I.1.5. Le microbiote intestinal

I.1.5.1. Formation du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal se forme dès la naissance, au contact de la flore vaginale de la mère, ou au contact des micro-organismes de l'environnement lors d'une césarienne (Tiihonen *et al.*, 2010). Il continue d'évoluer tout au long de la vie jusqu'à l'âge adulte où il se stabilise ; sa composition varie d'une personne à une autre en plus d'être spécifique pour

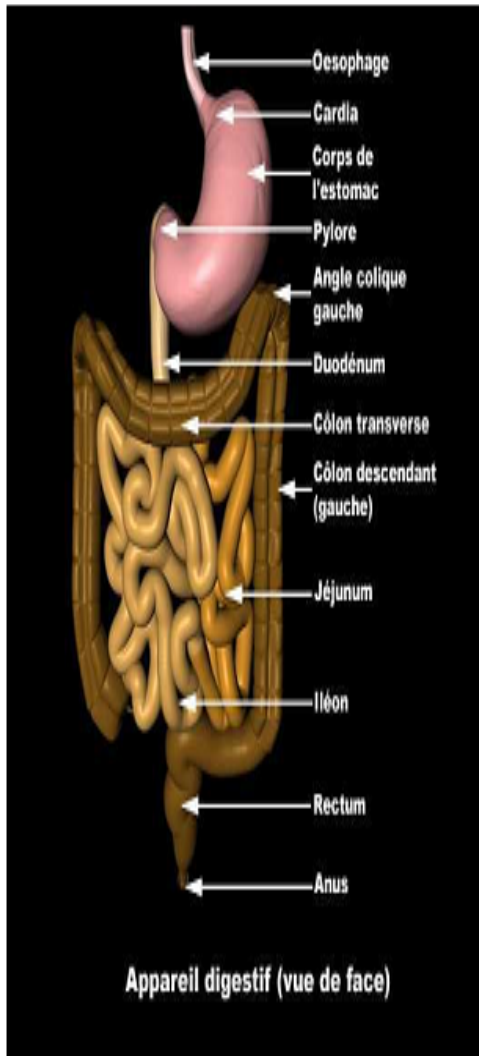
chaque individu selon son alimentation et son mode de vie ainsi que selon certains facteurs génétiques et thérapeutiques (Campeotto *et al.*, 2007 ; Milani *et al.*, 2017).

Il abrite jusqu'à cent mille milliards de microorganismes constituant une flore intestinale diversifiée, et les différentes espèces retrouvées appartiennent à cinq grands phylums : les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobacteria, les Verrucomicrobia et les Proteobacteria (Whitman *et al.*, 1998 ; Guillame Elemetais, 2014 ; Schroeder et Bäckhed, 2016).

Les conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal affectent fortement la répartition bactérienne malgré la barrière acide gastrique qui inhibe fortement la croissance, de nombreux micro-organismes acido-tolérants anaérobies facultatifs tels que les lactobacilles, les streptocoques, les levures, et bien d'autres arrivent à s'y développer (Wilson, 2008). Dans l'intestin grêle, l'oxygène diminue et la flore retrouvée est principalement composée d'anaérobies facultatifs et d'anaérobies stricts, notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridiums retrouvés aussi dans le colon (Ebel, 2012).

I.1.5.2. Rôle du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal (Figure 3) est essentiel au bon fonctionnement de l'écosystème digestif est joue un rôle important dans les fonctions digestives, métaboliques, immunitaires et neurologiques (Kamada *et al.*, 2013 ; Martinez-Guryn *et al.*, 2018 ; Fan et Pedersen, 2021). Des modifications structurelles et physiologiques peuvent survenir en cas d'absence des microorganismes intestinaux, comme l'augmentation du volume du caecum, un amincissement de la paroi intestinale, une diminution des plaques de Payer et un allongement des villosités de la muqueuse (Ebel, 2012). Le microbiote participe au métabolisme de l'ensemble des nutriments (glucides, protéines, lipides etc...) pour les rendre assimilables par l'organisme grâce à l'action enzymatique bactérienne et joue également un rôle important dans la protection de l'hôte contre les agents pathogènes par son effet barrière (Moroni, 2007). En effet, les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, du microbiote gastro-intestinal humaine produisent des substances antimicrobiennes actives contre les microorganismes entéro-pathogènes impliqués dans la diarrhée et certaines maladies intestinales (Bernet-Camard *et al.*, 1997 ; Servin., 2004 ; Moal et Servin, 2006).



Appareil digestif (vue de face)

Oesophage : mucus, péristaltisme. Seuls les

microorganismes provenant des aliments ou de la cavité orale sont présents.

Estomac : pH acide (pH<2), O₂, enzymes, mucus.

Microflore : 10⁴ UFC/g : *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*.

Duodénum : sécrétions pancréatiques et biliaires, mucus, faible O₂. Microflore : 10³-10⁴ UFC/g : *Bacteroides*, *Candida albicans*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*.

Jéjunum : sécrétions pancréatiques et biliaires, mucus, péristaltisme. Microflore : 10⁵-10⁷ UFC/g : *Bacteroides*, *Candida albicans*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*.

Iléon : Anaérobiose, sels biliaires, enzymes. Microflore : 10⁷-10⁸ UFC/g : *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Véillonella*.

Colon : Anaérobiose (E_h=-200 à -300 mV), motricité, enzymes bactériennes, acides gras volatiles, ammoniaque,...

Microflore : 10¹⁰-10¹¹ UFC/g : *Bacteroides*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*.

Figure 3 : Description du microbiote intestinal humain (Ouweland and Vesterlund, 2003)

I.2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) : cas de la rectocolite hémorragique (RCH)

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI), sont représentées par la maladie de Crohn, dont l'inflammation peut toucher toutes les parties du tube digestif, et la RCH, dont l'inflammation est localisée au niveau du rectum et du colon (Baumgart et Sandborn, 2007).

La RCH est une maladie chronique inflammatoire caractérisée par des périodes de rémission et de récurrence de l'inflammation des muqueuses, entraînant des symptômes tels que des douleurs abdominales, de la diarrhée sanglante et de la fatigue (Torres *et al.*, 2012). Sa pathogénicité peut être liée à une prédisposition génétique, à des défauts de la barrière épithéliale, à des réponses immunitaires excessives du système de défense de l'organisme générant une réaction auto-immune qui provoque des saignements observés lors de diarrhée sanglante et des ulcérations au niveau du colon diagnostiquées par coloscopie et par des examens histologiques de fractions de tissus cellulaires colorectales (Magro *et al.*, 2012; Ungaro *et al.*, 2016). Une Dysbiose peut être une conséquence en cas d'inflammation chronique de l'intestin, et est souvent réparée par la consommation de probiotiques afin de restaurer l'équilibre de la flore intestinale et éventuellement de réduire l'inflammation (Girardin et Frossard, 2012 ; Nobaek *et al.*, 2000 ; Verdu et Collins, 2004) ainsi que la modulation du système immunitaire (Steidler *et al.*, 2000 ; O'Mahony *et al.*, 2005 ; Hatakka et Saxelin, 2008).

I.2.1. Modèles d'étude des maladies inflammatoires de l'intestin

I.2.1.1. Modèles *in-vitro*

Les modèles cellulaires d'étude *in vitro*, les plus utilisés sont représentés dans le tableau 1.

I.2.1.2. Modèles *in-vivo*

Les deux modèles expérimentaux d'étude *in vivo* de la pathologie inflammatoire intestinale sont chimio-induites, soit par le Dextran Sulfate Sodium (DSS) (tableau 2) qui provoque une perturbation de la barrière intestinale, soit par l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) ou l'acide 2,4-dinitrobenzène sulfonique (DNBS) qui provoquent une colite expérimentale, caractérisée par une réaction inflammatoire aiguë entraînant l'élévation des cytokines immunitaires et une infiltration de neutrophiles et de macrophages au sein des couches épithéliales de l'intestin (Alex *et al.*, 2009) et une infiltration de neutrophiles et de macrophages au sein des couches épithéliales de l'intestin (Te Velde *et al.*, 2006).

Tableau 1 : Modèles cellulaires in vitro pour l'étude des maladies inflammatoires intestinales

Modèles cellulaires	Origine d'isolement	Caractéristiques
Les cellules épithéliales humaines Caco-2	Adénocarcinome colorectal humain (Fogh et Trempe, 1975)	- Différenciation spontanée des cellules et Capacité de produire des marqueurs inflammatoires (cytokines pro-inflammatoires) en réponse à d'autres cytokines telles que l'IL-1 β , le TNF- α (Cheng <i>et al.</i> , 2008 ; Rodríguez-ramiro, 2013)
Les cellules épithéliales HT-29	Adénocarcinome colorectal humain (Fogh et Trempe, 1975)	- Différenciation cellulaire nécessitant des conditions de cultures spécifiques (Huet <i>et al.</i> , 1987) - Utilisation comme barrière intestinale humaine dans des recherches d'absorption et de perméabilité en coculture avec la lignée cellulaire Caco-2 (Behrens <i>et al.</i> , 2001 ; Barnett <i>et al.</i> , 2016 ; Béduneau <i>et al.</i> , 2014)
Les cellules mononuclées du sang périphériques (Les PBMC)	Ce sont des lymphocytes, des monocytes et des cellules dendritiques issues des couches leuco-plaquettaires du sang de donneurs sains (Kleiveland, 2015)	- La présence de marqueurs cellulaires pour les macrophages et les cellules dendritiques a été décrite dans des cocultures utilisant des PBMC (Leonard <i>et al.</i> , 2010).

Le modèle de perturbation de la barrière intestinale par le Dextran Sulfate Sodium (DSS), est couramment utilisé pour déterminer la réponse immunitaire innée lors d'une colite (Cooper *et al.*, 2000), et lorsqu'il est administré par voie orale, il reproduit exactement les symptômes observés lors des MICI : perte de poids, sang dans les selles, diarrhée, tel que cela a été évalué par le « Disease Activity Index » (DAI) (Mimura *et al.*, 2004), ainsi que des ulcérations, érosions des cellules épithéliales avec une importante infiltration de lymphocytes et neutrophiles qui sont évalués par un score histologique déterminant la réponse inflammatoire (Okayasu *et al.*, 1990; Johansson *et al.*, 2010).

Le modèle TNBS est très utilisé pour son action rapide et son inflammation localisée pouvant se généraliser s'il est administré plusieurs jours donc il est limité par un protocole d'administration précis, en plus de la nécessité d'une présélection génétique des souris (Saavedra *et al.*, 1994 ; Prantera *et al.*, 2002).

Tableau 2 : Conditions d'étude des souches bactériennes dans des modèles d'inflammations intestinales chez la souris (Kechaou, 2012).

Références	(Nanda Kumar <i>et al.</i> , 2008)	(Miyauchi <i>et al.</i> , 2009)	(Mennigen <i>et al.</i> , 2009)	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
Bactéries	Cocktail de bactéries <i>L. rhamnusus</i> LGG <i>L. Plantarum</i> CIP102021 <i>L. casei</i> (CIP107868) <i>L. lactis</i> (CIP101028) <i>B. bifidum</i> (CIP56.7T) <i>B. infantis</i> (CIP105265T) <i>B. adolescentis</i> (CIP64.59T)	<i>L. delbrueckii sup. bulgaricus</i> no. 3. <i>L. casei</i> no.9 <i>L. gasseri</i> no.10 <i>L. rhamnosus</i> OLL.2838	Cocktail VSL.3 <i>S. thermophilus</i> <i>B. longum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> <i>L. bulgaricus</i>	<i>L. plantarum</i> HY115 <i>L. brevis</i> HY7401
Induction de inflammation	4% DSS intègre dans l'alimentation des souris.	3.5% DSS dans l'eau de boisson.	3.5% DSS dans l'eau de boisson.	5% DSS dans l'eau de boisson.
Administration des bactéries par rapport à l'induction de l'inflammation	7 jours avant et 7 jours après	24h après l'induction au DSS. Gavages quotidiens pendant 3 jours : bactéries vivants (10^7 UFC souris) ou des bactéries tuées par la chaleur.	7 jours avant et 7 jours après	7 jours après
Résultats obtenus	La baisse des bactéries du groupe	La baisse des effets de la colite	La baisse des DAI	La baisse de l'activité de dégradation
Après l'administration des bactéries	Bactéroïdes chez les souris traitées au DSS. -Traitement probiotique restaure les niveaux de bactéroïdes ; et l'élévation des niveaux des <i>Bifidobacterium</i> et <i>Lactobacillus</i> . -La baisse des symptômes cliniques ; histologie et biochimique. -La baisse de la sécrétion de TNF à partir d'un marceau de colon distal	<i>L. rhamnosus</i> OLL2838 vivante ou tuée par la chaleur - de la perte de poids avec les deux formes testées. - l'élévation de la longueur des colons. - La baisse de l'activité MPO des morceaux de colons distaux meilleure avec la bactérie vivante.	-La baisse du score histologique -- l'élévation de la protection de la barrière épithéliale.	Sulfates de chondroïtine (protège le cartilage contre les réactions enzymatiques et contre les dommages dus aux radicaux libres) et de l'acide hyaluronique.

I.3. Probiotiques et bactéries lactiques

I.3.1. Les probiotiques

I.3.1.1. Le concept probiotique

Le concept de probiotique est apparu depuis les travaux de Metchnikoff en 1907 et utilisé pour la première fois par Lilly et Stillwell en 1965 pour décrire une substance produite par un microorganisme ayant la capacité de stimuler ou inhiber la croissance d'autres microorganismes (Lilly et Stillwell, 1965). Plus tard, en 1991, Fuller redéfinit le terme « probiotique » comme étant des cultures microbiennes vivantes ajoutées aux préparations alimentaires comme additif à effet bénéfique permettant d'améliorer la digestion et l'hygiène intestinale chez l'hôte. Actuellement, les probiotiques sont définis comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, confèrent des effets bénéfiques pour l'hôte » (FAO/OMS, 2001).

I.3.1.2. Critères de criblage des bactéries à potentiel probiotique

Plusieurs scientifiques visent à isoler un grand nombre de bactéries à potentiel probiotique important pour le développement de nouveaux produits agro-alimentaires (Cukrowska *et al.*, 2009 ; Guo *et al.*, 2010 ; Koll *et al.*, 2010 ; Jiang *et al.*, 2016). La "Food and Agriculture Organization (FAO), a mis en place plusieurs critères de sélection (Figure 4) pour le criblage des meilleures souches à potentiel probiotique (FAO/ WHO, 2002). L'identité de ces souches constitue un critère de sélection très important à côté de l'aspect sécuritaire qui devrait déterminer l'absence de virulence chez les souches choisies (Coudeyras et Forestier, 2010). La viabilité ou survie des souches sélectionnées aux conditions du tube digestif et la dose ingérée (10^9 UFC/jour), comptent aussi parmi les critères importants très étudiés pour obtenir un effet bénéfique efficace (Cocoran *et al.*, 2006). En effet, cette viabilité est déterminée par des tests *in vitro* de résistance à l'acidité gastrique, l'oxygène, le potentiel redox, les sels biliaires, les sécrétions enzymatiques, l'adhérence au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines, l'activité antimicrobienne, les propriétés d'immunomodulation et l'interaction avec la flore endogène (Gueimonde et Salminen, 2006). Tout microorganisme reconnu comme probiotique obtient le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (Charalampopoulos *et al.*, 2002 ; Bron et Kleerebezem, 2018).

I.3.1.3. Effets Bénéfiques des Probiotiques

Les probiotiques sont à l'origine de plusieurs effets bénéfiques pour la santé de l'hôte grâce à pouvoir de production de bactériocines et d'acides gras à chaîne courte, la compétition

trophique, la stimulation de la barrière muqueuse et l'immunomodulation (Isolauri *et al.*, 2001 ; Mercenier *et al.*, 2003).

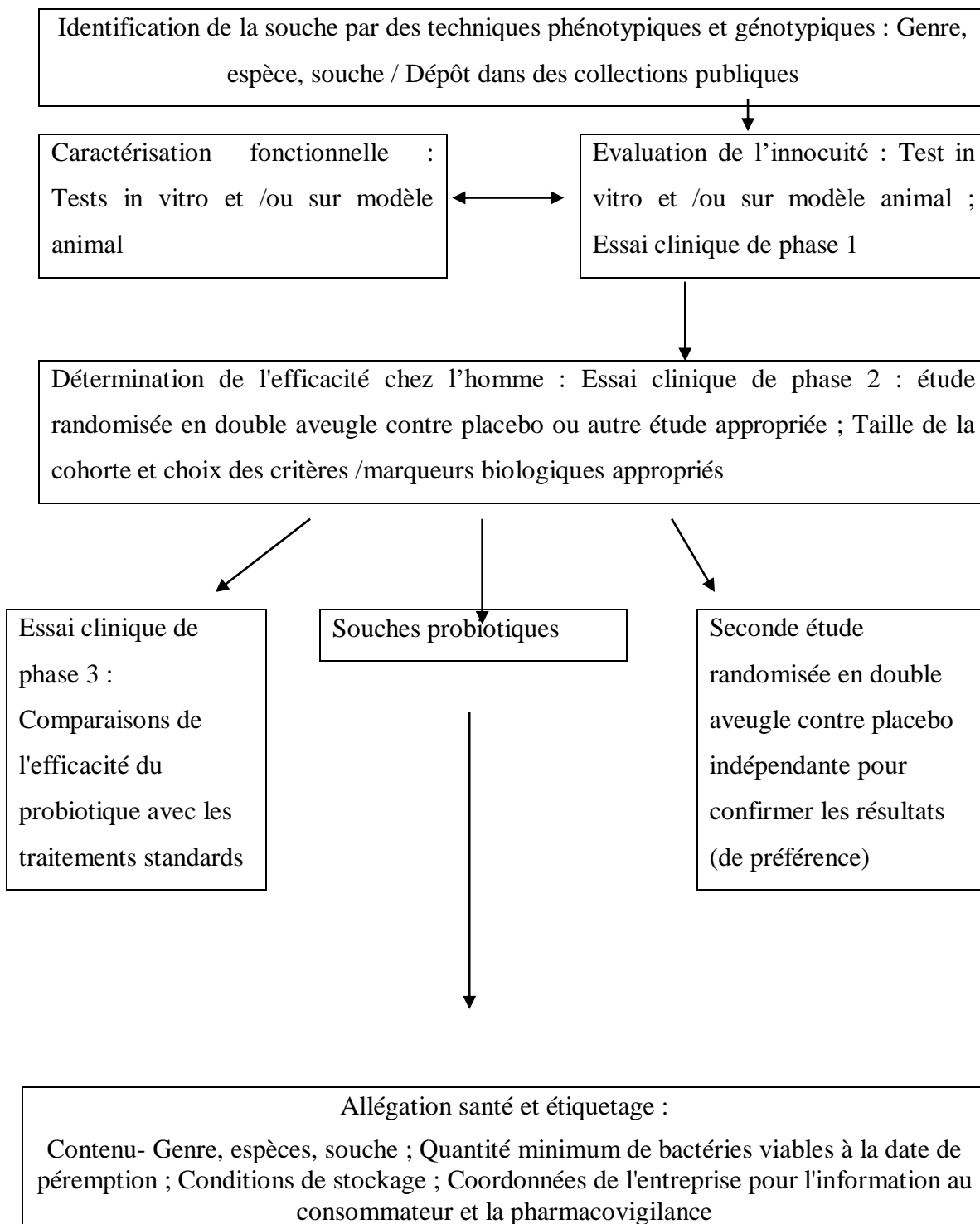


Figure 4 : Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques destinés à l'usage humain (FAO–WHO, 2002).

En effet, différents auteurs ont montré que la consommation de probiotiques permet d'équilibrer le microbiote intestinal lors de dysbiose liée à des maladies intestinales inflammatoires en contribuant à d'autres bienfaits pour la santé (Fuller, 1989 ; Kechagia *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2021). D'autres effets bénéfiques des probiotiques ont également été rapportés , notamment la prévention des infections du tractus intestinal en empêchant l'adhésion des agents pathogènes, en exerçant un antagonisme bactérien par la compétition pour les nutriments, en améliorant le système immunitaire, en réduisant les allergies, en atténuant l'intolérance au lactose, etc....(Majamaa et Isolauri, 1997; Hudault *et al.*, 1997 ; Sanders, 2001 ; Gopal *et al.*, 2001 ; Mercenier *et al.*, 2003 ; Rastall, 2004 ; Quinto *et al.*, 2014).

I.3.2. Les bactéries lactiques

I.3.2.1. Définition

Les bactéries lactiques sont définies selon les caractéristiques phénotypiques en cellules Gram-positives, catalase négative, oxydase négative, n'ayant ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase, immobiles, non sporulées, aéro-anaérobies facultatives, productrices d'acide lactique par fermentation lactique (Axelsson, 2004). Leur culture nécessite des facteurs de croissance tels que les acides aminés ; ainsi que les glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Dellaglio et Felis, 2005).

Les bactéries lactiques obéissent au concept « GRAS » et sont ubiquistes, retrouvées dans diverses niches écologiques tel que le lait et produits laitiers, les végétaux, dans les muqueuses humaines et animales (Salminen *et al.*, 1998 ; Saarela *et al.*, 2000 ; Quinto *et al.*, 2014). Néanmoins, d'autres espèces lactiques opportunistes *Streptococcus* et *Enterococcus*, peuvent présenter une certaine pathogénicité (Aguirre et Collins, 1993).

I.3.2.2. Taxonomie

La première classification établie par Orla Jensen en 1919 (Novel, 1993), basée sur le profil fermentaire des glucides, la morphologie cellulaire et la température optimale de croissance a permis de différencier quatre genres de bactéries lactiques : *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* (Hammes et Vogel, 1995 ; Vandamme *et al.*, 1996). Par la suite, l'identification génétique des bactéries lactiques par les nouvelles méthodes moléculaires telles que la polymérisation en chaîne (PCR) et le séquençage du gène ARNr 16S (Drake *et al.*, 1996 ; Petti *et al.*, 2005) (Figure 5), ont établi des bases de données précises pour l'analyse phylogénétique (Figure 6) et l'identification de nombreuses autres espèces parmi 13 genres

bactériens différents : *Lactobacilli*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (Neefs *et al.*, 1993 ; Schleifer et Ludwig, 1995 ; Zheng *et al.*, 2020)

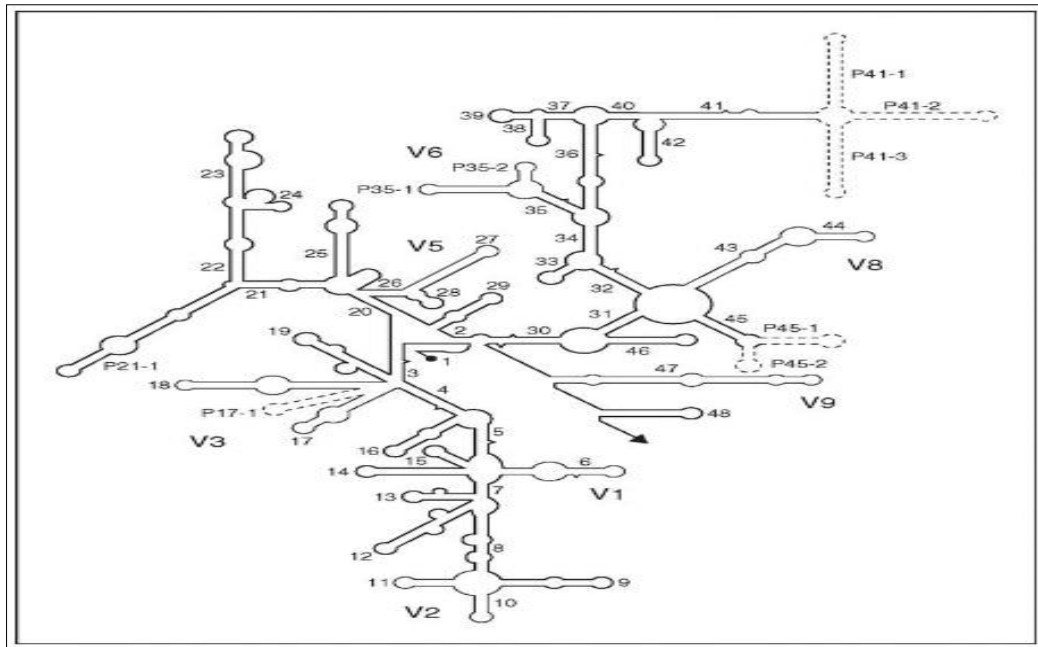


Figure 5 : Modèle de structure secondaire d'ARNr 16S des procaryotes. Les régions où la séquence des bases nucléotidiques est plus variable sont marquées V1 à V9 (Neefs *et al.*, 1993)

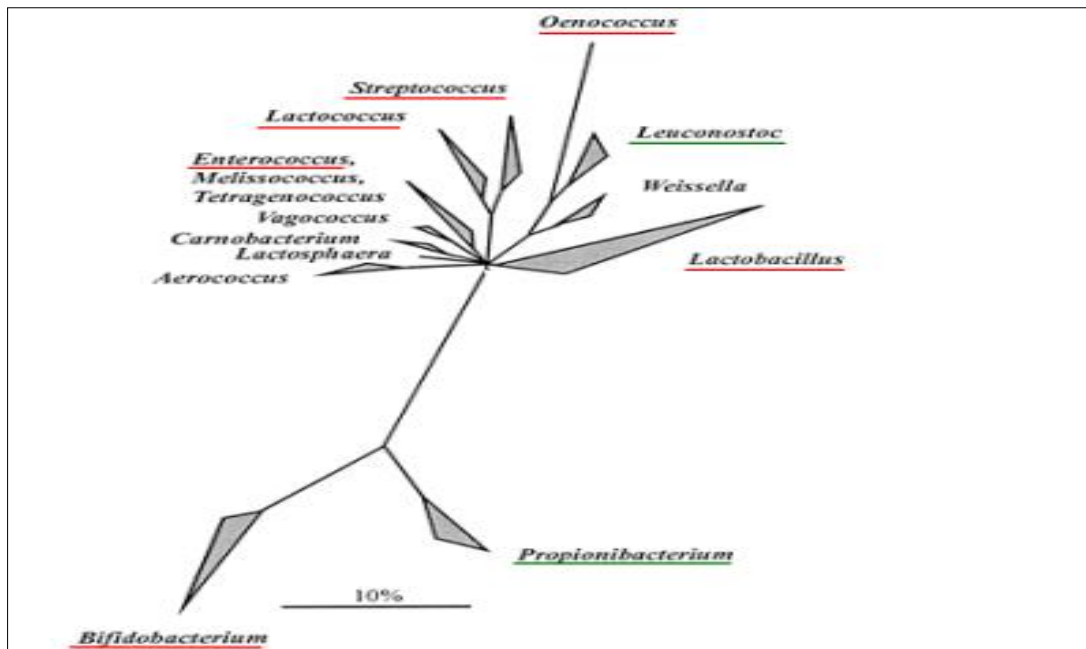


Figure 6 : Analyse phylogénétique des principaux genres constituant les BL basées sur les séquences des ARNr 16S (Schleifer et Ludwig, 1995).

I.3.2.3. Les Lactobacilles

Les espèces du groupe des lactobacilli sont les plus étudiées parmi les bactéries lactiques utilisées comme probiotiques pour leur immense diversité génétique, métabolique et écologique, en plus d'être omniprésents dans différents habitats et peuvent avoir plusieurs applications industrielles et de santé (Ait Abdeslam *et al.*, 2019 ; Mohamad *et al.*, 2020 ; Ayaash *et al.*, 2021 ; Cai *et al.*, 2021 ; Oberg *et al.*, 2022).

Les lactobacilles présentent des caractéristiques phénotypiques et génotypiques différentes avec un pourcentage de Guanine et Cytosine (G+C) compris entre 32% et 53% (Falsen *et al.*, 1999). La structure cellulaire de ces bactéries se présente sous forme de coccobacilles assemblés en chaînes ou bacilles allongés, élancés, parfois recourbés (Charalampopoulos *et al.*, 2002). Ces souches sont dites anaérobies facultatives, ce qui signifie que certaines espèces présentent une aérotolérance et d'autres souches sont strictement anaérobies (Kandler et Weiss, 1986). Certaines espèces sont thermorésistantes et acidotolérantes (Hofvendahl et Hahn, 2000) et ont également des exigences nutritionnelles qui sont apportées par des milieux de cultures spécifiques à leur croissance (De Man *et al.*, 1960 ; Rogosa *et al.*, 1961).

I.3.2.4. Classification des lactobacilles

Les lactobacilles sont des bactéries Gram positif, classés dans le phylum des Firmicutes, la classe des Bacilli, l'ordre des Lactobacillales et la famille de Lactobacillaceae (Bergey's., 2004).

La nouvelle taxonomie actuelle du genre *Lactobacilli*, établie par de nouvelles méthodes moléculaires (ADN et protéomique), présente une importante diversité phylogénétique et physiologique des espèces de *Lactobacilli* et révèle la présence de 261 espèces en mars 2020. Cette diversité existe aux niveaux phénotypique, écologique et génotypique en proposant une reclassification du genre *Lactobacillus* en 25 genres signés sous le nom de groupe *Lactobacillus delbrueckii*, *Paralactobacillus* et 23 nouveaux genres selon la nouvelle nomenclature et qui sont représentés par les genres *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companiolactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agriactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* et *Lentilactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020).

I.3.2.5. Méthodes de caractérisation et d'identification des Lactobacilles :

I.3.2.6.1 Méthodes conventionnelles :

Il s'agit des techniques d'identification phénotypique traditionnelles utilisant les cultures dépendantes (Tableau 3), physiologique (Larpent, 1997 ; Reque *et al.*, 2000 ; Guiraud, 2003) et biochimique (Freney, 2007). Cependant, l'identification phénotypique des bactéries reste lente par rapport à l'identification moléculaire (Petti *et al.*, 2005).

I.3.2.6.2. Méthodes d'identification moléculaire :

Ces méthodes résumées dans le tableau 3, permettent une identification rapide des microorganismes depuis leur environnement naturel (Huybens *et al.*, 2009 ; Roux et Rolain, 2014). En effet, la réaction de polymérisation en chaîne PCR qui permet l'amplification du fragment d'intérêt d'acide nucléique par l'utilisation de couple d'amorces d'ADN universelles ou spécifiques aux genres et/ou à l'espèce a fait ses preuves d'efficacité dans plusieurs études (Dubernet *et al.* 2002 ; Hilario, 2007 ; Van Guilder *et al.*, 2008 ; Huybens *et al.*, 2009 ; Garibyan et Avashia, 2013). Ensuite, l'estimation de la taille moléculaire en paire de base de l'amplifié se fait par révélation électrophorétique sur gel d'Agarose, hybridation ADN/ADN et par le séquençage du produit amplifié (Poitrassé et Houdea, 2002 ; Westermeier, 2004).

Le séquençage est une autre méthode complémentaire d'identification qui détermine la séquence amplifiée et fournit une base de données précise enregistrée dans les bases de données BLAST de Genbank du NCBI (Lamoril *et al.*, 2008). Au final l'analyse phylogénique permet d'établir les relations taxonomiques et les distances étroites entre les séquences et de concevoir un arbre phylogénique (Figure 7), (Amann *et al.*, 1995).

I.3.2.6.3. Méthode d'identification protéomique : MALDI-TOF MS

L'apparition de la technique MALDI-TOF MS a révolutionné les moyens d'identification et est devenue une méthode de routine dans les laboratoires de microbiologie pour sa simplicité d'utilisation et son faible coût analytique (Carbonelle *et al.*, 2011).

Il s'agit d'une méthode d'identification rapide pour tous les microorganismes (bactéries, levures mais aussi champignons) dans leurs milieux de cultures naturelles avec une grande précision (Nacef *et al.*, 2016). Son principe analytique permet le calcul de la distance parcourue par les ions soumis à un champ électrique en un temps donné en fonction du rapport de la masse sur la charge (m/z) (Carbonelle *et al.*, 2007).

Tableau 3 : Méthodes d'identification conventionnelles (cultures dépendantes) et génotypiques des lactobacilles (Temmerman *et al.*, 2004).

Méthodes	Principe	Temps d'identification	Niveau d'identification	Reproductibilité	Références
Identification phénotypique					
Caractérisation morphologique et physiologique	Observation microscopique	Lent	Genre bactérien ou moins	Moyenne	Gonzalez <i>et al.</i> (2000)
Caractérisation biochimique	Caractères de croissance tests simples Assimilation et fermentation de substrats (Galleries API)	Lent	Genre bactérien ou espèces	Moyenne	Muyanja <i>et al.</i> (2003)
Profil protéique	SDS page des protéines	Rapide	Espèces bactériennes	Elevée	Leisner <i>et al.</i> (2001)
Identification génotypique					
Amorces spécifiques	PCR avec amorces spécifique au groupe	Lent	Cela dépend de l'amorce utilisée	Elevée	Nomura <i>et al.</i> (2002)
Séquençage	Détermination de la séquence des gènes (ADNr 16s....) Enzyme de Restriction	Rapide	Identification du Genre ou espèce	Elevée	Booyesen <i>et al.</i> (2002)
RFLP (Restriction Fragment-Length polymorphy DNA)	Analyse du fragment de restriction (REA) de l'ADN ou des amplicons de PCR	Moyen	Espèces à la souche	Elevée	Giraffa <i>et al.</i> (2002)
AFLP (Amplified fragment Length polymorphism)	Analyse Combinée des REA et PCR	Rapide	Espèces à la souche	Elevée	Giraffa et Neviani (2000)
Random Amplified Polymorphism DNA (RADP- PCR)	Randomly primed PCR	Lent	Espèces à la souche	Lente	Booyesen <i>et al.</i> (2002)
Rep-PCR (Repetitive element sequence)	PCR ciblant les séquences répétées intercalées	Lent	Espèces à la souche	Elevée	Gevers <i>et al.</i> (2001)
Electrophorèse sur gel à champ pulsé (PFGE)	REA et électrophorèse sur gel à champ pulsé	Rapide	Souches	Elevée	Ventura et Zink (2002)
Ribotypage	REA et détection de sondes oligonucléiques	Rapide	Espèces à la souche	Elevée	Lyhs <i>et al.</i> (2002)
Hybridisation des sondes	hybridisation ADN-ADN par des sondes marqués	Rapide	Genre à l'espèce	Elevée	Manero et Blanch (2002)

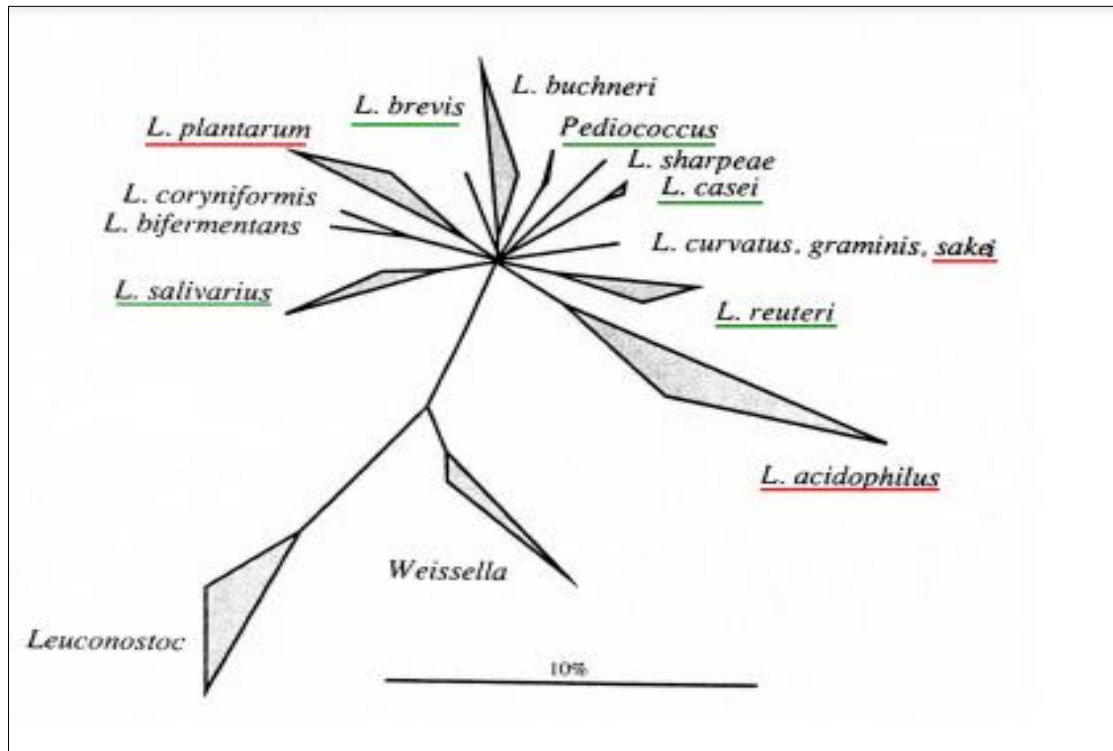


Figure 7 : Arbre phylogénétique des espèces principales du genre *Lactobacillus* basé sur les ARNr 16S. Les espèces soulignées en rouge ont au moins un génome disponible séquencé, et celles en vert sont celles qui ont au moins un génome en cours de séquençage. La barre indique une divergence de séquence estimée à 10%. (Amann *et al.*, 1995)

CHAPITRE II.

MATERIELS & METHODES

II. Matériels et Méthodes

II.1. Matériel Biologique

II.1.1. Souches lactiques et souches indicatrices

Les souches lactiques étudiées dans ce travail ont été isolées à partir de lait cru de vaches laitières élevées dans une ferme d'élevage traditionnelle dans la région de Menasria, Wilaya de Mascara située dans l'ouest de l'Algérie (36.17547° N, 1.44178° W), saines nourries avec du foin, du son et d'herbes de pâturages et n'ayant reçu aucune antibiothérapie. Ces souches ont été codifiées et les échantillons affectés d'un numéro comme suit : LbN1 (N°1), LbN5 (N°2), LbN9 (N°3), LbN10 (N°4), LbN11 (N°5), LbN12 (N°6), LbN13 (N°7), LbN14 (N°8) et LbN15 (N°9).

Les souches indicatrices sont représentées par les souches pathogènes suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus niger* ATCC 106404. Elles sont utilisées pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats lactiques.

II.1.2. Milieux de cultures

Selon les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques ciblées (*Lactobacilli* sp) dans cette étude et leur métabolisme fermentaire, différents milieux de cultures (Tableau 4) favorisant le développement de ces bactéries ainsi que leur identification ont été utilisés pour l'isolement des souches lactiques. Tous les milieux de cultures sont stérilisés à l'autoclave pendant 20min à une température de 120°C. La composition des différents milieux de cultures est exposée dans les Annexes.

Tableau 4 : Milieux de culture utilisés

Milieux de culture	Description / utilisation
<ul style="list-style-type: none">• MRS (Man Rogosa, Sharp)• Milieu lait écrémé	<ul style="list-style-type: none">• Bouillon et Gélose / culture et isolement des bactéries lactiques du Groupe de lactobacilles.
<ul style="list-style-type: none">• MRS (1,5% de Glycérol)	<ul style="list-style-type: none">• Bouillon / Conservation des isolats

<ul style="list-style-type: none">• Milieu hypersalé, Moeller (ADH), Milieu protéolytique, Galerie Api 50CHL	<ul style="list-style-type: none">• Bouillon/ identification phénotypique (caractérisation physiologique et biochimique)
<ul style="list-style-type: none">• Milieu MH (Muller Hinton)	<ul style="list-style-type: none">• Bouillon et Gélose / Etude de l'activité antibactérienne

II.2. Méthodes

II.2.1. La collecte des échantillons de lait

Dix échantillons de lait ont été prélevés sur dix vaches laitières dont les conditions d'élevage ont été précisées précédemment (se référer au paragraphe II.1.1.). Le prélèvement des échantillons de lait est réalisé dans des tubes à essais stériles, en conditions aseptiques avec traite manuelle à l'aide de gants stériles après avoir nettoyé les mamelles et la peau environnante avec de l'eau stérile. Les premières gouttes sont éliminées avant chaque prélèvement, puis les tubes sont transportés dans une glacière pour le respect de la chaîne de froid lors de l'acheminement jusqu'au laboratoire afin de procéder immédiatement à l'isolement.

II.2.2. Isolements, purification et conservation des souches

Les échantillons de lait ont été enrichis avec du lait écrémé (10 % : P/V) puis dilués et étalés sur MRS Agar (Conda laboratorios, Madrid, Espagne) (De Man *et al.*, 1960). Ensuite, 10 mL de lait enrichi ont été ajoutés de manière aseptique à 90 mL de solution saline stérile (0,9 % : P/V) qui a également servi à réaliser des dilutions en série dans des tubes stériles jusqu'à $D10^{-4}$. On prélève 1 mL de chaque dilution que l'on inocule en surface des géloses MRS stériles en boîtes pétri. Les boîtes sont alors incubées 24 à 48h selon la souche en anaérobie à 37 ° C. La coloration de Gram et le test catalase ont été utilisés pour la sélection préliminaire des isolats qui ensuite sont triplement purifiés par des repiquages successifs sur milieux MRS solide par la méthode d'épuisement de charge (méthode de quadrants). Les isolats de bacilles sélectionnés, présumés être des lactobacilles, étaient principalement Gram positifs et catalase négatifs.

Pour une période de conservation courte à 4°C (4 semaines au maximum), les souches pures sont ensemencées sur gélose MRS inclinée puis incubées 18h à 37°C. Pour une conservation de longue durée, les souches pures sont ensemencées en cultures jeunes sur

milieu liquide, et après incubation de 18h, les suspensions sont centrifugées et le culot bactérien est re-suspendu dans le milieu de conservation MRS-Glycérol 15% (25/75 v/v).

Une agitation au vortex permet d'homogénéiser la suspension bactérienne avant de la conserver au congélateur à -20 / -80°C. En cas de besoin, les cultures sont décongelées rapidement et repiquées dans le milieu lait liquide deux fois avant utilisation (Samelis *et al.*, 1994).

II.2.3. Caractérisation phénotypique et biochimique des isolats

Cette partie est basée sur une étude des caractères morphologiques à savoir l'examen macroscopique et microscopique, et des caractères physiologiques et biochimiques des isolats

II.2.3.1. Caractérisation phénotypique

II.2.3.1.1. Examen macroscopique

Cet examen permet de constater sur milieu liquide un trouble du milieu qui indique qu'il y a croissance bactérienne, ensuite la morphologie des colonies obtenues sur milieu solide, permet de déterminer la présence de colonies pures bien isolées. Ces colonies isolées sont soumises à une observation macroscopique afin de déterminer les caractères cultureux typiques des bactéries lactiques (forme, aspect, taille, couleur, opacité et contour) (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997).

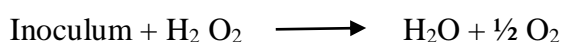
II.2.3.1.2. Examen microscopique

Basé sur la morphologie des cellules bactériennes et leur mode d'association observés par microscope optique. Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries et d'en déceler la forme. Des frottis des isolats sont ensuite réalisés pour une coloration différentielle de Gram ce qui nous permet de distinguer les isolats selon le type de Gram (positif ou négatif) (Prescott et al., 2003), leur morphologie (bacille ou coque) et leurs modes d'associations (isolés, en chaînettes ou en tétrades). Les bactéries lactiques sont à Gram+(Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997).

II.2.3.2. Caractérisation biochimique

II.2.3.2.3. Recherche de la catalase

La présence de catalase se traduit par l'apparition de bulles d'oxygène lors du contact de la bactérie avec l'eau oxygénée (H₂O₂) selon la réaction :



Quelques gouttes d'eau oxygénée sont mises en contact avec la suspension bactérienne et l'apparition de bulles d'oxygène sur la lame indique que la bactérie est catalase positive (Kandler et Weiss, 1986).

II.2.3.2.2. Croissance à différentes températures

Le facteur température permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles de celles thermophiles. Pour cela des tubes de bouillon MRS ont été inoculés par les cultures pures des isolats, puis incubés 24 à 48h à 30 et 45°C. Ensuite, pour vérifier la thermorésistance des isolats, des cultures pures sont inoculées dans du bouillon MRS et exposées à une température de 60°C et 100°C pendant respectivement 30 et 10min, puis incubées à 37°C pendant 24 à 48h. Les bactéries présentant une croissance sont considérées comme thermorésistantes (Stiles et Holzapfel, 1997).

II.2.3.2.3. Croissance sur milieux hyper salés

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification des lactobacilles. En effet, le sel inhibe les bactéries nocives et favorise l'activité fermentaire de certaines bactéries dont les bactéries lactiques qui le tolèrent (Masui *et al.*, 1979 ; Shockey et Borger, 1991). Les cultures à tester ont étéensemencées sur des bouillons hyper salés à 4, 6.5 et 9.5% de NaCl. Après une incubation à 37°C pendant 24h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble (Cai *et al.*, 1997).

II.2.3.2.4. Croissance à pH acide

L'influence de l'acidité sur la croissance des souches a été testée sur gélose MRS solide à différents pH (2.5, 4 et 5) obtenus par addition de HCl 1N. Les souches sontensemencées en touches (spots) et incubées 24 à 48h à 37°C (Sharpe, 1979)

II.2.3.2.5. Recherche de l'oxydase

La recherche d'oxydase est l'un des critères les plus couramment utilisés pour identifier les bactéries, notamment les bacilles à Gram négatif. Cela consiste à mettre en évidence la capacité des bactéries testées à oxyder la forme réduite incolore du dérivé méthylé de la p-phénylène diamine en leur forme oxydée rose violacé (Sharpe, 1979). À l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie bactérienne est déposée sur un disque préimprégnés du réactif N-diméthyl-paraphénylène diamine et laisser réagir 1 min. Les bactéries produisant l'oxydase deviennent rose-violettes. Dans notre cas, les bactéries oxydases négatives sont retenues.

II.2.3.2.6. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

La recherche de cette enzyme permet de caractériser les bactéries lactiques car elle libère l'ammoniaque et la citrulline à partir de l'arginine. Pour ce faire le bouillon Moeller à arginine a été ensemencé par les cultures à tester, après une incubation à 37°C pendant 24h, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du glucose. La dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac empêchent le virage au jaune (Sharpe, 1979)

II.2.3.2.7. Profil fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles Hétérofermentaires. Pendant leur croissance, les bactéries lactiques dégradent les sucres du milieu de culture en empruntant soit la voie homofermentaire dont le produit final est essentiellement l'acide lactique, soit la voie hétérofermentaire qui produit en plus de l'acide lactique, de l'éthanol, de l'acétate et du CO₂ (De Roissart et Luquet, 1994). Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂), par l'ensemencement des tubes de bouillon MRS liquide contenant les cloches de Durham avec les isolats et après incubation à 37°C pendant 24 h. La production de gaz se manifeste par l'apparition de bulles d'air dans les cloches (Sharpe, 1979). La capacité des bactéries lactiques à dégrader différents sucres est un critère d'identification important. Ce profil fermentaire a été mis en évidence sur galerie API 50CH (McLeod *et al.*, 2008).

II.2.3.3. Caractères sécuritaires des isolats

II.2.3.3.1. Test d'hémolyse

Le test d'hémolyse détermine l'innocuité des isolats. Il est réalisé en ensemencant en stries des cultures jeunes des isolats (18h) sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose au sang. L'incubation de ces boîtes à 37°C pendant 24h détecte l'hémolyse grâce à la formation d'une zone claire ou de couleur verte autour des colonies (β et α hémolytique, respectivement). En revanche, si les bactéries ne présentent aucune modification du milieu elles seront considérées non hémolytiques (γ hémolytiques). (Padmavathi *et al.*, 2018).

II.2.3.3.2. Antibiorésistance :

L'antibiorésistance des isolats est révélée par un antibiogramme en milieu solide vis-à-vis des cinq disques d'antibiotiques suivants : Colistine, acide nalidixique, streptomycine, sulfamide, gentamicine. Une culture jeune de 18h de chaque souche bactérienne est

ensemencée en surface de la gélose MRS et les disques d'antibiotiques y sont déposés en surface. Les boîtes de culture sont ensuite maintenues en incubation à 37°C pendant 18h, puis les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (Charteris *et al.*, 1998).

II.2.3.4. Caractères technologiques des isolats

II.2.3.4.1. Production d'acétoïne

Pour réaliser ce test, chaque tube contenant 5 mL du milieu Clark et Lubs stérile est inoculé par une culture jeune de 18h de la souche lactique à tester. Après incubation de 24h à 37°C, les réactifs de Vogues-Proskauer VPI (NaOH à 16% d'alcool) et VPII (alpha-naphtol à 6% d'alcool) sont ajoutés sur les cultures (V/V) à la température ambiante ; ce mélange est laissé reposer pendant 10min avant de lire la réaction. La réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu (Avril *et al.*, 1992).

II.2.3.4.2. Production d'exopolysaccharides

La production de Dextrane à partir de saccharose est mise en évidence sur milieu hyper saccharose MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962). Les isolats ensemencés par stries sont incubés à 37°C pendant 24h. Après incubation, les isolats producteurs d'exopolysaccharides sont visualisés par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes (Leveau *et al.*, 1991).

II.2.3.4.3. Activité protéolytique

L'activité protéolytique des isolats est déterminée sur gélose (Agar au Lait écrémé) qui une fois préparée, coulée, et solidifiée, est ensemencé par les précultures de 18h des souches, par la technique des multipoints à l'aide de coton-tige, et les boîtes sont incubées 24 à 48h à 37°C. La protéolyse est révélée par l'apparition des zones claires autour des souches (Veuillemard., 1986).

II.2.3.4.4. Activité lipolytique

La lipolyse est mise en évidence sur milieu gélosé à l'émulsion de jaune d'œuf. Des spots de la culture jeune ont été déposés en surface de cette gélose à l'aide de coton-tige. Après une incubation à 37°C pendant 24-48h, la lipolyse est révélée par une zone claire autour des spots (Harrigan et Mc Cane, 1990).

II.2.3.4.5. Pouvoir acidifiant

Le pouvoir acidifiant traduit la capacité d'une souche à produire de l'acide qui dans le cas des bactéries lactiques est l'acide lactique (Larpent, 1997). Il consiste à ensemercer du lait écrémé à 10% (PV) préalablement stérilisé par les souches lactiques isolées et qui est incubé 24h à 37°C. La cinétique d'acidification de ce lait est mesurée par titration à la soude 1N en présence de phénolphtaléine sur des prélèvements de 10mL de fermentât aux intervalles de temps 0, 2, 4, 6, 8 et 24h. Le virage de la couleur du lait au rose pâle persistant au moins 10 secondes correspond au point d'équivalence atteint par le volume de NaOH versé (V_{NaOH}). L'acidité du lait en degrés Dornic (°D) est calculée selon l'équation suivante (2) :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10 \quad (2)$$

Le pH du lait a été également mesuré.

II.2.4. Identification moléculaire des isolats

L'identification génotypique des différents isolats passe par plusieurs étapes qui sont décrites ci-dessous.

II.2.4.1. Extraction de l'ADN bactérien

L'ADN génomique des souches bactériennes a été extrait à l'aide du kit d'extraction et de purification d'ADN génomique Promega Wizard® (Promega ; Madison, WI, USA) selon les recommandations du fabricant. Les cellules ont été prélevées à partir des culots bactériens frais après centrifugation de la culture et élimination du surnageant.

Le Kit "Wizard® de Promega" d'extraction d'ADN, combine deux types de lyse cellulaire : une lyse enzymatique par le lysozyme et une lyse chimique par une solution de lyse (NaOH 2M+SDS). La quantité et la qualité des extraits d'ADN ont été déterminées grâce au spectrophotomètre le NanoDrop™ (Thermos Scientific, Wilmington, DE, États-Unis) (Figure 8) qui permet d'estimer automatiquement le rapport de pureté de L'ADN (A260/ A280) grâce à un système informatique sur la plateforme d'analyse post-génomique (<http://icore.unicaen.fr/plateformes/proteogen/>).

Selon le fabricant, la procédure d'extraction commence par une centrifugation (5 min à 2000xg) d'une culture cellulaire jeune (18h) donnée avec élimination du surnageant et re-suspension du culot bactérien dans un volume de 480µL de solution d'EDTA. Après addition de 120µL de solution de lysozyme, le mélange est incubé 1h à 37°C dans un Thermomix (Figure 9) avant d'être centrifugé 2 min à 13000xg. Un volume de 600µL de solution de lyse est ajouté au culot récupéré avant d'être incubé 5min à 80°C dans le Thermomix. Après quoi,

Kouadri Boudjelthia N. (2024). Etude de l'adaptation des probiotiques et détermination de leurs effets bénéfiques. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques, Université de Mostaganem

on laisse refroidir 10 min pour ensuite ajouter 2 μ L de solution RNAase et de nouveau incubé 1h à 37°C dans le Thermomix. Après refroidissement 10 min à température ambiante, 200 μ L de solution de précipitation de protéines sont ajoutés et le mélange est placé 5 min dans de la glace puis centrifugé 3 min à 13000xg pour récupérer le surnageant dans 600 μ L d'isopropanol cette fois-ci. Ceci est suivi par la récupération dans de l'éthanol 70% du culot d'une centrifugation de 2 min à 13000xg. Une nouvelle centrifugation (2 min à 13000xg) du mélange permet de récupérer le culot contenant l'ADN qui est débarrassé de l'éthanol par aspiration par micropipette et évaporation au speed vac concentrateur (Figure 9). Le culot est réhydraté avec 80 μ L d'une solution de Tris EDTA et incubé 1h à 65°C.



Figure 8 : Le spectrophotomètre Nano Drop (Thermos Scientific, Wilmington, DE, USA)

Figure 9 : Appareils utilisés pour l'extraction de l'ADN bactérien des isolats.

A : Le Thermomix ; **B :** Le Speed VAC Concentrateur.

II.2.4.2. Amplification d'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification des gènes d'ADNr 16S est réalisée par la réaction enzymatique de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant des amorces (P4/P3) universelles (Tableau 5) ciblant la région V6-V8 de l'ARN 16S bactérien pour un volume final de 50 μ L (milieu réactionnel + ADN extrait). Le programme PCR est établi par un Thermocycleur automatisé (fig.10) qui répète 30 cycles de trois étapes : dénaturation à 97°C pendant 1min ; hybridation à 58°C pendant 1min ; et élongation à 72°C pendant 1min et 30 sec.

Ces cycles sont précédés par une étape de pré-dénaturation à 95°C pendant 15min suivie d'une extension finale à 72°C pendant 15min. La réaction de PCR consiste à transférer l'ADN matriciel (10 à 50 ng/ μ L), dans un volume réactionnel (Tableau 6) contenant 1 μ L de chacune des deux amorces utilisées, 3 μ L de solution MgCl₂, 25 μ L de Taq Mix (Taq polymérase+ dNTP) et H₂O (qsp 50 μ L). Les amplifiât sont ensuite déterminés par électrophorèse sur gel d'agarose.

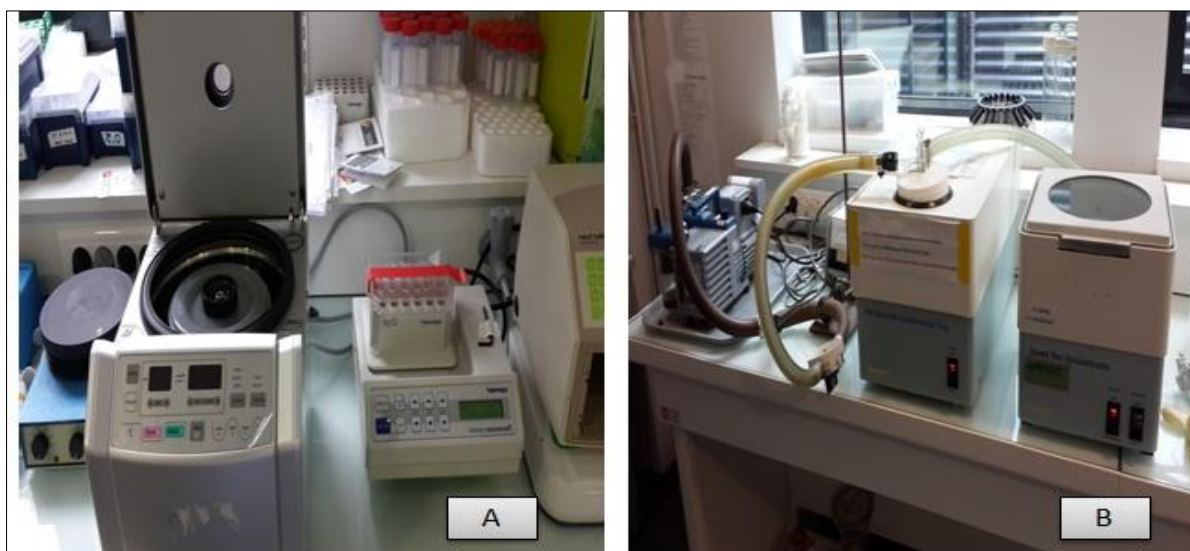


Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées.

Amorces	Séquences	Sens	Référence
---------	-----------	------	-----------

P3	Bact 968-GC-f 5'CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC3'	Forward	(Nübel <i>et al.</i> , 1996)
P4	Bact 1401-r 3'GCGTGTGTACAAGACCC5'	Reverse	

Tableau 6 : Composition du milieu réactionnel pour un échantillon PCR

Composants du milieu	Volume μ L
MgCL ₂ (2.5 mM)	3 μ L
Amorce P3	1 μ L
Amorce P4	1 μ L
TaqMix	25 μ L
H ₂ O	Qsp 50 μ L



Figure 10 : Thermocycleur et le programme PCR pour l'amplification du gène ADNr16s

II.2.4.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de la PCR ont fait l'objet d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %, contenant du bromure d'éthidium (BET). La taille des amplifiât (Région V6-V8 ; 434 pb) a été confirmé et les fragments d'ADN amplifiés sont visualisé sous la lumière ultraviolette dans une chambre sombre rattaché à micrographe pour photographier le gel (Figure 11).

II.2.4.3.1. Préparation du gel d'Agarose à 1%

1g de poudre d'agarose est dissout dans un volume de 100 mL de tampon TBE 1X (Tris ; Borate ; EDTA buffer 10X) : le tampon est dilué : TBE 1X= 10mL d'ED + qsp 1L de TBE 10X. Le mélange est doucement agité manuellement avant dissolution totale de l'agarose à chaud pendant 2 min au micro-onde. Le mélange est ensuite mis à refroidir 15min sur un agitateur avant de couler la cuve d'électrophorèse et laisser solidifier (fig.11). Une fois solidifiée, le gel est récupéré pour être immergé dans la solution de TBE 1X.

II.2.4.3.2. Le dépôt sur gel

Les échantillons à déposer dans les puits du gel sont préparés dans des tubes de 0.5mL à raison de 3 μ L de produits de PCR qui sont additionnés d'eau ultra pure et de Gel Red (Tableau 7). Une solution ladder (le marqueur de taille) est également préparée en mélangeant 3 μ L de ladder 1KB +1 μ L de Gel Red (solution rouge). Au final, un volume total de 9 μ L (3 μ L Ladder + 6 μ L des échantillons) est déposé dans chaque puits. La migration se fait sous une tension de 80 volts et dure 45 min.

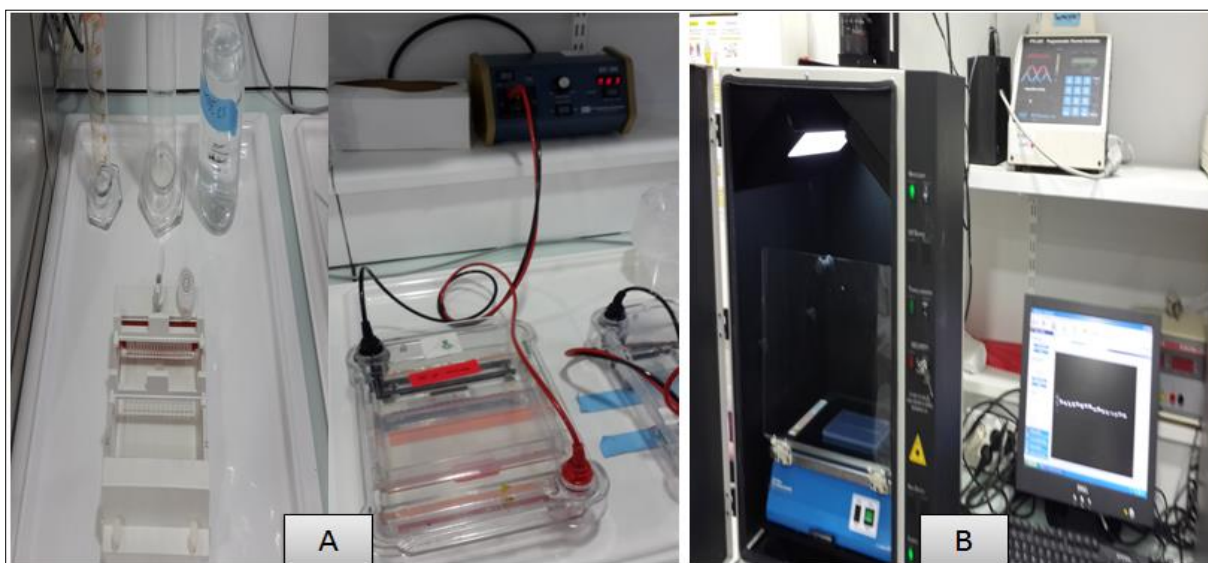


Figure 11 : Appareils utilisés pour l'électrophorèse sur gel d'agarose

A/ Préparation du gel d'agarose 1% ; B : Visualisation du gel sous les rayons ultraviolets

Tableau 7 : Milieu réactionnel pour l'électrophorèse

Milieu réactionnel	Volume final

<u>Préparation des échantillons de PCR :</u> Produit de PCR (ADN) : 3µL Le gel Rouge (Gel Red) : 1µL H2O: 2µL	6 µL
Marqueur de taille (Ladder)	3µL

II.2.4.3.3. Purification des produits de PCR

Les amplifiât d'ADN ont été purifiés à partir des produits PCR de toute trace de tampon (Éthanol ou autres produits utilisés lors d'extraction de l'ADN) en utilisant le kit de purification "le Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System».

➤ **Procédure suivie selon le fournisseur**

- Transférer 25µL de produits de PCR dans des tubes collecteur de 1.5mL stérile
- Ajouter le même volume de 25µL de solution Binding Membrane.
- Fermer les tubes avec les mini-colonne à membrane « SV minicolumn »
- Incuber à la température ambiante pendant 1min
- Transférer ensuite sur un nouveau tube avec colonne membranaire
- Centrifuger à 16000xg pendant 1min
- Lavage avec la solution Membranaire V=700µL ; et insertion de la colonne membranaire dans un nouveau tube collecteur
- Centrifugation à 16000xg Pendant 1min
- Deuxième lavage avec la même solution avec V= 500µL et réinsertion de la colonne membranaire dans un nouveau tube collecteur
- Centrifugation à 16000xg pendant 1min
- Vider le tube et le recentrifuger à une vitesse douce pendant 1min avec le couvercle de centrifugeuse ouvert pour permettre l'évaporation de n'importe quel éthanol résiduel.
- Transférer prudemment et doucement la colonne membranaire sur de nouveau tube eppendorf de 1.5mL pour l'élution

- Ajouter une solution de « Nucléase-Free Water » (solution de Tris) V=50µL à travers la colonne membranaire et laisser incuber à température ambiante pendant 1 min
- Centrifugation à 16000xg pendant 1min
- La solution obtenue est notre ADN pure
- Conserver la solution ADN à 4°C ou à -20°C.

II.2.4.3.4. Séquençage des produits de PCR purifiés

Le séquençage de nos produits de PCR a été réalisé par le laboratoire « Eurofins Génomic séquencing » à Cologne en Allemagne. Après réception des résultats, la correction des séquences brutes est réalisée en ligne pour obtenir les séquences Fasta de chacune des souches sélectionnées qui sont introduites dans la base de données BLAST du programme de NCBI (<http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>, consultée le 3 mars 2022) pour être comparées à celles de la Genbank pour l'identification des souches selon un pourcentage de similarité. Les séquences traitées ont été soumises à la base de données nucléotidiques de la Genbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), afin d'obtenir des numéros de soumission pour chaque souche de lactobacille.

En utilisant, le logiciel MEGA-X d'analyse génétique de l'évolution moléculaire (Kumar et al., 2018), disponible sur <http://www.megasoftware.net>, nous avons construit un arbre phylogénétique basé sur la comparaison des séquences nucléotidiques des ARNr 16s en calculant les distances phylogéniques par la méthode Neighbor's-joining avec la correction jukes-cantor (Saitou et Nei, 1987).

II.2.5. Identification par MALDI-TOF MS

Le protocole est détaillé en figure 12 ; il consiste à prélever une colonie pure depuis son milieu de culture MRS que l'on place sur une plaque en acier spéciale (MALDI-TOF plaque : MS Big Ankor 24BC, Bruker Daltonics inc, Allemagne), et que l'on étale avec 10µL d'une solution saturée d'acide trans-3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (HCCA portionné, Bruker) + 0.1µL d'acide formique pour permettre une bonne cristallisation de la matrice avec l'échantillon (Nacef *et al.*, 2016).

Le mélange est laissé sécher à température ambiante avant d'être introduit dans le spectrophotomètre de masse (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization -Time- Of- Flight Mass). Des spectres de masse sont obtenus automatiquement par un système informatisé qui les traduit ensuite en score d'identification par le logiciel MALDI Biotyper TM4.0 Data Base

Bruker (Daltonics, Germany). Les résultats sont obtenus sous forme de tableaux présentant une liste des 10 meilleurs scores d'identification allant de 0.00 à 3.00 (Tableau 8) et sont issus de deux tentatives expérimentales.

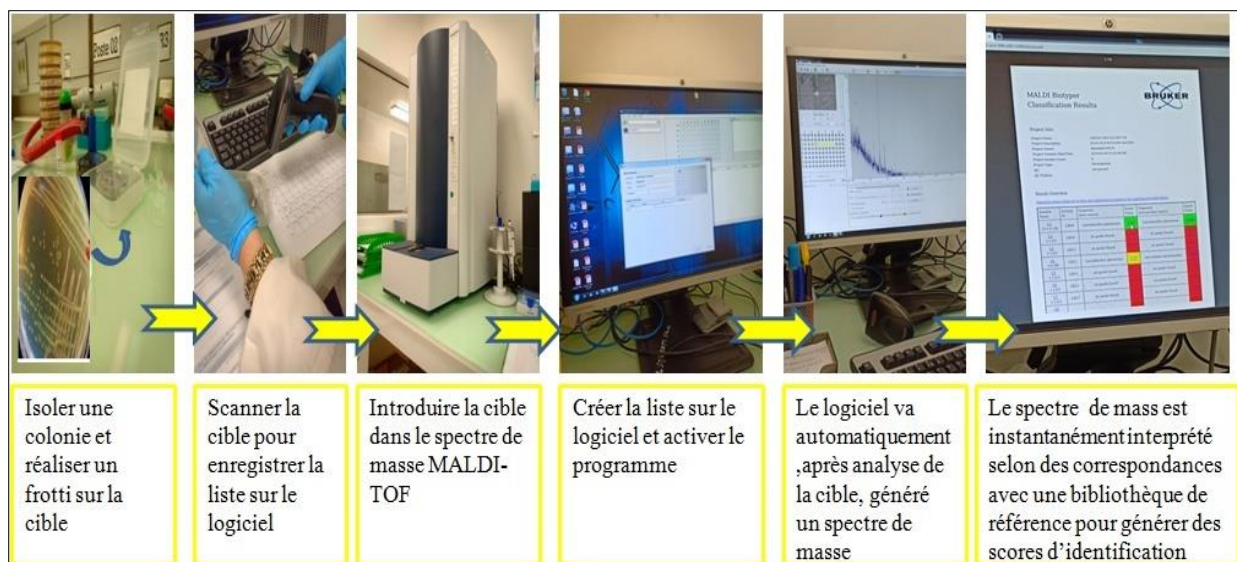


Figure 12: Etapes du protocole d'identification des isolats par la méthode MALDI-TOF MS

Tableau 8: Interprétation standard des scores obtenus par le logiciel du MALDI-TOF

Intervalle du score	Description	Symbole	Couleurs
[2.300- 3.000]	Identification probable élevé de l'espèce	(+++)	Vert
[2.000- 2.299]	Identification sécurisée du genre, identification probable de l'espèce	(++)	Vert
[1.700-1.999]	Identification probable du genre	(+)	Jaune
[0.000- 1.699]	Identification non fiable	(-)	Rouge

II.2.6. Sélection *in Vitro* des souches à potentiel probiotique

II.2.6.1. La résistance aux conditions hostiles du tube digestif

Dans cette partie, neuf souches de lactobacilles ont fait l'objet des différents tests qui simulent le parcours que peut subir un microorganisme probiotique durant son passage dans le tractus digestif.

II.2.6.1.1 Résistance au suc gastrique simulé

Dans le but de déterminer la capacité de survie des souches de lactobacilles au transit gastrique, les bactéries isolées ont été soumises pendant 4h à 37°C selon le temps de passage

à l'estomac (Sensoy, 2011), à une simulation du suc gastrique : [(% : P/V) : 6.2 NaCl, 0.22 CaCl₂, 1.2 NaHCO₃, 2.2 KCl, 0.3 pepsine, pH 2.5] (Pinto et al., 2006). Les cellules viables ont été dénombrées sur gélose MRS à la fin de l'incubation. Le fluide gastrique simulé a été stérilisé par filtration à travers une membrane de 0.22µm. Le taux de survie des souches a été calculer par la formule suivante:

$$\text{Taux de survie (\%)} = (\log \text{ UFC au temps } t_1 / \log \text{ UFC au temps } t_2) \times 100 \quad (2)$$

II.2.6.1.2. Résistance aux sels biliaries

La survie des souches aux sels biliaries a été évaluée selon la méthode de Hyronimus *et al.* (2000). En bref, 1 mL de chaque jeune culture de 18h a été centrifugé à 8000tr/min/10 min et le surnageant a été éliminé. Ensuite, 50 µL de chaque culot bactérien ont été inoculés dans 450 µL de MRS à 0.5% (P/V) de sels biliaries ajusté à pH= 8. La survie des souches de lactobacilles a été évaluée par la méthode de comptage des colonies sur gélose MRS après 4 h d'incubation à 37 °C. Le temps d'incubation est choisi en fonction du temps nécessaire à la digestion dans l'intestin grêle avec les sels biliaries (Sensoy, 2021). Le taux de survie a été calculé selon la formule précédente (2)

II.2.6.1.3. Résistance aux enzymes digestives

Les souches ont été exposées à l'effet de deux enzymes digestives l'amylase pancréatique et la trypsine, pour simuler leur confrontation à la barrière enzymatique du tractus gastrointestinal. Le taux de survie des souches en présence de ces enzymes a été évalué selon la méthode décrite par Ouwehand *et al.* (2001). Pour ce faire, 50 µL de chaque suspension de souche ont été inoculés dans 450 µL de solution d'amylase pancréatique (Sigma, Aldrich, Neustadt, Allemagne) fraîchement préparée (0.1 mg/mL dans du tampon PBS, pH 6.9) d'une part, et dans 450µL de solution de trypsine (Alfa Aesar, par ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA) fraîchement préparée (0.1 mg/mL dans du PBS, pH 7.6) d'autre part. Les cellules viables ont été ensuite dénombrées avec la méthode de comptage de colonies sur plaque de gélose MRS après 5h d'exposition à 37°C (Sensoy, 2021). Le taux de survie a été calculé selon la même formule précédente (2).

II.2.6.2. L'adhésion des souches isolées aux cellules épithéliales

Le récapitulatif des étapes du protocole est représenté dans la figure 13.

II.2.6.2.1. Préparation des cellules épithéliales

La méthode décrite par Mäyrä-Mäukinen *et al.* (1983) a été utilisée pour la préparation des cellules épithéliales. Des segments intestinaux (Iléon et colon) de poulet ont été ouverts et lavés avec une solution de tampon phosphate stérile (PBS, pH 7.2) dans laquelle ils sont maintenus 30 min à 4°C pour éliminer le mucus superficiel, avant d'être de nouveau lavés 3 fois avec le tampon PBS et sont remis à 4°C dans du tampon PBS avant d'être utilisés pour éliminer toutes les bactéries adhérentes. Les segments sont par la suite pris un par un afin de collecter les cellules intestinales en grattant la surface tapissant l'intestin grêle (iléon) et le côlon avec une lame stérile. Les cellules sont mises en suspension dans 9 mL de PBS. Des fractions cellulaires sont examinées au microscope optique pour s'assurer que les bactéries adhérentes ont bien été éliminées. La concentration en cellules épithéliales a été ajustée entre 10^4 à 10^5 cellules/mL (Yu et Tsen, 1993).

II.2.6.2.2. Test d'adhésion

Le test d'adhésion a été réalisé selon la technique de Fuller *et al.* (1978). Des cultures jeunes (18h) en bouillon de nos isolats de lactobacilles ont été centrifugées et remises en suspension dans une solution tampon (PBS, pH7.2) et la charge bactérienne est ajustée à une densité cellulaire de 10^8 UFC/mL. Ensuite, 1 mL de la suspension bactérienne et 1 mL de la suspension de cellules épithéliale préparées extemporanément sont mélangés dans un même tube mis en rotation à 20 tours/min et l'interaction est maintenue pendant 30 min à 37°C. L'adhésion est mesurée en observant au microscope optique des frottis après coloration avec 0.5% de Crystal violet pendant 5 min. Si plus de 15 cellules bactériennes adhèrent à une cellule épithéliale, le test est positif et cela traduit une bonne adhésion des bactéries aux cellules épithéliales (Pedersen et Tannock 1989 ; Lin *et al.*, 2007).

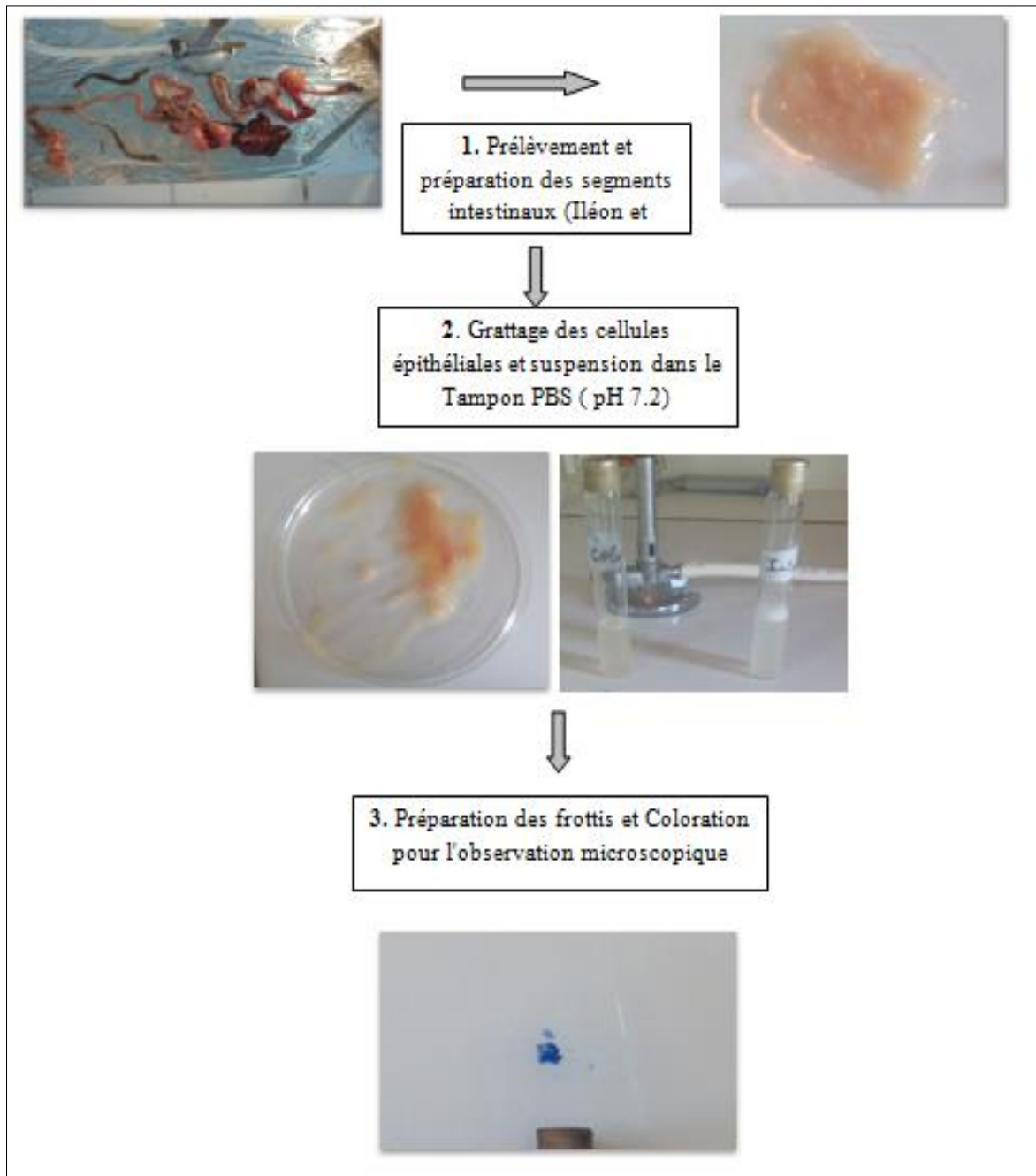


Figure 13 : Etapes du test d'adhésion aux cellules épithéliales.

II.2.6.3. Détermination des activités biologiques des souches

II.2.6.3.1 Activité antibactérienne

Le rôle antimicrobien des isolats lactiques est évalué contre six germes pathogènes responsables de toxi-infections : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus niger* ATCC 106404. Le protocole utilisé est

celui décrit par Chaalel *et al.* (2015). Brièvement, des cultures jeunes (18h) des isolats dans un milieu bouillon MRS à 37°C ont été centrifugées pendant 10 min à 14 000xg.

Ensuite, 50 µL de surnageant ont été filtrés (filtre 0,22µm) et leur acidité neutralisée puis mis dans des puits de 5 mm de diamètre sur la gélose MRS pré-inoculée avec les souches pathogènes indicatrices.

Les plaques de gélose ont été incubées à 37°C pendant une nuit pour toutes les bactéries pathogènes testées, et pendant 48 à 72h pour les champignons *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus niger* ATCC 106404. La formation de zones d'inhibition claires autour des puits, indique une activité antimicrobienne positive contre les pathogènes (Chaalel *et al.*, 2015).

II.2.6.3.2. Détermination de l'activité antioxydante

L'activité de piégeage du radical DPPH par les souches lactiques isolées a été déterminée selon la méthode décrite par Blois. (1958) qui consiste à mélanger 1 mL de chaque culture d'isolat jeune de 18 h avec 1 mL de solution méthanolique de DPPH à 0.004 % (P/V) qu'on laisse 30 min dans l'obscurité à température ambiante. Ensuite, chaque mélange a été centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 min et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 517 nm contre de l'eau distillée (témoin négatif) par rapport à l'acide ascorbique (Sigma, Aldrich) comme standard (contrôle positif). Le pourcentage d'inhibition (I%) de l'élimination des radicaux DPPH est calculé selon la formule suivante (3) :

$$I (\%) = [(A)_{\text{control}} - (A)_{\text{assay}}] / (A)_{\text{control}} \times 100 \quad (3)$$

II.2.7. Expérimentation exploratrice de l'effet anti-inflammatoire *in vivo* chez le modèle murin d'étude de rectocolite induite au sulfate de Dextrane sodique (DSS)

Dans ce travail, seule la souche isolée, *Lactiplantibacillus plantarum* LbN14, ayant présenté les meilleurs critères d'éligibilité au statut probiotique a été testée pour son effet préventif et/ou curatif vis-à-vis d'une inflammation colique légère à modérée induite par le sulfate de Dextran sodique (DSS) (Alfa Aesar MW, Ca 40 000USA, 25g) chez 40 rats Wistar mâles.

Toutes les procédures ont été approuvées par le Comité d'éthique animale de la Faculté des sciences de la vie et de la nature affiliée à l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem qui a approuvé cette recherche (Agrément n° 2019-013).

II.2.7.1. Matériel biologique

II.2.7.1.1. Souches bactériennes et produits utilisés

Une souche probiotique *Bifidobacterium animalis* sub sp *lactis* : Bb12, un complexe ultra biotique de souches probiotiques commerciales et un traitement médicamenteux de référence à la Sulfasalazine ont été utilisés pour évaluer et comparer l'effet anti-inflammatoire de la souche sélectionnée, *Lactiplantibacillus plantarum* LbN14 (Tableaux 9 et 10).

Tableau 9 : Bactéries lactiques utilisées

Souches bactériennes	Code	Origine
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	LbN14	Collection des souches isolées du lait de vache
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Bb12	Collection des Souches probiotique du laboratoire LMBFAS

Tableau 10 : Les produits pharmaceutiques utilisés

Produits	Composition	Laboratoires	Catégorie
Ultra biotique	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Bifidobactérium breve</i> (01géllule=4milliards de bactéries)	Nutrisanté	Complexe de Probiotique
Salazopyrine®En	Sulfasalazine 500mg	Pfizer	Comprimés enrobés gastro-résistants

II.2.7.1.2. Animaux d'expérience

Il s'agit de 40 rats Wistar mâles, obtenus de l'institut Pasteur d'Alger, nourris par tourteaux à base d'orge, de maïs, de son et de soja fourni par la Sarl « la ration » (Bouzareah, Alger).

II.2.7.1.3. Milieux de cultures

Les milieux de cultures utilisées lors de cette étude sont représentés dans le tableau 11. Les détails de composition des différents milieux se trouvent en annexe.

Tableau 11 : Milieux de cultures et leur utilisation

Milieux de culture	Utilisations
Gélose Columbia	Dénombrement de la flore <i>Bifidobactéries</i> sur milieu solide, après 72 h d'incubation à 37°C en conditions d'anaérobiose.
MRS agar	Dénombrement de la flore <i>Lactobacilles</i> sur milieu solide, après 72 h d'incubation à 37°C en conditions d'anaérobiose.
Mc. Konkey agar	Dénombrement de la flore <i>Entérobactéries</i> sur milieu solide, après 24 - 48 h d'incubation à 37°C en conditions d'aérobiose.
Bile esculine agar	Dénombrement de la flore <i>entérocoque</i> sur milieu solide, après 24 - 48 h d'incubation à 37°C en conditions d'aérobiose.
Viande-foie+ Alun de fer, sulfite de sodium à 80 ° C Pendant 10 minutes	Dénombrement de la flore <i>Clostridium</i> sur milieu solide, après 24 - 48 h d'incubation à 37°C en conditions d'anaérobiose.
Muller Hinton à base de sang	Dénombrement de la flore <i>bactéroïdes</i> sur milieu solide, après 24h d'incubation à 37°C en conditions d'anaérobiose.

II.2.7.2. Condition d'élevage des rats Wistar

Les 40 rats Wistar mâles âgés de 4 semaines, pesant entre 70 et 100g ont été hébergés dans une pièce aménagée à température contrôlée (22°C), respectant un cycle d'éclairage et d'obscurité (12h/12h) dans des cages en polycarbonate (Figure 14). Les rats ont été mis en lots de cinq rats par cage et nourris ad libitum et recevant de l'eau distillée stérile à volonté.

Figure 14 : Les cages d'élevage des rats Wistars

II.2.7.3. Protocole d'induction de l'inflammation au DSS

L'induction de l'inflammation intestinale par le DSS a été réalisée selon la méthode décrite par Roachat *et al.* (2007) et Watterlot *et al.* (2010). La figure 15 présente le protocole



expérimental de l'étude avec 3 groupes témoins, à savoir : un groupe témoin sans induction (lot 1), un groupe à colite DSS 3%-induite (lot 2), un groupe témoin LbN14 sans induction (lot8) , et 5 autres groupes à colite DSS 3% induite recevant les différents traitements en préventif et/ou curatif : le lot 3 : 3% DSS + sulfasalazine " Salazopyrine® en 500mg, Pfizer" du jour 7 au jour 14 ; le lot 4 : 3% DSS + Bifidobacterium animalis BB12 du jour 1 au jour 14 ; le lot 5 : 3%DSS + Ultra biotique « Complément alimentaire à base de souches de ferments lactiques, Laboratoire Nutrihealth, Algérie » du jour 1 au jour 14; le lot 6 : 3% DSS + LB14 du jour 1 au jour 14 ; et le lot 7 : 3% DSS + LB14 du jour 7 au jour 14.

L'induction de l'inflammation est effectuée par administration orale de 100 mL par groupe et par jour de solution de soude à 3% (P/V) de DSS pH 8.5. Pour ce faire, la gravité de la colite a été évaluée en mesurant la consommation alimentaire, le gain de poids corporel et en déterminant la longueur du côlon et les lésions histologiques. Les cultures bactériennes sont incubées à 37 °C pendant 18h et sont ajustées à $1,2 \times 10^9$ UFC/mL avant administration durant toutes les étapes expérimentales.

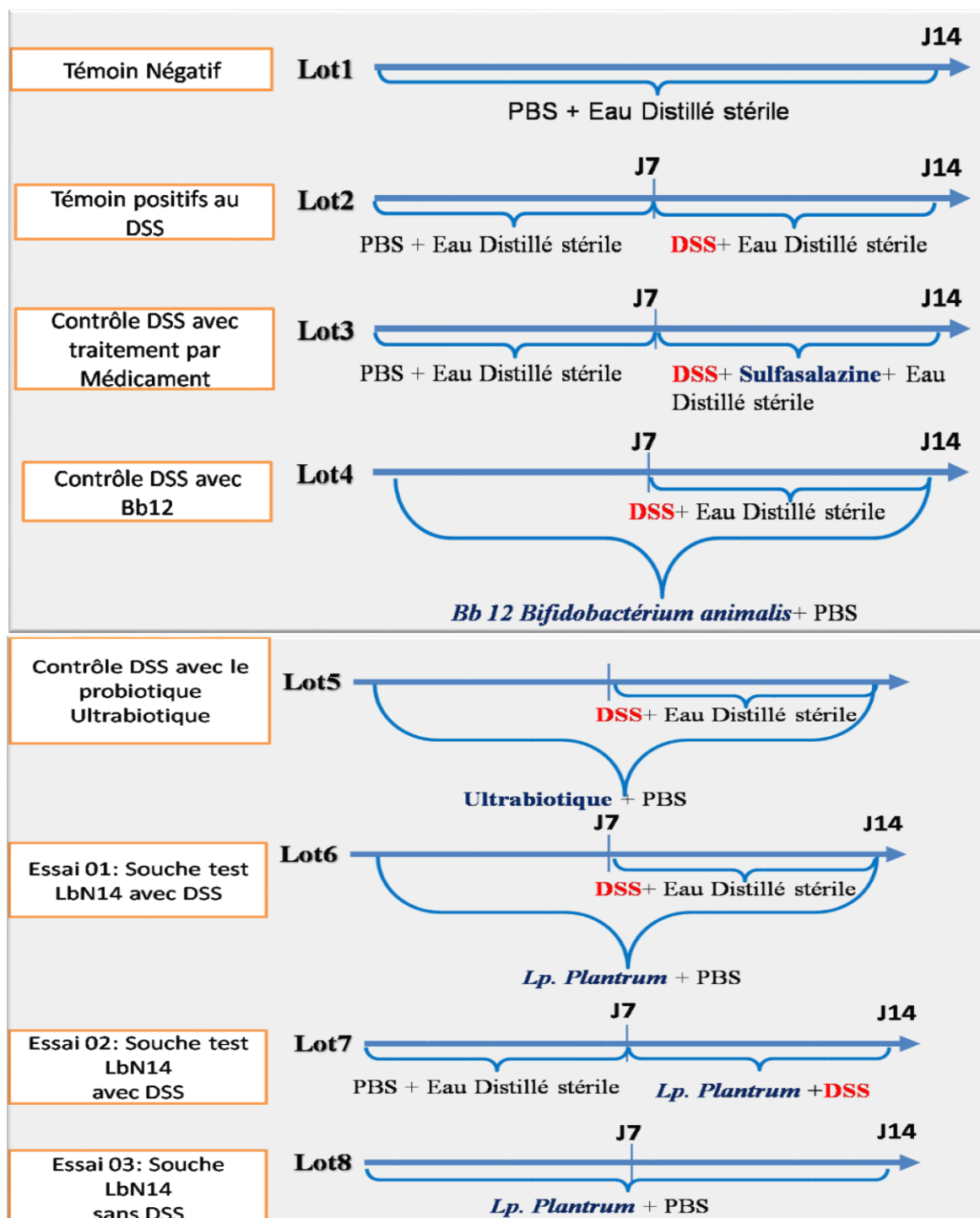


Figure 15 : Protocole expérimental : Les rats âgés de 4 semaines ont été randomisés en 8 lots (n = 5 rats par lot) : lot 1 : Témoin négatif pas d'induction, lot 2 : Témoin colite positif induction avec 3% DSS, lot 3 : (DSS+ Sulfasalazine) du jour 7 au jour 14) ; lot 4: (3% DSS + Bb12) du jour 1 au jour 14 ; lot 5 : (3% DSS + Ultrabiotique du jour 1 jour 14) ; lot 6 : (3%DSS +LbN14 du jour 1 au jour 14) ; lot 7: (3%DSS + LbN14 du jour 7 au jour 14 pendant l'induction au DSS ; le lot 8 : (Témoin positif LbN14" supplémentée seulement en LbN14 sans induction au DSS.

II.2.7.4. Dénombrement de la flore intestinale

Une analyse microbiologique des crottes des rats a été réalisée pour le contrôle de la flore intestinale. Le dénombrement en milieu solide a concerné les différents microorganismes de la flore digestive, à savoir : *les bifidobactéries, les lactobacilles, les entérobactéries, les entérocoques, les clostridium et les bactéroïdes*. Pour ce faire, un échantillonnage des crottes est réalisé dans des conditions stériles à partir de chaque rat dans des Eppendorf stériles. Ensuite, chaque échantillon de crotte est mis en suspension dans 10 mL d'eau physiologique et les solutions mères obtenues sont diluées au 1/10^{ème} en série jusqu'à la dilution 10⁻¹⁰. Après quoi, 100 µL de chaque dilution sont étalés sur les milieux appropriés (Guiraud, 2003).

La procédure est renouvelée 3 fois pour tous les lots d'expérimentation pour les trois phases expérimentales : la phase d'adaptation, la phase d'induction au DSS et la phase d'administration des différents traitements.

II.2.7.5. Collecte du sang et prélèvement des organes

Les rats sont sacrifiés après avoir été anesthésiés par inhalation du chloroforme et le sang est prélevé directement avec une seringue de 5 mL, mis dans des tubes de prélèvement et conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Ensuite, les rats sont disséqués et éviscérés par incision ventrale pour dégager le tube digestif ainsi que la totalité des organes (le cœur, la rate, les reins, les poumons, l'estomac, les testicules et le foie) qui sont pesés. Le colon récupéré et libéré du tissu adipeux adhérent est rincé doucement avec une solution saline et sa longueur est mesurée entre la jonction iléo-caecale et le rectum proximal.

II.2.7.6. Etude histologique

II.2.7.6.1. Préparation des échantillons de colon

Les coupes histologiques du colon ont été menées selon le protocole décrit par Lenoir *et al.* (2011) (Figure 16). Brièvement, les sections de colon et de rectum prélevées sur chaque rat des 8 groupes sont fixées dans du Bouin pendant 48h. Après un lavage rapide à l'eau du robinet pour éliminer l'excès de Bouin, les sections sont placées dans des cassettes de déshydratation qui sont plongées dans une série de bains d'éthanol à 70 % pendant au moins 6 h et 100% pendant 20 à 24h.

La clarification des échantillons se fait en maintenant les cassettes 4h dans le mélange éthanol-chloroforme (1V/1V) puis 6h dans du chloroforme pur. Les cassettes contenant les

prélèvements sont par la suite incluses dans la paraffine pendant 24h avant utilisation pour la confection des coupes histologiques.

II.2.7.6.2. Préparation des coupes histologiques sur lame

Les blocs de paraffine contenant les segments à analyser sont obtenu en plaçant la face inférieure des cassettes sans le couvercle sur des moules en acier inoxydable chauffés contenant les coupe transversale ou longitudinale. L'ensemble est enrobé de paraffine et laisser refroidir sur une plaque de glace afin que le bloc de paraffine se forme et se solidifie (fig.16). Après formation du bloc, retirer les moules et congeler le bloc à -20°C. Les blocs des tissus doivent être homogènes en consistance, sans bulles d'air car ce caractère est d'une grande importance lors de la confection des coupes au microtome. Les cassettes qui contiennent le prélèvement sont fixées à l'ensemble du bloc car le numéro d'identification permet de garantir la traçabilité des échantillons.

Trois coupes de 5 µm ont été effectuées au microtome (Leica, Allemagne) en série et notées A, B, C, R. Cette épaisseur permet aux rayons lumineux du microscope de traverser les coupes et d'éviter les superpositions tissulaires (McMillan et Harris, 2018).

Les coupes des blocs de tissus sont réalisées d'abord grossièrement (20 microns), puis finement (5microns), pour permettre une lecture microscopique correcte. Il est nécessaire que le ruban des coupes obtenu soit sans plis ni déchirures. La partie du ruban choisi est prise par une pince métallique et mise sur une lame inondée d'alcool à 70 % puis libéré à la surface de l'eau distillée chauffée du bain marie à 45°C.

Une fois les coupes bien tendues, elles sont récupérées sur la lame identifiée placée en angle droit avec la surface de l'eau du bain marie pour éviter la mauvaise fixation du ruban sur la lame. Ensuite, les lames sont mises sur une plaque chauffante réglée à 50°C pendant 1h pour éliminer la paraffine.

II.2.7.6.3. La coloration a l'hématoxyline et éosine

Le principe de cette coloration est d'associer un colorant nucléaire à un colorant cytoplasmique et les étapes de la coloration sont décrites dans la figure 17. Il s'agit de déparaffiner d'avantage les lames par passage dans deux bains de xylène de 10 min chacun, Réhydrater ensuite graduellement, dans deux bains d'alcool absolu pendant 5min puis un bain d'alcool à 70% pendant 5 mn. Cette réhydratation est nécessaire pour l'adhésion des colorants au niveau tissulaire Les échantillons sont colorés d'abord avec l'hématoxyline



Figure 16 : Etapes de préparation des échantillons de colon pour l'examen histologique

Pendant 20 mn suivi d'un rinçage à l'eau du robinet pendant 15 min, et ensuite avec l'éosine pendant 10 min suivi d'un rinçage de 10 min à l'eau du robinet. Les échantillons sont ensuite de nouveau déshydratés dans de l'alcool à 70 % puis par immersion rapide dans de l'alcool pur avant d'être séchés au papier buvard et transférés dans du xylène pendant 15 min pour une clarification.

Les lamelles sont placées sur les lames en évitant la formation des bulles d'air, et sont fixées en utilisant un baume fixateur (baume de Canada). Les lames sont ensuite observées sous microscope optique.



Figure 17 : Etapes de coloration des lames à l'hématoxyline et à l'éosine.

II.2.7.6.4. Evaluation des atteintes histologiques

Dans cette partie les lames préparées ont été lues à l'aide d'un microscope optique et un score histologique (Tableau 12) a été établi individuellement pour chaque rat, selon une grille d'évaluation des atteintes inflammatoires de la muqueuses épithéliales des trois sections du colons et le rectum. Le score de chaque lot représente une moyenne des atteintes histologiques (Lenoir *et al.*, 2011)

Tableau 12 : Score histologique des atteintes inflammatoires (Lenoir *et al.*, 2011)

Lame n°	Rat n°				Lot n°											
Les atteintes histologiques	Score A				Score B				Score C				Score R			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Destruction de l'épithélium de surface																
Dilatation des cryptes																
Infiltration des Polynucléaires Neutrophiles																
Infiltration des Mononucléaire																
Profondeur d'infiltration																
Abcès cryptiques																
Œdème																
Décollement dystrophique de l'épithélium de surface (érosion)																
Ulcération																

II.2.8. Analyse statistique

Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel IBM SPSS, version 26.0. Les données ont été rapportées comme la moyenne \pm SEM. Le niveau de signification statistique a été fixé à $p < 0,05$ pour les deux tests latéraux. L'ANOVA unidirectionnelle suivie du test de Tukey a été utilisée pour comparer les résultats de survie des différentes souches aux conditions gastro-intestinales simulées *in vitro* et l'activité antioxydante. La MANOVA multidirectionnelle, suivie du test de Tukey, a été utilisée pour comparer les résultats de l'activité antimicrobienne des différentes souches obtenues.

Les comparaisons entre les différents résultats *in vivo* ont été analysées par le logiciel GraphPad Prism7. L'analyse de la distribution paramétrique était affirmée par le test de Shapiro et le test de corrélation de Pearson r . Les différences sont considérées comme significatives si ($P < 0.05$), non significatives si ($P > 0.05$).

CHAPITRE III.

RESULTATS ET DISCUSSION

III. Résultats et Discussion :

Les bactéries lactiques (ou LAB en abréviation du terme anglais « Lactic Acid Bacteria ») constituent une flore diversifiée et abondante dans le lait et les produits laitiers et dont l'utilisation dans les aliments fonctionnels et la formulation de produits diététiques à base de probiotiques revêt un intérêt croissant. Ceci est lié à leur capacité de production de métabolites et surtout de fermentation lactique qui améliore considérablement les propriétés sensorielles des aliments (Mokoena, 2017 ; Ruiz Rodríguez *et al.*, 2019). En Algérie, le lait cru et les produits laitiers sont largement consommés en raison de leur richesse en protéines qui constituent un substitut potentiel à la viande qui reste coûteuse. Cette consommation s'ancre également dans des habitudes alimentaires traditionnelles qui privilégient la valeur nutritionnelle de ces produits (Kacimi, 2013 ; Derouiche et Zidoune, 2015 ; Ait Abdeslam *et al.*, 2019).

L'analyse phénotypique, moléculaire (PCR-16) et protéomique (MALDI-TOF) d'un total de neuf isolats de bactéries lactiques sélectionnés, révèlent la présence majoritaire de huit souches identifiées en tant que *Lactiplantibacillus plantarum* et une souche renommée *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Les résultats de l'étude sont représentés par quatre volets relatifs à :

- L'identification phénotypique des souches lactiques : où sont présentés critères morphologiques, physiologiques et biochimiques et les caractères technologiques des isolats,
- L'identification moléculaire par PCR des isolats en utilisant des amorces d'ADNr 16s, et l'identification protéomique (MALDI-TOF) comme une étape d'identification précise
- La soumission des isolats aux différents tests d'éligibilité au statut de souches probiotiques tels que leur survie aux conditions hostiles du tractus gastro-intestinal et leurs activités biologiques,
- Leur effet anti-inflammatoire in Vivo dans un modèle murin de rectocolite induite par le Sulfate de Dextran Sodique (DSS) utilisant des rats Wistar.

III.1. Identité phénotypique des isolats

La caractérisation phénotypique des isolats a porté d'abord sur les caractères morphologiques déterminés par observation macroscopique (aspect de la colonie sur gélose MRS et lait écrémé), et microscopique (coloration de Gram et forme cellulaire) ; ensuite sur les caractères physiologiques tels que le type fermentaire, les activités de l'oxydase et de l'arginine dihydrolase, l'influence de la température, du sel et du pH sur la croissance ; sur les caractères biochimiques comme le profil fermentaire ; ainsi que sur l'innocuité des isolats et leurs caractères technologiques.

III.1.1. Aspect macroscopique et microscopique des isolats

L'observation macroscopique des isolats sur les différents milieux solides (MRS et lait écrémé) a permis d'identifier les colonies bactériennes après une incubation de 24 h à 37°C. Les différentes colonies visualisées étaient rondes, de contours réguliers, de couleurs blanches à jaunâtres et opaques (Figure 18).

L'observation microscopique des isolats après coloration de Gram, a révélé des formes cellulaires en bâtonnets (Figure 19). En effet, les bactéries lactiques sont Gram positive et catalase négative. Elles se présentent comme des bâtonnets ou coccobacilles et sont reconnues comme lactobacilles. Elles peuvent aussi être sous forme de coccidé et reconnues comme entérocoques, streptocoques ou pédiocoques ... selon leur mode d'association (Kandler et weise., 1986).

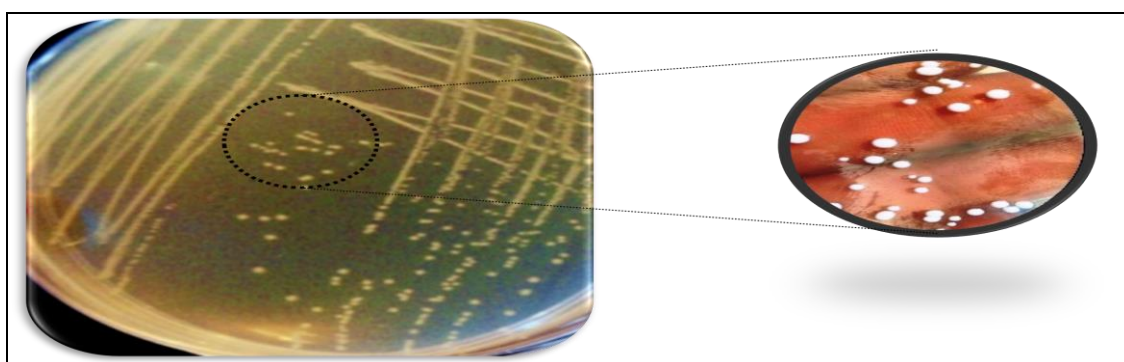


Figure 18: Aspect macroscopique des colonies de l'isolat lactique (LbN14) observé après purification par la méthode des stries

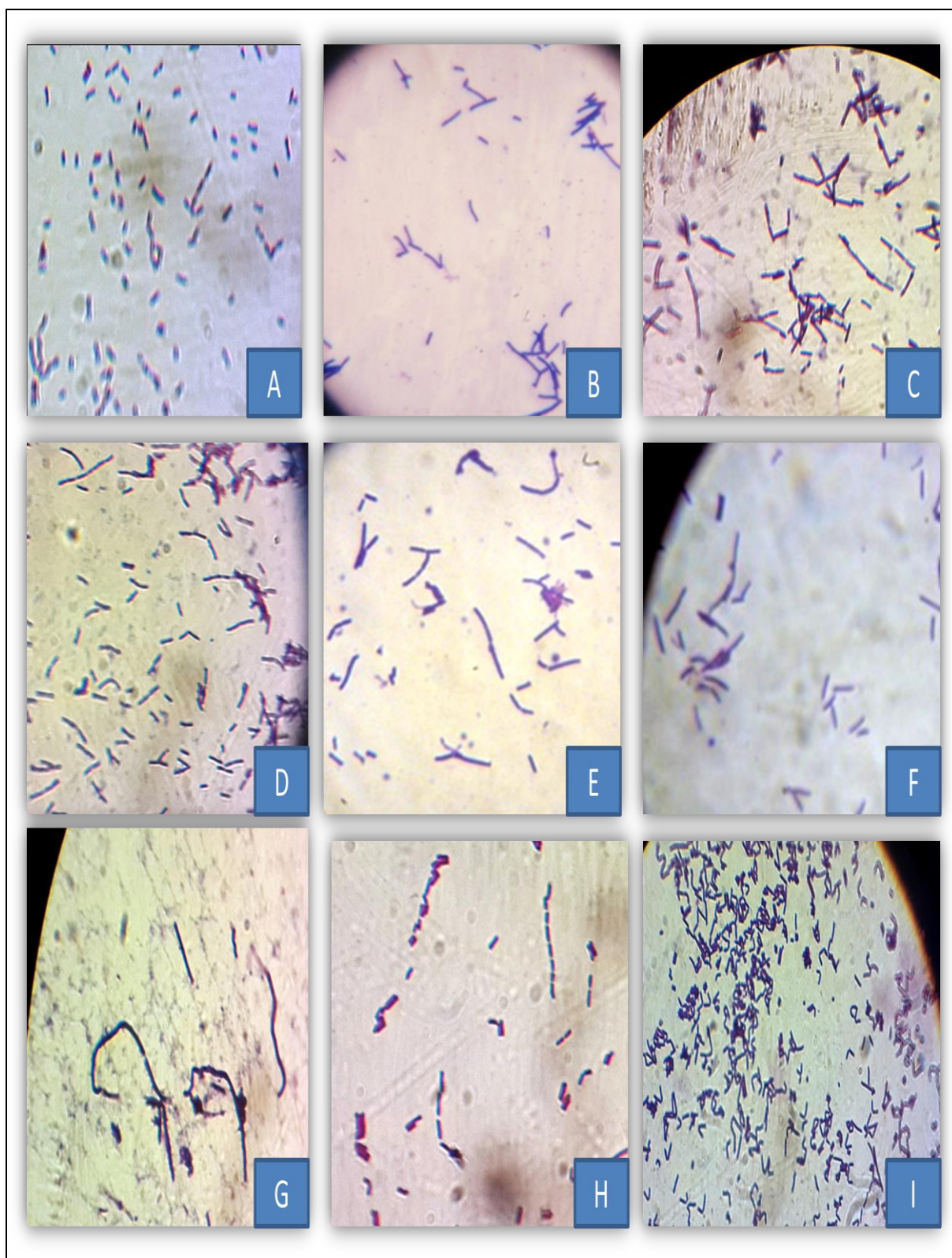


Figure 19 : Aspect microscopique des neuf isolats de lactobacilles après coloration de Gram ($\times 100$) ; A : LbN1/ B : LbN5, C : LbN9, D : LbN10, E : LbN11, F : LbN12, G : LbN13, H : LbN14, I : LbN15

III.1.2. Caractères physiologiques et biochimiques

Selon les caractères physiologiques et biochimiques, les neuf souches identifiées, huit s'apparentent à l'espèce *Lactiplantibacillus plantarum* et une souche s'apparente à l'espèce *Lactiacaseibacillus rhamnosus*. Sur le plan physiologique, les souches étudiées présentent les mêmes caractéristiques car elles sont toutes catalase et oxydase négatives, arginine dihydrolase négatives, hétéro fermentaires facultatives et se développent toutes à 37°C (Tableau 13).

La physiologie des bactéries lactiques les apparente au groupe de bactéries non sporulantes, à Gram positif et catalase négative, oxydase négative, anaérobie, constituées à la fois de Cocci et de formes Bacilli. Elles sont strictement fermentatives avec comme principal produit final du métabolisme des glucides, l'acide lactique (Axelsson, 1998).

Les souches ont affiché une croissance positive en présence de 4.5 et 6.5% de NaCl ; alors qu'à 9.5% il n'y a aucune croissance. D'autres études ont rapporté récemment la tolérance modérée des souches de *lactobacilles* aux différentes concentrations de NaCl (Yalçınkaya et Kılıç, 2019 ; Vaccalluzzu *et al.*, 2020). Le critère de tolérance aux fortes concentrations de NaCl est un attribut favorable pour la sélection de souche probiotique utilisable en tant que starter de culture (Marroki *et al.*, 2011 ; Jeyagowri *et al.*, 2023).

La croissance des souches dans les différents milieux acides testés varie selon la souche considérée. Les souches LbN1 et LbN12 poussent aux pH 4.5 et 5, mais pas à pH 2.5. Toutes les autres souches se sont développées à tous les pH testés (2.5 ; 4.5 et 5). Effectivement, la littérature rapporte que la plupart des LAB préfèrent un pH initial de 6 à 7 pour la croissance et que de nombreux lactobacilles sont acidophiles et tolèrent des conditions de pH faible (Garvie, 1967 ; Jay *et al.*, 2005 ; Hutkins et Nannen, 1993).

La coagulation du lait par les isolats et la formation du caillé étaient déterminées par simple culture dans le milieu lait écrémé. Les résultats révèlent la formation de caillé, donc une coagulation positive chez la totalité des souches *L. rhamnosus* (LbN1) et *L. plantarum* (LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14, et LbN15). En effet, les bactéries lactiques sont connues par leur capacité à coaguler le lait utilisant le lactose pour produire l'acide lactique et la présence d'un système protéolytique complet constitué d'une protéinase associée à l'enveloppe cellulaire, qui leur permet de dégrader et d'utiliser efficacement la caséine du lait (Kunji *et al.*, 1996).

Le caractère homofermentaire ou hétérofermentaire des lactobacilles est déterminé par la production de gaz à partir du glucose. Les souches lactiques sont toutes classées hétérofermentaires avec production de CO₂. En effet, les bactéries lactiques hétérofermentaires facultatifs produisent de l'acide lactique, de l'éthanol ou de l'acide acétique et du CO₂, mais dans certaines conditions (zones climatiques chaudes) et en fonction de la source de carbone, certaines bactéries comme *Lactiplantibacillus plantarum* peuvent adopter un métabolisme homofermentaire intéressant (Siezen et van Hylckama, 2001 ; Krieger-Weber, 2022).

Les résultats de fermentation des glucides par les neuf lactobacilles, sont illustrés dans le tableau 14 où l'on voit que toutes ces souches fermentent le maltose, le D-glucose, le D-fructose et le D-mannose. Certains sucres comme l'arabinose, le mannopyranoside, le mellobiose et raffinose sont aussi fermentés par toutes les souches exceptées par la souche LbN1. Ces résultats confirment la présence de deux profils fermentaires différents.

Selon Ahrne *et al.* (1989), l'aptitude des LAB à fermenter ou non certains glucides est reliée à la présence de gènes codés par des ADN extra chromosomiques (les plasmides), ce qui fait que lors de la perte ou l'acquisition de ces plasmides, la bactéries développent un profil métabolique différent entre les espèces du même genre ou même au sein de l'espèce elle-même, affectant par ce fait le modèle de fermentation et donnant ainsi la possibilité de pouvoir les différencier et identifier le genre et /ou l'espèce.

La caractérisation phénotypique est fréquemment utilisée pour l'identification des LAB et permet d'identifier le genre. L'identité du genre *Lactobacillus* est confirmée par la coloration de Gram ainsi que certains tests biochimiques. Les espèces de *Lactobacillus* sont des bâtonnets Gram-positifs, catalase-négatifs, non sporulés et non mobiles (allant des coccobacilles aux bacilles longs et minces) (Mohammed *et al.*, 2009).

Les caractères physiologiques et la fermentation des différents types de sucres sont utilisés dans la classification des *Lactobacillus* en groupes (Ait Abdeslam *et al.*, 2019). Cependant, l'identification des espèces de *Lactobacillus* basée uniquement sur les tests physiologiques, biochimiques et de fermentation des sucres est insuffisante et non fiable, c'est pourquoi il est recommandé et très utile d'utiliser les techniques moléculaires offrant une alternative rapide et spécifique d'identification fiable et sûre de l'espèce (Jeyagowri *et al.*, 2023).

Tableau 13 : Caractères phénotypiques des isolats lactiques

Souches	LbN1	LbN5	LbN9	LbN10	LbN11	LbN12	LbN13	LbN14	LbN15
Formes cellulaires	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 4.5% de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 6.5% de NaCl	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Croissance à 9.5% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à pH 2.5	-	+	±	+	+	+	±	+	-
Croissance à pH 4	+	±	±	±	+	+	+	+	+
Croissance à pH 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coagulation du lait	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Test ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production de CO2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
fermentation Type	Hetero-fermentaire facultatif	Hetero-fermentaire facultatif	Hetero-fermentaire facultatif	Hetero-fermentaire facultatif	Hetero-fermentaire facultatif	Hetero-fermentaire facultatif	Hetero-fermentaire facultatif	Hetero-fermentaire facultatif	Hetero-fermentaire facultatif

+: positif (présence); -: Négatif (absence); ±: Croissance faible

Tableau 14 : Profil fermentaire des neuf isolats réalisés sur galerie API 50CHL (Biomérieux, France)

Souches lactique	LbN1	LbN5	LbN9	LbN1 0	LbN1 1	LbN1 2	LbN1 3	LbN1 4	LbN1 5
L/Arabinose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D/xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L/Adonitole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L/Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitole	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitole	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannopyranoside	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucopyranoside	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	±	+	+	+	+	+	+	+	+
Mellobiose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inuline	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	±	+	+	+	+	+	+	+	+
Turanose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D/Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L/Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D/Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L/Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: fermentation ; -: absence de fermentation

III.1.3. Caractères sécuritaires et technologiques des isolats

III.1.3.1. Innocuité

En ce qui concerne la sécurité des microorganismes probiotiques, l'hémolyse constitue un des principaux facteurs déterminant la virulence des bactéries pathogènes, et c'est pourquoi l'activité hémolytique a été utilisée pour évaluer l'innocuité des souches isolées. Un antibiogramme a également été réalisé. Selon les résultats obtenus (tableau 15), les souches testées ne présentent aucune action hémolytique, ce qui atteste de leur innocuité. La sensibilité des isolats aux différents antibiotiques, déterminée par la méthode des disques, révèle que les isolats LbN5, LbN9 et LbN11 sont résistants aux cinq antibiotiques testés suivants : colistine, acide nalidixique, streptomycine, sulfamides et gentamicine ; alors que les isolats LbN1, LbN10, LbN12, LbN13, LbN14 et LbN15 ont présenté une sensibilité à la colistine.

En effet, il est rapporté que les souches probiotiques sélectionnées devraient avoir la capacité de résister aux antibiotiques couramment utilisés dans les traitements des infections gastro-intestinales (Ren *et al.*, 2014). Les probiotiques présentant des résistances aux antibiotiques peuvent être utiles dans la gestion de ce type d'infections, et sont capables d'exercer des effets positifs contre certaines pathologies diarrhéiques en étant associés aux antibiotiques dans leur traitement (Georgieva *et al.*, 2015). Cependant, les probiotiques LAB seraient sensibles aux antibiotiques de manière à ne pas diffuser la propriété de résistance à d'autres bactéries pathogènes dans la même niche, où la résistance aux antibiotiques entre elles devrait être innée et non transférable (Jose *et al.*, 2015).

Aussi, plusieurs souches de *Lactobacillus* sont naturellement résistantes à plusieurs antibiotiques, ce qui soulève des inquiétudes quant au transfert d'une telle résistance à d'autres bactéries pathogènes, mais, étant codée sur le chromosome, cette résistance n'est pas facilement transférable des lactobacilles tel que cela a été démontré par des expériences de conjugaison (Tynkynen *et al.*, 1998).

Par ailleurs, l'autorité Européenne de sécurité des aliments (EFSA ou European Food Safety Authority) a établi un système de présomption de sécurité (QPS ou Qualified Presumption of Safety) pour l'évaluation du statut des micro-organismes, qui prend en compte des facteurs tels que leur taxonomie, leur familiarité, leur pathogénicité et leur utilisation prévue. Si une espèce particulière de micro-organisme est approuvée en vertu du QPS, les souches ultérieures de cette espèce ne nécessiteront pas d'examen réglementaire

avant d'être introduites dans l'approvisionnement alimentaire. Au cours de l'examen initial du QPS, la sécurité de *L. plantarum*, ainsi que celle de nombreux autres membres du genre *Lactobacillus*, a été évaluée. Sur la base des preuves disponibles, le comité scientifique a conclu que *L. plantarum* était effectivement sans danger pour la consommation (EFSA, 2017 ; Halder *et al.*, 2017).

III.1.3.2. Thermo résistance

Le test de thermo résistance permet d'évaluer la résistance des souches aux différentes températures des procédés de pasteurisation des produits laitiers. D'après les résultats obtenus, la majorité des souches testées résistent aux températures de 63°C et 65°C après 10 min d'exposition ; par contre elles n'ont pas résisté à 100°C pendant 10min (Tableau 16).

Ces résultats sont comparables à ceux de Tailliez. (2004) qui a démontré que la plupart des lactobacilles se multiplient dans une gamme de température comprise entre 15 et 42 °C et certaines souches de lactobacilles dites « thermorésistantes » restent viables au-delà de 55 °C.

L'étude d'Ait Abdeslam *et al.* (2019) démontre que le traitement de 63,5°C pendant 30 min détruit tous les lactobacilles. Il a également été rapporté que des souches de *L. paracasei* sub sp. *tolerans* sont capables de résister à une température de 72°C pendant une exposition de 40 secondes (Gobbetti *et Minervini*, 2014).

Tableau 15 : Innocuité des neuf isolats de lactobacilles

Isolats	LbN1	LbN5	LbN9	LbN10	LbN11	LbN12	LbN13	LbN14	LbN15
Test d'hémolyse*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Résistance aux antibiotiques									
Colistine	S	R	R	S	R	S	S	S	S
Acide Nalidixique	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Streptomycine	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Sulfamide	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicine	R	R	R	R	R	R	R	R	R

* (-): Absence d'hémolyse: les bactéries sont dites γ Hémolytique, ne présente aucune zone autour des colonies

Tableau 16 : Propriétés technologiques des neuf isolats de lactobacilles

Isolats	LbN1	LbN5	LbN9	LbN10	LbN11	LbN12	LbN13	LbN14	LbN15
Test de thermo résistance									
Croissance à 63°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 65°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 100°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production d'acétoïne (Pouvoir aromatisant)									
Réaction vpI/vpII	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Pouvoir texturant									
Production des EPS	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Activité protéolytique									
Protéolyse	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Diamètre (mm)	15	15	6	11	12	/	/	14	14
Activité de Lipolyse									
	-	+	-	-	+	+	+	+	+

+: Résultats positif (présence) / -: Résultats négatif (absence); +/-: production faible

III.1.3.3. Production d'acétoïne

Le pouvoir aromatique des isolats est déterminé par la production d'acétoïne. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 20 et révèlent une production d'acétoïne positive par la formation d'un anneau rose intense à la surface du milieu Clark et Lubs.

Les souches : LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13 et LbN14, ont présenté une réaction positive aux réactifs avec l'apparition de l'anneau rose à la surface du milieu. En revanche, les souches LbN1 et LbN15 sont incapables de produire l'acétoïne d'où l'absence de la couleur rose en surface du milieu. En effet, lorsqu'une souche est capable de fermenter des hexoses via la voie du butylène glycolique pour produire l'acétoïne, elle présentera un résultat VP positif (Harrigan et McCane, 1976 ; Axelsson, 2004).

La création de molécules odorantes est une étape technologique essentielle dans le processus de production de produits laitiers fermentés. L'émergence d'arômes dans les produits fermentés est le résultat direct des processus métaboliques des bactéries lactiques, notamment la glycolyse, la lipolyse et la protéolyse (Marilley et Casey, 2004).

De nombreux auteurs ont présenté des résultats comparables en ce qui concerne la production des molécules aromatiques, tels que l'acétoïne, l'acétate et le lactate, en utilisant la voie métabolique diacétyle/acétoïne à partir du pyruvate, processus connu depuis longtemps chez diverses espèces de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, avec un accent particulier sur les espèces *L.plantarum* chez lesquelles cela a été rapporté par plusieurs études (Hickey *et al.*, 1983; Axlesson , 2004; Hammes et Hertel., 2006; Pogačić *et al.*,2015; Meng *et al.*, 2018).

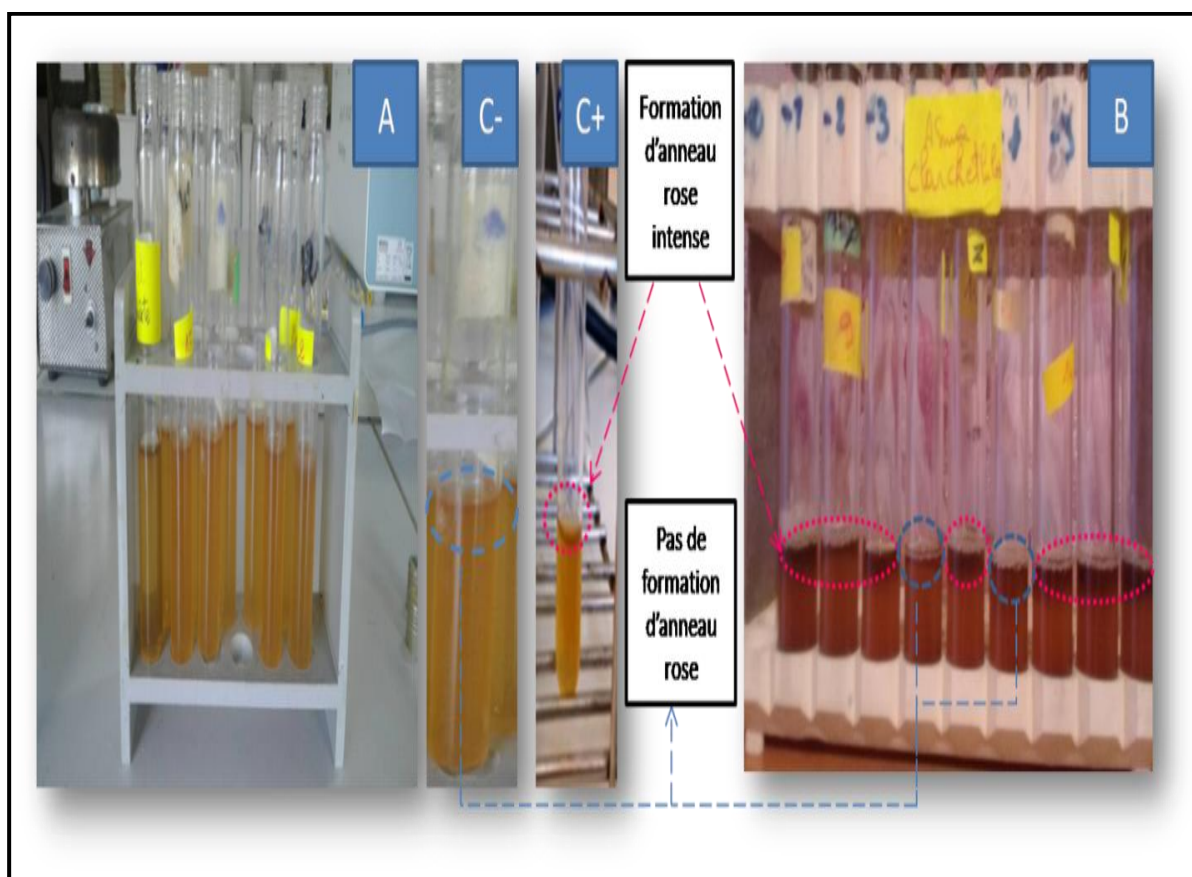


Figure 20 : Production d'acétoïne par les neuf isolats lactiques. Test réalisé par les réactifs VPI/VPII sur milieux Clark et Lubs. A : Les cultures des isolats sans réactif VPI/VPII. B : Les cultures + réactif VPI/VPII. C- : Témoin négatif. C+ : Témoin positif (avec réactif VPI/VPII)

III.1.3.4. Production des exopolysaccharides (EPS)

La production des EPS par nos isolats, est déterminée par la croissance sur gélose hyper saccharosée et la production des exopolysaccharides est traduite par l'apparition de colonies larges et gluantes (Figure 21).

Les résultats démontrent clairement une bonne croissance des souches sur le milieu hyper saccharosé, et l'aspect des colonies indique un faible pouvoir de production d'EPS. Ces observations rejoignent celles de Looijesteijn *et al.* (2001) qui ont rapporté qu'au sein d'une même espèce de bactérie lactique, peuvent exister des souches fortement ou faiblement productrices d'EPS sans que ce caractère n'engendre des disparités de croissance.

Les bactéries lactiques ont une capacité importante de production d'une variété de polysaccharides, étroitement liée à la surface cellulaire pour former des polysaccharides capsulaires (CPS) ou sécrétés sous forme d'EPS (Prete *et al.*, 2021). Les EPS sont des polymères biodégradables de haut poids moléculaire formés à partir de résidus monosaccharides de sucres et de dérivés de sucre et produits par une variété de bactéries (Sanlibaba, 2016).

L'intérêt de la production d'EPS sur la physiologie bactérienne n'est pas encore entièrement élucidé, mais semble jouer un rôle dans la tolérance des bactéries aux conditions stressantes associées au processus de fermentation, tels que le pH, la température, la pression osmotique, etc... (Donot *et al.*, 2012). De plus, les EPS jouent un rôle fondamental dans la formation de biofilm et dans le mécanisme d'agrégation cellulaire ou d'adhésion aux surfaces abiotiques et biotiques comme la muqueuse intestinale (Flemming, 2016).

Aussi, la production des EPS par les bactéries lactiques est un critère de sélection favorable et très recherché dans de nombreux processus industriels alimentaires. Effectivement, les polysaccharides extracellulaires microbiens sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire ainsi que dans les industries cosmétique et pharmaceutique (Korczyk *et al.*, 2018).

Ils sont aussi utilisés en panification, dans les levains pour l'amélioration de la qualité des pains sans gluten (Galle *et al.*, 2012), dans la viscosité du yaourt, dans la production de certains fromages où l'utilisation de cultures productrices d'EPS permet d'améliorer la qualité des fromages (Patel *et al.*, 2012).

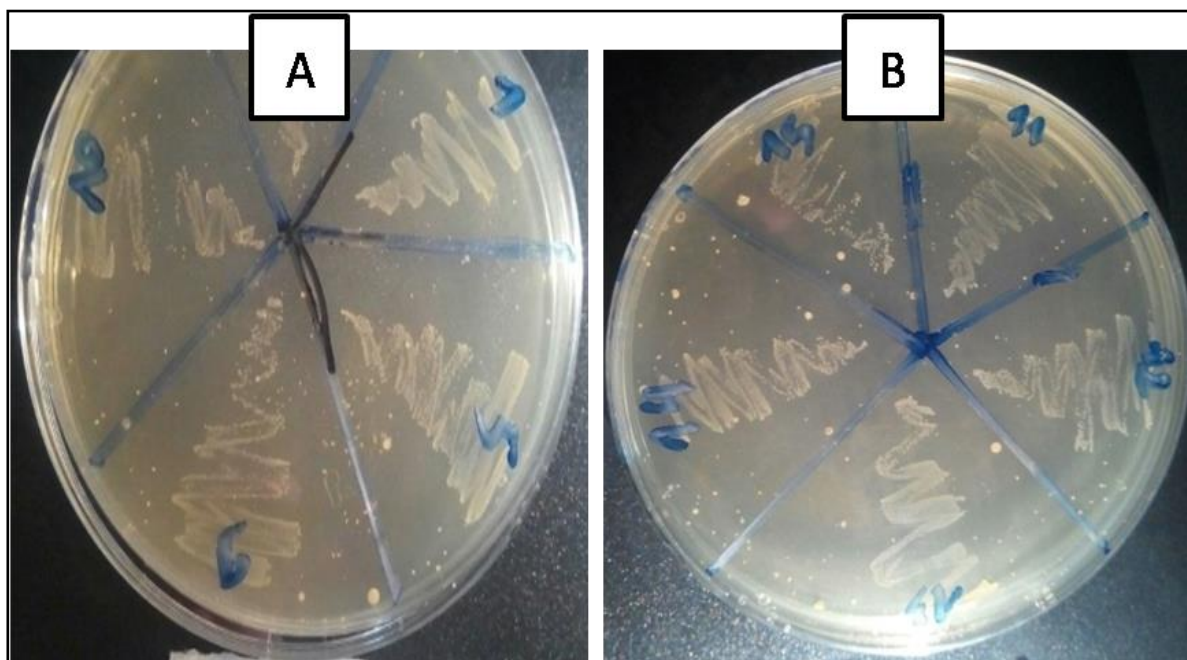


Figure 21 : Mise en évidence de la production d'exopolysaccharides (EPS) par l'aspect des colonies larges et gluantes des isolats sur milieu hyersaccharosé. A/ 1 : LbN 1 ; 5 : LbN ; 9 : LbN9 ; 10 : LbN 10. B/ 11 : LbN11 ; 12 : LbN12 ; 13 : LbN13 ; 14 : LbN14 ; 15 : LBN 15

III.1.3.5. Activité protéolytique

La plupart des souches lactiques isolées dans ce travail ont une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair autour des souches de lactobacilles testés sur le milieu de protéolyse (Figure 22).

Les diamètres des zones claires obtenues sont résumés dans le tableau 18. L'activité protéolytique est variable d'une souche à l'autre ; et les meilleures zones de protéolyse sont obtenues chez les souches LbN1, LbN5, LbN14 et LbN15 avec un niveau élevé de protéolyse (14-15 mm) ; et les souches LbN10 et LbN11 avec une protéolyse moyenne (11- 12 mm). La souche LbN9 est faiblement protéolytique avec une zone de 6mm de diamètre ; alors que les souches LbN13 et LbN12 sont considérées comme non protéolytique car elles n'ont pas du tout présenté d'halos clairs.

Ces résultats sont comparables à l'étude d'Ait Abdeslam et al. (2019) qui ont mis en évidence une activité protéolytique chez plusieurs souches de lactobacilles isolées d'un lait fermenté de brebis, et parmi lesquelles il y avait *L. plantarum* LB16 et *L. plantarum* Lb48 ainsi que *L. rhamnosus* LB6 avec des diamètres d'inhibition de 27mm ; 13.5mm et 13.5mm, respectivement ; alors qu'aucune protéolyse n'a été enregistré pour la souche *L. paracasei*

LB30. Une étude plus ancienne, a montré que l'activité protéolytique était en grande partie attribuée aux espèces lactobacilles (Litopoulo-Tzanetaki et Tzanetakis, 2011).

Cette protéolyse des bactéries lactiques est connue par leur aptitude courante à produire des protéases de paroi qui débutent la dégradation des caséines mais dont l'intensité varie considérablement avec l'espèce (Liu *et al.*, 2012). L'hydrolyse des caséines par ces protéases se traduit justement en zones claires autour des colonies des bactéries protéolytiques lors des cultures en milieux gélosés (Putranto *et al.*, 2020).

En effet, le système protéolytique des bactéries lactiques comprend des protéinases, des peptidases et des protéines de transport spécifiques. Les protéinases décomposent la caséine en peptides, lesquels sont hydrolysés en petits peptides et acides aminés par des peptidases intracellulaires. Aussi, ce système protéolytique des bactéries lactiques est associé à l'utilisation de la caséine, qui fournit des acides aminés essentiels aux cellules en croissance dans le lait. Les bactéries lactiques et leur système protéolytique jouent un rôle important dans les propriétés organoleptiques des produits laitiers fermentés. Outre le traitement nutritionnel, la protéolyse cellulaire est responsable du contrôle de la qualité des polypeptides et des mécanismes de régulation en maintenant des niveaux appropriés de protéines régulatrices et en les éliminant si nécessaire (Savijoki *et al.*, 2006 ; Kieliszek *et al.*, 2021).

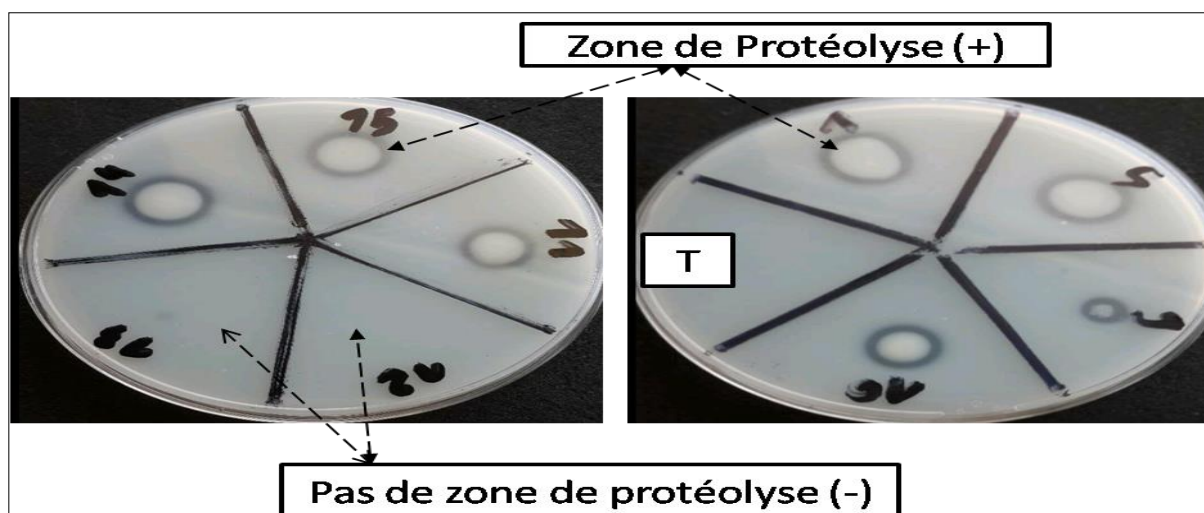


Figure 22 : Formation des zones de protéolyse sur milieu agar au lait écrémé chez les neuf isolats 1 : LbN1 ; 5 : LbN ; 9 : LbN9 ; 10 : LbN 10 ; 11 : LbN11 ; 12 : LbN12 ; 13 : LbN13 ; 14 : LbN14 ; 15 : LBN 15. T : témoin (partie nonensemencée).

III.1.3.6. Activité lipolytique

Les résultats révèlent que les souches lactiques LbN5, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14 et LbN15 ont une activité lipolytique illustrée par les halos clairs autour des spots des cultures ; alors que les souches LbN1, LbN9 et LbN10 malgré leurs croissances ils ne présentent aucun halo clair autour des spots malgré leur croissance affichée et, par conséquent, ne sont pas lipolytiques (Figure 23).

Des activités lipolytiques ont été mises en évidence chez *L. plantarum* (Xanthopoulos *et al.*, 2000) ; ainsi que chez *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* et *Lactobacillus acidophilus* (García-Cano *et al.*, 2019). Certaines de ces souches comme *Lactobacillus lactis* et *L. acidophilus* se sont distinguées par leur activité estérase plus élevée (El Soda *et al.*, 1986). L'étude d'Ait Abdeslam *et al.* (2019) ne révèle aucune lipolyse chez les espèces de *Lactobacilles* malgré leur croissance affichée sur les milieux testés.

En effet, Il est connu que les bactéries lactiques sont considérées comme faiblement lipolytique en comparaison à d'autres groupes bactériens (De Roissart et Luquet, 1994).

Néanmoins, il existe des preuves que les LAB pourraient être impliquées dans la libération de niveaux élevés d'acides gras libres et des précurseurs de saveur qui peuvent contribuer à la saveur globale de certains fromages et aliments fermentés pendant les longs processus de maturation (Zourari et Desmazeaud, 1992 ; McSweeney et Sousa, 2000 ; Collins *et al.*, 2003 ; Casaburi *et al.*, 2008 ; García-Cano *et al.*, 2019).

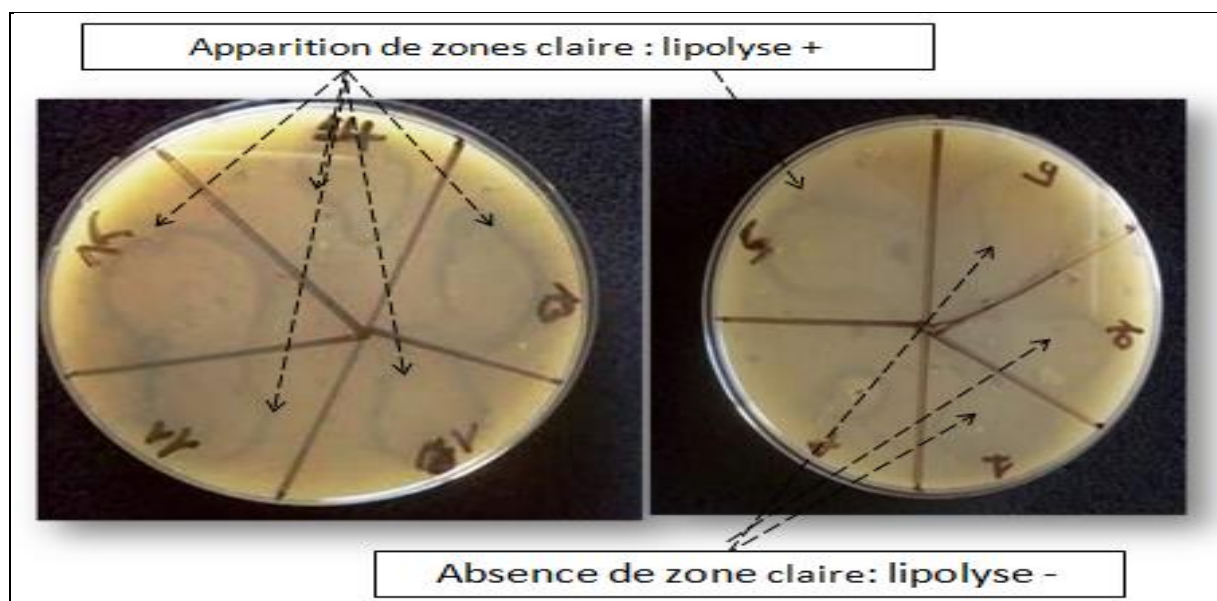


Figure 23 : Mise en évidence de l'activité lipolytique sur gélose nutritive (GN) avec émulsion de jaune d'œuf (10% : V/V). 1 : LbN1 ; 5 : LbN ; 9 : LbN9 ; 10 : LbN 10 ; 11 : LbN11 ; 12 : LbN12 ; 13 : LbN13 ; 14 : LbN14 ; 15 : LBN 15.

III.1.3.7. Production d'acide lactique

Le pouvoir acidifiant est un critère métabolique très important pour la sélection des bactéries lactiques d'intérêt technologique utilisées comme starters de fermentation dans les industries agro-alimentaires ; c'est pourquoi l'aptitude à l'acidification des isolats lactobacilles a été caractérisée par un suivi de la production d'acide lactique pendant la fermentation d'un milieu lait standard à 37° C pendant 24h. Deux paramètres ont été évalués, le pH et la quantité d'acide lactique produite.

D'après les résultats illustrés par les figures 24 et 25, les isolats de *Lactiplantibacillus*, révèlent une corrélation positive directe entre la diminution du pH et le taux d'acide lactique produit. La vitesse d'acidification était variable selon la souche considérée.

Les souches ont présenté une vitesse d'acidification rapide après 6h d'incubation. Au bout de 24h de fermentation, le Ph chute de plus de 1.5 unités. Cette variation était de 3.15, 2.66, 2.71, 2.69, 2.58, 2.6, 2.12, 2.43 et 2.58 pour les souches LbN1, LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14 et LbN15, respectivement.

Selon Ayad *et al.* (2004) préconisent que l'activité acidifiante des isolats est considérée moyenne lorsque le pH atteint 4 unités au bout de 3 à 5 h de fermentation. Les valeurs de cette activité acidifiante obtenues par nos souches lactiques étaient plus élevées que celles rapportées par Ait Abdeslam *et al.* (2019).

D'autres études rapportent également des activités acidifiantes moyennes à faibles chez les bactéries lactiques hétérofermentaires (Yagoubi et Bensoltane, 2018 ; Mangia *et al.*, 2019 ; Abdel-Rahman *et al.*, 2013 ; Tsuge *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*, 2020).

En effet, l'acide lactique est reconnu comme un acide organique sûr et autorisé, ayant le statut de GRAS (Generally Recognized As Safe) et il est fréquemment utilisé comme, starter de fermentation, agent, acidulant et exhausteur de goût, conservateur alimentaire ainsi qu'antioxydant et cryoprotecteur, en particulier dans l'industrie des boissons (Upadhyay *et al.*, 2014).

Cependant, l'utilisation de LAB hétérofermentaires comme ferments lactiques n'est pas très courante en raison de la libération de CO₂ et de la production simultanée d'acide lactique avec d'autres acides organiques, qui est considérée comme défaut induisant plusieurs problèmes dans la production agro-alimentaire notamment des emballages gonflés et des

fissures dans les produits laitiers et les fromages à pâte dure, respectivement (Abedi et Hashemi, 2020).

Les LAB hétérofermentaires comprennent principalement *Oenococcus*, *Leuconostoc* et quelques *Lactobacillus* sp. qui métabolisent le glucose en acide lactique, acide acétique, acide formique, éthanol, diacétyle, acétoïne et dioxyde de carbone. Les principaux *Lactobacillus* sp hétérofermentaires utilisés pour leurs propriétés fermentaires sont *L. brevis*, *L. fermentum* et *L. reuteri* (Abdel-Rahman *et al*, 2013).

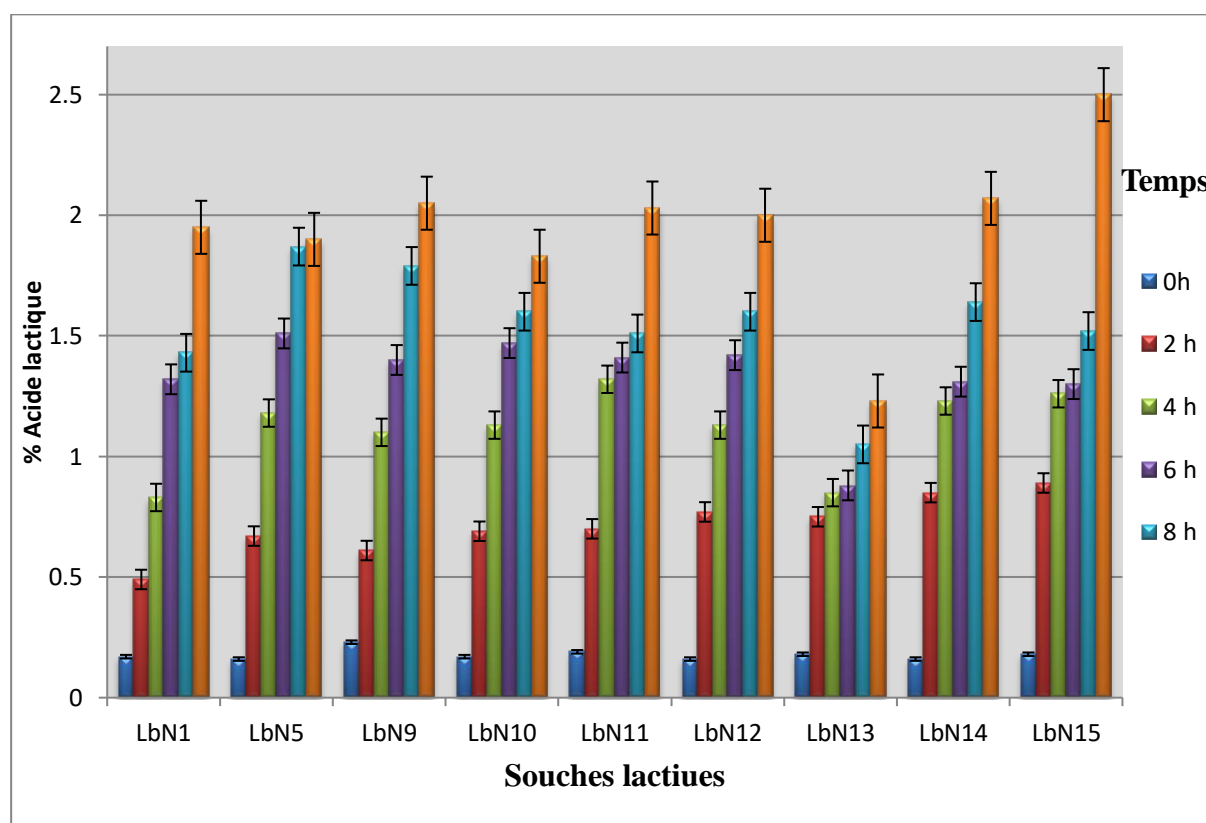
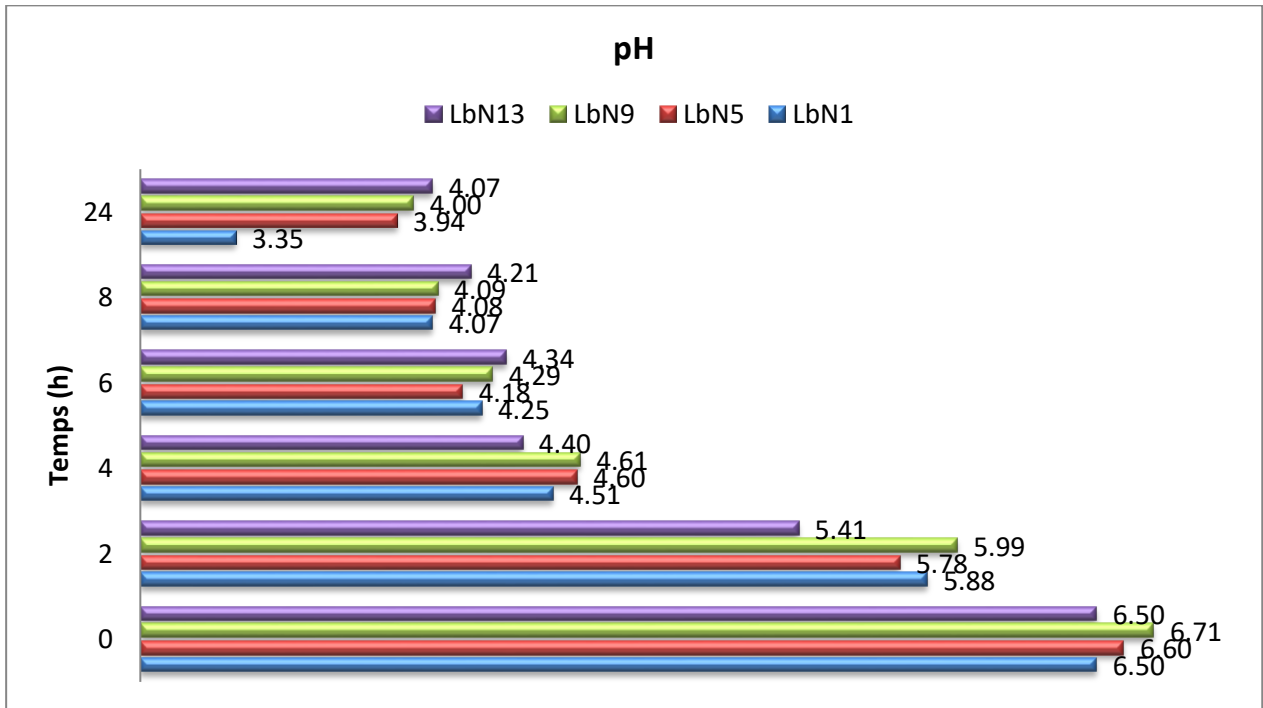
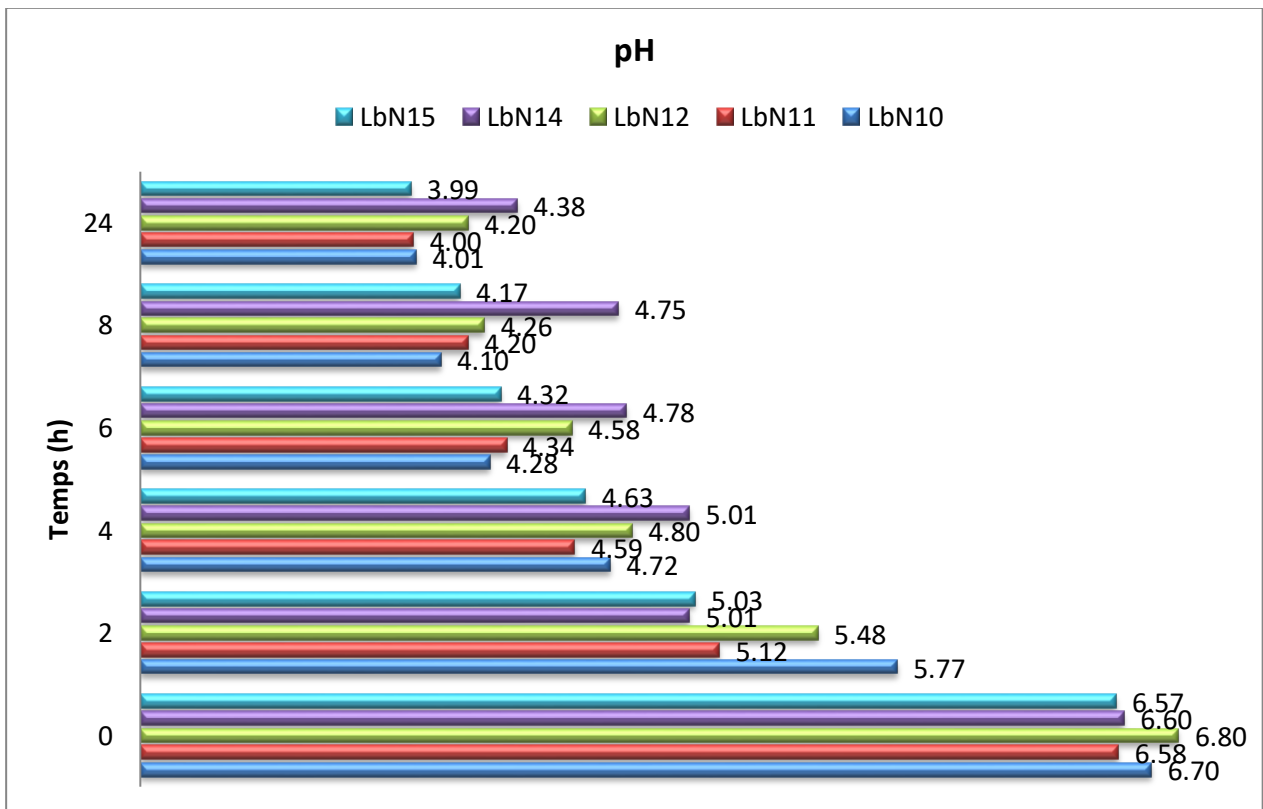


Figure 24 : Production d'acide lactique exprimée en % d'acide lactique par les isolats de lactobacilles LbN1 ; LbN5 ; LbN9 ; LbN13 ; LbN10 ; LbN11 ; LbN12 ; LbN13 et LbN14



(A)



(B)

Figure 25 : pH des monocultures de 24h à 37°C d'isolats lactobacilles

(A) : LbN1, LbN5, LbN9, LbN13 ; (B) : LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14

III.2. Identification moléculaire et protéomique des souches de *Lactiplantibacillus* isolées

III.2.1. Identification des isolats par PCR de L'ADN r 16s, séquençage et construction d'arbre phylogénétique

L'identification génotypique a été obtenue après extraction et amplification (PCR 16s) des ADN. Toutes les souches sélectionnées par PCR16s ont révélé la présence de bandes issues de l'amplification de l'ADN, comme le montre le profil du gel d'électrophorèse dans la figure 26. La longueur attendue des amplicons est d'environ 434 pb qui représente la taille du fragment de la région hypervariable V6-V8 (Nübel *et al.*, 1996).

Les séquences génétiques de l'ARNr 16S des souches LbN1, LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14 et LbN15 ont été soumises à la base de données NCBI Genbank pour une attribution spécifique des numéros d'accès suivants : OM976615, OM976616, OM976617, ON008307, ON008308, ON008309, ON008310, OM976618 et ON008311, respectivement.

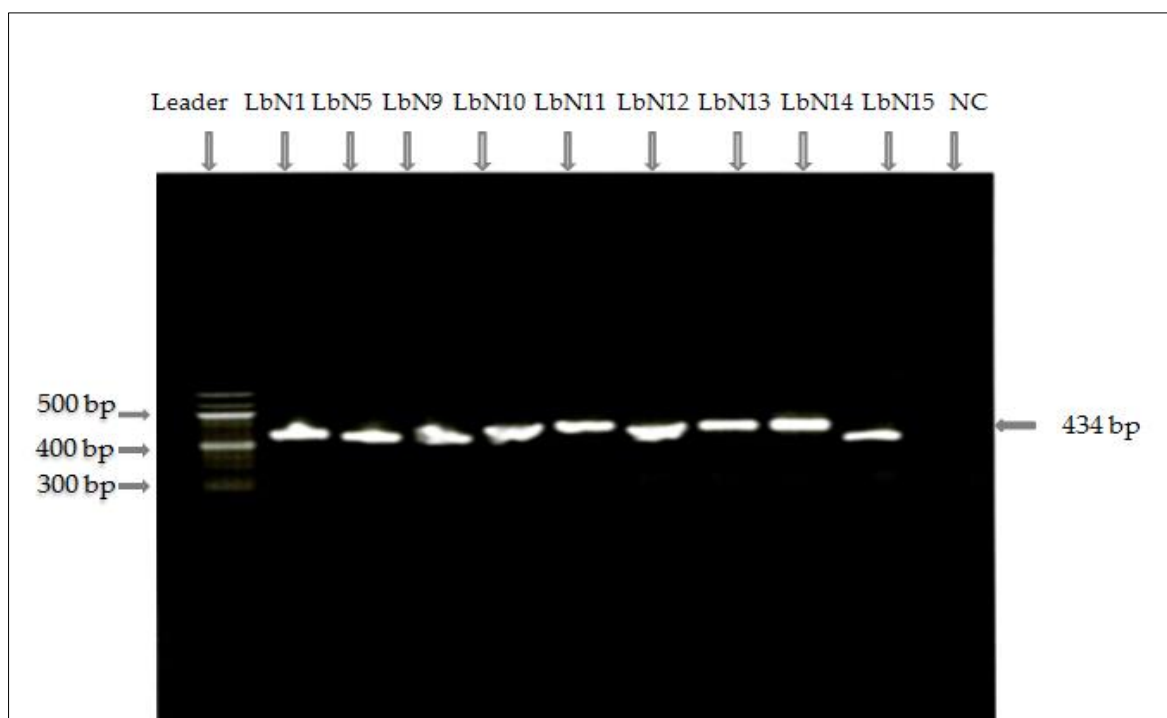


Figure 26 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1% réalisée avec une solution de TBE 1X (TBE 1X = 10mL d'eau distillée pour compléter à 1L de TBE 10X) d'ARNr PCR 16S en utilisant les amorces universelles P3: Bact968-GC-f et P4:Bact1401-r, apparentées aux régions hypervariables V6-V8 avec une longueur de fragment de 434 pb. NC : Contrôle négatif ; LbN1, LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14 et LbN15 : isolats.

Le séquençage (Eurofins Genomic) des séquences amplifiées a permis l'obtention des séquences brutes des ADNr 16s. Après traitement des séquences obtenues à partir du séquençage, elles ont été introduites dans le programme de base de données BLAST du NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, consulté le 3 mars 2022) pour comparer les séquences FASTA aux séquences déposées dans la Genbank pour l'identification des souches. Les scores de similarité (%) obtenus sont démontrés dans le tableau 17.

Le BLAST des séquences brutes du gène rRNA16S obtenu par les amorces universelles (P3 : Bact968-GC-f) et anti sens (P4 : Bact1401-r), a permis la sélection de huit (LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14, LbN15) apparentées aux genres *Lactiplantibacillus sp.* et une souche (LbN1) apparenté au genre *Lacticaseibacillus sp.* avec 100 et 99.75% de similarité, respectivement, selon les données de Genbank.

Nous constatons une diversité spécifique pour certains isolats qui étaient apparentés à plusieurs espèces différentes du même genre avec des scores similaires. Les isolats LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN13, LbN14 et LbN15 ont été identifiés à 100 % comme *Lactiplantibacillus plantarum* avec le même taux d'homologie que celui des espèces suivantes : *L. paraplanturum*, *L. herbarum*, *L. fabifermentans*, *L. argentoratensis* et *L. pentosus*. L'isolat LbN12 a montré une similarité de 99,75 % avec *Lactiplantibacillus plantarum*, *L. herbarum*, *L. paraplanturum*, *L. fabifermentans*, *L. argentoratensis* et *L. pentosus*, respectivement ; tandis que la similarité de l'isolat LbN1 avec *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei* et *L. paracasei sub sp tolerans* était d'environ 99,75 %. La souche LbN1 appartient à *Lactobacillus rhamnosus* selon les récents changements dans la taxonomie de *Lactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020).

Un dendrogramme obtenu par le logiciel MEGA-X d'analyse génétique de l'évolution moléculaire, disponible sur <http://www.megasoftware.net> nous a permis de concevoir un arbre phylogénétique dans le but de déterminer les relations évolutives entre nos séquences. L'arbre phylogénétique obtenu est rapporté dans la figure 27.

Il résulte de l'alignement de l'ARNr 16s des séquences FASTA des neuf isolats de lactobacilles et des séquences des souches types récupérées de la base de données NCBI (*L. plantarum*, *L. argentoratensis*, *L. paraplanturum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus*, *L. paracasei sub sp tolerans*, *L. herbarum*).

Tableau 17 : Scores de similarité (%) des souches identifiées par ARNr 16S

Isolats	Score d'identification exprimé en pourcentage de similarité (%)	Souche identifiée : Genre/espèce
LbN1	99.75	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
LbN5	100	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
LbN9	100	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
LbN10	100	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
LbN11	100	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
LbN12	99.75	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
LbN13	100	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
LbN14	100	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
LbN15	100	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>

L'analyse des distances phylogénétiques a permis de regrouper huit isolats (LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14, LbN15) en relation évolutive avec l'espèce *Lactiplantibacillus plantarum* et un isolat (LbN1) avec l'espèce *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

La souche LbN1 a été regroupée autour des souches standards suivantes : *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBRC 3425, *Lacticaseibacillus casei* ATCC 393, *Lacticaseibacillus paracasei* sub sp. *paracasei* JCM 8130 et *Lacticaseibacillus paracasei* subsp *tolerans* NBRC15906.

La souche LbN12 a été identifiée dans le groupe du standard suivant : souches, *Lactiplantibacillus herbarum* TCFE 032-E4, *Lactiplantibacillus parapalantarum* DSM10667, *Lactiplantibacillus plantarum* Subsp. *argenteratensis* DK022 et *Lactiplantibacillus pentosus* ATCC 8041.

En effet, la taxonomie actuelle des lactobacilles proposée par Zheng et al. (2020) apporte de nouvelles opportunités dans la découverte scientifique. Cette classification démontre que la majorité des lactobacilles appartiennent au genre *Lactiplantibacillus* avec une petite appartenance au genre *Liquorilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Loigolactobacillus* et *Paucilactobacillus* (Zheng et al., 2020).

Par ailleurs, d'autres analyses des données avec la nouvelle taxonomie dans des échantillons de kéfir et des échantillons vaginaux, ont révélé la présence de *Lentilactobacillus* et *Limosilactobacillus*, respectivement (Qiao *et al.*, 2022).

La première espèce identifiée dans le groupe *Lactiplantibacillus* est *Lactiplantibacillus plantarum*, qui représente l'ancien groupe *Lactobacillus plantarum* (Bergey *et al.*, 1923) ; cette espèce est atypique ; pour son activité pseudo catalase et pour la réduction du nitrate (Zheng *et al.*, 2020). Elle est prédominante, dans différents produits de fermentation ; deux sous espèces lui sont reconnues : *Lactiplantibacillus plantarum subsp plantarum* et *Lactiplantibacillus plantarum subsp argentoratensis* les deux diffèrent par l'absence de fermentation de melezitose chez *L. plantarum subsp argentoratensis* (Zheng *et al.*, 2020).

La deuxième espèce trouvée, regroupée aussi dans le groupe *Lactiplantibacillus* est *Lactiplantibacillus herbarum*, nommée précédemment *lactobacillus herbarum* (Mao *et al.*, 2015). Elle a été isolée des radis fermentés et est distinguée par rapport aux autres par la non fermentation du sucrose et elle ne peut pas pousser à 37°C (Mao *et al.*, 2015 ; Zheng *et al.*, 2020).

L'espèce *Lactiplantibacillus paraplantarum* est la troisième espèce proposée, elle ressemble à *Lactiplantibacillus plantarum* dont l'ancienne appellation est *Lactobacillus plantarum* décrite par Curk *et al.* (1996). Elle peut être isolée des matières fécales humaines, de la bière, des légumes fermentés, des fruits fermentés, des matières fécales des chiens en bonne santé et du lait (Zheng *et al.*, 2020).

La quatrième espèce reconnue par le Blast est *Lactiplantibacillus fabifermentans*, dont le basonyme est *Lactobacillus fabifermentans*, elle est isolée des fèves de cacao fermentées, du raisin fermenté et des céréales fermentés (De Bruyne *et al.*, 2009).

L'avant dernière espèce est *Lactiplantibacillus plantarum subsp. argentoratensis* (dont le nom se rapportant à Argentoratus, nom romain de la Ville de Strasbourg en Alsace, France) est la nouvelle appellation du basonyme : *Lactobacillus plantarum subsp. argentoratensis* 1633^{VP} (Bringel *et al.*, 2005). Les souches de cette espèce sont isolées des féculents, d'aliments fermentés d'origine végétale, d'ensilage végétale. etc., et diffèrent aussi des souches *L. plantarum subsp. plantarum* par l'absence de fermentation de melezitose (Bringel *et al.*, 2005).

En dernier, *Lactiplantibacillus pentosus* dont le basonyme est *Lactobacillus pentosus* (Zanoni *et al.*, 1987), sont des cellules en bâtonnets droits, non mobiles, produisant de l'acide et qui coagulent le lait. Ces cellules sont isolées de diverses sources, notamment les levains, l'ensilage de maïs, les eaux usées, vagin humain, selles humaines et de plusieurs préparations alimentaires fermentées, les olives, poudres de feuilles de mûrier, le thé, la pâte de riz gluant, les nouilles de maïs, sauce chili, moutarde, cornichons, tofu puant et produits laitiers (Zanoni *et al.*, 1987).

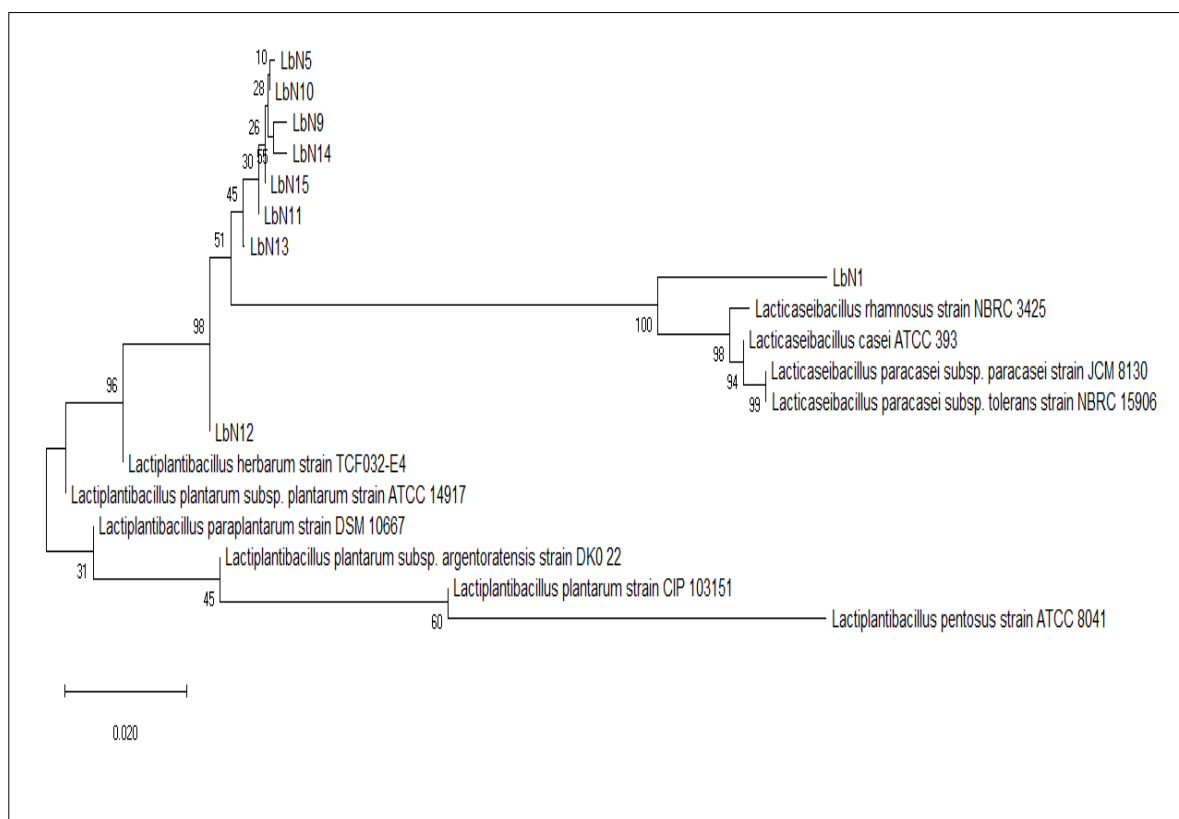


Figure 27 : Dendrogramme basé sur les séquences génétiques de l'ARNr 16S, montrant les relations au sein des isolats de lactobacilles et leurs positions avec des représentants de certains autres taxons apparentés de la base de données NCBI (*Lactocaseibacillus rhamnosus* NBRC 3425, *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393, *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* CM 8130, *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* NB RC15906 , *Lactiplantibacillus herbarum* TCFE 032-E4, *Lactiplantibacillus parapalantarum* DSM 10667, *Lactiplantibacillus plantarum* sous-espèce *Argentoratensis* DK022 et *Lactiplantibacillus pentosus* ATCC 8041). Les séquences ont été alignées en utilisant la méthode de jointure de voisin avec correction de Jukes-Cantor. Les valeurs d'amorçage sont affichées sur les nœuds.

Ensuite, vient le groupe *Lacticaseibacillus*, qui est référé au groupe *Lactobacillus casei* ; il a une importance économique considérable, vu qu'il renferme plusieurs espèces. Le premier exemple c'est l'espèce nommée *Lacticaseibacillus casei* par Orla jensen en (1916) ensuite *Streptobacterium casei* par le même auteur en (1919), qui a été isolée de diverses sources incluant le cornichon traditionnel chinois, les matières fécales de l'enfant, le nasopharynx, la liqueur et ensilage d'avoine ; et utilisée comme starter de culture dans la fermentation (Gänzle, 2019 ; Hutkins, 2019). Le deuxième exemple est celui de l'espèce *Lacticaseibacillus paracasei* subsp *paracasei* qui a été isolée des produits laitiers, eaux usées et ensilage (Zheng *et al.*, 2020).

Deux autres espèces appartenant à ce groupe *Lacticaseibacillus* sont identifiées, la première *Lacticaseibacillus rhamnosus* anciennement reconnue comme *Lactobacillus rhamnosus* par Hansen (1968), isolée des produits laitiers, de la viande fermentée, du poisson, des végétaux, des céréales et des muqueuses de l'homme (orale, vaginale et intestinale) (Dal Bello et Hertel., 2006). La deuxième espèce est *Lactobacillus paracasei* subsp *tolerans*, initialement connue sous le nom *Lactobacillus casei* subsp *tolerans*, isolée des produits laitiers et d'ensilage de tomates (Collins *et al.*, 1989).

En conclusion, la diversité phylogénique des *Lactobacilleaceae* est liée à la diversité du métabolisme (Wuyts *et al.*, 2018) en termes de tolérance vis-à-vis de l'oxygène, des acides organiques ou des hydrates de carbone utilisés (Qiao *et al.*, 2022). Plusieurs études utilisant des approches moléculaires et phylogénétiques ont montré que la systématique bactérienne et les gènes bactériens de l'ARNr 16s sont hautement conservés en raison du rôle fondamental des ribosomes dans la synthèse des protéines lors de l'évolution des micro-organismes (Chakravorty *et al.*, 2007).

III.2.2. Identification par MALDI-TOF MS

L'analyse MALDI-TOF MS a concerné huit isolats (LbN5 ; LbN9 ; LbN10 ; LbN11 ; LbN12 ; LbN13 ; LbN14 ; et LbN15). Les valeurs des scores d'identification sont reportées dans le tableau 18 et les listes d'identification proposées par le logiciel MALDI BioTyper 3.0 (Bruker Daltonics, Ca, USA) pour les souches sont présentées dans le tableau 19.

Un score d'identification supérieur à 2 est obtenu pour les six souches : LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14, et il indique une forte probabilité d'identification fiable de l'espèce *Lactiplantibacillus plantarum*. Par contre, les souches LbN5 et LbN15 affichent des

scores d'identification compris entre 1.7 et 1.99 ce qui permet l'identification fiable du genre ou groupe bactérien *Lactiplantibacillus*.

Ces résultats protéomiques obtenus par la technique de spectrométrie MALDI-TOF sont cohérents avec l'identification de l'ARNr 16S. Les deux méthodes révèlent la présence de *Lactobacillus plantarum* versus *Lactiplantibacillus plantarum*, ce qui atteste de la fiabilité de cette technique. Cette cohérence entre les deux méthodes citées a également été observée par de nombreux autres auteurs qui ont souligné les performances du MALDI-TOF confirmant les résultats d'identification des souches de *Lactobacillus* par les méthodes de génotypage (Bizzini *et al.*, 2010 ; Dec *et al.*, 2016 ; Nacef *et al.*, 2016 ; Aït Abdeslam *et al.*, 2019).

L'utilisation de la méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS était nécessaire pour confirmer l'identité moléculaire des isolats pour lesquels l'identification de l'ARNr 16S n'était pas concluante. En effet, cette technique moins coûteuse par rapport aux techniques génomiques a été développée dans la recherche microbiologique et permet une identification efficace, fiable et rapide de tous types de micro-organismes (Sauget, 2016).

Tableau 18 : Scores d'identification et meilleures correspondances d'identification adaptées par MALDI-TOF MS

Isolats	Score d'identification*	Identification**
LbN5	1.924	<i>L. plantarum</i>
LbN9	2.302	<i>L. plantarum</i>
LbN10	2.191	<i>L. plantarum</i>
LbN11	2.050	<i>L. plantarum</i>
LbN12	2.067	<i>L. plantarum</i>
LbN13	2.205	<i>L. plantarum</i>
LbN14	2.307	<i>L. plantarum</i>

*: Score d'identification : inférieur à 1.69: ne permet pas une identification fiable ; 1.70 -1.99 : Identification avec niveau de confiance moyen ; 2.00 – 3 : Identification avec un grand niveau de confiance.

** : L'espèce répertoriée avec le score le plus élevé parmi les 10 espèces proposées pour l'identification MALDI.

Tableau 19 : Listes d'identification proposées par la base de données de l'analyse MALDI-TOF MS des souches LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14 et LbN15, respectivement

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier	Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 12028 DSM	1.924	1590	1 (+++)	Lactobacillus plantarum DSM 20246 DSM	2.302	1590
2 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 13273 DSM	1.901	1590	2 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	2.247	1590
3 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 1055 DSM	1.893	1590	3 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 1055 DSM	2.23	1590
4 (+)	Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T DSM	1.891	337330	4 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 2648 DSM	2.12	1590
5 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 2648 DSM	1.891	1590	5 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 13273 DSM	2.113	1590
6 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	1.875	1590	6 (++)	Lactobacillus plantarum ssp argentoratensis DSM 16365T DSM	2.099	271881
7 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 20246 DSM	1.872	1590	7 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 12028 DSM	2.088	1590
8 (+)	Lactobacillus plantarum ssp argentoratensis DSM 16365T DSM	1.817	271881	8 (++)	Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T DSM	2.08	337330
9 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 20205 DSM	1.796	1590	9 (+)	Lactobacillus paraplantarum DSM 10667T DSM	1.963	60520
10 (-)	Lactobacillus paraplantarum DSM 10667T DSM	1.549	60520	10 (+)	Lactobacillus pentosus DSM 16366 DSM	1.744	1588

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier	Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 12028 DSM	2.191	1590	1 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 13273 DSM	2.05	1590
2 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	2.151	1590	2 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 1055 DSM	2.025	1590
3 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 2648 DSM	2.148	1590	3 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	2.021	1590
4 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 1055 DSM	2.126	1590	4 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 12028 DSM	2.008	1590
5 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 13273 DSM	2.111	1590	5 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 20246 DSM	2.002	1590
6 (++)	Lactobacillus plantarum ssp argentoratensis DSM 16365T DSM	2.091	271881	6 (+)	Lactobacillus plantarum ssp argentoratensis DSM 16365T DSM	1.975	271881
7 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 20246 DSM	2.088	1590	7 (+)	Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T DSM	1.935	337330
8 (++)	Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T DSM	2.062	337330	8 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 2648 DSM	1.923	1590
9 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 20205 DSM	1.789	1590	9 (+)	Lactobacillus paraplantarum DSM 10667T DSM	1.724	60520
10 (+)	Lactobacillus paraplantarum DSM 10641 DSM	1.611	60520	10 (+)	Lactobacillus paraplantarum DSM 10641 DSM	1.644	60520

Kouadri Boudjelthia N. (2024). Etude de l'adaptation des probiotiques et détermination de leurs effets bénéfiques. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques, Université de Mostaganem

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier	Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	2.067	1590	1 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 12028 DSM	2.205	1590
2 (++)	Lactobacillus plantarum ssp argenteratensis DSM 16365T DSM	2.058	271881	2 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 1055 DSM	2.193	1590
3 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 13273 DSM	1.989	1590	3 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	2.14	1590
4 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 2648 DSM	1.938	1590	4 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 20246 DSM	2.13	1590
5 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 20246 DSM	1.929	1590	5 (++)	Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T DSM	2.118	337330
6 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 1055 DSM	1.928	1590	6 (+)	Lactobacillus paraplanarum DSM 10667T DSM	1.971	60520
7 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 12028 DSM	1.86	1590	7 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 13273 DSM	1.908	1590
8 (+)	Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T DSM	1.816	337330	8 (+)	Lactobacillus plantarum ssp argenteratensis DSM 16365T DSM	1.846	271881
9 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 20205 DSM	1.775	1590	9 (+)	Lactobacillus pentosus DSM 16366 DSM	1.835	1589
10 (+)	Lactobacillus pentosus DSM 16366 DSM	1.57	1589	10 (+)	Lactobacillus paraplanarum DSM 10641 DSM	1.756	60520

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier	Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Lactobacillus plantarum DSM 20246 DSM	2.307	1590	1 (+)	Lactobacillus plantarum ssp argenteratensis DSM 16365T DSM	1.868	271881
2 (+++)	Lactobacillus plantarum DSM 12028 DSM	2.306	1590	2 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 12028 DSM	1.842	1590
3 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 1055 DSM	2.253	1590	3 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 13273 DSM	1.773	1590
4 (++)	Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T DSM	2.158	337330	4 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 2648 DSM	1.737	1590
5 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	2.153	1590	5 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 20205 DSM	1.733	1590
6 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 13273 DSM	2.144	1590	6 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 1055 DSM	1.715	1590
7 (++)	Lactobacillus paraplanarum DSM 10667T DSM	2.093	60520	7 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	1.709	1590
8 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 2648 DSM	2.073	1590	8 (+)	Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T DSM	1.688	337330
9 (++)	Lactobacillus plantarum ssp argenteratensis DSM 16365T DSM	2.007	271881	9 (+)	Lactobacillus plantarum DSM 20246 DSM	1.651	1590
10 (+)	Lactobacillus paraplanarum DSM 10641 DSM	1.811	60520	10 (+)	Lactobacillus paraplanarum DSM 10641 DSM	1.596	60520

III.3. Potentiel probiotique des souches lactiques isolées

III.3.1. Tolérance des souches aux conditions gastro-intestinales simulées in vitro

III.3.1.1. Acidité gastrique et sels biliaires

Le taux de survie des neuf souches aux conditions digestives simulées à savoir, le suc gastrique (pepsine 1.33 % ; pH 2) et les sels biliaires (0.5 %), a été estimé par la viabilité cellulaire moyenne des souches (Figure 28).

Les souches affichent une très bonne tolérance aux conditions digestives imposées avec une différence inter-souche hautement significative ($p < 0.001$). La viabilité des souches était plus élevée en présence des sels biliaires avec des taux de survie compris entre 94.84 et 107.17 % pendant 240min d'exposition. En revanche, le taux de viabilité des souches par rapport au suc gastrique simulé était légèrement inférieur et compris en moyenne entre 80.37 et 101.27 %.

Selon les résultats des tests de Tukey, les moyennes du taux de viabilité des souches ont été enregistrées après 240min d'exposition au suc gastrique simulé et aux sels biliaires, et ont permis de classer les souches en cinq groupes homogènes avec une différence significative de Tukey ($p < 0.05$).

Les deux souches LbN1 et LbN14 étaient significativement les plus tolérantes aux sels biliaires avec des taux de viabilité de 107.17 % et 105.17 %, respectivement. La souche LbN14 était également la souche la plus tolérante au suc gastrique simulé avec un taux de viabilité de 101.27 % ; alors que LbN1 était moins tolérante avec un taux de viabilité de 81,35 %. Cependant, il n'y a pas de différence significative ($p > 0.05$), entre les deux souches LbN11 et LbN9 dans leur tolérance vis-à-vis du suc gastrique et des sels biliaires.

Les souches LbN10, LbN11, LbN12 et LbN9 forment un groupe de tolérance moyenne aux sels biliaires par rapport aux autres souches. Par contre, en ce qui concerne la tolérance au suc gastrique, le groupe de tolérance moyenne est représenté par les souches LbN9, LbN11, LbN13 et LbN15.

Les résultats sont comparables à ceux publiés par Iorizzo *et al.* (2022) qui ont montré une survie élevée de 10 souches de *L. plantarum* en milieu acide (pH 2.5) et en présence de 0.3% de sels biliaires et qui suggèrent même que leurs souches *L. plantarum* avaient une forte probabilité de résister aux conditions stressantes du tractus gastro-intestinal à savoir, le faible pH et la présence de bile.

Amar (2015) a également rapporté les potentialités probiotiques de 15 souches de *Lactobacillus* sp et de 7 souches de *Streptococcus* sp isolées des matières fécales sur la capacité de survie avec une concentration de 0.3% de sels biliaires, de telle sorte que les bactéries testées étaient beaucoup plus résistantes aux sels biliaires par rapport aux milieux acides où la plupart des souches ont été inhibées.

Plusieurs études ont démontré que la majorité des souches de *L. plantarum* testées toléraient l'acidité, bien qu'à des degrés légèrement différents, selon un certain nombre d'espèces et des mécanismes distincts (Kaushik *et al.*, 2009 ; Guidone *et al.*, 2013 ; Hamon *et al.*, 2014).

La très bonne tolérance des souches à l'acidité du suc gastrique simulé a été expliquée par Fidanza *et al.* (2021) qui a rapporté que les traitements préalables de survie des espèces *L. plantarum* aux différents pH acides provoquent des altérations membranaires inductibles lors des tests de tolérance à l'acide. En effet, une exposition préalable à des conditions acides non mortelles dans le cadre d'un processus connu sous le nom de réaction de tolérance à l'acide induit de telles altérations (Foster et Hall, 1991 ; Klaenhammer *et al.*, 2005 ; Quinto *et al.*, 2014).

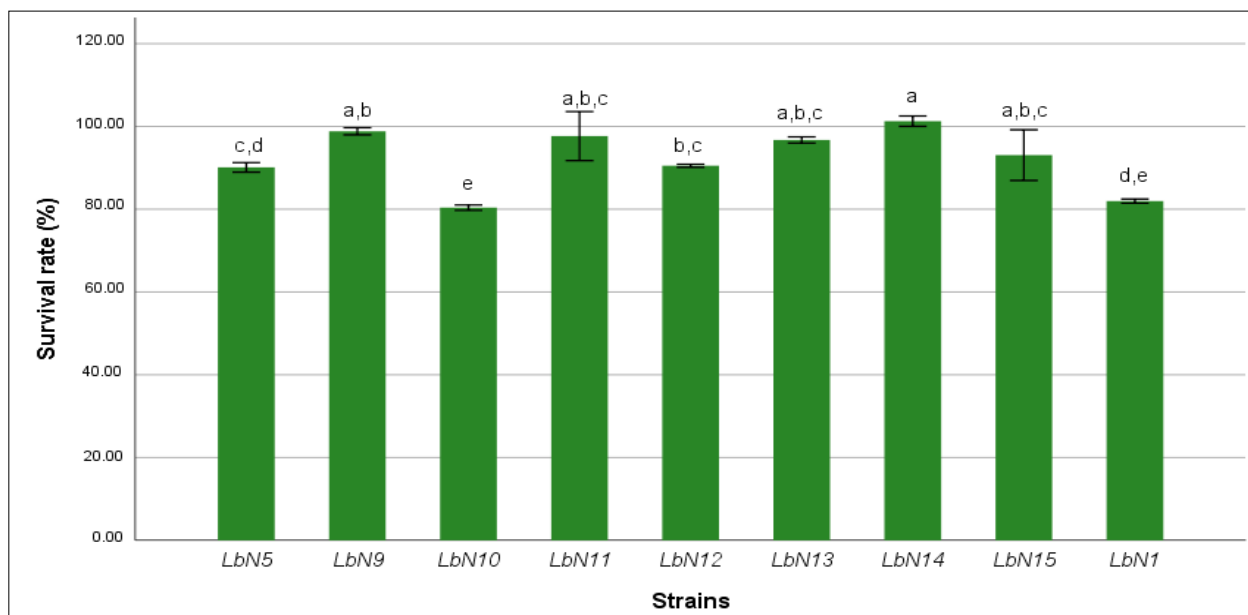
Cependant cette induction les aide à tolérer les conditions extrêmes du tractus gastro-intestinal par l'utilisation de plusieurs mécanismes, tel que le recyclage rapide des protéines endommagées (Morelli *et al.*, 2012 ; Chiang *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2014).

L'expression de la phosphofructokinase (PFK) et de la pyruvate kinase (PYK) pour le métabolisme des glucides chez *L. plantarum*, joue un rôle important dans le maintien du pH intracellulaire pour la capacité cellulaire à l'homéostasie et favorise la résistance au stress des facteurs environnementaux (Fidanza *et al.*, 2021).

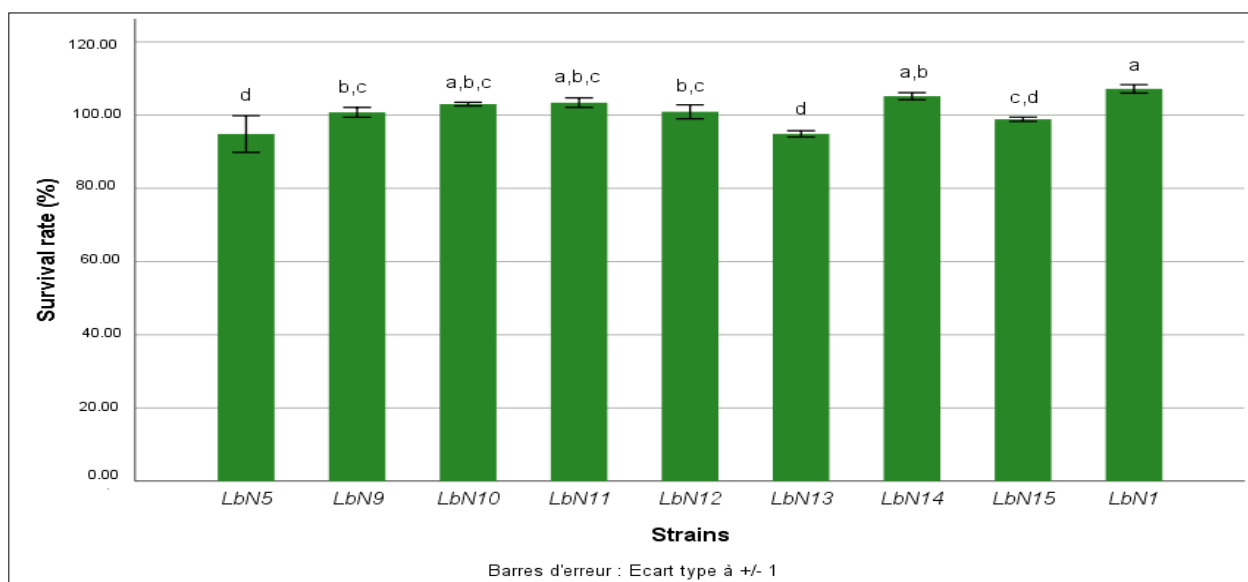
En effet, l'expression de la PFK et de la PYK chez *L. plantarum* est hautement régulée pour booster le catabolisme des sucres et augmenter la production d'énergie (ATP) activatrice de la pompe qui participe au maintien de l'homéostasie du pH intracellulaire (Huang *et al.*, 2016). Cette augmentation de la fonction de la pompe à protons est en outre facilitée par l'expression importante des gènes *atpA* et *atpC* de l'ATP-synthétase (Heunis *et al.*, 2014 ; Seme *et al.*, 2015).

Il est également établi que différentes souches du même groupe que les *Lactobacilli*, peuvent avoir une tolérance acide très variable, notamment chez les espèces de *L. plantarum* (Fidanza *et al.*, 2021). De plus, la quantité de souches probiotiques qui survivent lors du

transit dans l'intestin humain dépend de la souche elle-même, de la dose ingérée, des facteurs de stress liés à l'hôte (acidité, sels biliaires, etc.) et du vecteur alimentaire ; ces facteurs permettent d'améliorer la survie des bactéries probiotiques lors de leur transit dans le tube digestif pour prendre vie afin d'exercer leurs effets bénéfiques (Ziar et Riazi, 2012 ; Ziar et Riazi, 2014 ; Ziar et Riazi, 2022).



(A)



(B)

Figure 28 : Taux de survie des souches aux conditions gastro-intestinales simulées ; (A) : le suc gastrique simulé (1,33% : (p/v) pepsine, pH= 2. (B) : Sels biliaires (0.5% : P/V) (ANOVA, $p < 0.001$). a, b, c, d, e : groupes homogènes

Aussi, la différence de résistance aux acides chez la même espèce peut être attribuée à la quantité relative de couple protons H⁺-ATPase présent dans les membranes cellulaires (Hong et al., 1999). En effet, cette pompe à protons H⁺-ATPase contrôle la perméabilité aux protons en permettant aux cellules de résister à de grandes différences de pH entre le cytoplasme bactérien et le milieu extérieur (Nannen et Hutkins, 1991). Le métabolisme des acides aminés joue également un rôle important dans le maintien de la capacité cellulaire à assurer l'homéostasie et dans la résistance aux stress environnemental chez plusieurs espèces de bactéries (Reveron *et al.*, 2012).

Les souches à potentiel probiotique doivent également tolérer les sels biliaires. En effet, la tolérance des espèces de lactobacilles est liée à l'hydrolyse des sels biliaires par les hydrolases telle que la Bile Salt Hydrolase (BSH) qui catalyse la dé-conjugaison des résidus glycine et taurine à partir du cholestérol (Pfeiler et Klaenhammer, 2009).

III.3.1.2. Tolérance aux enzymes digestives

La tolérance des souches isolées aux enzymes digestives a été évaluée en les confrontant à la trypsine et l'amylase pancréatique. Le taux de survie de ces souches est reporté sur la figure 29 qui indique une différence très hautement significative entre les résultats des deux tests (ANOVA, $p < 0.001$). Cependant, le test de Tukey ($p < 0.05$) a classé les souches en quatre groupes homogènes en ce qui concerne la tolérance aux enzymes.

Toutes les souches étudiées ont affiché une viabilité supérieure à 90 % après 5h d'exposition aux enzymes. Il n'y avait pas de différence significative entre les souches LbN1, LbN14 et LbN15, qui formaient le meilleur groupe tolérant à la trypsine avec des taux de viabilité de 96, 97.94 et 96.14 %, respectivement. Ces mêmes souches formaient également le meilleur groupe tolérant à l'amylase pancréatique avec des taux de viabilité de 105.07 ; 99.74 et 99.47 % pour LbN1, LbN14 et LbN15, respectivement. Ces résultats suggèrent que les souches peuvent survivre dans l'environnement intestinal humain.

En effet, Les souches à potentiel probiotique doivent non seulement être capables de résister à leur passage dans l'estomac et avoir la capacité de proliférer dans l'intestin grêle avec une tolérance aux sels biliaires ; mais aussi, ils doivent résister aux enzymes digestives présente dans l'intestin grêle et le gros intestin pour contribuer à la digestion du bol alimentaire (Sensoy, 2021).

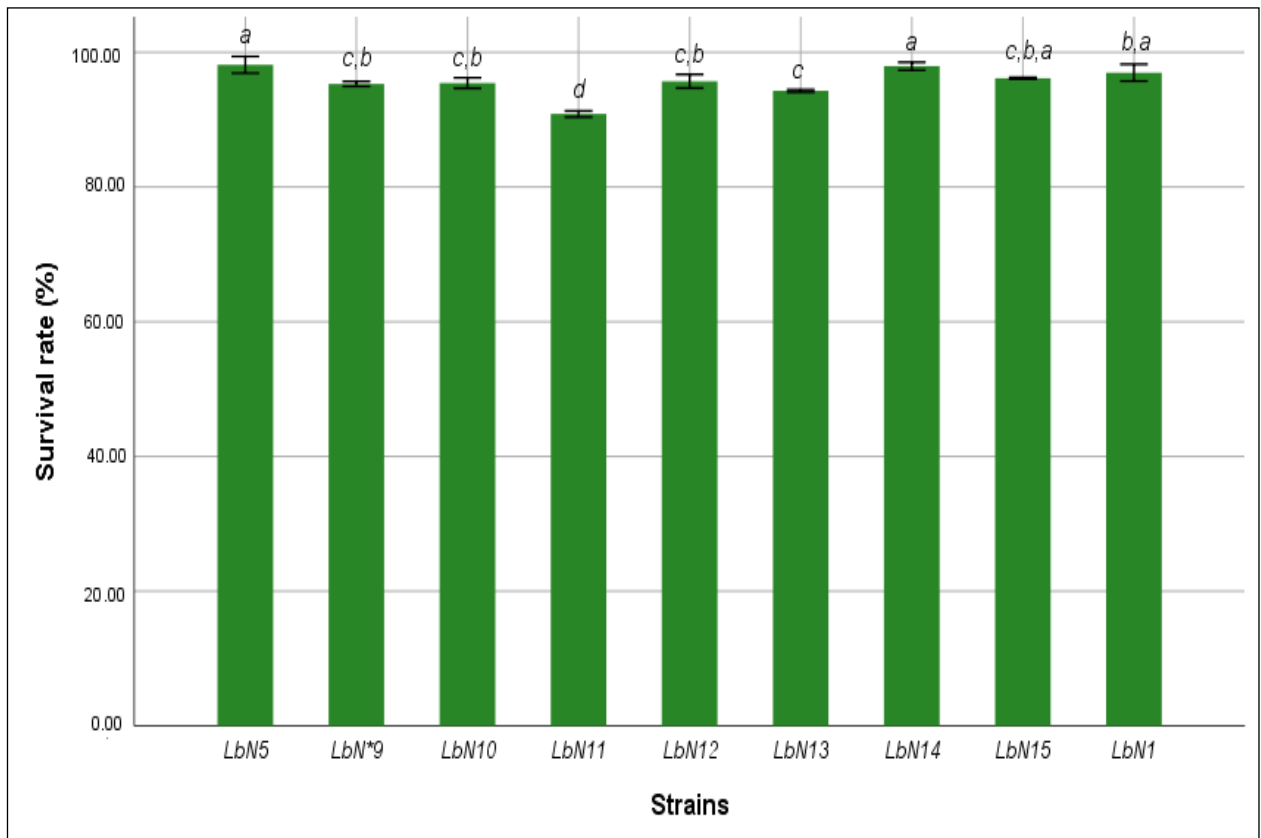
L'estomac est le premier lieu de digestion à pH 2.5 après la bouche. Ce pH peut remonter à 5 après la prise d'un repas (effet tampon) et revenir à la valeur de base en 2h. En moyenne, le séjour gastrique dure 3 à 4h (Hill et Marsh., 1990 ; Sensoy, 2021). Ensuite, le chyme rejoint l'intestin grêle pour la phase d'absorption intestinale des nutriments, qui dure entre 6 et 7h. La concentration moyenne de sels biliaires dans le tractus intestinal humain est d'environ 0.3 % (P/V) (Dunne *et al.*, 2001).

Ces données bibliographiques nous ont orienté dans le choix de la durée d'exposition aux conditions simulées de suc gastrique et intestinal pour effectuer les différents tests. En effet, selon la quantité et le type d'aliments ingérés, la durée de la digestion varie selon les différents compartiments du tractus gastro-intestinal (GIT) et sa vitesse est influencée par la composition biochimique du chyme (Benini *et al.*, 1994 ; Hertz, 1910), le volume du repas (Hunt *et al.*, 1985 ; Lin *et al.*, 1992 ; Doran *et al.*, 1998) et sa texture (Barbé *et al.*, 2013), la densité calorique (Moore *et al.*, 1984), le sexe du consommateur (Hermansson et Sivertsson, 1996), les conditions physiologiques (Costill et Saltin, 1974) et la motilité gastro-intestinale (Camilleri *et al.*, 1985).

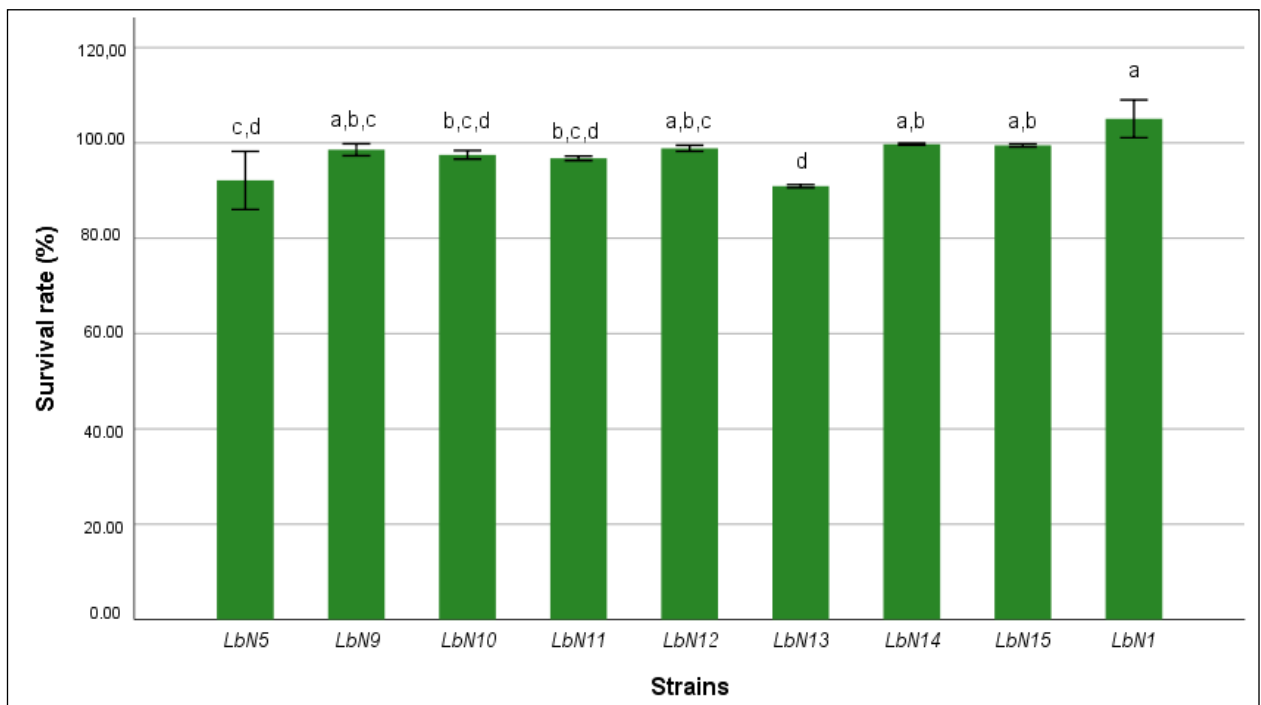
Par ailleurs, l'importance des sécrétions digestives, notamment des enzymes pancréatiques, dans la digestion des aliments chez les mammifères adultes est connue depuis longtemps (Grossman *et al.*, 1942 ; Desnuelle *et al.*, 1962). Les sécrétions pancréatiques tels que les bicarbonates tamponnent le chyme acide et favorisent l'action des enzymes comme les protéases, la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase, les carboxypeptidases A et B, l'amylase et les lipases (Corring et Aumaitre, 1970). Havenaar et Huis in't Veld. (1992) ont rapporté qu'en plus d'étudier la tolérance à la bile, il est intéressant aussi de sélectionner des souches pour vérifier la tolérance au suc pancréatique et/ou au suc intestinal total avec des enzymes digestives.

III.3.2. Adhésion des souches isolées aux cellules épithéliales

En raison, de l'importance d'adhésion des lactobacilles à l'épithélium intestinal qui représente l'un des principaux facteurs limitant leur colonisation dans le tube digestif, la capacité d'adhésion des différentes souches isolées à des cellules épithéliales issues de segments intestinaux (Iléon et colon) de poulets a été évaluée. Les souches LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN14 et LbN 15 (*Lactiplantibacillus plantarum*) expriment une très bonne adhésion cellulaire ; alors que les souches LbN01 et LbN 13 n'affichent aucune adhésion (Tableau 20 et Figure30).



(A)



(B)

Figure 29 : Taux de survie des souches aux enzymes digestive : (A) Trypsine ; (B) Amylase pancréatique. (ANOVA, $p < 0,001$). a, b, c, d, e : groupes homogènes

Tableau 20 : Evaluation de l'adhésion des isolats lactiques aux cellules épithéliales

Isolats	Adhésion	Interprétation
LbN1	-	<i>Pas d'adhésion</i>
LbN5	+++	<i>Adhésion</i>
LbN9	+++	<i>Adhésion</i>
LbN10	+++	<i>Adhésion</i>
LbN11	++	<i>Adhésion</i>
LbN12	++	<i>Adhésion</i>
LbN13	-	<i>Pas d'adhésion</i>
LbN14	+++	<i>Adhésion</i>
LbN15	+++	<i>Adhésion</i>

+ / Adhésion - / pas d'Adhésion ;

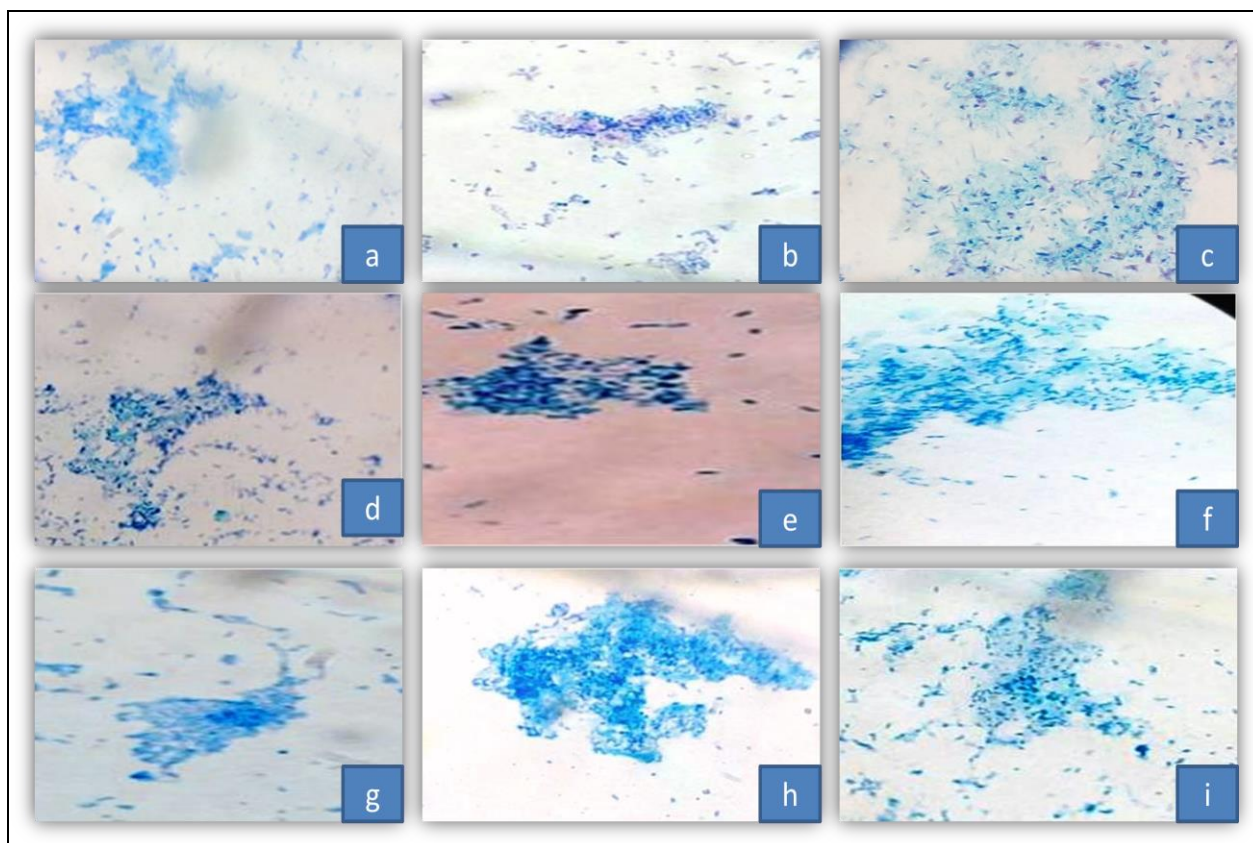


Figure 30 : Observation microscopique de l'adhésion des souches lactiques aux cellules épithéliales : a: LbN1; b: LbN5 ; c: LbN9 ; d: LbN10 ; e: LbN11 ; f: LbN12 ; g: LbN13 ; h: LbN14 ; i: LbN15.

Ces résultats préliminaires peuvent expliquer la variabilité inter-souches de la capacité de survie aux conditions gastro-intestinales simulées. Cependant, les différences dans la résistance des souches aux hostilités digestives n'impliquent pas une bonne adhésion des souches les plus résistantes, car cette capacité d'adhésion peut être exprimée différemment selon le modèle de cellules spécifiques utilisé *in vitro* (Fuller *et al.*, 1987).

En effet, différents modèles de cellules épithéliales humaines et/ou animales ont été utilisés pour montrer que l'adhésion des LAB dépendait de la souche et qu'elle pouvait être positive ou négative (Mäyrä-Mäukinen *et al.*, 1983 ; Conway *et al.*, 1987 ; Jin *et al.*, 1996 ; Corfield *et al.*, 2000 ; Fernandez *et al.*, 2003 ; Fang *et al.*, 2015 ; Louail, 2022).

Le mécanisme impliqué dans l'adhésion positive n'est pas encore bien élucidé. Cependant, il a été suggéré que cela est dû à la présence de couches superficielles de glycoprotéines (également appelées couches S), et l'expression des protéines LPXTG dans la paroi cellulaire bactérienne (Louail, 2022). Le passage rapide dans les conditions gastro-intestinales semble également être un facteur de prévention de la colonisation de l'intestin et stimule l'adhésion cellulaire (Davis *et al.*, 1976).

En revanche, l'inhibition de certaines souches bactériennes à l'adhésion aux cellules épithéliales serait due à une couche de microvésicules atteignant 50 nm de diamètre observée par microscope électronique à transmission entre les microvillosités et le gel muqueux qui empêche l'adhésion des bactéries (Mäyrä-Mäukinen *et al.*, 1983 ; Mack *et al.*, 1999 ; Jagota et Bennison, 2002 ; Mack *et al.*, 2003 ; Moal et Servin., 2006).

L'adhésion des souches aux cellules épithéliales représente un critère important de sélection de probiotiques à effets bénéfiques pour la santé de l'hôte dans l'inhibition compétitive des agents pathogènes et l'immunorégulation chez l'hôte (Pitino *et al.*, 2010 ; Jensen *et al.*, 2014 ; Jiang *et al.*, 2018 ; Song *et al.*, 2019).

III.3.3. Evaluation des activités biologiques des souches isolées

III.3.3.1. L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne ou antagonisme microbien est un critère important dans la sélection des probiotiques et elle a été évaluée par la méthode de diffusion en puits. Les diamètres des zones d'inhibition des souches de *L. plantarum* sont reportés dans le tableau 21.

Les souches ont manifesté une activité antimicrobienne vis-à-vis de bactéries Gram positives et Gram négatives, ainsi que vis-à-vis de champignons. Les résultats du test MANOVA révèlent une différence significative de cette activité entre les souches. Le test Tukey a été entrepris pour mieux apprécier la comparaison entre l'efficacité des souches étudiées.

Les diamètres de zone d'inhibition minimale et maximale enregistrés dans ce travail sont respectivement 4.9 et 17.47 mm ; les neuf souches ont affiché des diamètres de zone d'inhibition importants vis-à-vis des bactéries pathogènes testées, sauf vis-à-vis d'*Aspergillus niger* ATCC 106404 dont les diamètres semblent plus faibles ne dépassant pas 9mm.

Par ailleurs, la plupart des souches ont présenté le même effet vis-à-vis de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, pour lequel les diamètres des zones d'inhibition les plus élevés varient de 13.10mm et 14.67mm pour les souches LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN14 et LbN15 ; alors que les souches LbN5 et LbN13, ont exprimé une activité antibactérienne plus ou moins moyenne avec des diamètres de zones d'inhibition respectifs de 12.07mm et 11.58mm.

Les souches *L. plantarum* isolées ont été classées en trois groupes homogènes. En ce qui concerne l'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, le plus grand diamètre de zone d'inhibition (14.27mm) a été obtenu avec la souche LbN14. Les souches expriment également une inhibition variable selon la souche considérée vis-à-vis des pathogènes *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec un diamètre maximal de zone d'inhibition de 17.33mm, obtenu avec LBN15.

Le plus grand diamètre de zone d'inhibition exprimé par la souche LbN14 vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 est de 17.47mm. Ces résultats sont similaires à ceux de Jiang *et al.* (2016) qui ont montré que *L. plantarum* WLPL04 avait une activité à large spectre contre les souches à Gram positif, notamment *Staphylococcus aureus* CMCC26003 et les souches à Gram négatif telles que *Pseudomonas aeruginosa* MCC10104 (Jiang *et al.*, 2016).

L'activité inhibitrice peut inclure un certain nombre de substances pouvant provoquer une rupture de la membrane, une interférence du gradient H⁺ ou une inhibition enzymatique. De plus, l'action antimicrobienne des LAB est souvent due à une interaction complexe entre différents composés (Iorizzo *et al.*, 2020).

La neutralisation du surnageant écarte l'effet des acides organiques et met en évidence l'effet inhibiteur de la croissance exercé par d'autres substances synthétisées par les

lactobacilles (peroxyde d'hydrogène, du diacétyle ou bactériocines). En effet, les acides organiques (par exemple les acides lactique, acétique, butyrique et propionique) produits par les LAB) réduisent le pH dans la lumière gastro-intestinale et inhibent la croissance de micro-organismes pathogènes opportunistes (Quinto *et al.*, 2014 ; Iorizzo *et al.*, 2020).

Aussi, la production de composés antimicrobiens comme les bactériocines, l'exclusion compétitive des agents pathogènes, le renforcement de la barrière intestinale contre les agents pathogènes et le renforcement du système immunitaire de l'hôte pour combattre les agents pathogènes sont autant de propriétés d'importance cruciales (Ziar *et al.*, 2014 ; Iorizzo *et al.*, 2020 ; Fijan, 2023).

En effet, Chaalel *et al.* (2015) ont rapporté qu'une souche de *Lactobacillus plantarum* LbM2a, isolée des selles de nouveau-nés âgés d'une semaine, produisait de la plantaricine qui permettait l'inhibition de 18 des 22 souches indicatrices, dont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Bacillus cereus*.

III.3.3.2. L'activité antioxydante

L'activité antioxydante des souches de *L. plantarum* a été déterminée par le test de piégeage du radical libre DPPH et les résultats de l'ANOVA montrent une différence très hautement significative ($p < 0,001$) entre les neuf souches en ce qui concerne l'inhibition du radical DPPH (Figure 31).

Le test post hoc de Tukey a été utilisé pour classer les souches en groupes homogènes selon leur activité anti-radicalaire. Il n'y avait pas de différences significatives entre les pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les sept souches LbN15, LbN5, LbN11, LbN01, LbN9, LbN14 et LbN10 allant de 62.8% à 92.15%. Les activités antiradicalaires les plus faibles ont été enregistrées par LbN13 (54.96 %) et LbN12 (54.35 %), qui n'étaient pas significativement différentes.

Toutes les souches ont montré une activité antioxydante importante, l'activité de piégeage du DPPH la plus élevée (92.15 %) étant obtenue avec la souche LbN09. Ces résultats sont en accord avec ceux de Düz *et al.* (2020) qui ont rapporté que l'activité antioxydante la plus élevée affichée par *L. plantarum*IH14L était de 90.34 %, tandis que le pourcentage le plus faible (58.38) a été enregistré avec la souche GH8L.

Tableau 21 : Activité antimicrobienne des souches LAB isolées

Souches lactiques isolées	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches pathogènes					
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 33862	<i>C. albicans</i> ATCC10231	<i>A. niger</i> ATCC 106404
LbN1	13.10 ± 0.36 ^{a,b,c}	14.20 ± 0.72 ^b	12.50 ± 0.5 ^{a,b}	12.03 ± 0.15 ^{b,c}	14.67 ± 0.58 ^{c,d}	6.83 ± 0.76 ^{b,c,d,e}
LbN5	12.07 ± 0.11 ^{b,c}	14.17 ± 0.28 ^b	11.97 ± 0.95 ^{a,b}	13.50 ± 0.50 ^{a,b}	17.00 ± 1.00 ^{a,b}	8.73 ± 0.46 ^{a,b}
LbN9	13.83 ± 0.28 ^{a,b}	14.40 ± 1.21 ^b	13.80 ± 0.38 ^a	13.40 ± 0.52 ^{a,b}	14.17 ± 0.28 ^d	9.00 ± 0.50 ^a
LbN10	14.57 ± 0.40 ^a	15.03 ± 0.55 ^{a,b}	13.10 ± 0.56 ^{a,b}	12.23 ± 1.15 ^b	15.77 ± 0.49 ^{b,c}	8.07 ± 1.10 ^{a,b,c,d}
LbN11	14.67 ± 0.57 ^a	14.80 ± 0.26 ^b	12.10 ± 0.26 ^{a,b}	12.97 ± 0.45 ^{a,b}	15.60 ± 0.60 ^{b,c,d}	4.90 ± 0.36 ^e
LbN12	14.50 ± 0.50 ^a	14.33 ± 1.15 ^b	11.37 ± 0.78 ^b	12.63 ± 0.32 ^{a,b}	14.60 ± 0.52 ^{c,d}	8.33 ± 0.58 ^{a,b,c}
LbN13	11.58 ± 0.95 ^c	16.17 ± 0.76 ^{a,b}	12.40 ± 0.52 ^{a,b}	10.27 ± 0.64 ^c	16.83 ± 0.28 ^{a,b}	7.13 ± 0.32 ^{a,b,c,d}
LbN14	14.49 ± 1.32 ^a	15.77 ± 0.93 ^{a,b}	12.80 ± 0.72 ^{a,b}	14.27 ± 1.10 ^a	17.47 ± 0.45 ^a	6.23 ± 1.12 ^{d,e}
LbN15	14.47 ± 0.55 ^a	17.33 ± 1.15 ^a	12.83 ± 1.60 ^{a,b}	13.80 ± 0.20 ^{a,b}	14.87 ± 0.41 ^{c,d}	6.43 ± 0.51 ^{c,d,e}
<i>p</i> value* (MANOVA test)	0.000	0.003	0.04	0.000	0.000	0.000

* Chaque valeur représente la moyenne ± SD. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test MANOVA suivi du test de Tukey. a, b, c, d, e : groupes homogènes

Dans les travaux de Won *et al.* (2021), l'activité de piégeage du radical DPPH la plus élevée a été enregistrée pour *Lactiplantibacillus plantarum* (60 %) et *Lacticaseibacillus paracasei* (75.80 %). L'activité antioxydante peut s'expliquer par la production de composés (polysaccharides extracellulaires et l'acide lipotéichoïque) à la surface des cellules et par l'existence d'enzymes telles que la NADH-oxydase, la superoxydase (SOD), la NADH-peroxydase et les catalases de manganèse non hèmes chez les LAB (Zhang *et al.*, 2011 ; Won *et al.*, 2021).

La disponibilité de micro-organismes probiotiques comme antioxydants naturels a également été étudiée ces dernières années. Les lactobacilles représentent une grande proportion des bactéries lactiques (LAB) dont le potentiel probiotiques antioxydant a été rapporté dans plusieurs études (Al Kalbani *et al.*, 2019 ; Antognoni *et al.*, 2019 ; Song *et al.*, 2019 ; Düz *et al.*, 2020).

De nombreux antioxydants synthétiques présentent de fortes activités antioxydantes contre divers systèmes d'oxydation ; cependant, ils ont également des effets néfastes tels que des lésions hépatiques et des effets cancérigènes, et leur utilisation dans les aliments a été restreinte ou interdite dans certains pays ; c'est pourquoi il est très important de trouver des antioxydants plus sûrs et naturels en utilisant des ressources biologiques comme alternative aux antioxydants synthétiques (Osuntoki et Korie, 2010 ; Düz *et al.*, 2020).

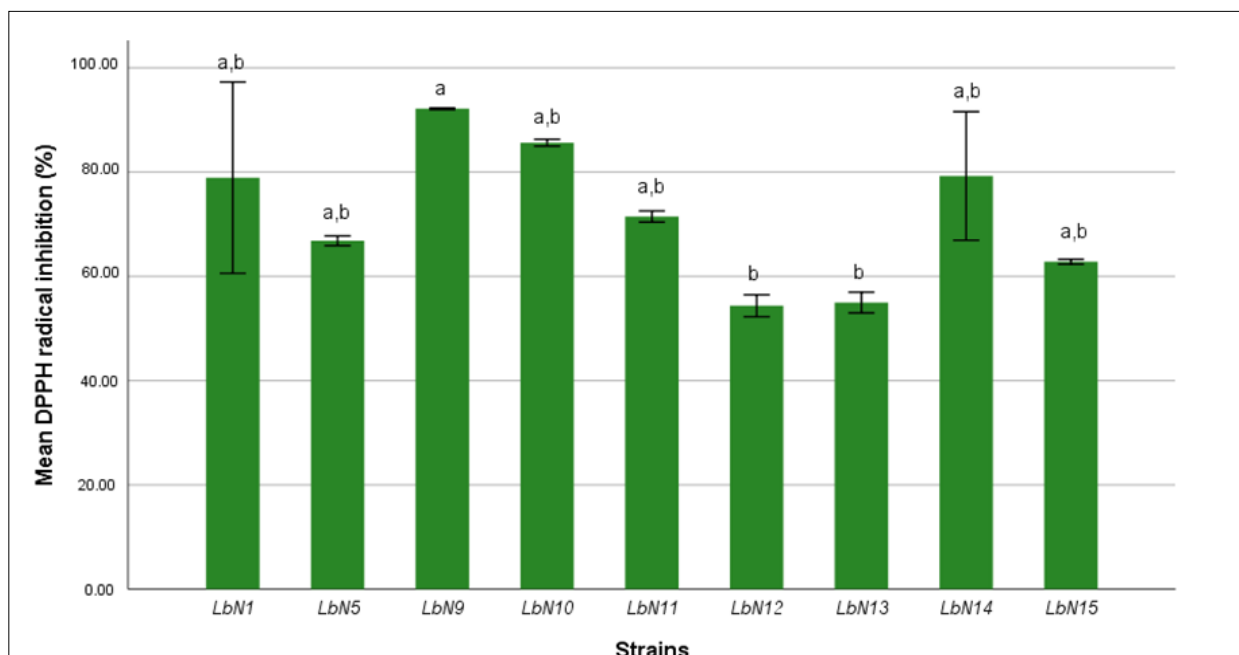


Figure 31 : Activité antioxydante des souches de *L. plantarum* estimée par l'activité de piégeage du radical libre DPPH (ANOVA, $p < 0.001$). a, b, c, d, e : groupes homogènes

III.4. Etude *in vivo* de l'effet de la souche *Lactiplantibacillus plantarum* LbN14 dans le modèle Murin d'inflammation intestinale

La rectocolite hémorragique fait partie des maladies chroniques inflammatoires qui touchent les intestins appelées MICI pour lesquelles il n'existe pas de traitement curatif (Ungaro *et al.*, 2016).

Les thérapies utilisées pour le traitement de ces maladies sont complexes et lourdes, composés de plusieurs médicaments à savoir des anti-diarrhéiques, des antibiotiques, des antispasmodiques, des immunosuppresseurs et des corticoïdes. Cependant, il existe des traitements alternatifs ou complémentaires qui permettent de mieux gérer ces maladies au quotidien, d'où l'intérêt de sélectionner des bactéries lactiques à potentiel probiotique ayant un effet anti-inflammatoire pouvant atténuer les symptômes de ces maladies (Alauzet, 2017).

La souche LbN14 identifiée comme ayant le meilleur profil probiotique, est choisie dans cette expérience pour vérifier si elle peut procurer un effet anti-inflammatoire préventif et /ou thérapeutique pouvant réduire l'inflammation intestinale ou atténuer les lésions épithéliales engendrées par l'administration orale de sulfate de Dextrane sodique (DSS). La souche LbN14 était administrée à la concentration cellulaire de 1.2×10^9 UFC. mL⁻¹ par rat

III.4.1. Effet de la souche LbN14 sur la modulation du microbiote intestinal

Des analyses microbiologiques de la microflore intestinale des différents lots de rats sont réalisées sur les crottes prélevées lors de la période d'adaptation ainsi que pendant la phase expérimentale (avant et pendant l'induction). Les résultats obtenus du dénombrement des différents groupes bactériens sont illustrés dans la figure 32.

Le dénombrement des bactéries lactiques révèle la présence des lactobacilles et des bifidobactéries. Les bifidobactéries sur milieu Colombia étaient présentes en période d'adaptation et période d'essai dans le lot 1 (témoin négatif), le lot2 (DSS-Bb12) et le lot 5 (DSS-Ultrabiotique), avec supplément en Bb12 et en Ultrabiotique, et dont le nombre de cellules a atteint 3.15×10^7 UFC/mL ; 2.12×10^8 UFC/mL ; 6.45×10^8 UFC/mL, respectivement.

L'induction de la rectocolite au DSS pour le lot 2 (témoin positif colite DSS) et le lot 3 (DSS-Sulfasalazine), a diminué significativement le nombre des bifidobactéries en l'absence d'aucun traitement probiotique contrairement aux lots, lot 6 (DSS-LbN14 avant et après

induction), lot 7 (DSS-LbN14 après induction au DSS et le lot 8 (Témoin positif LbN14), qui ont exposé seulement une légère diminution.

Dans le lot1 (témoin négatif), la croissance des lactobacilles était stable pendant les deux phases (adaptation et expérimentation) et a atteint 2.67×10^6 UFC/mL. Le lot2 (témoin positif colite DSS) a affiché une croissance des lactobacilles de 1.8×10^5 UFC/mL en moyenne pendant la phase d'adaptation ensuite une diminution est enregistrée jusqu'à 3×10^4 UFC/mL pendant la phase d'administration du DSS. Le dénombrement des lactobacilles dans le lot 8 (Témoin positif LbN14) était comparable au lot1 et la croissance a atteint les 1.25×10^{11} UFC/mL pendant la phase d'administration du DSS ; contrairement au lot 3 (DSS-Sulfasalazine), lot 4 (DSS-Bb12), lot 5 (DSS-Ultrabiotique), lot 6 (DSS-LbN14 avant et après induction) et lot 7 (DSS-LbN14 après induction) où la croissance des lactobacilles était plus importante entre 10^7 et 10^{11} UFC/mL surtout en phase de traitement et administration du DSS.

Le dénombrement des *Bactéroïdes* montre clairement un nombre de cellules plus bas ne dépassant pas les 10^5 UFC/mL pour tous les lots, à l'exception des lots: lot 2 (témoin positif colite DSS) et lot 3 (DSS-Sulfasalazine) ou ils ont atteint 3.52×10^8 et 1.08×10^7 ufc/mL, respectivement.

Quant à la croissance des *Entérobactéries* dans le groupe témoin lot 1, leur nombre a atteint 2.14×10^5 ufc/mL. Les lots 6, 7 et 8 affichent une croissance stable avec 1.64×10^5 , 2.54×10^5 et 2.17×10^5 UFC/mL respectivement. En revanche, les lots 2 et 3 affichent une légère augmentation du nombre de cellules surtout pendant la semaine d'induction au DSS avec 2.85×10^7 et 2.25×10^6 UFC/mL, respectivement. Une diminution du nombre d'entérobactéries est également observée dans les Lots 4 et 5.

Le groupe des *Entérocoques* était en croissance plus ou moins stable dans les lots 1 et 3, contre une légère élévation de croissance dans le lot 2. Une nette augmentation des entérocoques des lots 4, 5, 6, 7 et 8 a été enregistrée.

Ces résultats indiquent que la croissance des différents genres bactériens se déroule normalement sans aucun déséquilibre bactérien pendant la phase d'adaptation (Firmicutes > Bacteroides). Cependant, durant la période expérimentale, notamment la phase d'administration du DSS pour les lots sans traitement bactérien (lot 2 et lot 3), une dysbiose traduite par l'augmentation du nombre dans le groupe des Bacteroides par rapport au groupe des Firmicutes (Lactobacilles, Clostridium, et entérocoques) est enregistrée. Elle est due au

développement de la colite hémorragique après administration du DSS dans ce cas, d'où les symptômes cliniques observés chez les rats des deux lots.

Par ailleurs, les lots d'induction au DSS ayant reçu en même temps un traitement placebo par la souche LbN14 pendant les deux phases expérimentales où seulement pendant la phase d'induction du DSS, ont révélé une stabilité de l'équilibre de la flore intestinale chez les rats des lots : lot 4 (DSS-Bb12), lot 5 (DSS-Ultrabiotique), lot 6 (DSS-LbN14 avant et après induction) et lot 7 (DSS-LbN14 après induction) en comparaison avec les lots témoins lot1 (négatif) et lot 8 (positif -LbN14) ; ce qui laisse suggérer que la souche LbN14 possède un potentiel probiotique dans le maintien et même dans l'amélioration de l'équilibre de la flore intestinale chez les rats atteint de rectolite chronique hémorragique (RCH).

Park *et al.* (2021) ont pu observer une transition de la diversité microbienne cœcale de l'état normal vers une dysbiose avec des changements dynamiques des populations au cours du développement de la colite. Aussi, plusieurs études plus anciennes avaient rapporté l'existence d'une dysbiose chez les patients atteints de MICI (Sokol *et al.*, 2006 ; Sokol *et al.*, 2008 ; Machiels *et al.*, 2014 ; Pascal *et al.*, 2017). Le microbiote intestinal est constitué de deux phylum bactériens dominants, les Firmicutes et les Bacteroidetes, qui constituent près de 90 % de la population totale, les Firmicutes étant plus abondants que les Bacteroidetes (Qin *et al.*, 2010).

Les autres phylums bactériens présents dans l'intestin humain sont les actinobacteria, les proteobacteria, les verrucomicrobia, les fusobacteria, les cyanobacteria, les spirochaetes. Le phylum des firmicutes est majoritairement composé de bactéries appartenant aux clostridia ; alors que celui des Bacteroidetes est, quant à lui, représenté par plusieurs espèces de bacteroides. Le phylum des actinobacteria comprend les bifidobactéries (Cherbuy *et al.*, 2013). Chez l'adulte, le microbiote intestinal est dominé par des espèces bactériennes anaérobies strictes ainsi que des bactéries anaérobies facultatives comme les enterobacteries mais en nombre plus faible (Cherbuy *et al.*, 2013).

Par ailleurs, la dysbiose associée aux MICI est un cas particulier de dysbiose intestinale, où les modifications de structure de la communauté du microbiote intestinal sont aussi corrélées avec une dérégulation de la réponse immunitaire de l'hôte, conduisant à une inflammation sévère et chronique de l'intestin (Rajca., 2015). Bien que les mécanismes qui permettent la modulation du microbiote intestinal restent pour la plupart inconnus, plusieurs

scientifiques s'emballent vers la recherche des différentes voies de modulation du microbiote intestinal qui pourraient être proposées en prévention ou comme option thérapeutique visant à rétablir l'équilibre intestinal, et lutter ainsi contre les pathologies associées aux dysbioses (Varela *et al.*, 2013 ; Schreck *et al.*, 2017 ; Hojsak *et al.*, 2018 ; Štofilová *et al.*, 2022).

La diversité alimentaire et l'apport direct de bactéries bénéfiques, sont des éléments clé de la composition et de la stabilité du microbiote intestinal (Hojsak *et al.*, 2018 ; Štofilová *et al.*, 2022). En effet, les probiotiques tels que *Lactobacillus* sp. exercent un effet bénéfique important sur la composition de la microflore intestinale humaine et sur le système immunitaire (Selvamani *et al.*, 2022).

III.4.2. Effet anti-inflammatoire de la souche LbN14

Dans cette section, nous avons tout d'abord suivi l'évolution pondérale des rats pendant trois semaines (phase d'adaptation, phase avant induction, phase d'induction au DSS, respectivement) par mesure directe du poids corporel ainsi que le poids moyen d'aliment consommé par semaine. Ensuite, les atteintes inflammatoires macroscopiques sont évaluées par mesure des tailles des segments de colon prélevés de chaque lot de rats après leur sacrifice, ainsi que la mesure des poids des organes. Au final, les atteintes inflammatoires microscopiques sont évaluées par une étude histologique des segments de colons ainsi que le calcul du score histologique par observation microscopique des différentes lésions épithéliales causées par l'inflammation induite par le DSS.

Les résultats de l'évolution des poids des rats révèlent que les rats se développent normalement avec un poids corporel variable ($P < 0.05$) pendant leur croissance et les gains et/ou les pertes de poids enregistrés sont différentes d'un rat à l'autre selon le lot considéré à chaque étape expérimentale (Figure 33).

Les rats du lot 1, lot témoin sans traitement probiotique, ni induction au DSS, affichent une bonne évolution de leur poids avec une consommation alimentaire régulière stable (figure 34), et le poids moyen des rats a atteint 164.14 ± 4.5 g. Les rats de ce lot n'ont affiché aucun changement dans l'aspect des crottes, il n'y a pas de diarrhée ni de saignement donc pas de changements physiologiques précis.

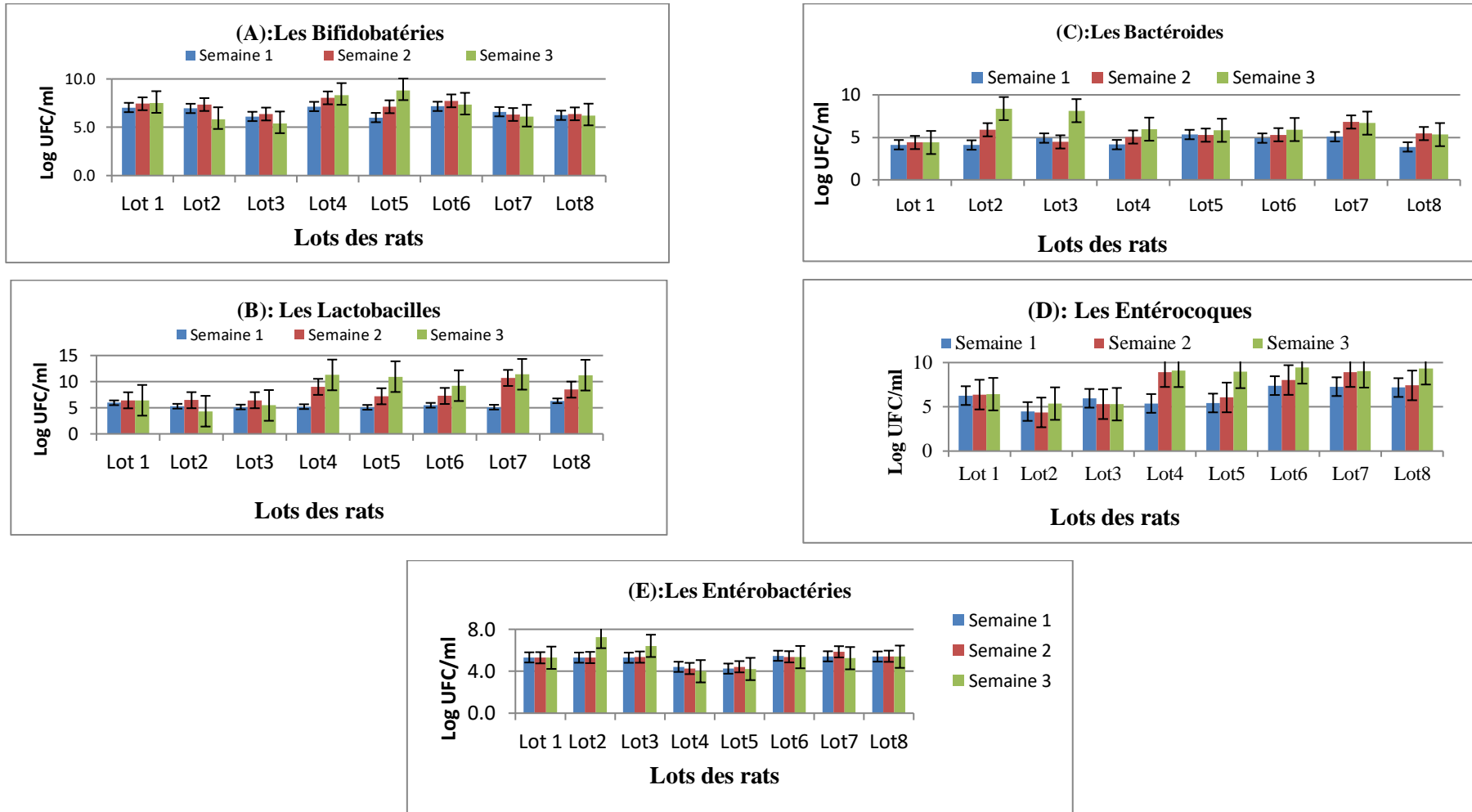


Figure 32 : Dénombrement du microbiote intestinal:(A): Les bifidobactéries, (B): Les lactobacilles, (C): Les bactéroïdes, (D):Les entérocoques, (E): Les Entérobactéries, lot1:Témoin négatif (sans DSS ni LbN14) ; lot2: Témoin colite positif ; lot3: DSS-Sulfasalazine ; lot4: DSS-Bb12 ; lot5: DSS-Ultrabiotique ; lot6: (DSS-LbN14 avant et après induction) ; lot7:(DSS-LbN14 après induction) ; lot8:(Témoin positif avec LbN14).

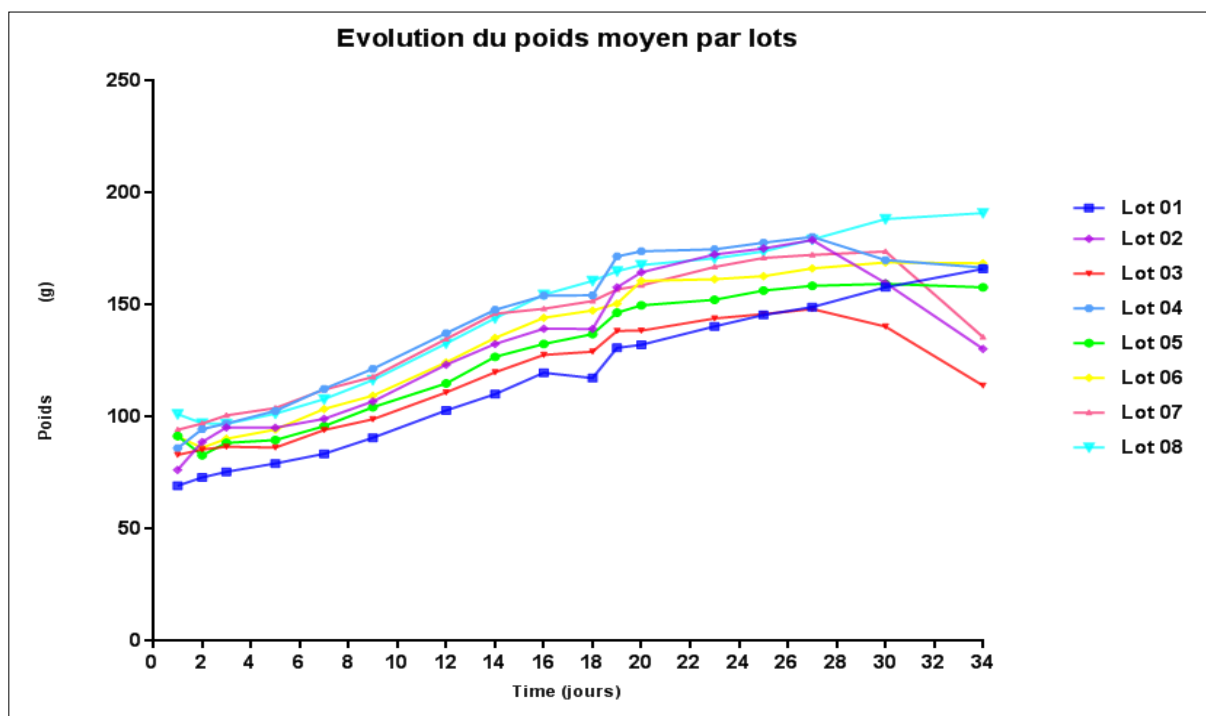


Figure 33 : Evolution du poids des rats par lots ($P < 0.0001$). Lot 1 : Témoin négatif (sans DSS ni LbN14) ; lot 2 : Témoin colite positif ; lot 3 : DSS-Sulfasalazine ; lot 4 : DSS-Bb12 ; lot 5 : DSS-Ultrabiotique ; lot 6 : (DSS-LbN14 avant et après induction) ; lot 7 : (DSS-LbN14 après induction) ; lot 8 : (Témoin positif avec LbN14).

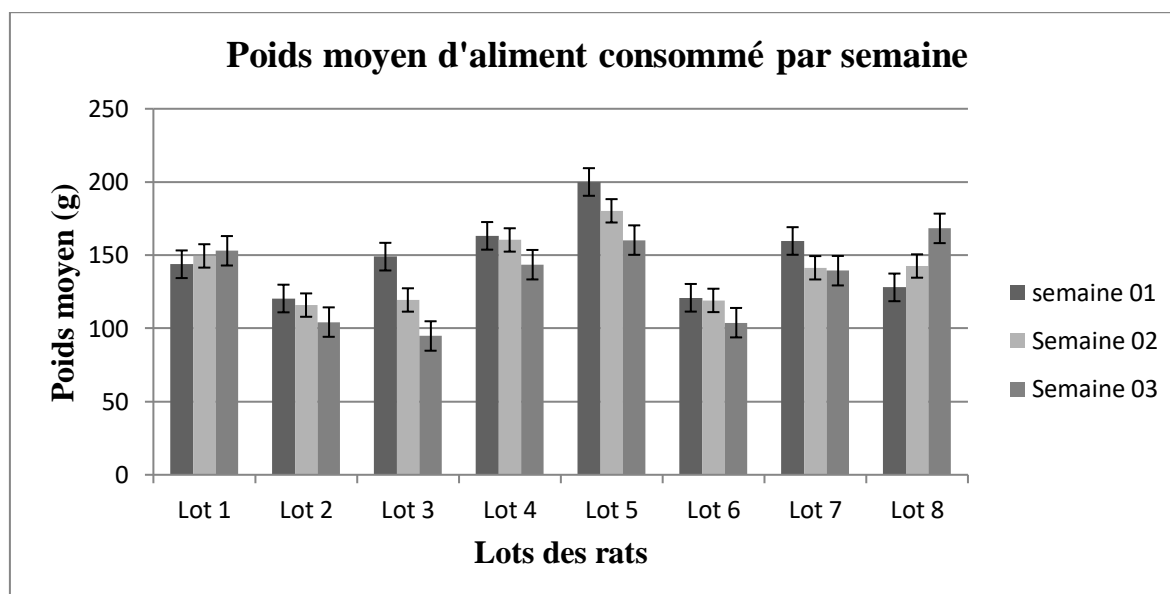


Figure 34 : Poids moyen d'aliment consommé par les rats de chaque lot. Semaine 1 (J1-J7) : la phase d'adaptation ; Semaine 2 : (J8-J14) la phase expérimentale avant administration de DSS, et Semaine 3 : (J14-J21) phase expérimentale après administration de DSS / lot 1 : Témoin négatif (sans DSS ni LbN14) ; lot 2 : Témoin colite positif ; lot 3 : DSS-Sulfasalazine ; lot 4 : DSS-Bb12 ; lot 5 : DSS-Ultrabiotique ; lot 6 : (DSS-LbN14 avant et après induction) ; lot 7 : (DSS-LbN14 après induction) ; lot 8 : (Témoin positif avec LbN14).

Cependant, lors de la période expérimentale, surtout lors de la période d'induction avec le DSS, de J7-J14 ; le poids des rats a baissé de façon variable d'un rat à l'autre et il y'a apparition de symptômes digestifs (diarrhée aiguë ainsi que des saignements couvrant l'anوس) accompagnés d'une réduction de leur activité et d'une diminution de la prise de nourriture surtout pour les lots : lot 2 (Témoin positif colite) et lot 3 (DSS-Sulfasalazine).

Le poids des rats du lot 2, lot contrôle de la maladie RCH où les rats ayant reçus le DSS pendant 7 jours n'ont pas été traités par la souche LbN14 ou par le médicament standard, la sulfasalazine (SASP), a évolué normalement de J1 à J7, puis a nettement diminué pour atteindre 134 ± 3.4 g de J8 à J14, période de fortes diarrhées avec du sang dans l'anوس et les selles, témoins d'une colite ulcéreuse très active.

Le lot 3 a été traité par un anti-inflammatoire, la sulfasalazine (SASP), pendant la période d'induction de la RCH avec le DSS et n'a reçu aucun prétraitement préventif. L'évolution du poids des rats a été similaire à celle du lot 2, avec un poids qui continue d'augmenter pendant la phase d'adaptation et la phase expérimentale avant induction de la RCH et qui, par la suite, diminue pendant l'induction de la colite au DSS, avec aussi la mort de 3 rats. Les crottes de ces 3 rats étaient molles avec saignement mais sans diarrhée comme cela a été le cas du lot 2 (témoin positif colite) ; alors qu'une hémorragie et un anus sanglant ont été constatés chez les rats morts, laissant penser à l'inefficacité de la dose de Sulfasalazine utilisée à éradiquer ou réduire la RCH induite au DSS.

En effet, certains modèles d'inflammation intestinale animale publiés précédemment sur la maladie inflammatoire de l'intestin chez l'homme, démontrent l'effet pharmacologique des médicaments tels que la Salazopyrine (SASP) ou ses analogues, couramment utilisés pour traiter cette affection chez l'homme. La fraction active de la Sulfasalazine SASP dans la colite ulcéreuse est connue pour être le 5-aminosalicylique (5-ASA) qui semble également avoir un effet thérapeutique sur l'inflammation induite au DSS (Axelsson *et al.*, 1996). Les principes actifs de la Sulfasalazine SASP jouent un rôle capital dans la diminution de l'activité apoptotique des cellules épithéliales intestinales (Williams *et al.*, 2011).

Dans le cas des rats du lot 4 qui ont reçu un supplément en souche bifide Bb12 avant et pendant l'induction de la RCH avec le DSS, l'évolution du poids a été similaire mais moins marquée dans sa réduction que celle des lots précédents (perte de poids de 19.72 ± 0.3 vs 36.4 ± 3.6 g par rat). Les crottes étaient de très molles à diarrhéiques mais avec une intensité sans

apparition de sang visible ; évoquant un probable effet de diminution des signes cliniques de la RCH par la souche Bb12. Ces résultats se rapprochent de ceux de Kato *et al.* (2004) qui, en évaluant l'effet thérapeutique d'un lait fermenté renfermant des bifidobactéries chez vingt patients atteints d'une RCH active modérée à sévère pendant douze semaines, avaient relevé une amélioration des scores d'activité clinique, endoscopique et histologique.

Le poids des rats du lot 5, qui ont reçu en supplément un probiotique commercial, l'Ultrabiotique, avant et pendant l'induction de la rectolite au DSS, était en augmentation constante jusqu'à la fin de l'induction pendant la période d'adaptation, ainsi qu'au cours des deux semaines d'expérimentation. Il faut signaler la présence d'une diarrhée (Tableau 22) mais pas aussi intense et sans saignement visible. Ces résultats sont similaires aux essais cliniques du complexe probiotique VSL # 3 qui ont permis d'atténuer la colite induite par le DSS et ont montré des effets bénéfiques des probiotiques sur les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) (Liu *et al.*, 2019).

Le poids moyen des rats du lot 6 (DSS-LbN14 avant et après induction) et du lot 7 (DSS-LbN14 après induction), ceux testés par la souche LbN14 (*Lactobacillus plantarum*) ont atteint $170.6 \pm 4.4\text{g}$ et $135.68 \pm 4.4\text{g}$, respectivement. L'aspect des crottes n'a présenté aucun changement physiologique, pas de diarrhée ni de saignement dans les deux lots.

Les rats du lot 8 (Témoin LbN14), qui ont reçu seulement la souche LbN14 pendant les deux semaines d'expérimentation sans aucune induction au DSS, ont affichés une prise de poids plus importante où ils ont atteint une moyenne de $191,7 \pm 0,3\text{g}$ de poids corporel.

La longueur moyenne du colon des rats du lot 2 ($15.3 \pm 0,5\text{ cm}$) est significativement ($P < 0.05$) inférieure à celles des lots témoins : lot 1 ($21.3 \pm 0,3\text{cm}$) et 8 ($21,26 \pm 0,6\text{cm}$) (fig.35, tableau 21). Les autres groupes : lot 3, lot 4, lot 5, lot 6 et le lot 7, recevant les différents traitements avant et/ou après l'induction de la RCH au DSS, ont affichés des longueurs de colon variables selon le lot considéré et qui variaient entre 16.25 et 18.50 cm.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de plusieurs études d'évaluation des modifications structurales et ultra-structurales qui apparaissent lors de l'inflammation aiguë ou chronique induite par le DSS, dont une diminution de la longueur du colon, paramètre fréquemment utilisé comme marqueur de l'inflammation (Gaudio *et al.*, 1999 ; Lenoir *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2022).

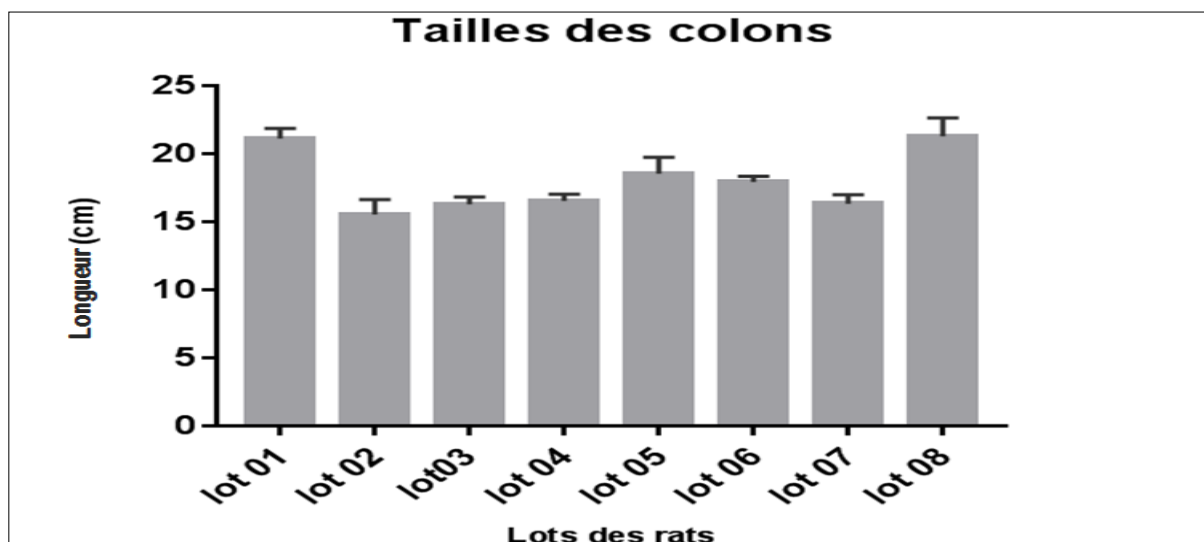


Figure 35 : Evolution des longueurs des colons par lots ($P < 0,05$) : lot 1 : Témoin négatif (sans DSS ni LbN14) ; lot 2 : Témoin colite positif ; lot 3 : DSS-Sulfasalazine ; lot 4 : DSS-Bb12 ; lot 5 : DSS-Ultrabiotique ; lot 6 : (DSS-LbN14 avant et après induction) ; lot 7 : (DSS-LbN14 après induction) ; lot 8 : (Témoin positif avec LbN14).

Tableau 22 : Evaluation des atteintes macroscopiques de l'inflammation

Lots * des rats	Poids relatif des organes en % de poids					Diarrhée	Saignement
	Poumon	Rein	Cœur	Rate	Foie		
Lot 1	0.75	0.75	0.44	0.31	4.34	-	-
Lot 2	0.82	0.80	1.08	0.41	4.23	+++	+++
Lot 3	0.73	0.73	0.33	0.39	4.09	++	++
Lot 4	0.73	0.84	0.33	0.31	3.79	++	-
Lot 5	1.01	0.78	0.37	0.29	4.53	+	-
Lot 6	1.18	0.65	0.30	0.26	4.17	±	-
Lot 7	0.91	0.87	0.43	0.34	4.44	-	-
Lot 8	0.95	0.73	0.35	0.32	4.17	-	-

* lot 1 : Témoin négatif (sans DSS ni LbN14) ; lot 2 : Témoin colite positif du DSS ; lot 3 : DSS-Sulfasalazine ; lot 4 : DSS-Bb12 ; lot 5 : DSS-Ultrabiotique ; lot 6 : (DSS-LbN14 avant et après induction) ; lot 7 : (DSS-LbN14 après induction) ; lot 8 : (Témoin positif de LbN14).

En effet, le DSS, un polysaccharide sulfaté composé d'unités de Dextrane et d'anhydre-glucose sulfaté, n'est pas décomposé par la flore intestinale, et son mécanisme précis pour induire une inflammation du côlon reste non complètement élucidé (Ishioka *et al.*, 1987 ; Kitajima *et al.*, 2001 ; Wirtz *et al.*, 2017). Cependant, il semble endommager les structures épithéliales de la muqueuse intestinale, entraînant une inflammation comme le démontre son impact toxique sur des entérocytes *in vitro* de la lignée Caco-2 (Araki *et al.*, 2006).

Cette altération de la muqueuse épithéliale permet le développement d'une inflammation par colonisation du tissu lymphoïde par des macrophages qui interagissent avec les lymphocytes T (Araki *et al.*, 2010 ; Hall *et al.*, 2011). Différentes variables, telle que le poids moléculaire et la concentration (diluée ou non) du DSS, ainsi que le mode et la durée d'administration, entraînent des réponses différentes en fonction de l'espèce hôte utilisée (Vowinkel *et al.*, 2004).

La surveillance des animaux (mesure du poids et consommation de l'aliment) pendant l'expérimentation permet le contrôle et l'évaluation de la sévérité de l'inflammation induite (Kullmann *et al.*, 2001).

En effet, l'administration de DSS induit une modification progressive de la texture des matières fécales se traduisant par l'apparition d'une diarrhée aiguë caractéristique de la colite consécutive à un trouble fonctionnel entraînant une réduction, voire une incapacité du côlon à absorber les électrolytes, les sels minéraux et l'eau. Ce trouble est dû à la destruction de la barrière épithéliale, elle-même liée à l'augmentation des taux de TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha) au niveau du site de l'inflammation (Lenoir *et al.*, 2011).

La présence de sang dans les selles et dans la zone anale est également une caractéristique déterminante de l'inflammation et constitue un paramètre de calcul d'un score, le « disease activity index » (DAI), qui permet ainsi d'évaluer la sévérité de l'inflammation tout au long de l'expérimentation (Cooper *et al.*, 1993).

L'analyse histologique des sections des colons prélevés après sacrifice des rats, est déterminée par observation microscopique des lames histologiques après coloration des tissus. Elle nous a permis de caractériser l'atteinte tissulaire de l'inflammation induite par le DSS. Les résultats obtenus sont reportés dans les figures 36 et 37.

Les résultats du lot 02 (contrôle de DSS) indiquent le développement d'une RCH très active avec un score histologique très élevé proche de 14 ± 0.4 où le DSS a provoqué de sévères altérations de la muqueuse colique telles que la destruction de l'épithélium, la dilatation des structures glandulaires et/ou l'apparition d'œdème dans le chorion. Ces effets sont atténués dans les autres lots notamment le lot 4:(DSS-Bb12) ; le lot 5 : (DSS-Ultrabiotique) et le lot 6 : (DSS-LbN14 avant et après induction), respectivement, et dont les rats ont reçu à titre préventif la souche bifide probiotique Bb12, l'Utrabiotique et la souche isolée dans ce travail, la LbN14, respectivement, avant et pendant l'induction au DSS

Les lots lot3 (DSS-Sulfasalazine) et lot7 (DSS-LbN14 après induction) n'ayant pas reçu de traitement à titre préventif, ont affiché amélioration considérable des atteintes microscopiques malgré une légère diminution du score histologique qui a atteint $10 \pm 1,1$.

Ces résultats expriment un effet réducteur des atteintes histologiques et se rapprochent de ceux observés dans l'étude réalisée par Kechaou. (2012) dont l'analyse histologique des tissus de colon, a montré un effet anti-inflammatoire de la souche de *L. paracasei* VEL12195 avec un score autour de 30 qui était diminué significativement après traitement des souris par la même souche lors du premier essai avec une dose de 3% de DSS

Santos *et al.* (2012) avaient également montré que des souches lactobacilles de l'espèce *L. delbrueckii* étaient capables de diminuer les scores macroscopique et histologique au niveau du colon

D'autres travaux réalisés par Lenoir *et al.* (2011) sur l'effet protecteur de la consommation d'infusion de la verveine citronnée sur le développement de la colite induite par le sulfate de Dextrane sodique (DSS) chez le rat, ont rapporté l'efficacité du score histologique dans l'évaluation de l'inflammation et ont observé une protection partielle de la muqueuse colique avec un score histologique de 8.72 chez cette infusion contre une atteinte histologique induite par le DSS bien marquée avec un score histologique initial de 12.4.

En effet, la majorité des dommages observés pendant l'établissement des scores histologique concerne des lésions présentes dans la partie distale du colon tels qu'un amincissement et une érosion de l'épithélium de surface, la dilatation des cryptes, et des zones d'œdème, en plus d'une diminution du nombre de cellules caliciformes, ainsi que l'apparition occasionnelle d'abcès cryptiques ou de congestions vasculaires (Gaudio *et al.*, 1999 ; Vetuschi *et al.*, 2002).

Aussi, l'un des facteurs examinés est l'infiltration des muqueuses coliques par des cellules immunitaires, principalement des polynucléaires neutrophiles (PNN) et des macrophages. Ces cellules immunitaires spécifiques sont connues pour occuper rapidement les muqueuses du côlon lors d'une réponse inflammatoire (Sertejn *et al.*, 2003). De plus, elles contiennent de l'enzyme myéloperoxydases (MPO) dans leurs granules azurophiles primaires, liées à la colonisation du côlon par les PNN et souvent utilisée comme marqueur d'inflammation au début de l'inflammation, il semble que les PNN et souvent utilisée comme marqueur d'inflammation. Au début de l'inflammation, il semble que les PNN soient présents aux côtés des lymphocytes T au niveau de la muqueuse, indiquant leur implication potentielle dans l'activation de ces cellules de l'immunité adaptative (Sertejn *et al.*, 2003).

L'ampleur des changements provoqués par l'inflammation est souvent mesurée à l'aide d'un système de notation d'un score histologique qui évalue le degré et la prévalence de chaque paramètre sur une échelle de 0 à 3 (Okayasu *et al.*, 1990).

Dans la présente étude *in vivo*, nous avons pu démontrer un effet anti-inflammatoire notoire de la souche LbN14 sur la base d'un seul essai mais qui reste toutefois insuffisant pour déterminer l'effet anti inflammatoire sur des doses plus élevées, en plus de n'avoir testé qu'une seule souche, il serait donc important en perspective de réaliser d'autres essais avec des doses différentes pour les autres souches identifiées.

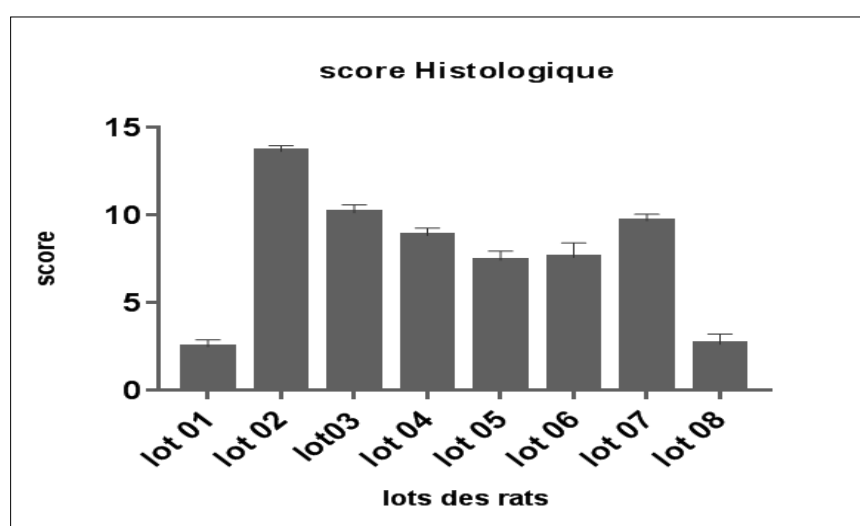


Figure 36 : Scores d'évaluation des atteintes histologiques chez les rats des différents lots d'expérimentation ($P < 0.05$). Lot2 : Témoin colite positif du DSS ; lot3 : DSS-Sulfasalazine ; lot4 : DSS-Bb12 ; lot5 : DSS-Ultrabiotique ; lot6 : (DSS-LbN14 avant et après induction) ; lot7 : (DSS-LbN14 après induction) ; lot 8 (Témoin positif de LbN14).

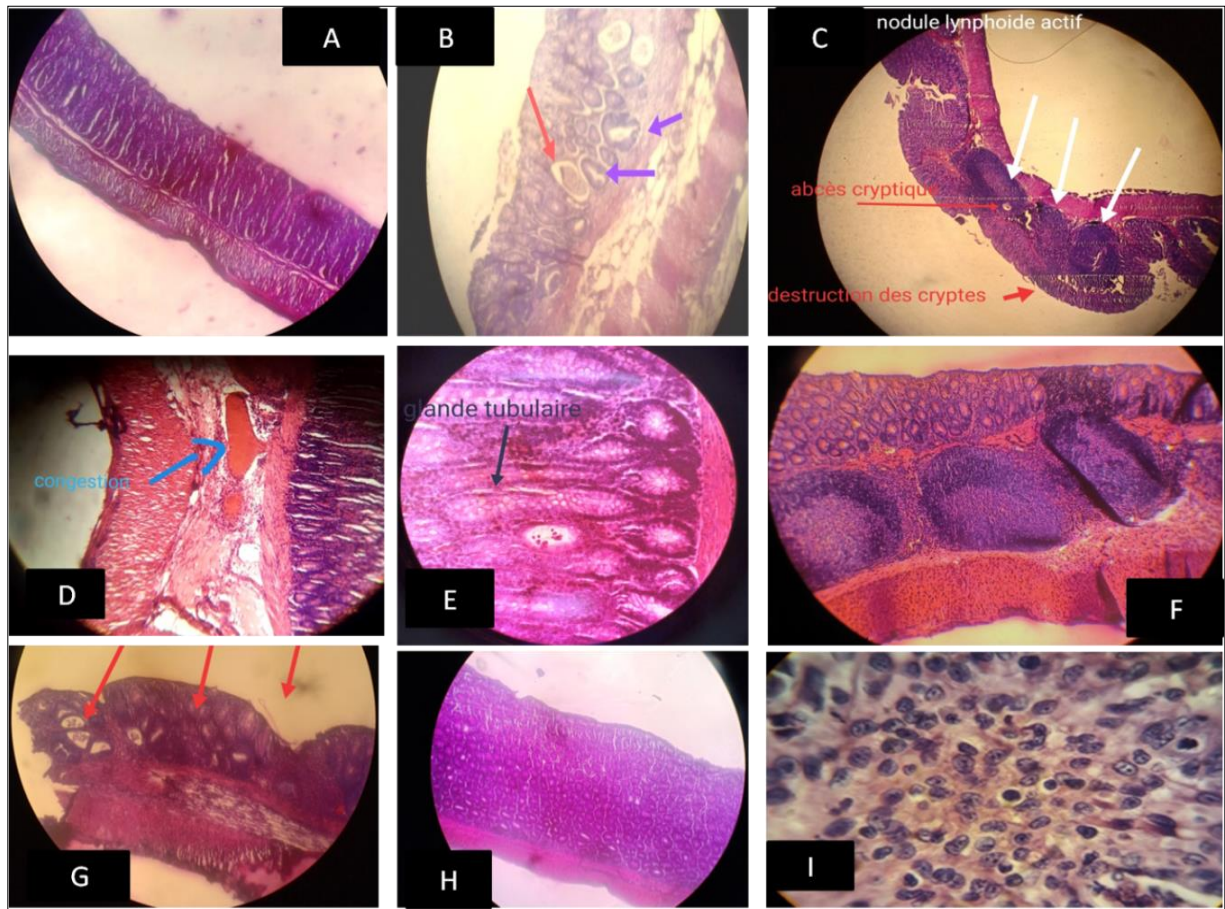


Figure 37 :Observation microscopique de coupes histologiques des colons de rats Wistars (Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine):A/ Aspect normale du colon du lot Témoin (grossissement x5); B/ Colon de rats du lot traité par le DSS (dilatation des crypte, abcès cryptique, Erosion) (grossissement x10);; C/ Colon de rats traités par la SASP (rémission par des nodules lymphoïde actif) (grossissement x5) ; D/ Colon de rats traité par Bb12 (crypte normale, destruction focale et congestion vasculaire) (grossissement x10) ; E/ Colon de rats traités par le probiotique commerciale (glande tubulaire bien distincte; pas de destruction des crypte ni ulcération) (grossissement x40) ; F/ Colon de rats traités avant et après l'induction au DSS par la souche test LbN14 (cryptes normales, plusieurs nodules lymphoïdes actifs) (grossissement x10) ; G/Colon de rats traité par LbN14 seulement en phase d'induction au DSS (abcès cryptiques, ulcération, destruction des cryptes et érosion) (grossissement x10) ; H/ Colon de rats traités par LbN14 seule sans induction au DSS (épithélium régulier avec ces glandes tubulaires bien structuré, absence d'abcès cryptiques, pas de congestion vasculaire, ni d'ulcération ou d'érosion) (grossissement x10) ; I/ Infiltration des cellules PNN et Mononuclées(grossissement x100).

Conclusion générale

Au total, neuf souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir du lait cru de vache, appartenant au groupe des Lactobacilli ayant certaines propriétés probiotiques comme le pouvoir antagoniste vis-à-vis une d'une gamme de bactéries pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires, le pouvoir antioxydant ainsi que l'effet anti-inflammatoire préventif des maladies intestinales chroniques.

La première partie a été consacrée à la caractérisation de ces souches qui a visé en premier lieu leur identification sur la base de critères phénotypiques. C'est ainsi que nous avons pu identifier la forme cellulaire des isolats, déterminer leur profil fermentaire des sucres et mettre en évidence certaines propriétés technologiques comme le pouvoir acidifiant, aromatisant et texturant. En second lieu, Nous nous sommes orientés vers l'identification moléculaire dans le but de connaître l'identité génétique exacte de ces souches lactiques, par l'extraction de l'ADN et l'amplification en chaine par polymérase (PCR). Un séquençage nous a permis l'obtention des séquences d'ADN des souches qui ont été ensuite comparées avec la banque de données du BLAST (NCBI) pour l'identification des espèces concernées.

La deuxième partie, a concerné la sélection des souches ayant un potentiel probiotique et qui a été établie sur la base de tests de survie aux conditions hostiles simulées du tube digestif ; ainsi que l'évaluation des activités biologiques notamment les activités antimicrobiennes et antioxydante.

La troisième et dernière partie a porté sur l'étude des propriétés anti inflammatoires in vivo en utilisant le modèle murin de la rectocolite hémorragique induite au DSS à 3%. L'essai a été fait avec une seule souche, la LbN14, considérée comme ayant le meilleur potentiel probiotique sur la base des tests in Vitro précédents.

L'analyse phénotypique, moléculaire (PCR-16S) et protéomique (MALDI-TOF) ont abouti à l'identification de huit souches (LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN13, LbN14, LbN15 et LbN12) apparentées à l'espèce *Lactiplantibacillus plantarum* avec 100 et 99.75% de similarité, respectivement et une souche (LbN1) renommée *Lacticaseibacillus rhamnosus* à 100% de similarité lors de la comparaison des séquences d'ADNr 16s avec la base de données Genbank. La combinaison de l'analyse phylogénétique et protéomique nous a permis de

démontrer la fiabilité des techniques d'identification utilisées et de confirmer les résultats obtenus par amplification des ADNr 16S.

Les résultats des critères technologiques des souches, révèlent certaines activités technologiques intéressantes telles que le pouvoir acidifiant du lait, l'activité protéolytique, lipolytique, aromatique et texturante. Ces souches peuvent être proposées comme starters dans les processus de fermentation industrielle une fois mieux caractérisées sur le plan des conditions technologiques industrielles.

L'étude in-vitro du potentiel probiotique nous a permis d'affirmer que les neuf souches présentent des propriétés probiotiques intéressantes. Les souches *Lactocaseibacillus rhamnosus* LbN1 et *Lactiplantibacillus plantarum* LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14 et LbN15, ont affiché leurs performances selon plusieurs critères comme l'absence d'hémolyse, la résistance aux conditions digestives simulées avec des taux de survie acceptables et l'adhésion aux cellules épithéliales. Ces souches ont également démontré une très bonne activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis de germes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires, en plus d'une très bonne activité antioxydante. Cependant, il serait intéressant de compléter ces observations par l'évaluation de ces performances in-vivo pour mieux cerner leur éventuel statut de probiotique.

Dans le modèle murin d'inflammation intestinale induite au DSS à 3% chez des rats males Wistars, nous avons pu montrer que la souche *L. plantarum* LbN14, a permis de protéger les rats d'expérimentation surtout ceux qui l'ont reçu en préventif avant et après l'induction au DSS. Ces résultats préliminaires sont très encourageants et il serait intéressant en perspective de confirmer ces propriétés anti-inflammatoires par de nouveaux essais et d'explorer aussi le potentiel anti-inflammatoire des autres souches identifiées.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

-A-

1. **Abdel-Rahman M.A., Tashiro Y., Sonomoto K. (2013).** Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol. Adv.* 31 : 877–902.
2. **Abedi E., Hashemi SMB. (2020).** Lactic acid production - producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon.*6(10): e04974.
3. **Aguilar-Toalá J.E.R., Garcia-Varela, H.S. Garcia, V. Mata-Haro' A.F. González-Córdova' B.Vallejo-Cordoba' A.Hernández-Mendoza (2018).** Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology.* 75 : 105-114.
4. **Aguirre M and Collins M. D (1993).** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journale d'Applied Bacteriologie.* 75 : 95-107.
5. **Ahrne S., Molin G., Stahl, S. (1989).** Plasmids in *Lactobacillus* strains isolated from meat and meat products. *Syst. Appl. Microbiol.* 11 :320-325.
6. **Ait Abdeslam A., Desmaures N. et Bensoltane A. (2019).** Identification of indigenous *Lactobacillus* isolated from artisanal Algerian dairy product by 16S rRNA Gene Sequencing and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *South Asian J Exp Biol.* 9 (5): 193-206.
7. **Alauzet C. (2017).** Microbiote intestinal, dysbiose et pathologies. *Correspondances en Onco-Hématologie.*;13(3):119-124
8. **Alex P., Zachos N.C., Nguyen T., Gonzales L., Chen T-E., Conklin L.S., Centola M. et Xuhang L. (2009).** Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 March ;15(3): 341-352.
9. **Alkalbani NS, Turner MS et Ayyash MM. (2019).** Isolation, identification, and potential probiotic characterization of isolated lactic acid bacteria and in vitro investigation of the cytotoxicity, antioxidant, and antidiabetic activities in fermented sausage. *Microb Cell Fact.* 18,188.
10. **Amann R.I., Ludwig W. et Schleifer K.H. (1995).** Phylogenetic Identification and in Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews.* 59: 143-169.
11. **Amar S.M. El yacine (2015).** Effet préventif et curatif de certains aliments fonctionnels sur le développement du cancer colorectal. Thèse de Doctorat. Université Mustapha Stambouli de Mascara. p3-74.
12. **Antognoni F., Mandrioli R., Potente G., Taneyo Saa DL et Gianotti A. (2019).** Changes in carotenoids, phenolic acids and antioxidant capacity in bread wheat doughs fermented with different lactic acid bacteria strains. *Food Chem* 292: 211-216.

13. **Araki Y., Mukaisyo K., Sugihara H., Fujiyama Y., and Hattori T., (2010).** Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Oncology Reports*, 24 (4): 869–874.
14. **Araki Y., Sugihara H., et Hattori T., (2006).** In vitro effects of dextran sulfate sodium on a Caco-2 cell line and plausible mechanisms for dextran sulfate sodium-induced colitis. *Oncology Reports* 16: 1357-1362.
15. **Avril J-L, Dabernat H, Denis F, Montiel H, (1992).** Bactériologie clinique, 2^{ème} édition Paris. P 168-171.
16. **Axelsson L. (1998).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S., et Wright A. Eds., Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Functional Aspects*, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York:1-72.
17. **Axelsson L. (2004).** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A., Eds., Lactic Acid Bacteria: *Microbiological and Functional Aspects, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York*, pp 1-67.
18. **Axelsson L.G., Landström E., Goldschmidt T.J., Grönberg A., et Bylund-Fellenius A.C. (1996).** Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* A1 45: 181–191.
19. **Ayad E.H.E., Nashat S., El-Sadek N., Metwaly H. et El-Soda M. (2004).** Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*, 21(6): 715-725.
20. **Ayyash M.M., Abdalla A.K., AlKalbani N.S., Baig M.A, Turner M.S., Liu S.Q., Shah N.P. (2021).** Invited review: Characterization of new probiotics from dairy and non dairy products-Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability. *Journal of Dairy Sciences*. 104:8363-8379.

-B-

21. **Ballouhey Q. (2018).** Etude de la paroi intestinale dans un modèle murin d'interruption intestinale : rôles des cellules du SNE et des cellules neuroendocrines. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges. Français. ffNNT : 2018LIMO0011ff. fftel-02144320f
22. **Barbé F., Ménard O., Gouar Y.L., Buffière C., Famelart M.-H., Laroche B., Feunteun S.L., Dupont D., et Rémond D. (2013).** The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. *Food Chemistry*, 136(3-4): 1203-1212.

23. **Barnett A.M., Roy N.C., McNabb W.C., et Cookson A.L. (2016).** Effect of a Semi-Purified Oligosaccharide-Enriched Fraction from Caprine Milk on Barrier Integrity and Mucin Production of Co-Culture Models of the Small and Large Intestinal Epithelium. *Nutrients* 8 (5): 267.
24. **Baumgart D.C, et Sandborn W.J. (2007).** Inflammatory bowel disease: Clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet* 2007;369 (9573):1641-1657.
25. **Béduneau A., Tempesta C., Fimbel S., Pellequer Y., Jannin V., Demarne F., et Lamprecht A. (2014).** A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87 (2): 290-298.
26. **Behrens I., Stenberg P., Artursson P. et Kissel T. (2001).** Transport of Lipophilic Drug Molecules in a New Mucus-Secreting Cell Culture Model Based on HT29-MTX Cells. *Pharmaceutical Research* 18 (8): 1138-1145.
27. **Benini L., Brighenti F., Castellani G., Brentegani M.T., Casiraghi M.C., Ruzzenente, O., Sembenini C., Caliarì S., Porrini M., et Vantini, I. (1994).** Gastric emptying of solids is markedly delayed when meals are fried. *Digestive Diseases and Sciences*, 39(11), 2288–2294.
28. **Bergey DH., Harrison F., Breed R., Hammer F. (1923).** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1st ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1923.
29. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology., (2004).** Taxonomic Outline of the prokaryotes. *Second edition; Release 05 May 2004.*
30. **Bessaguet F. et Desmoulière A. (2021).** Le pancréas. Fiche physiologie. *Actualités pharmaceutiques*, June 2021; 60 (607) : 55-59.
31. **Bintsis T. (2018).** Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *Aims Microbiol.* 4: 665–684.
32. **Bizzini A., Durussel C., Bille J., Greub G., Prod'homme G. (2010).** Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology.* 48(5):1549–1554.
33. **Blander JM., Longman RS., Iliev ID., Sonnenberg GF., Artis D. (2017).** Régulation de l'inflammation par les interactions du microbiote avec l'hôte. *Nat. Immunol.* 18(8): 851-860. doi: 10.1038/ni.3780.
34. **Blois M.S. (1958).** Antioxidant determination by the use of a stable Free radical. *Nature*, 181: 1199–1200.

35. **Booyesen C., Dicks L.M.T., Meijering I., et Ackermann A. (2002).** Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. *International Journal of Food Microbiology*.76: 63-73.

36. **Boukezzoula N., Chaalel A., Choukri T., Bruneau A., Gérard P., Bouziane N., Yassine N.C., Girbal-Neuhauser E., Riazi A. (2019).** Evaluation of lactase activity in new isolated *Lactobacillus* strains. *South Asian Journal of Experimental Biology*. 8(4): 154-161.

37. **Bringel F, Castioni A, Olukoya DK, Felis GE, Torriani S. (2005).** *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. *nov.*, isolated from vegetable matrices. *Int J Syst Evol Microbiol*; 55:1629–1634.

38. **Bron P.A. et Kleerebezem M. (2018).** Lactic Acid Bacteria for Delivery of Endogenous or Engineered Therapeutic Molecules. *Front. Microbiol.* 9:1821. doi: 10.3389/fmicb.2018.01821

-C-

39. **Cai Y., Ohmomo S., Ogawa M., Kumai S. (1997).** Effect of NaCl-tolerant lactic acid bacteria and NaCl on the fermentation characteristics and aerobic stability of silage. *J Appl Microbiol* 83(3): 307-313.

40. **Cai Z., Wang S., et Li J. (2021).** Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. *Front. Med.* 8:474-765.

41. **Camilleri M., Malagelada J. R., Brown M. L., Becker G., et Zinsmeister A. R. (1985).** Relation between antral motility and gastric emptying of solids and liquids in humans. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 249(5) : G580–G585.

42. **Campeotto F., Waligora-Dupriet A-J., Doucet-Populaire F., Kalach N., Dupont C., Butel M-J. (2007).** Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 31: 533- 542.

43. **Carbonelle E., Beretti J.-L., Cottyn, S., Quesne, G., Berche P., Nassif X., Ferroni A. (2007).** Rapid Identification of Staphylococci Isolated in Clinical Microbiology Laboratories by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* ; 45(7): 2156–2161.

44. **Carbonelle E., Mesquita C., Bille E., Day N., Dauphin B., Beretti J-L., Ferroni A., Gutmann L., Nassif X. (2011).** MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem*; 44(1): 104-109.

45. **Casaburi A., Di Monaco R., Cavella S., Toldrá F., Ercolini D., et Villani F. (2008).** Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiology*. 25 (2):335-347.

46. Chaalel A., Boukezzoula N., Belhocine M., Choukri T., Riazi A. (2017). Antagonistic activity of *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS and some *Bifidobacterium* sp against *Shigella sonnei*. *South Asian J Exp Biol.* 7 (2): 92-99.
47. Chaalel A., Riazi A., Dubois-Dauphin R., Thonart P. (2015). Screening of plantaricin EF and JK in an Algerian *Lactobacillus plantarum* isolate. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 5: 474-482.
48. Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N., Alland D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*; 69(2): 330–339.
49. Charalampopoulos D., Pandiella S.S., Webb C. (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology.* 92:851-859.
50. Charteris WP., Kelly PM., Morelli L., Collins JK. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food. Prot.* 61: 1636-1643.
51. Chen S., Xu Y., Cheng N., Li F., Zhao H., Bai N., El-Seedi H.R., Cao W. (2022). Mitigation of DSS-Induced Colitis Potentially via Th1/Th2 Cytokine and Immunological Function Balance Induced by Phenolic-Enriched Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Bee Pollen Extract. *Foods* 2022. 11(9): 1293.
52. Chen J., Chen X., Ho CL. (2021). Recent development of probiotic bifidobacteria for treating human diseases. *Front Bioeng Biotechnol.* 9:770-248.
53. Chen P.T., Hong Z.S., Cheng C.L., Ng I.S., Lo Y.C., Nagarajan D., Chang J.S. (2020). Exploring fermentation strategies for enhanced lactic acid production with polyvinyl alcohol-immobilized *Lactobacillus plantarum* 23 using microalgae as feedstock. *Bioresour. Technol.* 308:132-266.
54. Cheng K.C., Li C., et Uss A.S. (2008). Prediction of oral drug absorption in humans – from cultured cell lines and experimental animals. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4 (5):581-590.
55. Cherbuy C., Thomas M., et Langella P. (2013). Le microbiote intestinal : une composante santé qui évolue avec l'âge. [Pathologies ou troubles fonctionnels associés à des dysbioses du microbiote intestinal. *Innovations Agronomiques* n° 33: 37-46.
56. Chiang M. L., Chen H. C., Wu C., et Chen M. J. (2014). Effect of acid adaptation on the environmental stress tolerance of three strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Foodborne Pathog. Dis.* 11: 287-294.

57. Cocoran BM, Ross RP, Fitzgerald GF, Dockery P, Stanton C (2006). Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under stressful conditions induced by drying. *Appl Environ Microbiol*, 72:5104-5107.
58. Collins MD., Phillips BA., Zannoni P. (1989). Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *Tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. Nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 39:105-108.
59. Collins YF, McSweeney PLH, Wilkinson MG (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int Dairy J*. 13:841-866.
60. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci*. 70:1-12.
61. Cooper H.S., Murthy S., Kido K., Yoshitake H. et Flanigan A. (2000). Dysplasia And Cancer In The Dextran Sulfate Sodium Mouse Colitis Model. Relevance To Colitis-Associated Neoplasia In The Human: A Study Of Histopathology, B-Catenin And P53 Expression And The Role Of Inflammation. *Carcinogenesis*, 2000. 21(4): 757-768.
62. Cooper H.S., Murthy S.N., Shah R.S., Sedergran D.J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*. 69:238-249.
63. Corfield A.P., Myerscough N., Longman R., Sylvester P., Arul S. and Pignatelli M. (2000). Mucins and Mucosal Protection in the Gastrointestinal Tract: New Prospects for Mucins in the Pathology of Gastrointestinal Disease. *Gut*. 47: 589-594.
64. Corring T., Aumaitre A., (1970). Effet du traitement thermique du tourteau de soja sur la variation de l'équipement enzymatique du pancréas exocrine et les performances pondérales du rat après sevrage. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys*. 10 (3):443-457.
65. Costill D. L., et Saltin B. (1974). Factors limiting gastric emptying during rest and exercise. *Journal of Applied Physiology*. 37(5): 679-683.
66. Coudeyras S., et Forestier C. (2010). Microbiote et probiotiques : impact en santé humaine *Rev. can. microbiol*. doi:10.1139/W10-052 ; Publié par les presses scientifiques du CNRC. 56 : 611–650.
67. Cukrowska B., Motyl I., Kozáková H., Schwarzer M., Górecki R.K., Klewicka E., Slizewska K., Libudzisz Z. (2009). Probiotic *Lactobacillus* strains: in vitro and in vivo studies. *Folia Microbiol* (Praha) 54(6): 533-537.
68. Curk MC., Hubert JC., Bringel F. (1996). *Lactobacillus paraplanatarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. *Int J Syst Bacteriol*. 46:595-598.

- 69. Da Silva S. (2013).** Conséquences d'un stress chronique sur la barrière de mucus intestinal chez le rat : effet du probiotique *Lactobacillus farciminis*. These de Doctorat. Ecole Doctorale SEVAB : Ingénieries microbienne et enzymatique. Université de toulouse. 7 novembre 2013. p 35-40.
- 70. Dal Bello F., et Hertel C. (2006).** Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. *Syst Appl Microbiol.* 29:69-76
- 71. Davis L. E., MacDonald N. C., Palmberg P. W., Riach G. E., et Weber, R. E. (1976).** Adhesion and Adhesives: Science and Technology" 2nd Edition, Eden Prairie, MN, Physical Electronics Industries.
- 72. De Bruyne K., Camu N., De Vuyst L., et Vandamme P. (2009).** *Lactobacillus fabifermentans* sp. nov. and *Lactobacillus cacaonum* sp. nov., isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *Int J Syst Evol Microbiol*; 59:7–12.
- 73. De Man J.D, Rogosa M., et Sharpe M.E (1960).** A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: pp130-135.
- 74. De Roissart H., et Luquet F. M. (1994).** Bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques / coordonnateurs/Editeur / Publisher : Uriage : Lorica. Chemin saint Georges, F-38410 France.
- 75. 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.
- 76. De Vriese Maaike C.b., Vaughan Elaine E., Kleerebezem Michiel c., De Vosa Willem M.b, (2006).** *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal* 16 (2006) 1018–1028.
- 77. Dec M., Puchalski A., Urban-Chmiel R., et al. (2016).** 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiol* 16, p105.
- 78. Dellaglio F, et Felis G.E., (2005).** Taxonomy of lactobacilli and Bifidobacteria. In *Probiotics and prebiotics: Scientific Aspects*, Caister Academic Press, Norfolk, UK. PP: 25-50.
- 79. Dellaglio F., de Roissard H., Torriani S., Curk MC et Janssens D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques* (De Roissard H. et Luquet F.M.). Lorica, Uriage. 1, 25-116.
- 80. Deriouche M. et Zidoune M.N (2015).** Characterisation of a traditional cheese, The Michouna of the Tebessa region, Algéria. *Livestock Research for Rural Development*.

volume27, Article#229. Retrieved July 18,2019, from <http://www.lrrd.org/lrre27/11/meri27229.html>

81. Desnuelle P., Reboud J.-P., Ben abdeljill A., (1962). Influence of the composition of the diet on the enzyme content of rat pancreas in: Ciba Foundation Symposium on the exocrine Pancreas, Churchill F (London), p. 90.

82. Devoize L., et Dallel R. (2010). Salivation In : EMC (Elsevier Masson SAS) Médecine buccale; 28-150-M-10. Disponible sur <http://www.em-premium.com.bases-doc.univ-lorraine.fr/article/189353>

83. Donot F., Fontana A., Baccou JC., Schorr-Galindo S (2012). Exopolysaccharides microbiens : principaux exemples de synthèse, d'excrétion, de génétique et d'extraction. *Glucides. Polyme.* 2012 ; 87 : 951-962.

84. Doran Selena, Jones Karen L., Andrews Jane M., Horowitz Michael (1998). Effects of meal volume and posture on gastric emptying of solids and appetite. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 275(5), R1712–R1718.

85. Drake M., Small C.L., Spence K.D., et Swanson B.G (1996). Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp.in dairy products by using the polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection* 59: pp 1031–1036.

86. Dubernet S., Desmasures N., Gueguen M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letter* 21: pp 271-275.

87. Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan GC., Shanahan F. et Collins JK. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition.* 73, 386-392.

88. Dupin H. (1992). Alimentation et nutrition humaine. Esf Editeur, Paris, Amazon France. 1533 p

89. Düz M., Doğan Y.N., Doğan İ. (2020). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* strains isolated from fermented Turkish Sucuk. *An. Acad. Bras. Cienc.*92,p0105.

-E-

90. Ebel Bruno (2012). Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz. These de titre de Docteur de l'Université de Bourgogne Discipline : Sciences de l'Alimentation - Spécialité : Microbiologie. Université de Bourgogne – AgroSup Dijon Ecole Doctorale Environnement - Santé. France, pp 9-88.

91. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci A, et al. (2017). Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA Journal*. 2017;15(3):177.

92. El-Soda M., El-Wahab HA., Ezzat N., Desmazeaud MJ., Ismail A. (1986). The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli. II. Detection of esterase system of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Lait* 66:431–443.

-F-

93. Falsen E., Pascual C., Sjoden B., Ohlen M., Collins MD. (1999). Phenotypic and phylogenetic characterization of novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1): pp217-221.

94. Fan Y., et Pedersen O. (2021). Microbiote intestinal dans la santé et les maladies métaboliques humaines. *Nat. Rév. Microbiol.* doi : 10.1038/s41579-020-0433-9

95. Fang Z., Hongfei Z., Junyu Z. et al.(2015). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional Chinese cheese. *Ann Microbiol* 65, p:1419–1426.

96. FAO / OMS (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS) .*Working Group Report. Cordoba, Argentina.*

97. FAO–WHO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group, London, Ontario.

98. Fedorak RN., et Madsen KL., (2004). Probiotics and the management of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*;10:286-99

99. Fernandez M.F., Boris S., et Barbés C (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 2003, 94,p: 449–455.

100. Fidanza M., Panigrahi P., Kollmann T.R. (2021). *Lactiplantibacillus plantarum*–Nomad and Ideal Probiotic. *Front. Microbiol.*12, 712-236.

101. Fijan S. (2023). Probiotics and Their Antimicrobial Effect. *Microorganisms*, 11, 528.

102. Flemming H.-C.(2016). EPS-hier et aujourd'hui. *Microorganismes*. 2016 ; 4 :41.

103. Fogh Jørgen; et Germain Trempe. (1975). New Human Tumor Cell Lines ». In Human Tumor Cells in Vitro, *édité par Jørgen Fogh*, 115-159. Springer US. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-1647-4_5.

104. Foster J. W., et Hall H. K. (1991). Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173, 5129–5135.

105. Freney J. (2007). Précis de bactériologie clinique. Paris: Éd. Eska; 2007.

106. Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 1989; 66(5):365–378.

107. Fuller R. (1991). "Probiotics in human medicine." *Gut* 32(4): 439-442.

108. Fuller R., Barrow P.A., et Brooker B.E., (1978). Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 582-591.

-G-

109. Galle S., Schwab C., Dal Bello F., Coffey A., Gänzle MG., Arendt E.K. (2012). Influence des exopolysaccharides synthétisés in situ sur la qualité du pain au levain de sorgho sans gluten. *Int. J. Microbiol alimentaire*. 2012 ; 155 : 105-112.

110. Gänzle MG. (2019). Fermented Foods. In: Doyle MP, Diez Gonzalez F, Hill C. (editors). *Food Microbiol. Fundam. Front*, 5th ed. ASM Press; pp. 855–900.

111. García-Cano Israel; Rocha-Mendoza Diana; Ortega-Anaya Joana; Wang Karen; Kosmerl Erica; Jiménez-Flores Rafael (2019). Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 03(13):5243-5257.

112. Garibyan L., et Avashia N. (2013). Research Techniques Made Simple : Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* mars 2013;133(3):e6.

113. Gaudio E., Taddei G., Vetusch A., Sferra R., Frieri G., Ricciardi G., Caprilli R. (1999). Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Am. J Dig Dis Sci.*; 44:1458–1475.

114. Georgieva R., Yocheva L., Tserovska L., Zhelezova G., Stefanova N., Atanasova A. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnol. Equip.*; 29:84–91.

115. Gevers D., Huys G., et Swings J. (2001). Applicability of rep-PCR finger printing for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 31–36.

- 116. Giraffa G., Lazzi C., Gatti M., Rossetti L., Mora D., et Neviani E. (2002).** Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 163–172.
- 117. Giraffa, G., et Neviani, E. (2000).** Molecular identification and characterisation of food-associated lactobacilli. *Italian Journal of Food Science*, 4, 403–423.
- 118. Girardin M., et Frossard J.-L. (2012).** Place des probiotiques dans le traitement des maladies inflammatoires intestinales. *Rev Med Suisse* 2012 ; Vol.8.p:1674-1678.
- 119. Gobbetti M., et Minervini F.(2014).***Lactobacillus /Lactobacillus casei*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, eds.: Batt C. A. & Tortorello M.L., Elsevier.
- 120. Gonzalez C.J., Encinas J.P., Garcia-Lopez M.L., et Otero A. (2000).** Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*, 17, 383–391.
- 121. Gopal P.K., Prasad J., Smart J., et Gill H.S. (2001).** In Vitro Adherence Properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 Strains and Their Antagonistic Activity against an Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 207-216.
- 122. Grossman M. L., Greengard H., Ivy A. C. (1942) .** The effect of dietary composition on pancreatic enzymes. *Amer. J. Physiol.*, 138, 67-68
- 123. Gueimonde M., et Salminen S. (2006).** New methods for selecting and evaluating probiotics. *Journal of Digestive an Liver Disease* (38): pp S242-S247.
- 124. Guénard H. (2001).** Glandes endocrines. In: Guénard H, editor. *Physiologie humaine .Paris: Pradel; .p.466 – 472.*
- 125. Guidone A., Ianniello R. G., Ricciardi A., Zotta T., et Parente, E. (2013).** Aerobic metabolism and oxidative stress tolerance in the *Lactobacillus plantarum* group. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1713–1722.
- 126. Guiraud JP. (2003).** Microbiologie Alimentaire. Edition : Dunod, Paris, 652p.
- 127. Guo X.H., Kim J. M., et al. (2010).** "Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties." *Anaerobe* 16(4): 321-6.
- H-**
- 128. Halder D., Mandal M., Chatterjee S.S., Pal N.K., Mandal S. (2017).** Indigenous Probiotic *Lactobacillus* Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicines*. 2017 Jun 16; 5(2):31.

129. **Hall L. J., Faivre E., Quinlan A., Shanahan F., Nally K., et Melgar S. (2011).** “Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis,” *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 56, no. 1, pp. 79–89.
130. **Hammes W. P. et Hertel C. (2006).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*; Chapter 1.2.10; In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt, Eds., the Prokaryotes, Vol. 4, 3rd Edition, Springer, York, pp. 320-403.
131. **Hammes W. P., et Vogel R. F.(1995).** The genus *Lactobacillus*. in the genera of Lactic Acid Bacteria. B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel, eds. Springer Publishing. Pages 19–54.
132. **Hamon E., Horvatovich P., Marchioni E., Aoude-Werner D., et Ennahar S.(2014).** Investigation of potential markers of acid resistance in *Lactobacillus plantarum* by comparative proteomics. *J. Appl. Microbiol.* 116, 134–144.
133. **Hansen P.(1968).** Type strains of *Lactobacillus* species. A report by the taxonomic subcommittee on lactobacilli and closely related organisms. pp.76.
134. **Harrigan M.G., et McCane M.E. (1976).** Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, London.
135. **Harrigan W., et McCance M. (1990).** Laboratory Methods in food and Dairy Microbiology, 8th edn. Academic Press, London, UK.
136. **Hatakka K, et Saxelin M. (2008).** Probiotics in intestinal and non-intestinal infectious diseases – clinical evidence. *Curr Pharm Des* 2008; Vol. 14.p.1351–1367.
137. **Havenaar R., et Huis in't Veld J.H.J.(1992).** Probiotics; A General Review' in the Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. In: Wood, B., Ed., Elsevier, London, 151-170.
138. **Hayek Saeed A.,et Ibrahim Salam A. (2013).** Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 4, p 73-87.
139. **Heda R, Toro F, Tombazzi CR. (2022).** Physiology, Pepsin. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL);. PMID: 30725690.
140. **Hermansson G., et Sivertsson R. (1996).** Gender-related differences in gastric emptying rate of solid meals. *Digestive Diseases and Sciences*, 41(10), 1994–1998.
141. **Hertz A. F. (1910).** The motor functions of the stomach. *QJM: An International Journal of Medicine*, 3(4), 373–394.
142. **Heunis T., Deane S., Smit S., et Dicks L. M. (2014).** Proteomic profiling of the acid stress response in *Lactobacillus plantarum* 423. *J. Proteome Res.* 13, 4028–4039.

143. Hickey M.W., Hillier A.J., Jago G.R. (1983). Metabolism of pyruvate and citrate in lactobacilli. *Aust J Biol Sci* 36, 487-496.
144. Hilario E. (2007). Overview of hybridization and detection techniques. *Methods Mol Biol.* 2007; 353:27- 38.
145. Hill MJ.,et Marsh PD. (1990). Human microbial ecology. *CRC press.* PP. 57-69.
146. Hofvendhal K., et Hahn-Hagerdal B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources (1). *Enzyme Microbiology and Technology*, 26: pp 87-107.
147. Hojsak I, Fabiano V, Pop TL, Goulet O, et al. (2018). Guidance on the use of probiotics in clinical practice in children with selected clinical conditions and in specific vulnerable groups. *Acta Paediatr.* 107: 927-37.
148. Hong S.-I., Kim Y.-J., Pyun Y.-R. (1999). Tolérance acide du *Lactobacillus plantarum* du Kimchi. *LWT Food Sci. Technologie.* ; 32 : 142-148.
149. Huang R., Pan M., Wan C., Shah N. P., Tao X., et Wei, H. (2016). Physiological and transcriptional responses and cross protection of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 under acid stress. *J. Dairy Sci.* 99, 1002–1010.
150. Hudault S., Lievin V., Bernet-Camard M.F.,et Servin A.L. (1997). Antagonistic Activity Exerted in Vitro and in Vivo by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 Infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 513-518.
151. Huet C., Sahuquillo-Merino C., Coudrier E., et Louvard D. (1987). Absorptive and Mucus-Secreting Subclones Isolated from a Multipotent Intestinal Cell Line (HT-29) Provide New Models for Cell Polarity and Terminal Differentiation. *The Journal of Cell Biology* 105 (1): 345-357.
152. Hunt J. M., Smith J. L., et Jiang C. L. (1985). Effect of meal volume and energy density on the gastric emptying of carbohydrates. *Gastroenterology* 89: 1326–1330.
153. Hutkins Robert W., et Nannen Nancy L., (1993). "PH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria" Faculty Publications in *Food Science and Technology.* 28. <https://digitalcommons.unl.edu/foodsciefacpub/28>
154. Hutkins RW. (2019). Microbiology and technology of fermented foods, 2nd. Chigaco, IL: IFT Press;
155. Huybens N., Mainil J., Marnier D. (2009). Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. *Annales de médecine vétérinaire.* 2009;(153):112- 28.

156. Hyronimus B., Le Marrec C., HadjSassi A., Deschamps A., (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 193–197.

-I-

157. Iorizzo M., Albanese G., LetiziaF., TestaB., TremonteP., VergalitoF., LombardiS.J., Succi M., Coppola R., Sorrentino E. (2022). Probiotic Potentiality from Versatile *Lactiplantibacillus plantarum* Strains as Resource to Enhance Freshwater Fish Health. *Microorganisms*; 10 (2) p .463.

158. Iorizzo M., Testa B., Lombardi SJ., Ganassi S., Ianiro M., Letizia F., Succi M., Tremonte P., Vergalito F., Cozzolino A., Sorrentino E., Coppola R., Petrarca S., Mancini M., De Cristofaro A. (2020) Antimicrobial Activity against *Paenibacillus larvae* and Functional Properties of *Lactiplantibacillus plantarum* Strains: Potential Benefits for Honeybee Health. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Jul 24; 9(8):442.

159. Ishioka T., Kuwabara N., Oohashi Y. et al (1987). Induction of colorectal tumors in rats by sulfated polysaccharides. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 17, 215-244.

160. Isolauri E., Sütas Y., Kankaanpää P., Arvilommi H., Salminen S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition.*;73(2):444S–450S.

-J-

161. Jagota Anand et Bennison Stephen J. (2002). Mechanics of Adhesion through a Fibrillar Microstructure. *Integrative and Comparative Biology*, 42(6), 1140–1145.

162. Jancek S. (1997). Famille α -amylase: biologie moléculaire et évolution. *Programme. Biophys. Mol. Biol.* 67 67–97.

163. Jensen H., Roos S., Jonsson H., Rud I., Grimmer S., van Pijkeren J. P., et al. (2014). Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus in vitro. *Microbiology* 160, 671–681.

164. Jeyagowri N., Ranadheera C.S., Manap M.Y., Gamage A., Merah O., Madhujith T. (2023). Phenotypic Characterisation and Molecular Identification of Potentially Probiotic *Lactobacillus* sp. Isolated from Fermented Rice. *Fermentation* 2023, 9, 807.

165. Jiang H., Tang X., Zhou Q., Zou J., Li P., Breukink E., et al. (2018). Plantaricin NC8 from *Lactobacillus plantarum* causes cell membrane disruption to *Micrococcus luteus* without targeting lipid II. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7465–7473.

166. Jiang M., Zhang F., Wan C., Xiong Y., Shah N.P., Wei H., Tao X., (2016). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *J. Dairy Sci.*99, 1736–1746.

167. Jin L.Z., Ho Y.W., Ali M.A., Abdullah N., Ong K.B., et Jalaludin S. (1996). Adhesion of Lactobacillus isolates to intestinal epithelial cells of chicken. *Letters in Applied Microbiology* 1996, 22, p: 229-232

168. Johansson MEV., Gustafsson JK., Sjöberg KE., Petersson J., Holm L., et al. (2010) Bacteria Penetrate the Inner Mucus Layer before Inflammation in the Dextran Sulfate Colitis Model. *PLoS ONE* 5(8): e12238. doi:10.1371/journal.pone.0012238

169. Jose N.M., Bunt C.R., Hussain M.A. (2015). Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*. 3:198-212. Doi: 10.3390/microorganisms3020198.

-K-

170. Kacimi S. (2013). Food Dependence in Algéria: of Milk Powder versus local production, what Evolution? Mediterranean Journal of Social Sciences MCSER Publishing, Rome -Italy4:11.

171. Kamada N., Chen GY., Inohara N., Núñez G. (2013). Contrôle des agents pathogènes et des pathobiontes par le microbiote intestinal. *Nat. Immunol.* doi: 10.1038/ni.2608

172. Kandler O., et Weiss N (1986). Genus Lactobacillus Beijerinck 1901, 212 AL. In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol 2, Baltimore, Williams & Wilkins, p. 1209-1234.

173. Kato K., Mizuno S., Umesaki Y., Ishii Y., Sugitani M., Imaoka A., et al. (2004). Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20(10): 1133–1141.

174. Kaushik J. K., Kumar A., Duary R. K., Mohanty A. K., Grover S., et Batish V. K. (2009). Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of Lactobacillus plantarum. *PLoS ONE* 4:e8099. doi: 10.1371/journal.pone.0008099

175. Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N., Fakiri E.M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutr.* 2013 Jan 2;:481651.

176. Kechaou Larguèche Noura (2012). Identification de nouvelles souches probiotiques à propriétés immuno-modulatrices et anti-oxydantes. Sciences agricoles. These de Doctorat en sciences. Université Paris Sud - Paris XI., Français, pp 37-80.

177. Khan I., Ullah N., Zha L., Bai Y., Khan A., Zhao T., Che T., et Zhang C. (2019). Altération du microbiote intestinal dans les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) : cause ou conséquence ? Traitement des MICI ciblant le microbiome intestinal. *Pathogen.MDPI*. 8(3): 126. doi: 10.3390/pathogens8030126

178. Kieliszek M., Pobiega K., Piowarek K., Kot A.M. (2021). Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules* 2021. 26: 1858.
179. Kitajima S., Morimoto M., Sagara E., Shimizu C., et Ikeda Y. (2001). Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice," *Experimental Animals*. 50 (5): 387-395.
180. Klaenhammer T.R., Barrangou R., Buck B.L., Azcarate-Peril M.A. et Altermann E. (2005). Genomic Features of Lactic Acid Bacteria Effecting Bioprocessing and Health. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 393-409.
181. Kleiveland C.R. (2015). Chapter 5: Peripheral Blood Mononuclear Cells. In *The Impact of Food Bioactives on Health*, édité par Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, et Harry Wichers,. *Springer International Publishing*. 161-167doi:10.1007/978-3-319-16104-4_15.
182. Koll P., Mandar R., et Smidt I., Hütt P., Truusalu K., Mikelsaar R-H., Shchepetova J., Krogh-Andersen K., Marcotte H., Hammarström L, Mikelsaar M. (2010). Screening and evaluation of human intestinal lactobacilli for the development of novel gastrointestinal probiotics. *Curr Microbiol* 61(6): 560-566.
183. Korcz E., Kerényi Z., Varga L. (2018). Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: Potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. *Food & Function*, 9 (2018), pp. 3057-3068.
184. Krieger-Weber Sibylle (2022). *Lactiplantibacillus plantarum*, un outil polyvalent pour la désacidification biologique. Série de conférences IVES, IVAS 2022. <https://ives-openscience.eu/14559/>
185. Kühnel W. (1998). Appareil digestif. Atlas de poche d'Histologie. Paris: p 250-320.
186. Kullmann F., Messmann H., Alt M., Gross V., Bocker T., Scholmerich J., Ruschoff J. (2001). Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *Int. J. Colorectal Dis*. 16: 238-246.
187. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Geneics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol*. 35: 1547-1549.
188. Kunji E.R.S., Mierau I.A., Poolman B., Konings W.N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 1996. 70: 187-221.

-L-

189. Lacour B., et Belon JP. (2015). Physiologie du système digestif. In: Lacour B, Belon JP , editors. Physiologie. Issy-lesMoulineaux: Elsevier Masson. 2015. 225-258.

- 190. Lamoril J., Ameziane N., Deybacha J.C., Bouizegarènea P., Bogard M (2008).** Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie DNA sequencing technologies : A revolution in motion. *Part one J. Immuno-analyse et biologie spécialisée*. 23: 260-279.
- 191. Larpent J.P. et Larpent-Gourgaud M. (1997).** Mémento technique de microbiologie : micro-organismes eucaryotes et procaryotes, structure, métabolisme, systématique, applications industrielles, milieux de culture et réactifs. Tec & Doc Lavoisier, 1039 pages.
- 192. Larpent S.P (1997).** Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire; lavoisier, Paris. Edition technologie et Documentation, pp 10-72.
- 193. Leclaire S. (2008).** Digestion et absorption des nutriments. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 43(1):45-50.
- 194. Lee H. A., Bong Y.J., Kim H., Jeong J.K., Kim H.Y., Lee K.W., et Park K.Y. (2015).** Effect of nanometric Lactobacillus plantarum in kimchi on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J. Med. Food*. 18:1073-1080.
- 195. Lee H.S., Han S.Y., et Bae E-A., Huh C-S., Ahn Y-T., Lee J-H., Kim D-H. (2008).** Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice. *Int Immunopharmacol*. 8(4): 574-580.
- 196. Lee Y.K., et Salminen S., (1995).** The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol*. 6: 241-245.
- 197. Lenoir L., Rossary A., Joubert-Zakeyh J., Vergnaud-Gauduchon J., Farge MC., Fraisse D., Texier O., Lamaison J-L., Vasson M-P., Felgines C., (2011).** Lemon Verbena Infusion Consumption Attenuates Oxidative Stress in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in the Ra. *Dig Dis Sci* (2011) 56: 3534-3545.
- 198. Leonard F., Collnot E-M., et Lehr C-M. (2010).** A Three-Dimensional Coculture of Enterocytes, Monocytes and Dendritic Cells to Model Inflamed Intestinal Mucosa in Vitro. *Molecular Pharmaceutics* 7 (6): 2103, 19. Doi: 10.1021/mp1000795.
- 199. Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B., (1991).** La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro- alimentaires. 2 ème Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3: 2-40.
- 200. Lilly DM., et Stillwell RH. (1965).** "Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms." *Science* 147(3659): 747-748.
- 201. Lin H. C., Elashoff J. D., Yo-guo G.U., Meyer J. H. (1992).** Effect of meal volume on gastric emptying., *Neurogastroenterology and Motility*, 4(3): 157-163. doi:10.1111/j.1365-2982.1992.tb00156.x

- 202. Lin Wen-Hsin; Yu Bi; Jang Sheng-Hon; Tsen Hau-Yang (2007).** Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *j.anaerobe* , 13(3-4): 107-113. doi:10.1016/j.anaerobe.2007.04.006.
- 203. Litopoulo-Tzanetaki E., et Tzanetakis N., (2011).** Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research* 101 (1-3): 17-32.
- 204. Liu M., Bayajanov J.R., Renckens B., Nauta A et Siezen R.J (2012).** The protéolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *Genomics* 11:36.
- 205. Liu Xj., Yu R., et Zou Kf. (2019).** Probiotic Mixture VSL#3 Alleviates Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis in Mice by Downregulating T Follicular Helper Cells. *CURR MED SCI* 39, 371–378.
- 206. Looijesteijn P.J., Lionel Trapet; Eric de Vries; Tjakko Abee; Jeroen Hugenholtz (2001).** Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*., *Int J Food Microbiol* ; 64(1-2), 71–80.
- 207. Louail R. (2022).** Invasion de l'épithélium intestinal par des bactéries commensales du microbiote et impact sur la physiologie intestinale. Thèse de Doctorat. Université de Normandie. France; p: 148-150.
- 208. Lyhs U., Korkeala H., et Bjorkroth J. (2002).** Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout using ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 147–153.

-M-

- 209. Machiels K., Joossens M., Sabino J., et al. (2014).** A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 63:1275-83.
- 210. Mack D.R., Michail S., Wei S., McDougall L. et Hollingsworth M.A. (1999)** Probiotics Inhibit Enteropathogenic *E. coli* Adherence in Vitro by Inducing Intestinal Mucin Gene Expression. *American Journal of Physiology*, 276, G941-G950.
- 211. Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S. and Hollingsworth, M.A. (2003).** Extracellular MUC3 Mucin Secretion Follows Adherence of *Lactobacillus* Strains to Intestinal Epithelial Cells in Vitro. *Gut*, 52, 827-833.
- 212. Magro F., Rodrigues A., Vieira A.I., et al. (2012).** Review of the disease course among adult ulcerative colitis population-based longitudinal cohorts. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 573–83
- 213. Majamaa, H.; Isolauri, E. J. (1997).** Probiotics: A novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin. Immunol.* 99,p: 179-85.

214. **Manero A., et Blanch A. R. (2002).** Identification of Enterococcus spp. based on specific hybridisation with 16S rDNA probes. *Journal of Microbiological Methods*, 50, 115–121.
215. **Mangia N.P., Saliba L., et Deiana P. (2019).** Functional and safety characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* FS103 isolated from sheep cheese and its survival in sheep and cow fermented milks during cold storage. *Annals of Microbiology*, 69:161-170.
216. **Mao Y., Horvath P., Chen M. (2015).** *Lactobacillus herbarum* sp. nov., a species related to *Lactobacillus plantarum*. *Int J Syst Evol Microbiol*; 65:4682-4688.
217. **Marilley L., et Casey M.G (2004).** Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90(2): 139-159.
218. **Marroki A., Zuniga M., Kihal M., Martinez G. (2011).** Characterization of *Lactobacillus* from Algeriangoats's milk based on phenotypic, 16SrDNA Sequencing and their technological properties. *Braz. J. Microbiol.*42: 58–171.
219. **Martinez-Guryn K., Hubert N., Frazier K., Urlas S., Musch MW, Ojeda P., et Pierre J.F., Miyoshi J., Sontag T.J., Cham CM., Reardon CA., Leone V. et Chang EB. (2018).** Small Intestine Microbiota Regulate Host Digestive and Absorptive Adaptive Responses to Dietary Lipids. *Microbe hôte cellulaire. j.chom* 23(4):458-469.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.03.011
220. **Masui M., Onishi H., et Unemoto T. (1979).** Halophilic Microorganismes., Tokyo: Yishiyakusyupan pp. 313-348.
221. **Mayeux J.V., Sandine W.E., et Elliker P.R. (1962).** A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Science*, 45: 655-656.
222. **Mäyrä-Mäukinen A., Mnninen M., Gyllenberg H. (1983)** .The adherence of lactic acid bacteria to the columnar epithelial cells of pigs and calves, *Journal of Applied Bacteriology*, 55 (2): 241–245.
223. **McLeod A., Nyquist O L., Snipen L, Naterstada K and Axelssona L (2008).** Diversity of *Lactobacillus sakei* strains Investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and Applied Microbiology*. 31:393-403.
224. **McMillan Donald B., et Harris Richard J., (2018).** in An Atlas of Comparative Vertebrate Histology, *Diagnostic and Translational Research Guide* 2018, Pages ix-xxix
225. **McSweeney P., et Sousa M. (2000).** Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait* 80: 293–324.

226. Meng Zhaoxu; Zhang Lanwei; Xin Liang; Lin Kai; Yi HuaXi; et Han Xue (2018). Technological characterization of Lactobacillus in semihard artisanal goat cheeses from different Mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria; *J. Dairy Sci.* 101:2887–2896.
227. Mennigen R., NolteK., et al. (2009). "Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296(5): G1140-1149.
228. Mercenier A., Pavan S., Pot B. (2003). Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design* 9(2): pp 175-191.
229. Metchnikoff E. (1907). The prolongation of life: Optimistic studies. G. P. Putnam & Sons, London. UK
230. Milani C., Duranti S., Bottacini F., Casey E., Turrone F., Mahony J., Belzer C., Delgado Palacio S., Arbolea Montes S., Mancabelli L., Lugli G.A., Rodriguez J.M., Bode L., de Vos W., Gueimonde M., Margolles A., van Sinderen D., Ventura M. (2017). The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 81:e00036-17.
231. Mileti E., Matteoli G., Iliev I. D., et Rescigno M. (2009). Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: Prediction for in vivo efficacy. *PLoS ONE* 4:e7056.
232. Mimura T., Rizzello F., Helwig U., Poggioli G., Schreiber S., Talbot I.C., Nicholls R.J., Gionchetti P., Campieri M., Kamm MA. (2004). Once Daily High Dose Probiotic Therapy For Maintaining Remission In Recurrent Or Refractory Pouchitis. *Gut*: (53), p.108-114.
233. Miyauchi E., Morita H., et al. (2009). *Lactobacillus rhamnosus* alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase in vivo. *J Dairy Sci* 92(6): 2400-8.
234. Moal V.L.L., et Servin A.L. (2006). The Front Line on Enteric Host Defence against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides and Microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 315-337.
235. Mohamad N., Manan H., Sallehuddin M., Musa N., Ikhwanuddin M. (2020). Screening of Lactic Acid Bacteria Isolated from Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium Rosenbergii*) as Potential Probiotics. *Aquac. Rep.*, 18, 100523.
236. Mohammed M., Abd El-Aziz H., Omran N., Anwar S., Awad S., El-Soda M. (2009) Rep-PCR characterization and biochemical selection of lactic acid bacteria isolated from the Delta area of Egypt. *Intern. J. Food Microbiol.* 2009, 128, 417–423.

237. Mokoena M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(8), 1255.

238. Moore J.G., Christian P. E., Brown J. A., Brophy C., Datz F., Taylor A., et Alazraki N. (1984). Influence of meal weight and caloric content on gastric emptying of meals in man. *Digestive Diseases and Sciences*, 29(6), 513–519.

239. Mörbe U.M., Jørgensen P.B., Fenton T.M., vonBurg N., Riis L.B. , Spence J. , Agace W.W. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure and function. *Mucosal Immunol.*, 14 (4) pp. 793-802.

240. Moroni O. (2007). Contribution à l'étude des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections entériques à *Listeria monocytogenes* : analyse in vitro et étude in vivo des mécanismes d'action antimicrobien. University of Laval, Canada. PhD Thesis.

-N-

241. Nacef M., Chevalier M., Chollet S., Drider D., Flahaut C. (2016). MAL-DI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *Int. J. Food Microbiol.* 247, 2–8.

242. Nanda Kumar N. S., et Balamurugan R., et al. (2008). "Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis in mice administered dextran sodium sulfate." *J Gastroenterol Hepatol* 23(12): 1834-9.

243. Nannen NL., et Hutkins RW (1991). Activité de l'adénosine triphosphatase à translocation de protons chez les bactéries lactiques. *J. Dairy Sci.* 1991 ; 74 : 747-751.

244. Neefs J.M., Van de Peer Y., De Rijk P., Chapelle S., et De wachter R.(1993). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research.* 21: pp 3025-3049.

245. Nobaek S., Johansson M.L., Molin G., Ahrne S., et Jeppsson B. (2000). Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *American Journal of Gastroenterology*, vol.95.p. 1231-1238.

246. Nomura M., Kobayashi M., et Okamoto T. (2002). Rapid PCR-based method which can determine both phenotype and genotype of *Lactococcus lactis* subspecies. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2209–2213.

247. Novel G (1993). Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. et Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374.

248. Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaidr J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W., Backhaus H. (1996). Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in *Paenibacilluspolymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *J. Bacteriol.*, 178, 5636–5643.

-O-

249. Oberg Taylor S., McMahon Donald J., Culumber Michele D., McAuliffe Olivia, and Oberg Craig J. (2022). Invited review: Review of taxonomic changes in dairy-related lactobacilli. *Journal of Dairy Science* Vol. 105 No. 4, 2022; 105:2750–2770.

250. Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa t., Inagaki Y., Nakaya R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694–702.

251. O'Mahony L., McCarthy J., Kelly P., Hurley G., Luo F., Chen K., O'Sullivan G.C., Kiely B., Collins J.K., Shanahan F., et Quigley E.M.,(2005). *Lactobacillus* and Bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profile. *Gastroenterology*, Vol.128.p.541-551.

252. Orla- Jensen S. (1916). Maelkeri- Bakteriologi.

253. Orla- Jensen S. (1919). The lactic acid bacteria. Copenhagen: Andr Fred Høst and Son; 1919.

254. Osuntoki A., et Korie I. (2010). Antioxidant Activity of Whey from Milk Fermented with *Lactobacillus* Species Isolated from Nigerian Fermented Foods. *Food Technol Biotechnol* 48(4): 505-511.

255. Ouwehand A. C., et Vesterlund S. (2003). "Health aspects of probiotics." *Drugs* 6: 573-580.

256. Ouwehand A.C., Tölkö S., et Salminen S. (2001). The Effect of Digestive Enzymes on the Adhesion of Probiotic Bacteria In Vitro. *J. Food Sci.* 66, 856–859.

-P-

257. Padmavathi T., Bhargavi R., Priyanka Purushothama R., Niranjana N.R et Pavitra P.V (2018). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its purification. *J Genet EnG Biotechnol*, 16 (2): 357-362.

258. Pascal V., Pozuelo M., Borrueal N., Casellas F., Campos D., Santiago A., Martinez X., Varela E., Sarrabayrouse G., Machiels K., Vermeire S., Sokol H., Guarner F., Manichanh C. (2017). A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*.66 (5):813-22.

259. Patel S., Majumder A., et Goyal A. (2012). Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. Review article. *Indian J Microbiol* 52(1):3–12.

260. **Pedersen K., et Tannock GW. (1989).** Colonization of the porcine gastro intestinal tract by Lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*; 55: 279–83.
261. **Petti CA., Polage CR., Schreckenberger P. (2005).** The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. *J Clin Microbiol.* déc 2005;43(12):6123- 5.
262. **Pfeiler E.A., et Klaenhammer T.R. (2009).** Role of Transporter Proteins in Bile Tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*75, 6013–6016.
263. **Pinto M.G.V., Franz C.M., Schillinger U., Holzapfel W.H. (2006).** Lactobacillus spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 205–214.
264. **Pitino I., Randazzo C.L., Mandalari G., Lo Curto A., Faulks R.M., Le Marc Y., Bisignano C., Caggia C., Sean M., et Wickhamb J. (2010).** Survival of Lactobacillus rhamnosus strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiology* 27 (8) 1121-1127.
265. **Pocock G., et Richards C.D. (2004).**"Intestin et nutrition." Physiologie humaine, les fondements de la médecine. Paris: p 399-444.
266. **Pogačić T., Maillard M-B., Leclerc A., Hervé C., Chuat V., Alyson Y.L., Valence F. et Thierry A. (2015).** A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiology*, 46:145–153.
267. **Poitrase et houdea (2002).** La PCR en temps réel : principes et applications. *Revue biologie et biotechnologie (2) :2-11*
268. **Prantera C., Scribano M L., Falasco G., Andreoli A., Luzi C. (2002).** Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with Lactobacillus GG. *Gut*, 51(3), 405–409.
269. **Prescott L.M., Harley J.P., et Donald A. (2003).** Microbiologie, De boeck université, 2eme édition française. 128 : 28-29.
270. **Prete R., Alam M.K., Perpetuini G., Perla C., Pittia P., Corsetti A. (2021).** Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides Producers: A Sustainable Tool for Functional Foods. *Foods* 2021, 10, 1007-1653.
271. **Putranto W.S., Suhartono M.T., Kusumaningrum H.D., Giriwono P.E., Mustopa A.Z. (2020).** A novel rennin like protease from Lactobacillus plantarum 1.13 isolated from Indonesian fermented meat (Bakasam), *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (2020),p.101-818.

272. Qiao N., Wittouck S., Mattarelli P., Zheng J., Lebeer S., Felis GE., et Gänzle MG. (2022). After the storm—Perspectives on the taxonomy of Lactobacillaceae. *Symposium Review; Future of Probiotics Webinar, American Dairy science association, JDS Communications*®2022. 3(3):222–227.

273. Qin J., Li R., Raes J., et al. (2010). A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing. *Nature*, 464, 59-65.

274. Quinto EJ., Jiménez P., Caro I., Tejero J., Mateo J. et Girbés T. (2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. Scientific research. *Food and Nutrition Sciences*, 5:1765-1775.

-R-

275. Rajca S. (2015). Conséquences physiopathologiques de la dysbiose associée aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, Français. ffNNT : 2015PA066188ff. fftel-01214956f

276. Rastall R. A. (2004). "Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance." *Journal of Nutrition* 134(8): 2022-2026.

277. Reed K. K., et Wickam R. (2009). "Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro." *Seminars in oncology nursing* 25(1): 3-14.

278. Ren D., Li C., Qin Y., Yin R., Du S., Ye F., Liu C., Liu H., Wang M., Li Y., et al. (2014). In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*.;30:1–10.

279. Reque E.F., Pandey A., Franco S.G., et Soccol C.R. (2000). Isolation, identification and physiological study of lactobacillus fermentum lpb for use as probiotic in chickens. *Brazilian Journal of Microbiology*. vol31n4.

280. Reveron I., de Las Rivas B., Munoz R., et Lopez de Felipe F. (2012). Genome-wide transcriptomic responses of a human isolate of *Lactobacillus plantarum* exposed to p-coumaric acid stress. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 1848–1859. doi: 10.1002/mnfr.201200384

281. Rochat T., Bermudez-Humaran L., Gratadoux J-J., Fourage1 C., Hoebler C., Corthier G., et Langella P. (2007). "Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice." *Microb Cell Fact* 6: 22.

282. Rodríguez-Ramiro I., Ramos S., Elvira L-O., Agis-Torres A., Bravo L., Goya L., et Martín M.A. (2013). Cocoa polyphenols prevent inflammation in the colon of azoxymethane-treated rats and in TNF- α -stimulated Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition* 110 (02): 206–215.

283. Rogosa M., Franklin JG., et Perry KD., (1961).Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of *Lactobacillus* subsp. *Journal of General Microbiology*, 24: pp 473-482.

284. Roux V., et Rolain JM. (2014). Identification des bactéries par biologie moléculaire. *EMC - Maladies infectieuses*.11(1):1- 11.

285. Ruiz Rodríguez L.G., Mohamed F., Bleckwedel J., Medina R., De Vuyst L., Hebert, E. M., et Mozzi F. (2019). Diversity and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Wild Fruits and Flowers Present in Northern Argentina. *Frontiers in microbiology*, 10, 1091.

-S-

286. Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. ; 84(3):197–215.

287. Saavedra J.M., Bauman N.A., Perman J.A., Yolken R.H., Saavedra J.M., Bauman N.A., Oung I. (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet*, 344(8929), 1046–1049.

288. Saitou N., et Nei M. (1987).The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4,406–425.

289. Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos W.M. (1998). Demonstration of safety of probiotics – a review, *Int. J.Food Microbiol.* 44: 93-106.

290. Samelis J., Maurogenakis F., Metaxopoulos J. (1994). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int J Food Microbiol*, 23(2), 179–196.

291. Sanders M. (2001). In *Probiotics, Prebiotics and new Foods*:Rome, Italy, pp. 27-30.

292. Sanlibaba P (2016). Production d'exopolysaccharides Cakmak GA par des bactéries lactiques. *Appl. Microbiol. Accès libre*. 2016 ; 2 : 451-469.

293. Santos Rocha C, Lakhdari O, Blottiere HM, Blugeon S, Sokol H, et al. (2012) Anti-inflammatory properties of dairy lactobacilli. *Inflamm Bowel Dis* 18: 657–666.

294. Sauget M (2016). Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF : application aux principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales; Thèse de doctorat en Sciences de la vie et de la santé. Bactériologie. Université de France-Compté (<http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01558289/document>.)

295. **Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006)** .Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 394–406.
296. **Schleifer K. H., et Ludwig, W. (1995)**.Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System Appl Microbiol* 18: pp 461-467.
297. **Schreck B.A., Gregory P.J., et al. (2017)**. Probiotics for the Treatment of Infantile Colic: A Systematic Review. *J Pharm Pract*; 30: 366-374.
298. **Schroeder BO., et Bäckhed F. (2016)**. Signaux du microbiote intestinal aux organes distants en physiologie et maladie. *Nat. Méd.* doi: 10.1038/nm.4185
299. **Selvamani S., Vijay M., El Enshasy H.A., Thevarajoo S., El Adawi H., Zeini I., Pham K., Varzaks T., Abomoela KB., (2022)**. Efficacy of Probiotics-Based Interventions as Therapy for Inflammatory Bowel Disease: A Recent Update *Shanmugaprakasham Saudi Journal of Biological Sciences.* 29 (5):3546-3567.
300. **Seme H., Gjuracic K., Kos B., Fujs S., Stempelj M., Petkovic H., et al. (2015)**. Acid resistance and response to pH-induced stress in two *Lactobacillus plantarum* strains with probiotic potential. *Benef. Microbes* 6, 369–379.
301. **Sensoy Ilkay (2021)**. Review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Curr. Res. Food Sci.*, 4, 308–319.
302. **Serteyn D., Grulke S., Franck T., Mouithys-mickalad A., Deby-dupont G. (2003)**. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann.Méd.Vet.* 147, pp79-93.
303. **Servin A.L. (2004)** Antagonistic Activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against Microbial Pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 405-440.
304. **Sharpe M E (1979)**. Identification of the lactic acid bacteria. In: Identification Methods for Microbiologists. In: Skinner, F. A. and D. W. (Eds). London: Academic Press.pp. 233-259.
305. **Shockey W.L., Borger D.C. (1991)**. Effect of Salt on Fermentation of Alfalfa. 2. Treatment with Sodium Chloride, *Clostridium butyricum*, and Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 74(1), pp.160–166.
306. **Siezen R.J et Hylckama Vlieg J.V(2011)**.Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. Siezen and van Hylckama Vlieg *Microbial Cell Factories*, 10, 1-13.
307. **Silbernagl S., et Despopoulos A. (2008)**. Digestion. In: Silbernagl S.; Despopoulos A.; editors. *Atlas de poche de physiologie.* Paris: Flammarion. p. 228– 68

308. Sokol H., Pigneur B., Watterlot L., Lakhdari O., Bermudez-Humaran L.G., Gratadoux J.J., Blugeon S., Bridonneau C., Furet J.P., Corthier G., Grangette C., Vazquez N., Pochart P., Trugnan G., Thomas G., Blottière H.M., Doré J., Marteau P., Seksik P., Langella P., (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an antiinflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105,pp16731-16736.
309. Sokol H., Seksik P., Rigottier-Gois L., Lay C., Lepage P., Podglajen I., Marteau P., et Dore J.I. (2006). Specificities of the Fecal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease *Inflamm Bowel Dis*; Volume 12, Number 2, p 106-111.
310. Song M.W., Jang H.J., Kim K.T. et Paik H.D. (2019). Probiotic and Antioxidant Properties of Novel Lactobacillus brevis KCCM 12203P Isolated from Kimchi and Evaluation of Immune-Stimulating Activities of Its Heat-Killed Cells in RAW 264.7 Cells. *J Microbiol Biotechnol* 29(12): 1894-1903.
311. Steidler L., Hans w., Schotte L., Neiryneck S., Obermeier F., Falk W., Fiers W., et Renaut E. (2000). Treatment of murine colitis by *Latococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, vol.289.p.1352-1355.
312. Stiles ME, Holzapfel WH (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29.
313. Štofilová J., Kvaková M., Kamlárová A., Hijová E., Bertková I., Guľašová Z. (2022). Probiotic-Based Intervention in the Treatment of Ulcerative Colitis: Conventional and New Approaches. *Biomedicines*. Sep 9;10(9): 2236.
314. Sui X., Wang K., Gluchowski N. L. et al. (2020). Structure and catalytic mechanism of a human triacylglycerol-synthesis enzyme. *Nature*, vol. 581, no. 7808, pp. 323–328.
- T-
315. Tailliez P. (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitat, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques*. 6(1): 35-41.
316. Te Velde Anje A., Marleen I. Verstege , Daniel W. Hommes (2006). Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 12(10): 995–999.
317. Temmerman R., Huys G., et Swings J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: Culture dependent and culture independante methods. *Trends in food Sfcience &technologiy* , 15: 348–359.
318. Tiihonen K., Ouwehand A.C., Rautonen N. (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews* 9, 107-116.

319. Tomas J., Sansonetti P. (2017). Dialogue hôte-microbiote : interaction entre microbiote et épithélium intestinal. In: Le microbiote intestinal : un organe à part entière. p. 55–64.

320. Torres J., Billioud V., Sachar D.B., Peyrin-Biroulet L., Colombel J-F. (2012). Ulcerative colitis as a progressive disease: the forgotten evidence. *Infl amm Bowel Dis* 2012; Vol. 18. p.1356–1363

321. Tsuge Y., Kawaguchi H., Sasaki K., Tanaka T., Kondo A. (2014). Two-step production of D-lactate from mixed sugars by growing and resting cells of metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 98:4911–4918.

322. Tynkkynen S., Singh K.V., Varmanen P. (1998). Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. *Int. J. Food Microbiol.* 1998; 41:195–204.

-U-

323. Ungaro R., Mehandru S., Allen P.B., Peyrin-Biroulet L., Colombel J-F. (2016). Ulcerative colitis. Seminar; Division of Gastroenterology (R Ungaro MD, S Mehandru MD, Prof J-F Colombel MD) and Immunology Institute (S Mehandru), Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA; Division of Gastroenterology, Ulster Hospital, Belfast, Northern Ireland, UK (PB Allen MD); and Department of Gastroenterology, University Hospital of Nancy-Brabois, Vandoeuvre-les-Nancy, France (Prof L Peyrin-Biroulet MD). Published online November 30, 2016 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32126-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2)

324. Upadhyaya B.P., DeVeaux L.C., Christopher L.P. (2014). Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production. *Trends Biotechnol* 32:637–644.

-V-

325. Vaccalluzzo A., Pino A., Angelis M.D., Bautista-Gallego J., Romeo F.V., Foti P., Caggia C., Randazzo C.L.(2020). Effects of Different Stress Parameters on Growth and on Oleuropein-Degrading Abilities of *Lactobacillus plantarum* Strains Selected as Tailored Starter Cultures for Naturally Table Olives. *Microorganisms* 2020, 8, 1607.

326. Van Guilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques. avr* 2008;44(5):619- 26.

327. Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. et Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60, 407-438.

328. Varela E., Manichanh C., Gallart M., et al. (2013). Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*; 38:151-61.

- 329. Ventura M., et Zink R. (2002).** Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 217, 141–154.
- 330. Verdu E.F., et Collins S.M. (2004).** Irritable bowel syndrome, Best practice and research *Clinical Gastroenterology*, vol.18.p.315-321.
- 331. Vetuschi A., Latella G., Sferra R., Caprilli R., Gaudio E. (2002).** Increased proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig. Dis. Sci.*, 47 pp. 1447-1457.
- 332. Vuilleumard J.C. (1986).** Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Tec et Doc, Lavoisier. Paris. 3, 1-65
- 333. Von Wright A., et Axelsson L. (2011).** Lactic Acid Bacteria: An Introduction," In: S. Lahtinne, S. Salminen, A. Von Wright and A. Ouwehand, Eds., Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, CRC Press, London, , pp. 1-17.
- 334. Vowinkel T., Kalogeris T. J., Mori M., Krieglstein C. F., et Granger D. N. (2004).** "Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 49, no. 4, pp. 556–564.

-W-

- 335. Watterlot L., Rochat T., Sokol H., Cherbuy C., Bouloufa I., Lefèvre F., Gratadoux J.-J., , Edith Honvo-Hueto E., Chilmonczyk S., Blugeon S., Corthier G., Langella P., Bermúdez-Humarán L-G. (2010).** "Intragastric administration of a superoxide dismutase- producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice." *Int J Food Microbiol* 144(1): 35-41.
- 336. Westermeier R. (2004).** Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2004. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527603468>
- 337. Whitcomb D.C., et Lowe M.E (2007).** *Human Pancreatic Digestive Enzymes.* , *Dig Dis Sci* 52(1), 1–17.
- 338. Whitman WB., Coleman DC., et Wiebe WJ. (1998).** Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(12):6578-6583.
- 339. Widayastuti Y., et Febrisiantosa A.R (2014).** "The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation," *Food and Nutrition Sciences*, Vol. 5 No. 4, pp. 435-442.
- 340. Williams C., Panaccione R., Ghosh S., Rioux K. (2011).** Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol.* Jul;4(4):237-48.

341. Wirtz S., Popp V., Kindermann M., Gerlach K., Weigmann B., Fichtner-Feigl S., Neurath M.F. (2017). Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nature Protocols*, 12(7), 1295–1309.

342. Won G.Y., Choi S.I., Park N.Y., Kim J.E., Kang C.H., Kim G.H., (2021). In Vitro Antidiabetic, Antioxidant Activity, and Probiotic Activities of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lacticaseibacillus paracasei* Strains. *Curr. Microbiol*, 78, 3181–3191.

343. Wu X., Altman R., Eiteman M. A., et Altman, E. (2014). Adaptation of *Escherichia coli* to elevated sodium concentrations increases cation tolerance and enables greater lactic acid production. *Appl. Env. Microbiol.* 80, 2880–2888.

344. Wuyts S., Van Beeck W., Oerlemans EFM., Wittouck S., Claes IJJ., et al. (2018). Carrot juice fermentations as man- made microbial ecosystems dominated by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*; 84:e00134-18–18.

-X-

345. Xanthopoulos V., M. Hatzikamari T., Adamidis E., Tsakalidou N., Tzanetakis E., Litopoulou-Tzanetaki (2000). Heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* isolates from Feta cheese throughout ripening. *Journal of Applied Microbiology* 2000, 88, 1056-1064.

-Y-

346. Yagoubi A., et Bensoltane A. (2018). Phenotypic and Molecular characterization of *Lactobacilli* isolated from breast-fed infants faeces in bechar region, south west of Algeria. *S.A.J.B.*, 8(6): 212-221.

347. Yalçinkaya S., Kılıç G., et Başıyigit (2019). Isolation, identification and determination of technological properties of the halophilic lactic acid bacteria isolated from table olives. *Journal of Food Science and Technology*, 8. doi:10.1007/s13197-019-03679-9

348. Yu B., et Tsen HY (1993). *Lactobacillus* cells in the rabbit digestive tract and the factors affecting their distribution. *J Appl Bacteriol*; 75: 269–75.

-Z-

349. Zago M., M. E., Fornasari D., Carminati P., Burns V., Suárez G., Vinderola J., Reinheimer et GiraffaG. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28:1033–1040.

350. Zanoni P., Farrow JAE., Phillips BA., Collins MD. (1987). *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol*; 37:339–341.

351. Zhang S., Liu L., Su, Y., Li H., Sun Q., Liang X., Lv J. (2011). Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 5, 5194–5201.

- 352. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M., Harris H.M., Mattarelli P., O'Toole P.W., Pot B., Vandamme P., Walter J., et al. (2020).** A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 70 : 2782–2858.
- 353. Ziar H., Gérard P., Riazi A. (2012).** Calcium alginate-resistant starch mixed gel improved the survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *International journal of food science+ technologie* ; 47(7):1421-1429.
- 354. Ziar H., Gérard P., Riazi A. (2014).** Effect of prebiotic carbohydrates on growth, bile survival and cholesterol uptake abilities of dairy-related bacteria. *J. Sci. Food Agric.*; 94:1184–1190.
- 355. Ziar H., Riazi A. (2022).** Polysorbate 80 improves the adhesion and survival of yogurt starters with cholesterol uptake abilities. *Saudi J Biol Sci. Aug*; 29(8):103-367.
- 356. Zourari A., Accolas J.P., et Desmazeaud M.J. (1992).** Metabolism and Biochemical Characteristics of Yogurt Bacteria. *A review. Lait*, 72: 1-34.

Annexes

Annexe 1 :

Milieux de cultures :

Bouillon MRS (De Man et al., 1960):

Extrait de viande	8,00g
Extrait de levure	4,00g
Peptone	10,00g
Glucose	20, 0 g
Acétate de sodium tri hydraté	5, 0 g
Citrate d'ammonium	2, 0 g
Tween 80	1, 0 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2, 0 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0, 2 g
Sulfate de manganèse tétra hydraté	0, 05 g
Eau distillée (qsp)	1000ml

pH = 6, 5±0,3

Remarque : Pour la gélose ajouter Agar-agar 10, 0 g

La stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 20min

Le milieu de conservation : MRS additionné de 1,5% (v/v) de Glycérol

Tampon PBS:

Sodium chloride	8.0g
Potassium chloride	0.2g
Di-sodium hydrogène phosphate	1.15g
Potassium dihydrogène phosphate	0.2g

pH 7.3 ± 0.2 à 25°C.

Milieu protéolytique

Agar-agar	1,5g
Eau distillée (qsp)	100ml
Lait écrémé U.H.T. candia silhouette	3,00ml

La stérilisation à l'autoclave : 100°C pendant 12min

Milieu Lait écrémé reconstitué 20% (P/V)

Poudre de lait écrémé	200g
Eau distillé (qsp)	1000ml

La stérilisation à l'autoclave : 100°C pendant 12min

Bouillon hypersalé (4,0; 6,5 et 9,5% de NaCl) (Larpent et Larpent, 1997)

Glucose	5,0g
Extrait de Viande	5,0g
Peptone	15,0g
NaCl	40,0g; 65g; 95g
Eau distillée (qsp)	1000,0 ml

pH 7,5.

La stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 15min

Milieu Moeller (ADH):

Extrait de levure	3,0 g
L-arginine (monochlorhydrate)	5,0 g
Glucose	1,0 g
Bromocrésol pourpre.	0,16 mg
Éthanol	1,0 mL
Chlorure de sodium.	5,0 g
pH = 6,8	
Ce milieu est présenté en petits tubes fins ce qui facilite l'anaérobiose.	

Gélose au sang: Milieu prêt à l'emploi déshydraté

Peptone	15,0g
Digestat de Foie	2,5g
Extrait de levure	5g
Chlorure de sodium	5,0g
Agar-agar	12,0g
pH 7,2± 0,2	

La stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 15min

Remarque : pour la gélose au sang frais, à 100,0ml de base stérile refroidi à 45°C, s'ajoute 5,0-10,0% de sang de cheval ou de mouton

Milieu Clark et Lubs :

Tryptone	2,0 g
Peptone	5,0g
K ₂ HPO ₄	5,0g
Glucose	5,0g
Eau distillée (qsp)	1000,0 ml
pH 7.	

La stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 15min

Milieu hypersacharosé (MSE):

Pour 1 litre de milieu :

Tryptone	10,0 g
Gélatine	2,5 g
Extrait autolytique de levure.	5,0 g
Saccharose.	100,0 g
Glucose	5,0 g
Citrate de sodium	1,0 g
Azide de sodium	75,0 mg
Agar agar bactériologique	15,0 g
pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 6,9 ± 0,2.	

Gélose Columbia : Milieu prêt à l'emploi déshydraté:

Mélange spécial de peptone	23,0g
Amidon	1,0g

Kouadri Boudjelthia N. (2024). Etude de l'adaptation des probiotiques et détermination de leurs effets bénéfiques. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques, Université de Mostaganem

Chlorure de sodium (NaCl)	5,0g
Eau distillée (qsp)	1000,0 ml
pH 7,3	
La stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 15min	

Gélose McKonkey prête à l'emploi :

Peptone (Digestion pancréatique de gélatine)	17,0g
Rouge neutre	0,03 g
Protéose peptone (viande et caséine)	3,0g
Violet de cristal	1,0 mg
Lactose monohydraté	10,0g
Gélose	13.5 g
Sels biliaires	1.5g
Eau distillée	1000ml
Chlorure de sodium	5,0 g
pH Final 7.1 ± 0.2	
La stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 15min	

Gélose Bile esculine (BEA):

Extrait de bœuf	11,0g
Digestion enzymatique de gélatine	34,5 g/L
Esculine	1,0g
Sulfate de manganèse	0.05g
Bile de bœuf	2,0g
Citrate d'ammonium ferrique	0,5 g/L
Agar-agar	15,0 g/L

Gélose Viande -Foie :

Peptone viande-foie	30,0g
Sulfite de sodium	2,5g
Glucose	2,0g
Citrate ferrique ammoniacal	0,5g
Amidon soluble	2,0g
Agar	11,0g
pH final à 25°C : $7,6 \pm 0,2$	

Milieu Mueller Hinton

Extrait de Viande	2,0g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar- agar	17,0g
pH 7,3.	
La stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 15min	

Annexe 2:

Liste des séquences des gènes ADNr16S des isolats

>Nacima_LbN1

GCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACA
GTCCGAAGTGAAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTGACCTCGCGGTCTCGCAACTC
GTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGAT
TTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTTACTAGAGTGCCC
AACTAAATGCTGGCAACTAGTCATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTTTGCCTCCG
AAGGGGAAACCTGATCTCTCAGGTGATCAAAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTT
CTTCGCGTTCCCCCGTGCCCCCGCCCCGCCCCGGGGCGGGCCCCCGGG

>Nacima_LbN5

TGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTAC
AATCCGAAGTGAAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTTCGCAACT
CGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGA
TTTACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCC
CAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCC
GAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTT
CTTCGCGTTCCCCCGTGCCCCCGCCCCGCCCCGGGGGGCCCC

>Nacima_LbN9

GATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCT
ACAATCCGAAGTGAAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTTCGCAA
CTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGAT
GATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTG
CCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCC
CCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGG
TTCTTCGCGTTCCCCCGTGCCCCCGCCCCGCCCCGGGGCGGGCC

>Nacima_LbN10

AATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCT
ACAATCCGAAGTGAAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTTCGCAA
CTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGAT
GATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTG
CCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCC
CCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGG
TTCTTCGCGTTCCCCCGTGCCCCCGCCCCGCCCCGGGGCGGGCC

>Nacima_LbN11

GAATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCC
TACAATCCGAAGTGAAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTTCGCA
ACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGA
TGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGT
GCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA
CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCC
CCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAG
GTTCTTCGCGTTCCCCCGTGCCCC

>Nacima_LbN12

ATGCTGATCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTAC
AATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACT
CGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGA
TTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCC
CAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCC
GAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTT
CTTCGCGTTCCCCCGTGCCCC

>Nacima_LbN13

ATGGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCT
ACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAA
CTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGAT
GATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTG
CCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCC
CCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGG
TTCTTCGCGTTCCCCCGTGCCCC

>Nacima_LbN14

ACTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCT
ACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAA
CTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGAT
GATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTG
CCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCC
CCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGG
TTCTTCGCGTTCCCCCGTGCCCCCGCCCCGCCCCGGGGCGGCCCC

>Nacima_LbN15

AATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCT
ACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAA
CTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGAT
GATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTG
CCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCC
CCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGG
TTCTTCGCGTTCCCCCGTGCCCC

Annexe 3:

Bulletins D'analyse MALDI-TOF MS

 République Algérienne Démocratique et Populaire
SPA CRAPC Expertise
Filiale Du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico-Chimiques -MESRS-
Capital Social : 7 000 000 DA
Adresse : Frères Belhadj Bou-Ismaïl (w) Tiziouza
Tél/Fax : 024 32 58 93 / 024 31 41 Mail: contact@crapcexpertise.com site : www.crapcexpertise.com

Bulletin d'Analyse


N° 00069/2019/ SPA CRAPC EXPERTISE, Du 28/03/2019

N° du Dossier : 0169/2019 Relatif à l'analyse des échantillons par MALDI-TOF,
Date d'Enregistrement : 27/02/2019.
Demandeur : **KOUADRI BOUDJELTHIA NACIMA,**
Adresse :
RC N° :
NIF N° :
NIS N° :
ART N° :

I. Résultats d'analyse :

N-B :
Les conditions d'analyses et résultats sont regroupées ci-joint.

Bou- Ismaïl, le : 28/03/2019
LAARABA Rachid
Directeur technique

CACHET ET SIGNATURE


RC N°: 42/00-0524525813 NIF N°: 001342052432552 NIS N°: 001542260014166 N° Article : 42260119851
N° Compte Bancaire : 004001354801001356912/CPA Agence Tiziouza (00184)

MALDI Biotyper Classification Results



Project Info:

Project Name: 190325-0835-1011007718
 Project Description: 25.03.2019 KOUADRI NACIMA
 Project Owner: Admin@FLEX-PC
 Project Creation Date/Time: 2019-03-25T08:36:53.434
 Project Analyte Count: 6
 Project Type: Development
 QC: not present
 QC Position:

Result Overview

[Organism names which are in blue and underlined are linked to the matching hint table below.](#)

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
E1 (-) (C)	LB10	no peaks found	<0	no peaks found	<0
E2 (-) (C)	LB11	not reliable identification	1.546	not reliable identification	1.479
E3 (-) (C)	LB13	no peaks found	<0	no peaks found	<0
E4 (+) (B)	LB15	Lactobacillus plantarum	1.868	Lactobacillus plantarum	1.842
E5 (-) (C)	LB17	no peaks found	<0	no peaks found	<0
E6 (++) (A)	LB19	Lactobacillus plantarum	2.067	Lactobacillus plantarum	2.058

MALDI Biotyper Classification Results



Project Info:

Project Name: 190324-0935-1011007718
 Project Description: 24.03.2019 KOUADRI NACIMA
 Project Owner: Admin@FLEX-PC
 Project Creation Date/Time: 2019-03-24 T09:38:04.288
 Project Analyte Count: 10
 Project Type: Development
 QC: not present
 QC Position:

Result Overview

Organism names which are in blue and underlined are linked to the matching hint table below.

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>B1</u> (+) (B)	LB05	<u>Lactobacillus plantarum</u>	1.924	Lactobacillus plantarum	1.901
<u>B2</u> (-) (C)	LB09	no peaks found	<0	no peaks found	<0
<u>B3</u> (-) (C)	LB10	no peaks found	<0	no peaks found	<0
<u>B4</u> (-) (C)	LB11	no peaks found	<0	no peaks found	<0
<u>B5</u> (-) (C)	LB12	no peaks found	<0	no peaks found	<0
<u>B6</u> (-) (C)	LB13	no peaks found	<0	no peaks found	<0
<u>B7</u> (+) (B)	LB14	<u>Lactobacillus plantarum</u>	1.802	Lactobacillus plantarum	1.787
<u>B8</u>					

(-) (C)	LB15	no peaks found	<0	no peaks found	<0
<u>B9</u> (-) (C)	LB17	no peaks found	<0	no peaks found	<0
<u>B10</u> (-) (C)	LB19	no peaks found	<0	no peaks found	<0

MALDI Biotyper Classification Results



Project Info:

Project Name: S0324-1043-1011007718
 Project Description: 24.03.2019 KOUADRI NACIMA
 Project Owner: Aiming@FLEX-PC
 Project Creation Date/Time: 2019-03-24T10:45:08.062
 Project Analyte Count: 9
 Project Type: Development
 QC: not present
 QC Position:

Result Overview

Organism names which are in blue and underlined are linked to the matching hint table below.

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
C1 (+++ (B))	LB09	Lactobacillus plantarum	2.507	Lactobacillus plantarum	2.305
C2 (-) (C)	LB10	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
C3 (-) (C)	LB11	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
C4 (+) (B)	LB12	Lactobacillus plantarum	1.77	not reliable identification	1.634
C5 (-) (C)	LB13	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
C6 (-) (C)	LB15	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
C7 (-) (C)	LB17	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
C8					

C8 (-) (C)	LB19	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
C9 (-) (C)	LB17	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0

Annexe 3:

Photos de l'activité antifongique des souches LbN9 et LbN14

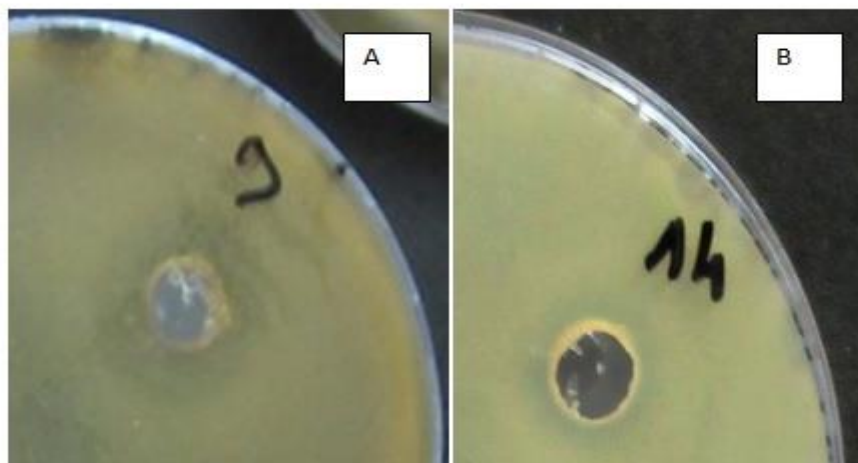


Figure 38. Activité antibactérienne vis-à-vis de *Aspergillus Niger* ATCC106404
A. LbN9 ($9,00 \pm 0,50$ mm) / B. LbN14 ($6,23 \pm 1,12$ mm)

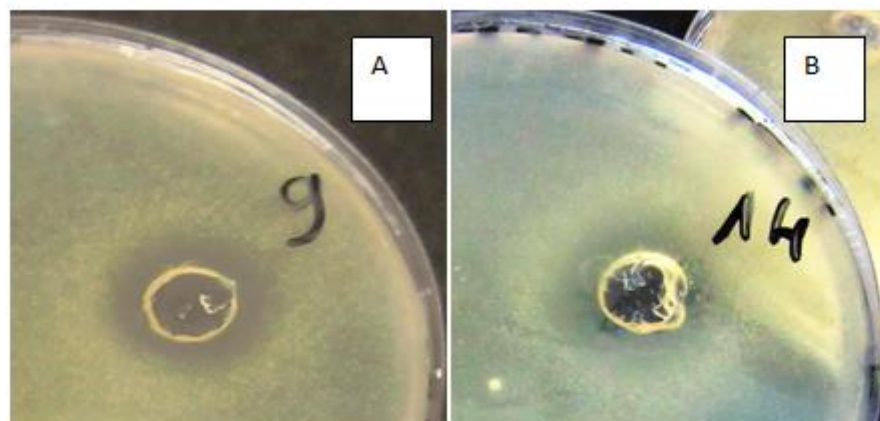


Figure 39. Activité antibactérienne vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231
A. LbN9 ($14,17 \pm 0,28$ mm) / B. LbN14 ($17,47 \pm 0,45$ mm)

Annexe 4:

Liste des Communications

Publications :

- **Kouadri Boudjelthia, N.;** Belabbas, M.; Bekenniche, N.; Monnoye, M.; Gérard, P.; Riazi, A. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Newly Isolated from Algerian Raw Cow's Milk. *Microorganisms* **2023**, 11, 2091. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082091>

Communications Nationales :

- **Kouadri Boudjelthia Nacima,** Riazi Ali (2021). Antagonisme de souches *Lactobacillus* sp isolées de lait de vache vis-à-vis de bactéries pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires. webinaire ; 2eme journées scientifique: staphylocoques et santé publiques. Organisé Le 05juin **2021** par l'Ecole National supérieur vétérinaire (ENSV) Rabie Bouchama d'Alger et le Laboratoire de recherche Hygiène Alimentaire et Système Assurance Qualité. Alger.Algérie.

Communications Internationales :

- **Kouadri Boudjelthia Nacima,** Riazi A. Evaluation du potentiel probiotique de souches lactiques isolées du lait de vache. Communication orale : Colloque International de Biosciences **2018** "Génie enzymatique et production de métabolite", organisé par l'Ecole Supérieure en Sciences Biologique d'Oran ; du 28 au 29 Octobre **2018** à Oran. Algérie.
- **Kouadri Boudjelthia Nacima,** Riazi Ali. Potentiel antagoniste de souches du genre *Lactobacillus* isolées du lait de vache vis-à-vis de bactéries pathogènes responsables de toxi-infections. Communication affichée (poster) au 1^{er} Symposium International sur la Recherche Antimicrobienne (ISAR 2018) ; organisé par le laboratoire de production Agricoles Valorisation Durable des Ressources Naturelles de l'université de khemis- Miliana du 02 au 03 Mai **2018**.
- **Kouadri Boudjelthia Nacima ;** Riazi Ali. Évaluation in-vitro de l'effet des enzymes digestives sur la survie des souches de *Lactobacillus plantarum* isolées du lait de vache. Communication affichée (poster), au Congrès Méditerranéen en Bio-analyses- CMB 2019 : Toxicologie, Ecotoxicologie, Aliment et Santé ; les 13-15 Décembre **2019** à Mahdia, Tunisie.
- **Kouadri Boudjelthia Nacima;** Kebir A., Benmahdi T., Yahla I., Riazi A. Newly isolated strain, *Lactobacillus plantarum*, reduces the incidence of DSS-induced ulcerative colitis in Wistar rats. Communication affichée (poster); au Journées Internationales de Biotechnologie (JIB 2019); The International Days of Biotechnology (IDB 2019); 18 - 21 Décembre **2019**; à l'Hôtel Marhaba Palace El Kantaoui, Sousse (Tunisie).
- **Kouadri Boudjelthia Nacima.,** **Riazi A.** Mise en évidence in vitro des aptitudes technologiques de neuf souches de *Lactobacillus plantarum* isolées du lait de vache. 1^{er} Webinaire International sur les

Kouadri Boudjelthia N. (2024). Etude de l'adaptation des probiotiques et détermination de leurs effets bénéfiques. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques, Université de Mostaganem

Applications innovantes des Biotechnologies en Industrie Alimentaire : du Laboratoire à l'Entreprise (WAIBIA 2021). Organisé par le Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL) de l'Institut de la Nutrition ,de L'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA) de l'université de Constantine; Constantine, 1et 2 Décembre 2021 Algérie.

Liste des travaux de recherche pédagogiques entrant dans le cadre de la thèse :

- **Promotrice** : ELMEDDAH Z. et LADJAL Cherifa (2017). Etude de l'activité antibactérienne de souches lactiques isolées du lait de vache. Master II, Nutrition et pathologie. Univ. Mostaganem.
- **Promotrice** : Bouhafis F. et Medjahed N. (2018). Survie in vitro de souches lactiques locales aux conditions gastriques simulées. Master II, Nutrition et pathologie. Univ. Mostaganem.
- **Promotrice** : Slamnia I. et Saddok A.Z (2018). Aptitudes technologiques de souches lactiques locales. Master II, Nutrition et pathologie. Univ. Mostaganem.
- **Promotrice** : Mehaddi D. et Belkediem A. (2019). Intitulé du mémoire: Etude in vitro sur l'effet des enzymes digestives sur la survie des lactobacilles isolées de lait de vache. Master II, Nutrition et pathologie. Univ. Mostaganem.
- **Promotrice** : Benguella C. et Boumediene S. (2019). Essai in-vivo de l'effet des souches de lactobacilles dans le traitement de la rectocolite hémorragique. Master II, Nutrition et pathologie. Univ. Mostaganem.
- **Promotrice** : Beddaiche A. et Lazreug Z. (2020). Effet de quelques prés biotiques sur la croissance des souches de *Lactobacillus plantarum* isolées du lait de vache. Master II, Nutrition et pathologie. Univ. Mostaganem.
- **Promotrice** : Kaddour S. et Azzi I. (2020). Activité antimicrobienne des *Lactobacillus sp* associés aux antibiotiques vis-à-vis de certains pathogènes. Master II, Nutrition et pathologie. Univ. Mostaganem.
- **Promotrice** : Belabdoune L. et Rouabhi A. (2021). Exploration de l'effet antimicrobien des souches lactiques. Master II, Nutrition et pathologie. Univ. Mostaganem.
- **Promotrice** : Hamida N. et Lahouali M. (2021) : Etude de l'activité anti-oxydante des bactéries lactiques. Master II, Nutrition et pathologie. Univ. Mostaganem.

PUBLICATION



Article

Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Newly Isolated from Algerian Raw Cow's Milk

Nacima Kouadri Boudjelthia ¹, Meryem Belabbas ², Nahla Bekenniche ³, Magali Monnoye ⁴, Philippe Gérard ⁴ and Ali Riazi ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Beneficial Microorganisms, Functional Food and Health, Department of Food Sciences, Faculty of Natural and Life Sciences, Abdelhamid Idris Badis University, Mostaganem 27000, Algeria; nacima.kouadriboudjelthia@univ-mosta.dz
- ² Department of Agronomy Sciences, Faculty of Natural and Life Sciences, Djillali Liabès University, Sidi Bel Abbès 22000, Algeria; meryem.belabbas@univ-sba.dz
- ³ Laboratory of Food Technology and Nutrition, Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem 27000, Algeria; nahla.bekenniche@univ-mosta.dz
- ⁴ Micalis Institute, INRAE, AgroParisTech, Paris-Saclay University, 78350 Jouy-en-Josas, France; magali.monnoye@inrae.fr (M.M.); philippe.gerard@inrae.fr (P.G.)
- * Correspondence: ali.riazi@univ-mosta.dz; Tel.: +213-779-94-15-17; Fax: +213-45-41-68-41

Abstract: This study aims to screen new LAB from Algerian cow's milk to assess their probiotic properties. Molecular identification and MALDI-TOF mass spectrometry methods were used to identify the LAB isolates. The probiotic potential of isolates was determined with in vitro tests of survival to gastrointestinal conditions (pH 2, 0.3% pepsin, 0.5% bile salts, 0.1% trypsin, and 0.1% pancreatic amylase) and antimicrobial and antioxidant activities. Eight isolates were identified as *Lactiplantibacillus plantarum* (100%) and one isolate as *Lacticaseibacillus rhamnosus* (95.75%). The MALDI-TOF MS analysis of the isolates confirms that the strains belong to the group of lactobacilli bacteria, particularly *Lactiplantibacillus plantarum*. The high survival rate reflects a good strain tolerance to the in vitro host simulated gastrointestinal conditions. All bacteria exhibit an antibacterial activity strain with inhibition zone diameters ranging from 4.9 mm against *Aspergillus niger* ATCC 106404 to 17.47 mm against *Candida albicans* ATCC 10231. The antioxidant activity with the highest DPPH scavenging activity (92.15%) was obtained with the LbN09 strain. In light of these results, some of the strains isolated from raw milk of the local Algerian breed cows show promising probiotic properties, giving them a possible use in preserving food from microbial spoilage and oxidation during storage.

Keywords: lactic acid bacteria (LAB); raw cow's milk; probiotic; antioxidant; antibacterial



Citation: Kouadri Boudjelthia, N.; Belabbas, M.; Bekenniche, N.; Monnoye, M.; Gérard, P.; Riazi, A. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Newly Isolated from Algerian Raw Cow's Milk. *Microorganisms* **2023**, *11*, 2091. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082091>

Academic Editor: Cinzia Lucia Randazzo

Received: 30 June 2023
Revised: 4 August 2023
Accepted: 8 August 2023
Published: 15 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The interest in probiotics is illustrated by the constant increase in the world market for these living microorganisms, which are increasingly sought after by consumers who are more aware of their well-being. The relevance of probiotics in maintaining and improving human health is related to their beneficial effect on intestinal flora. The screening of new bacterial strains with probiotic properties is costly and time-consuming. Raw cow's milk is a potential source of LAB, which is one of the most commonly used bacteria that can provide food and health benefits related to their ability to produce secondary metabolites and functional proteins [1]. Many LABs are considered probiotics and are targeted by several researchers for their immense genetic, metabolic, and ecological diversity, as they colonize a wide range of habitats and can have different industrial applications [2].

Probiotics are defined as live bacteria if administered in adequate amounts and provide health benefits [3]. These probiotics are isolated from several ecological niches, in particular, from cow's milk, which is an important source of LAB, in particular, species

belonging to the *Lactobacillus* genus. Probiotic strains prevent intestinal infections and dysbiosis in the host by producing lactic acid and functional proteins (i.e., bacteriocins) able to exert an antagonistic activity against the pathogenic bacteria; they also contribute to the maintenance of the essential balance of intestinal microbiota [4,5].

Probiotic bacteria cannot exert their beneficial effects if they cannot survive digestive hostilities (barriers of gastric acidity, bile salts, and digestive enzymes) during their transit through the gastrointestinal tract. Their adherence to the intestinal cells can also contribute to their probiotic properties [6]. Several studies have shown beneficial effects in the host of most *Lactobacillus plantarum* species isolated from milk and fermented food, and which have been evaluated for their probiotic potential through their resistance to digestive hostilities, antioxidant and antagonistic activities, and adherence to epithelial cells [7,8].

Moreover, several specific new LAB strains were selected for the prevention and/or in vivo treatment of several inflammatory bowel diseases due to food poisoning [9,10]. The initial classification of *lactobacilli* was based on morphological and physiological characteristics (gram, cell morphology, colony appearance); on growth parameters (optimum incubation temperature, pH tolerance, and oxygen requirements), on biochemical characterization, the used substrates, and the final metabolic products made it possible to divide the *lactobacilli* into three groups according to their fermentative pathway: obligate homofermentative, facultative homofermentative, and obligate heterofermentative [11]. Obligate homofermentative lactobacilli use the Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway to convert glucose into lactic acid but cannot use the pentose-phosphate pathway to ferment pentoses. Obligate heterofermentative lactobacilli exclusively use the pentose-phosphate pathway; while facultative homofermentative use EMP but also ferment pentoses [11].

Molecular taxonomy, based on DNA sequencing, allows sequences to be compared to a database for species identification, and the phylogenetic tree represents the relatedness of lactobacilli strains according to divergence from common ancestors [12]. The MALDI-TOF-MS identification method is currently applied to the routine identification of many microorganisms such as the reliable and rapid identification of LAB [13]. In this study, nine LAB isolates from Algerian raw cow's milk were assessed. Isolates were first phenotypically selected and identified by 16S rDNA and MALDI-TOF MS before evaluating their probiotic properties in vitro, including antioxidant and antimicrobial activities as well as their ability to survive simulated gastrointestinal conditions (gastric fluid, bile salts, trypsin, and pancreatic amylase). Algerian cow's milk is lacking information as a potential medium LAB that may be a source of probiotic strain isolation, so this study is the first attempt to screen such new LAB strains with probiotic status.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

Ten milk samples were collected from ten cows in aseptic conditions with manual milking using sterile gloves after cleaning the udders and surrounding skin with sterile water, throwing the first drops, and then transporting them in an ice box to the laboratory for immediate isolation procedure. Cows were living in a Menasria traditional livestock farm, district of Mascara located in Western Algeria (36.17547° N, 1.44178° W), and fed with fodder, bran, and natural grasses from pasture.

2.2. Strains, Growth Conditions, and Identification

Milk samples were enriched in skimmed milk (10%) and then diluted and plated on MRS Agar (Conda laboratorios, Madrid, Spain) [14]. Next, 10 mL of enriched milk was added aseptically to 90 mL of sterile saline solution (0.9%). Serial dilutions were made using sterile saline solution in sterile tubes up to 10^{-4} . Sterile MRS plate agar was inoculated (1 mL) and incubated anaerobically in a CO₂ incubator at 37 °C for 24 h. Bacterial purification was routinely assessed using morphological tests such as gram staining, catalase, CO₂ production, and capacity of growth in different NaCl concentrations for a preliminary selection of different isolates of lactobacilli. Gram-positive, catalase-

negative bacilli isolates selected were presumed to be lactobacilli and were stored in MRS-Glycerol (25/75 *v/v*) at -80°C .

Genomic DNA of bacterial strains was extracted using the commercial extraction kit Promega Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega; Madison, WI, USA) according to the manufacturer's recommendation. The cells were harvested from fresh bacterial pellets after culture centrifugation and supernatant removal. The quantity and the quality of DNA extracts were monitored using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). A Bio-Rad T100 PCR programmable Thermal Cycler was used to amplify the 16S rRNA gene with prokaryotic 16S rRNA universal primer's region V6-V8:P3:Bact968-GC-f (5'/CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAAG-AACCTTAC3') and P4: Bact1401-r (3'/GCGTGTGTACAAGACCC5') as described by Nübelet al. [15]. The enzyme used was a Taq polymerase from Qbiogen (Qbiogen, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The PCR mixes contained 10 to 50 ng/ μL DNA matrix, 1 μL of each primer, 3 μL of MgCl_2 solution, 25 μL of TaqMix (Taq polymerase + dNTPs), and H_2O 50 μL . PCR amplification protocol was carried out with an initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 30 denaturing cycles at 97°C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min and 30 s. The procedure was completed with a final elongation step at 72°C for 15 min.

16S rRNA amplified samples were purified by using a Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and then hot start sequenced by a German sequencing company (Eurofins Genomic sequencing, Cologne, Germany). All obtained Fasta sequences were blasted to the BLAST database program of NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, accessed on 3 March 2022), and compared with the sequences deposited in GenBank for strain identification. A phylogenetic tree based on the analysis of 16S rRNA gene sequences was constructed using MEGA-X: Molecular Evolution Genetic Analysis [16] available at <http://www.megasoftware.net>. The distances were calculated using the Neighbor-joining method with jukes-cantor correction [17].

2.3. MALDI-TOF MS Identification

A single colony grown on MRS agar was transferred onto a MALDI-TOF steel target plate (MS Big Ankor 24BC, Bruker daltonics inc., Bremen, Germany). Next, 10 μL of a saturated solution of trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (HCCA portioned, Bruker) were added to 0.1 μL of formic acid to allow crystallization of the matrix with the sample [13]. The plate was left to dry at ambient temperature and introduced into the mass spectrophotometer (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of Flight Mass Spectrometry: MALDI-TOF/MS; Microflex, Bruker). The automated system generates spectra interpreted by software (MALDI Biotyper TM4.0 Data base Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The results are shown as the top 10 identification matches along with confidence scores ranging from 0.00 to 3.00. Data are representative of two experiments.

2.4. Strain Survival to the In Vitro Simulated Gastrointestinal Conditions

Survival capacity at the stomach transit was determined by Vizoso Pinto et al. [18] method. The bacteria were subjected to in vitro simulated gastric fluid and whose composition (%: P/V) is: 6.2 NaCl, 0.22 CaCl_2 , 1.2 NaHCO_3 , 2.2 KCl, 0.3 pepsin, and pH 2.5. The simulated gastric fluid was sterilized by filtering through a 0.22 μm membrane. Viable cells were counted with the agar plate method on MRS at the end of the time required for the process of converting the bolus into chyme in the stomach, which is 4 h of incubation at 37°C [19]. The survival rate was calculated by the following formula:

$$\text{Survival rate (\%)} = (\log \text{UFC at time } t_1 / \log \text{UFC at time } t_2) \times 100 \quad (1)$$

Survival strains of bile salts were assessed according to the method of Hyonimus et al. [20]. Briefly, 1 mL of each overnight culture (18 h) was centrifuged at 8000 rpm/10 min and the supernatant was discarded. Next, 50 μL of each bacterial

pellet was inoculated in 450 μ L of MRS (pH8 + bile salts (0.5%). The survival of lactobacilli strains was assessed by counting plate agar media at 4 h at 37 °C. This incubation was chosen based on the time required for digestion in the small intestine with bile salts [19]. The survival rate was calculated using the previous Formula (1).

Strain survival rate for digestive enzymes was assessed as described by Ouwehand et al. [21]. To do so, 50 μ L of each strain suspension were inoculated into 450 μ L of pancreatic amylase (Sigma, Aldrich, Neustadt, Germany) solution freshly prepared (0.1 mg/mL in PBS, pH 6.9) on one hand, and into 450 μ L of trypsin (Alfa Aesar, by Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) solution freshly prepared (0.1 mg/mL in PBS, pH 7.6). Viable cells were determined with the MRS agar plate count method after 5 h exposure to enzymes at 37 °C. The survival rate was calculated using the previous Formula (1).

2.5. Determination of Biological Activities of the Strains

2.5.1. Antimicrobial Activity

Antimicrobial activity of LABs strains against some relevant human pathogens including *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, and *Aspergillus niger* ATCC 106404 was determined as described by Chaalel et al. [22]. Overnight cultures strains in MRS broth medium at 37 °C were centrifuged for 10 min at 14,000 \times g. Next, 50 μ L of filtered (0.2 μ m filter) and neutralized supernatant were put in 5 mm diameter wells on MRS agar plate pre-inoculated with the indicators of pathogen bacteria. The agar plates were incubated at 37 °C overnight for all pathogenic bacteria tested, and for 48 to 72 h for the fungi *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus niger* ATCC 106404. The clear zone formation indicates the positive antimicrobial activity of the supernatant metabolites against the pathogens [22].

2.5.2. Antioxidant Activity

DPPH radical scavenging activity of LAB strains was determined according to the original method of Blois et al. [23]. Utilizing this method, 1 mL of each 18 h bacterial young culture was mixed with 1 mL of 0.004% (P/V) DPPH methanolic solution and left for 30 min in the dark at room temperature. Thereafter, each mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min and the absorbance of the supernatant was measured at 517 nm against distilled water (negative control) in comparison to ascorbic acid (Sigma, Aldrich) as standard (positive control). The percentage inhibition (I%) of DPPH radical scavenging activity was calculated according to the following formula:

$$I (\%) = [(A_{\text{control}} - A_{\text{assay}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (2)$$

2.6. Statistical Analysis

The data obtained were analyzed using IBM SPSS statistics, version 26.0. Data were reported as mean \pm SD. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$ for the two-sided tests. The unidirectional ANOVA followed by the Tukey test was used to compare the results of survival of the different strains to the in vitro simulated gastrointestinal conditions and the antioxidant activity. The multidirectional MANOVA, followed by the Tukey test, was used to compare the results of the antimicrobial activity of the different strains obtained in the strain growth zone inhibition test with those of the reference antimicrobials.

3. Results

3.1. Analysis of a Total of Nine Selected LAB Isolates Reveals Eight Putative Strains *Lactiplantibacillus plantarum* and One Putative Strain *Lacticaseibacillus rhamnosus*, as Confirmed by Molecular (PCR-16) and Proteomic (MALDI-TOF) Identification

Phenotypic characterization of a total of nine obtained isolates revealed that all the cow's milk isolated strains were gram-positive and catalase negative. However, to assign reliable profiles to the selected isolates, molecular identification remains essential and obligatory.

The 16S rRNA gene sequences of strains LbN1, LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14, and LbN15 were submitted to NCBI Genbank database under the following number: OM976615, OM976616, OM976617, ON008307, ON008308, ON008309, ON008310, OM976618, and ON008311, respectively. All strains selected by PCR16s revealed the presence of bands from the DNA amplification as shown by the electrophoresis gel profile in Figure 1. The expected Amplicon length is about 434 bp fragment of the hypervariable V6-V8 region [24]. The crude sequences obtained from Eurofins Genomic sequencing were blasted using the BLAST database program of NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, accessed on 3 March 2022). The FASTA sequences were compared with the sequences deposited in GenBank for the identification of strains. Similarity scores (%) are presented in Table 1. The BLAST of Crude Sequences of the rRNA16S gene obtained by the universal P3:Bact968-GC-f sense primers and antisense primer P4: Bact1401-r, allowed the selection of 9 isolates belonging to the 2 genera *Lactiplantibacillus* sp. and *Lacticaseibacillus* sp. with 100 and 99.75% similarity, respectively, according to the Genbank data.

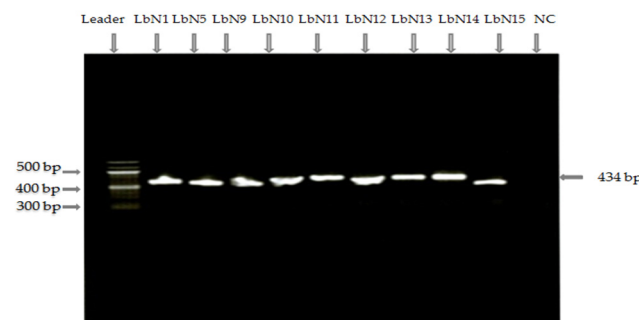


Figure 1. A 1% Agarose gel electrophoresis made with TBE 1X solution (TBE 1X = 10 mL of distilled water make up to 1L de TBE 10X) of PCR rRNA 16S using the universal primers P3:Bact968-GC-f and P4: Bact1401-r, related to hypervariable regions V6-V8 region with fragment length 434 bp. Leader; NC: Negative control; LbN1, LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14, and LbN15: Isolates.

Table 1. Similarity scores (%) of identification results by 16S rRNA of lactic acid bacteria isolates.

Isolates Code	Species Identification	Similarity Scores (%)
LbN1	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	99.75
LbN5	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>	100
LbN9	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>	100
LbN10	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>	100
LbN11	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>	100
LbN12	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>	99.75
LbN13	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>	100
LbN14	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>	100
LbN15	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>	100

The Dendrogram reported in Figure 2 results from the alignment of the 16s rRNA sequences of the nine lactobacilli isolates and the sequences of the type strains retrieved from the NCBI database (*L. plantarum*, *L. argentoratensis*, *L. paraplantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus*, *L. paracaseisubsp. tolerans*, *L. herbarum*). Analysis of phylogenetic distances grouped together eight isolates (LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14, LbN15) in *Lactiplantibacillus plantarum* and one isolate (LbN1) in *Lacticaseibacillus rhamnosus*. The LbN1 strain has been grouped around the following standard strains: *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBRC 3425, *Lacticaseibacillus casei* ATCC 393, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130, and *Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans* NBRC 15906. The LbN12 strain has been identified in the group of the following standard strains: *Lactiplantibacillus herbarum* TCFE 032-E4, *Lactiplantibacillus paraplantarum* DSM 10667, *Lactiplantibacillus plantarum* Subsp. *argentoratensis* DK022, and *Lactiplantibacillus pentosus* ATCC 8041.

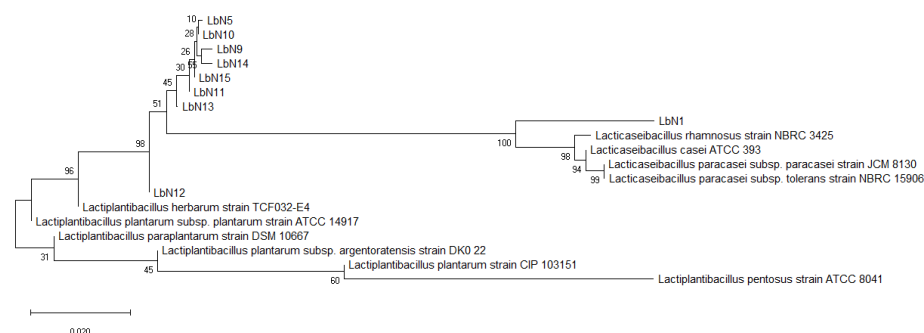


Figure 2. Dendrogram based on the 16S rRNA gene sequences, showing the relationships within the lactobacillus isolates and their positions with representatives of some other related taxa from the NCBI database (*Lactocaseibacillus rhamnosus* NBRC 3425, *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393, *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* CM 8130, *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* NBRC 15906, *Lactiplantibacillus herbarum* TCFE 032-E4, *Lactiplantibacillus paraplantarum* DSM 10667, *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *Argentoratensis* DK 022, and *Lactiplantibacillus pentosus* strain ATCC 8041). The sequences were aligned using the neighbor-joining method with Jukes-Cantor correction. Bootstrap values are shown on the nodes.

MALDI-TOF MS analysis concerned eight isolates (LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14, and LbN15). The use of the MALDI-TOF/MS mass spectrometry method was necessary to support the molecular identity of isolates for which 16S rRNA identification was inconclusive. The identification list proposed by MALDI BioTyper 3.0 software (Bruker Daltonics) identified the strains as *L. plantarum* with the following scores values of identification: 2.302, 2.191, 2.050, 2.067, 2.205, 2.307 for strains LbN9, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, and LbN14, respectively; while scores values for the LbN5 and LbN15 strains were 1.924 and 1.868, respectively. This result indicates good reliability and a high probability of identification according to the criteria proposed by the constructor: a log (score) below 1.69 did not allow reliable identification; a log (score) between 1.70 and 1.99, allowed a probable identification of the genus with a low level of confidence; a log(score) between 2.00 and 2.29 indicates secure gender identification; and a log (score) between 2.30 and 3 indicates high probable species identification with high confidence.

3.2. The Isolated Strains Have Shown an Interesting Probiotic Profile

3.2.1. Gastric Fluid and Bile Salts Tolerance

Strain survival rate to simulated digestive conditions, estimated by the mean cell viability, represents the tolerance of the different strains to gastric fluid (pepsin 1.33%; pH 2) and to bile salts (0.5%), respectively. The result is shown in Figure 3. The 2-factor ANOVA test showed a very high significant difference ($p < 0.001$) between the nine strains with respect to tolerance to the digestive conditions studied. The viability of the strains was higher in the bile salts with survival rates varying between 94.84% and 107.17% throughout the 240 min of the incubation. In contrast, the strain's viability rate with respect to gastric fluid was slightly lower and ranged from 80.37% to 101.27% after the same incubation time. According to the results of Tukey's tests, the strains' viability-rate averages recorded after 240 min of exposure to gastric fluid and bile salts conditions are classified into homogeneous groups according to Tukey's significant difference ($p < 0.05$). The two strains LbN1 and LbN14 were significantly the most tolerant to bile salts with viability rates of 107.17% and 105.17%, respectively. LbN14 was also the most tolerant strain to gastric fluid with a viability rate of 101.27%; on the other hand, LbN1 was less tolerant with a viability rate of 81.35%. There is no significant difference between the two strains LbN11 and LbN9 in the two tolerance tests. The strains LbN10, LbN11, LbN12, and LbN9 form a group of medium bile salt tolerance compared to the other strains. In contrast, regarding gastric fluid tolerance, the medium tolerance group is represented by LbN9, LbN11, LbN13, and LbN15 strains.

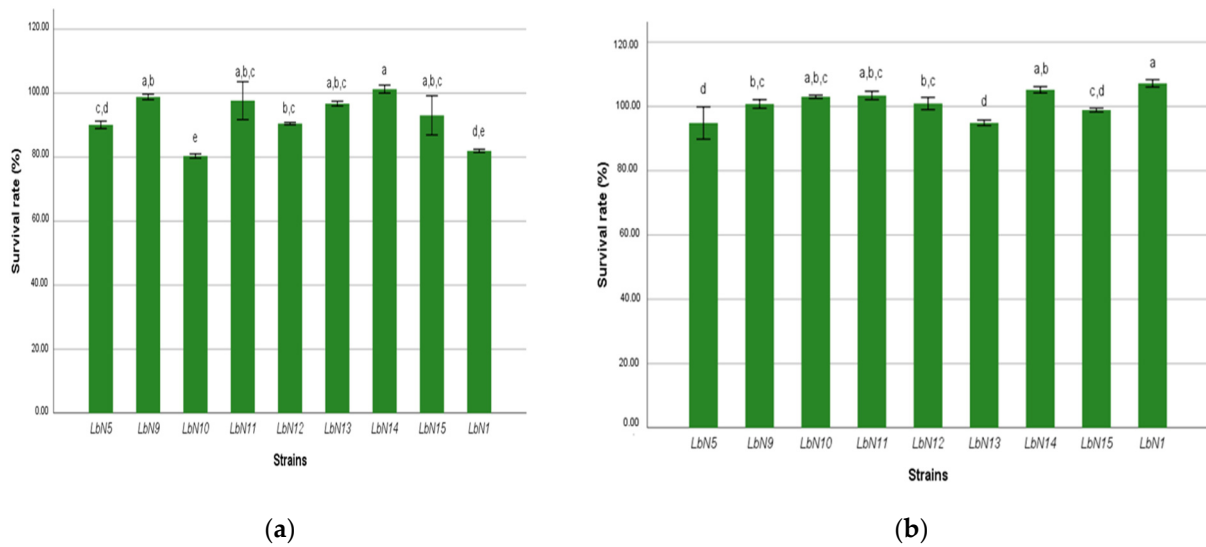


Figure 3. Strain viability rate to gastric fluid and bile salts at 240 min: (a) gastric fluid (pepsin 1.33%); (b) bile salts 0.5%. (ANOVA, $p < 0.001$). a,b,c,d,e: homogeneous groups.

Strain tolerance to digestive enzymes, such as trypsin and pancreatic amylase, was used to evaluate their survival. The results obtained are presented in Figure 4. Tukey's test ($p < 0.05$) classified the strains into four homogeneous groups with respect to enzyme tolerance. All the strains studied showed good viability greater than 90% after 5 h of exposure. There was no significant difference between the LbN1, LbN14, and LbN15 strains, which formed the best trypsin-tolerant group with viability rates of 96, 97.94, and 96.14%, respectively. These same strains also formed the best pancreatic amylase tolerant group with viability rates of 105.07, 99.74, and 99.47% for LbN1, LbN14, and LbN15, respectively. Therefore, these results suggest that the strains can survive in the human gut environment.

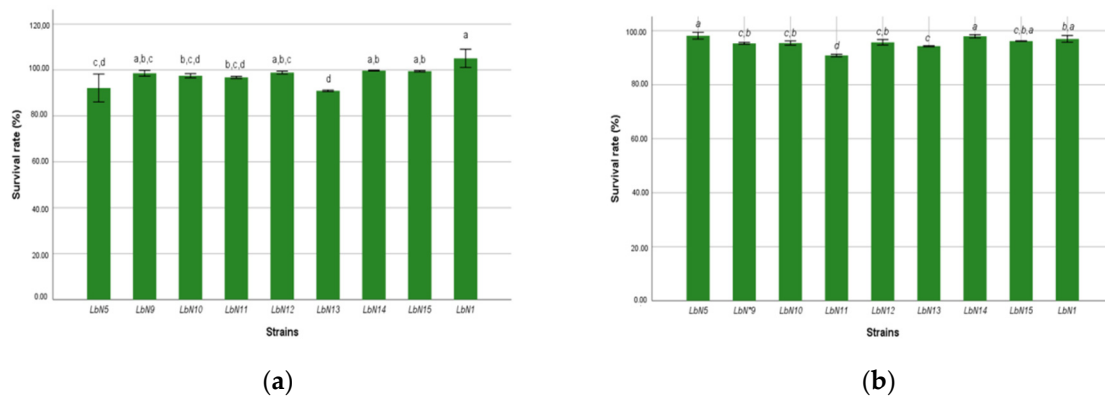


Figure 4. Viability rate of strains to intestinal fluid: (a) pancreatic amylase; (b) Trypsin. (ANOVA, $p < 0.001$). a,b,c,d: homogeneous groups.

3.2.2. Antioxidant Activity

The antioxidant activity of *L. plantarum* strains was determined by the DPPH radical scavenging test. The ANOVA results show a very highly significant difference ($p < 0.001$) between the nine strains with respect to the inhibition of DPPH radical (Figure 5). The Tukey post hoc test was used to classify the strains into homogeneous groups according to their antiradical activity. There was no significant difference between the recorded free radical inhibition percentages of the seven strains LbN15, LbN5, LbN11, LbN01, LbN9, LbN14, and LbN10; ranging from 62.8% to 92.15%. The weakest antiradical activities were recorded by LbN13 (54.96%) and LbN12 (54.35%), which were not significantly different.

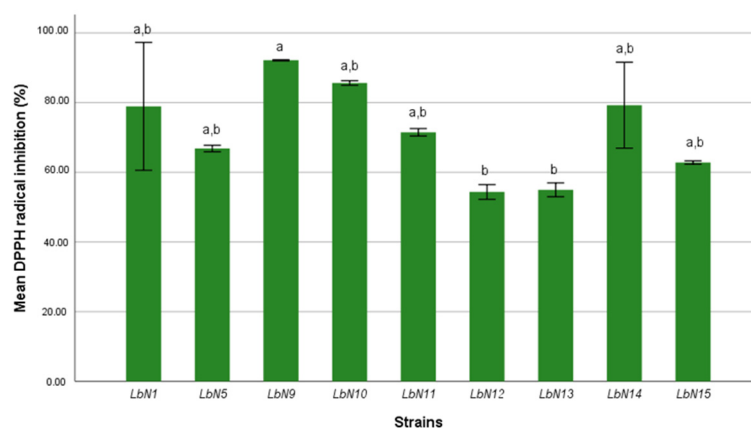


Figure 5. Antioxidant activity of strains of *L. plantarum* estimated by DPPH radical scavenging activity (ANOVA, $p < 0.001$). a,b: homogeneous groups.

3.2.3. Antimicrobial Activity

The results of the disk diffusion test to determine the diameters of the zones of inhibition of the antimicrobial activity of the strains of *L. plantarum* are reported in Table 2. The results of the MANOVA test reveal a significant difference between the different strains with regard to the inhibition of the growth of the different pathogens tested.

Table 2. Antimicrobial activities of isolated LAB strains against six food-borne pathogenic microorganisms.

Isolated LAB Strains	Pathogens/Inhibition Zone (mm)					
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 33862	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>A. niger</i> ATCC 106404
LbN1	13.10 ± 0.36 ^{a,b,c}	14.20 ± 0.72 ^b	12.50 ± 0.5 ^{a,b}	12.03 ± 0.15 ^{b,c}	14.67 ± 0.58 ^{c,d}	6.83 ± 0.76 ^{b,c,d,e}
LbN5	12.07 ± 0.11 ^{b,c}	14.17 ± 0.28 ^b	11.97 ± 0.95 ^{a,b}	13.50 ± 0.50 ^{a,b}	17.00 ± 1.00 ^{a,b}	8.73 ± 0.46 ^{a,b}
LbN9	13.83 ± 0.28 ^{a,b}	14.40 ± 1.21 ^b	13.80 ± 0.38 ^a	13.40 ± 0.52 ^{a,b}	14.17 ± 0.28 ^d	9.00 ± 0.50 ^a
LbN10	14.57 ± 0.40 ^a	15.03 ± 0.55 ^{a,b}	13.10 ± 0.56 ^{a,b}	12.23 ± 1.15 ^b	15.77 ± 0.49 ^{b,c}	8.07 ± 1.10 ^{a,b,c,d}
LbN11	14.67 ± 0.57 ^a	14.80 ± 0.26 ^b	12.10 ± 0.26 ^{a,b}	12.97 ± 0.45 ^{a,b}	15.60 ± 0.60 ^{b,c,d}	4.90 ± 0.36 ^e
LbN12	14.50 ± 0.50 ^a	14.33 ± 1.15 ^b	11.37 ± 0.78 ^b	12.63 ± 0.32 ^{a,b}	14.60 ± 0.52 ^{c,d}	8.33 ± 0.58 ^{a,b,c}
LbN13	11.58 ± 0.95 ^c	16.17 ± 0.76 ^{a,b}	12.40 ± 0.52 ^{a,b}	10.27 ± 0.64 ^c	16.83 ± 0.28 ^{a,b}	7.13 ± 0.32 ^{a,b,c,d}
LbN14	14.49 ± 1.32 ^a	15.77 ± 0.93 ^{a,b}	12.80 ± 0.72 ^{a,b}	14.27 ± 1.10 ^a	17.47 ± 0.45 ^a	6.23 ± 1.12 ^{d,e}
LbN15	14.47 ± 0.55 ^a	17.33 ± 1.15 ^a	12.83 ± 1.60 ^{a,b}	13.80 ± 0.20 ^{a,b}	14.87 ± 0.41 ^{c,d}	6.43 ± 0.51 ^{c,d,e}
<i>p</i> value* (MANOVA test)	0.000	0.003	0.04	0.000	0.000	0.000

* Each value represents the mean ± S.D. Statistical analysis was performed using the MANOVA test followed by Tukey's test.

The Tukey test was undertaken to better appreciate the comparison between the effectiveness of the strains studied. The minimal and maximal inhibition zone diameters recorded in this work are 4.9 and 17.47 mm, respectively. The nine strains showed a large inhibition zone diameter against the pathogenic bacteria tested, except against *Aspergillus niger* ATCC 106404 whose best zone of inhibition is 9 mm (LbN9). Most strains exhibited the same effect on *Bacillus subtilis* ATCC 6633, with inhibition zone diameters ranging from 13.10 to 14.67 mm, except those of LbN5 and LbN13, whose inhibition zones diameters were 12.07 mm and 11.58 mm, respectively. The *L. plantarum* strains were classified into three homogeneous groups with respect to the growth inhibition of *Staphylococcus aureus* ATCC 33862. The largest inhibition zone diameter (14.27 mm) was obtained with LbN14. The strains had an antibacterial effect on both gram-negative and -positive bacteria, but the effect of these strains on *Escherichia coli* ATCC 25922 was less

than that exerted by the different strains on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 with a maximum inhibition zone diameter of 17.33 mm obtained with LbN15. The largest inhibition zone diameter (17.47 mm) was recorded against *Candida albicans* ATCC10231 with the LbN14 strain.

4. Discussion

Raw milk (from cows, goats, buffalos, sheep, camels, and donkeys), as well as human breast milk, are sources of heterogeneous lactic flora, commonly used to isolate new LAB strains with important probiotic potential, which aroused the interest of several research teams around the world [1,25–27]. LABs have a GRAS (Generally Recognized As Safe) status and many probiotic properties, giving them a multitude of opportunities to be used in the food industry [28]. Therefore, the present study seeks to isolate new LAB strains from Algerian cow's milk in order to select those with probiotic properties of interest.

There were nine selected isolates of gram-positive, catalase-negative, and heterofermentative. The 16s rDNA and MALDI-TOF MS showed that these isolates belong to lactobacilli genera, namely *Lacticaseibacillus rhamnosus* "LbN1", *Lactiplantibacillus plantarum* "LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN14, and LbN15" and *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *Argentoratensis* "LbN12". Moreover, there was a species diversity for some isolates that were related to several different species of the same genus and the same percentage. The isolates LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN13, LbN14, and LbN15 were 100% identified as *Lactiplantibacillus plantarum* with the same homology rate as that of the following species: *L. pentosus*, *L. herbarum*, *L. paraplanturum*, *L. fabifermentans*, and *L. argentoratensis*. The isolate LbN12 has shown 99.75% similarity to *Lacticaseibacillus plantarum*, and *L. pentosus*, *L. herbarum*, *L. paraplanturum*, *L. fabifermentans*, and *L. argentoratensis*, respectively; while the LbN1 isolate similarity to *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, and *L. paracasei subsp. tolerans* was about 99.75%. The LbN1 strain belongs to *Lacticaseibacillus rhamnosus* according to the recent *Lactobacillus* taxonomy changes [29]. This classification creates a new opportunity for scientific discovery and reveals that the genus *Lactobacillus* includes 261 species (as of March 2020) that are extremely diverse at the phenotypic, ecological, and genotypic levels. It also proposed the reclassifying of the *Lactobacillus* genus into 25 genera in the *Lactobacillus* genus, signed under group name *Lactobacillus delbrueckii*, *Paralactobacillus* and 23 new genera represented with the names *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companiolactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* and *Lentilactobacillus* [29].

The proteomic results obtained by the MALDI-TOF spectrometry technique were coherent with rRNA 16S identification. Both methods lead to the same result with respect to *Lactobacillus plantarum* versus *Lactiplantibacillus plantarum*. This consistency between the two methods cited was also observed by many other authors who have underlined the MALDI-TOF performance confirming the results of identification of *Lactobacillus* strains by genotyping methods [1,13].

To evaluate the probiotic potential of lactobacilli strains, some criteria were investigated in this work. All strains exhibited good tolerance to the in vitro tests of simulated host gastrointestinal conditions and good resistance against digestive enzymes. Several studies have recorded good viability of LABs, especially *L. plantarum* under different conditions of the gastrointestinal tract. Indeed, Iorizzo et al. [8] showed a high survival rate for 10 strains of *L. plantarum* in the presence of 0.3% of bile salts in an acidic medium (pH 2.5). Fidanza et al. [30] reported that the tolerance of *L. plantarum* species to extreme conditions of the gastrointestinal tract is explained by the use of several mechanisms, such as the rapid recycling of damaged proteins and the expression of phosphofructokinase (pfk) and pyruvate kinase (pyk) for carbohydrate metabolism. These mechanisms play an important role in maintaining intracellular pH for the cellular capacity for homeostasis and

promote resistance to stress from environmental factors. Moreover, strains with probiotic potential must exhibit bile salt tolerance, such as the expression of bile salt hydrolase (BSH), which catalyzes the deconjugation of glycine and taurine residues from cholesterol [31] and has been definitively linked to the tolerance of a number of Lactobacilli species exposed to bile salts [30]. Additionally, the amount of probiotics surviving in transit through the human gut depends on the strain, ingested dose, host-related stressors (acidity, bile salts, etc.), and food carrier [32]. Additionally, Chen et al. [33] revealed for the first time that five new bile salt tolerance-related genes involved in the phosphotransferase system, the two-component system, the carbohydrate metabolic pathway, and malate dehydrogenase can be used as a biomarker to screen for bile-salt-resistant lactobacilli [33].

All the strains showed an important antioxidant activity with the highest DPPH scavenging activity (92.15%) being obtained with the LbN09 strain. These results are in agreement with those of Düz et al. [34] who reported that the highest antioxidant activity exhibited by *L. plantarum* IH14L was 90.34%, while the lowest percentage (58.38) was recorded with the GH8L strain. In the work of Won et al. [35], the highest DPPH radical scavenging activity was recorded for *Lactiplantibacillus plantarum* (60%) and *Lacticaseibacillus paracasei* (75.80%). The antioxidant activity can be explained by the production of cell surface compounds such as strain-produced extracellular polysaccharides and lipoteichoic acid and the existence of enzymes, such as NADH-oxidase, SOD, NADH peroxide and non-heme manganese catalases in LAB bacteria [34,36].

The antimicrobial or antagonistic activity is an important criterion for the selection of probiotics. The production of antimicrobial compounds like bacteriocins, competitive exclusion of pathogens, strengthening the intestinal barrier against pathogens, and boosting the host's immune system to fight off pathogens are all crucial properties of significance [37]. All bacteria exhibit an antibacterial activity strain with inhibition zone diameters ranging from 4.9 mm against *Aspergillus niger* ATCC 106404 to 17.47 mm against *Candida albicans* ATCC 1023. These results are similar to those of Jiang et al. [4] who showed that *L. plantarum* WLPL04 had broad-spectrum activity against gram-positive strains including *Staphylococcus aureus* CMCC26003 and gram-negative strains such as *Pseudomonas aeruginosa* MCC10104. Neutralization of the supernatant permits the elimination of the organic acids effect and indicates the possible existence of other inhibitory agents produced by the lactobacilli tested, which may be hydrogen peroxide, diacetyl, or bacteriocins. Chaalel et al. [22] reported that a *Lactobacillus plantarum* LbM2a strain, isolated from the feces of one-week-old newborns, produced a plantaricin substance that allowed the inhibition of 18 of the 22 indicator strains, including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Bacillus cereus*.

5. Conclusions

A total of nine strains of lactobacilli were isolated from raw cow's milk collected in North-West of Algeria. The combination of genotypic and biomolecular analyses revealed the presence of three different species of lactobacilli bacteria, namely *Lacticaseibacillus rhamnosus* (LbN1), *Lactiplantibacillus plantarum* (LbN5, LbN9, LbN10, LbN11, LbN14, LbN15) and *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *Argentoratensis* (LbN12). The convergence of these two results confirms the reliability of the MALDI-TOF MS as a method of identification. Isolated strains exhibit an appreciable resistance to the host simulated gastric acidity and intestinal conditions (i.e., bile salts and digestive enzymes), and they have relevant antioxidant and antimicrobial activities. The results of this experiment are conclusive regarding the identity of the strains and the in vitro tests of candidacy for probiotic status undergone by the isolated strains. Such properties are in favor of further investigations to strengthen the probiotic status of these strains in order to be used in the food industry.

Author Contributions: Conceptualization, N.K.B. and A.R.; methodology, N.K.B., M.M. and P.G.; software, N.B. and M.B.; validation, A.R., M.B. and P.G.; formal analysis, N.K.B., M.B., M.M. and N.B.; investigation, N.K.B. and M.M.; resources, A.R. and P.G.; data curation, A.R.; writing—original draft preparation, N.K.B. and N.B.; writing—review and editing, N.K.B., P.G. and A.R.; visualization, P.G. and A.R.; supervision, A.R.; project administration, A.R.; funding acquisition, A.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research: grant number DOOL01UN270120190003 and The APC was funded by Nacima Kouadri Boudjelthia.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ait Abdeslam, A.; Desmasure, N.; Bensoltane, A. Identification of indigenous *Lactobacillus* isolated from artisanal Algerian dairy product by 16S rRNA Gene Sequencing and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *South Asian J. Exp. Biol.* **2019**, *9*, 193–206.
2. Oberg, T.S.; McMahon, D.J.; Culumber, M.D.; McAuliffe, O.; Oberg, C.J. Invited review: Review of taxonomic changes in dairy-related lactobacilli. *J. Dairy Sci.* **2022**, *105*, 2750–2770. [[CrossRef](#)]
3. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514. [[CrossRef](#)]
4. Jiang, M.; Zhang, F.; Wan, C.; Xiong, Y.; Shah, N.P.; Wei, H.; Tao, X. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 1736–1746. [[CrossRef](#)]
5. Ito, R.; Mine, Y.; Yumisashi, Y.; Yoshioka, R.; Hamaoka, M.; Taji, T.; Murayama, T.; Nikawa, H. In Vivo Efficacy of *Lactocaseibacillus rhamnosus* L8020 in a Mouse Model of Oral Candidiasis. *J. Fungi* **2021**, *7*, 322. [[CrossRef](#)]
6. Ayyash, M.M.; Abdalla, A.K.; AlKalbani, N.S.; Baig, M.A.; Turner, M.S.; Liu, S.Q.; Shah, N.P. Invited review: Characterization of new probiotics from dairy and non dairy products—Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 8363–8379. [[CrossRef](#)]
7. Mohamad, N.; Manan, H.; Sallehuddin, M.; Musa, N.; Ikhwanuddin, M. Screening of Lactic Acid Bacteria Isolated from Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) as Potential Probiotics. *Aquac. Rep.* **2020**, *18*, 100523. [[CrossRef](#)]
8. Iorizzo, M.; Albanese, G.; Letizia, F.; Testa, B.; Tremonte, P.; Vergalito, F.; Lombardi, S.J.; Succi, M.; Coppola, R.; Sorrentino, E. Probiotic Potentiality from Versatile *Lactiplantibacillus plantarum* Strains as Resource to Enhance Freshwater Fish Health. *Microorganisms* **2022**, *10*, 463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lee, H.A.; Bong, Y.J.; Kim, H.; Jeong, J.K.; Kim, H.Y.; Lee, K.W.; Park, K.Y. Effect of nanometric *Lactobacillus plantarum* in kimchi on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J. Med. Food* **2015**, *18*, 1073–1080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Cai, Z.; Wang, S.; Li, J. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. *Front. Med.* **2021**, *8*, 765474. [[CrossRef](#)]
11. Hammes, W.P.; Vogel, R.F. The genus *Lactobacillus*. In *Lactic Acid Bacteria*; Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H., Eds.; Blackie Academic and Professional: London, UK, 1995; Volume 2, pp. 19–54.
12. Clarridge, J.E., III. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 840–862. [[CrossRef](#)]
13. Nacef, M.; Chevalier, M.; Chollet, S.; Drider, D.; Flahaut, C. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *247*, 2–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. De Man, J.C.; Rogosa, M.; Sharpe, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **1960**, *23*, 130–135. [[CrossRef](#)]
15. Nübel, U.; Engelen, B.; Felske, A.; Snaidr, J.; Wieshuber, A.; Amann, R.I.; Ludwig, W.; Backhaus, H. Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5636–5643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Niyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]
17. Saitou, N.; Nei, M. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406–425. [[CrossRef](#)]
18. Pinto, M.G.V.; Franz, C.M.; Schillinger, U.; Holzapfel, W.H. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *109*, 205–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sensoy, I.A. review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Curr. Res. Food Sci.* **2021**, *4*, 308–319. [[CrossRef](#)]
20. Hyronimus, B.; Le Marrec, C.; HadjSassi, A.; Deschamps, A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *61*, 193–197. [[CrossRef](#)]

21. Ouwehand, A.C.; Tölkö, S.; Salminen, S. The Effect of Digestive Enzymes on the Adhesion of Probiotic Bacteria In Vitro. *J. Food Sci.* **2001**, *66*, 856–859. [[CrossRef](#)]
22. Chaalel, A.; Riazi, A.; Dubois-Dauphin, R.; Thonart, P. Screening of plantaricin EF and JK in an Algerian *Lactobacillus plantarum* isolate. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2015**, *5*, 474–482. [[CrossRef](#)]
23. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable Free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200. [[CrossRef](#)]
24. Yu, Z.; Morrison, M. Comparisons of Different Hypervariable Regions of rrs Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4800–4806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Maragkoudakis, P.A.; Zoumpopoulou, G.; Miaris, C.; Kalantzopoulos, G.; Pot, B.; Tsakalidou, E. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 189–199. [[CrossRef](#)]
26. Akhmetsadykova, S.H.; Baubekova, A.; Konuspayeva, G.; Akhmetsadykov, N.; Faye, B.; Loiseau, G. Lactic acid bacteria biodiversity in raw and fermented camel milk. *Afr. J. Food Sci. Technol.* **2015**, *6*, 84–88. [[CrossRef](#)]
27. Keddar, K.; Ziar, H.; Belmadani, N.; Monnoye, M.; Gérard, P.; Riazi, A. Probiotic Bacteria from Human Milk Can Alleviate Oral Bovine Casein Sensitization in Juvenile Wistar Rats. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1030. [[CrossRef](#)]
28. Gasser, F. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur* **1994**, *92*, 45–67.
29. Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C.M.; Harris, H.M.; Mattarelli, P.; O'Toole, P.W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 2782–2858. [[CrossRef](#)]
30. Fidanza, M.; Panigrahi, P.; Kollmann, T.R. *Lactiplantibacillus plantarum*–Nomad and Ideal Probiotic. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 712236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Pfeiler, E.A.; Klaenhammer, T.R. Role of Transporter Proteins in Bile Tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 6013–6016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ziar, H.; Gérard, P.; Riazi, A. Effect of prebiotic carbohydrates on growth, bile survival and cholesterol uptake abilities of dairy-related bacteria. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *94*, 1184–1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chen, C.; Yu, L.; Tian, F.; Zhao, J.; Zhai, Q. Identification of Novel Bile Salt-Tolerant Genes in *Lactobacillus* Using Comparative Genomics and Its Application in the Rapid Screening of Tolerant Strains. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2371. [[CrossRef](#)]
34. Düz, M.; Doğan, Y.N.; Doğan, İ. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* strains isolated from fermented Turkish Sucuk. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2020**, *92*, e20200105. [[CrossRef](#)]
35. Won, G.Y.; Choi, S.I.; Park, N.Y.; Kim, J.E.; Kang, C.H.; Kim, G.H. In Vitro Antidiabetic, Antioxidant Activity, and Probiotic Activities of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lacticaseibacillus paracasei* Strains. *Curr. Microbiol.* **2021**, *78*, 3181–3191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Zhang, S.; Liu, L.; Su, Y.; Li, H.; Sun, Q.; Liang, X.; Lv, J. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2011**, *5*, 5194–5201. [[CrossRef](#)]
37. Fijan, S. Probiotics and Their Antimicrobial Effect. *Microorganisms* **2023**, *11*, 528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.