

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

Faculté des Sciences de la Nature  
et de la Vie  
Département de Microbiologie  
Appliquée et Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و  
علوم التغذية

Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme :

**Master Académique en Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière: Sciences Biologiques**

**Option : Microbiologie Appliquée**

**Thème**

**Screening des bactéries lactiques productrices d'EPS  
isolées des produits alimentaires et évaluation de leurs  
potentielle probiotique**

**Membres de Jury**

**Présidente : Dr. AYAD RIMA**

**Examinatrice : Dr. AIT MEDDOUR AMEL**

**Encadrante : Dr. BOURIDANE HAMIDA**

**Présenté par**

**M<sup>elle</sup> Khen Loubna**

**M<sup>elle</sup> Lounis Sounia**

**Année Universitaire 2022-2023**

**Numéro d'ordre (bibliothèque) : .....**



On remercie **Allah** le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire. Nous tenons à remercier vivement notre promotrice **Dr Bouridane Hamida**, d'avoir accepté de nous encadrer en nous donnant confiance afin de réaliser ce modeste travail, dont tout le mérite lui revient. On l'a remercié pour son aide et ses remarques ainsi que tous les conseils qu'elle n'a cessé de nous prodiguer tout au long de ce travail.

Nous tenons à remercier vivement **Dr AYAD. R** d'avoir accepté de présider le jury de soutenance. Nos vifs remerciements s'adressent aussi à **Dr AIT MEDDOUR. A** d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos remerciements s'adressent également à tous les membres de l'équipe du laboratoire de microbiologie appliquée, leur qualités humaine et scientifique ont été indispensables pour mener à bien ce travail.

Nos remerciements vont également à nos enseignants qui nous ont accompagnés pendant notre cursus universitaire.

Enfin, on adresse nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

**\*Merci\***

# *Dédicaces*

*Nous devons l'aboutissement de ce mémoire à de nombreuses personnes.*

*C'est avec immense fierté et respect que je dédie ce modeste travail : A ceux qui donnent un sens à mon existence, à la lumière de mes yeux en témoignage de votre affection et de votre amour, pour votre patience et votre soutien pendant les moments que j'ai traversé, **A ma très chère mère Razika et Mon très cher père Mohammed.** J'espère Que dieu vous protège et vous garde*

***A mes chères sœurs :** Malika et Lyna pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*

***A mes chers frères :** Bilal et Zakaria pour leur appui et leur encouragement.*

***A ma chère amie :** Fatiha , Ratiba , Madjda et khadidja*

*Enfin, je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail*

*A vous tous, un grand Merci.*



–Loubna–

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures .....	ii
Liste des photos .....	iii
Liste des tableaux .....	iv

## ***I. Synthèse bibliographique***

Introduction .....	1
I. 1. Bactéries lactiques .....	3
I.1.1. Historique .....	3
I.1.2. Définition et caractéristiques .....	3
I.1.3. Habitat et origine .....	3
I.1.4. Taxonomie et classification .....	3
I.1.5. Voies fermentaire .....	5
I.1.5.1. Bactéries homo-lactiques.....	5
I.1.5.2. Bactéries hétéro-lactiques.....	6
I.2. Probiotiques .....	7
I.2.1. Généralités .....	7
I.2.2. Principaux microorganismes.....	7
I.2.3. Critères de sélection .....	8
I.2. 3.1. Critères de sécurité .....	8
➤ Origine.....	8
➤ Identification de la souche.....	8
➤ Innocuité.....	9
➤ Résistance aux antibiotiques.....	9
I.2.3.2. Critères fonctionnelle .....	9
➤ Activité antimicrobienne.....	9
➤ Résistance aux sels biliaires et aux acides gastriques.....	9
➤ Adhésion aux cellules épithéliales.....	10
I.2.3.3. Critères technologiques .....	10
I.2.4. Effet des probiotiques sur la santé humaine .....	11
I.3. Exopolysaccharides .....	12
I.3.1.Exopolysaccharides des bactéries lactiques.....	12
I.3.2.Structure et composition des exopolysaccharides.....	12
I. 3.3. Classification des exopolysaccharides .....	13
I.3.3.1Classification selon la composition chimique.....	14
I.3.3.2.Classification selon leur fonctionnalité.....	15
I.3. 4. Rôle des exopolysaccharides.....	15

## ***II. Matériel et méthodes***

II.1 Objectifs et lieu de l'étude.....	17
II.2. Matériel.....	17
II.2.1 Matériel biologique.....	17
II.2.1. Matériel non biologique.....	17
II.3. Méthodes.....	17
II.3.1. Isolement et purification des bactéries lactiques.....	17
II.3.3. Conservation des isoalts.....	18
II.3.4. Production des exopolysaccharides.....	19
II.3.4.1. Screening des isolats productrices d'exopolysaccharides.....	19
II.3.4.2. Extraction des EPS.....	19
II.3.4. 3. Quantification des EPS.....	19
II.3.5. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques.....	20
II.3.5.1. Résistance aux pH gastrique.....	20
II.3.5.2. Résistance aux sels biliaires .....	20
II.3.5. 3. Adhérence sur tube de verre .....	20
II.3.5. 4. Test d'auto-agrégation et de co-agrégation .....	21
II.3.5. 5. Test d'hydrophobicité.....	21
II.3.5. 6. Adhésion aux cellules épithéliales.....	22
II.3.5. 7. Recherche de la productrices d'eau oxygénée par les isolats.....	22
II.3.5. 8. Pouvoir acidifiant.....	23
II.3.5. 9. Activité antibactérienne et effet des surnageant.....	23
II. 3.6. Evaluation de l'aspect sécuritaire.....	23
II. 3.6.1. Activité hémolytique.....	23
II. 3.6.2. Résistance aux antibiotiques .....	24

## ***III. Résultats et discussion***

III.1. Isolement et purification des bactéries lactiques.....	25
III.2. Production d'exopolysaccharides.....	28
III.2.1. Screening des souches productrices des EPS.....	28
III.2.2. Quantification d'Exopolysaccharides.....	30
III.3. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques.....	32
III.3.1. Résistance aux PH gastrique.....	32
III.3.2. Résistance aux sels biliaires.....	33
III.3.3. Adhérence sur tube de verre.....	34
III.3.4. Capacité d'auto-agrégation/co-agrégation.....	35
III.3.5. Test d'hydrophobicité.....	38
III.3.6. Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial intestinal.....	40
III.3.7. Recherche de la productrices d'eau oxygénée par les isolats .....	41
III.3.8. Pouvoir acidifiant.....	43
III.3.9. Activité antibactérienne et effet des surnageants.....	44
III. 4. Evaluation de l'aspect sécuritaire.....	47

III. 4.1. Activité hémolytique.....	47
III. 4.2. Résistance aux antibiotiques.....	48
Conclusion.....	51
Références bibliographiques.....	52

Annexes

Résumé

**ATCC:** American type culture collection

**DZI :** diamètres des zones d'inhibition

**GRAS:** Generally Recognized As Safe

**MRS :** Man-Rogosa et Sharp

**NADH:** Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide.

**ROS:** Espèces réactive d'oxygène

**PBS :** Phosphate Buffer Salin

**Rpm :** Rotation par minute

**TCA :** Trichloro acetic acid solution

<b>Figure 1</b> : Aperçu schématique de la phylogénie des bactéries lactiques.....	4
<b>Figure 2</b> : Voies de dégradation du glucose par les bactéries lactiques.....	6
<b>Figure 3</b> : Mécanismes d'adhésion aux cellules épithéliales.....	10
<b>Figure 4</b> : Classification des EPS en fonction de leur composition, du type de liaison et de l'orientation du carbone impliqué dans la liaison.....	14
<b>Figure 5</b> : Répartition de la production d'EPS des isolats lactiques.....	30
<b>Figure 6</b> : Concentration des EPS produit par les quatre isolats lactiques.....	31
<b>Figure 7</b> :Taux de survie des isolats lactiques sur milieu acide PH 2.....	32
<b>Figure 8</b> : Taux de survie des isolats en présence de sels biliaires 0,3%.....	33
<b>Figure 9</b> : Pourcentage d'auto-agrégation des quatre isolats lactiques.....	35
<b>Figure 10</b> : Pourcentages de coagrégation des quatre isolats lactiques avec <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
<b>Figure 11</b> : Pourcentage d'hydrophobicité des quatre isolats lactiques vis-à-vis du xylène.....	39



<b>Photo 1 :</b> Observation macroscopique des colonies lactiques sur gélose MRS.....	25
<b>Photo 2 :</b> Photomicrographie des isolats lactiques après coloration de Gram.....	26
<b>Photo 3 :</b> Aspect des colonies de quelques isolats lactiques.....	28
<b>Photo 4 :</b> Adhérence des isolats lactiques .sur tube de verre.....	34
<b>Photo 5 :</b> Photomicrographie de l’auto-agrégation des quatre isolats lactiques (G×100).....	36
<b>Photo 6 :</b> Photomicrographie de la co-agrégation de isolat lactique RI2 avec <i>P. aeruginosa</i> (Gx100).....	37
<b>Photo 7 :</b> Photomicrographie d’adhésion de l’ isolat RI2 aux cellules épithéliales.....	40
<b>Photo 8 :</b> Identification de la production de peroxyde d'hydrogène des quatre isolats lactiques.....	42
<b>Photo 9 :</b> Résultats de l'activité antibactérienne des isolats lactiques.....	46
<b>Photo 10 :</b> Zones $\gamma$ -hémolyse des quatre isolats comparés à un exemple.....	47
<b>Photo 11 :</b> Zones d’inhibition des quatre isolats avec les 17 antibiotiques testés .....	48

<b>Tableau 1.</b> Familles et genres de bactéries lactiques.....	5
<b>Tableau 2.</b> Principales espèces utilisées comme probiotique à usage humain.....	7
<b>Tableau 3 .</b> Structure et fonction de quelques EPS LAB.....	13
<b>Tableau 4.</b> Caractéristiques comparatives des homo et des hétéropolysaccharides produits par les bactéries lactiques.....	15
<b>Tableau 5.</b> Mode d'action des exopolysaccharides.....	16
<b>Tableau 6 .</b> Critères macroscopiques et microscopiques des isolats lactiques.....	27
<b>Tableau 7.</b> Résultats du test de production des EPS sur gélose hypersaccharosée et gélose MSE.....	29
<b>Tableau 8 .</b> Résultats des tests d'adhérence sur tube de verre.....	35
<b>Tableau 9.</b> Variation du pH du surnageant des cultures dans 24H.....	43
<b>Tableau 10.</b> Diamètres des zones d'inhibitions (mm) cultures et surnageants des isolats lactiques vis-à-vis des souches pathogènes.....	44
<b>Tableau 11.</b> Résultats d'antibiogramme des quatre isolats testés.....	49



# ***Introduction***

Les bactéries lactiques (BL) sont omniprésentes dans la nature et isolées dans un large éventail d'habitats, y compris les produits laitiers fermentés et non fermentés, les légumes, les fruits et le miel (**Adikari et al., 2021 ; Guo et al., 2022**).

L'isolement des BL et leur caractérisation à partir de sources naturelles indigènes ou d'aliments traditionnels et les produits laitiers ont suscité un intérêt croissant de la part des chercheurs au cours des dernières années (**Mgbodile et al., 2023**).

Naturellement, les bactéries lactiques produisent divers métabolites bénéfiques (**Kavitake et al., 2023**) tels que les acides organiques, les antioxydants et des peptides antimicrobiens qui contribuent à un meilleur équilibre microbien intestinal, à une meilleure digestion, à l'atténuation des symptômes de constipation et au renforcement de la barrière muqueuse. Les isolats des bactéries lactiques probiotiques peuvent également avoir des effets anticancéreux, antiallergiques ou antidiabétiques (**Plavec et al., 2020**). Par conséquent, les BL dont les activités bénéfiques pour la santé ont été démontrées leurs compétences probiotiques doivent être évaluées avant d'être utilisées dans les aliments ou les médicaments (**Ferdouse et al., 2022**).

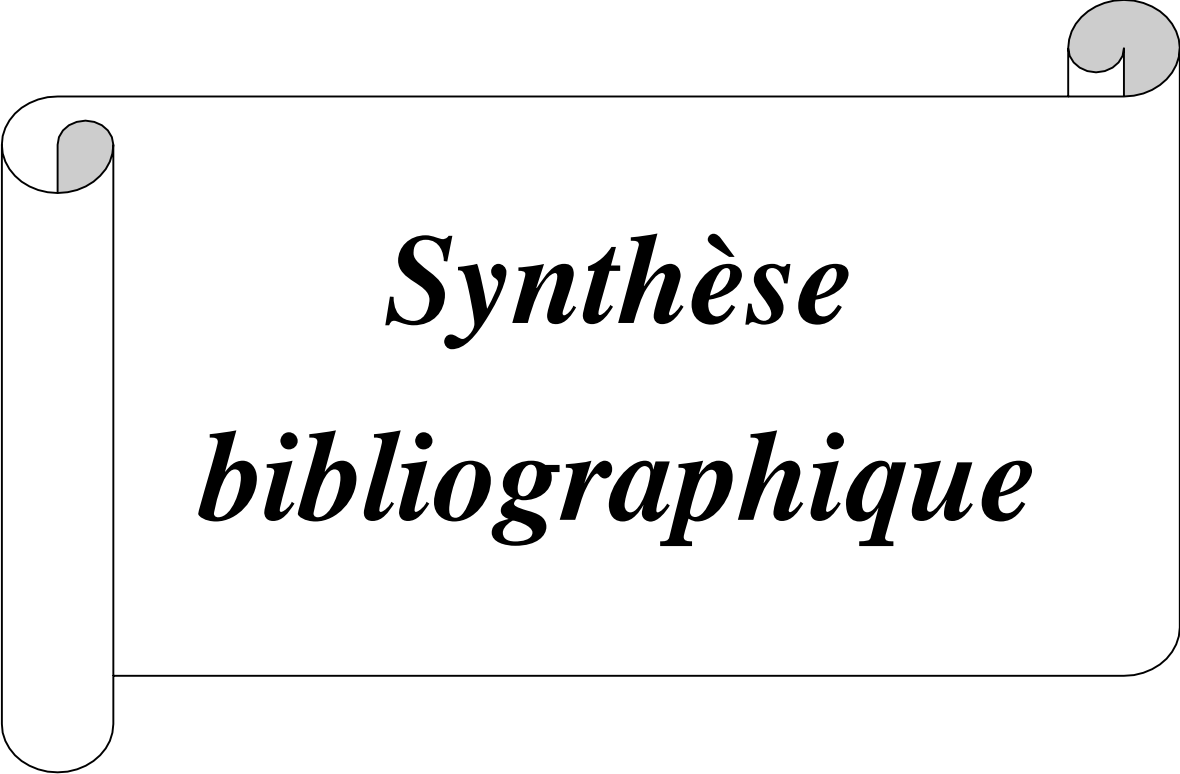
L'un des principaux avantages des probiotiques est leurs capacité d'inhiber les micro-organismes pathogènes et leurs détérioration par divers mécanismes, notamment l'inhibition de leurs adhérence aux cellules épithéliales, la sécrétion de composés antimicrobiens et la modulation du système immunitaire (**Plaza-Diaz et al., 2019**). Cela justifie leur utilisation dans la bio-conservation des aliments et des produits thérapeutiques (**Prabhurajeshwar., 2017**).

Ces dernières années, avec l'intérêt croissant des biomolécules naturelles, les exopolysaccharides (EPS) d'origine microbienne, en particulier les EPS produits par les bactéries lactiques potentiellement probiotiques présentent un champ de recherche intéressant. Ces substances biologiques ont des diversités structurelles et physico-chimiques ainsi que de nombreuses applications biologiques incluent des propriétés fonctionnels antioxydantes, antimicrobiennes, anticancéreuses, de cicatrisation des plaies, immunomodulatrices et prébiotiques (**Kavitake et al., 2023**).

Ces EPS sont bio-fonctionnels pour la conservation des aliments, la sécurité alimentaire et d'autres revendications de santé (**Zhang et al., 2023**).

Notre travail est structuré en trois parties ;

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour d'un premier chapitre reprenant des connaissances actuelles sur les bactéries lactiques, d'un deuxième chapitre qui donne une vue générale sur les probiotiques, et d'un troisième chapitre sur les exopolysaccharides des BL.
- Dans la seconde partie nous exposons le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation des objectifs de notre travail. Elle comporte l'isolement et la purification des bactéries lactiques à partir de quatre niches alimentaires ; lait de vache fermenté, lait de chèvre, le miel naturel et vinaigre de cidre. ainsi que la sélection des isolats producteurs des exopolysaccharides suivi d'une série de tests qui évalue le potentiel probiotique de nos isolats sélectionnés.
- La troisième partie du manuscrit est consacrée aux résultats et discussion et une conclusion générale résumera les principaux acquis de ce travail.



*Synthèse*  
*bibliographique*

## **I. 1. Bactéries lactiques**

### **I.1.1. Historique**

Depuis plus de 4000 ans, Carl Wilhelm Scheele était le premier qui a découverts les bactéries lactiques (BL) en isolant l'acide lactique du lait aigre. En 1857, Pasteur a découvert que des micro-organismes étaient impliqués dans la production d'acide lactique. En 1881, M/s Clinton processing company (USA) était la première qui a commercialisé l'acide lactique par des procédés de fermentation, après 1980, les chercheurs ont observé l'application généralisée de ces bactéries lactiques dans le domaine de la biomédecine et de la conservation des aliments (**Gupta et al., 2018**).

### **I.1.2. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques**

Les BL constituent un groupe hétérogène de microorganismes caractérisé par la production de l'acide lactique comme produit final à partir de la fermentation des carbohydrates (**Mozzi et al., 2010**).

Elles sont des procaryotes, Gram-positives, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont le plus souvent immobiles, tolérantes aux acides et non sporulées, catalase négative, oxydase négative, anaérobies facultatives, micro-aérophiles, cocci à bâtonnets (**Savado et Traore., 2011 ; Szutowska., 2020**).

### **I.1.3. Habitat et origine des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont généralement associées à des habitats riches en nutriments (**Kathiriya et al., 2018**). Elles se retrouvent dans les matières végétales et les fruits en décomposition, dans les produits laitiers, la viande et le poisson fermentés, les céréales, les betteraves, les légumes marinés, le levain, les ensilages, les boissons fermentées, les jus, les eaux usées et dans les cavités des humains et des animaux. Chez les humains, elles habitent particulièrement la cavité orale, l'iléon, le côlon et sont les microorganismes dominants dans le vagin (**Mokoena., 2017**).

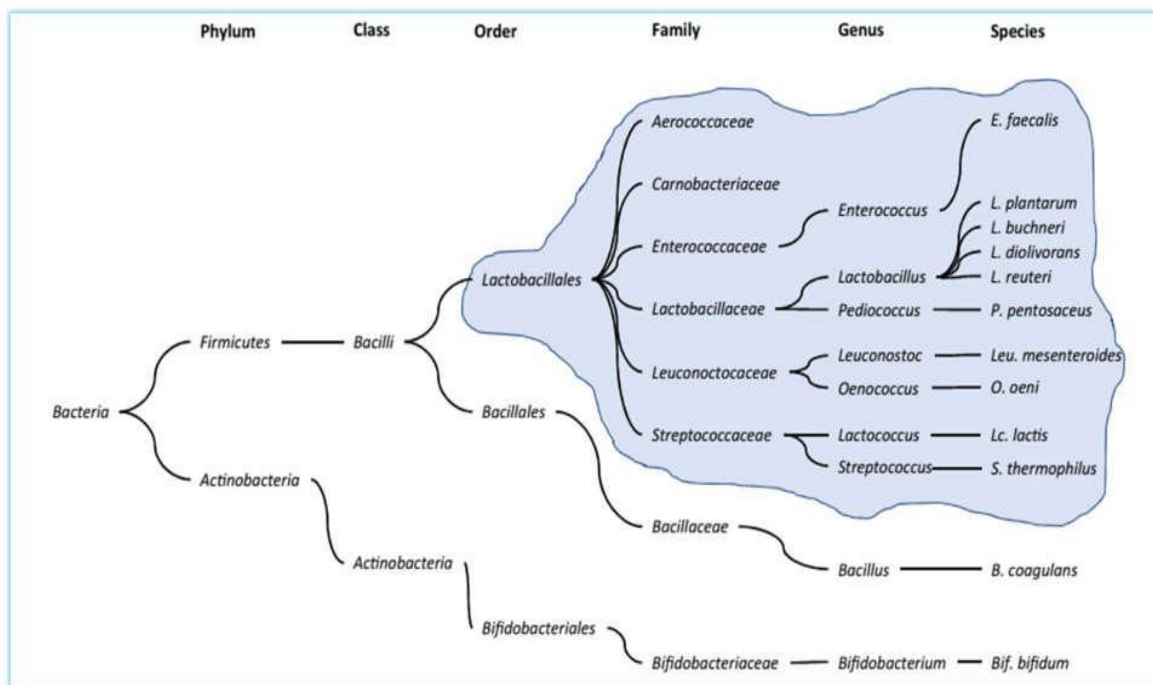
### **I.1.4. Taxonomie et classification**

La première classification des BL a été établie en 1919 par Orla-Jensen. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Cette classification a été complétée par la taxonomie moléculaire (**Ludwig et al., 2008**).

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures,

l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (Ayivi *et al.*, 2020). La classification actuelle requiert l'incorporation de plusieurs méthodes modernes telles que l'analyse de la paroi cellulaire, les protéines cytoplasmiques solubles, et l'analyse de certains enzymes par électrophorèse. Ces méthodes ont fourni plus de précision à ce groupe. Des techniques moléculaires ont été également utilisées pour la distinction intra-spécifique des espèces (Liu *et al.*, 2014).

Les bactéries lactiques sont trouvées dans deux phylums distincts (Figure 1), à savoir le firmicutes et *Actinobacteria* (Liu *et al.*, 2014 ; Mattarelli *et al.*, 2014).



**Figure 1** : Aperçu schématique de la phylogénie des bactéries lactiques (Sauer *et al.*, 2017).

Selon la dernière édition de *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales* (Tableau 01) renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae* (König et Fröhlich., 2017). Elles sont caractérisées par un faible contenu en guanine et cytosine (GC de 31 à 49%). Au sein du phylum *Actinobacteria*, on trouve le genre *Bifidobacterium*, qui a une teneur élevée en GC (58 à 61%) (Horvath *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014).



**Tableau 01.** Familles et genres de bactéries lactiques (Liu *et al.*, 2014;Mattarelli *et al.*, 2014 ;Felis *et al.*, 2016)

Famille	Genres
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus, Abiotrophia, Aerococcus, Dolosicoccus, Eremococcus, Facklamia, Globicatella, Ignavigranum</i>
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Agitococcus, Alkalibacterium, Allofustis, Alloiococcus, Atopobacter, Atopococcus, Atopostipes, Carnobacterium, Desemzia, Dolosigranulum, Granulicatella, Isobaculum, Lacticigenium, Marinilactibacillus, Pisciglobus, Trichococcus</i>
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Bavariicoccus, Catellicoccus, Enterococcus, Melissococcus, Pilibacter, Tetragenococcus, Vagococcus</i>
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus, Pediococcus</i>
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc, Fructobacillus, Oenococcus, Weissella</i>
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus, Lactovum, Streptococcus</i>
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Aeriscardovia, Alloscardovia, Bifidobacterium, Gardnerella, Metascardovia, Parascardovia, Scardovia</i>

La taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces augmente (Pot., 2008). Actuellement, la famille des *Lactobacillaceae* contient *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, et 23 nouveaux genres (Zheng *et al.*, 2020 ;Ayivi et Ibrahim., 2022).

### I.1.5.Voies fermentaire des bactéries lactiques

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (Figure 02). Il s'agit des voies homofermentaire (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Ayivi et Ibrahim., 2022).

#### I.1.5.1. Bactéries homo-lactiques

Les bactéries lactiques homofermentaire (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, et certaines espèce *Lactobacillus* ) fermentent les sucres par la Embden- Meyerhoff -Parnas ( EMP ) voie de pyruvate , qui est transformé en acide lactique par lactate déshydrogénase (Mayo *et al.*, 2010).

### I.1.5. 2.Bactéries hétéro-lactiques

Les BL hétérofermentaires tels que *Leuconostoc*, *Oenococcus* et certaines espèces de *Lactobacillus* fermentent le sucre généralement par la voie de la phosphokétolase.

La fermentation des pentoses (xylose et ribose) conduit à la formation de pyruvate et l'acétyl- P et leur conversion ultérieure en lactate et acétate, respectivement. Les hexoses (glucose, fructose, mannose) chez ces bactéries peuvent être converties en le lactate, CO<sub>2</sub> et en éthanol (Mayo *et al.*, 2010).

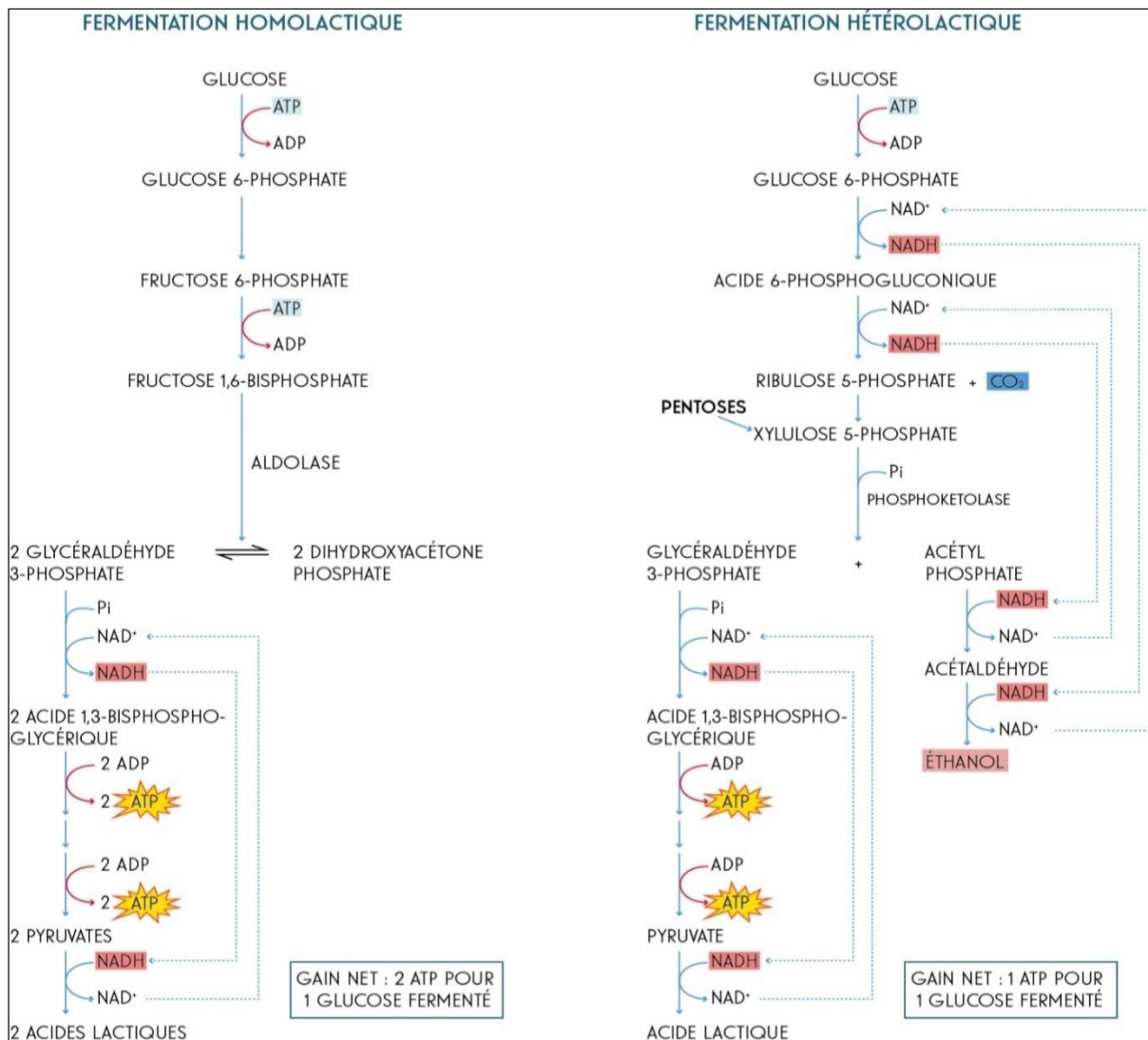


Figure 2 : Voies de dégradation du glucose par les bactéries lactiques (Ayivi et Ibrahim.,2022).

## I.2. Probiotiques

### I.2.1. Généralités

La naissance des probiotiques a été souvent liée aux travaux du scientifique **Elie Metchnikoff** qui a reçu le prix Nobel en **1907**, lorsqu'il a remarqué que la longévité et la bonne santé des paysans Bulgares est liée à la consommation des produits laitiers fermentés. Plus tard, il a constaté que l'ingestion des bactéries lactiques influençait positivement sur la microflore intestinale en réduisant la population des bactéries putrifiantes ou produisant des toxines dans le tube digestif, ce qui améliore l'hygiène digestive, et donc augmente l'espérance de vie (**Gogineni et al., 2013**).

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs "*pros*" et "*bio*" qui signifient littéralement "pour la vie" ou « en faveur de la vie », contrairement au terme antibiotique signifiant "contre la vie" (**Nataraj et Mallappa., 2021**). En 2002, un groupe mixte FAO/OMS a défini les probiotiques comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (**Greeshma et al., 2022 ; Yan et Goldman., 2020**).

### I.2.2. Microorganismes probiotiques

Les produits probiotiques peuvent contenir une ou plusieurs souches microbiennes sélectionnées (**Tableau 2**).

**Tableau 2.** Principales espèces utilisées comme probiotique à usage humain (**Markowiak et Śliżewska ., 2017**).

<i>Autres microorganismes</i>	<i>Autres bactéries lactiques</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>L. amylovorus</i>
<i>(boulardi)</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. casei</i>
		<i>B. breve</i>	<i>L. gasseri</i>
		<i>B. infantis</i>	<i>L. helveticus</i>
		<i>B. longum</i>	<i>L. johnsonii</i>
			<i>L. pentosus</i>
			<i>L. plantarum</i>
			<i>L. reuteri</i>
			<i>L. rhamnosus</i>

Les micro-organismes probiotiques humains appartiennent principalement aux genres suivants : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. En outre, des souches de bactéries à Gram positif appartenant au genre *Bacillus* et certaines souches de levure appartenant au genre *Saccharomyces* sont couramment utilisées dans les produits probiotiques (Markowiak et Śliżewska., 2017).

### **I.2.3. Critères de sélection**

Selon les suggestions de l'OMS, de la FAO et de l'EFSA (l'Autorité européenne de sécurité des aliments), dans leur processus de sélection, les souches probiotiques doivent répondre à des critères de sécurité et de fonctionnalité, ainsi qu'à des critères liés à leur utilité technologique (Markowiak et Śliżewska., 2017).

#### **I.2. 3.1. Critères de sécurité**

##### **➤ L'origine**

Les souches probiotiques peuvent être isolées à partir de différentes sources telles que les aliments fermentés, les animaux et les êtres humains. Toutefois, pour qu'une souche probiotique soit considérée comme utilisable par l'homme, elle doit être isolée de la microflore humaine (Ayivi *et al.*, 2020) ; comme le gros intestin humain, l'intestin grêle ou le lait maternel, ou d'origine animale ; comme le lait cru et les aliments fermentés (Shewale *et al.*, 2014).

##### **➤ Identification de la souche**

Selon les lignes directrices de l'OMS/FAO, les probiotiques sont spécifiques à une souche et doivent donc être identifiés au niveau du genre, de l'espèce et de la souche (Shewale *et al.*, 2014). L'identification des souches, qui se fait par des méthodes phénotypiques et génotypiques, est importante pour relier une souche à un effet spécifique sur la santé ainsi que pour permettre une surveillance précise et des études épidémiologiques (Wedajo., 2015).

Plusieurs méthodes moléculaires peuvent être utilisées pour l'identification des espèces et la différenciation des souches microbiennes (l'électrophorèse en champ pulsé, le séquençage des gènes de l'ARNr 16S, le profilage des protéines, le ribotypage, la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) classique, l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe et la PCR palindromique à éléments répétitifs) (Shokryazdan *et al.*, 2017).

➤ **Innocuité**

La FAO et l'OMS considèrent qu'il est important de procéder à une évaluation minimale de la sécurité, notamment en ce qui concerne la résistance aux antibiotiques, la production de métabolites spécifiques tels que le d-lactate et l'ammoniaque, les effets secondaires chez l'homme, la production de toxines et l'hémolyse potentielle, même pour les populations microbiennes classées GRAS (**kang et al., 2019**).

➤ **Résistance aux antibiotiques**

Les BL sont naturellement résistantes à de nombreux antibiotiques en raison de leur structure et de leur physiologie. Dans la plupart des cas, la résistance n'est pas transmissible, cependant il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autres espèces et genres. C'est une raison importante pour choisir les souches manquantes de transfert de résistance potentiel (**Samedi et Charles., 2019**).

### **I.2.3.2. Critères fonctionnelle**

➤ **Activité antimicrobienne**

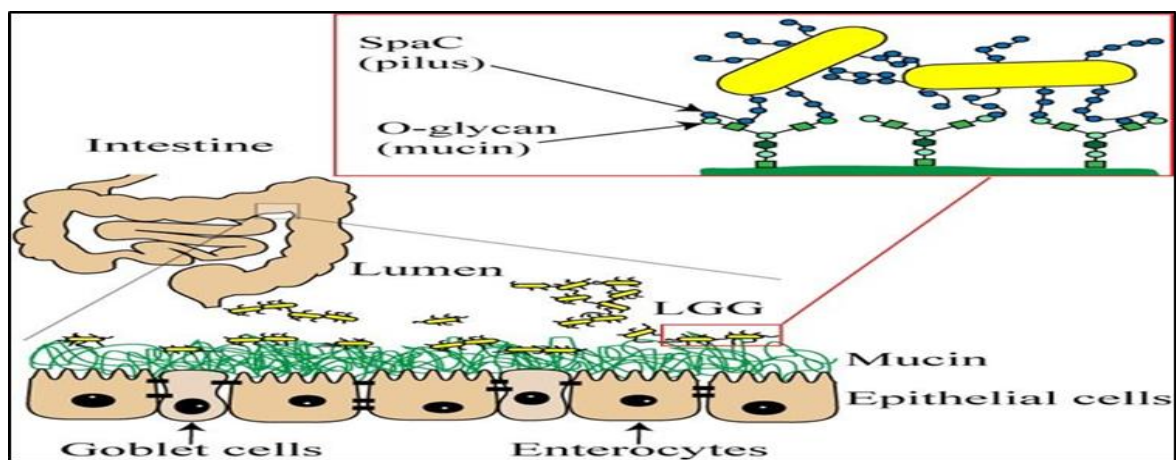
L'activité antimicrobienne contre les pathogènes est un autre aspect important qui doit être pris en compte pour la sélection des souches potentiellement probiotiques. Bien que la production de composés antimicrobiens puisse le principal mécanisme de l'activité antimicrobienne des souches probiotiques, il existe d'autres mécanismes tels que tels que la concurrence entre les souches probiotiques et les souches pathogènes pour les nutriments, l'attachement aux cellules épithéliales et la stimulation du système immunitaire (**Shokryazdan et al., 2017**).

➤ **Résistance aux sels biliaries et aux acides gastriques**

Après ingestion, les cellules probiotiques sont confrontées à des facteurs antimicrobiens dans l'estomac (faible pH, jus gastrique et pepsine) et l'intestin (pancréatine et sels biliaries). Le probiotique doit posséder des mécanismes de tolérance ou d'exclusion de l'acide et de la bile pour survivre dans l'intestin .La résistance gastro-intestinale varie selon les espèces par exemple, les *Lactobacilles* sont largement résistants, tandis que les *Bifidobactéries* sont extrêmement sensibles à un pH faible, présentant des taux de survie faibles ou nuls à pH 2 et pH3 (**Fontana et al., 2013 ; De Melo Pereira et al., 2018**). En résumé, un pH compris entre 2 et 5 et des concentrations de sels biliaries comprises entre 0,3 et 2 % sont considérés comme critiques pour la sélection des microorganismes probiotiques (**De Melo Pereira et al., 2018**).

### ➤ Adhésion aux cellules épithéliales

La capacité d'adhérer à la couche intestinale est un critère de sélection recommandé pour le choix des probiotiques, puisqu'il s'agit d'une condition de la colonisation de l'intestin. L'adhésion est le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes (**Figure 3**). Elle repose sur la réalisation d'un ensemble de tests *in vitro* et *in vivo* à partir de cellules d'origine animale et/ou humaine (**Palomares et al., 2007 ; Reyes-Gavilan et al., 2011 ; Samedi et Charles., 2019**). En plus de l'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin, les probiotiques peuvent s'attacher au mucus qui recouvre les entérocytes ou aux divers micro-organismes présents dans le tractus gastro-intestinal (**Samedi et Charles., 2019**).



**Figure 3 :** Mécanismes d'adhésion aux cellules épithéliales (**Eshrati et al., 2018**).

### I.2.3.3. Critères technologiques

Outre la sécurité et les propriétés fonctionnelles, les aptitudes technologiques sont également prises en compte dans la sélection des souches probiotiques. Ces critères sont les suivants :

- Facilité de la production de quantités élevées de biomasse,
- Viabilité et stabilité des propriétés souhaitées des bactéries probiotiques pendant le processus de préparation (congélation, lyophilisation), et de distribution de produits probiotiques,
- Taux de survie élevé lors du stockage dans les produits finis (en conditions aérobies et micro-aérophiles),
- Bonnes propriétés sensorielles,

- Résistance aux phages,
- Souches génétiquement stables,
- Production à grande échelle. (Wedajo., 2015 ; Markowiak et Ślizewska., 2017; Samedi et Charles., 2019)

#### **I.2.4. Effet des probiotiques sur la santé humaine**

Des études scientifiques montrent que la consommation des probiotiques est conseillée pour maintenir l'équilibre de la microflore intestinale et pour le traitement de certaines maladies (Prabhurajeshwar et Chandrakanth., 2017).

Les probiotiques présentent plusieurs avantages pour la santé (Yadav et Shukla., 2017):

- ✓ Améliorer l'état nutritionnel de l'individu,
- ✓ Augmentation de la disponibilité des vitamines, des minéraux et des oligo-éléments dans l'organisme,
- ✓ Aide à la sécrétion d'enzymes digestives, par exemple la sécrétion de  $\beta$ -galactosidase,
- ✓ Prévention et traitement de la diarrhée due à une infection, de la diarrhée du voyageur, de la diarrhée virale aiguë, diarrhée chez les l'enfant, la diarrhée associée à un surdosage d'antibiotiques et la diarrhée due à l'exposition à l'irradiation,
- ✓ Diminution du taux de cholestérol dans l'organisme,
- ✓ Amélioration du système immunitaire,
- ✓ Augmentation de la motilité du gros intestin qui aide à soulager la constipation,
- ✓ Maintien de l'intégrité des muqueuses,
- ✓ Maintien des microbes intestinaux par une activité antimicrobienne,
- ✓ Diminuer les symptômes de l'intolérance au lactose,
- ✓ Prévenir les allergies d'origine alimentaire,
- ✓ Présenter des activités anticancérogènes,

### **I.3. Exopolysaccharides**

Les Exopolysaccharides (EPS) sont des macromolécules organiques à chaîne longue linéaires ou ramifiées composées d'unités de sucre dans différents rapports qui comprennent principalement le glucose, le galactose, le rhamnose,.... synthétisées par divers microbes à l'aide de différentes sources de carbone au cours du processus de fermentation (**Chen et Narbad ., 2018**).

Grâce à ces propriétés techno-fonctionnelles, les exopolysaccharides limitent ainsi certains défauts de fabrication fréquemment rencontrés en industrie laitière, comme une faible viscosité, une rupture de gel ou une synérèse élevée. Ils remplacent aussi, dans les yaourts et les fromages, les matières grasses et répondent ainsi, à une nouvelle demande de consommation en produits allégés (**Bajpai et al.,2016**).

#### **I.3.1.Les exopolysaccharides des bactéries lactiques**

Les EPS synthétisés par BL ont des implications pour la santé de l'hôte et agissent en tant qu'ingrédients alimentaires. En raison de la variabilité des groupes de gènes glycosyltransférases qui déterminent la composition des monosaccharides, la structure des EPS est très riche. Les EPS sont synthétisés par les bactéries lactiques par la voie de synthèse extracellulaire et la voie Wzx/Wzy-dépendante. Les EPS de LB produits par différents genres de LAB, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* (**Gawandeet al., 2021**).

#### **I.3.2.Structure et composition des exopolysaccharides**

La bioactivité des EPS-BL est liée à leur structure spécifique. Jusqu'à présent, se sont principalement concentrées sur la composition en monosaccharides, le poids moléculaire, les liaisons glycosidiques et les groupes fonctionnels des EPS-BL.

Il est normalement établi que la bioactivité des EPS dépend principalement de sa structure aussi bien que sa source. Leur composition en monosaccharides, dirige leur fonction (**Tableau 3**) et même leurs poids moléculaire qui affecte grandement leurs propriétés physicochimiques et leurs activité biologique. En raison de la plus grande force moléculaire interne (liaisons chimiques) des LAB-EPS HMW, les viscosités des EPS –BL et des PM sont positivement corrélées dans une large mesure. Les liaisons glycosidiques (telles que  $\alpha/\beta$  et 1→2, 3, 4 et 6) influencent beaucoup plus que la composition en monosaccharides des LAB-EPS.



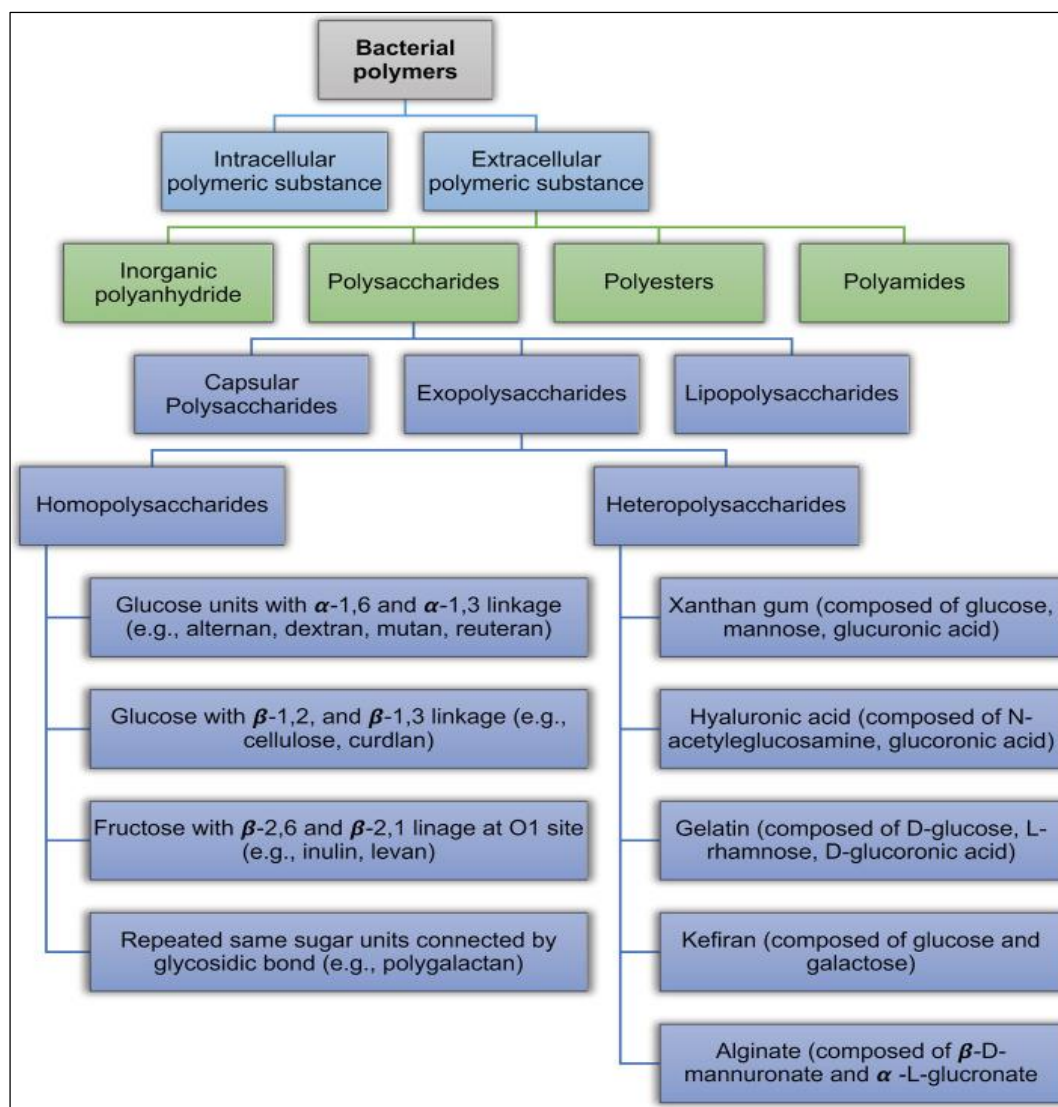
Les liaisons  $\alpha$  sont plus flexibles que les liaisons  $\beta$  et l'hydroxyle de l'hémiacétal a une portée plus étendue, de sorte que les liaisons  $\alpha$  ont généralement des propriétés allostériques, ce qui lui permet de se lier correctement à des enzymes et à des molécules de signalisation apparentées. Comme les enzymes digestives humaines ne peuvent hydrolyser qu'une partie des  $\alpha$ -EPS, les  $\beta$ -EPS ne peuvent pas être éliminés. Un des facteurs importants affectant l'immunité des LAB-EPS est la solubilité qui peut être augmentée par des liaisons 1,6-glycosidiques (Zhang *et al.*, 2023)

**Tableau 3 .Structure et fonction de quelques EPS LAB (Zhang *et al.*, 2023).**

LAB strain	Structure	Function
<i>Lactobacillus confusus</i> TISTR 1498	Backbone: (1→6)- $\alpha$ -D-glucan LMW: $\leq 70 \times 10^3$ Da	Immunostimulatory ability
<i>Lactilactobacillus curvatus</i> SJTUF 62116	→2)- $\alpha$ -D-Manp-(1→, →4)- $\alpha$ -D-Manp-(1→, →3,6)- $\alpha$ -D-Manp-(1→, T- $\beta$ -D-Glcp-(1→, →6)- $\beta$ -D-Glcp-(1→, and →3)- $\beta$ -D-Glcp-(1→	Antioxidant, inhibiting the growth of <i>Streptococcus Enteritidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , and <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Backbone: $\alpha$ -(1→6)-Glc Branch: $\alpha$ -(1→3)-Glc	Antimicrobial, antibiofilm, antioxidant abilities, promoting the growth of <i>Bifidobacteria</i>
<i>L. helveticus</i> LZ-R-5.	→6)- $\beta$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -GlcP-(1→3)- $\beta$ -D-Glcp- (1→3)- $\beta$ -D-Glcp-(1→3)- $\beta$ -DD-Glcp-(1→	Immunostimulatory ability
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> OLL 1073R-1	Main components: glucose, galactose, and phosphorus	The promotion of lymphocyte mitosis, antiinfluenza virus, and enhancement of natural killer activation
<i>L. rhamnosus</i> GG (LGG)	Backbone: →3)- $\beta$ -D-Galf(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)- a-D-GlcpNAc-(1→3)- $\alpha$ -L-Rhap-(1→3)-a-D-Galp- (1→Branch: $\beta$ -D-Galf-(1→6)-	Ease bowel oxidative damage and apoptosis
<i>L. paraplantarum</i> NCCP 962	Monosaccharide composition: mannose, glucose, and galactose	Cholesterol-lowering ability
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	Backbone: →6)- $\beta$ -D-Glcp-(1→6(2))- $\beta$ -D-GlaP- (1→4)- $\alpha$ -D-GlaP-(1→3)- $\beta$ -D-GlaP-(1→4)- $\beta$ -D- GlcP-(1→Branch: - $\beta$ -D-GlcP-(1→2(6))-	Immunostimulatory ability, gelling agent
<i>L. rhamnosus</i> KF5	Monosaccharide composition: glucose,	Stimulating the proliferation of splenocytes

### I. 3.3. Classification des exopolysaccharides

Les EPS sont des polymères naturels, également appelés biopolymères, que l'on trouve comme composants structurels, principalement dans divers systèmes vivants, tels que les plantes, les animaux et les micro-organismes. Les biopolymères extracellulaires, souvent appelés "substances polymères extracellulaires", sont classés en quatre catégories : les polysaccharides, les polyanhydrides inorganiques (par exemple, les polyphosphates), les polyesters et les polyamides (Figure 4). Parmi ces catégories, le groupe des polysaccharides est plus abondant que les autres sous-groupes. Les EPS sont classées en fonction de leur composition chimique ou de leur fonctionnalité (Kaur et Dey., 2022).



**Figure 4 :** Classification des EPS en fonction de leur composition, du type de liaison et de l'orientation du carbone impliqué dans la liaison (Kaur *et al.*, 2022).

### I. 3.3. 1. Classification selon la composition chimique

Selon leurs compositions chimiques, les EPS peuvent être classés en deux grandes catégories : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Cette classification repose sur la composition des monomères, la charge, la liaison, la présence de chaînes latérales répétées et les substitutions de groupes dans la chaîne polysaccharidique (**Tableau 4**). Les homopolysaccharides sont composés d'un seul type d'unité monosaccharidique liée par des liaisons glycosidiques, tandis que les hétéropolysaccharides sont des cocktails de différents types d'unités monosaccharidiques (des disaccharides aux heptasaccharides) (Montoya, 2019 ; Korcz, et Varga, 2021).

### I. 3.3. 2. Classification selon leur fonctionnalité

Les EPS peuvent être classées en sept catégories en fonction de leur fonctionnalité : constructive, sorptive, tensioactive, redox-active, d'oxydoréduction, informatives, actives et nutritives (Kaur *et al.*, 2022).

**Tableau 4.** Caractéristiques comparatives des homo et des hétéropolysaccharides produits par les bactéries lactiques (Abarquero *et al.*, 2022).

Homopolysaccharides	Hétéropolysaccharides
Contient un seul type de monosaccharide	Contient plus d'un type de monosaccharide
Monosaccharides majeurs : glucose ou fructose	Monosaccharides majeurs : glucose, galactose et rhamnose
Présence de Lien $\alpha$ ou $\beta$	Présence de liens $\alpha$ et $\beta$
Chaîne linéaire ou avec branchement	Généralement chaîne avec branchement
Masse molaire $> 10^6$ Da	Masse molaire $10^4$ - $10^6$ Da
Principalement produits par <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> , et <i>Weissella</i>	Principalement produits par <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , et <i>Streptococcus</i>
Produits extracellulairement à partir de saccharose ou d'amidon	Produits au niveau intracellulaire
Produits en grande quantité (grammes/Litre)	Produits en petite quantité (milligrammes/Litre)
Absence de groupe non glucidique	Présence de groupe non glucidique
Ne sont pas chargés	Peuvent contenir des groupes chargés
Principalement associé à l'activité prébiotique	Principalement associé à l'activité d'immuno-modulatrice

### I.3. 4. Rôle des exopolysaccharides

Le rôle physiologique des EPS de BL est complexe et encore incertain. Généralement, ils ne sont pas utilisés comme source énergétique, car la plupart des espèces productrices ne possèdent pas les gènes impliqués dans leur dégradation mais plutôt protecteur (Tableau 5).

Les trois principaux rôles fonctionnels rattachés aux EPS sont :

- La protection contre la dessiccation, les attaques de bactériophages, la phagocytose et la résistance au stress (acide, thermique, osmotique et oxydatif),
- La reconnaissance et les interactions cellule-cellule,

- La formation de biofilms, (Abarquero *et al.*, 2022).

Tableau 5. Mode d'action des exopolysaccharides (Kaur *et al.*, 2022).

Mode of action			
Anti-bacterial activity	Anti-fungal activity	Anti-biofilm activity	Anti-viral activity
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition of cell wall synthesis</li> <li>• Inhibition of protein synthesis</li> <li>• Inhibition of nucleic acid synthesis and processing</li> <li>• Inhibition of metabolic pathways</li> <li>• Interference with cell membrane integrity</li> <li>• Inhibition of cytoplasmic membrane structure</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition of DNA synthesis</li> <li>• Inhibition of protein synthesis</li> <li>• Inhibition of proteins like Hsp 90</li> <li>• Production of oxidative stress through ROS and RNS</li> <li>• Inhibition of microtubule assembly</li> <li>• Inhibition of cell wall, cell membrane, mitochondrial signalling molecules</li> <li>• Inhibition of chitin synthase</li> <li>• Inhibition of beta-glucans synthesis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interference and inhibition of bacterial adhesion</li> <li>• Destabilizing the biofilm structure</li> <li>• Detaching bacteria from mature biofilm</li> <li>• Interfering with motility</li> <li>• Down-regulation of genes involved in matrix synthesis and in controlling of biofilm life style</li> <li>• Preventing expression of efflux pump</li> <li>• Inhibition of quorum sensing</li> <li>• Membrane destruction</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interference with viral DNA/RNA synthesis and regulation</li> <li>• Interfere in the ability of virus to bind the cells</li> <li>• Support in attachment and entry of inhibitors</li> <li>• Blocking the ion channels</li> <li>• Inhibition of protein synthesis and activity of several enzymes</li> <li>• Targeting viral functions</li> </ul>



***Matériel et  
Méthodes***

## **II.1 Objectifs et lieu de l'étude**

Notre travail est basé sur l'isolement des BL à partir des produits alimentaires laitier (lait de chèvre, lait de vache fermenté « Raib ») et non laitier (Miel naturel, vinaigre de cidre de pomme), puis de faire une pré-identification, un screening des isolats productrices des EPS et l'évaluation des aptitudes probiotiques des isolats sélectionnés.

L'intégralité de ce travail a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, durant la période Avril- juin 2023.

## **II.2. Matériel**

### **II.2.1 Matériel biologique**

Le matériel biologique utilisé dans cette étude est comme suite :

- ✓ **Les isolats bactériens isolés** : bactéries lactiques.
- ✓ **Les isolats de référence et souches pathogènes** : trois souches à Gram+ et à Gram- à savoir *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ont été utilisées au cours de cette étude fournies par M<sup>f</sup>. KHENNOUF. T, et deux souches pathogènes ; *Serratia marcescens* et *Staphylococcus aureus* fournies par M<sup>m</sup>. ALIOUA.S.

#### **II.2.1. Matériel non biologique**

Les milieux de culture, l'appareillage, et les réactifs utilisés dans cette étude sont présentés dans les **annexes**.

## **II.3. Méthodes**

### **II.3.1. Isolement et purification des bactéries lactiques**

Vingt-six échantillons de quatre différents produits alimentaires ;( 2 échantillons de Miel naturel et 1 échantillon de vinaigre de cidre de pomme et 10 échantillon de lait de vache fermenté « Raib » et 13 source du lait de chèvre) a fait l'objet d'un isolement de bactéries lactiques. Les échantillons collectés de plusieurs fermes de la wilaya de Jijel.

Pour l'isolement 1mL de lait de chèvre et 1g de Raib, ont subit une série de dilutions décimales (jusqu'à  $10^{-6}$ ). A partir des dilutions  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ , un volume de 0.1mL est prélevé et déposé à la surface de la gélose MRS suivi d'un étalement, Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48h en anaérobiose (**Edalati et al., 2018; Rahmeh et al.,2019**).

Pour l'isolement des BL à partir de vinaigre et le miel, un enrichissement été effectué comme suite : 1 ml de vinaigre et 1g miel ont été déposé dans 9ml du bouillon MRS et les tubes sont incubés à

37°C pendant 24h à 48h. De la période d'incubation des bouillons d'enrichissements, une série de dilution décimale de (jusqu'à  $10^{-2}$ ) un isolement sur gélose MRS a été réalisé. Une incubation est effectuée à 37°C pendant 24h à 48h (**Lashani et al., 2020**).

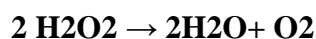
La purification des isolats isolées a été réalisée par repiquages alternés et successifs sur milieux MRS (bouillon /gélose) jusqu'à l'obtention de colonies. La pureté des souches est révélée par la présence sur gélose de colonies homogènes ayant le même aspect, la même couleur, la même taille et la même forme (**Monika et al., 2017**).

Après purification, les isolats sont pré-identifiés en se basant sur différents caractères morphologiques, coloration de Gram et test de catalase (**Bai et al., 2016; Sandes et al., 2017**).

➤ **Examen macroscopique** : cette étude est basée sur l'observation de la culture des isolats sur gélose MRS pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies (**Badis et al., 2005**).

➤ **Examen microscopique** : ce test est effectué sur des frottis auparavant colorés par une coloration différentielle (coloration de Gram), qui permet de sélectionner les bactéries Gram+ et Gram-, et d'apprécier la forme et le mode de regroupement des cellules. La coloration est faite selon la méthode classique (**Annexes**), L'observation des cellules bactériennes est réalisée au microscope optique (G x100) (**Zantar et al., 2013**).

➤ **Recherche de la catalase** : L'activité catalytique est mise en évidence en émulsionnant sur une lame la culture bactérienne à tester avec une solution d'eau oxygénée. La présence d'une catalase se manifeste par l'apparition de bulles abondantes d'oxygène.



Les bactéries à Gram + et à catalase négatif ont été considérées comme des bactéries lactiques présomptives (**Khan et al., 2014**).

### **II.3.3. Conservation des isolats**

Deux types de conservation ont été appliqués. Une à courte et l'autre à longue durée. La conservation à court terme des isolats purs est effectuée sur milieu MRS solide incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines (**Laiche et al., 2019**). La Conservation à longue durée des isolats purifiés a été réalisée dans le bouillon MRS contenant 30% de glycérol et stockés à une température de -20°C (**Rahmeh et al., 2019**).

## **II.3.4. Production des exopolysaccharides**

### **II.3.4.1. Screening des isolats productrices d'exopolysaccharides**

Le screening des isolats productrices d'exopolysaccharides est réalisé sur deux milieux différents, la gélose hypersaccharosée et la gélose MSE. Les cultures bactériennes sont ensemencées à la surface des boîtes par stries et incubées à 37°C pendant 24 h à 48 h, à la fin de l'incubation les isolats productrices d'EPS ont été déterminées par l'aspect visuel (**Mostefaoui et al., 2014**).

### **II.3.4.2. Extraction des EPS**

Afin d'extraire les EPS de nos isolats criblés nous avons utilisé la méthode décrite par **Abid et al. (2018)** avec une modification mineure. Après la période d'incubation, une solution de TCA (**annexes**) a été ajoutée pour donner une concentration finale de 4% (masse/volume). Les protéines précipitées ont été éliminées par centrifugation (12 000 x g pendant 30 min à 4°C). Deux volumes d'éthanol ont été ajoutés aux surnageants, agités vigoureusement et maintenus à 4°C pendant une nuit. L'EPS brut a été recueilli par centrifugation à 15 000 x g pendant 15 min à 4°C, puis le culot EPS a été dissous dans l'eau distillée.

### **II.3.4.3. Quantification des EPS**

La quantité produite d'EPS a été estimée par la méthode de phénol-acide sulfurique en utilisant le glucose comme étalon. En bref, dans des tubes en verre très propres, on ajoute : 800 µl d'échantillon avec 40 µl de phénol (80%), mélangé au vortex puis 2 ml d'acide sulfurique sont ajoutées, le tout est mélangé au vortex puis incubé à l'obscurité pendant 30 min. Un blanc est préparé en utilisant 800 µl d'eau distillée à la place de l'échantillon. Lire l'absorbance à 490 nm. Les résultats sont exprimés en milligrammes (mg) d'EPS par litre (**DuBois et al., 1956**) à l'aide d'une courbe d'étalonnage de glucose (**annexes**).



### **II.3.5. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques**

#### **II.3.5.1. Résistance aux pH gastrique**

La capacité de la souche à survivre dans le milieu acide a été étudiée en se référant à la méthode décrite par **Rajoka et al. (2018)**. Brièvement, 0.5ml de la culture jeune (18h) a été introduit dans 5 ml de bouillon MRS déjà ajusté à pH 2, et pH 6. La résistance de la bactérie à ce facteur hostile a été estimée par la lecture de la densité optique à 620 après incubation de 2 h à 37°C.

Le pourcentage de survie a été calculé par la comparaison des valeurs de la DO de la culture dans le bouillon MRS à différents pH :

$$\% \text{ survie} = (\text{DO MRS pH 2} / \text{DO MRS pH 6}) \times 100$$

#### **II.3.5.2. Résistance aux sels biliaires**

La tolérance de la souche à la bile a été réalisée selon la méthode décrite par **Li et al. (2020)** avec des modifications mineures. Le culot bactérien de la souche incubé à 37°C pendant 18h a été récupéré par centrifugation (5000 rpm/10 min) et lavé deux fois avec du PBS ; puis mis en suspension dans 5 ml du même tampon ; 1 ml de la culture standardisée a été inoculé dans 6 ml du PBS avec et sans à 0.3% de sels biliaires, suivi d'une incubation à 37°C pendant 4h.

Le taux de survie a été déterminé par la mesure de la DO à 620 nm, en comparant les valeurs de la DO de la culture sur PBS avec et sans sels biliaires. L'équation suivante a été appliquée:

$$\% \text{ survie} = (\text{DO sels biliaires} / \text{DO témoin}) \times 100$$

#### **II.3.5. 3. Adhérence sur tube de verre**

La méthode d'adhérence sur tube de verre a été utilisée pour évaluer l'adhésion sur tissus durs de nos isolats ; une adhésion importante peut être corrélée à la production d'exopolysaccharides de surface (**Samot. 2012**)

Dans un tube de verre contenant 10mL de MRS additionné de 1% de saccharose (poids/volume), 500 µL d'une culture overnight du lactobacille à tester est ajoutée. La culture est incubée à 37°C avec une inclinaison de 37°C. La formation du biofilm est évaluée à 24 heures puis à 48 heures, selon une échelle établie par **Murchison et al. (1981)** ; les valeurs de cette échelle s'étendent de 0 (aucune adhérence) à 4 (fortement adhérent).

#### II.3.5. 4. Test d'auto-agrégation et de co-agrégation

Pour les essais d'auto-agrégation et de co-agrégation la méthode décrite par (Cizeikiene et Jagelaviciute ., 2021), a été suivie. Le culot bactérien de la souche incubé à 37°C pendant 18h a été récupéré par centrifugation (5000 rpm/10 min) et lavé deux fois avec du PBS puis mis en suspension, une agitation de 10 secondes a été procédée et l'absorbance de la suspension initiale a été ajustée à 0.6. Après une incubation à 37°C pendant 3 h et 18h les absorbances ont été déterminées à une longueur d'onde de 600 nm.

Le pourcentage d'auto-agrégation a été exprimé en fonction de temps, en appliquant la formule suivante (Beldarrain-Iznaga *et al.*, 2021) :

$$\text{Autoagrégation (\%)} = ((\text{Abs}_0 - \text{Abs}_t) / \text{Abs}_0) \times 100$$

Avec :  $\text{Abs}_t$  : DO à t heure d'incubation ;  $\text{Abs}_0$  : DO à  $t_0$ .

Pour le test de co-agrégation, la suspension cellulaire de notre souche a été préparée de la même manière que le test d'auto-agrégation. Cependant, des cultures d'*Escherichia coli* ATCC 25922 de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont été préparées dans le bouillon nutritif. Pour se faire, pour chaque espèce bactérienne, un tube du bouillon nutritif a été ensemencé par une colonie de chaque espèce et le tout a été incubé à 37°C pendant 24h. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5000rpm/15min après deux lavages avec PBS.

Une fois les suspensions préparées, un volume égal de souche test (2 ml) a été mélangé suivipar un vortex de 10 secondes et d'une incubation à 37°C sous agitation pendant 3h. L'absorbance du mélange ( $A_{\text{mix}}$ ) a été mesurée à 600 nm après 3h et 18h d'incubation. Le pourcentage de co-agrégation a été déterminé comme suit (Beldarrain-Iznaga *et al.*, 2021) :

$$\text{Co-agrégation \%} = [(A_{\text{Lactobacillus}} + A_{\text{pathogène}}) - A_{\text{mix}}] / [(A_{\text{Lactobacillus}} + A_{\text{pathogène}})] \times 100$$

#### II.3.5. 5. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité a été déterminée selon la méthode décrite par Zarour *et al.* (2018) avec une mineur modification. D'après une culture jeune des isolats le culot a été récolté par centrifugation 6000 rpm pendant 5 min, lavé deux fois et remis en suspension dans le tampon PBS. L'absorbance initiale (DO

initiale) de la suspension cellulaire a été ajustée à environ 0.8 à 450 nm. Ensuite 0.6 ml du xylène a été ajouté doucement à 3 ml de la suspension bactérienne suivie par une incubation à 37°C pendant 10 min suivie d'un vortex pendant 2 min, laisser reposer pendant 15 minutes, la phase aqueuse a été soigneusement prise avec une pipette pasteur et l'absorbance finale (DO final) a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. La diminution de l'absorbance a été prise comme mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (% H) calculée par l'équation suivante :

$$\text{Hydrophobicité (\%)} = ((\text{DOinitiale} - \text{DOfinale}) / \text{DOinitiale}) \times 100$$

Où DO initial et DO finale sont l'absorbance avant et après l'addition du xylène, toluène, chloroforme.

#### **II.3.5. 6. Adhésion aux cellules épithéliales**

Ce test consiste à étudier la capacité des isolats d'adhérer aux cellules épithéliales. La méthode utilisée est celle décrite par **Lin et al. (2007)**. Avant de mettre en œuvre le test d'adhésion, un segment de l'iléon provenant du jabot de poulet ont été ouvert et laver avec du tampon phosphate- buffer salin stérile (PBS pH 7,2) puis maintenu dans ce tampon à 4°C pendant 30min, et ensuite laver 10 fois avec du PBS stérile puis laisser au repos à 4°C pendant 3h. Les cellules intestinales sont raclées dans du PBS stérilisé. Cette suspension cellulaire a été examinée par microscope pour s'assurer de l'absence d'une contamination bactérienne. Les suspensions bactériennes de 24h on été centrifugées à 6000 rpm/10min, ensuite le culot cellulaire a été standardisé dans PBS (pH 7,2). Un millilitre de cette suspension bactérienne a été mélangée avec 1 ml de la suspension de cellules épithéliales. Le mélange incubé à 37°C pendant 30 minutes. L'adhésion a été observée par microscopie (G ×100) après avoir été colorée avec le violet de Gentiane. le test est considéré positif si le nombre de bactéries adhérees est supérieur à 15. Au moins 10 cellules épithéliales ont été examinées par analyse.

#### **II.3.5. 7. Recherche de la productrices d'eau oxygénée par les isolats**

Les isolats ont été testés pour la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'application de la méthode décrite par **Kumherová et al. (2020)** et **Ahire et al. (2021)**. Les isolats ont été cultivés sur la gélose MRS additionnée de 250 µg / mL de 3,3', 5,5'- tétraméthylbenzidine et 0,01 mg / ml de peroxydase de Raifort, puis les boites ont été incubées en anaérobiose à 37°C pendant 48h. Les boites sont laissées ouvertes pendant 30 min sous la hotte. Après cette exposition à l'oxygène, les colonies produisant du peroxyde d'hydrogène se colorent en bleu.

La peroxydase du milieu réagit avec le peroxyde d'hydrogène produit par les lactobacilles pour libérer de l'oxygène et des protons qui vont réduire la tétraméthylbenzidine en formant ainsi un produit coloré. La production de peroxyde d'hydrogène est évaluée selon l'intensité de la coloration : (+++) forte production, (++) production moyenne, (+) faible production, (-) sans production.

#### **II.3.5. 8. Pouvoir acidifiant**

Ce test est réalisé par l'application de la technique décrite par **Dimitonova et al. (2007)**. Il consiste à suivre la variation du pH du milieu après des périodes d'incubation. Des cultures lactiques jeunes ont été inoculées (1%) dans du bouillon MRS puis incubées à 37°C. La quantité d'acides produites est déterminée indirectement en mesurant le pH des surnageants de chaque souche avec un pH-mètre. Le pH initial a été mesuré, puis des mesures ont été faites après 4 h, 6h et 24h d'incubation.

#### **II.3.5. 9. Activité antibactérienne et effet des surnageants**

Ce test consiste à étudier l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des souches indicatrices et les souches pathogènes. Il s'agit de cinq souches : *Escherichia coli* (ATCC) 25922, *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) 27853, *Serratia marcescens* et *Staphylococcus aureus*. L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode des disques avec des modifications mineures par **Bachiri et al. (2016)** a été appliquée : elle consiste à ensemercer par écouvillonnage la gélose nutritive par la souche indicatrice standardisée. Après incubation pendant 30 min à 37°C, des disques stériles (de 5 mm de diamètre) ont été déposés à la surface de la gélose. Chaque disque reçoit 10µl d'une culture lactique jeune et de l'autre coté 10µl de surnagent brute des cultures lactiques. Une fois les boîtes sont séchées à température ambiante, elles sont incubées à 4°C pendant 4h, par la suite incubées à 37°C pendant 24h. L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques.

### **II. 3.6. Evaluation de l'aspect sécuritaire**

#### **II. 3.6.1. Activité hémolytique**

L'activité hémolytique des BL a été déterminée par la méthode (**Oyewole et al ., 2018**) avec modification. La gélose au sang (5% du sang humain: v / v) a été coulée et solidifiée, puis inoculée par les cultures lactiques et incubée à 37 °C/ 48 h.

Après incubation, la lecture des résultats est la suivante :

- ✓ La souche est  $\alpha$ -hémolytique : présence de zones vertes autour des colonies
- ✓ La souche est non hémolytique ( $\gamma$ -hémolyse): absence de zones autour des colonies
- ✓ La souche est  $\beta$ -hémolytique : présence de zones de lyses sanguines claires autour des colonies

### **II. 3.6.2. Résistance aux antibiotiques**

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été suivie. Après une culture de 18 h, on a ensemencé les souches à l'aide d'un écouvillon à la surface de la gélose MRS. Chaque boîte reçoit des disques d'antibiotiques: Pénicilline, Amoxicilline, Vancomycine, Ticarcilline, Ceftazidime, Oxacilline, Amoxicilline, Imipenem, Ofloxacine, Nitrofurane, Triméthoprim, Polymixine, Colistine, Spiramycine, Lincomycine, Doxycycline, Tétracycline. Après incubation à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (**Melia et al., 2018**).

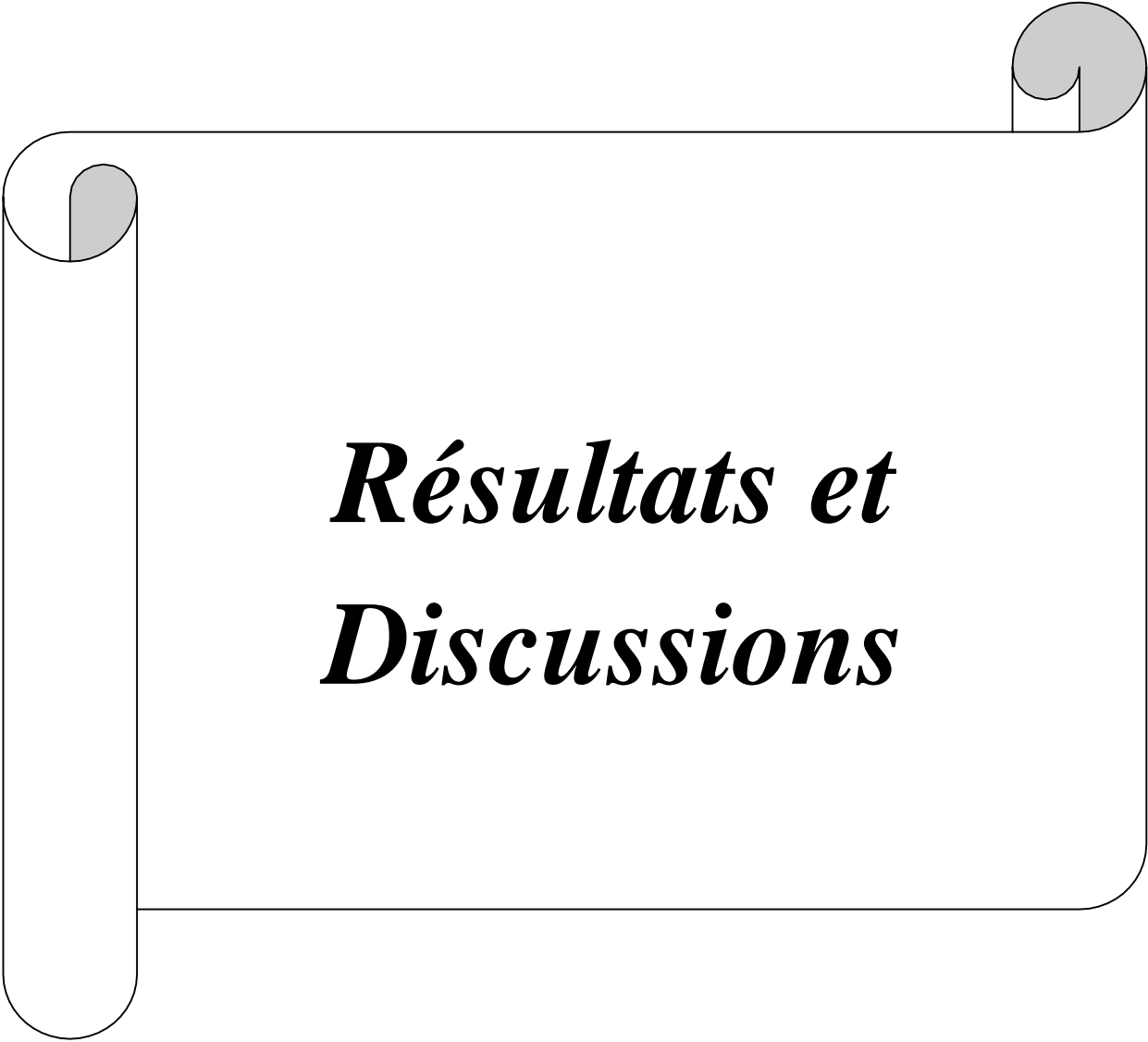
Les diamètres des zones d'inhibition (DZI) ont été mesurés et les résultats ont été exprimés en termes de résistance (R), de sensibilité intermédiaire (I) et de sensibilité (S), selon les valeurs proposées par le standard NCCLS et **Jomehzadeh et al. (2020)**

Où :

Souche résistance :  $DZI \leq 15\text{mm}$  ;

Souche à sensibilité modérée :  $16 \leq DZI \leq 20\text{mm}$  ;

Souche sensible :  $DZI \geq 21\text{mm}$ .

A decorative scroll graphic with a black outline and grey shading at the corners, framing the text.

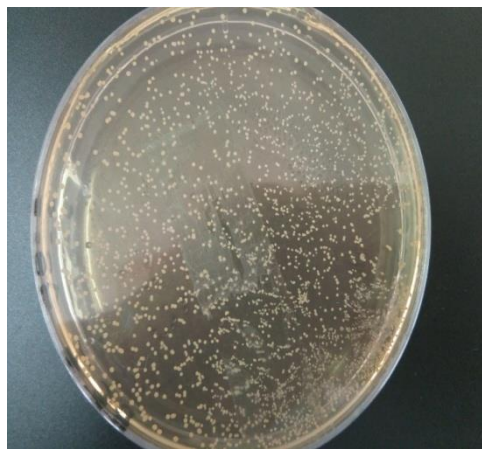
# *Résultats et Discussions*

### **III.1. Isolement et purification des bactéries lactiques**

Au cours de cette étude nous avons isolé et purifié 35 bactéries lactiques à partir du lait de chèvre, Raib du lait de vache, le vinaigre de cidre de pomme et le Miel naturel en se basant sur les caractères morphologiques, microscopique et test de catalase.

#### ➤ **Examen macroscopique**

La caractérisation macroscopique des colonies obtenues a permis de décrire leur aspect qui est apparu typique et homogène. Les colonies sont apparues lisses, légèrement bombées de forme circulaire à contour régulier, de taille plus ou moins importante avec une couleur blanc crème. **(Photo 01).**



**Photo 01:** Observation macroscopique des colonies lactiques sur gélose MRS.

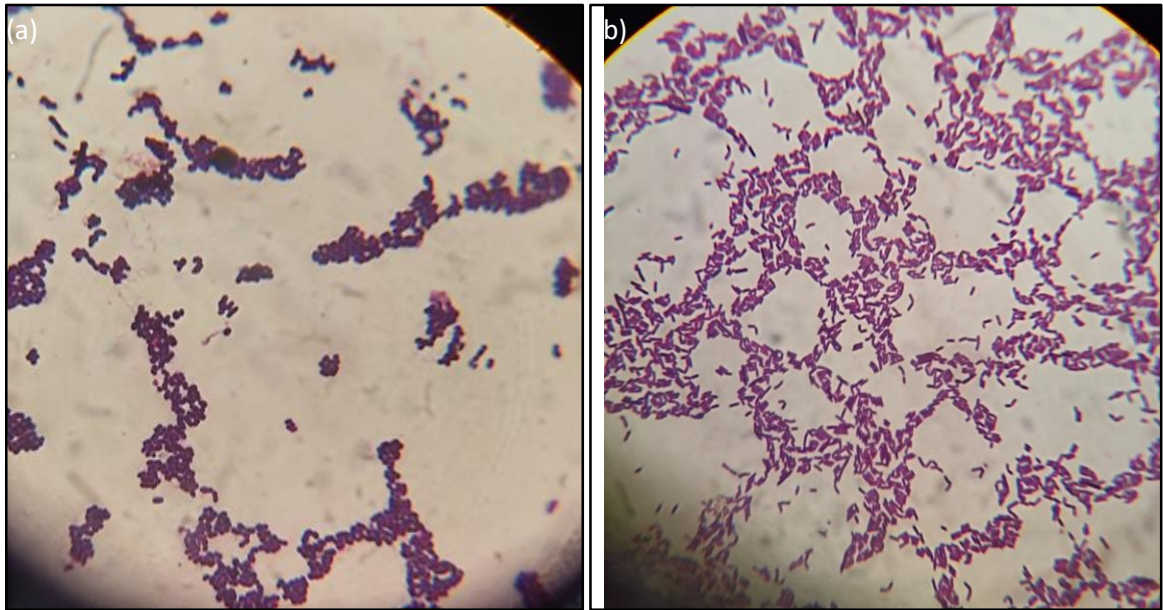
#### ➤ **Examen microscopique :**

L'observation microscopique des isolats après une coloration de Gram a révélé que l'ensemble des isolats étaient Gram positif (**Tableau 6**). Les formes des cellules étaient distinctes ; des cocci et des bacilles, dont le mode de regroupement varie d'une souche à l'autre : chaînette, diplocoques et en amas (**Photos 02**).

Selon **Savado et Traore.(2011)**, il existe deux grands groupes de bactéries lactiques morphologiquement bien distincts : les cocci et les bacilles.

#### ➤ **Recherche de la catalase :**

Le résultat du test de catalase s'est révélé négatif pour toutes les souches (pas de dégagements gazeux), ce qui laisse suggérer que ces bactéries sont des souches lactiques (**Tableau 6**). Ces résultats concordent avec ceux retrouvés par **Lairini et al.(2014)**.



**Photo 02** : Photomicrographie des isolats lactiques après coloration de Gram.

(a) RB3 Cocci, (b) MA3 Bacille (GX100)

D'après les résultats nous avons remarqué que les produits alimentaires laitiers (lait de chèvre, lait de vache fermenté « Raib ») riche en bactéries lactiques par rapport aux produits alimentaires non laitiers (Miel naturel, vinaigre de cidre).



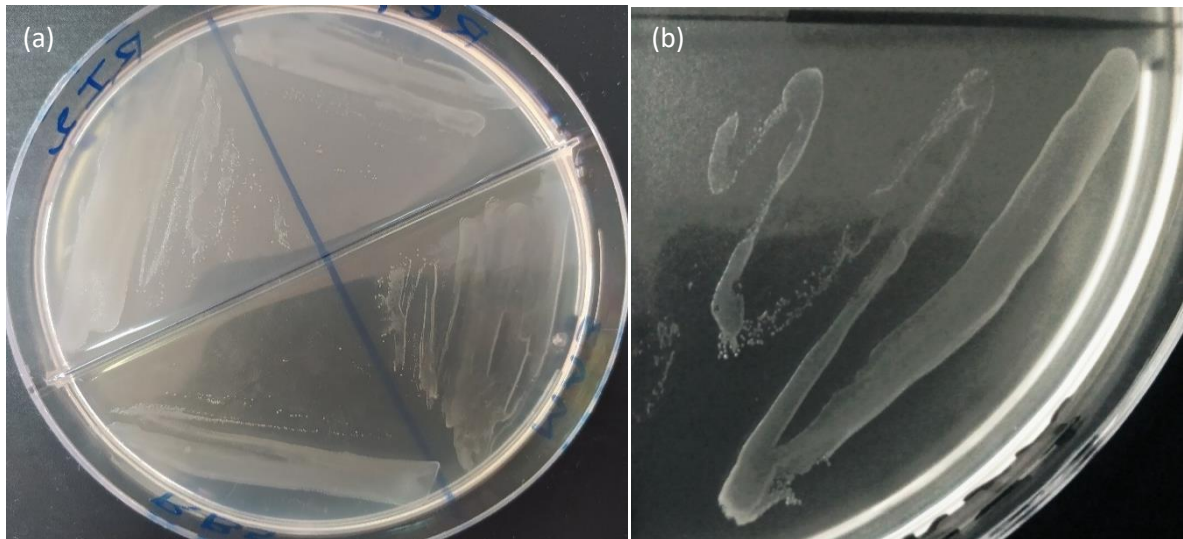
**Tableau 06 .Critères macroscopiques et microscopiques des isolats lactiques.**

Echantillon	Isolat	Critère microscopiques			Critère macroscopiques
		Catalase	Gram	Forme	
Lait	LA 01	-	Gram+	Bacille	Petite, réguliers, transparente
	LE 01	-	Gram+	Cocci	Petites fines blanchâtres circulaires.
	LE 03	-	Gram+	Bacille	moyenne, légèrement bombes ronde, blanc crème
Raib	RA 02	-	Gram+	Cocci	Petite, rondes bombées blanchâtres réguliers
	RA 03	-	Gram+	Cocci	Petite rondes réguliers
	RA 04	-	Gram+	Cocci	moyenne, bombée ronde, blanc crème
	RA 09	-	Gram+	Cocci	moyenne, légèrement bombée ronde, blanc crème
	RA 13	-	Gram+	Cocci	colonie, rondes réguliers, blanc transparente
	RB 02	-	Gram+	Cocci	Petite rondes opaques réguliers, transparente
	RB 03	-	Gram+	Cocci	Petite, rondes opaques réguliers, transparente
	RB 05	-	Gram+	Cocci	petite taille, circulaire, régulier transparente
	RB 06	-	Gram+	Cocci	petite taille, circulaire, régulier et transparente
	RB 07	-	Gram+	Cocci	Petite réguliers, transparente
	RB 08	-	Gram+	Cocci	Petite réguliers, transparente
	RC 04	-	Gram+	Cocci	Petites fines blanchâtres circulaires.
	RD 03	-	Gram+	Cocci	Petites fines blanchâtres circulaires.
	RE 05	-	Gram+	Cocci	Laitesuses, bombées, blanchâtres circulaires régulier.
	RE 06	-	Gram+	Cocci	Laitesuses, bombées blanchâtres circulaires régulier.
	RE 07	-	Gram+	Bacille	Bombées blanchâtres circulaires régulier
	RE 08	-	Gram+	Bacille	Bombées blanchâtres circulaires régulier
	RF 03	-	Gram +	Cocci	Convexes blanchâtres circulaires régulier.
	RF 08	-	Gram+	Cocci	convexes blanchâtres circulaires régulier.
	RG 04	-	Gram+	Bacille	Petites jaune moutarde, légèrement bombées.
	RG 07	-	Gram+	Cocci	Jaune moutarde, légèrement bombées.
RI 02	-	Gram+	Bacille	Petites fines blanchâtres circulaires.	
RI 04	-	Gram+	Bacille	Laitesuses, bombée, blanchâtres, circulaires régulier.	
RI 07	-	Gram+	Bacille	fines blanchâtres circulaires régulier	
Vinaigre	VA 05	-	Gram+	Bacille	jaune moutarde, bombées.
Miel	MA 03	-	Gram+	Bacille	moyenne, ronde, blanc crème
	MA 05	-	Gram+	Cocci	moyenne, légèrement bombes blanc crème
	MA 06	-	Gram+	Cocci	moyenne, ronde blanc crème
	MA 07	-	Gram+	Cocci	moyenne, ronde, a couleur blanc crème
	MB 02	-	Gram+	Cocci	moyenne, ronde, blanc crème
	MB 03	-	Gram+	Cocci	moyenne, légèrement bombes blanc crème
	MB 05	-	Gram+	Cocci	Colonie taille moyenne, légèrement bombes de forme ronde, a couleur blanc crème

## III.2. Production d'exopolysaccharides

### III.2.1. Screening des souches productrices des EPS

La capacité de production des EPS des 35 isolats été présentée dans le **Tableau 7**. Seulement 21 bactéries ont une forme de colonies blanchâtres et visqueuses avec un aspect gluant sur le milieu hypersaccharosée et la gélose MSE, ce qui indique la capacité de la production des EPS par ces bactéries (**Photos 03**).



**Photo 0 3 :** Aspect des colonies de quelques isolats lactiques.

(a) sur gélose hypersaccharosée, (b) sur gélose MSE

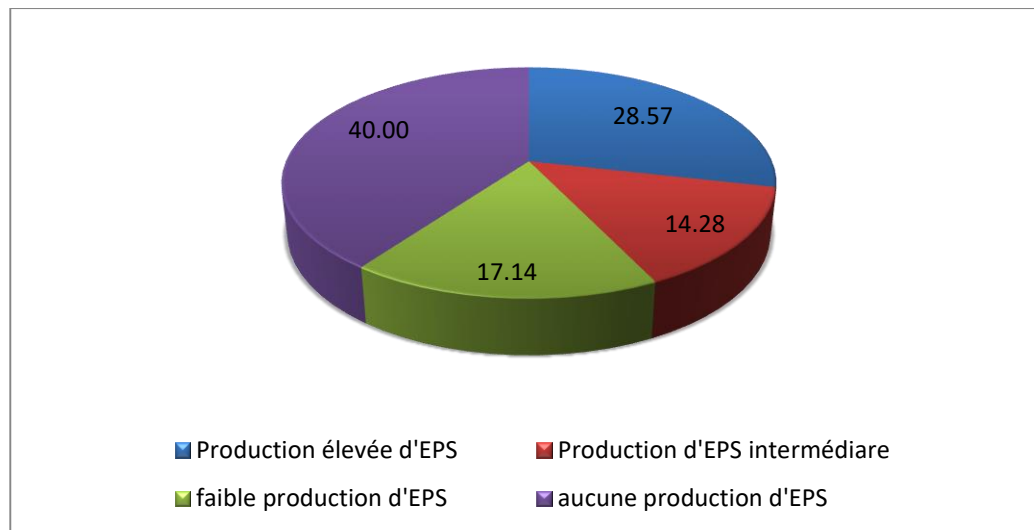
**Mostefaoui et al.(2014)** ont montré que les souches de bactéries lactiques formant des colonies larges et visqueuses indiquant la production d'EPS, sur cette base on peut conclure que nos souches ont productrice cette propriété.

**Tableau 7.** Résultats du test de production des EPS sur gélose hypersaccharosée et gélose MSE  
(Bouridane *et al.*., 2016).

Isolat	gélose hypersaccharosée	gélose MSE
LA 01	+	+
LE 01	+	+
LE 03	-	-
RA 02	+	+
RA 03	-	-
RA 04	-	-
RA 09	-	-
RA 13	++	++
RB 02	+++	+++
RB 03	+++	+++
RB 05	+++	+++
RB 06	+++	+++
RB 07	+++	+++
RB 08	+++	+++
RC 04	++	++
RD 03	+++	+++
RE 05	+	+
RE 06	+++	+++
RE 07	+++	++
RE 08	-	-
RF 03	-	-
RF 08	-	-
RG 04	+	+
RG 07	-	-
RI 02	++	++
RI 04	-	-
RI 07	-	-
VA 05	-	-
MA 03	++	++
MA 05	+++	+++
MA 06	+++	+++
MA 07	+	+
MB 02	-	-
MB 03	-	-
MB 05	-	-

+++ : Production élevée d'EPS, ++ : Production d'EPS intermédiaire, + : faible production d'EPS, - : aucune production d'EPS

D'après la représentation graphique, nous constatons que 28.57% des isolats fortement productrice, 14.28% ont une production intermédiaire, 17.14 % ont une faible production alors que 40 % des souches n'ont aucune production des EPS (**Figure 5**).



**Figure 5:** Répartition de la production d'EPS des isolats lactiques.

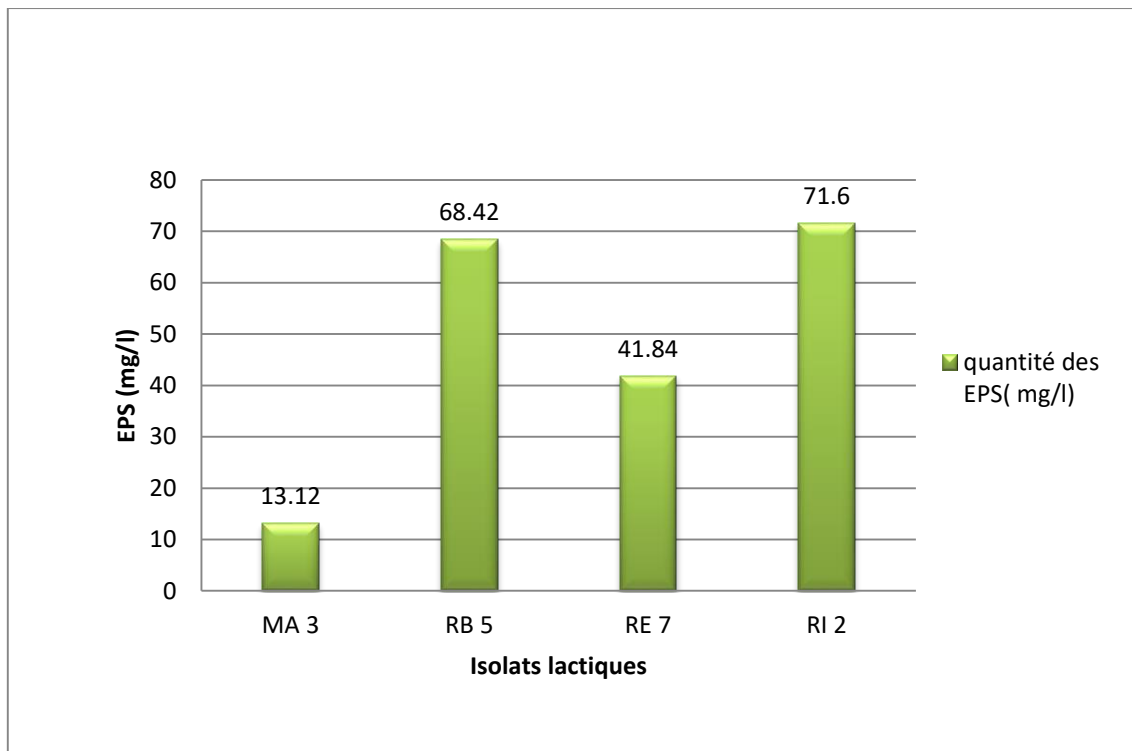
On se basant sur les résultats du screening, nous avons sélectionné quatre isolats lactiques RB5, RE7, RI2 et MA3 pour réaliser les autres tests.

### III.2.2. Quantification d'exopolysaccharides

Dans notre étude, la quantité d'EPS produit varie légèrement entre les quatre isolats (entre 13.12 et 71.60 mg/l). Isolat RI2 été le meilleur isolat productrice d'EPS avec une production maximale de 71.60 mg/l suivie par l'isolat RB5 avec une concentration de 68.42 mg/l, alors que les isolats RE7 et MA3 ont une production de 41.84 mg/l et 13.12 mg/l respectivement (**Figure 6**). Les résultats montrent que tous les isolats sont capables de produire les EPS mais avec des proportions différentes.

Les EPS produites par les bactéries probiotiques ont acquis une grande importance dans les applications thérapeutiques telles que les activités antimicrobiennes, immunomodulatrices, anti-inflammatoires, antioxydantes, antitumorales, antivirales, antidiabétiques, antiulcéreuses et hypocholestérolémiantes (**Angelin et Kavitha., 2020**).

Les cultures de BL qui ont un taux élevé en d'EPS présentent plusieurs avantages par rapport à celle non productrices d'EPS, car ces molécules affectent la texture, la rhéologie et les propriétés technologiques de l'aliment produit (**Adesulu-Dahunsi et al., 2018**).



**Figure 6 :** Concentration des EPS produit par les quatre souches.

**Adelekan et al. (2020)** ont trouvé que *L. plantarum* isolée d'un produit fermenté non laitier a produit une grande quantité d'EPS estimé 199,1 mg/L. par ailleurs, **Mostefaoui et al. (2014)** ont obtenu un taux de production d'EPS par *Lactobacillus delbrueckii* de 175 mg/l.

Dans une recherche récente, ils ont constaté que le rendement total en EPS de *L. plantarum* était de 378 mg/L, tandis que pour *L. mucosae* et *L. rhamnosus* était de 153,2 mg/L et 167,6 mg/L, respectivement (**Bomfim et al., 2020**).

L'isolat RB5 montre une forte production sur milieu solide et les isolats RE7 et RI2 et MA3 à une Production intermédiaire des EPS. Par ailleurs, sur le milieu liquide l'isolat RB5 garde sa forte productivité mais la production des EPS chez les isolats MA3 et RE7 diminue, par contre, elle augmente chez isolat RI2.

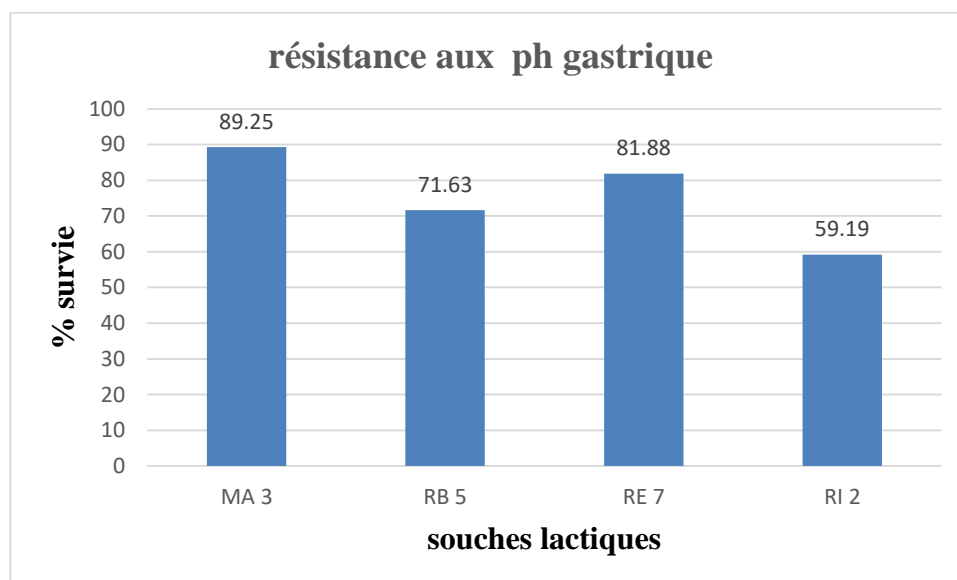
Les différences dans la production d'EPS suggèrent que la quantité d'EPS est une caractéristique dépendante de la souche, influencée par la phase de croissance, y compris les conditions environnementales du milieu de culture. Ces conditions comprennent les sources de carbone et d'azote, ainsi que les conditions physicochimiques pour la croissance bactérienne (c'est-à-dire la température, le pH, le taux d'oxygène, etc.) les méthodes d'extraction et les conditions de croissance (**Lai., 2014 ; Khalil et al., 2018 ; Bomfim et al., 2020**).

### III.3.Évaluation de quelques propriétés probiotiques

#### III.3.1.Résistance aux PH gastrique

Sachant que la survie des souches aux conditions drastiques du tube digestif représente un des caractères importantes pour la sélection des souches probiotiques; nous avons testé la résistance des quatre isolats lactiques aux conditions acides similaires à celles de l'estomac (pH2) pendant 2 h d'incubation. Les résultats sont présentés sur la **Figure 7**.

Les quatre isolats qui ont été testées pour savoir leur résistance au pH gastrique ont présenté une bonne croissance sur le milieu acide avec un pourcentage de 89,25% pour la souche d'origine miel MA3, 81,88%, 71,63% et 59,19% pour les souches de la niche raib, respectivement RE7, RB5 et RI2.



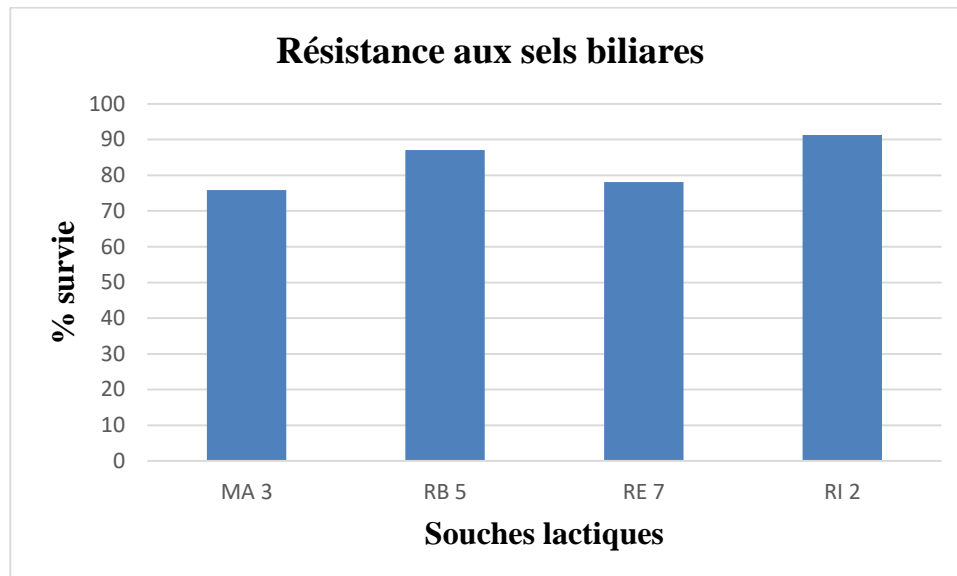
**Figure 7:** Taux de survie des isolats lactiques sur milieu acide PH 2.

La résistance de certaines souches lactiques aux conditions de stress (pH acide) peut être expliquée par le fait que ces bactéries sont productrices d'EPS, et que ces polymères pouvaient jouer un rôle protecteur. Les bactéries lactiques sont dotées de systèmes de détection du stress destinés à activer les défenses, leur permettant de se réadapter aux conditions difficiles ou aux changements environnementaux (**Wu et al., 2022**).

La résistance à l'acidité n'est pas acquise suite à une diminution du pH mais elle est souche dépendante. De même, la plupart des bactéries lactiques sont naturellement bien adaptés à un pH acide, elles sont capables non seulement de produire des acides mais de fonctionner à pH acide (**Ayyash et al., 2021**).

### III.3.2. Résistance aux sels biliaires

Les quatre isolats testés présentent une différence modérée de la résistance aux sels biliaires à une concentration de 0,3% de sels. Après la fin de l'exposition des souches au stress biliaire, les taux de croissances bactériennes représentaient : 91,25% ; 87,07% ; 78,08% et 75,84% pour les souches RI2, RB5, RE7 et MA3, respectivement (**figure 8**). On remarque que le taux de survie, le plus élevé, est obtenu par la souche RI2. La croissance en absence de sels biliaires (0%) a été utilisé comme témoin à la base du lequel, les autres taux de survie ont été calculés.



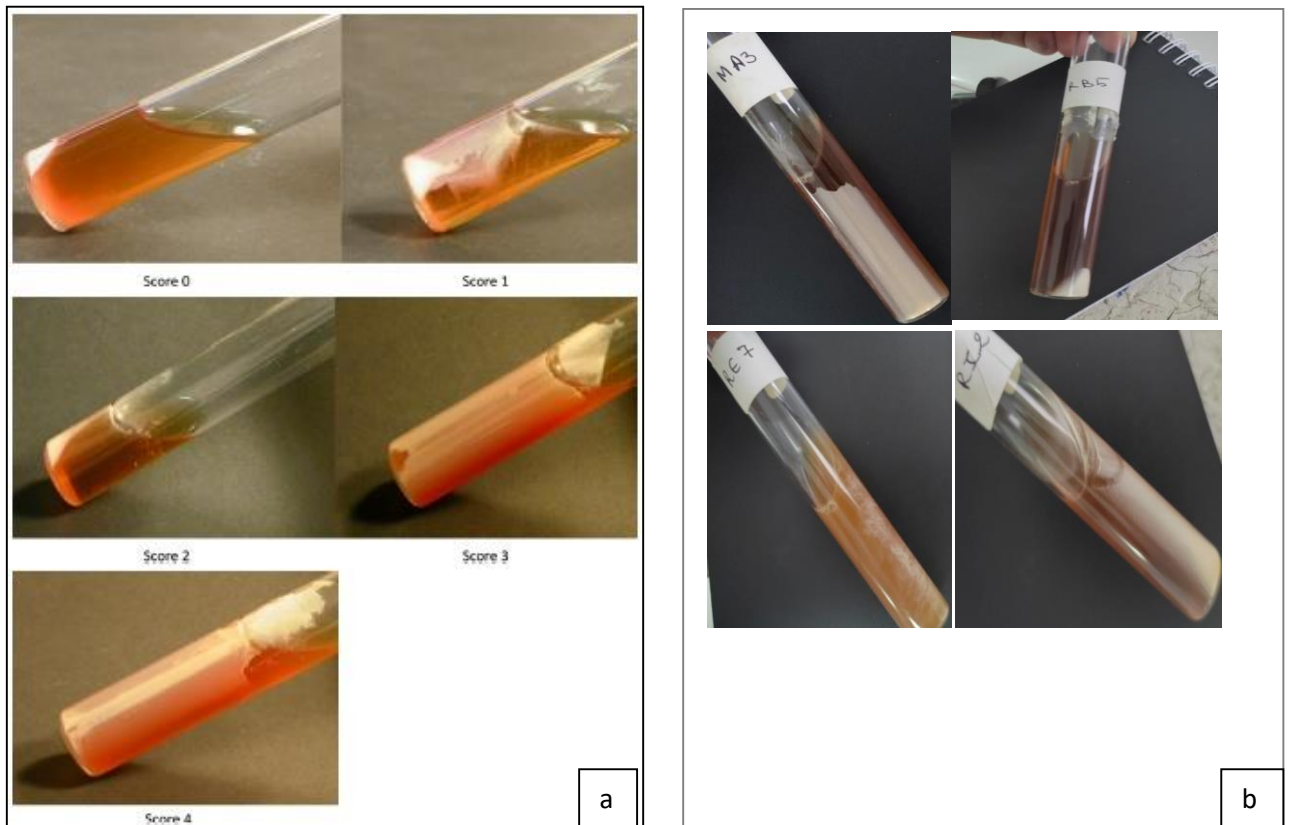
**Figure 8** : Taux de survie des isolats en présence de sels biliaires 0,3%.

Le pH de l'estomac varie de 1 à 2 (pendant le jeûne), une concentration de 0.3% (p/v) est souvent considérée comme critique pour la sélection des souches probiotiques résistantes (**Yang Li et al., 2019**). Pour considérer une souche comme probiotique, elle doit être capable de maintenir sa survie dans ces conditions de pH faible et des sels biliaires pour garantir qu'elle traverse l'intestin tout en offrant des avantages pour la santé de l'hôte.

Il a été rapporté, que certaines souches de bactéries lactiques comme les lactobacilles sont capables de métaboliser leurs acides biliaires ce qui les protèges contre la bile, l'un des mécanismes de cette résistance est la déconjugaison des acides biliaires par les enzymes hydrolase des sels biliaires, ce qui a pour effet de diminuer la solubilité de la bile à pH bas et de réduire ses activités détergentes (**Ayyash et al.,2021**).

### III.3.3. Adhérence sur tube de verre

Les propriétés d'adhérence des lactobacilles ont été évaluées *in vitro* selon la méthode d'adhérence sur tube de verre, les résultats recueillis après 48h d'incubation sont résumés dans le **Tableau 8**. Deux isolats ont donné des scores d'adhésion sur tube de verre supérieur ou égal à 3 selon l'échelle visuelle de Murchison (**Photo 04**).



**Photo 04 :** Adhérence des isolats lactiques sur tube de verre.

**a :** échelle visuelle de la classification de Murchison, **b :** les quatre isolats

La formation de biofilm par les bactéries lactiques productrices d'EPS est cruciale (**Eshrati et al., 2018 ; Kaur et al., 2022**); qui augmente leur potentiel probiotique bénéfique par compétition sur surface cellulaire et les nutriments avec les pathogènes et d'avoir une importante capacité de contact qui facilite l'échange de signaux (**Gurram et al., 2021**).



**Tableau 8.** Résultats des tests d'adhérence sur tube de verre

Isolats	Score
MA3	4
RB5	2
RE7	1
RI2	4

0: absence de biofilm ; 1: biofilm non-adhérent ; 2: biofilm faiblement adhérent ; 3: biofilm adhérent ; 4: biofilm fortement adhérent.

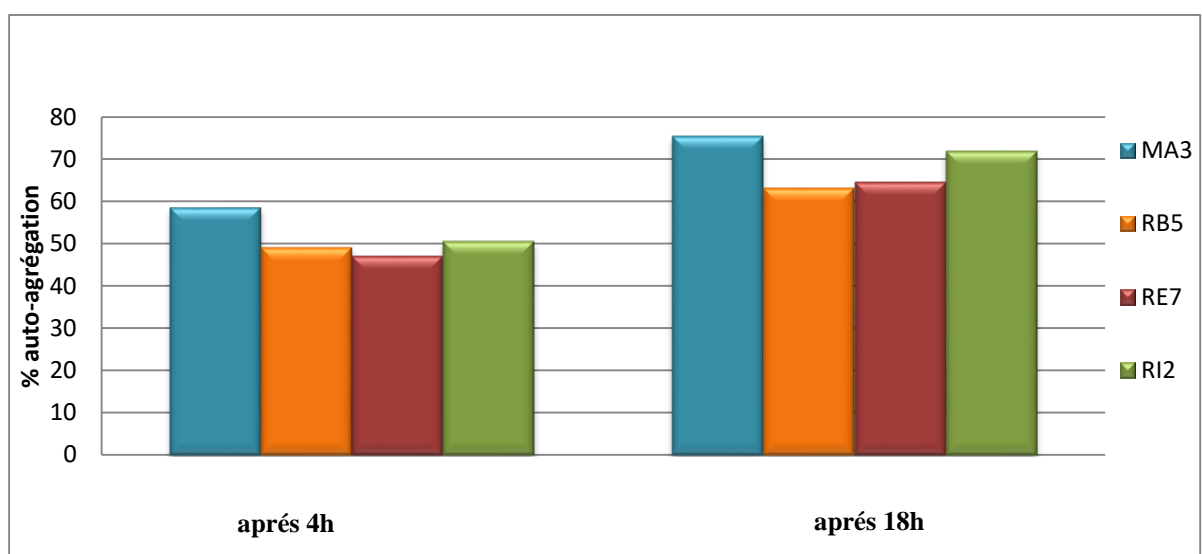
Les travaux de **Samot et al. (2012)** ont montré que les bactéries lactiques fortement adhérent aux surfaces et formant les biofilms sont des producteurs d'exopolysaccharides ; qui représentent la matière en cause de l'adhésion (**Lu Y., et al., 2022**) .

Ces bactéries à Gram positif (vu la composition de la paroi) ; leur capacité à adhérer aux surfaces dépend principalement de la liaison spécifique des récepteurs, de la charge et de l'interaction hydrophobe (**Omeonu et al .,2022**).

### III.3.4. Capacité d'auto-agrégation/co-agrégation

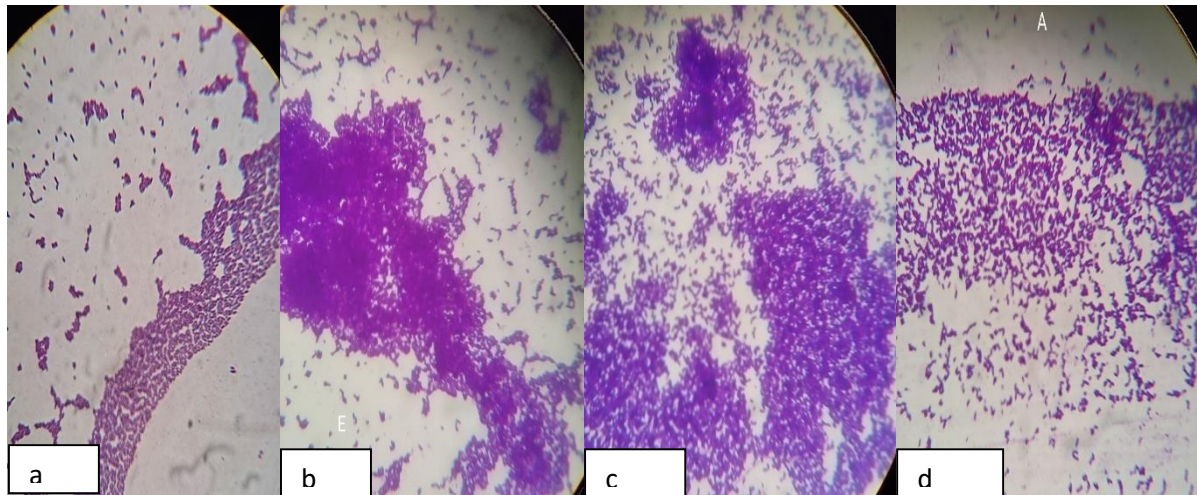
L'autoagrégation et la co-agrégation sont considérées comme des caractères nécessaires à l'adhérence. Car, ils facilitent la colonisation temporaire et protègent le système hôte par la formation de biofilm sur le tissu de l'hôte (**Ren et al., 2014 ; Tallapragada et al ., 2018**).

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les isolats MA3, RB5, RE7, RI2 étudiées ont une capacité modérée d'auto-agrégation avec un pourcentage de 58,51%, 49,05%, 47,07%, 50,58% respectivement après 4 heures d'incubation (**Figure 9**).



**Figure 9:** Pourcentage d'auto-agrégation des quatre isolats lactiques.

Donc les quatre isolats ont un fort pourcentage d'autoagrégation (> 10%) selon les critères décrits par **Rodríguez-Sánchez et al.(2021)**. Après 18h d'incubation, les quatre isolats ont montré un pourcentage plus élevé à celui de 4h d'incubation ; MA3 (75.39%), RB5 (62.98%), RE7(64.47%), RI2 (71.88% ).L'observation microscopique a également confirmé la formation des regroupements cellulaires et la présence des agrégats (**photo 05**).



**Photo 05** : Photomicrographie de l'auto-agrégation des quatre isolats lactiques (G×100).

(a) :RB5 : (b): RE7 : (c) :RI2 : (d) :MA3

Les mêmes résultats sont trouvés par **Lee et al. (2021)**, où ils ont isolés deux souches de bactéries lactiques : *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Lactobacillus plantarum* KU200656 avec un taux d'auto- agrégation de 71,30 % et 73,08 %, respectivement après 18h d'incubation.

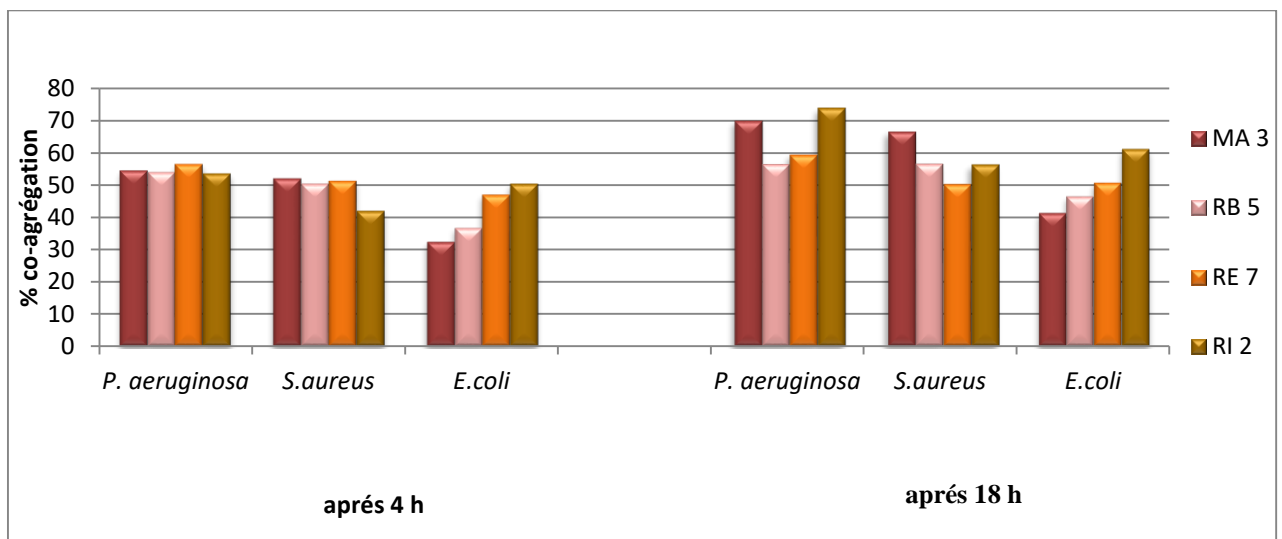
Une autre étude menée par **Ahmed et al. (2021)** a démontré que la plus forte capacité d'auto-agrégation, supérieure à 40% après 24 h d'incubation, les pourcentages d'auto-agrégation les plus élevés sont :  $63,61 \pm 2.65\%$ , et  $61,74 \pm 1.8\%$  ont été enregistrés pour *Lb. fermentum* (L10) et *Strep. lutetiensis* (L14) respectivement.

Alors que, les travaux de **Jang et al.(2019)** ont prouvé qu' après 4 heures d'incubation la souche *L. brevis* KU15153 et *L. rhamnosus* GG ont des capacités d'auto-agrégation de 21,44 % et 22,68 % respectivement alors que après 24 heures d'incubation l'auto-agrégation était chez *L. brevis* KU15153 (52,55 %) et celle de *L. rhamnosus* GG (44,70 %).

La coagrégation avec les pathogènes est également considérée comme une caractéristique des souches probiotiques car elle permet d'éviter la colonisation du tractus gastro-intestinal par des pathogènes et peut constituer un mécanisme de défense important contre l'infection (**Rodríguez-Sánchez et al., 2021**).

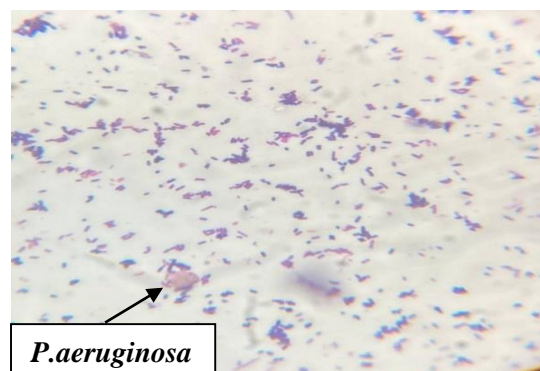
Le test de co-agrégation a été réalisé entre quatre isolats lactiques MA3, RB5, RE7, RI2 et les trois souches pathogènes ATCC *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. coli* après 4h et 18h d'incubation.

D'après les résultats présentés dans **la figure 10**, nous avons remarqué une bonne coagrégation de MA3, RB5, RE7, RI2 avec les trois espèces pathogènes *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. coli* après 18h d'incubation où les valeurs enregistrées (**Photo 06**); pour MA3 étaient de 69.95 %, 66.60% et 41.38%, avec RB5 nous avons trouvé 56.48%, 56.55%et 46.40% , l'isolat RE7 a présenté des valeurs de 59.40%, 50.31%et 50.74% alors que le taux de la co-agrégation pour RI2 étaient de 73.85%, 56.33% et 61.14% respectivement.



**Figure 10 :** Pourcentages de coagrégation des quatre isolats lactiques avec *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Des études réalisées par **Khalil et al.(2018)** ont montré que le pourcentage de co-agrégation de *Lactobacillus sp* est proche de notre résultat et il varie entre : 50.05% et 63.94% pour *P. aeruginosa*, pour *S. aureus* 22.10% - 40.15%. Cependant il est moins important pour *E. coli* (22.94 % -36.54%).



**Photo 06 :** Photomicrographie de la co-agrégation d'isolat lactique RI2 avec *P. aeruginosa* (Gx100).

Les mêmes résultats sont trouvés par **Ahmed et al. (2021)** où ils ont trouvé que *Lb. acidophilus* , et *Streplutetiensis* ont une capacité de la coagrégation avec *E. coli* par des valeurs de  $52.51 \pm 3.62$ , et  $45,76 \pm 1,92\%$ , respectivement.

La forte capacité de coagrégation de souches lactiques indique qu'une barrière défensive peut être produite qui empêchera les pathogènes de coloniser l'intestin humain. La présence de protéines spécifiques et/ou d'un facteur adhésif spécifique sur la surface de ces souches nécessite des études complémentaires (**Sui et al., 2021** ).

De plus, la coagrégation avec un pathogène potentiel permet aux probiotiques de produire des substances antimicrobiennes à proximité immédiate de ces derniers, ce qui peut être bénéfique pour la santé, ce qui peut inhiber la croissance des souches pathogènes dans le tractus gastro-intestinal (**Cozzolino et al., 2020 ; Rodríguez-Sánchez et al., 2021**).

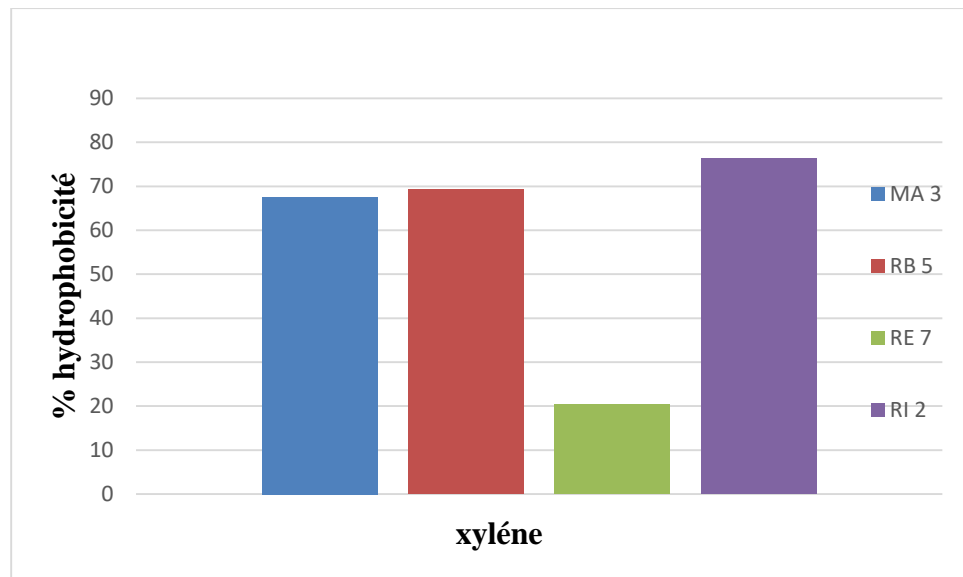
### **III.3.5. Test d'hydrophobicité**

L'hydrophobie de la surface bactérienne est une caractéristique importante pour maintenir les bactéries dans le tractus gastro-intestinal. Cette caractéristique est l'un des facteurs qui peuvent permettre aux bactéries probiotiques de mieux adhérer à la muqueuse (**Çelik et Çelebioğlu.,2021**).

Dans ce test, nous avons évalué l'hydrophobicité de la surface cellulaire de quatre isolats lactiques MA3, RB5, RE7, RI2 vis-à-vis du xylène (solvant apolaire) (**Grujović et al., 2019**), les résultats obtenus sont mentionnés dans la **Figure 11**.

D'après les résultats obtenus, le pourcentage d'hydrophobicité obtenu pour MA3, RB5, RE7 et RI2 en présence du xylène était de 67.56 % , 69.34 % ,20.29 % ,76.27 % respectivement.

Le pourcentage d'hydrophobicité est exprimé comme suit : 0-35 % - faible hydrophobicité ;36-70 % - hydrophobicité modéré ; 71-100 % - hydrophobicité forte (**Grujović et al.,2019**).



**Figure 11:** Pourcentage d'hydrophobicité des quatre isolats lactiques vis-à-vis du xylène.

Par ailleurs Selon **Burgain et al. (2014)**, une bactérie est hydrophobe lorsque le pourcentage d'hydrophobicité est supérieur à 50% et hydrophile lorsqu'il est inférieur à 20% et moyennement hydrophobe si le pourcentage est compris entre ces deux valeurs, donc nos isolats sélectionnés ne sont pas hydrophile.

Les études sur la surface des cellules microbiennes ont montré que la présence d'une matière protéique entraîne une plus grande hydrophobie, tandis que les surfaces hydrophiles sont associées à la présence de polysaccharides (**Cozzolino et al., 2020**).

Ces résultats sont proches à ceux de **Handa et Sharma. (2016)**, *L.plantarum* avait un pourcentage de 50.8% d'hydrophobicité au xylène.

Selon **Dlamini et al.(2019)** où ils ont isolé quatre souches de bactéries lactiques *Lactobacillus reuteri* ZJ625, *Lactobacillus reuteri* VB4, *Lactobacillus salivarius* ZJ614 et *Streptococcus salivarius* NBRC13956. La surface cellulaire hydrophobe a été démontrée par une forte adhérence au xylène (78-84 %).

Selon **Rodríguez-Sánchez et al. (2021)** les BL sont naturellement hydrophiles et que l'hydrophobicité est une propriété qui dépend de la souche.

En particulier, les propriétés physiques et chimiques de la surface des cellules bactériennes, telles que l'hydrophobie et la capacité d'auto-agrégation, pourraient donner des informations sur la capacité d'une souche à d'interagir avec son environnement. Plus précisément, l'hydrophobicité est très probablement due aux éléments suivants interactions complexes entre les charges positives et

négatives, entre les composants hydrophobes et hydrophiles caractérisant la surface bactérienne (Cozzolino *et al.*, 2020).

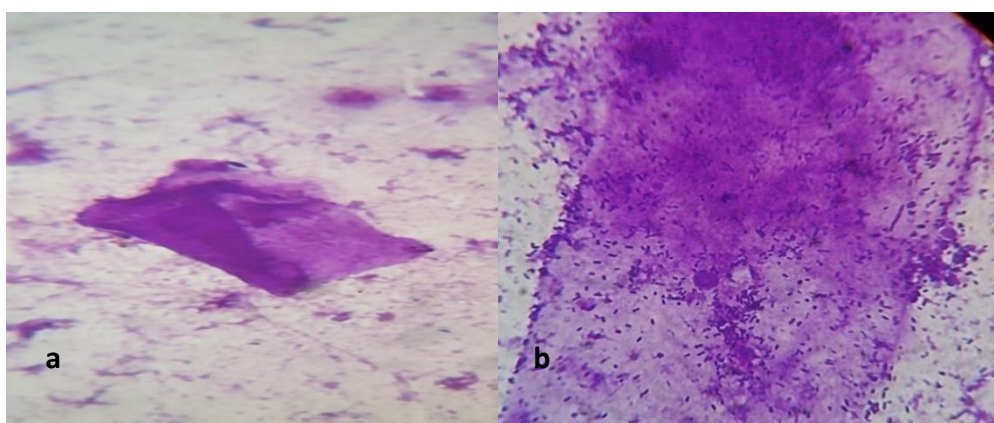
La différence d'hydrophobicité est due à la variation du taux de protéines cellulaires ainsi qu'aux conditions de l'environnement qui peuvent affecter l'expression de ces protéines de surface de la cellule (Sayedbowrn *et al.*, 2014).

La capacité d'adhésion des bactéries joue un rôle important dans la colonisation intestinale. Par conséquent, l'hydrophobie a été considérée comme un marqueur probiotique potentiel, au même titre que d'autres attributs souhaitables, utilisés pour la sélection de nouvelles souches probiotiques (Cozzolino *et al.*, 2020).

### III.3.6. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial intestinal

Les probiotiques peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé en inhibant la colonisation des agents pathogènes et en améliorant la cicatrisation des muqueuses lors de l'adhésion à l'épithélium intestinal (Jeong *et al.*, 2021).

Une vérification des tissus est réalisée pour confirmer la pureté de nos cellules et l'efficacité du lavage. La **Photo 07** montre les résultats de l'adhésion au tissu épithélial des quatre isolats sélectionnés. D'après l'observation microscopique de cinq champs nous avons déduit que les isolats ont une forte capacité d'adhésion aux cellules épithéliales (plus que 15 bactéries par cellule) des souches RI2, MA3 et RB5. Tandis que RE7 ont montré une capacité d'adhésion moyenne.



**Photo 07** : Photomicrographie d'adhésion de l'isolat RI2 aux cellules épithéliales (G×100).

(a) Contrôle négatif, (b) adhésion de RI2

Les micro-organismes potentiellement probiotiques doivent posséder une capacité d'attachement pour coloniser et exercer les bienfaits attendus sur la santé (Ayyash *et al.*, 2021) ; un meilleur échange de signaux entre les bactéries et les cellules de tube digestif, exerçant un antagonisme en inhibant la colonisation du tractus intestinal par des bactéries pathogènes (Chen *et al.*, 2018) .

La capacité d'adhésion des probiotiques peut être affectée par plusieurs facteurs, tels que les liaisons non spécifiques, y compris les forces de Van Der Waals, forces électrostatiques et liaisons hydrogènes et hydrophobes, et la liaison spécifique aux molécules par une fixation directe via des adhésines qui peut être de nature protéique, polysaccharidique, ou lipoteichoïque (Jeong *et al.*, 2021).

Les gènes liés à l'adhésion peuvent être identifiés comme pathogènes chez les bactéries pathogènes. Cependant, pour les probiotiques tels que les bactéries lactiques, ces gènes sont liés à la survie et à la colonisation (adhésion) des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal, les gènes d'adhésion ne sont plus subjectivement des gènes de virulence (Wu *et al.*, 2023).

La couche de mucus qui recouvre le tube digestif est le premier point de contact entre le microbiote intestinal et l'hôte (Xu *et al.*, 2021). La surface des probiotiques contient de nombreux types de molécules et de structures biologiques qui ont un impact sur leur capacité à s'attacher à la couche de mucus par hydrophobicité, y compris l'EPS, les pili et l'acide lipoteichoïque (Konieczna *et al.*, 2018 ; Lu *et al.*, 2022).

Les mécanismes d'adhésion ont été largement étudiés pour les bactéries nouvellement isolées, en tant qu'élément important de la caractérisation des probiotiques (Ayyash *et al.*, 2021).

### **III.3.7. Recherche de la productrices d'eau oxygénée par les isolats**

La capacité de production de peroxyde d'hydrogène a été divisée en 4 groupes selon l'intensité de la couleur dont une production élevée est de (+++), une production moyenne de (++) et une faible production de (+), cependant, une absence de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est cotée de (-). La **photo 08** illustre la forte production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour les quatre isolats sélectionnés.



**Photo 08 :** Identification de la production de peroxyde d'hydrogène des quatre isolats lactiques (a) :RB5 : (b): RE7 : (c) :MA3 : (d) :RI2.

Les *lactobacilles* sont capables de produire des substances antimicrobiennes actives. La plupart sont des acides organiques (principalement l'acide lactique) et du peroxyde d'hydrogène, qui a été déterminée par des changements pigmentaires dans les colonies (**Kumherová et al., 2021**).

Le mécanisme par lequel les lactobacilles résistent au peroxyde d'hydrogène diffère selon les espèces et selon les souches de la même espèce. L'expression constituée du système thiorédoxine-thiorédoxine réductase jouant un rôle important dans la tolérance à l'oxygène et au peroxyde d'hydrogène chez *L. casei*. Par ailleurs, il est bien établi que le NADH peroxydase décompose l' $H_2O_2$  et que certaines souches de *L. plantarum* produisent de la pseudo catalase qui agit également pour décomposer le peroxyde d'hydrogène (**Serata et al., 2016 ;Tang et al., 2017**).

Bien que  $H_2O_2$  soit relativement doux et peu réactif et toxique, il peut former des ROS plus actifs, tels que les radicaux hydroxyles, entraînant ainsi d'autres réactions, ce qui entraîne des dommages dans les cellules (**Tang et al., 2017**).

Selon **Feng et Wang.(2020)** les bactéries possédant une catalase sont très résistantes à  $H_2O_2$ , mais en raison de l'absence de cette activité, les bactéries lactiques présentent généralement une résistance plus faible à  $H_2O_2$ .

De nombreuses études ont examiné les mécanismes de tolérance des bactéries lactiques à l'oxygène et aux ROS. Des enzymes telles que la NADH oxydase et la pyruvate oxydase, qui dégradent



l'oxygène moléculaire, la superoxyde dismutase (SOD), qui cible le superoxyde en tant que substrat, et la NADH peroxydase, qui dégrade le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sont impliqués dans les mécanismes de tolérance (Naraki *et al.*, 2020).

La production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les *lactobacilles* est l'un des mécanismes de défense les plus importants contre la colonisation par des micro-organismes pathogènes ou opportunistes (Santos *et al.*, 2016).

### III.3.8. Pouvoir acidifiant

Pour étudier la capacité d'acidification des isolats testés, une mesure de PH a été suivie durant 4 h, 6 h et 24 h d'incubation. La diminution du pH des quatre isolats en culture pure, est présentée dans le **tableau 09**.

**Tableau 09.** Variation du pH du surnageant des cultures dans 24H

t(h) \ pH	MA3	RB5	RE7	RI2
0	5,85	5,85	5,85	5,85
4	5,47	5,44	5,50	5,55
6	5,18	5,18	5,26	5,11
24	3,74	3,76	3,75	3,75

L'acidification des quatre isolats a commencé dès les premières heures d'incubation pour arriver après 24 h à une valeur ~ 3,75 pour les quatre isolats. Pendant les 04 premières heures le pH ne subit pas de modifications majeures et les lactiques commencent à s'adapter au milieu et aux substrats disponibles. Ensuite, jusqu'à environ six heures de fermentation, on observe une légère baisse du pH, due en fait que les bactéries lactiques commencent à métaboliser les sources disponibles plus rapidement. Au cours de l'étape suivante, après 24 heures, le pH diminue (de 3,75), ce qui indique la performance d'acidification de ces isolats notant que sont de différentes niches (miel et raib).

Des expériences ont montré que, les souches lactiques ont un degré élevé d'activité acidifiante, surtout dans les dernières heures de la fermentation dont les travaux de Berhe *et al.* (2018) ont donné des résultats proches de nos résultats.

Selon Hossain *et al.* (2023) et Deshwal *et al.* (2021) le PH acide est dû de la production d'acides organiques, en créant un environnement acide, défavorise la croissance des bactéries non tolérantes et exerce une compétition pour les substrats.

Le pouvoir acidifiant des lactiques des aliments laitiers est le plus puissant (Berhe *et al.*, 2018), cela implique que les isolats lactiques du miel ont aussi un fort potentiel acidifiant.

### III.3.9. Activité antibactérienne et effet des surnageants

L'évaluation du pouvoir antagoniste et l'activité antibactérienne de quatre isolats lactiques a été étudié vis-à-vis cinq souches (**photo 09**), à savoir *Escherichia coli* ATCC25922 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens* et *Staphylococcus aureus*, l'inhibition se traduit par la formation de zones claires, autour des souches ensemencées. Les diamètres des zones d'inhibitions (Zi) sont représentés dans le **tableau 10**.

**Tableau 10.** Diamètres des zones d'inhibitions (mm) cultures et surnageants des isolats lactiques vis-à-vis des souches pathogènes.

Isolats lactiques souches cibles	surnageants des isolats lactiques (mm)				Culture des isolats lactiques (mm)			
	MA	RB	RI	RE	MA	RB	RI	RE
<i>Escherichia coli</i> (ATCC) 25922	13mm	12mm	12mm	13mm	12mm	10mm	12mm	13mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC) 27853	15mm	15 mm	14mm	14mm	12mm	11 mm	17mm	13mm
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC) 25923	12mm	-	-	12mm	12mm	10mm	11mm	16mm
<i>Serratia marcescens</i>	13mm	13mm	13mm	14mm	11mm	12mm	13mm	9 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	9 mm	13mm	9mm	9 mm

Le **tableau 10** signale que l'activité antibactérienne des surnageant des souches lactiques n'était pas semblable envers la collection des souches cibles. En effet, les diamètres des zones d'inhibitions étaient compris entre 12 et 15mm. L'activité inhibitrice vis-à-vis *Staphylococcus aureus* était totalement absente.

Il apparaît que les surnageants des isolats lactiques RB5 et RI2 n'arrivent pas à inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, alors que nous avons trouvé une bonne activité antimicrobienne contre les autres souches mises au test, d'où l'apparition de zones d'inhibition d'un diamètre compris entre 12 et 15mm pour les isolats lactiques RB5 et RI2.

Les surnageant des isolats lactiques MA3 et RE7 exercent une meilleure activité inhibitrice vis-à-vis des cinq souches pathogènes, avec des diamètres de zones d'inhibition qui oscillent entre 12 et 15mm et entre 12 et 14 mm respectivement.

Une étude menée par **Bindu et Lakshmidévi. (2021)** a révélé que les surnagent préparés à partir de *L. acidophilus*, *L. plantarum* et *L. rhamnosus* ont montré une activité antibactérienne contre *E. coli* avec une zone d'inhibition allant de 17 à 31 mm de diamètre.

La fraction extracellulaire correspondant au surnageant présente un fort pouvoir antibactérien, ce qui confirme la production d'agent antimicrobien par les souches lactiques dans le milieu. Plusieurs études ont montré que la fraction extracellulaire contient des substances responsables de cette interaction (**Labioui et al., 2005**).

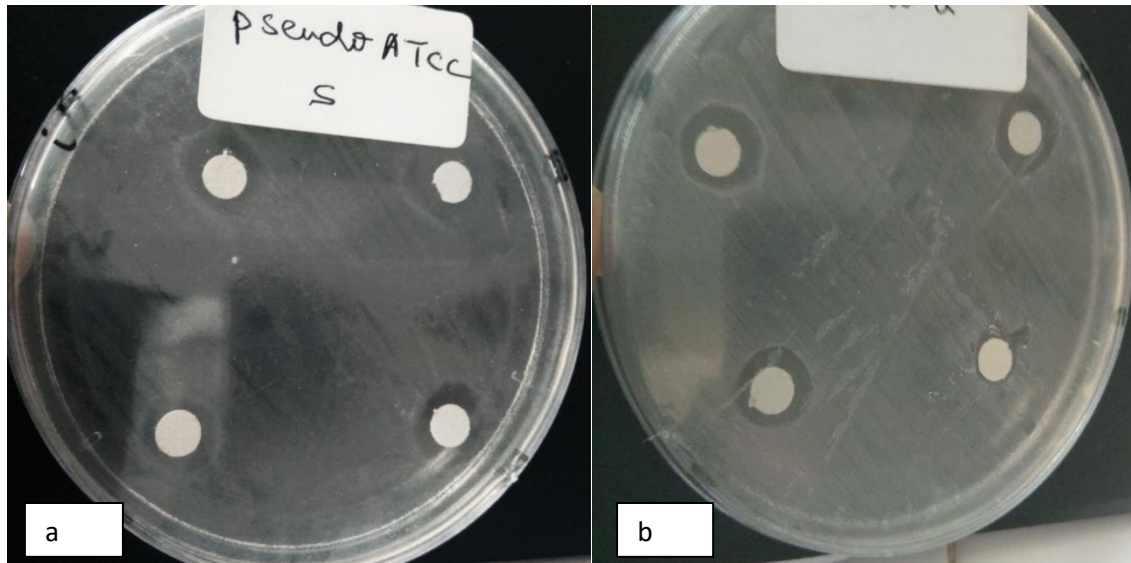
La production de substances antimicrobiennes dans le surnageant peut être favorisée par des modifications des facteurs intrinsèques de la culture, tels que le profil des nutriments et les micro-éléments (**Evangelista et al., 2021**).

Les résultats observés dans **le tableau 10** montrent que la plupart des isolats possèdent un effet antagoniste contre les bactéries indicatrices. Les meilleures zones d'inhibition ont été observées pour les souches RI2 et RE7 à l'égard de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC et *Staphylococcus aureus* ATCC avec des zones 17 et 16 mm respectivement.

La souche MA3 a un effet inhibiteur, plus ou moins prononcée, sur toutes les bactéries pathogènes avec des diamètres des zones d'inhibition de 9 à 12 mm, et la souche RB5 présentent une nette inhibition des cinq souches tests dont le diamètre des zones d'inhibition est compris entre 10 et 13mm.

Les souches *lactobacillus* sont connues pour produire une large gamme de composés antibactériens, y compris des bactériocines, d'enzymes inhibitrices, des acides organiques, de l'éthanol, du diacétyle et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En outre, les substances antibactériennes produites par les BL sont généralement reconnues comme des composants non toxiques et non irritants, car elles sont naturellement dégradées dans le corps ou dans l'environnement. L'activité antibactérienne est donc

une propriété importante des probiotiques (Muhammad *et al.* ,2019 ; Jeong *et al.* , 2021 ; Dincer et Kivanc ., 2022).



**Photo 09** : Résultats de l'activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis de  
(a) :*Pseudomonas aeruginosa* ATCC et (b) :*Serratia marcescens*

Les résultats obtenus corroborent ceux dévoilé par **khan** et al. (2021), ces derniers ont montré que la souche *Lactobacillus agilis* exerce a un effet antagoniste important contre *E.coli* (13mm) et *Staphylococcus aureus* (13mm).

Les travaux **Adesulu-Dahunsi** et al. (2018) ont reporté que les diamètres des zones d'inhibitions de la souche *Lactobacillus plantarum* contre *Staphylococcus aureus* ATCC 11632 (8-15 mm), et *Escherichia coli* ATCC11229 (2-9 mm).Selon **Lee** et al. (2021) les diamètres des zones d'inhibitions des deux souche : *Lactobacillus rhamnosus* GG exerce un effet antagoniste important contre *E. coli* (29 mm).et *Staphylococcus aureus* (25,40 mm) et la souche *Lactobacillus plantarum* KU200656 vis-à-vis de *E. coli* (31,44 mm).et *Staphylococcus aureus* (30,17mm).

L'inhibition de certaines bactéries pathogènes peut aussi être associée aux EPS secrétés par les souches productrices (**Denkova et al.**, 2017) . Les EPS sont capables de perturber la structure de l'enveloppe cellulaire bactérienne, en particulier la couche de peptidoglycane. Ce qui peut mener au blocage des récepteurs ou des canaux situés sur la membrane externe des bactéries (**Sivasankar et al.**, 2018).

### III.4. Evaluation de l'aspect sécuritaire

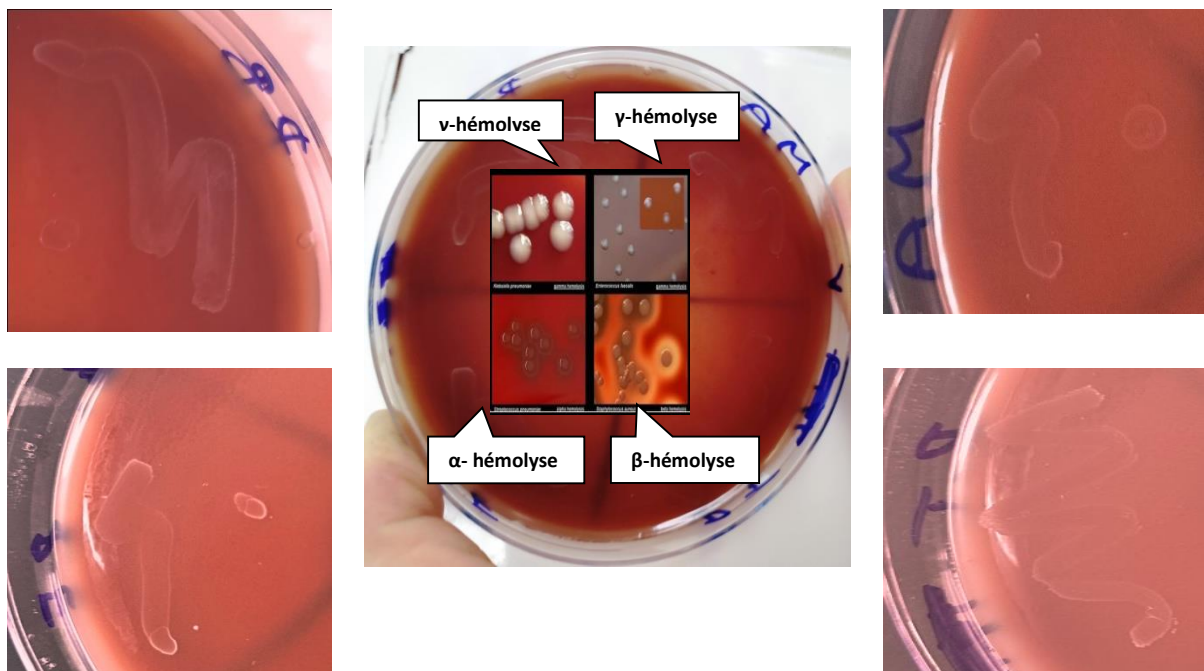
Pour l'évaluation de la sécurité, la sensibilité aux antibiotiques, et les activités hémolytiques doivent être prises en compte conformément à la directive **FAO/OMS** de 2002.

#### III. 4.1. Activité hémolytique

Pour déterminer l'aspect sécuritaire des isolats étudiés, une évaluation des propriétés hémolytiques est testée.

Il est bien connu que l'hémolyse est associée à la pathogénicité des souches en raison de la production d'hémolysines (**Kim et al., 2022**). Notre bactéries étudiées n'ont montré aucune activité d'hémolyse ( $\gamma$ -hémolyse) autour des colonies sur la gélose au sang (**Photo 10**). En effet l'absence de tout signe d'hémolyse indique l'aspect sécuritaire de nos lactiques.

Une faible activité hémolytique est considérée comme un facteur de risque pour l'homme, dans notre étude, les isolats ont montré une activité négative qui nous a permis de dire que ces isolats ont la possibilité d'être utilisés comme souches probiotiques.



**Photo 10** : Zones  $\gamma$ -hémolyse des quatre isolats comparés à un exemple (**Meng et al., 2021**)

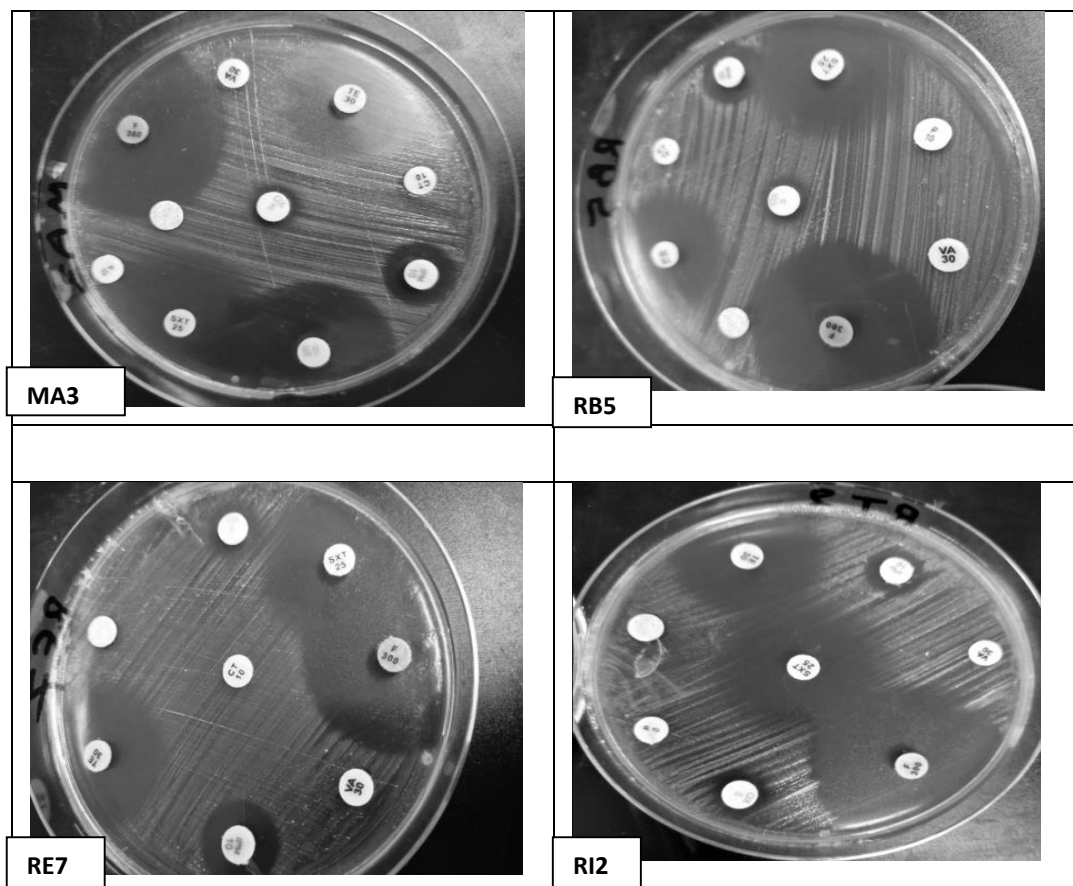
D'après des recherches récentes, les gènes liés à l'hémolysine n'ont pas été trouvés dans les gènes des *Lactobacilles* (**Wu et al., 2023**). C'est le même cas pour plusieurs souches des *Lactocoques* qui ont été non hémolytiques (**Pienizet et al., 2014**).

### III. 4.2. Résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques et les probiotiques semblent jouer un rôle bénéfique dans le traitement et la prévention des maladies gastriques (Li *et al.*, 2020).

Les quatre isolats mises en test ont présenté une résistance et sensibilité (**Photo11**) ; selon les zones d'inhibitions vis-à-vis des antibiotiques utilisés (**Tableau 11**).

Les isolats MA3, RB5, RE7 et RI2 ont présenté une résistance à 11 antibiotiques : Pénicilline, Vancomycine, Ticarcilline, Ceftazidime, Oxacilline, Ampicilline, Imipenem, Ofloxacine, Polymixine B, Colistine et Lincomycine. Une sensibilité était observée avec les 6 antibiotiques restants : Amoxicilline, Nitrofurane, Bactrim, Spiramycine, Doxycycline et Tétracycline. Sauf pour RE7 qui résiste à la Doxycycline.



**Photo 11** : Zones d'inhibition des quatre isolats avec les 17 antibiotiques testés.

Le faite que nos isolats sont résistants à certains antibiotiques, c'est-à-dire qu'ils ne seront pas perdu après une antibiothérapie par de tel antibiotiques, alors que ces même isolats sont sensibles à d'autres antibiotiques.

Tableau 11. Résultats d'antibiogramme des quatre isolats testés

Antibiotique	Charge	Symbole	Famille	Zones d'inhibitions (mm)				Mode d'action
				MA 3	RB5	RE7	RI2	
Pénicilline	10 UI	P	Béta lactamines	R	R	R	R	bactérienne Inhibiteurs de la synthèse du peptido- glycane Inhibiteurs de la synthèse des protéines Inhibiteurs de la synthèse des protéines
Amoxicilline	25 µg	AMX	Béta-lactamines	20 I	27 S	24 S	26 S	
Vancomycine	30 µg	VAN	Glycopeptides	R	R	R	R	
Ticarcilline	75 µg	TIC	Carboxy pénicillines	R	R	R	R	
Ceftazidime	30 µg	CAZ	Céfalosporines	14 R	20 I	18 I	20 I	
Oxacilline	5 µg	OX	Béta-lactamines	10 R	10 R	12 R	12 R	
Ampicilline	10 µg	AM	Aminopénicillins	11 R	14 R	12 R	15 R	
Imipenem	10 µg	IPM	Carbapénèmes	15 R	15 R	15 R	12 R	
Ofloxacin	5 µg	OFX	Fluoroquinolones	11 R	11 R	11 R	11 R	
Nitrofurane	300 µg	F	Nitrofuranes	38 S	36 S	34 S	40 S	
Triméthoprime/sulfaméthoxazole	25 µg	SXT	Sulfamides-diaminopyrimidines	30 S	30 S	30 S	33 S	
Polymixine	300 UI	PB	Polymixines	R	R	R	R	
Colistine	10 µg	CT	Polymixines	R	R	R	R	
Spiramycine	100 µg	SR	Macrolides	30 S	31 S	30 S	30 S	
Lincomycine	2 µg	L	Lincosamides	7 R	7 R	12 R	12 R	
Doxycycline	30 µg	DO	Tétracyclines	24 S	28 S	13 R	24 S	
Tetracycline	30 µg	TE	Tétracyclines	29 S	28 S	26 S	28 S	

(S) sensible ; (I) intermédiaire ; (R) résistant

La sensibilité aux antibiotiques est considérée comme l'un des facteurs de sécurité les plus importants pour les souches probiotiques (Srinivash *et al.*, 2023). D'autres chercheurs trouvent qu'il fallait renforcer le microbiote intestinal par des probiotiques lors d'un traitement par les antibiotiques pour éviter toute complication (Liao *et al.*, 2021).

La résistance et la sensibilité des souches aux antibiotiques représentent une préoccupation pour les chercheurs car ces propriétés peuvent limiter les applications des probiotiques ; en cas de plasmides qui peuvent être transmis aux germes pathogènes (Devi *et al.*, 2023).

L'analyse du génome complet des bactéries lactiques a un grand intérêt pour les scientifiques afin de connaître leur pathogénicité et leur utilité (Wu *et al.*, 2023).

L'analyse de la séquence génomique des bactéries lactiques a confirmé qu'aucun gène pathogène ou gène similaire code pour la résistance aux antibiotiques, n'a été identifié (Kim *et al.*, 2018).

Les résultats de l'évaluation de la sécurité obtenus par **Manovina et al. (2022)** ont révélé que les bactéries lactiques sont considérées comme des organismes de qualité alimentaire et sont utilisées dans une variété de préparations pour l'alimentation humaine et animale.

**Ahire et al. (2021)** après avoir étudié la sensibilité aux antibiotiques des Lactobacilles, ont recommandé la sensibilité aux antibiotiques comme une caractéristique pour les utiliser en tant que culture probiotique.

D'après **Srinivash et al. (2023)** les bactéries lactiques sont sensibles aux inhibiteurs de protéines tels que la clindamycine, la tétracycline, le chloramphénicol et l'érythromycine et résistent aux antibiotiques à base de glycopeptides tels que la gentamycine, la streptomycine et la kanamycine .





***Conclusion***

Notre présent travail a été consacré pour isoler des bactéries lactiques à partir de quatre niche: lait de chèvre, raib du lait de vache, vinaigre de cidre et le miel naturel. Leur culture sur le milieu MRS et la catalase négatif après une coloration de gram.

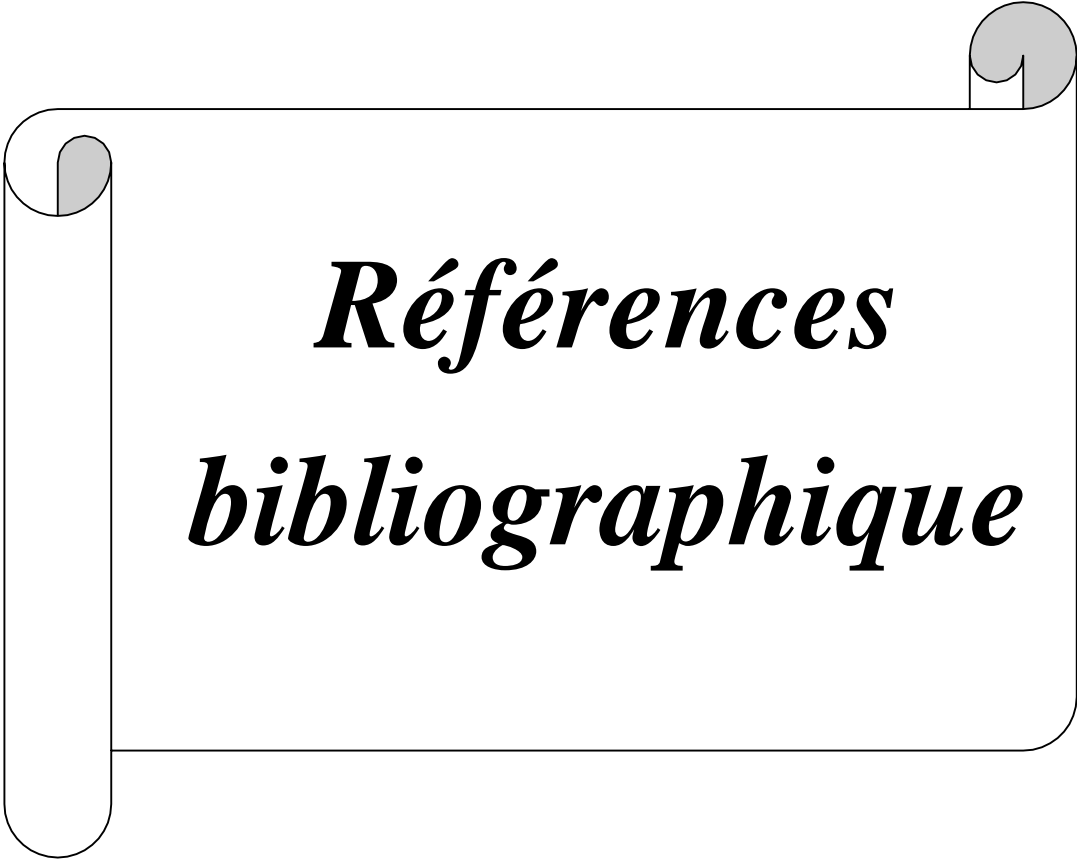
Un premier screening de 35 isolats purifiés basée sur la capacité de production d'EPS nous a permis de sélectionner quatre isolats MA3, RB5, RE7 et RI2 et après quantification l'isolat RI2 est la plus productrice de ces molécules.

Les résultats ont montré que les isolats MA3 et RI2 présentaient un bon potentiel probiotique mieux que RB5 et RE7. Ces dernières ont une résistance élevée aux conditions hostiles à savoir l'acidité (pH=2) et les sels biliaires (0.3%). Elles avaient une bonne capacité d'auto-agrégation, d'hydrophobicité et de co-agrégation et même un effet antagoniste et une activité antibactérienne des surnageants envers les agents pathogènes, une bonne adhésion aux cellules épithéliales et aussi une bonne adhérence au tube en verre signifiant la capacité de former des biofilms. Ces quatre isolats sont producteurs d'eau oxygénée. L'évaluation de l'aspect sécuritaires à donnée des zones  $\gamma$ -hémolytique avec les quatre isolats alors que la sensibilité et la résistance aux antibiotiques est variable selon la bactérie et le type d'antibiotique.

Au final et en guise de conclusion, nous pouvons dire que les aliments fermentés ou non testés, sont riches en bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides et qui ont un grand potentiel probiotique.

Comme perspectives les travaux suivants peuvent lui être complémentaires :

- Confirmation de l'identité des souches par des méthodes moléculaires,
- Etude des critères de sécurité des souches, à savoir, le test de cytotoxicité,
- Evaluation des effets probiotiques *in vivo*,
- Mise au point d'un lait fermenté probiotique à base des souches étudiées.



***Références  
bibliographique***

A

- Abarquero D., Renes E., Fresno J. M., Tornadijo M. E. 2022.** Study of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their industrial applications: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 57(1): 16-26.
- Abarquero D., Renes E., Combarros-Fuertes P., Fresno, J. M., Tornadijo M. E. 2022.** Evaluation of technological properties and selection of wild lactic acid bacteria for starter culture development. *International Journal of Food Science and Technology*. 171:114121.
- Abid Y., Casillo A., Gharsallah H., Joulak I., Lanzetta R., Corsaro M. M., Azabou S. 2018.** Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*. 108(1): 719-728.
- Adelekan A. O., Olurin T. O., Ezeani A. O. 2020.** Antioxidant activities of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria isolated from commercial yoghurt samples. *Advances in Microbiology*. 10(08): 359- 374.
- Adesulu-Dahunsi A. T., Jeyaram K., Sanni A. I. 2018.** Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products. *Food Control*. 92: 225-231.
- Adikari A. M. M. U., Priyashantha H., Disanayaka J. N. K., Jayatileka D. V., Kodithuwakku S. P., Jayatilake J. A. M. S.; Vidanarachchi J. K. 2021.** Isolation, identification and characterization of *Lactobacillus* species diversity from Meekiri: traditional fermented buffalo milk gels in Sri Lanka. *Heliyon*. 7(10). 8136.
- Ahire J. J., Sahoo S., Kashikar M. S., Heerekar A., Lakshmi S. G., et Madempudi R. S. 2021.** In vitro assessment of *Lactobacillus crispatus* UBLCP01, *Lactobacillus gasseri* UBLG36, and *Lactobacillus johnsonii* UBLJ01 as a potential vaginal probiotic candidate. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 15(2) :275-286.
- Ahmed A. S. I., El Moghazy G. M., Elsayed T. R., Goda H. A. L., Khalafalla G. M. 2021.** Molecular identification and *in vitro* evaluation of probiotic functional properties of some Egyptian lactic acid bacteria and yeasts. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 19(1): 1-16.
- Angelin J., Kavitha M. 2020.** Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*. 162 : 853-865.

**Ayivi R. D., Gyawali R., Krastanov A., Aljaloud S. O., Worku M., Tahergorabi R., Ibrahim S. A. 2020.** Lactic acid bacteria: food safety and human health applications. *Dairy*. 1(3): 202-232.

**Ayivi R. D., Ibrahim S.A. 2022.** Lactic acid bacteria : an essential probiotic and starter culture for the production of yoghurt. *international journal of food science and technology*.57(11) : 7008-7025

**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 nondairy products—Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability. *Journal of Dairy Science*. 104(8). 8363-8379.

## B

**Bachiri L., Echchegadda G., Ibijbijen J., Nassiri L. 2016.** Etude phytochimique et activité antibactérienne de deux espèces de Lavande Autochtones Au Maroc: «Lavandula stoechas L. et Lavandula dentata L.». *European Scientific Journal*. 12(30) : 313-333.

**Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M., Ouzrout R. 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "araabiaetkabyle". *Sciences and Technologie.C, Biotechnologies* :30-37.

**Bai L.J., Wang L., Ji S .J.2016.** Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharide from *L. helveticus* SMN2-1. *Chemical Engineering Transactions*. 55: 61-66.

**Bajpai V. K., Majumder R., Rather I. A., Kim K. 2016.** Extraction, isolation and purification of exopolysaccharide from lactic acid bacteria using ethanol precipitation method. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 11(3). 573-576.

**Beldarrain-Iznaga T., Villalobos-Carvajal R., Sevillano-Armesto E., Leiva-Vega J.2021.** Functional properties of *Lactobacillus casei* C24 improved by microencapsulation using multilayer double emulsion. *Food Research International*.141: 1-10.

**Berhe T., Ipsen R., Seifu E., Kurtu M. Y., Eshetu M Hansen E. B. 2018.** Comparison of the acidification activities of commercial starter cultures in camel and bovine milk. *International Journal of Food Science and Technology* .89. 123-127.

**Sarayu B .,Nahashon S. 2022.** "Recent Advances in Probiotic Application in Animal Health and Nutrition: A Review" *Agriculture* 12 (2): 304.

**Bindu A., Lakshmidēvi N. 2021.** Identification and *in vitro* evaluation of probiotic attributes of lactic acid bacteria isolated from fermented food sources. *Archives of microbiology*. 203 : 579-595.

**Bomfim V. B., Neto J. H. P. L., Leite K. S., De Andrade Vieira É., Lacomini M., Silva C. M., Cardarelli H. R. 2020.** Partial characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* CNPC003. *Food Science and Technology*. 127: 1-8.

**Burgain J., Scher J., Francius G., Borges F., Corgneau M., Revol-Junelles A., Cailliez-Grimal C., Gaiani C. 2014.** Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid Interface Science*. 213: 21-35.

**Buxeraud J. 2021.** Impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal. *Actualités Pharmaceutiques*. 60(607) : 18-19.

**Bouridane H., Sifour M., Idoui T., Annick L., et Thonard P. 2016.** Technological and probiotic traits of the lactobacilli isolated from vaginal tract of the healthy women for probiotic use. *Iranian Journal of Biotechnology*. 14(3) : 192-201.

## C

**Çelik E., Celebioglu Hu. 2021.** Effets de la capsanthine sur l'hydrophobicité de surface et les propriétés d'auto-agrégation de *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal international des sciences de l'environnement agricole et de l'alimentation* .5(2) :243-249.

**Chen W., Narbad A., Chen H., Narbad A. 2018.** Proteins and exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria. *Lactic Acid Bacteria in Foodborne Hazards Reduction: Physiology to Practice*. 51-85.

**Cizeikiene D., Jagelaviciute J. 2021.** Investigation of antibacterial activity and probiotic properties of strains belonging to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera for their potential application in functional food and feed products. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*: 1-17.

**Cozzolino A., Vergalito F., Tremonte P., Iorizzo M., Lombardi S. J., Sorrentino E., Succi M. 2020.** Preliminary evaluation of the safety and probiotic potential of *Akkermansia muciniphila* DSM 22959 in comparison with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microorganisms*. 8(2) : 1-13.

## D

**De los Reyes-Gavilán C. G., Suárez A., Fernández-García M., Margolles A., Gueimonde M., Ruas-Madiedo P. 2011.** Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell

line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Research in Microbiology*. 162(5): 514-519.

**De Melo Pereira G. V., de Oliveira Coelho B., Júnior A. I. M., Thomaz-Soccol V Soccol C. R. 2018.** How to select a probiotic. A review and update of methods and criteria. *Biotechnology advances*. 36(8): 2060-2076.

**Denkova R., Goranov B., Teneva D., Denkova Z. Kostov G. 2017.** Antimicrobial activity of probiotic microorganisms: Mechanisms of interaction and methods of examination. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs*. 1: 201-112.

**Deshwal G. K., Tiwari S., Kumar A., Raman R. K.; Kadyan S. 2021.** Review on factors affecting and control of post-acidification in yoghurt and related products. *Trends in Food Science & Technology*. 109. 499-512.

**Devi P. B., Rajapuram D. R., Jayamanohar J., Verma M., Kavitate D., Avany B. A. M., Shetty P. H. 2023.** Gamma-aminobutyric acid (GABA) production by potential probiotic strains of indigenous fermented foods origin and RSM based production optimization. *International Journal of Food Science and Technology*. 17:114511.

**Dimitonova S., Danova S., Serkedjieva J., Bakalov B. 2007.** Antimicrobial activity and protective properties of vaginal *lactobacilli* from healthy Bulgarian women. *Anaerobe*.13:178-184.

**Dincer E., Kivanc M. 2022.** Evaluation of metabolic activities and probiotic characteristics of two *Latilactobacillus sakei* strains isolated from pastirma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 38(12) :1-12.

**Dlamini Z. C., Langa R. L., Aiyegoro O. A., Okoh A. I. 2019.** Safety evaluation and colonisation abilities of four lactic acid bacteria as future probiotics. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 11(2) : 397-402.

**DuBois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. 1956.** Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28(3):350-356.

## E

**Edalati E., Saneei B., Alizadeh M., Hosseini S. S., Bialvaei A. Z., Taheri, K. 2019.** Isolation of probiotic bacteria from raw camel's milk and their antagonistic effects on two bacteria causing food poisoning. *New microbes and new infections*. 27:64-68.

**Eshrati M., Amadei F., Staffer S., Stremmel W., Tanaka M. 2018.** Shear-enhanced dynamic adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG on intestinal epithelia: correlative effect of protein expression and interface mechanics. *Langmuir*. 35(2): 529-537.

**Evangelista A. G., Corrêa J. A. F., Dos Santos J. V. G., Matté E. H. C., Milek M. M., Biauki G. C., Luciano F. B. 2021.** Cell-free supernatants produced by lactic acid bacteria reduce *Salmonella* population *in vitro*. *Microbiology*. 167(11). 1:13.

## F

**Felis G.F., Salvetti E., Torriani S. 2015.** Systematic of lactic acid bacteria: current status. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. 1: 25-31.

**Feng T., Wang J. 2020.** Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic. *Gut Microbes*. 12(1): 1-24.

**Ferdouse J., Paul S., Chowdhury T., Ali F., Islam S., Hossain T. J. 2022.** Probiotic characteristics of *Pediococcus pentosaceus* and *Apilactobacillus Kunkeei* strains: the lactic acid bacteria isolated from Bangladeshi natural honey. *Appl Food Biotechnol*. Forthcoming. 10 (1): 33-45.

**Fontana L., Bermudez-Brito M., Plaza-Diaz J., Munoz-Quezada S., Gil A. 2013.** Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*. 111(2): 35-50.

## G

**Gao Y., Li D. 2018.** Screening of lactic acid bacteria with cholesterol-lowering and triglyceride-lowering activity *in vitro* and evaluation of probiotic function. *Annals of Microbiology*. 68(9): 537-545.

**Gawande K., Kolhekar M., Kumari M., Kapila S., Sharma P., Ali S. A., Behare, P. V. 2021.** Lactic acid bacteria based purified exopolysaccharide showed viscofying and hypercholesterolemic capabilities. *Food Hydrocolloids for Health*. 1. 100042.

**Gogineni V. K., Morrow L. E., Gregory P. J., Malesker M. A. 2013.** Probiotics: history and evolution. *Journal of Ancient Diseases and Preventive Remedies*. 1(2):1-7.

**Greeshma K., Deokar C. D., Raghuvanshi K. S., Bhalerao V. K. 2022.** Morphological and molecular characterization of isolated probiotic yeast. *International Journal of Bio-resource and Stress Management*. 13(5): 472-480.



**Grujović M. Ž., Mladenović K. G., Nikodijević D. D., Čomić L. R. 2019.** Autochthonous lactic acid bacteria—presentation of potential probiotics application. *Biotechnology letters*. 41: 1319-1331.

**Guo S., Chen M., Wu T., Liu K., Zhang H., Wang J. 2022.** Probiotic *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* Probio-M8 improves the properties and organic acid metabolism of fermented goat milk. *Journal of Dairy Science*. 105(12): 9426-9438.

**Gupta R., Jeevaratna K., Fatima A. 2018.** Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health. *International Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*. 5(10): 411-424.

## H

**Hameed A. M., Elkhtab E., Mostafa M. S., Refaey M. M., Hassan M. A. A., El-Naga M. A.; Aly A. A. 2021.** Amino acids, solubility, bulk density and water holding capacity of novel freeze-dried cow's skimmed milk fermented with potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Bu-Eg5 and *Lactobacillus rhamnosus* Bu-Eg6. *Arabian Journal of Chemistry*. 14(8): 103291.

**Handa S., Sharma N. 2016.** *In vitro* study of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum*F22 isolated from chhang—A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 14(1): 91-97.

**Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*. 73(2): 365–373.

**Horvath P., Coûté-Monvoisin A. C., Romero D. A., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R. 2009.** Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *International journal of food microbiology*. 131(1): 62-70.

**Hossain S., Khetra Y., Dularia C., Meena G. S., Arora S. 2023.** Symbiotic fermentation study of *Acetobacter orientalis* and lactic acid bacteria for lactobionic acid enriched yoghurt production. *Food Bioscience*. 53:102612.

## I

**Iñiguez-Palomares C., Pérez-Morales R., Acedo-Félix E. 2007.** Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Revista Latino americana de Microbiologia*. 49(3-4): 46-54.

**J**

**Jang H. J., Lee N. K., Paik H. D. 2019.** Probiotic characterization of *Lactobacillus brevis* KU15153 showing antimicrobial and antioxidant effect isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*. 28: 1521-1528.

**Jeong C. H., Sohn H., Hwang H., Lee H. J., Kim T. W., Kim D. S., Hong, S. W. 2021.** Comparison of the probiotic potential between *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from kimchi and standard probiotic strains isolated from different sources. *Foods*. 10(9). 2125.

**Jomehzadeh N., Javaherizadeh H., Amin M., Saki M., Al-Ouqaili M. T., Hamidi H., Gorjian Z. 2020.** Isolation and identification of potential probiotic *Lactobacillus* species from feces of infants in southwest Iran. *International Journal of Infectious Diseases*. 96: 524-530.

**K**

**Kang M. S., Yeu J. E.; Hong S. P. 2019.** Safety Evaluation of Oral Care Probiotics *Weissella cibaria* CMU and CMS1 by Phenotypic and Genotypic Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(11): 1-22.

**Kathiriya M.R., Prajapati J.B., Hati S., Vekariya Y.V. 2018.** Significance of growth rate, acceptability of fermented milk and release of peptides by lactic cultures. *Research & Reviews: Journal of Dairy Science and Technology*. 5(1): 31-40.

**Kaur N., Dey P. 2022.** Bacterial Exopolysaccharides as Emerging Bioactive Macromolecules: From Fundamentals to Applications. *Research in Microbiology*. 104024.

**Khalil E. S., Manap M. Y., Mustafa S., Amid M., Alhelli A. M., Aljoubori A. 2018.** Probiotic characteristics of exopolysaccharides-producing *Lactobacillus* isolated from some traditional Malaysian fermented foods. *CyTA-Journal of Food*. 16(1) : 287-298.

**Khan A. N., Yasmin H., Ghazanfar S., Hassan M. N., Keyani R., Khan I., Ahmad, A. 2021.** Antagonistic, Anti-oxidant, Anti-inflammatory and Anti-diabetic Probiotic Potential of *Lactobacillus agilis* Isolated from the Rhizosphere of the Medicinal Plants. *Saudi journal of biological sciences*. 28(11): 6069-6076.

**Khataybeh B., Jaradat Z et Ababneh Q. 2023.** Anti-bacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities of honey: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 116830.

**Kim T., Mondal S. C., Jeong C. R., Kim S. R., Ban O. H., Jung Y. H., Kim, S. J. 2022.** Safety evaluation of *Lactococcus lactis* IDCC 2301 isolated from homemade cheese. *Food Science & Nutrition*. 10(1): 67-74.

**König H., Fröhlich J. 2017.** Lactic acid bacteria. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*: 3-41.

**Korcz E., Varga L. 2021.** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 110 : 375-384.

**Kumherová M., Veselá K., Kosová M., Mašata J., HoráčkováŠ., Šmidrkal J. 2020.** Novel potential probiotic *Lactobacilli* for prevention and treatment of vulvo vaginal infections. *Probiotics and antimicrobialproteins*. 13: 163-172.

## L

**Labioui H ., Elmoualdi L ., El Yachioui M., Ouhsine M. 2005.** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*. 144 : 237-250.

**Lai Y. J., Tsai S. H., Lee M. Y. 2014.** Isolation of exopolysaccharide producing *Lacto bacillus* strains from sorghum distillery residues pickled cabbage and their antioxidant properties. *Food Science and Biotechnology*. 23: 1231-1236.

**Laiche A.T., KhelefC., DaoudiH. 2019.** Study of the Antimicrobial Activity of Bacteriocins Produced by Lactic Bacteria Isolated from Camel Milkin Southern Algeria. *Journal of Pure and Applied Microbiology*.13(2):1285-1292.

**Lashani E., Davoodabadi A., Dallal M. M. S. 2020.** Some probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from honey and their antimicrobial activity against foodborne pathogens. *Veterinary research forum* .11(2):121–126.

**Lee J. E., Lee N. K., Paik H. D. 2021.** Antimicrobial and anti-biofilm effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* KU 200656 isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*. 30 : 97-106.

**Li T., Teng D., Mao R., Hao Y., Wang X., Wang J. 2020.** A critical review of antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Food Research International*. 136: 109571.

**Liao W., Chen C., Wen T., Zhao, Q. 2021.** Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in adults: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Journal of clinical gastroenterology*. 55(6): 469.

**Lin T. Y., Chien M. F. C. 2007.** Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*. 100(4):1419-1423.

**Liu C., Xue W. J., Ding H., An C., Ma S. J. 2021.** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented vegetables in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology*. 4168.

**Liu W., Pang H., Zhang H., Cai Y. 2014.** Biodiversity of lactic acid bacteria. *Lactic acid bacteria: Fundamentals and Practice*: 103-203.

**Lu Y., Han S., Zhang S., Wang K., Lv L., Mc Clements D. J., Li L. 2022.** The role of probiotic exopolysaccharides in adhesion to mucin in different gastrointestinal conditions. *Current Research in Food Science*. 5 : 581-589.

## M

**Manovina M., Selvi B. T., Prathiviraj R., Selvin J. 2022.** Potential probiotic properties and molecular identification of lactic acid Bacteria isolated from fermented millet porridge or ragi koozh and jalebi batter. *Animal Gene*. 26: 200134.

**Markowiak P., Śliżewska K. 2017.** Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*. 9(9): 1-30.

**Mattarelli P., Holzapfel W., Franz C. M., Endo A., Felis G. E., Hammes W., Pot B., Dicks L., Dellaglio F. 2014.** Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 64(4): 1434-1451.

**Mayo B., Aleksandrak-Piekarczyk T., Fernandez M., Kowalczyk M., Alvarez-Martin P., Bardowski J. 2010.** Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. 3-33.

**Melia S., Yuherman J., Purwati E. 2018.** Selection of buffalo milk lactic acid bacteria with probiotic potential. *Asian Journal of pharmaceutical and clinical research*. 11(6): 186-189.

**Melo C. D. C. S., Da Silva Freire A., Galdeano M. A., da Costa C. F., de Oliveira Gonçalves A. P. D., Dias F. S., Menezes D. R. 2021.** Probiotic potential of *Enterococcus hirae* in goat milk

and its survival in canine gastrointestinal conditions simulated in vitro. *Research in Veterinary Science*. 138: 188-195.

**Meng L., Zhu X., Tuo Y., Zhang H., Li Y., Xu C., Jiang, S. 2021.** Reducing antigenicity of  $\beta$ -lactoglobulin, probiotic properties and safety evaluation of *Lactobacillus plantarum* AHQ-14 and *Lactobacillus bulgaricus* BD0390. *Food Bioscience*. 42: 101137.

**Mgbodile F. C., Nwagu, T. N. T. 2023.** Probiotic therapy, African fermented foods and food-derived bioactive peptides in the management of SARS-CoV-2 cases and other viral infections. *Biotechnology Reports*. 1-795.

**Mokoena M. P .2017.** Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens. A mini-review *Molecules*. 22(8): 1-13.

**Monika Savitri., Kumar V., Kumari A., Angmo K., Bhalla T. C. 2017.** Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India. *Journal of Food Science and Technology*. 54 : 1945-1952.

**Mostefaoui A., Hakem A., Yabrir B., Boutaiba S., Badis A. 2014.** Screening for exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian rawcamel milk. *African Journal of Microbiology Research*. 8(22) : 2208-2214.

**Mozzi F., Vignolo G. M. 2010.**Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. *Blackwell publishing*. 54 :35-57.

**Muhammad Z., Ramzan R., Abdelazez A., Amjad A., Afzaal M., Zhang S., Pan S. 2019.** Assessment of the antimicrobial potentiality and functionality of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from the conventional inner Mongolian fermented cheese against foodborne pathogens. *Pathogens*. 8(2) :1-20.

**Murchison H., Larrimore S., et Curtiss 3rd R. 1981.** Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* mutants defective in adherence and aggregation. *Infection and immunity*. 34(3) : 1044-1055.

## N

**Naraki S., Igimi S., Sasaki Y. 2020.**NADH peroxidase plays a crucial role in consuming H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Lactobacillus casei* IGM394. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 39(2): 45-56.

**Nataraj B. H., Mallappa R. H. 2021.** Antibiotic resistance crisis: an update on antagonistic interactions between probiotics and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Current Microbiology*. 78(6): 2194-2211.

**O**

**Ogunremi O. R., Sanni A. I., Agrawal R. 2015.** Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*. 119(3): 797–808.

**Omeonu F. C., Onilude A. A., Azuh V. O., Laba S. A. 2022.** Phylogenetic identification and some physiological properties of lactic acid bacteria isolated from the oral cavities of some selected students from University of Ibadan, Nigeria. *Journal of Advances in Microbiology*. 22(8): 70-83.

**Oyewole O. F., Maria C. O., Tope P. S., Funmi O. O. 2018.** *In vitro* Study of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from The Gut of Chickens in Abeokuta, Nigeria. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*. 58(1) :73-84.

**P**

**Plavec T.V., Berlec A. 2020.**Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*. 8(2): 1-21.

**Prabhurajeshwar C., Chandrakanth R. K. 2017.**Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An *in vitro* validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical Journal*. 40(5):270-283.

**R**

**Rahmeh R., Akbar A., Kishk M., Al-Onaizi T., Al-Azmi A., Al-Shatti A., Akbar B. 2019.**Distribution and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from raw camel milk. *New Microbes and New Infections*.30:1-8.

**Rajoka M. S. R., Hayat H. F., Sarwar S., Mehwish H. M., Ahmad F., Hussain N., Shi J. 2018.** Isolation and evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from poultry intestine. *Microbiology*. 87(1) : 116-126.

**Reddy G., Altaf M. D., Naveena B. J., Venkateshwar M., Kumar E. V. 2008.** Amylolytic bacterial lactic acid fermentation—a review. *Biotechnology advances*. 26(1):22- 34.

**Ren D., Li C., Qin Y., Yin R., Du S., Ye F., LIU C., Liu H.,Wang M., Li L., Sun Y., Li X., TianM., Jin N. 2014.** *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*. 30: 1-10.

**Rodríguez-Sánchez S., Fernández-Pacheco P., Seseña S., Pintado C., et Palop M. L. 2021.** Selection of probiotic *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity to be used as biocontrol agents in food industry. *LWT-Food Science and Technology*. 143 : 1-11.

**Rodzi N. A. R. M., Lee L. K. 2021.** Traditional fermented foods as vehicle of non-dairy probiotics: Perspectives in South East Asia countries. *Food Research International*. 150 :110814.

**S**

**Saadat Y. R., Khosroushahi A. Y., Gargari B. P. 2019.** A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate polymers*. 217:79-89.

**Samedi L., Charles A.L. 2019.** Evaluation of Technological and Probiotic Abilities of Local Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 7(1): 9-19.

**Samot J. 2012.** *Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux* (Doctoral dissertation, Université de Bordeaux Ségalen (Bordeaux 2)).

**Sandes S., Alvim L., Silva B., Acurcio L., Santos C., Campos M., Nunes Á . 2017.** Selection of new lactic acid bacteria strains bearing probiotic features from mucosal microbiota of healthy calves: Looking for immunobiotics through *in vitro* and *in vivo* approaches for immunophylaxis applications. *Microbiological Research*. 200:1-13.

**Santarmaki V., Kourkoutas Y., Zoumpopoulou G., Mavrogonatou E., Kiourtzidis M., Chorianopoulos N., Ypsilantis P. 2017.** Survival, intestinal mucosa adhesion, and immunomodulatory potential of *Lactobacillus plantarum* strains. *Current microbiology*. 74 :1061-1067.

**Santos C. M., Pires M. C., Leao T. L., Hernández Z. P., Rodriguez M. L., Martins A. K., Nicoli J. R. 2016.** Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. *Microbiology*. 162(7): 1195-1207.

**Sauer M., Russmayer H., Grabherr R., Peterbauer C.K., Marx H. 2017.** The Efficient clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. *Trends in Biotechnology*. 35(8): 756-769.

**Savado A., Traore A. S. 2011.** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 5(5):2057- 2075.

- Savedboworn W., Charoen R., Phattayakorn K. 2014.** Growth and survival rates of *Lactobacillus plantarum* in Thai cereal cultivars. *Applied Science and Engineering Progress*. 7(3): 49-61.
- Serata M., Kiwaki M., Iino T. 2016.** Functional analysis of a novel hydrogen peroxide resistance gene in *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Microbiology*. 162(11) : 1885-1894.
- Shewale R.N., Sawale P.D., Khedkar C.D et Singh A. 2014.** Selection criteria for probiotics. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 9 (1): 17-22.
- Shokryazdan P., Faseleh Jahromi M., Liang J. B., et Ho Y. W. 2017.** Probiotics: from isolation to application. *Journal of the American College of Nutrition*. 36(8): 666-676.
- Simões L., Fernandes N., de Souza A., dos Santos L., Magnani M., Abrunhosa L., Dias D. R. 2022.** Probiotic and antifungal attributes of lactic acid bacteria isolates from naturally fermented Brazilian table olives. *Fermentation*, 8(6): 277.
- Sivasankar P., Seedeve P., Poongodi S., Sivakumar M., Murugan T., Sivakumar L., Balasubramanian T. 2018.** Characterization, antimicrobial and antioxidant property of exopolysaccharide mediated silver nanoparticles synthesized by *Streptomyces violaceus* MM72. *Carbohydrate polymers*. 181: 752-759.
- 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. *Journal of microbiology and biotechnology*. 29(12): 1894-1903.
- Srinivash, M., Krishnamoorthi, R., Mahalingam, P. U., Malaikozhundan, B., Keerthivasan, M. 2023.** Probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from homemade fermented food products. *Journal of Agriculture and Food Research*. 11:100517.
- Sui Y., Liu J., Liu Y., Wang Y., Xiao Y., Gao B., Zhu D. 2021.** *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus* strains from fermented tangerine vinegar and their cholesterol degradation activity. *Food Bioscience*. 39 : 1-9.
- Sun Z., Yu J., Dan T., Zhang W., Zhang H. 2014.** Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice*. 1-101.
- Szutowska J. 2020.** Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: A systematic literature review. *European Food Research and Technology*. 246(3): 357-372.



**T**

**Tallapragada P., Rayavarapu B., Rao P P., Ranganath N.N., Veerabhadrapa P.P. 2018.** Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 16(2) : 357-362.

**Tang W., Xing Z., Li C., Wang J., Wang Y. 2017.** Molecular mechanisms and *in vitro* antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. *Food Chemistry*. 221: 1642-1649.

**V**

**Vihari S.R., Laeeq S., Pradhan R., Khan I.H. 2014.** Identification of microbial flora from uti patients via biochemical reaction. *International Journal of Current Research*. 10(6):9028-9037.

**W**

**Wedajo B. 2015.** Lactic acid bacteria: benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. *Journal of Probiotics and Health* .3(2): 129-138.

**Wu J. J., Zhou Q. Y., Liu D. M., Xiong J., Liang M. H., Tang J., Xu Y. Q. 2023.** Evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* LGZ1029 based on whole genome and phenotype analysis. *International Journal of Food Science and Technology*. 114759.

**Wu Q., Zhang C., Wa Y., Qu H., Gu R., Chen D., Chen X. 2022.** Correlation between exopolysaccharide biosynthesis and gastrointestinal tolerance of *Lactiplantibacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 132(1): 584-591.

**Y**

**Yadav R., Shukla P. 2017.** Probiotics for human health: current progress and applications. *Recent Advances in Applied Microbiology*. 133-147.

**Yan T., Goldman R. D. 2020.** Les probiotiques pour la diarrhée liée aux antibiotiques chez l'enfant. *Canadian Family Physician*. 66(1) : 9-11.

**Z**

**Zantar S., El Galiou O., Zerrouk H. M., Laglaoui A. 2013.** Elaboration d'un fromage de chèvre semi-affiné à partir d'une sélection de souches lactiques autochtones isolées du lait de chèvre du Nord du Maroc. *Options Méditerranéennes*. 108(1) :191-197.

**Zarour K., Prieto A., Pérez-Ramos A., Kihal M., López P. 2018.** Analysis of technological and probiotic properties of Algerian *L. mesenteroides* strains isolated from dairy and non-dairy products .49:351-361.

**Zhang J., Xiao Y., Wang H., Zhang H., Chen W., Lu W. 2023.** Lactic acid bacteria-derived exopolysaccharide: Formation, immunomodulatory ability, health effects, and structure-function relationship. *Microbiological Research*. 127432.

**Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C. M., Harris H. M., Mattarelli P., O'toole P. W., Pot B., Vandamme P. Walter J. 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*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 70(4): 2782-2858.



***Annexes***

### **Produits chimiques:**

- ❖ **Milieux de culture:** gélose MRS, bouillon MRS, bouillon et gélose nutritif.
- ❖ **Colorants:** colorants de la réaction de Gram (fushine, cristal violet, lugol),
- ❖ **Autres:** sels biliaires, PBS, Eau physiologique stérile, HCl, l'huile d'immersion, éthanol, phénol (80%), Alcool, Eau oxygénée, Xylène, Eau distillée, Eau physiologique, écouvillon stérile, glycérol, disques d'antibiotiques.

### **Appareillage**

- Bec Bunsen
- Bain marie (Memmert)
  
- Boîtes de Pétri, tubes à essais, flacons et ependoff.
- Pipettes Pasteur, pipettes graduées, burette, bécher, anse de platine, Micropipette
- Balance électronique
- Agitateur magnétique chauffant , Vortex
- Autoclave (Slli AVX électrique, pbibrand)
- Etuve 37°C (Memmert)
- Réfrigérateur (ENIEM)
- Centrifugeuse (SIGMA 1-14)
- Spectrophotomètre optique (analytik jena)
- pH mètre (Hanna)
- Microscope optique

### **Protocole de coloration de Gram**

- Verser sur une lame une goutte d'eau physiologique et mélanger avec une colonie de l'échantillon puis fixer à la chaleur.
- Couvrir le frottis avec le violet de Gentiane, laisser agir pendant 1 minute. Rincer la lame avec l'eau de robinet.
- Recouvrir la lame avec de lugol et laisser agir 1 minute. Rincer la lame avec l'eau de robinet.
- Recouvrir la lame avec de l'alcool pendant 30 secondes. Rincer avec l'eau de robinet jusqu'à disparition de la couleur violette.
- Couvrir la lame avec un contre colorant la fushine et laisser agir pendant 1 minute. Rincer doucement avec l'eau de robinet et sécher avec du papier absorbant.
- Examiner sur microscope sous l'objectif x100 avec une goutte d'huile à immersion.

## Les milieux des cultures

### Gélose hypersaccharosée

Extraitdeviande.....	10 g
Extraitdelevure.....	3 g
Bactopeptone.....	2,5 g
Saccharose.....	150 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2 g
NaCl.....	1 g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
Agar.....	1,5 g
Eaudistilléeqsp.....	1000 ml
PH=6,8-7	
Stérilisation20min120°C	

### Milieu MRS

Polypeptone.....	10 g
Extraitdeviande.....	10 g
Extraitautolytiquedelevure.....	5 g
Glucose.....	20 g
Tween80.....	1,08 g
Phosphatedipotassique.....	2 g
Acétatedesodium.....	5 g
Citratéd'ammonium.....	2 g
Sulfatedemagnésium.....	0,2 g
Sulfatedemanganèse.....	0,05 g
Eaudistilléeqsp	1000 ml
Stérilisation20min120°C	

### Phosphate Buffers Saline (PBS)

8gNaCl
0,2 gKCl
1,44gNa <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,24gKH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Eaudistillée1000ml
Ajusterle pH a7, 5
Stérilisation20min120°C

**Milieu MSE**

Tryptone 20 g

Gélatine 2.5 g

Extrait de levure 5 g

Saccharose 100 g

Glucose 5 g

Citrate de sodium 1 g

Azide de sodium 0.075 g

Agar-Agar 15 g

Eau distillée 1000 mL

pH 6,8

**Bouillon MRS**

Polypeptone..... 10.00g

Proteose peptone.....10.0 g

Extrait de viande.....10.00g

Extrait autolytique de levure..... 5.00g

Glucose..... 20.0g

Tween 80..... 1.08 g

Phosphate dipotassique.....2.0g

Sodium acétate..... 5.0

Ammonium citrate..... 2.0

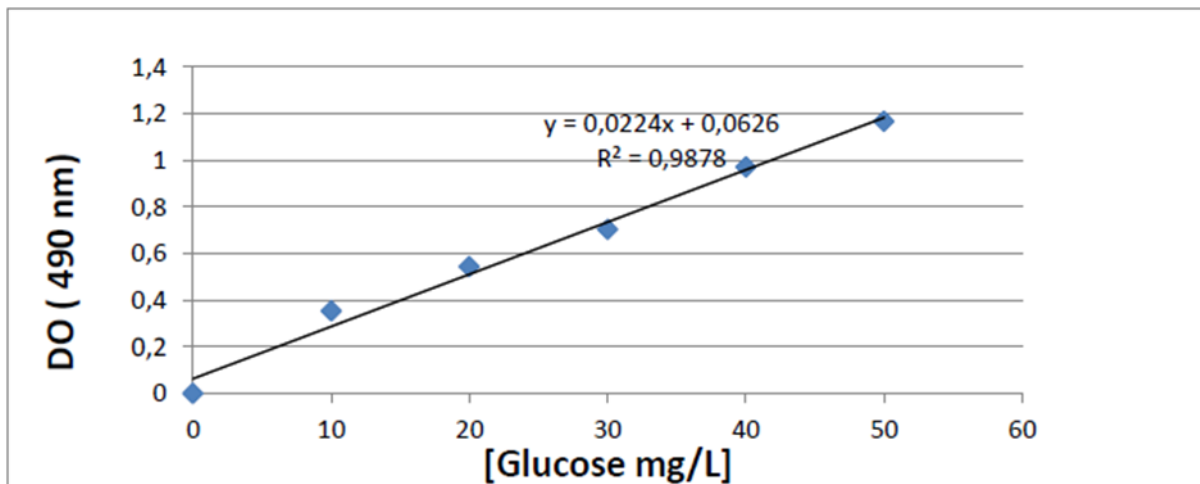
Magnésium sulfate..... 0.2

Manganèse sulfate..... 0.05

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C

**Solution de TCA 80%** : 8g de cristaux dissoudre dans 10ml d'eau distillée. Agitation vigoureuse par le vortex.

**Courbe d'étalonnage de glucose.**



---

Réalisé par :  
Khen Loubna  
Lounis Sounia

Encadré par:  
**D<sup>r</sup>.Bouridane Hamida**

Date de soutenance:  
10/09/2023

---

## Screening des bactéries lactiques potentiellement probiotiques isolées à partir des produits alimentaires

---

### Résumé

Dans cette étude, nous sommes intéressés à isoler et à sélectionner des bactéries lactiques productrices d'EPS provenant des produits alimentaires laitiers (lait de chèvre, lait de vache fermenté « Raib ») et non laitiers (Miel naturel, vinaigre de cidre de pomme). Trente-cinq isolats ont été purifiés et testés pour leur capacité de production des EPS. Quatre isolats ont été sélectionnés pour l'évaluation de leurs aptitudes probiotiques et leurs aspects sécuritaires. Les résultats trouvés montrent que les souches ont; une production d'exopolysaccharide modérée, une activité antibactérienne avec un diamètre compris entre 9-17 mm, une résistance aux conditions gastro-intestinale, une forte capacité d'auto et co-agrégation, un pouvoir adhésif au tissu intestinale, une hydrophobicité élevée, une production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, une résistance et sensibilité aux antibiotiques, un pouvoir acidifiant intéressant (PH~3,75) et absence de l'activité hémolytique.

**Mots clés :** Adhésion, Autoagrégation, Exopolysaccharides, Hydrophobicité, Probiotiques

---

### Abstract

In this study, we are interested to isolating, identifying lactic acid bacteria to produce EPS from dairy (goat's milk, « Raib » fermented cow's milk) and non-dairy (natural honey, apple cider vinegar) food products producing EPS. Thirty-five isolates were purified and tested for their ability. Four isolates were selected for evaluation of their probiotic potential and safety aspects. The results show that the strains have moderate exopolysaccharide production, antibacterial activity with diameters ranging from 9-17 mm, resistance to gastrointestinal conditions, high self- and co-aggregation capacity, adhesiveness to intestinal tissue, high hydrophobicity, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, resistance and sensitivity to antibiotics, interesting acidifying power (PH~3.75) and absence of hemolytic activity.

**Keywords :** Adhesion, Autoaggregation, Exopolysaccharide, Hydrophobicity, Probiotic

---

### ملخص

في هذه الدراسة ، نحن مهتمون بعزل واختيار بكتيريا حمض اللاكتيك التي تنتج EPS من منتجات الألبان (حليب الماعز ، حليب البقر المخمر "الرايب") وغير الألبان (العسل الطبيعي ، خل التفاح) من المنتجات الغذائية. تمت تنقية 35 عزلة واختبارها لمعرفة قدرتها على إنتاج مادة الـ EPS. تم اختيار أربع عزلات لتقييم كفاءتهم البروبيوتكية وجوانب السلامة الخاصة بهم. تظهر النتائج أن السلالات لديها ؛ إنتاج عديد السكاريد الخارجي المعتدل ، نشاط مضاد للجراثيم بقطر يتراوح بين 9-17 مم ، مقاومة لأمراض الجهاز الهضمي ، قدرة قوية على التجميع الذاتي والتجمع المشترك ، قوة لاصقة لأنسجة الأمعاء ، هيدروفوبية عالية، إنتاج H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ، مقاومة وحساسية للمضادات الحيوية ، قوة حامضية مثيرة للاهتمام (PH ~ 3.75) وغياب النشاط الانحلالي.

**الكلمات المفتاحية:** الإلتصاق، التجمع الخلوي الذاتي ، متعدد السكاريد، خاصية الكراهة للماء، البروبيوتيك.

---