

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل

Université Mohamed Seddik Benyahia - Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de la

Vie

Département de Microbiologie Appliquée

et des Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية وعلوم التغذية

## Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme :

**Master Académique en Biologie**

**Option** : Microbiologie Appliquée

**Thème** :

Evaluation de quelques propriétés probiotiques des bactéries lactiques tolérantes aux métaux lourds isolées de la microflore intestinale des nourrissons

**Membres de Jury :**

**Présidente** : M<sup>me</sup> Roula Sagia

**Examinatrice** : Dr. Ait Meddour Amel

**Encadreur** : Dr. Ouled Haddar Houria

**Présenté par :**

**M<sup>elle</sup> Kemih Ahlam**

**M<sup>elle</sup> Kerrouche Amel**

**Année Universitaire 2017 – 2018**

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

# *Remerciements*

*Au terme de cette étude, nous tenons à remercier ALLAH qui nous a donné le courage et la volonté d'aller jusqu'au bout et de ramener ce présent travail à son ultime point.*

*Nous tenons à témoigner notre profonde reconnaissance et exprimer nos remerciements à nos parents, leur amour, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel, nous ont permis de réaliser ce modeste travail.*

*Nos sincères remerciement sont adressés premièrement à notre encadreur **Dr.Ouled Haddar Houria**, d'avoir accepté de nous encadrer, de nous avoir prêté une attention particulière et n'a, à aucun moment, ménagé ses efforts pour nous apporter son aide la plus précieuse et ses nombreux conseils infailibles.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer notre travail, **M<sup>me</sup> Roula Sagia** en tant que présidente de jury et **Dr. Ait Meddour Amel** d'avoir pris de son temps pour examiner et juger notre travail.*

*Nos remerciements vont également à tout le corps enseignant de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, qui nous a fourni les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.*

*Nous voudrions exprimer notre reconnaissance envers l'ensemble des ingénieurs de laboratoires pour leurs aides et leur patience durant la période de la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions également nos amis et collègues qui ont été à nos côtés et nous ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long cette démarche.*

*Nous saisissons également cette opportunité pour remercier **M<sup>lle</sup> Abbas Nadjiba** pour son savoir, son aide et le temps qu'elle nous a accordé.*

*Enfin, Dans le souci de n'oublier personne, que tous ceux qui nous ont soutenu, encouragé, conseillé et aidé de près ou de loin, puissent trouver dans ces lignes l'expression de notre reconnaissance et gratitude.*

Liste des figures .....	III
Liste des tableaux .....	IV
Liste des abréviations .....	V
Introduction .....	1

### *Synthèse bibliographique*

I. La flore intestinale et la santé .....	3
II. Risques d'exposition aux métaux lourds et microbiote .....	6
II.1. Généralités sur les métaux lourds .....	6
II.2. De l'agriculture à l'industrie, les sources anthropiques varient .....	6
II.3. Répartition des métaux lourds dans l'environnement .....	8
II.4. Toxicité et conséquences .....	8
III. Mécanismes de tolérance aux métaux lourds.....	10
III.1. Exclusion du métal toxique par une barrière de perméabilité.....	12
III.2. Transport actif d'ions métalliques à partir de cellules (efflux).....	12
III.3. Désintoxication enzymatique.....	13
III.4. Séquestration extracellulaire ou intracellulaires.....	13
III.5. Exemples de l'élimination de quelques métaux lourds.....	13
III.5.1. L'Arsenic (As).....	13
III.5.2. Le Plomb (Pb) et le Cadmium (Cd).....	14
III.5.3. Le Mercure (Hg).....	15
III.5.4. Le Chrome (Cr).....	15

### *Matériel et Méthodes*

I. Méthodes.....	16
I.1. Préparation de l'échantillon, Isolement, Purification .....	16
I.1.1. Préparation des dilutions.....	16
I.1.1. Isolement des bactéries lactiques.....	16
I.1.3. Purification des souches isolées.....	16
I.1.4. Identification des bactéries lactiques.....	17
I.1.4.1. Etude des caractères morphologiques.....	17
a. Examen macroscopique.....	17
b. Examen microscopique.....	17
I.1.4.2. Etude des caractères physiologiques et biochimiques.....	17
a. Test de la catalase.....	17
b. Croissance à différentes températures (15°C, 25°C, 30°C et 44°C).....	17
c. Croissance à différentes concentration de NaCl.....	18

d. Recherche du type fermentaire.....	18
e. Hydrolyse de l'arginine (ADH).....	18
I.2. Screening des bactéries lactiques tolérantes aux métaux lourds.....	18
I.2.1. Préparation des solutions mères des métaux lourds.....	18
I.2.2. Etude de la tolérance des souches lactiques aux métaux lourds.....	19
I.2.3. Sélection des souches les plus résistantes aux métaux lourds.....	19
I.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	20
I.3. Evaluation biologique de quelques aptitudes probiotiques des bactéries lactiques <i>in vitro</i> ...	20
I.3.1. Tolérance aux acides.....	20
I.3.2. Tolérance aux sels biliaires.....	21
<b>Résultats et discussion</b>	
I. Isolement, purification et identification des bactéries lactiques.....	22
I.1. Etudes des caractères morphologiques des souches lactiques.....	22
I.1.1. Examen macroscopique.....	22
I.1.2. Examen microscopique.....	22
I.2. Tests physiologiques et biochimiques.....	23
I.2.1. Recherche de la catalase.....	24
I.2.2. Croissance à différentes températures.....	24
I.2.3. Croissance à différentes concentrations de NaCl.....	24
I.2.4. Recherche du type fermentaire.....	24
I.2.5. Hydrolyse de l'arginine.....	25
II. Etude de la tolérance des souches lactiques aux métaux lourds.....	27
II.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	33
III. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques des bactéries lactiques <i>in vitro</i> .....	35
III.1. Evaluation du taux de survie des bactéries lactiques aux conditions acides.....	35
III.2. Evaluation du taux de croissance des bactéries lactiques en présence sels biliaires.....	36
Conclusion .....	38
Références bibliographiques.....	39
Annexes.....	VII
Résumé	

<b>Figure 1</b> : Principales fonctions du microbiote.....	4
<b>Figure 2</b> : Aspect macroscopique de quelques colonies de bactéries lactiques pures sur milieu MRS incubée à 37°C pendant 48h .....	22
<b>Figure 3</b> : Aspect microscopique de quelques souches de bactéries lactiques après la coloration de Gram (G×100) .....	23
<b>Figure 4</b> : Résultats du type fermentaire montrant la formation de bulles de gaz.....	25
<b>Figure 5</b> : Résultats du test ADH sur quelques souches.....	25
<b>Figure 6</b> : Répartition des genres de la collection lactique %.....	26
<b>Figure 7</b> : Croissance de la souche E <sub>1</sub> C dans le bouillon MRS en présence de 30mg/l du métal incubée à 37°C .....	27
<b>Figure 8</b> : Croissance de la souche E <sub>1</sub> E dans le bouillon MRS en présence de 30mg/l du métal incubée à 37°C .....	27
<b>Figure 9</b> : Croissance de la souche E <sub>2</sub> A dans le bouillon MRS en présence de 30mg/l du métal incubée à 37°C .....	28
<b>Figure 10</b> : Croissance de la souche E <sub>2</sub> B dans le bouillon MRS en présence de 30mg/l du métal incubée à 37°C.....	28
<b>Figure 11</b> : Croissance de la souche E <sub>2</sub> C dans le bouillon MRS en présence de 30mg/l du métal incubée à 37°C.....	28
<b>Figure 12</b> : Croissance de la souche E <sub>2</sub> D dans le bouillon MRS en présence de 30mg/l du métal incubée à 37°C.....	28
<b>Figure 13</b> : Croissance de la souche E <sub>2</sub> E <sub>1</sub> dans le bouillon MRS en présence de 30mg/l du métal incubée à 37°C.....	29
<b>Figure 14</b> : Croissance de la souche E <sub>2</sub> E <sub>2</sub> dans le bouillon MRS en présence de 30mg/l du métal incubée à 37°C.....	29
<b>Figure 15</b> : Croissance de la souche E <sub>2</sub> G dans le bouillon MRS en présence de 30mg/l du métal incubée à 37°C.....	29
<b>Figure 16</b> : Croissance de la souche E <sub>2</sub> K dans le bouillon MRS en présence de 30mg/l du métal incubée à 37°C.....	29

<b>Tableau 1</b> : Micro-organismes utilisés comme probiotiques ( <b>Saad et al., 2013</b> ).....	5
<b>Tableau 2</b> : Provenance des métaux lourds à partir des différentes sources anthropogènes ( <b>Kobielska et al., 2018 ; Lee et al., 2018</b> ).....	7
<b>Tableau 3</b> : Différents effets de certains métaux lourds sur la santé humaine ( <b>Wang et al., 2003 ; Zare et al., 2018 ; Lal et al., 2018 ; Lee et al., 2018</b> ).....	9
<b>Tableau 4</b> : Caractères morphologiques des bactéries lactiques isolées sur bouillon MRS.....	23
<b>Tableau 5</b> : Caractères physiologiques et biochimiques des souches isolées.....	26
<b>Tableau 6</b> : Résultats de l'identification des genres.....	26
<b>Tableau 7</b> : Taux de croissance ( $h^{-1}$ ) des dix souches dans du bouillon MRS additionné de 30 mg/l de métal incubées à 37 C° pendant 48h.....	32
<b>Tableau 8</b> : Valeurs de la DO mesurée à 600 nm pour les souches, E <sub>2</sub> D, E <sub>2</sub> E <sub>1</sub> , E <sub>2</sub> E <sub>2</sub> en présence de concentrations croissantes du Cr, Cd et Pb respectivement.....	33
<b>Tableau 9</b> : Croissance des souches E <sub>2</sub> D, E <sub>2</sub> E <sub>1</sub> et E <sub>2</sub> E <sub>2</sub> en fonction du pH du milieu.....	35
<b>Tableau 10</b> : Taux de survie (%) des souches E <sub>2</sub> D, E <sub>2</sub> E <sub>1</sub> et E <sub>2</sub> E <sub>2</sub> dans le milieu acide à pH 2.....	36
<b>Tableau 11</b> : Taux de croissance ( $min^{-1}$ ) des souches E <sub>2</sub> D, E <sub>2</sub> E <sub>1</sub> et E <sub>2</sub> E <sub>2</sub> incubées dans du bouillon MRS avec et sans bile, après 240 minutes d'incubation .....	37

**[Me]** : Concentration de métal  
**°C** : Degré Celsius  
**μ** : Taux de croissance  
**AA** : Acide aminé  
**AGCC** : Acide gras à chaîne courte  
**As** : Arsenic  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**B.** : *Bifidobacterium*  
**BL** : Bactéries Lactiques  
**Cd** : Cadmium  
**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice  
**Cr(III)** : Chrome trivalent  
**Cr(VI)** : Chrome hexavalent  
**Cu** : Cuivre  
**DO** : Densité Optique  
**ETM** : Eléments Traces Métalliques  
**FAO** : Food Agricultural Organization  
**Fe** : Fer  
**GI** : Gastro-intestinal  
**h** : Heure  
**Hg** : Mercure  
**IgA** : Immunoglobuline A  
**L.** : *Lactobacillus*  
**MICI** : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin  
**Mn** : Manganèse  
**MRS** : Man, Rogosa et Sharpe  
**Ni** : Nickel  
**Pb** : Plomb  
**PBS** : Sodium Phosphate Buffer  
**pH** : Potentiel d'Hydrogène  
**rpm** : Rotation per minute  
**SM** : Solution Mère  
**Th17** : Lymphocyte T helper de type 17  
**TMAO** : Triméthylamine-N-oxyde  
**Treg** : Lymphocyte T régulateur

**UFC** : Unité Formant Colonie

**UV** : Ultraviolets

**v/v** : Volume par volume

**WHO** : World Health Organization

**Zn** : Zinc



# *Introduction*

Avec l'avènement de l'industrialisation, la sécurité alimentaire et la santé humaine sont devenues des questions récurrentes et préoccupantes partout dans le monde, dues à la pollution souvent invisible et très nocive constituant un réel problème aux différents organismes existants. Cette pollution est principalement liée à ce qui est communément appelé de nos jours « métaux lourds ». Ils se sont propagés partout dans notre environnement et sont accumulés dans notre organisme via la nourriture et l'eau que nous buvons, ainsi que par l'air que nous respirons (**Tada et Inoue, 2000 ; Wang et al., 2003 ; Mubofu, 2012**).

A l'état de traces, certains métaux sont nécessaires voir indispensables pour de nombreux processus cellulaires. En revanche, lorsqu'ils dépassent un certain seuil, ils présentent une toxicité plus ou moins forte, c'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), du fer (Fe). D'autres métaux, comme le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg) ou du cadmium (Cd), n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule et sont très dangereux même à faible dose. Contrairement à d'autres polluants, ces éléments ne sont pas biodégradables et ont tendance à former des complexes, s'accumulant dans les tissus (**El Makhfouk et al., 2003 ; Wang et al., 2003**).

Le cadmium (Cd) et le plomb (Pb), sont parmi les dix premiers métaux toxiques dans la liste prioritaire des substances dangereuses. Ils pénètrent dans le corps humain principalement par la nourriture et l'eau (**Teemu et al., 2008 ; Rathnayake et al., 2009 ; Bhakta et al., 2012**).

Le cadmium est biologiquement non essentiel mais toxique même à faible concentration. Il peut affecter toutes les formes de vie de par sa toxicité élevée et sa grande solubilité dans le sol et l'eau. Il a été considéré comme polluant extrêmement nocif. Il peut provoquer des maladies rénales, le cancer du poumon et du foie, comme il peut altérer la reproduction et le système cardiovasculaire (**Rathnayake et al., 2009 ; Leshe et Tessema, 2014**). Le plomb quant à lui est également considéré comme un polluant environnemental durable et est responsable de diverses maladies humaines graves (**Bhakta et al., 2012**).

A côté du plomb et du cadmium, le chrome est aussi hautement toxique et cancérigène. La contamination par le chrome est due principalement à son utilisation dans l'industrie du cuir, des métallurgies, du textile et des pigments. L'exposition des êtres humains à ce métal peut induire différentes pathologies dont les allergies, les diarrhées, l'eczéma, les ulcérations, les irritations de la peau, les désordres de la voie respiratoire...etc (**Kushwaha et al., 2012 ; Viti et al., 2013**).

Les méthodes d'élimination des métaux lourds sont diverses et variées mais toutes n'ont pas eu l'effet escompté et se sont souvent montrées très coûteuses et pas assez respectueuses de l'environnement. Ceci a suscité la curiosité des chercheurs et les a incité à trouver d'autres alternatives comme celle de la liaison des métaux lourds avec les bactéries lactiques à caractères

probiotiques et pourrait être une solution prometteuse pour l'élimination des métaux lourds du corps humain, de l'eau et des aliments (**Thabuy *et al.*, 2011 ; Wierzba *et al.*, 2015**).

En effet, les études ont montré que l'administration des probiotiques, souvent sous forme de complément alimentaire et qui sont des microorganismes vivants, aide vraisemblablement au rétablissement et au rééquilibre du microbiote intestinal mais aussi à sa protection des différentes substances dangereuses ingérées ou auxquelles on est exposé, notamment aux métaux lourds. C'est pour cela que la prise de ces microorganismes aux vertus thérapeutiques a connu un engouement important et font exclusivement l'objet des différentes recherches de ces dernières décennies (**Dupont, 2001**).

Ce présent travail a été principalement élaboré autour de la sélection des bactéries lactiques ayant la capacité à accumuler les métaux lourds tels que le plomb, le chrome et le cadmium afin de les utiliser dans la désintoxication du tractus intestinal et des aliments.

De ce fait, les principaux points établis au cours de ce travail pratique sont :

- L'isolement des bactéries lactiques des selles des nourrissons.
- Screening des bactéries lactiques tolérantes aux métaux lourds.
- La détermination de la CMI pour les souches les plus résistantes.
- L'évaluation de quelques propriétés probiotiques de ces bactéries lactiques.

*Synthèse*  
*bibliographique*

## I. La flore intestinale et la santé

Le microbiote intestinal (ou flore intestinale) est un ensemble de bactéries hébergées par l'être humain et vivant en symbiose avec son hôte, étroitement associé au tractus intestinal et interagissant avec lui, il constitue un écosystème complexe et diverse, il est réparti de manière différente tout le long du tractus intestinal (**Bourlioux et al., 2014 ; Joly et al., 2007**). La formation du microbiote intestinal débute dès la rupture des membranes fœtales, le tube digestif étant rapidement colonisé par les bactéries provenant du microbiote maternel et de l'environnement (**Butel, 2014**).

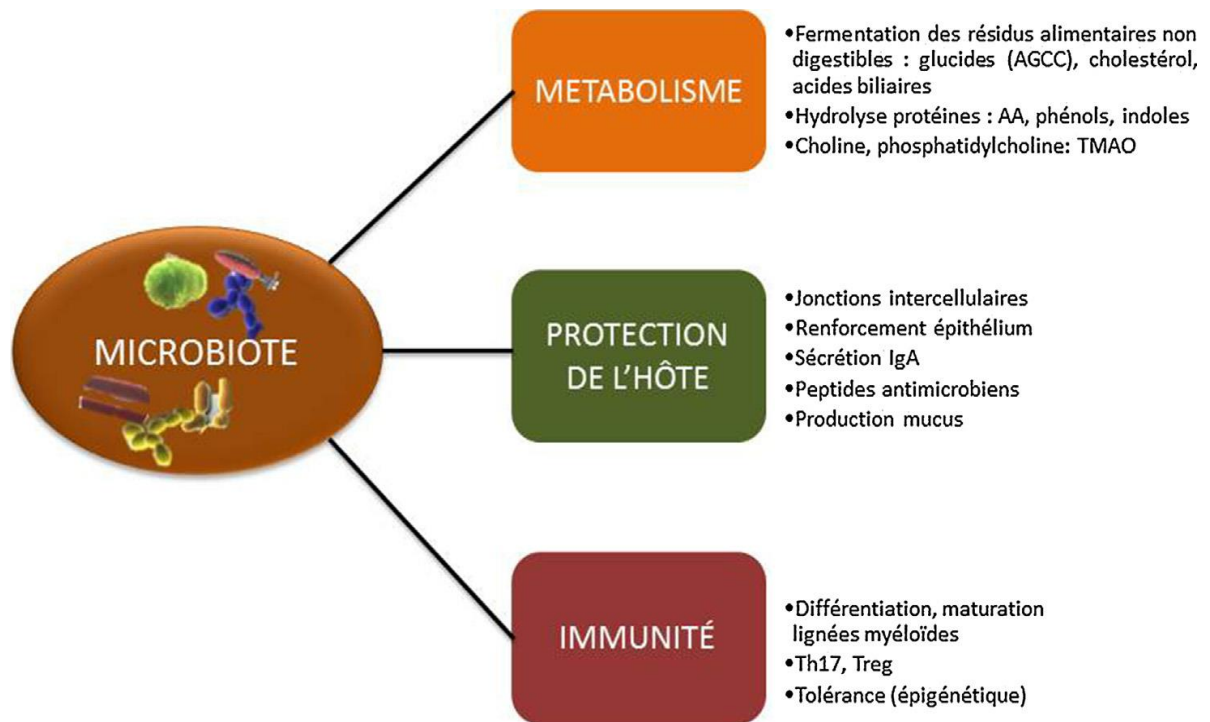
Il existe de nombreux facteurs qui influent sur la colonisation en bactéries du microbiote : le mode d'accouchement (voie basse, césarienne), l'âge gestationnel, l'alimentation, la prise d'antibiotiques. La composition du microbiote, propre à chaque individu, se diversifie ensuite sous l'influence de facteurs environnementaux (alimentation, hygiène, prise de médicaments...etc.) (**Bruneau et al., 2017**). Ce microbiote exerce de nombreuses fonctions physiologiques (**Figure 1**) et joue un rôle très important pour la nutrition et la santé de l'hôte (**Gras-Le Guen et al., 2011**). Parmi ces fonctions :

- Effet barrière et fonctions immunitaires

Le tractus digestif est protégé contre la colonisation par les agents pathogènes. Ceci est réalisé par la production de substances antimicrobiennes et la compétition pour les nutriments et les sites d'adhérence aux épithéliaux entre les bactéries commensales et les pathogènes. La flore intestinale exerce également des influences sur : l'épaisseur de la muqueuse intestinale, la taille des villosités, la production du mucus, l'activité enzymatique de la muqueuse, ainsi qu'une action sur les jonctions serrées. En plus elle stimule le développement du système immunitaire (**Bruneau et al., 2017**).

- Fonctions métaboliques

Tous les substrats non absorbés dans l'intestin grêle et les résidus alimentaires indigestibles sont fermentés par le microbiote colique, ce qui permet d'une part d'obtenir l'énergie nécessaire à la croissance des bactéries et, d'autre part, de générer la production d'une diversité de métabolites qui sont pour la plupart absorbés et utilisés par l'hôte (**Landman et al., 2016**).



**Figure 1** : Principales fonctions du microbiote (Tournadre *et al.*, 2017).

Acide gras à chaîne courte (AGCC), acide aminé (AA), triméthylamine-N-oxyde (TMAO), immunoglobuline A (IgA), lymphocyte T helper de type 17 (Th17), lymphocyte T régulateur (Treg).

En effet, les perturbations du microbiote intestinal sont impliquées aussi bien dans certaines pathologies intestinales que dans des pathologies extra-intestinales telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) du type maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique, l'obésité, le syndrome métabolique, certaines pathologies cardiovasculaires, certaines pathologies allergiques, en plus de l'autisme et des troubles du comportement (Bourlioux, 2014). Cependant, ce lien entre microbiote et pathologies est sous-tendu par de nombreuses études, ouvrant ainsi de nouvelles voies thérapeutiques par la modulation de ce microbiote, notamment par les probiotiques (Butel, 2014).

Les probiotiques sont définies, selon la FAO-WHO (Food Agricultural Organization- World Health Organisation) comme « micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité adéquate, exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (Thabuy *et al.*, 2011). Les probiotiques sont des bactéries lactiques de la famille des lactobacilles ou des bifidobactéries. Certaines autres sont moins couramment utilisés comme : *Escherichia coli*, *Streptococcus*, voir des micro-organismes non bactériens, en particulier la levure *Saccharomyces boulardii* (Tableau 1) (Piquet *et al.*, 2007 ; Saad *et al.*, 2013).

**Tableau 1** : Micro-organismes utilisés comme probiotiques (Saad *et al.*, 2013).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Autres
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Les microorganismes probiotiques peuvent avoir des effets bénéfiques soit directs, soit indirects en agissant *via* des modifications de l'immunité et de la flore. Ils agissent en particulier (Thabuy *et al.*, 2011 ; Syngai *et al.*, 2016 ; Schmitz *et al.*, 2016 ; Mathipa *et al.*, 2017) :

- En inhibant les bactéries pathogènes par compétition au niveau de leurs récepteurs.
- En augmentant l'effet barrière à la migration des bactéries et des produits toxiques à travers la muqueuse.
- En diminuant le pH et la croissance des bactéries potentiellement pathogènes par la production des acides organiques comme l'acide acétique et l'acide lactique.
- En stimulant le système immunitaire de l'hôte contre les agents pathogènes
- En diminuant l'expression des gènes de toxines ou inactivant des toxines.
- En inhibant directement plusieurs pathogènes cibles par la production des substances antimicrobiennes telles que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les bactériocines.

En effet, ces modes d'action sont grandement impliqués dans la défense contre les infections, la prévention du cancer, des allergies alimentaires, ainsi que la diminution des diarrhées associées à la prise d'antibiotiques, des diarrhées infectieuses aiguës, des ulcères induits par *Helicobacter pylori*, en plus de l'atténuation des maladies, inflammatoires et irritables des intestins et l'amélioration du métabolisme du lactose (Kumar, 2013).

## II. Risques d'exposition aux métaux lourds et microbiote

### II.1. Généralités sur les métaux lourds

On appelle métaux lourds tout élément métallique naturel dont la masse volumique dépasse  $5\text{g/cm}^3$  (Bothe *et al.*, 2017 ; Zare *et al.*, 2018). Cependant ce terme est assez abusif et souvent controversé car il regroupe l'ensemble des métaux et des métalloïdes présentant un caractère toxique pour la santé et l'environnement (Pourret *et al.*, 2018). Certains métaux toxiques ne sont pas principalement lourds comme le zinc (Zn), tandis que d'autres éléments toxiques ne sont pas tous des métaux, exemple : l'arsenic (As). A cet effet, le terme « métaux lourds » est de plus en plus remplacé par l'appellation « éléments traces métalliques » ou « ETM » (Miquel, 2001 ; Ali *et al.*, 2013 ; Pourret *et al.*, 2018).

Les métaux lourds sont présents naturellement dans l'environnement en quantité très faible mais à plus fortes doses ils peuvent s'avérer nocifs et très dangereux. Ceux qui sont le plus souvent considérés comme toxiques pour l'Homme et qu'on qualifiera de métaux lourds non essentiels sont le plomb (Pb), le mercure (Hg), l'arsenic (As), le chrome (Cr) et le cadmium (Cd). Les métaux lourds essentiels comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le nickel (Ni), le fer (Fe) et le manganèse (Mn), pourtant nécessaires à l'organisme en petites quantités et deviennent toxiques en dépassant un certain seuil (Tchounwou *et al.*, 2012 ; Kinoshita *et al.*, 2013 ; Zoghi *et al.*, 2014 ; Bothe *et al.*, 2017).

### II.2. De l'agriculture à l'industrie, les sources anthropiques varient

Les métaux lourds sont des éléments constitutifs naturels de la croûte terrestre, leur inconvénient majeur est qu'ils ne sont pas biodégradables et persistent dans l'environnement et dans les organismes (Anticó *et al.*, 2017). Ils peuvent être émis vers l'atmosphère par érosion éolienne, les activités volcaniques, l'altération des continents, des embruns marins et des feux de forêts (Tchounwou *et al.*, 2012).

A côté de ces processus naturels, les éléments traces métalliques ont été massivement utilisés par l'Homme dans l'agriculture et dans l'industrie. Bien que le développement et l'industrialisation aient apporté beaucoup à l'humanité les séquelles sont malheureusement présentes et leur apparition augmente au fil des années (Ranathunga *et al.*, 2017 ; Kobielska *et al.*, 2018 ; Ramachandra *et al.*, 2018). L'Homme est malheureusement prisonnier de ses propres exploits car les retombées atmosphériques d'aérosols de ses activités, souvent intentionnelles ou pas, telles que les exploitations minières, l'industrie métallurgique, le rejet des eaux usées ménagères et des raffineries, l'utilisation des engrais phosphatés et des insecticides, le non-recyclage des déchets industriels ou urbains toxiques, se retrouvent dans les différents compartiments environnementaux (sol, eau et air) mais



aussi dans la chaîne alimentaire et établissent des liens directs avec l'exposition humaine, sa contamination et son intoxication (**Kobielska et al., 2018 ; Ramachandra et al., 2018**).

Dans tableau 2, on citera certains métaux lourds, qui sont introduits dans l'environnement sous forme de gaz ou de particules en milieu aqueux ou solide, trouvés dans les différents secteurs agricoles et industriels.

**Tableau 2** : Provenance des métaux lourds à partir des différentes sources anthropogènes (**Kobielska et al., 2018 ; Lee et al., 2018**).

Métal lourd	Sources anthropogènes
<b>Plomb (Pb)</b>	Alliage, céramique, plastiques, verrerie, tuyaux et tubes, pigments.
<b>Cadmium (Cd)</b>	Batteries au nickel-cadmium, revêtements métalliques anticorrosifs, alliages, combustion du charbon, pigments.
<b>Cuivre (Cu)</b>	Conduites d'eau, produits chimiques et équipements pharmaceutiques, ustensiles de cuisine, toiture, alliages, pigments.
<b>Chrome (Cr)</b>	Fabrication de ferro-alliages, tannage des textiles et du cuir, traitement du bois, passivation de la corrosion des circuits de refroidissement, pigments.
<b>Arsenic (As)</b>	Additifs pour animaux, herbicides, insecticides, fongicides, pesticides, tannage et textile, pigments, céramique, métallurgie, production d'électricité (charbon et géothermie), filtres de lumière, feux d'artifice.
<b>Nikel (Ni)</b>	Composants informatiques, moules en céramique et en verre, galvanoplastie, piles au nickel-cadmium, prothèses dentaires et chirurgicales, pigments.
<b>Zinc (Zn)</b>	Alliages de zinc, stabilisants de PVC, les produits chimiques et médicaux, enduit anticorrosion, industrie de caoutchouc, peintures.
<b>Mercure (Hg)</b>	Amalgamation (procédé d'extraction du métal), appareils électriques et de mesure, obturations dentaires, lampes à vapeur de mercure, soudures, tubes à rayons X, produits pharmaceutiques, fongicides, instruments scientifiques.

### II.3. Répartition des métaux lourds dans l'environnement

Le sol est un milieu complexe et très varié, il occupe une place centrale dans l'équilibre des écosystèmes. Tous les sols contiennent naturellement des métaux lourds. On parle de pollution des sols par un élément trace métallique (ETM) lorsque ce dernier est présent à une dose constituant une menace pour l'activité biologique ou les fonctions du sol. En effet, la population microbienne, la faune et la flore du sol qui sont exposées à ce risque peuvent perturber tout un biotope et atteindre l'Homme si celui-ci n'est pas directement lié. C'est pour cela que la pollution des sols est devenue un enjeu mondial majeur car ses impacts sont très nocifs pour la santé humaine à court et à long terme. Les contaminations sont principalement dues aux phénomènes naturels et activités anthropiques citées précédemment (**Jung, 2008 ; Jiao *et al.*, 2015**).

Outre la contamination des sols, la présence des ETM dans ces derniers entraîne leur migration vers les nappes phréatiques, qui sont la principale source d'eau potable et sont d'une grande importance pour l'humanité. Ainsi la concentration des métaux lourds est déterminée par différents paramètres qui influencent leur dissémination, on citera : la forme chimique initiale du métal, le degré de solubilité du métal qui est aussi liée à la nature, la perméabilité, la porosité et l'acidité du sol, les conditions d'oxydoréduction, l'aération des sols, la température, l'apport de matières fertilisantes et le types de végétaux et d'animaux (**Kobielska *et al.*, 2018**).

Quant à la pollution de l'air c'est un sérieux problème environnemental sur tout le globe. Il est bien connu que la pollution de l'air affecte la santé humaine. Les particules atmosphériques contaminées par des métaux lourds ont un impact sévère sur le système respiratoire et cardiovasculaire. Ces métaux lourds sont transférés dans les constituants de la biosphère sous forme de particules en suspension dans l'air et sont absorbées par les racines des plantes ou déposées sur les organes végétaux externes et peuvent ainsi pénétrer dans le sol et le contaminer et de ce fait engendrer la contamination du cycle de l'eau et de la chaîne alimentaire (**Kayee *et al.*, 2015 ; Nadgorska-Socha *et al.*, 2017**).

### II.4. Toxicité et conséquences

Les métaux lourds représentent un risque potentiel pour l'environnement et l'Homme en raison de leur caractère ubiquitaire et de leur toxicité même à faible dose. Ils peuvent pénétrer dans le corps humain par inhalation, ingestion ou par une exposition cutanée qui engendrent par la suite des conséquences diverses et toutes plus dangereuses les unes que les autres. Le rôle de certains métaux est bien connu pour le maintien du métabolisme des organismes vivants, ils exercent plusieurs fonctions biologiques et physiologiques, notamment dans les réactions d'oxydoréduction grâce aux enzymes qu'ils constituent mais aussi on retrouve le fer dans l'hémoglobine, le zinc dans la

---

conformation des acides nucléiques, le sélénium dans les désiodases thyroïdiennes et le cuivre comme cofacteur essentiel à plusieurs enzymes (**Vigneri et al., 2017**). Cependant ils engendrent plusieurs effets de toxicité qui peuvent être divisés en effets aigus qui apparaissent immédiatement ou peu de temps après l'exposition et en effets chroniques qui se manifestent plusieurs années après et il est souvent difficile de tracer leurs origines étiologiques (**Anticó et al., 2017**).

Les métaux lourds agissent l'un sur l'autre avec des composants cellulaires tels que l'ADN et les protéines nucléaires, entraînant les dommages d'ADN et les changements de conformation qui peuvent mener à la modulation, à la carcinogenèse ou à la mort cellulaire (**Tchounwou et al., 2012**). Les complications et les maladies sont nombreuses et diverses, quelques exemples sont résumés dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Différents effets de certains métaux lourds sur la santé humaine<sup>3</sup> (**Wang et al., 2003 ; Zare et al., 2018 ; Lal et al., 2018 ; Lee et al., 2018**).

Métal lourd	Complications et maladies
<b>Plomb (Pb)</b>	Saturnisme, propriétés mutagènes sur l'appareil reproducteur, malformations diverses chez l'enfant, dysfonctionnement du foie, néphropathie chronique, lésion des neurones, hyperactivité, insomnie...
<b>Cadmium (Cd)</b>	Propriétés mutagènes sur le placenta, malformations diverses chez l'enfant, hypertension, dommages rénaux, ostéoporose...
<b>Cuivre (Cu)</b>	Lésions cutanées très graves, diarrhée, crampes d'estomac et nausées, dommages au cerveau et aux reins, cirrhose du foie et anémie chronique...
<b>Chrome (Cr)</b>	Irritation de la peau, cancer du poumon, bronchopneumonie, bronchite chronique, démangeaisons des voies respiratoires, maladies du foie...
<b>Arsenic (As)</b>	Pieds noirs, lésions cutanées très graves, cancers des poumons et de la peau, dommages au cerveau, conjonctivite...
<b>Nikel (Ni)</b>	Dermatite et sensibilisation allergique, problèmes pulmonaires et rénaux, cancer des poumons, du nez et des sinus...
<b>Zinc (Zn)</b>	Etourdissements, fatigue, dépression, irritation gastro-intestinale, hématurie, ictère, impuissance, insuffisance rénale et hépatique, léthargie, fièvre des fondeurs, cancer de la prostate, convulsions, vomissements...
<b>Mercure (Hg)</b>	Maladie de Minamata, malformations chez l'enfant, complications rénales, dyspnée et douleurs thoraciques, dysfonctionnement neuropsychologiques, troubles du cycle menstruel...

### III. Mécanismes de tolérance aux métaux lourds

Dans le chapitre précédent nous avons eu un aperçu sur la toxicité des métaux lourds, même à faibles concentrations, et leurs effets néfastes sur la santé de l'Homme et des animaux (**Kinoshita et al., 2013**). Ces derniers sont également toxiques pour les micro-organismes par l'altération de la structure des acides nucléiques ou des protéines ou l'interférence avec la phosphorylation oxydative et l'équilibre osmotique (**Bruins et al., 2000**).

D'après **Halttunen et al. (2007b)**, il existe une interaction complexe entre les contaminants de métaux lourds et les micro-organismes. Récemment, les études sont arrivées à confirmer que l'utilisation de la biomasse microbienne est un moyen efficace et attrayant qui représente une approche prometteuse pour la décontamination et la détoxification (**Kirillova et al., 2017**). Les métaux lourds se lient passivement à la surface bactérienne par des interactions électrostatiques et hydrophobes (**Gasong et al., 2017**). Les bactéries, elles, ont développé des mécanismes de résistance uniques qui leur permettent de survivre et, dans certains cas, d'éliminer, inactiver ou réduire les concentrations de contaminants des métaux lourds dans les aliments, l'eau et dans le tractus gastro-intestinal (GI) et ainsi protéger les composants cellulaires sensibles contre ces derniers (**Monachese et al., 2012 ; Zoghi et al., 2014 ; Gasong et al., 2017**).

Dans les nombreux travaux de recherche consacrés à cet insu, il a été constaté que les bactéries lactiques et les bifidobactéries reconnues comme des microorganismes inoffensifs et ayant un pouvoir probiotique, sont capables de réduire et d'inactiver les éléments toxiques par la liaison de surface grâce au pouvoir potentiel adhésif de la couche S dans leur paroi cellulaire. Les bactéries lactiques possèdent également des propriétés antioxydantes, ce qui constitue une autre caractéristique importante de la protection contre la toxicité des métaux (**Zoghi et al., 2014 ; Zhai et al., 2015 ; Gasong et al., 2017**).

Les bactéries lactiques ont cette aptitude à se lier et s'adhérer à la muqueuse intestinale ou aux cellules épithéliales leur conférant une protection contre les agents pathogènes et la capacité à éliminer les métaux lourds. Les bactéries lactiques à Gram positif, ont une capacité d'adsorption élevée en raison de la teneur élevée en peptidoglycane qui est un composant structurel principal et en acide teichoïque, composant mineur, dans leurs parois cellulaires. Elles ont une charge de surface négative qui facilite la liaison aux métaux lourds cationiques (**Halttunen et al., 2007b**). Cependant, cette liaison dépend de la souche microbienne, puisque l'augmentation de la concentration bactérienne augmente la liaison des métaux lourds, et du pH, car en effet, le pH joue un rôle primordial dans l'élimination et pour cause les métaux cationiques et les protons sont en compétition constante pour les sites de liaison chargés négativement. À pH inférieur à 2-3 l'élimination observée est très faible,

au-dessus de 3 elle est plus importante tandis qu'à des pH compris entre 4 et 6 elle y est maximale. Contrairement à ça, les membranes cellulaires bactériennes à Gram négatif sont plus faibles dans ces composants et adsorbent faiblement les métaux (**Monachese et al., 2012 ; Zoghi et al., 2014**).

Il est à noter aussi que l'administration des bactéries lactiques pour l'élimination des éléments toxiques dépend fortement de la stabilité du complexe probiotique-toxine dans le tractus gastro intestinal (GI) et le temps de résidence. Les bactéries lactiques s'adhèrent considérablement aux cellules intestinales mais le degré d'adhérence semble être très spécifique à la souche, aussi les conditions de faible pH qui se produisent dans l'estomac réduisent la survie des bactéries viables. L'utilisation de bactéries lactiques pourrait être bénéfique pour les humains et les animaux constamment exposés aux éléments toxiques en réduisant l'absorption de ces derniers et en augmentant leur excrétion (**Zoghi et al., 2014**).

Les micro-organismes ont développé des stratégies d'adaptation pour transformer l'élément en une forme moins nuisible ou lier le métal intra ou extracellulaire, empêchant ainsi toute interaction nuisible dans la cellule hôte comme ils sont aussi capables de transporter activement le métal hors du cytosol cellulaire. Le corps humain abrite la plus grande communauté microbienne dans le microbiote gastro-intestinal (GI) et contient plus de gènes que ceux trouvés dans le génome humain, ainsi, la diversité génétique et enzymatique est immense. Les mécanismes de résistance sont souvent codés par des plasmides, mais dans certains cas, les gènes se trouvent sur le chromosome, suggérant une pression évolutive importante pour maintenir le plasmide dans le tractus intestinal. Des exemples ont été donnés qui comprennent la résistance au mercure dans *Bacillus* et l'efflux du cadmium dans *Bacillus* et l'efflux d'arsenic dans *Escherichia coli* (**Monchy, 2007 ; Monachese et al., 2012**).

Les métaux lourds se lient aux parois cellulaires bactériennes selon trois mécanismes connus qui sont :

- Réactions d'échange ionique avec le peptidoglycane et l'acide téichoïque.
- Précipitation par des réactions de nucléation.
- Complexation avec des ligands azotés et oxygénés.

L'une des raisons pour laquelle on fait appel à la désintoxication, qui se produit habituellement dans le tractus intestinal humain, le foie et les reins, est d'agir à temps, avant que les composés puissent se propager et atteindre les sites cibles où les dommages surviennent. Et c'est par ce processus que le microbiote intestinal, les lactobacilles et les bactéries potentiellement probiotiques peuvent avoir le plus grand rôle dans la liaison et la séquestration des métaux à la surface de leur cellules, empêchant leur entrée dans le corps ou en les éliminant par défécation ultérieure et protégeant ainsi l'hôte (**Monachese et al., 2012**).

Les mécanismes de résistance connus sont d'après **Choudhury et al., (2001) ; Rathnayake et al., (2009) ; Etesami, (2018) :**

- Exclusion du métal par une barrière de perméabilité.
- Transport actif d'ions métalliques à partir de cellules (efflux).
- Séquestration extracellulaire ou intracellulaire.
- Transformation et désintoxication.

### **III.1. Exclusion du métal toxique par une barrière de perméabilité**

De nombreuses bactéries peuvent empêcher l'entrée des métaux à l'intérieur de la cellule par une adsorption passive non spécifique sur la membrane externe, enveloppe, couche S, substances polymères extracellulaires (EPS) et lipopolysaccharide (LPS). Il s'agit d'une immobilisation des éléments toxiques et une désintoxication locale qui est réalisée par la présence de nombreux groupements fonctionnels anioniques (carboxyle, groupes hydroxyles, amine, phosphate) sur la surface de la bactérie qui permet d'interagir avec les cations métalliques (**Vecchio et al., 1998 ; Etesami, 2018**).

**Kumar et al., (2018)** ont affirmé la formation d'un complexe stable, par certaines espèces de bactéries lactiques, entre les métaux lourds (tels que le Pb, Cd, As, Cr et Hg) et la paroi cellulaire. Les constituants de cette dernière jouent un rôle important dans l'adsorption des métaux lourds où les bactéries Gram positives et qui grâce à la présence d'une couche épaisse de peptidoglycane et la haute teneur en acide teichoïque dans leur paroi cellulaire, possèdent un pouvoir adsorbant élevé par rapport aux bactéries à Gram négatif. Ce qui amène à dire que la paroi des bactéries Gram-positives est un chélateur efficace de métaux (**Gadd, 1990 ; Vecchio et al., 1998 ; Kumar et al., 2018**).

En outre, les bactéries qui forment naturellement les polysaccharides extracellulaires sont capables d'adsorber les ions métalliques. Ce composant peut être produit par *Lactobacillus rhamnosus* GG et certaines souches de *Bifidobacterium longum* et il permet de fournir différents groupes chargés négativement, notamment le carboxyle, l'hydroxyle et le phosphate capables de relier les métaux cationiques tels que le cadmium et le plomb (**Bruins et al., 2000**).

### **III.2. Transport actif d'ions métalliques à partir de cellules (efflux)**

Pour faire face aux métaux lourds, certaines bactéries peuvent expulser activement ces derniers du cytosol vers l'extérieur par le système du transport actif (**Bruins et al., 2000 ; Monachese et al., 2012**). Il a été déjà démontré que les lactobacilles et d'autres espèces associées à l'intestin peuvent résister à certains métaux lourds tels que l'arsenic et le mercure par l'efflux actif hors de la cellule

grâce à la présence des opérons *mer* et *ars*, respectivement qui codent pour les transporteurs d'efflux (**Monachese et al., 2012**).

Cependant, et bien que ce mécanisme réduit les dommages à l'organisme en abaissant la concentration cellulaire, il n'est pas idéal pour l'hôte parce qu'il peut présenter un danger pour l'hôte par l'expulsion active du métal toxique dans la lumière intestinale. Les espèces idéales pour la désintoxication sont probablement celles qui ne possèdent pas les gènes codant pour les transporteurs de métaux et ne lient et ne séquestrent ainsi que les métaux lourds (**Monachese et al., 2012 ; Kumar et al., 2018**).

### **III.3. Désintoxication enzymatique**

Il existe un autre mécanisme de défense dans les bactéries contre la toxicité des métaux lourds qui permet la transformation des ions métalliques toxiques en composés moins toxiques. Il s'agit d'une *désintoxication enzymatique* des ions métalliques par l'oxydation ou la réduction, la méthylation ou la déméthylation (**Voica et al., 2016 ; Etesami, 2018**).

### **III.4. Séquestration extracellulaire ou intracellulaire**

Certaines bactéries peuvent résister aux métaux lourds par un mécanisme appelé séquestration extracellulaire, au cours duquel les bactéries produisent des métabolites, c'est ce qui provoque la précipitation des métaux. Elles sont caractérisées par leur capacité à lier efficacement les métaux lourds et ensuite détoxifier les métaux simplement par la formation de complexes (**Etesami, 2018**).

Au contraire, les métaux lourds peuvent s'accumuler dans le cytoplasme des cellules bactériennes pour prévenir l'exposition des composants cellulaires essentiels sensibles aux métaux (**Etesami, 2018**). Ce processus dépend de l'énergie métabolique des microorganismes (**Issazadeh et al., 2013**). Certains types ou formes de cellules peuvent être plus efficaces pour accumuler le métal que d'autres. Une fois le métal à l'intérieur de la cellule, il peut être situé dans un organite spécifique et / ou lié à une protéine telle que la métallothionéine (**Gadd, 1990**). Certaines espèces de bactéries lactiques, ainsi que d'autres micro-organismes, peuvent lier des ions métalliques à l'intérieur de la cellule (**Mrvčić et al., 2013**).

### **III.5. Exemples de l'élimination de quelques métaux lourds**

#### **III.5.1. L'arsenic (As)**

L'arsenic est une espèce anionique ayant une charge négative, qui peut s'avérer problématique pour les interactions bactériennes de liaison aux métaux, car la grande quantité de métal adsorbée par les microbes est due aux attractions entre la cellule bactérienne ayant une charge négative nette et le

métal chargé positivement. Pour se faire, des travaux ont été établis afin de neutraliser les charges négatives de surface pour augmenter l'attraction entre les groupes amino, étant les sites de liaison les plus probables de l'As, chargés positivement sur la paroi cellulaire et les métaux chargés négativement par la méthylation d'une sélection de lactobacilles, qui n'a par conséquent, pas eu d'effet significatif sur la réduction de toutes les charges négatives sur toutes les souches observées (**Halttunen et al., 2007b ; Monachese et al., 2012**).

Les souches de *Lactobacillus acidophilus* et de *Lactobacillus crispatus* DSM20584 sont connues pour produire des protéines de la couche S qui fournit des groupes chargés positivement, ce qui peut expliquer leur affinité à l'arsenic (**Monachese et al., 2012**).

### III.5.2. Le plomb (Pb) et le Cadmium (Cd)

Contrairement à l'arsenic, le plomb et le cadmium sont cationiques. Ils ont été étudiés ensemble car ces deux éléments réagissent de la même façon. L'élimination du cadmium et du plomb a été observée rapidement sur la surface bactérienne, probablement par un mécanisme d'échange d'ions (**Halttunen et al., 2007a**). Un phénomène de liaison rapide a été observé chez les espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* par la fixation de grandes quantités de plomb et de cadmium pendant une durée de 5min à 1h, et en plus de la non dissociation du métal celui-ci reste fortement séquestré même après 48h. D'autres travaux ont aussi montré la capacité remarquable de *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 et *Propionibacterium freudenreichii* à lier et adsorber de grandes quantités de plomb et de cadmium en seulement une heure de temps (**Halttunen et al., 2007a ; Monachese et al., 2012**).

Plusieurs souches de lactobacilles qui ont la capacité à lier le plomb et le cadmium sont connues à savoir : *L. rhamnosus* GG, LC705, *L. johnsonii* Lj1, *L. casei* Shirota, et *L. fermentum* ME3, en plus des souches de *L. amylovorus*, *L. reuteri* et *L. dextrinicus* reconnues comme souches probiotiques éliminant le plomb et le cadmium (**Monachese et al., 2012 ; Zhai et al., 2015**).

**Zhai et al., (2015)** ont étudié certaines propriétés que les bactéries lactiques doivent avoir pour qu'elles soient efficaces dans la désintoxication du cadmium :

- Pour éviter l'absorption intestinale du cadmium par l'hôte, les bactéries lactiques doivent avoir une bonne capacité de liaison au cadmium et une augmentation de son excrétion avec les souches par le biais des fèces.
- Les bactéries devraient avoir une grande tolérance au cadmium au niveau du tractus gastro-intestinal pour rester actives.
- Les souches devraient fournir des effets protecteurs contre le stress oxydatif induit par le Cd dans le corps humain.



- Les probiotiques doivent être testés pour leur tolérance de transit aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal humain pour éviter la perte de leur viabilité dans ce dernier.

### **III.5.3. Le mercure (Hg)**

Certaines bactéries peuvent effectuer la désintoxication du mercure organique par transformation du mercure méthylé en Hg<sup>2</sup> inorganique, qui est moins absorbé dans le tractus gastro-intestinal, puis en Hg<sup>0</sup>, qui est mal absorbé. Le mercure inorganique est rapidement importé par des transporteurs spécifiques du mercure et accumulé, ce qui réduit probablement la réabsorption par l'épithélium intestinal, alors que le mercure organique est internalisé par des moyens passifs. Certaines souches de lactobacilles ont le pouvoir de séquestrer le mercure et peuvent également avoir des mécanismes pour sa réduction. Les études faites ont démontré l'implication de la charge négative nette des lactobacilles et d'autres espèces de l'intestin à participer dans la liaison et la séquestration du mercure au niveau du tractus gastro-intestinal humain (**Monachese *et al.*, 2012**).

### **III.5.4. Le chrome (Cr)**

Les travaux de recherche sur le chrome, ont démontré que les lactobacilles et d'autres bactéries associées au tractus gastro-intestinal (GI), constituent la première ligne de défense au corps en convertissant le Cr (VI) toxique en sa forme moins toxique c'est-à-dire le Cr (III). Aussi, il a été démontré que l'exposition prolongée des lactobacilles au chrome peut les aider à mieux tolérer les métaux (**Monachese *et al.*, 2012 ; Vendruscolo *et al.*, 2017**).

*Matériel*

*et*

*Méthodes*

Notre travail, mené du mois d'Avril à Juin 2018, a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Mohamed Seddik Benyahia de Jijel.

Le but de cette étude était d'isoler des souches de bactéries lactiques tolérantes aux métaux lourds à caractères probiotiques, en visant exactement à :

- Isoler, purifier et identifier les bactéries lactiques.
- Screening des bactéries lactiques tolérantes aux trois métaux lourds (Pb, Cd, Cr).
- Sélectionner les bactéries lactiques les plus résistantes aux métaux lourds.
- Déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).
- Evaluer quelques aptitudes probiotiques des bactéries lactiques *in vitro*.

Le matériel utilisé se trouve dans les annexes 1, 2, 3 et 4.

## **I. Méthodes**

### **I.1. Préparation de l'échantillon, isolement et purification**

#### **I.1.1. Préparation des dilutions**

Pour isoler les bactéries lactiques, on prépare une série de dilutions décimales allant de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-6}$  pour chaque échantillon soit 2 séries de dilution à partir des selles des nourrissons pour réduire le nombre d'UFC. La solution mère (SM) est effectuée comme suite : on pèse 1 g d'échantillon qu'on dissout dans 10 ml d'eau physiologique stérile. Après homogénéisation on transfère 1 ml de cette dernière dans 9 ml d'eau physiologique c'est la dilution  $10^{-1}$ . De la même manière on procède aux autres dilutions jusqu'à  $10^{-6}$ , cependant seules les dilutions  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  seront retenues etensemencées dans les boîtes contenant la gélose MRS préalablement préparée (**Annexe 5**).

#### **I.1.2. Isolement des bactéries lactiques**

À partir des dilutions de  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ , on étale des volumes de 100  $\mu$ l, 50  $\mu$ l sur gélose MRS, à raison de quatre boîtes pour chaque dilution, ensuite on incube les boîtes pendant 48 à 72 h à 37°C dans des conditions aérobies et anaérobies dans une jarre d'anaérobiose en présence d'une flamme issue d'une bougie (**Guétouache et Guessas, 2015 ; Serrano-Nino et al., 2016**).

#### **I.1.3. Purification des souches isolées**

Après culture, on choisit au hasard des colonies distinctes et bien isolées qu'on purifie par repiquages successifs sur la gélose MRS selon la méthode des stries, puis on les incube à 37°C pendant 48 h, jusqu'à l'obtention de colonies semblables. On ensemence ces dernières dans des tubes

de bouillon MRS puis on les incube dans les mêmes conditions pour les utiliser dans la confirmation de la pureté des isolats par une coloration de Gram et un test de la catalase (Owusu-Kwarteng *et al.*, 2012 ; Arimah *et al.*, 2014 ; Wassie *et al.*, 2016 ; Dallal *et al.*, 2017).

#### I.1.4. Identification des bactéries lactiques

L'identification des bactéries lactiques est établie sur la base des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, tels que la catalase, l'oxydase, la croissance à différentes températures, la croissance à différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl), la production du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) par fermentation du glucose (Abdi *et al.*, 2013 ; Wassie *et al.*, 2016).

##### I.1.4.1. Etudes des caractères morphologiques

###### a. Examen macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle des colonies obtenues sur la gélose MRS après incubation à 37°C pendant 48 à 72 h afin de déterminer leurs caractères cultureux (couleur, disposition, aspect et forme) (Bekhouche et Boulahrouf, 2005 ; Toyosi *et al.*, 2017).

###### b. Examen microscopique

Pour différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement, une étude microscopique sur les 10 isolats par l'intermédiaire de la coloration de Gram sera réalisée selon le protocole décrit par Prescott *et al.*, 2003 (Annexe 6).

##### I.1.4.2. Etudes des caractères physiologiques et biochimiques

###### a. Test de la catalase

La catalase est l'une des enzymes antioxydantes les plus importantes, elle se trouve dans presque tous les organismes aérobies. Cette enzyme est responsable de la décomposition du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante (Krych-Madej et Gebicka, 2017) :  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Ce test est réalisé en émulsionnant la culture pure dans le peroxyde d'hydrogène à 3% sur une lame microscopique propre. La présence de la catalase se manifeste par la formation de bulles de gaz grâce à la décomposition de l'eau oxygénée (Bekhouche et Boulahrouf, 2005 ; Dallal *et al.*, 2017).

###### b. Croissance à différentes températures (15°C, 25°C, 30 °C et 44°C)

Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles de celles thermophiles. Il est réalisé par l'ensemencement de 200 µl de cultures jeunes pures à tester dans 3 ml de bouillon MRS. Après incubation à 15°C, 25°C, 30°C et 44°C pendant 24 à 48 h, la croissance des cellules est appréciée par la présence d'un trouble (Azadnia et Khan Nazer, 2009 ; Rhaïem *et al.*, 2016).

### c. Croissance à différentes concentrations de NaCl

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) permet de distinguer les espèces sensibles aux variations de la pression osmotiques et fournit des renseignements précieux pour l'identification, il conduit à distinguer les entérocoques des lactocoques.

Les bouillons MRS hypersalés à 4 % et 6,5 % de NaCl sont préparés puisensemencés par 100 µl de la culture jeune à tester et sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 h. La croissance des cellules est appréciée par la présence d'un trouble du milieu par rapport à un témoin (**Ismaili *et al.*, 2016 ; Toyosi *et al.*, 2017**).

### d. Recherche du type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO<sub>2</sub>). Pour se faire les isolats serontensemencés dans 10 ml de bouillon MRS contenant une cloche de Durham, le CO<sub>2</sub> dégagé par les bactéries hétérofermentaires, s'accumule dans la cloche de Durham après incubation pendant 24 à 48 h à 37°C, tandis que pour celles à caractère homofermentaire aucune accumulation de gaz ne sera observée (**Saidi *et al.*, 2002 ; Hariri *et al.*, 2009**).

### e. Hydrolyse de l'arginine (ADH)

La mise en évidence de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Le rôle de cette enzyme est de libérer l'ammoniaque et la citrulline à partir de l'arginine. La réalisation de ce test se fait en incubant à 37°C pendant 24 à 48 h les souches à tester avec le bouillon Môeller à arginine de couleur violette. Une couleur jaune vif indique une acidification du milieu dû à l'utilisation du glucose, la bactérie est ADH négative dans ce cas. Au contraire, si la couleur du milieu vire au jaune puis vers le violet, c'est une alcalinisation et cela veut dire que la dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac a eu lieu (**Môeller, 1955**).

## I.2. Screening des bactéries lactiques tolérantes aux métaux lourds

### I.2.1. Préparation des solutions mères de métaux lourds

Pour tester la tolérance de nos souches de bactéries lactiques vis-à-vis des trois métaux lourds à savoir le plomb (Pb), le chrome (Cr) et le cadmium (Cd), on prépare des solutions mères de ces derniers à une concentration de 1000 mg/l à partir des Nitrate de plomb (Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), Dichromate de potassium (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) et Dichlorure de cadmium (CdCl<sub>2</sub>), respectivement, en se basant sur les calculs suivant :

**SM1 : Plomb 1000 mg/l**

Masse molaire du  $(\text{Pb}(\text{NO}_3)_2) = 331,2 \text{ g/mol}$

Masse molaire du  $(\text{Pb}) = 207,2 \text{ g/mol}$

$$m = \frac{1000 \times 331,2}{(207,2) \times 2} = 1,6 \text{ g}$$

Pour préparer la solution mère à 1000 mg/l, on dissout 1,6 g de nitrate de plomb dans 1 litre d'eau distillée (**Kinoshita et al., 2013**).

**SM2 : Chrome 1000 mg/l**

Masse molaire du  $(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 294,16 \text{ g/mol}$

Masse molaire du  $(\text{Cr}) = 51,99 \text{ g/mol}$

$$m = \frac{1000 \times 294,16}{(51,99) \times 2} = 2,83 \text{ g}$$

Pour préparer la solution mère à 1000 mg/l, on dissout 2,83 g de dichromate de potassium dans 1 litre d'eau distillée (**Guo et al., 2010**).

**SM3 : Cadmium 1000 mg/l**

Masse molaire du  $(\text{CdCl}_2) = 183,317 \text{ g/mol}$

Masse molaire du  $(\text{Cd}) = 112,411 \text{ g/mol}$

$$m = \frac{1000 \times 183,317}{112,411} = 1,63 \text{ g}$$

Pour préparer la solution mère a 1000 mg/l, on dissout 1,63 g de chlorures de cadmium dans 1 litre d'eau distillée (**Pan et al., 2009 ; Guo et al., 2010**).

**I.2.2. Etude de la tolérance des souches lactiques aux métaux lourds**

Dix souches bactériennes sont cultivées préalablement dans du bouillons MRS et incubées à 37°C. Après 18 h d'incubation, un inoculum de 2% (v/v) de chacune de ces dernières est inoculé dans des tubes contenant 9,5 ml de bouillon MRS avec 30 mg/l de Pb (II), Cr (VI) et Cd séparément. En même temps, on prépare pour chaque souche des témoins contenant le bouillon MRS et la culture ensuite tous les tubes sont incubés à 37°C. Par le biais d'un spectrophotomètre UV- visible, on mesure la densité optique (DO) à 600 nm à différents intervalles de temps ( $T_0$ ,  $T_{24}$ ,  $T_{48}$ ) (**Kinoshita et al., 2013**).

**I.2.3. Sélection des souches les plus résistantes aux métaux lourds**

Pour déterminer la souche la plus résistante à chaque métal, on calcule les taux de croissance bactérienne  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) à différents moments pour chaque type de milieu selon la formule suivante (**Wei et al., 2009**).

$$\mu = \frac{1}{DO_0} \times \frac{(DO_t - DO_0)}{(T_t - T_0)}$$

DO<sub>t</sub> : densité optique à un temps t

DO<sub>0</sub> : densité optique à un temps 0

T<sub>t</sub> : temps après incubation

T<sub>0</sub> : temps initial

#### **I.2.4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des souches bactériennes sélectionnées soient les souches E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> pour le Cr, le Cd et le Pb, respectivement, est réalisée selon la méthode de dilution sur tube qui consiste à faire une série de dilutions croissantes de la solution mère du métal, selon le protocole suivant : une culture fraîche de chaque souche est cultivée dans du bouillon MRS pendant 18 h à 37°C. Après incubation, 100 µl de l'inoculum de chaque souche est transféré dans chaque tube contenant des concentrations croissantes en Cr, Pb et en Cd (50, 100, 150, ..... 400 mg/l) obtenues par dilution des solutions mères (SM1, SM2 et SM3) ayant une concentration de 1000 mg/l, avec un volume final de 5 ml du bouillon MRS pour chaque tube. D'autre part, une deuxième série de tubes représentant un blanc pour chaque concentration est aussi préparée. Les densités optiques sont mesurées à 600 nm au temps T<sub>0</sub> et T<sub>24</sub> après une incubation à 37°C. La concentration minimale en métal qui inhibe complètement la croissance bactérienne a été prise comme CMI (Bhattacharya et Gupta, 2013 ; Marzan *et al.*, 2017; Sinegani *et al.*, 2017).

#### **I.3. Evaluation biologique de quelques aptitudes probiotiques des bactéries lactiques *in vitro***

Pour effectuer les tests suivants, on a continué avec les trois souches précédentes à savoir : la souche E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> qui sont les plus tolérantes aux métaux lourds pour évaluer leurs potentiels probiotiques *in vitro*, soit la tolérance aux acides et la résistance aux sels biliaires.

##### **I.3.1. Tolérance aux acides**

Le test est réalisé selon la méthode qu'on a modifié décrite par (De Valdez *et Taranto*, 2001 ; Shehata *et al.*, 2016 ; Lee *et al.*, 2016 ; Maldonado *et al.*, 2018).

Pour faire ce test on prépare et ajuste avec l'HCl deux bouillons MRS à pH 2 et pH 6,4 pour chaque souche, puis on les stérilise. On récolte les cultures fraîches de 18 h par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 min, puis on lave les culots obtenus deux fois avec le tampon phosphate (PBS) pH 7,2 (Annexe 10). Une fois lavées, on suspend ces cellules au même volume initial dans le même tampon. Après agitation vigoureuse au vortex, on inocule cette suspension (2%) dans du bouillon MRS à pH 6,4 et pH 2. On prélève les cultures bactériennes d'abord à T<sub>0h</sub> puis on les incube à 37°C

et on les prélève encore aux temps  $T_{2h}$  et  $T_{4h}$  pour un dénombrement des cellules sous microscope optique à l'aide d'une cellule de Malassez. Ainsi on estime le taux de survie selon l'équation de **Lee et al., (2016)** :

$$\text{Taux de survie \% (SR)} = \frac{\text{Nombres des cellules viables soumises au stress dans MRS}}{\text{nombre des cellules viables dans le MRS controle}} \times 100$$

➤ **Principe de comptage :**

La cellule de Malassez, au volume total de  $1 \text{ mm}^3$ , est composée de 100 rectangles formés par un quadrillage de 10 bandes verticales et 10 bandes horizontales. Pour le comptage des cellules nous allons l'effectuer sur 10 des 25 rectangles non contigus pris complètement au hasard dans la cellule, puis on totalise le nombre de cellules selon l'équation suivante :

$$\frac{\text{Total des cellules comptées dans les 10 carrés}}{10} \times 100 = \text{nombre de cellule /ml}$$

### **I.3.2. Tolérance aux sels biliaires**

Ce test modifié évalue la capacité des souches isolées à croître en présence de sels biliaires. Préalablement, on prépare du bouillon MRS additionné de 0,3% de sels biliaires puis on le stérilise par autoclavage.

On récolte par centrifugation (5000 rpm, 10 min), les cultures jeunes de 18 h, on lave le culot obtenu deux fois avec du tampon PBS à pH 7,2 (**Annexe 10**) et on le suspend au volume original avec le PBS par agitation. On inocule cette suspension (0,5%) dans du bouillon MRS avec et sans sels biliaires. On mesure l'absorbance à 560 nm à  $T_0$  minutes et à  $T_{240}$  minutes d'incubation à  $37^\circ\text{C}$  (**De Valdez et Taranto, 2001 ; Serrano-Nino et al., 2016 ; Maldonado et al., 2018**). Pour ce qui est de déterminer la tolérance à la bile des cellules, on compare les taux de croissance des cultures dans les deux bouillons MRS (avec et sans sels biliaires) selon l'équation citée précédemment dans la partie **II.2.3** de cette section.



*Résultats*  
*et*  
*Discussion*

## I. Isolement, purification et identification des bactéries lactiques

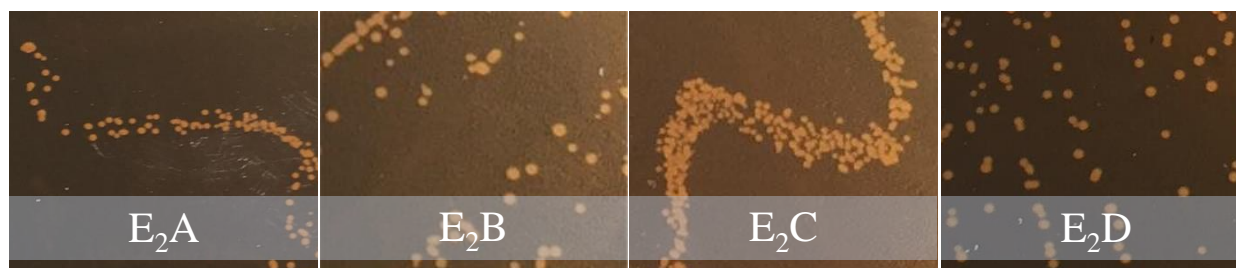
Dix souches sont sélectionnées à partir des bactéries lactiques isolées sur la gélose MRS provenant des deux échantillons des selles des nourrissons pour être identifiées et utilisées pour réaliser notre recherche. On a choisi deux souches à partir du premier échantillon et huit souches à partir du deuxième.

On a attribué à chaque souche un code **E** (échantillon) avec un numéro de l'échantillon (**1,2**) et suivi par une lettre (**A, B, C, D, E, G, K**) de la souche isolée, comme ce qui suit : E<sub>1</sub>C, E<sub>1</sub>E, E<sub>2</sub>A, E<sub>2</sub>B, E<sub>2</sub>C, E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>G, E<sub>2</sub>K.

### I.1. Etudes des caractères morphologiques des souches lactiques

#### I.1.1. Examen macroscopique

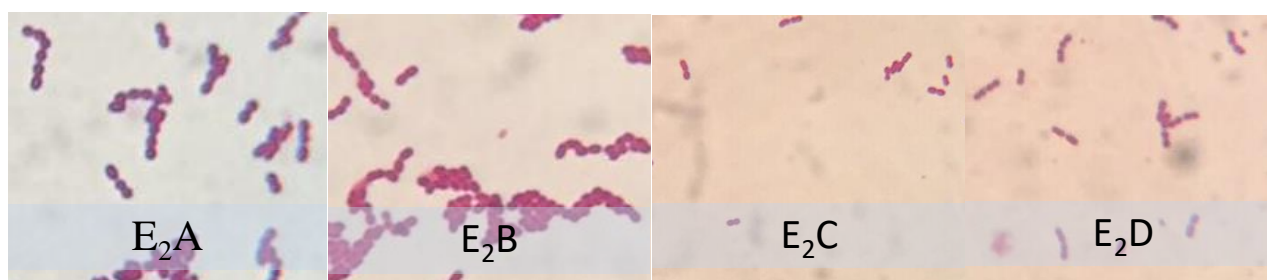
- On a observé sur la gélose MRS après 48 h d'incubation, l'apparition de petites colonies rondes de 1 à 2 mm de diamètre, blanchâtres pour la plus part, lisses et avec un contour régulier.
- Après deux repiquages successifs par la méthode de stries sur la gélose MRS, on a obtenu des colonies ayant le même aspect, la même taille et la même couleur, ce qui indique que les colonies obtenues sont pures (**Figure 2**).



**Figure 2** : Aspect macroscopique de quelques colonies de bactéries lactiques pures sur milieu MRS incubées à 37°C pendant 48 h.

#### I.1.2. Examen microscopique

- L'examen microscopique des souches purifiées a révélé trois formes de cellules : bacilles, coques et des coccobacilles. Elles sont disposées en paires ou en chaînettes plus ou moins longues. Les coques peuvent appartenir aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* ou *Leuconostoc* et les formes bâtonnets peuvent être des *Lactobacillus*. La coloration de Gram a montré que toutes les cellules sont Gram positif, dû à la couleur violette apparente au microscope (**Figure 3**). Les résultats de l'observation microscopique sont résumés dans le (**Tableau 4**) ci-dessous.



**Figure 3 :** Aspect microscopique de quelques souches de bactéries lactiques après la coloration de Gram (G×100).

**Tableau 4 :** Caractères morphologiques des bactéries lactiques isolées sur gélose MRS.

Souche	Macromorphologie (aspect des colonies)	Micromorphologie (Forme des bactéries)	Gram
E <sub>1</sub> C	Colonies blanches, rondes et lisses	Bacilles isolés	+
E <sub>1</sub> E	Colonies blanches, petites, rondes et lisses	Coccobacilles en paires ou en chaînettes	+
E <sub>2</sub> A	Colonies blanches, petites, rondes et lisses	Coccobacilles en paires ou en chaînettes	+
E <sub>2</sub> B	Colonies blanches, petites, rondes et lisse	Coccobacilles en paire ou en chaînette	+
E <sub>2</sub> C	Colonies blanches, petites, rondes et lisses	Coccobacilles en paires ou en chaînettes	+
E <sub>2</sub> D	Colonies blanches, petites, rondes et lisses	Coccobacilles en paire ou en chaînette	+
E <sub>2</sub> E <sub>1</sub>	Colonies transparentes, très petites, rondes et lisses	Coccis en paires ou en chaînettes	+
E <sub>2</sub> E <sub>2</sub>	Colonies transparentes, très petites, rondes et lisses	Coccis en paires ou en chaînettes	+
E <sub>2</sub> G	Colonies blanches, rondes et lisses	Bacilles	+
E <sub>2</sub> K	Colonies blanches, rondes et lisses	Bacilles	+

+ : Positives à la coloration de Gram

## I.2. Tests physiologiques et biochimiques

En plus des tests morphologiques, on a utilisé les tests physiologiques et biochimiques pour déterminer le genre de nos isolats. Les résultats de ces tests sont représentés dans le **tableau 5**.

### **I.2.1. Recherche de la catalase**

Pour le test de la catalase, toutes les souches sont incapables de décomposer l' $\text{H}_2\text{O}_2$  donc elles sont catalase négative.

### **I.2.2. Croissance à différentes températures**

L'étude de la croissance bactérienne à différentes températures est évaluée selon la présence d'un trouble dans le bouillon MRS, comme suite :

- Pour ce test, on a vu que toutes les souches croissent abondamment à 25°C et à 30°C, hormis la souche E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> qui pousse moyennement.
- A 44°C la plupart des souches poussent très faiblement d'où la quasi-inexistence du trouble, excepté les souches E<sub>2</sub>G et E<sub>2</sub>K chez qui on a remarqué une absence totale de croissance.
- A 15°C, sauf chez la souche E<sub>1</sub>C, où il n'y a pas eu de croissance, les autres souches ont toutes moyennement poussé.

De part ces résultats, on constate que ces souches sont en général mésophiles.

### **I.2.3. Croissance à différentes concentrations de NaCl**

L'étude de la croissance bactérienne à différentes concentration de NaCl est également évaluée selon la présence d'un trouble dans le bouillon MRS.

- Un trouble est observé dans le bouillon MRS à 4% de NaCl pour toutes les souches. Cependant, la croissance est abondante à 4% chez pratiquement toutes les souches sauf chez les souches E<sub>2</sub>A et E<sub>2</sub>K où le trouble est moyen.
- Contrairement au bouillon MRS à 4%, dans celui de 6.5%, presque toutes les souches croissent difficilement (E<sub>1</sub>C, E<sub>1</sub>E, E<sub>2</sub>A, E<sub>2</sub>C, E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> et E<sub>2</sub>G) ce qui apparait sous forme d'un trouble faible et presque absent chez E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>. Mais la souche E<sub>2</sub>B a une aptitude à bien croître à cette concentration de chlorure de sodium, qui s'est manifesté par la formation d'un trouble abondant.

### **I.2.4. Recherche du type fermentaire**

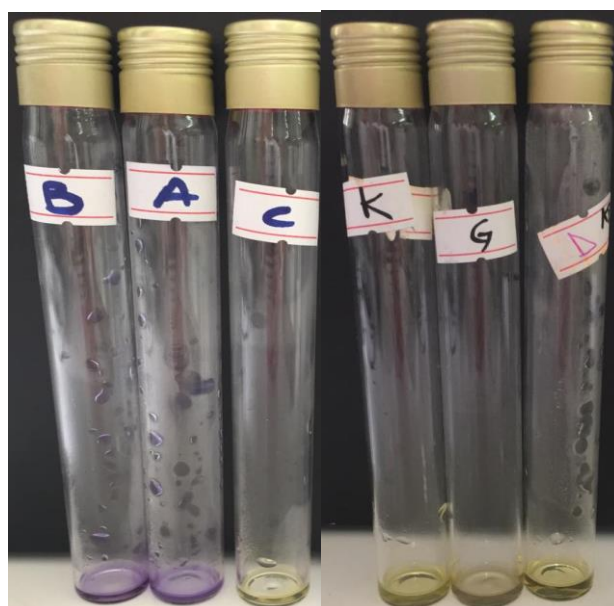
Pour le type de fermentation, on a observé la production de dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) chez les souches : E<sub>1</sub>C, E<sub>1</sub>E, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>G et E<sub>2</sub>K. Ces isolats sont considérés comme hétérofermentaires c'est-à-dire qu'elles fermentent le glucose avec la production de gaz (**Figure 4**). Pour le reste des souches (E<sub>2</sub>A, E<sub>2</sub>B, E<sub>2</sub>C, E<sub>2</sub>D) il n'y a pas eu de production de gaz lors de la fermentation du glucose. Donc, l'absence totale de gaz ( $\text{CO}_2$ ) pour les quatre souches est un indicateur du type homofermentaire.



**Figure 4** : Résultats du type fermentaire montrant la formation de bulles de gaz.

### I.2.5. Hydrolyse de l'arginine (ADH)

On a observé dans cette étape que presque toutes les souches (8 souches) n'ont pas la capacité à hydrolyser l'arginine, car ne possèdent pas l'ADH (l'arginine dihydrolase). Ceci s'explique par le changement de la couleur de base du milieu qui est violette vers le jaune, c'est-à-dire que les bactéries lactiques ont acidifié le milieu en utilisant le glucose comme source de carbone et d'énergie. Pour les 2 autres souches à savoir la souche E<sub>2</sub>A et E<sub>2</sub>B la couleur demeure inchangée, ce qui veut dire qu'elles sont capables d'utiliser l'arginine (**Figure 5**).



**Figure 5** : Résultats du test ADH sur quelques souches.

**Tableau 5** : Caractères physiologiques et biochimiques des souches isolées.

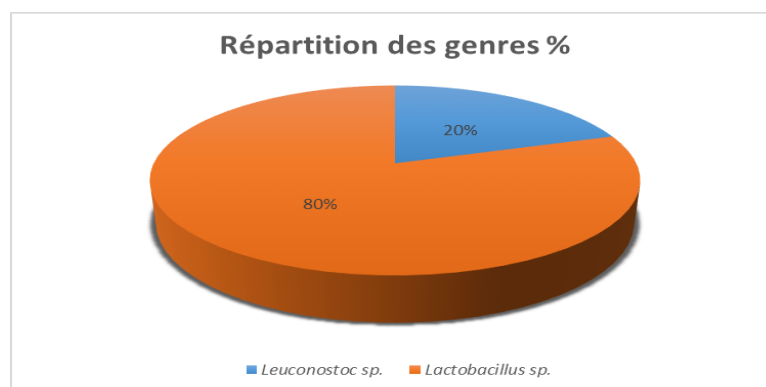
Souches	Catalase	ADH	CO <sub>2</sub>	Températures				NaCl	
				15°C	25°C	30°C	44°C	4%	6,5%
E <sub>1</sub> C	–	–	+	–	+++	+++	(+)	+++	++
E <sub>1</sub> E	–	–	+	++	+++	+++	(+)	+++	++
E <sub>2</sub> A	–	+	–	++	+++	+++	(+)	++	++
E <sub>2</sub> B	–	+	–	++	+++	+++	(+)	+++	+++
E <sub>2</sub> C	–	–	–	++	+++	+++	(+)	+++	++
E <sub>2</sub> D	–	–	–	++	+++	+++	(+)	+++	++
E <sub>2</sub> E <sub>1</sub>	–	–	+	++	+++	+++	(+)	+++	(+)
E <sub>2</sub> E <sub>2</sub>	–	–	+	++	+++	+++	(+)	+++	(+)
E <sub>2</sub> G	–	–	+	++	+++	+++	–	+++	++
E <sub>2</sub> K	–	–	+	++	+++	+++	–	++	–

+ : présence – : absence +++ : bonne croissance ++ : croissance moyenne (+) : croissance très faible

Ainsi, en se basant sur tous les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques, on a pu faire répartition en pourcentage des genres de la collection lactique (**Tableau 6, Figure 6**) après comparaison avec les tableaux de **Stiles et Holzapfel, 1997 ; Badis et al., 2005 ; Ismaili et al., 2016**.

**Tableau 6** : Résultats de l'identification des genres.

Souche	Genre
E <sub>1</sub> C	<i>Lactobacillus</i> sp.
E <sub>1</sub> E	<i>Lactobacillus</i> sp.
E <sub>2</sub> A	<i>Lactobacillus</i> sp.
E <sub>2</sub> B	<i>Lactobacillus</i> sp.
E <sub>2</sub> C	<i>Lactobacillus</i> sp.
E <sub>2</sub> D	<i>Lactobacillus</i> sp.
E <sub>2</sub> E <sub>1</sub>	<i>Leuconostoc</i> sp.
E <sub>2</sub> E <sub>2</sub>	<i>Leuconostoc</i> sp.
E <sub>2</sub> G	<i>Lactobacillus</i> sp.
E <sub>2</sub> K	<i>Lactobacillus</i> sp.



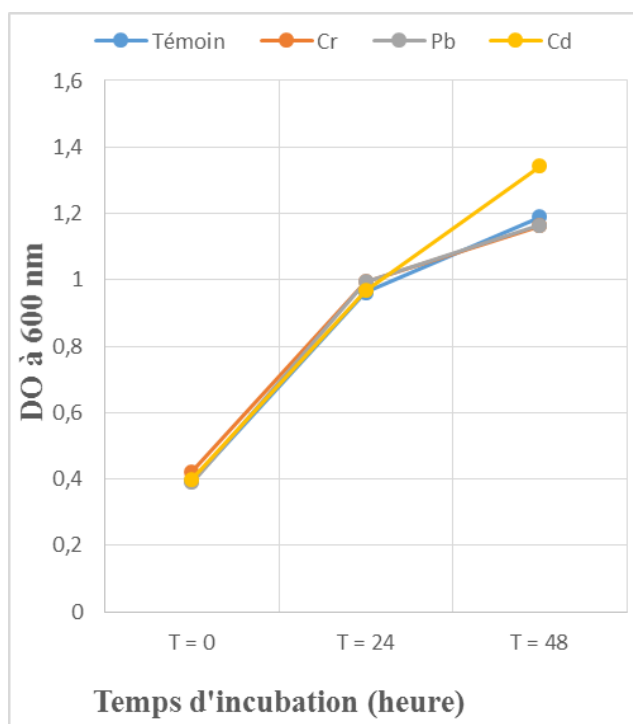
**Figure 6** : Répartition des genres de la collection lactique %.

## II. Etude de la tolérance des souches lactiques aux métaux lourds

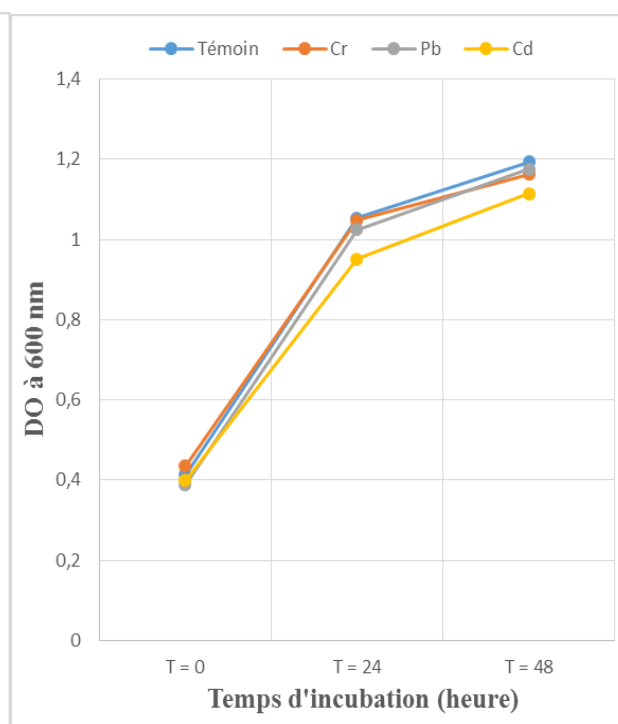
Dans cette partie, on a utilisé les dix souches de bactéries lactiques, isolées et identifiées précédemment, pour le screening des bactéries les plus tolérantes aux trois métaux lourds (Cr, Cd, Pb).

Pour effectuer ce test, on a ensemencé des bouillons MRS contenant 30 mg/l de métal avec des cultures fraîches de 18 h afin de sélectionner la souche la plus tolérante à un des trois métaux par mesure de la densité optique de chaque culture à 600 nm pendant un intervalle de temps de 48 h (**Annexe 7**) à raison d'une mesure chaque 24 h. Parallèlement, on a aussi préparé un témoin ne contenant que du bouillon MRS et la culture, pour chaque souche bactérienne.

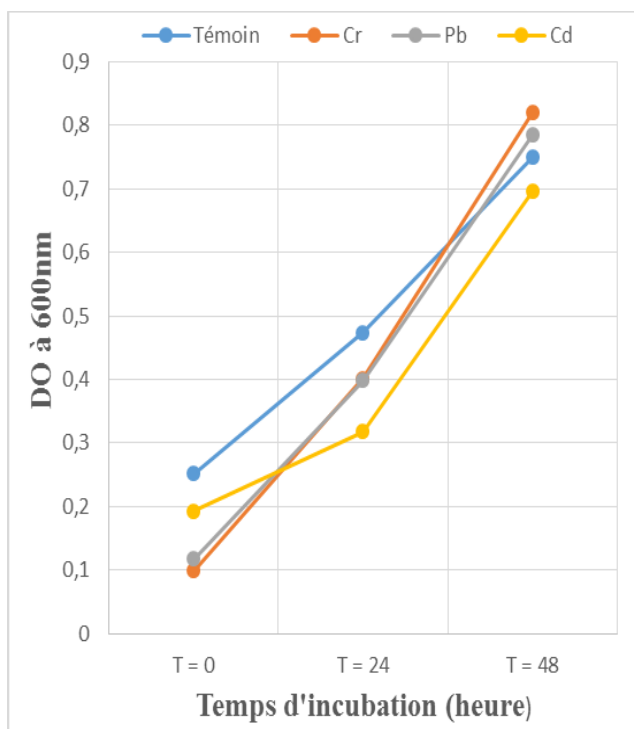
Les résultats sont illustrés dans des courbes qui représentent les variations de la croissance des dix souches de bactéries lactiques en présence et en absence des trois métaux en fonction du temps (**Figures 7-16**).



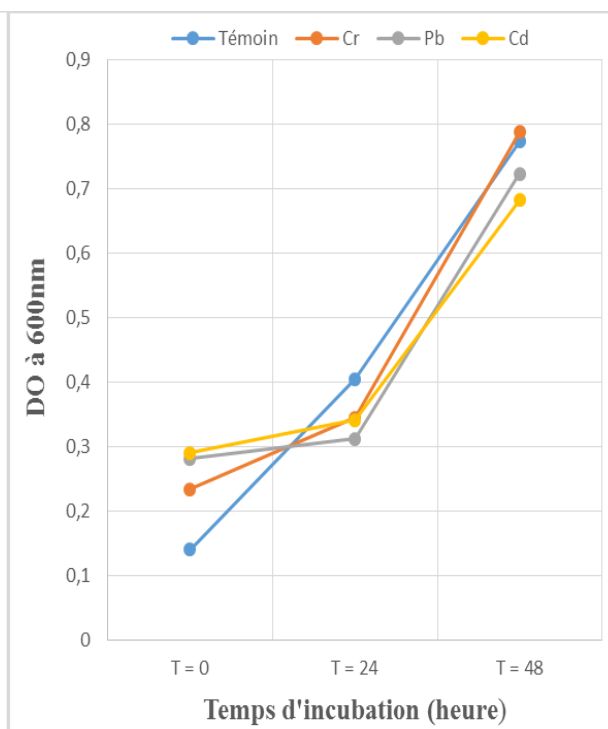
**Figure 7** : Croissance de la souche E<sub>1</sub>C dans le bouillon MRS en présence de 30 mg/l de métal incubée à 37°C.



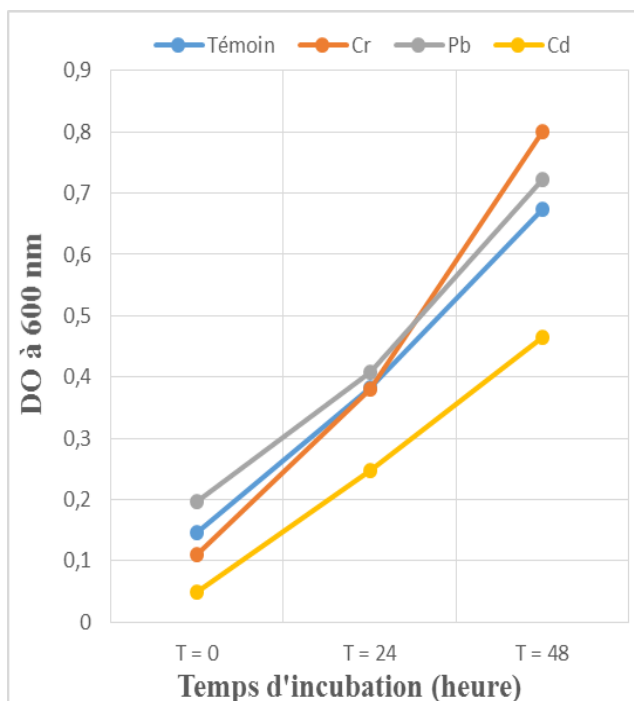
**Figure 8** : Croissance de la souche E<sub>1</sub>E dans le bouillon MRS en présence de 30 mg/l de métal incubée à 37 °C.



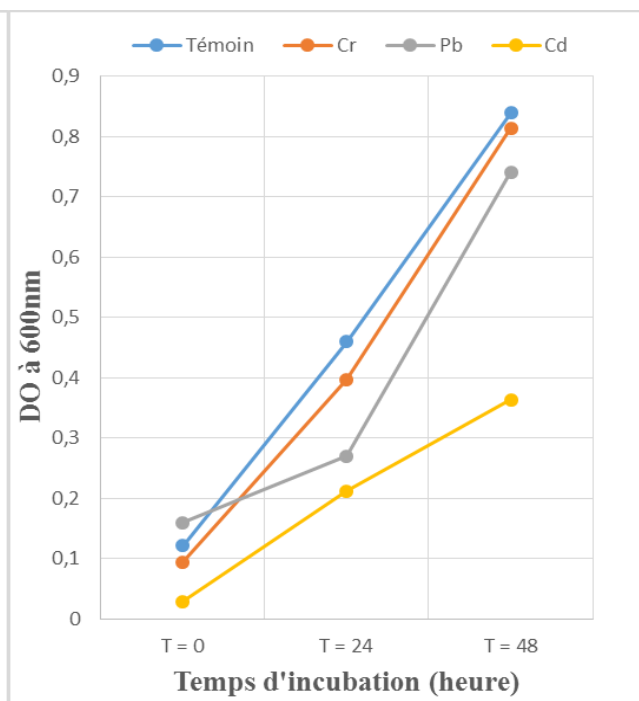
**Figure 9 :** Croissance de la souche E<sub>2</sub>A dans le bouillon MRS en présence de 30 mg/l du métal incubée à 37°C.



**Figure 10 :** Croissance de la souche E<sub>2</sub>B dans le bouillon MRS en présence de 30 mg/l du métal incubée à 37°C.

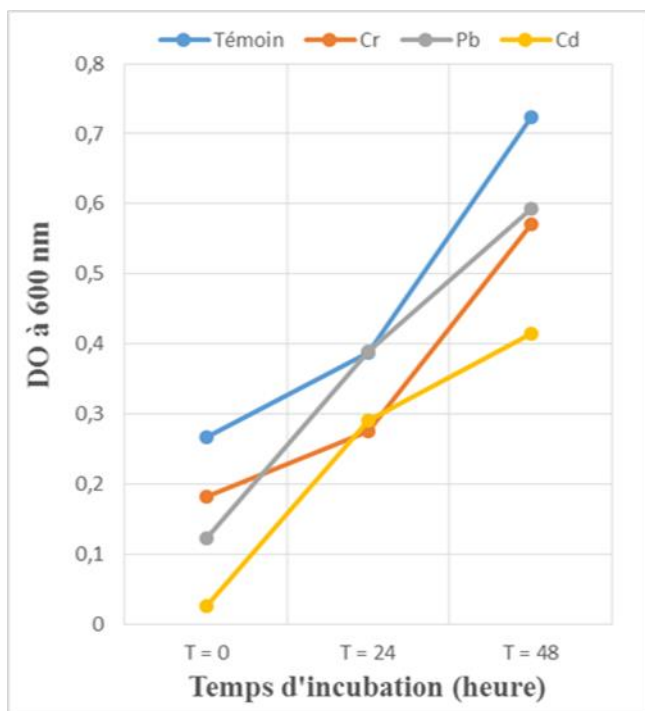


**Figure11 :** Croissance de la souche E<sub>2</sub>C dans le bouillon MRS en présence de 30 mg/l du métal incubée à 37°C.

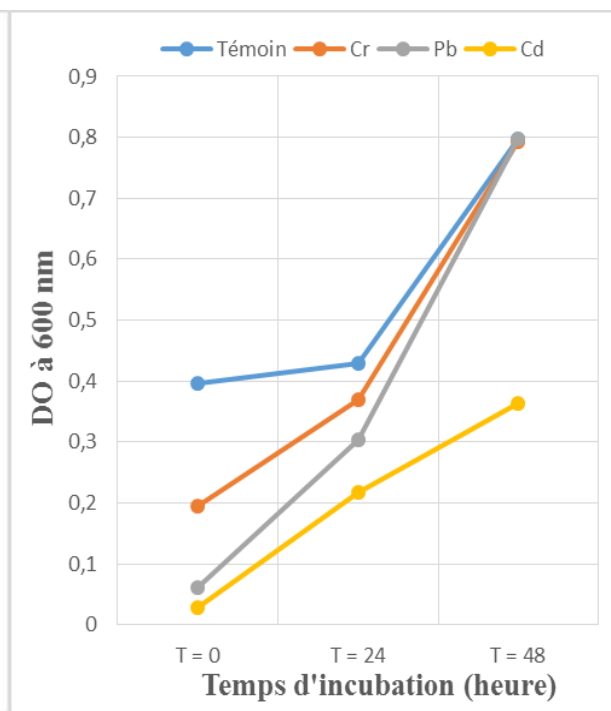


**Figure 12 :** Croissance de la souche E<sub>2</sub>D dans le bouillon MRS en présence de 30 mg/l du métal incubée à 37°C.

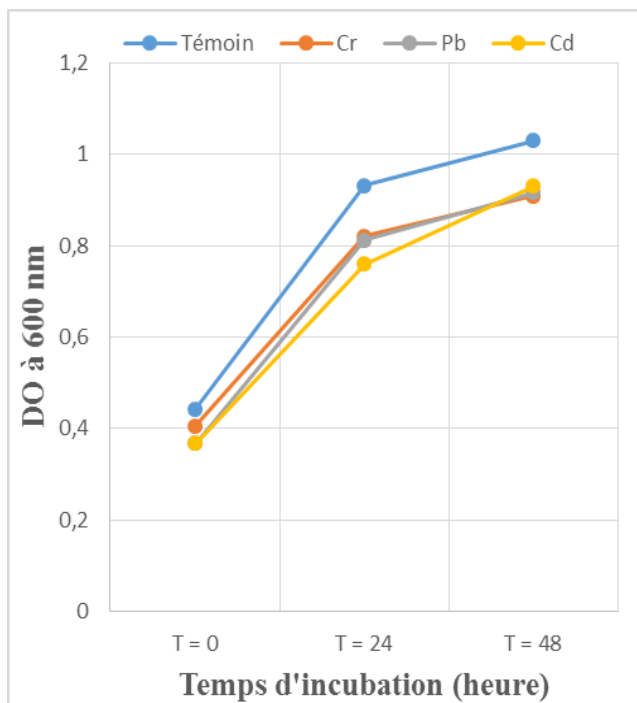




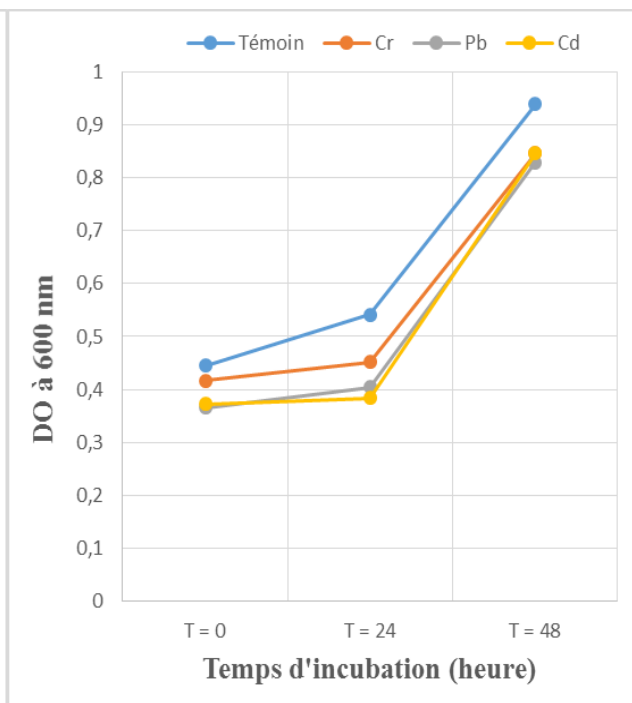
**Figure 13 :** Croissance de la souche E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> dans le bouillon MRS en présence de 30 mg/l du métal incubée à 37°C.



**Figure 14 :** Croissance de la souche E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> dans le bouillon MRS en présence de 30 mg/l du métal incubée à 37°C.



**Figure 15 :** Croissance de la souche E<sub>2</sub>G dans le bouillon MRS en présence de 30 mg/l du métal incubée à 37°C.



**Figure 16 :** Croissance de la souche E<sub>2</sub>K dans le bouillon MRS en présence de 30 mg/l du métal incubée à 37°C.

D'après les résultats obtenus, on a remarqué que tous les témoins ont une croissance avec une phase exponentielle.

En présence d'une concentration de 30 mg/l du métal (Cr, Cd ou Pb), on a observé que l'ensemble des souches ont la capacité de croître mais avec des taux de croissances variables vis-à-vis des trois métaux lourds pendant les 48 h d'incubation. On aperçoit dans ces courbes qu'au fil du temps d'incubation des dix souches en présence du métal, la croissance cellulaire augmente de façon remarquable tout le long des 48 h avec un taux de croissance variable et assez rapide.

On a remarqué que la croissance des souches E<sub>2</sub>A, E<sub>2</sub>C et E<sub>2</sub>D en présence du Cr augmente de façon exponentielle durant les 48 h et y était presque identique à celle du témoin. En contrepartie, les souches E<sub>2</sub>B, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> ont augmenté lentement pendant les premières 24 h pour ensuite progresser très rapidement durant les autres 24 h.

Concernant le plomb, les souches E<sub>2</sub>B, E<sub>2</sub>D et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> se développent avec un taux de croissance plus ou moins lent par rapport à celui des souches E<sub>2</sub>A, E<sub>2</sub>C et E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> pendant 24 h, ensuite toutes les souches augmentent de la même manière très rapidement.

En présence du cadmium, nous observons que toutes les bactéries se développent constamment avec un taux de croissance plus élevé par rapport à celui des autres métaux et il est maximal pour la souche E<sub>2</sub>E<sub>1</sub>.

Au contraire des autres souches, E<sub>1</sub>C, E<sub>1</sub>E, E<sub>2</sub>G et E<sub>2</sub>K se développent constamment d'une manière similaire à celle du témoin pour les trois métaux, surtout les premières 24 h, pendant lesquelles elles atteignent un taux de croissance maximale, puis cette dernière diminue légèrement avec une petite différence par rapport au témoin.

Selon **Bourlioux, (2014)**, la sensibilité des bactéries aux métaux lourds varie. Il a été démontré que *Lactobacillus plantarum* est sensible au Cd, mais résistant au Pb. Ceci a également été constaté par **Bhakta et al., (2012)** qui ont remarqué dans leur étude que 26 des BL probiotiques isolées avaient des pouvoirs de résistances métalliques différents ainsi que des aptitudes d'élimination du métal. Cela nous amène à dire qu'une souche bactérienne peut être sensible à un métal et en même temps être résistante à un autre, de même la résistance diffère d'une souche à une autre ce qui est clairement démontré dans nos résultats.

D'après **Shrivastava et al., (2003)**, les lactobacilles peuvent transformer le chrome en sa forme moins toxique. Dans ce contexte, l'exposition au chrome pendant une période plus longue peut rendre les souches de lactobacilles capables de mieux tolérer les métaux (**Upreti et al., 2011**). C'est pourquoi nous supposons que la raison de la ré-augmentation de la croissance de la plupart des souches est peut-être due à leur transformation en cellules plus résistantes. **Nies (1999)**, a indiqué que le plomb

n'est pas très toxique pour les micro-organismes. Ceci explique la croissance en continue de l'ensemble des dix souches en présence de ce dernier. De même, **Yi et al., 2017**, ont récemment démontré que *Leuconostoc mesenteroides*, qui a été isolé d'un aliment fermenté, a une forte aptitude de résister au Pb.

D'autres travaux ont montré que les micro-organismes ne sont pas aptes à éliminer ou à réduire le cadmium et ainsi pour prévenir la toxicité et les interactions néfastes avec les différents composants de la cellule, un mécanisme qui implique une liaison à la surface des cellules entre en jeu et permet par cette occasion aux BL d'y adsorber les ions métalliques (**Giri et al., 201 ; Kumar et al., 2018**).

Des études récentes ont révélé que *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum* et *L. brevis* peuvent lier et éliminer le cadmium, le plomb et le cuivre *in vitro*. Ainsi, *Lactobacillus fermentum* et *Bifidobacterium* peuvent se lier rapidement au Pb et au Cd au bout de 5min à 1h d'ingestion. Le métal est séquestré fortement dans les parois cellulaires bactériennes sans dissociation même après 48h. En effet, plusieurs facteurs qui influent sur la liaison et la séquestration des métaux par les bactéries existent tels que le type du métal, la concentration des cellules, le temps de contact et le pH de l'environnement. Il a également été démontré que la résistance des BL (*Lactococcus lactis* et *Oenococcus oeni*) au cadmium est due à un système de résistance similaire à celui de *Staphylococcus aureus* qui est porté par un plasmide codant pour une ATPase, qui catalyse l'efflux du Cd (**Kumar et al., 2018**).

Cela semble cohérent avec les résultats obtenus ce qui conduit à suggérer que la résistance de ces bactéries est probablement due à l'intervention de ces mécanismes.

Parmi les dix souches bactériennes testées, on a calculé le taux de croissance de chacune d'elles (**Tableau 7**) et on a retenu une souche ayant montré une haute résistance à chaque métal respectivement, soit les souches E<sub>2</sub>D pour le Cr, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> pour le Cd et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> pour le Pb. Ces mêmes souches ont été utilisées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque métal avec des concentrations croissantes.

**Tableau 7** : Le taux de croissance ( $h^{-1}$ ) des dix souches dans du bouillon MRS additionné de 30 mg/l de métal incubées à 37°C pendant 48 heures.

Souche	E <sub>1</sub> C			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T=24	0,060	0,056	0,064	0,059
T= 48	0,042	0,037	0,041	0,049
Souche	E <sub>1</sub> E			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T=24	0,065	0,059	0,069	0,058
T= 48	0,039	0,035	0,042	0,037
Souche	E <sub>2</sub> A			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T= 24	0,037	0,127	0,099	0,027
T= 48	0,041	0,151	0,118	0,054
Souche	E <sub>2</sub> B			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T=24	0,078	0,020	0,005	0,007
T= 48	0,094	0,049	0,033	0,028
Souche	E <sub>2</sub> C			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T= 24	0,067	0,102	0,045	0,171
T= 48	0,075	0,130	0,056	0,179
Souche	E <sub>2</sub> D			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T= 24	0,116	0,134	0,029	0,266
T= 48	0,123	<u>0,159</u>	0,076	0,243
Souche	E <sub>2</sub> E <sub>1</sub>			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T= 24	0,019	0,021	0,090	0,418
T= 48	0,036	0,044	0,080	<u>0,308</u>
Souche	E <sub>2</sub> E <sub>2</sub>			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T= 24	0,003	0,037	0,162	0,284
T= 48	0,021	0,064	<u>0,247</u>	0,251
Souche	E <sub>2</sub> G			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T= 24	0,046	0,043	0,050	0,044
T= 48	0,028	0,026	0,031	0,032
Souche	E <sub>2</sub> K			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T= 24	0,009	0,004	0,005	0,001
T= 48	0,023	0,022	0,026	0,026

## II.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Sur la base des résultats précédents du screening préliminaire (**Annexe 7**) et les taux de croissance cellulaire des dix souches de bactéries lactiques (**Tableau 7**) on a sélectionné les trois souches E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> pour déterminer la concentration minimale inhibitrice aux métaux lourds Cr, Cd et Pb, respectivement. Ce test permet de déterminer la plus faible concentration de métal à laquelle la croissance bactérienne est inhibée.

Pour le faire, on a mesuré la croissance cellulaire en présence de différentes concentrations de métaux (Pb, Cd, Cr) dans le bouillon MRS (**Annexe 8**), ensuite on a résumé les résultats dans le **tableau 8** où chaque valeur est déterminée par la différence entre la croissance cellulaire au temps initial (T<sub>0</sub>) et après 24h (T<sub>24</sub>).

**Tableau 8** : Valeurs de la DO mesurée à 600 nm pour les souches, E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> en présence de concentrations croissantes de Cr, Cd et Pb, respectivement.

Métaux	Cr (E <sub>2</sub> D)	Cd (E <sub>2</sub> E <sub>1</sub> )	Pb (E <sub>2</sub> E <sub>2</sub> )
Temps (h) [Me] en mg/l	T <sub>24</sub> - T <sub>0</sub>	T <sub>24</sub> - T <sub>0</sub>	T <sub>24</sub> - T <sub>0</sub>
50	0,236	0,112	0,163
100	0,197	0,036	0,169
150	0,157	0,003	0,181
200	0,123	-0,040	0,110
250	0,038	-0,046	0,120
300	-0,009	-0,045	0,075
350	-0,021	-0,088	0,024
400	-0,042	-0,145	-0,011

Comme le montrent les résultats de ce tableau, la concentration la plus faible pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée diffère d'un métal à un autre. La croissance de la souche E<sub>2</sub>D a été inhibée en présence de 300 mg/l de chrome, tandis que la souche E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> peut tolérer des niveaux plus élevés de plomb et peut aller bien au-delà jusqu'à arriver à la concentration de 400 mg/l de plomb où la croissance est complètement inhibée. En contrepartie, la plus faible concentration du cadmium à laquelle la croissance bactérienne est inhibée pour la souche E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> est égale à 200 mg/l.

**Chen et Hao, (1998)** ont affirmé dans leurs travaux que la plupart des bactéries résistantes à 50 mg/l de Cr (VI) étaient à Gram positif et elles tolèrent significativement des niveaux plus élevés de ce dernier mais que les bactéries à Gram négatif étaient plus sensibles au Cr (VI) que celles à Gram positif.

Plusieurs études ont montré que de nombreuses bactéries associées à l'intestin dont les lactobacilles, ainsi que certaines cellules immunitaires humaines sont capables de transformer le chrome Cr(VI) en sa forme moins toxique Cr(III) et sa bioaccumulation, et que si on expose les lactobacilles pendant une période au chrome elles généreront des souches résistantes et seront aptes à mieux tolérer les métaux. Mais les lactobacilles n'en demeurent pas seules car même les bactéries fécales humaines ont cette capacité à lier et séquestrer le chrome (**Boularab et al., 2011; Upreti et al., 2011 ; Monachese et al., 2012**).

Ce qui amène à une suite logique des résultats obtenus et une similitude qui pousse à croire que la souche E<sub>2</sub>D a cette capacité à tolérer des niveaux élevés de chrome.

Au cours des dernières années et après plusieurs recherches établies, **Zhai et al., 2015** ainsi que **Kirillova et al., 2017** ont montré qu'un bon nombre de bactéries lactiques dont *Lactobacillus plantarum*, *L. rhamnosus* GG, *L. johnsonii* Lj, *L. casei* Shirota, *L. fermentum* ME3, *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium lactis* ainsi que *L. amylovorus*, *L. reuteri* et *L. dextrinicus* et bien d'autres sont reconnues comme souches probiotiques pouvant lier et éliminer le Cd et le Pb.

Dans ce cas-là et conformément aux études précédentes, les résultats sont similaires à ceux obtenus par **Giri et al., (2017)** où ils ont montré que la CMI du Pb pour sept souches de bactéries lactiques variait de 50 à 1250 mg/l et *Lactobacillus reuteri* a montré une valeur maximale de CMI égale à 1250 mg/l. Ils sont également cohérents avec les résultats obtenus par **Bhakta et al., (2012)**, qui ont montré que la CMI du cadmium (Cd) et du plomb (Pb) pour 26 souches de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Enterococcus* était respectivement de 50 à 1000 mg/l et 2000 mg/l.

Ces observations suggèrent que les souches développent des mécanismes qui leur permettent de s'adapter aux conditions de stress de leur milieu d'origine (**Boularab et al., 2011**). On peut alors, à la suite de ces résultats, déduire que ces souches peuvent avoir un grand rôle dans la liaison des métaux et donc elles peuvent être une bonne alternative à la désintoxication et de ce fait protéger l'hôte du danger que représentent les métaux lourds.

### III. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques des bactéries lactiques *in vitro*

Communément, les probiotiques sont administrés par voie orale, alors la croissance et la viabilité des souches peuvent être affectées à travers le passage dans l'estomac et le petit intestin. Il est donc nécessaire d'évaluer le pouvoir de résistance des bactéries aux stress gastro-intestinal avant leur utilisation comme probiotiques (Ashraf *et al.*, 2009 ; Bhakta *et al.*, 2012 ; Shehata *et al.*, 2016).

#### III.1. Evaluation du taux de survie des bactéries lactiques aux conditions acides

Les bactéries lactiques, sont obligées de résister au pH acide de l'estomac pour exercer leur rôle probiotique ainsi que pour coloniser l'intestin (Hermanns *et al.*, 2014). En effet, pour déterminer leur capacité de survie au passage dans l'estomac, les trois souches E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> ont été inoculées dans des bouillons MRS à pH 2 et à pH 6,4 puis le nombre de cellules a été évalué après 2h et 4h d'exposition à l'aide de la cellule de Malassez. Les résultats de la croissance de ces souches sont représentés ci-dessous (Tableau 9).

**Tableau 9** : Croissance des souches E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> en fonction du pH du milieu.

Souche E <sub>2</sub> D			
Temps	pH du milieu	Nombre de cellules /ml	
		pH = 2	pH = 6.4
	T = 0 <sup>h</sup>	1,2.10 <sup>3</sup>	1,8.10 <sup>3</sup>
	T = 2 <sup>h</sup>	1,3.10 <sup>3</sup>	2,2.10 <sup>3</sup>
	T = 4 <sup>h</sup>	1.10 <sup>3</sup>	2,9.10 <sup>3</sup>
Souche E <sub>2</sub> E <sub>1</sub>			
Temps	pH du milieu	Nombre de cellules /ml	
		pH = 2	pH = 6.4
	T = 0 <sup>h</sup>	1,5.10 <sup>3</sup>	2.10 <sup>3</sup>
	T = 2 <sup>h</sup>	1,3.10 <sup>3</sup>	2,1.10 <sup>3</sup>
	T = 4 <sup>h</sup>	1.10 <sup>3</sup>	2,5.10 <sup>3</sup>
Souche E <sub>2</sub> E <sub>2</sub>			
Temps	pH du milieu	Nombre de cellules /ml	
		pH = 2	pH = 6.4
	T = 0 <sup>h</sup>	1,5.10 <sup>3</sup>	1,9.10 <sup>3</sup>
	T = 2 <sup>h</sup>	1,2.10 <sup>3</sup>	2,1.10 <sup>3</sup>
	T = 4 <sup>h</sup>	1.10 <sup>3</sup>	2,2.10 <sup>3</sup>

D'après les données de ce tableau, il apparaît que dans des conditions acides à pH 2, la croissance des souches E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> a diminué légèrement après 2 h d'exposition et le nombre de cellules atteint, 1,3.10<sup>3</sup> cellules/ml et 1,2.10<sup>3</sup> cellules/ml, respectivement, alors que le nombre de cellules de la souche E<sub>2</sub>D a augmenté et atteint 1,3.10<sup>3</sup>cellules/ml, mais tous sont inférieurs aux nombres des cellules témoins (pH 6,4) qui vont de 8,10<sup>3</sup> cellules/ml à 2,1.10<sup>3</sup> cellules/ml.

Après 4 h d'exposition à pH 2, une légère diminution est observée également pour les trois souches et qui atteint 1.10<sup>3</sup> cellules/ml. De plus, leur taux de croissance est ralenti par rapport à celui des souches incubées à pH 6,4 et qui se développent en continue et atteignent 2,9.10<sup>3</sup> cellules/ml,

$2,5.10^3$  et  $2,2.10^3$  cellules/ml, respectivement pour les souches E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>. Généralement les trois souches montrent une tolérance aux conditions acides.

A partir de ces résultats le taux de survie est calculé, selon **Lee et al., (2016)** et résumé dans le **tableau 10** :

**Tableau 10** : Taux de survie (%) des souches E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> dans le milieu acide à pH 2.

Souche		Taux de survie (%)		
		E <sub>2</sub> D	E <sub>2</sub> E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> E <sub>2</sub>
Temps	T = 2 <sup>h</sup>	59	61,90	57,14
	T = 4 <sup>h</sup>	34,48	40	45,45

Les résultats montrent que les taux de survie après exposition à pH 2 varient en fonction du temps. Cependant, le taux de survie le plus élevé était enregistré pour la souche E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> qui est égal à 45,45% tandis que le taux le plus faible a été observé pour la souche E<sub>2</sub>D ayant une valeur égale à 34,48% après 4 heures d'exposition à l'acidité. Donc, la souche la plus résistante est E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> et la plus sensible est la souche E<sub>2</sub>D.

Le mécanisme de résistance à l'acidité dépend de la souche et de l'espèce (**Abushelaibi et al., 2017**), ce qui explique la différence dans la tolérance des trois souches E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>. La tolérance de ces souches à l'acide, pourrait être due à la présence d'un gradient stable entre le pH extracellulaire et le pH cytoplasmique mais les fonctions cellulaires sont inhibées et les cellules meurent lorsque le pH interne atteint une valeur seuil. Cependant lorsque les bactéries croissent dans un milieu riche, tels que le milieu MRS acidifié, celui-ci leur procure l'énergie et les précurseurs métaboliques qui peuvent leur fournir une protection nécessaire et ainsi favoriser leur résistance (**Corcoran et al., 2005**). D'autre part, **Hawaz et al., (2016)** ont rapporté la capacité de survivre des espèces de *L. plantarum*, *L. cellobiosus* et *L. salivarius* à un pH allant de 2 à 4 avec une réduction significative de la viabilité, mais *L. brevis* conserve sa viabilité avec une réduction négligeable.

On constate donc que les deux souches E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> ont une bonne tolérance à l'acidité avec des taux de survie considérables.

### III.2. Evaluation du taux de croissance des bactéries lactiques en présence de sels biliaires

La présence de bile dans l'intestin grêle constitue un autre obstacle aux probiotiques. En effet, les éléments constitutifs de la bile sont toxiques pour la vie cellulaire en particulier les sels biliaires, en raison de leur capacité à perturber la structure de la membrane cellulaire. De ce fait, l'évaluation de la tolérance des souches de BL aux sels biliaires est le deuxième paramètre de base pour sélectionner les BL potentiellement probiotiques (**Hermanns et al., 2014 ; Ren et al., 2014**).



Dans ce test, les mêmes souches précédentes qui ont été évaluées pour l'acidité seront testées pour leur capacité à tolérer les sels biliaries. Il se fait par une inoculation des souches dans des bouillons MRS en absence et en présence de sels biliaries (0,3%), puis par l'intermédiaire d'un spectrophotomètre, on mesure les croissances des cellules après quatre heures d'exposition (**Annexe 9**), ensuite on calcule les taux de croissance de ces souches (**tableau 11**).

**Tableau 11** : Taux de croissance ( $\text{min}^{-1}$ ) des souches E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> incubées dans du bouillon MRS avec et sans bile, après 240 minutes d'incubation.

Souche	E <sub>2</sub> D	E <sub>2</sub> E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> E <sub>2</sub>
Témoin	$6,88.10^{-4}$	$8,653.10^{-4}$	$5,27.10^{-3}$
0,3%	$-1,437.10^{-3}$	$-6,81.10^{-4}$	$2,028.10^{-3}$

D'après les données de ce tableau, on a remarqué qu'après 240 minutes d'exposition aux sels biliaries (0,3%) la souche E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> a révélé une résistance remarquable aux sels biliare avec un taux de croissance atteignant  $2,028.10^{-3}$ , ceci dit, il reste inférieur à celui du témoin ( $5,27.10^{-3}$ ). Par contre, les souches E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> ne présentent aucune croissance. Ce qui amène à dire que la souche E<sub>2</sub>E<sub>2</sub> est une souche résistante et les souches E<sub>2</sub>D, E<sub>2</sub>E<sub>1</sub> sont des souches sensibles aux sels biliaries.

Ce résultat semble similaire à celui obtenu par **Jacobsen et al., (1999)** où ils ont révélé que les souches de bactéries lactiques testées sont relativement résistantes aux sels biliaries (0,3%), mais un retardement de la croissance de 1 à 4 heures a été remarqué pour 16 souches et le reste des souches ne se répliquaient pas. La tolérance de ces souches aux sels biliaries, peut-être due à la présence de l'enzyme hydrolase de sels biliaries qui peut réduire leurs effets toxiques par hydrolyse des sels biliaries combinés, mais la diminution de la viabilité est due à l'effet des sels biliaries sur la membrane cellulaire des micro-organismes (**Argyri et al., 2013 ; Angmo et al., 2016**).

**Shehata et al., (2016)** ont montré une bonne tolérance aux sels biliaries avec des degrés variables pour toutes les souches de bactéries lactiques testées, notamment la souche *Lactobacillus delbrueckii sub sp. Bulgaricus* qui a une meilleure tolérance aux sels biliaries suivie par la souche *Lactobacillus paracasei*. En revanche, **Hawaz et al., (2016)** ont rapporté que les espèces de *Lactobacillus salivarius* et *Lactobacillus fermentum* ont la capacité de survivre après 4h d'exposition à 0,3% de sels biliaries avec une réduction significative de la viabilité, mais *L. plantarum*, *L. cellobiosus* et *L. brevis* ont conservé leur viabilité avec une réduction négligeable.

Si d'après **Argyri et al., (2013)** les souches de lactobacilles qui peuvent se développer en présence de la bile sont celles qui peuvent survivre dans le tractus gastro-intestinal, et en se basant sur tous les résultats obtenus jusqu'ici, on peut désormais sélectionner la souche *Leuconostoc sp.* (E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>) comme un microorganisme potentiellement probiotique.

# *Conclusion*

L'objectif principal de la présente étude était d'isoler des souches de bactéries lactiques à caractères probiotiques, à partir des selles des nourrissons, résistantes à trois métaux qui sont le Cr, Cd et Pb, dans une perspective de leur utilisation comme des probiotiques pour assurer une protection et la désintoxication du corps humain et des aliments contre la toxicité de ces derniers. Dans la première partie, nous avons identifié dix souches de bactéries lactiques isolées des selles des nourrissons. Dans la deuxième partie, on s'est intéressé à étudier l'aptitude de ces souches à résister à ces métaux lourds. Troisième et dernière partie, on a effectué une évaluation du potentiel probiotique de trois souches ayant été les plus résistantes aux métaux étudiés dans l'étape précédente.

Les résultats obtenus :

- Ont permis d'attribuer ces isolats (dix) à deux genres différents à savoir *Lactobacillus sp.* (80%) et *Leuconostoc sp.* (20%).
- Les résultats relatifs à la résistance aux trois métaux (Pb, Cd et C) ont montré que les dix souches de bactéries lactiques tolèrent la même concentration initiale de ces ions métalliques testés (30mg/l).
- Les souches *Lactobacillus sp.* (E<sub>2</sub>D), *Leuconostoc sp.* (E<sub>2</sub>E<sub>1</sub>) et *Leuconostoc sp.* (E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>) peuvent tolérer des niveaux plus élevés de chrome, cadmium et plomb, respectivement jusqu'à des concentrations de 300 mg/l, 200 mg/l et 400 mg/l où leurs croissances ont été inhibées.
- Ces dernières ont montré également une capacité à survivre dans les conditions hostiles du tube digestif notamment le pH acide et les sels biliaires, citons les souches *Leuconostoc sp.* (E<sub>2</sub>E<sub>1</sub>) et *Leuconostoc sp.* (E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>) avec des taux de survie à un pH de 2 qui ont atteint 40% et 45,45%, respectivement et un taux de croissance en présence de sels biliaires de  $2,028 \cdot 10^{-3}$  pour la souche *Leuconostoc sp.* (E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>).

A la lumière de ces résultats, on suggère que ces souches de bactéries lactiques et surtout la souche *Leuconostoc sp.* (E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>), qui font partie de la composition normale du tractus intestinal, peuvent être de bons candidats pour la prévention contre la toxicité des métaux lourds et s'ajouter aux autres différents bienfaits des probiotiques.

Au final, ce travail nous pousse à nous poser d'autres questions concernant l'utilisation de ces probiotiques qualifiés de microorganismes inoffensifs et bénéfiques, encore mal-connus chez les consommateurs algériens, dans la désintoxication et les divers traitements liés au corps humain et aux différents aliments contaminés ingurgités par l'Homme, et qui peuvent être une alternative intéressante aux différents médicaments et antibiotiques vendus sur le marché.

*Références  
bibliographiques*

## A

- Abdi, A., Benhadj, M., Alioua, S., & Ga-Kirane, D. (2013).** Characterization and Antibiotic Susceptibility of Lactobacilli, Pathogenic and Spoilage Bacteria Isolated from Meats. *Turkish Online Journal of Science & Technology*, 3(3).
- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., & Ayyash, M. (2017).** Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 316-325.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013).** Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881.
- Angmo, K., Kumari, A., & Bhalla, T. C. (2016).** Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 428-435.
- Anticó, E., Cot, S., Ribó, A., Rodríguez-Roda, I., & Fontàs, C. (2017).** Survey of Heavy Metal Contamination in Water Sources in the Municipality of Torola, El Salvador, through In Situ Sorbent Extraction. *Water*, 9(11), 877.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013).** Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282-291.
- Arimah, B. D., Ogunlowo, O. P., Adebayo, M. A., & Jesumirhewe, C. (2014).** Identification of lactic acid bacteria isolated from selected Nigerian foods and comparison of their bacteriocins activities. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6, 20-26.
- Ashraf, M., Arshad, M., Siddique, M., & Muhammad, G. (2009).** In vitro screening of locally isolated Lactobacillus species for probiotic properties. *Pakistan Veterinary Journal*, 29(4), 186-190.
- Azadnia, P. K. N. A., & Khan Nazer, A. H. (2009).** Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 10(3), 235-240.

## B

- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D. E., & Kihal, M. (2004).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21(5), 579-588.
- 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" arabia et kabyle". *Sciences & Technologie C*, 23, 30-37.

- Bakradze, E., Vodyanitskii, Y., Urushadze, T., Chankseliani, Z., & Arabidze, M. (2018).** About rationing of the heavy metals in soils of Georgia. *Annals of Agrarian Science*, 16(1), 1-6.
- Bekhouche, F., & Boulahrouf, A. (2005).** Etudes quantitative et qualitative des bacteries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de constantine. *Sciences & Technologie C*, 23, 38-45.
- Bhakta, J. N., Ohnishi, K., Munekage, Y., Iwasaki, K., & Wei, M. Q. (2012).** Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6), 1193-1206.
- Bhattacharya, A., et Gupta, A. (2013).** Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr (VI) resistance and detoxification with potential application in bioremediation of heavy-metals-rich industrial wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(9), 6628-6637.
- Bothe, H., & Slomka, A. (2017).** Divergent biology of facultative heavy metal plants. *Journal of Plant Physiology*.
- Boularab, I., Bahafid, W., Joutey, N. T., Sayel, H., El Jaafari, S., & El Ghachtouli, N. (2011).** Étude du pouvoir réducteur du chrome hexavalent de trois isolats de levures : élaboration d'une stratégie de bioremédiation. *European Journal of Water Quality*, 42(1), 25-34.
- Bourlioux, P. (2014, January).** Current view on gut microbiota. In *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 72(1), 15-21.
- Bourlioux, P., Megerlin, F., Corthier, G., Gobert, J. G., & Butel, M. J. (2014, September).** Pourquoi la flore intestinale a-t-elle vocation à devenir médicament?. In *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 72(5), 325-329. Elsevier Masson.
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000).** Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(3), 198-207.
- Bruneau, A., Baylatry, M. T., Joly, A. C., & Sokol, H. (2017).** Le microbiote intestinal : quels impacts sur la carcinogénèse et le traitement du cancer colorectal?. *Bulletin du Cancer*.
- Butel, M. J. (2014).** Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *Journal des Anti-Infectieux*, 16(2), 33-43.

## C

- Chen, J. M., & Hao, O. J. (1998).** Microbial chromium (VI) reduction. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 28(3), 219-251.
- Choudhury, R., & Srivastava, S. (2001).** Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Current Science*, 768-775.
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2005).** Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3060-3067.

## D

- Dallal, M. S., Zamaniahari, S., Davoodabadi, A., Hosseini, M., & Rajabi, Z. (2017).** Identification and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional persian pickled vegetables. *GMS Hygiene and Infection Control*, 12.
- De Valdez G F et Taranto M P. 2001.** Probiotic properties of *Lactobacilli*. *Food Microbiology Protocols*, 173-181.
- Dupont, C. (2001).** Probiotiques et prébiotiques. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 14(2), 77-81.

## E

- El Makhfouk, M., Souissi, A., & El Meray, M. (2003).** Analyse de la fraction labile du zinc, cadmium, plomb et du cuivre dissous en milieu marin côtier par la redissolution anodique à impulsions différentielles. *Comptes Rendus Chimie*, 6(7), 689-693.
- Etesami, H. (2018).** Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 175-191.

## G

- Gadd, G. M. (1990).** Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*, 46(8), 834-840.
- Gasong, B. T., Abrian, S., & Setyabudi, F. M. S. (2017).** Methylmercury Biosorption Activity by Methylmercury-resistant Lactic Acid Bacteria Isolated From West Sekotong, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(4), 182-186.
- Giri, S. S., Jun, J. W., Yun, S., Kim, H. J., Kim, S. G., Kang, J. W., ... & Sukumaran, V. (2017).** Characterisation of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Gut of *Cyprinus carpio* That May Be Effective Against Lead Toxicity. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-9
- Gras-Le Guen, C., Launay, E., Colas, H., Potel, G., & Caillon, J. (2011).** Microbiote intestinale et antibiothérapie périnatale. *Journal des Anti-infectieux*, 13(2), 103-108.
- Guetouache, M., & Guessas, B. (2015).** Characterization and identification of lactic acid bacteria isolated from traditional cheese (Klila) prepared from cows milk. *African Journal of Microbiology Research*, 9(2), 71-77.
- Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., ... & He, Y. (2010).** Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulator endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource Technology*, 101(22), 8599-8605.

## H

- Halttunen, T., Finell, M., & Salminen, S. (2007 November)**. Arsenic removal by native and chemically modified lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), 173-178.
- Halttunen, T., Salminen, S., & Tahvonen, R. (2007 February)**. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 30-35.
- Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Bouhadi D. (2009)**. Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. *Revue de Microbiologie Industrielle, Sanitaire, et Environnementale*, 37-55.
- Hassaine, O., Zadi-Karam, H., & Karam, N. E. (2007)**. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *African Journal of Biotechnology*, 6(14).
- Hawaz, E. (2016)**. Isolation and Characterization of *Lactobacillus* Species from Head Cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) and its Potential Application as a Probiotic Agent. *East African Journal of Sciences*, 10(1), 23-28.
- Hermanns, G., Funck, G. D., Schmidt, J. T., Pereira, J. Q., Brandelli, A., & Richards, N. S. P. D. S. (2014)**. Evaluation of probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from artisan cheese. *Journal of Food Safety*, 34(4), 380-387.

## I

- Ismaili, M. A., Guilal, J., Hamama, A., Saidi, B., & Zahar, M. (2016)**. Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *The International Journal of Multi-disciplinary Sciences*, 1(1), 81-94.
- Issazadeh, K., Jahanpour, N., Pourghorbanali, F., Raesi, G., & Faekhondeh, J. (2013)**. Heavy metals resistance by bacterial strains. *Annals of Biological Research*, 4(2), 60-63.

## J

- Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., ... & Jakobsen, M. (1999)**. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4949-4956.
- Jiao, X., Teng, Y., Zhan, Y., Wu, J., & Lin, X. (2015)**. Soil heavy metal pollution and risk assessment in Shenyang industrial district, Northeast China. *PLoS One*, 10(5), e0127736.
- Joly, F., Coffin, B., & Messing, B. (2007)**. Rôle de la flore dans les pathologies digestives (maladie de Crohn, rectocolite ulcérohémorragique, cancer colorectal exclus). *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 21(2), 89-94.



**Jung, M. C. (2008).** Heavy metal concentrations in soils and factors affecting metal uptake by plants in the vicinity of a Korean Cu-W mine. *Sensors*, 8(4), 2413-2423.

### K

**Kayee, P., Songphim, W., & Parkpein, A. (2015).** Using Thai native moss as bio-adsorbent for contaminated heavy metal in air. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 197, 1037-1042.

**Kinoshita, H., Sohma, Y., Ohtake, F., Ishida, M., Kawai, Y., Kitazawa, H., ... & Kimura, K. (2013).** Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Research in Microbiology*, 164(7), 701-709.

**Kirillova, A. V., Danilushkina, A. A., Irisov, D. S., Bruslik, N. L., Fakhrullin, R. F., Zakharov, Y. A., ... & Yarullina, D. R. (2017).** Assessment of Resistance and Bioremediation Ability of Lactobacillus Strains to Lead and Cadmium. *International Journal of Microbiology*, 2017.

**Kobielska, P. A., Howarth, A. J., Farha, O. K., & Nayak, S. (2018).** Metal–organic frame works for heavy metal removal from water. *Coordination Chemistry Reviews*, 358, 92-107.

**Krych-Madej, J., & Gebicka, L. (2017).** Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 171, 10-17.

**Kumar, A. (2013).** Probiotics: Nature's medicine. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 3(3), 219.

**Kumar, N., Kumari, V., Ram, C., Thakur, K., & Tomar, S. K. (2018).** Bio-prospectus of cadmium bioadsorption by lactic acid bacteria to mitigate health and environmental impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-17.

**Kushwaha S, Sreedhar B et Sudhakar P P. (2012).** A spectroscopic study for understanding the speciation of Cr on palm shell based adsorbents and their application for the remediation of chrome plating effluents. *Bioresource Technology*, 116, 15-23.

### L

**Lal, S., Ratna, S., Said, O. B., & Kumar, R. (2018).** Biosurfactant and exopolysaccharide-assisted rhizobacterial technique for the remediation of heavy metal contaminated soil: An advancement in metal phytoremediation technology. *Environmental Technology & Innovation*.

**Landman, C., & Quévrain, E. (2016).** Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de Médecine Interne*, 37(6), 418-423.

**Lee, K. W., Shim, J. M., Park, S. K., Heo, H. J., Kim, H. J., Ham, K. S., & Kim, J. H. (2016).** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 130-137.

**Lee, S. Y., & Choi, H. J. (2018).** Persimmon leaf bio-waste for adsorptive removal of heavy metals from aqueous solution. *Journal of Environmental Management*, 209, 382-392.

**Leshe, S., & Tessema, M. (2014).** Determination of levels of essential and toxic heavy metals in lentil (*lens culinaris medik*) by flame atomic absorption spectroscopy. *African Journal of Chemical Education*, 4(4), 16-34.

**M**

**Maldonado, N. C., Fico seco, C. A., Mansilla, F. I., Melián, C., Hébert, E. M., Vignolo, G. M., & Nader-Macías, M. E. F. (2018).** Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle. *Livestock Science*, 212, 99-110.

**Marzan, L. W., Hossain, M., Mina, S. A., Akter, Y., & Chowdhury, A. M. A. (2017).** Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(1), 65-74.

**Mathipa, M. G., & Thantsha, M. S. (2017).** Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut Pathogens*, 9(1), 28.

**Miquel G. (2001).** Rapport sur : Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. *Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Techniques*, 261, 346-344.

**Monachese, M., Burton, J. P., & Reid, G. (2012).** Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics?. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6397-6404.

**Monchy, S. (2007).** Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat à l'Université Libre de Bruxelles).

**Mrvčić, J., Butorac, A., Šolić, E., Stanzer, D., Bačun-Družina, V., Cindrić, M., & Stehlik-Tomas, V. (2013).** Characterization of *Lactobacillus brevis* L62 strain, highly tolerant to copper ions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(1), 75-85.

**Mubofu, E. B. (2012).** Heavy metal content in some commonly consumed vegetables from kariakoo market, Dar es Salaam, Tanzania. *Tanzania Journal of Science*, 38(3), 201-208.

**N**

**Nadgórska-Socha, A., Kandziora-Ciupa, M., Trzęsicki, M., & Barczyk, G. (2017).** Air pollution tolerance index and heavy metal bioaccumulation in selected plant species from urban biotopes. *Chemosphere*, 183, 471-482.

**Nies, D. H. (1999).** Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(6), 730-750.

## O

**Owusu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Nielsen, D. S., Tano-Debrah, K., Glover, R. L., & Jespersen, L. (2012).** Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana. *Food Microbiology*, 32(1), 72-78.

## P

**Pan, R., Cao, L., & Zhang, R. (2009).** Combined effects of Cu, Cd, Pb, and Zn on the growth and uptake of consortium of Cu-resistant *Penicillium* sp. A1 and Cd-resistant *Fusarium* sp. A19. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1-3), 761-766.

**Piquet, M. A., Gloro, R., Justum, A. M., & Reimund, J. M. (2007).** Les probiotiques, des outils thérapeutiques pour moduler les effets biologiques de la flore intestinale : une introduction An introduction to probiotics as potential therapeutic tools. *Obésité*, 2(3), 227-233.

**Pourret, O., & Bollinger, J. C. (2018).** "Heavy metal"-What to do now: To use or not to use?. *Science of the Total Environment*, 610, 419-420.

**Prescott LM, Harley JP, et Donalds, A. (2003).** Microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition Française de Boeck Université. 128 :28-29.

## R

**Ramachandra, T. V., Sudarshan, P. B., Mahesh, M. K., & Vinay, S. (2018).** Spatial patterns of heavy metal accumulation in sediments and macrophytes of Bellandur wetland, Bangalore. *Journal of Environmental Management*, 206, 1204-1210.

**Ranathunga, L. N., & Esakkimuthu, M. (2017).** A review on toxicity of heavy metals due to intake of contaminated bovine milk. *Archives of Agriculture and Environmental Science*, 2(3), 244-246.

**Rathnayake, I. V. N., Megharaj, M., Bolan, N., & Naidu, R. (2009).** Tolerance of heavy metals by Gram positive soil bacteria. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 3(5), 270-274.

**Ren, D., Li, C., Qin, Y., Yin, R., Du, S., Ye, F., ... & Sun, Y. (2014).** In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*, 30, 1-10.

**Rhaim, N., Chahboun, N., Inekach, S., Ouhsine, M. (2016).** Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from cow milk and olives brine. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7(5), 1505-1509.

## S

- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., & Bressollier, P. (2013).** An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 1-16.
- Saidi, N., Guessas, B., Bensalah, F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D. E., ... & Kihal, M. (2002).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides. *Journal Algérien des Régions Arides*, 1, 01-11.
- Schmitz, S., & Suchodolski, J. (2016).** Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre-and synbiotics—what is the evidence?. *Veterinary Medicine and Science*, 2(2), 71-94.
- Sears, M. E. (2013).** Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification—a review. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Serrano-Nino, J. C., Solis-Pacheco, J. R., & Gutierrez-Padilla, J. A. (2016).** Isolation and identification of lactic acid bacteria from human milk with potential probiotic role. *Journal of Food and Nutrition Research*, 4(3), 170-177.
- Shehata, M. G., El Sohaimy, S. A., El-Sahn, M. A., & Youssef, M. M. (2016).** Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 65-75.
- Shrivastava, R., Upreti, R. K., & Chaturvedi, U. C. (2003).** Various cells of the immune system and intestine differ in their capacity to reduce hexavalent chromium. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 38(1), 65-70.
- Sinegani, A. A. S., & Younessi, N. (2017).** Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10, 247-255.
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
- Suciati, P., Tjahjaningsih, W., Masithah, E. D., & Pramono, H. (2015).** Aktivitas Enzimatis Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Kepiting Bakau (*Scylla spp.*) Sebagai Kandidat Probiotik.
- Syngai, G. G., Gopi, R., Bharali, R., Dey, S., Lakshmanan, G. A., & Ahmed, G. (2016).** Probiotics-the versatile functional food ingredients. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 921-933.

## T

- Tada, Y., & Inoue, T. (2000).** Use of oligotrophic bacteria for the biological monitoring of heavy metals. *Journal of applied Microbiology*, 88(1), 154-160.

**Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012).** Heavy metal toxicity and the environment. *In Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 133-164. Springer, Basel.

**Teemu, H., Seppo, S., Jussi, M., Raija, T., & Kalle, L. (2008).** Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 170-175.

**Thabuy, M. B., & Ratsimbazafy, L. (2011).** Effets des probiotiques chez les enfants prématurés. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, 14(4), 315,321.

**Tournadre, A., Tatar, Z., Coxam, V., & Soubrier, M. (2017).** Microbiote intestinal et régime alimentaire dans la polyarthrite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme Monographies*.

**Toyosi, O. M., Olubunmi, A., & Simeon, O. (2017).** Screening of Indigenous Bacterial Isolates from Dawadawa (African Locust Beans) in North Central Nigeria. *Biochemistry and Molecular Biology*, 2(6), 67.

## U

**Upreti, R. K., Sinha, V., Mishra, R., & Kannan, A. (2011).** In vitro development of resistance to arsenite and chromium-VI in Lactobacilli strains as perspective attenuation of gastrointestinal disorder. *Journal of Environmental Biology*, 32, 325-332.

## V

**Vecchio, A., Finoli, C., Di Simine, D., & Andreoni, V. (1998).** Heavy metal biosorption by bacterial cells. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 361(4), 338-342.

**Vendruscolo, F., da Rocha Ferreira, G. L., & Antoniosi Filho, N. R. (2017).** Biosorption of hexavalent chromium by microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 87-95.

**Vigneri, R., Malandrino, P., Gianì, F., Russo, M., & Vigneri, P. (2017).** Heavy metals in the volcanic environment and thyroid cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 457, 73-80.

**Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., et Giovannetti, L. (2014).** Molecular mechanisms of Cr (VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 633-659.

**Voica, D. M., Bartha, L., Banciu, H. L., & Oren, A. (2016).** Heavy metal resistance in halophilic Bacteria and Archaea. *FEMS Microbiology Letters*, 363(14).

## W

**Wang, Q. R., Cui, Y. S., Liu, X. M., Dong, Y. T., & Christie, P. (2003).** Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 38(5), 823-838.

**Wassie, M., & Wassie, T. (2016).** Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Cow Milk. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 3(8), 44-49.

**Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., & Tang, M. (2009).** Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous Materials*, 162(1), 50-56.

**Wierzba, S. (2015).** Removal of Cu (II) and Pb (II) from aqueous solutions by lactic acid bacteria. *Proceedings of ECOpole*, 9.

#### Y

**Yi, Y. J., Lim, J. M., Gu, S., Lee, W. K., Oh, E., Lee, S. M., et Oh, B. T. (2017).** Potential use of lactic acid bacteria *Leuconostoc mesenteroides* as a probiotic for the removal of Pb (II) toxicity. *Journal of Microbiology*, 55(4), 296-303.

#### Z

**Zare, E. N., Motahari, A., & Sillanpää, M. (2018).** Nanoadsorbents based on conducting polymer nanocomposites with main focus on polyaniline and its derivatives for removal of heavy metal ions/dyes: A review. *Environmental Research*, 162, 173-195.

**Zhai, Q., Yin, R., Yu, L., Wang, G., Tian, F., Yu, R., ... et Chen, W. (2015).** Screening of lactic acid bacteria with potential protective effects against cadmium toxicity. *Food Control*, 54, 23-30.

**Zoghi, A., Khosravi-Darani, K., & Sohrabvandi, S. (2014).** Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(1), 84.

# *Annexes*

**Annexe 1.** Collecte des échantillons

La niche écologique utilisée, pour l'isolement des bactéries lactiques, isolées des selles de deux nourrissons, allaités uniquement au le lait maternel, âgés respectivement de 4 et 5 mois. Ces échantillons collectés dans la wilaya de Jijel ont été acheminés directement au laboratoire et analysés le jour même.

**Annexe 2.** Les milieux de culture utilisée

- Gélose et bouillon MRS : pour la culture des bactéries lactiques.

**Annexe 3.** Produits chimiques et réactifs

- Violet de Gentiane
- Lugol
- Alcool 95%
- Fuschine
- L'huile à immersion
- HCl et NaOH
- Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )
- Nitrate de plomb ( $Pb(NO_3)_2$ )
- Dichromate de potassium ( $K_2Cr_2O_7$ )
- Dichlorure de cadmium ( $CdCl_2$ )
- Sels biliaires
- Phosphate disodique d'hydrogène ( $Na_2HPO_4$ )
- Phosphate dipotassique ( $K_2HPO_4$ )
- KCL (Chlorure de potassium) et NaCl (Chlorure de sodium)

**Annexe 4.** Appareillage et autre matériel

- Autoclave (Slli AVX électrique)
- Etuves 25°C, 30°C, 37°C, 44°C, 160°C (Mettler)
- Réfrigérateur (ENIEM)
- Bain-marie (Mettler)
- Balance analytique (Kern)
- Balance électronique (Kern EMB 600-2)
- pH mètre (Hanna)
- Vortex (VWR)
- Centrifugeuse à Eppendorf (Sigma)



- Microscope optique (Olympus)
- Cellule de Malassez
- Spectrophotomètre UV-visible (Specord 50 plus)
- Agitateur magnétique chauffant (Bunsen)

**Annexe 5.** Préparation du bouillon et gélose MRS :

<b>Composition</b>	<b>Quantité en (g/l)</b>
<b>Bouillon MRS</b>	
<b>Peptone</b>	10,0
<b>Extrait de viande de bœuf</b>	8,0
<b>Extrait de levure</b>	4,0
<b>Acétate de sodium 3 H<sub>2</sub>O</b>	5,0
<b>Phosphate dipotassique K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	2,0
<b>Citrate d'ammonium</b>	2,0
<b>Sulfate de magnésium, 7H<sub>2</sub>O</b>	0,2
<b>Sulfate de manganèse, 4H<sub>2</sub>O</b>	0,05
<b>Glucose</b>	20,0
<b>Tween 80</b>	1,0 ml
<b>Cystéine</b>	0,1
<b>Eau distillée</b>	1000 ml
<b>pH 6,2 ± 0,2</b>	Ajuster par NaOH ou HCl
<b>Gélose MRS</b>	1 litre bouillon MRS + de 15g d'agar

**Annexe 6.** Coloration de Gram, selon Prescott *et al.*, 2003 :

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

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène ;
- Couvrir le frottis par du violet de Gentiane pendant 60 secondes ;
- Ajouté du lugol pendant 30 secondes ;
- Décoloré avec l'alcool 95% ;
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- Ajouter la fuschine et laisser pendant 15 à 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope au grossissement (×100).

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

**Annexe 7** : Croissance des dix souches dans du bouillon MRS en présence de **30 mg/l** de métal incubées à **37°C** pendant **48<sup>h</sup>** :

Souche	<b>E<sub>1</sub>C</b>			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T = 0	0,394	0,422	0,390	0,398
T = 24	0,961	0,993	0,994	0,967
T = 48	1,189	1,162	1,164	1,341
Souche	<b>E<sub>1</sub>E</b>			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T = 0	0,412	0,434	0,387	0,399
T = 24	1,053	1,048	1,025	0,951
T = 48	1,193	1,162	1,175	1,114
Souche	<b>E<sub>2</sub>A</b>			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T = 0	0,251	0,099	0,117	0,192
T = 24	0,473	0,401	0,398	0,317
T = 48	0,749	0,819	0,784	0,695
Souche	<b>E<sub>2</sub>B</b>			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T = 0	0,140	0,233	0,281	0,290
T = 24	0,404	0,344	0,311	0,341
T = 48	0,773	0,787	0,722	0,681
Souche	<b>E<sub>2</sub>C</b>			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T = 0	0,146	0,110	0,196	0,048
T = 24	0,383	0,381	0,408	0,247
T = 48	0,673	0,800	0,722	0,464
Souche	<b>E<sub>2</sub>D</b>			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T = 0	0,121	0,094	0,159	0,028
T = 24	0,459	0,397	0,269	0,211
T = 48	0,839	0,813	0,741	0,363
Souche	<b>E<sub>2</sub>E<sub>1</sub></b>			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T = 0	0,266	0,182	0,122	0,026
T = 24	0,387	0,275	0,388	0,290
T = 48	0,723	0,571	0,593	0,414
Souche	<b>E<sub>2</sub>E<sub>2</sub></b>			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T = 0	0,396	0,195	0,061	0,027
T = 24	0,429	0,370	0,303	0,218
T = 48	0,797	0,794	0,796	0,363
Souche	<b>E<sub>2</sub>G</b>			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T = 0	0,442	0,405	0,367	0,367
T = 24	0,931	0,821	0,813	0,759
T = 48	1,029	0,909	0,915	0,930
Souche	<b>E<sub>2</sub>K</b>			
Métal	Témoin	Cr	Pb	Cd
T = 0	0,445	0,416	0,365	0,372
T = 24	0,541	0,451	0,404	0,383
T = 48	0,938	0,845	0,828	0,845

**Annexe 8.** Valeurs de la densité optique (**DO**) mesuré à **600nm** pour les 3 souches afin de déterminer la CMI :

Métaux Temps (h) [Me] en mg/l	Chrome (E <sub>2</sub> D)		Cadmium (E <sub>2</sub> E <sub>1</sub> )		Plomb (E <sub>2</sub> E <sub>2</sub> )	
	T <sub>0</sub>	T <sub>24</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>24</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>24</sub>
50	0,015	0,251	0,170	0,282	0,064	0,227
100	0,051	0,248	0,133	0,169	0,042	0,211
150	0,032	0,189	0,157	0,160	0,043	0,224
200	0,035	0,158	0,159	0,119	0,045	0,155
250	0,047	0,085	0,143	0,097	0,047	0,167
300	0,048	0,039	0,158	0,113	0,041	0,116
350	0,045	0,024	0,115	0,027	0,038	0,062
400	0,050	0,008	0,159	0,014	0,016	0,005

**Annexe 9.** Résultats du taux croissance des trois souches dans du bouillon MRS dépourvu et additionné de 0,3% de sels biliaries mesuré à **560nm** pendant **240<sup>min</sup>** :

Souche	E <sub>2</sub> D		E <sub>2</sub> E <sub>1</sub>		E <sub>2</sub> E <sub>2</sub>	
	T <sub>0</sub>	T <sub>240</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>240</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>240</sub>
Témoin	0,0442	0,0515	0,0703	0,0849	0,0226	0,0512
0,3%	0,1496	0,0980	0,1621	0,1356	0,0645	0,0959

**Annexe 10.** Sodium Phosphate Buffer (PBS) :

Composition	Quantité en g/l
NaCl	4,0
KCl	0,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,72
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,12
Eau distillée	500 ml
pH 7,2 ± 0,2	Ajuster par NaOH ou HCl

<b>Présidente : M<sup>me</sup> Roula Sagia</b> <b>Examinatrice : Dr. Ait Meddour Amel.</b> <b>Encadreur : Dr. Ouled Haddar Houria.</b>	<b>Présenté par :</b> <b>M<sup>elle</sup> Kemih Ahlam.</b> <b>M<sup>elle</sup> Kerrouche Amel.</b>
<b>Evaluation de quelques propriétés probiotiques des bactéries lactiques tolérantes aux métaux lourds isolées de la microflore intestinale des nourrissons</b>	
<b>Résumé</b>	
<p>Notre travail s'articule principalement sur l'isolement, à partir des selles des nourrissons, de bactéries lactiques au pouvoir probiotique ayant la capacité à résister aux métaux lourds. Dix souches ont été testées sur leur aptitude à tolérer trois métaux lourds notamment le Cr, Cd et Pb. Seulement trois d'entre elles ont été retenues après avoir étudié leur cinétique de croissance au fil du temps pour être tester pour leur pouvoir de croissance en présence de différentes concentrations de ces métaux, ainsi que leur habilité à résister aux conditions hostiles du tractus digestif. Les résultats obtenus ont montré une bonne capacité de résistance des souches <i>Lactobacillus sp.</i> (E<sub>2</sub>D), <i>Leuconostoc sp.</i> (E<sub>2</sub>E<sub>1</sub>) et <i>Leuconostoc sp.</i> (E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>), Cr &lt;300 mg/l, Cd &lt;200mg/l et Pb &lt;400mg/l, respectivement, mais aussi à l'acidité et aux sels biliaires. Ceci nous a permis de les classer parmi les microorganismes pouvant être utilisés dans la désintoxication du corps humain et de divers aliments.</p>	
<b>Mots clés :</b> bactéries lactiques, probiotique, métaux lourds, résistance, désintoxification.	
<b>Abstract</b>	
<p>Our work articulates mainly on isolating from the feaces on infants, probiotic lactic acid bacteria having the ability to resist heavy metals. Ten strains were tested on their capacity to tolerate three heavy metals, in particular Cr, Cd and Pb. Only three of them were retained after analyzing their growth kinetics over time, to test their growth potential in presence of different concentrations of these metals, as well as their capacity to withstand hostile conditions of the digestive tract. The obtained results showed a good resistance of <i>Lactobacillus sp.</i> (E<sub>2</sub>D), <i>Leuconostoc sp.</i> (E<sub>2</sub>E<sub>1</sub>) and <i>Leuconostoc sp.</i> (E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>), Cr &lt;300mg/l, Cd &lt;200mg/l and Pb &lt;400mg/l, respectively, and also to acidity and bile salts. This work allowed us to classify them among microorganisms being able to be used in the detoxification of the human body and various food.</p>	
<b>Key words:</b> Lactic acid bacteria, probiotic, heavy metals, resistance, detoxification.	
<b>المخلص</b>	
<p>يرتكز عملنا أساسا على عزل البكتيريا اللبنية ذات الخصائص البروبيوتيكية من براز الرضع، و القدرة على مقاومة المعادن الثقيلة. تم اختبار عشر سلالات من البكتيريا اللبنية لقدرتها على مقاومة ثلاثة معادن خاصة الكروم، الكاديوم والرصاص. بعد الدراسة الحركية لهذه السلالات تم اختيار ثلاث سلالات فقط لاختبار قدرتها على النمو في وجود تراكيز مختلفة من هذه المعادن وأيضا قدرتها على مقاومة الظروف الموجودة في الجهاز الهضمي. وقد أظهرت النتائج أن السلالات <i>Lactobacillus sp.</i> (E<sub>2</sub>D)، <i>Leuconostoc sp.</i> (E<sub>2</sub>E<sub>1</sub>) و <i>Leuconostoc sp.</i> (E<sub>2</sub>E<sub>2</sub>) لها قدرة معتبرة من جهة على مقاومة &gt;300 ملغ/ل من الكروم، &gt;200 ملغ/ل من الكاديوم و &gt;400 ملغ/ل من الرصاص على الترتيب، وكذلك على مقاومة الحموضة والأملاح الصفراوية وهذا ما يسمح لنا بتصنيفها من بين الكائنات الحية الدقيقة التي يمكن استخدامها لإزالة السموم من جسم الإنسان وكذلك الأطعمة المختلفة.</p>	
<p style="text-align: center;"><b>الكلمات المفتاحية:</b> بكتيريا حمض اللبن، البروبيوتيك، المعادن الثقيل، مقاومة، نزع السمية.</p>	