الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية وزارة التعليم العالى و البحث العلمى

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحى- جيجل

Université Mohammed Seddik Benyahia-Jijel-

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



كلية علوم الطبيعة و الحياة نسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و علوم التغذية

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Biologie **Option** : Microbiologie Appliquée



Influence de quelques facteurs sur le pouvoir adhésif d'une Souche de *Lactobacillus* d'origine laitière.

Membre de Jury:

Présidente : M^{me} .Roula Moussoui S.

Examinateur: Pr. Sifour M.

Encadreur: Mr. Khennouf T.

Présenté Par :

M^{elle} Abdelli Nadjet.

M^{elle} Aloui Wafa.

Melle Siffour Samia.

Année universitaire 2016-2017

No	D	'ordre	:			 	 • • • •	
1	$\boldsymbol{\nu}$	orure	• • •	• • • •	• • • •	 	 • • • •	• •

Remerciements



Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciements :

Au début et avant tout, le remerciement et louange à «Allah» le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail, Pour être bénéficié et bénéficier.

A cette occasion, nous remercions notre encadreur **Mr Khennouf Tarek**, qui a sacrifié de son temps afin de nous soutenir et nous guider pour pouvoir réaliser ce travail, par ce que grâce à vous et votre assurance qu'on a pu atteindre notre but.

Nous remercions également M^{me} **Roula Sajia** d'avoir accepté de présider le jury. Nous remercions **Professeur Sifour Mohemmed**, de biens vouloir évaluer et examiner ce mémoire.

A nos parents, en témoignage de notre gratitude pour leur écoute, leur soutien et leurs encouragements dans les moments difficiles, sans vous rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien et votre amour.

A nos amis, merci pour vos encouragements.

Nous remercions toute personne ayant contribué de prés ou de loin à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous.

Nadjet Samia Wafa



Table des matières

		Pages
	Liste des abréviations	i
	Liste des figures	ii
	Liste des tableaux	iii
	Introduction	1
	Synthèse bibliographique	
	Chapitre I : Les bactéries lactiques	
I.1.	Historique et Définition	2
I.2.	Habitat et origine des bactéries lactiques	2
I.3.	Les Caractéristiques générales	2
I.4.	Taxonomie, Classification et phylogénie	4
I.5.	Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	4
I.5.1.	Le genre Lactobacillus	4
I.6.	Les domaines d'applications des bactéries lactiques	6
I.6.1	L'utilisation des bactéries lactiques dans le domaine alimentaire	6
I.6.2	Dans le domaine de la santé	6
	Chapitre II : Les probiotiques	
II.1.	Historique de la définition des probiotiques	8
II.2.	Principales souches microbiennes au potentiel probiotiques	9
II.3.	Les critères de sélection des probiotiques	10
II.4.	Les mécanismes d'actions des probiotiques	10
II.5.	Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé	11
II.5.1.	Amélioration de la digestion du lactose	11
II.5.2.	Diminution d'allergie alimentaire	11
II.5.3.	Réduction du risque de diarrhée	11
II.5.4.	Diminution de cholestérol sanguin.	12
II.5.5.	Prévention du cancer du côlon et autre cancers	12
II.5.6.	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	12
	Partie Expérimentale	
	Chapitre III : Matériel et méthodes	
III.1.	Matériels	13
III.1.1.	Les souches bactériennes testées.	13
III.1.2.	Les cellules épithéliales intestinales	13
III.1.3.	Les milieux de cultures, les tampons, les produits chimiques et les	

	réactifs	13		
III.1.4.	Appareillage	14		
III.2.	Méthodes			
III.2.1.	Revivification et vérification de la pureté des souches	14		
III.2.2.	Test d'hydrophobicité	15		
III.2.3.	Test d'auto-agrégation	15		
III.2.4.	Adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales	16		
III.2.4.1.	Préparation des cellules épithéliales	16		
III.2.4.2.	Préparation des bactéries lactiques	16		
III.2.4.3.	Adhésion	16		
	Chapitre IV : Résultats et Discussion			
IV.1.	L'hydrophobicité, l'auto-agrégation et l'adhésion de la souche du genre			
	Lactobacillus BC12.	17		
IV.1.1.	L'hydrophobicité	17		
IV.1.1.1.	L'effet de pH	17		
IV.1.1.2.	L'effet des sucres.	19		
IV.1.1.3.	L'effet de CaCl ₂ , EDTA et Trypsine	20		
IV.1.2.	L'auto-agrégation	21		
IV.1.2.1.	L'effet de pH	21		
IV.1.2.2.	L'effet des sucres	22		
IV.1.2.3.	L'effet de CaCl ₂ , EDTA et Trypsine	23		
IV.1.3.	L'adhésion.	24		
IV.1.3.1.	L'effet de pH.	25		
IV.1.3.2.	L'effet des sucres.	26		
IV.1.3.3.	L'effet CaCl ₂ , EDTA etTrypsine.	27		
	Conclusion.	28		
	Références bibliographiques	29		
	Annexe			

Liste des abréviations

LAB: Lactic Acid Bacteria.

GRAS: Generally Recognized As Safe

EMP: Embden Meyerhof Parnas.

FAO: Food and Agriculture Organization.

FDA: Food and Drug Administration

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

ISAPP: International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics.

GIT: Tractus Gastro-Intestinal.

AAD: Diarrhées Associées aux Antibiotiques.

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin.

WHO:world health organization.

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique.

MRS: Gélose de Man, Rogosa, Sharpe.

PBS: Tampon Phosphate Salin.

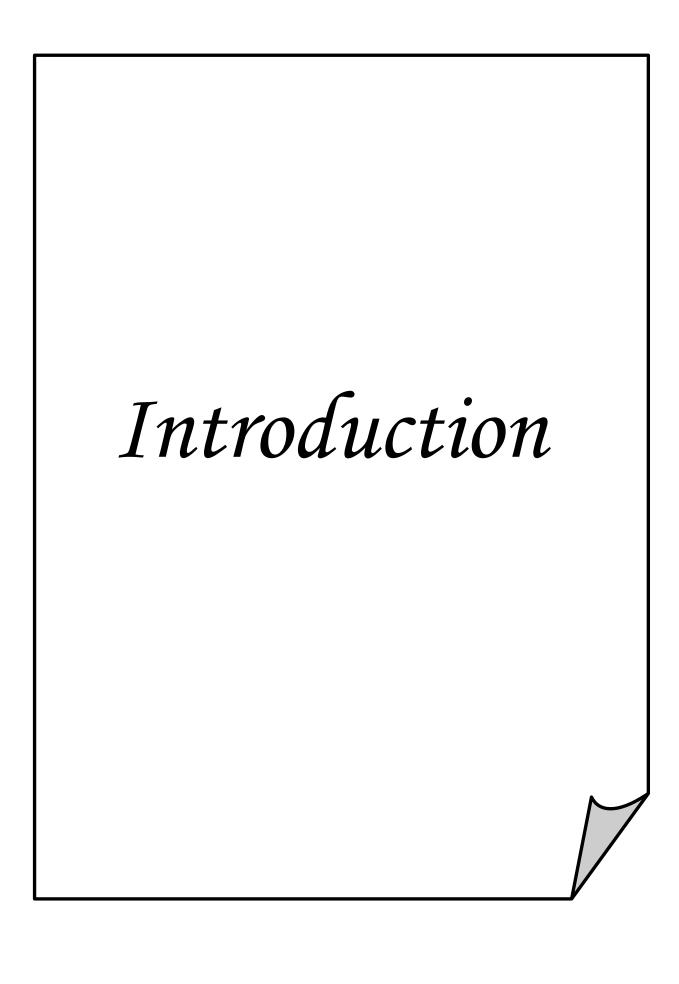
H%: Pourcentage d'hydrophobicité.

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Dégradation du glucose par les bacéries lactiques	2
Figure 2	Principaux critères de sélection des probiotiques	10
Figure 3	Pourcentages d'hydrophobicité de la souche Lactobacillus sp BC12 a	
	différents pH	18
Figure 4	Pourcentages d'hydrophobicité de la souche Lactobacillus sp BC12 a	
	différents sucres	19
Figure 5	Pourcentages d'hydrophobicité de la souche Lactobacillus sp BC12	
	aux CaCl ₂ , EDTA, Trypsine	21
Figure 6	Pourcentages d'auto-agrégation de la souche Lactobacillus sp BC12	
	a différents pH	22
Figure 7	Pourcentages d'auto-agrégation de la souche Lactobacillus sp BC12	
	a différents sucres	23
Figure 8	Pourcentages d'auto-agrégation de la souche Lactobacillus sp BC12	
	aux CaCl ₂ , EDTA, Trypsine	24
Figure 9	Photo-microscopique des cellules épithéliales	25
Figure 10	Photo-microscopique de l'effet du pH sur l'adhésion de la souche	
	Lactobacillus sp BC12 aux cellules épithéliales	26
Figure 11	Photo-microscopique de l'effet des sucres sur l'adhésion de la	
	Souche Lactobacillus sp BC12 aux cellules épithéliales	27
Figure 12	Photo-microscopique de l'effet de CaCl ₂ , EDTA et Trypsine sur	
	l'adhésion de la souche Lactobacillus sp BC12 aux cellules	
	épithéliales	28

Liste des tableaux

Numéro	Titre			
Tableau 1	Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales			
	caractéristiques	5		
Tableau 2	Une brève histoire des probiotiques	8		
Tableau 3	Les microorganismes les plus utilisées pour leurs effets probiotiques.	9		



Le terme bactérie lactique (LAB) a été progressivement accepté au début du 20 ème siècle (**khalid**, **2011**). Par leurs propriétés acidifiantes, aromatisantes et texturantes sont largement utilisées dans les produits dérivés du lait et leurs propriétés pro-biotiques elles sont très utiles à la santé, en effet, elles améliorent les fonctions digestives et ont un effet très positif sur la microflore intestinale (**Lairini** et *al*, **2014**).

Certaines souches spécifiques de bactéries lactiques en particulier de *Lactobacillus* et de genre *Bifidobacterium* sont reconnues comme probiotiques (**Wyszynska et al, 2015**).

Les probiotiques, généralement définis comme des micro-organismes vivants présentant des caractéristiques bénéfiques différentes, sont de plus en plus acceptés comme une mesure prophylactique alternative pour les humains et les animaux, soit pour traiter des maladies pathogènes, soit pour être utilisés dans des traitements préventifs (Lauzon et al ,2014).

La capacité d'adhésion aux cellules épithéliales et aux surfaces muqueuses pour réduire ou prévenir la colonisation de pathogènes est considérée comme un critère de sélection principal de nombreuses souches bactériennes à potentiel probiotiques. (Li et al, 2015). Les caractéristiques physicochimiques de la surface cellulaire telles que l'hydrophobicité et l'auto-agrégation sont dues en grandes partie à la nature des composés présents à sa surface cellulaire utiles pour l'adhésion) (Del Re et al, 2000). La capacité d'auto-agrégation et d'hydrophobicité des bactéries sont deux caractères indépendants, et leur détermination a été proposée comme une méthode indirecte pour l'évaluation de la capacité d'adhésion des bactéries (Deepika et al, 2009).

L'objectif de cette étude est de répondre à la problématique qui a comme intitulé : influence de quelques conditions de cultures sur le pouvoir adhésif de certaines souches de *Lactobacillus* d'origine laitière où nous avons étudié la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales de poulet, d'hydrophobicité, et l'auto-agrégation de la souche *Lactobacillus* sp BC12 dans différentes conditions : différents pH, en présence de différents sucres (galactose, lactose, maltose, fructose), EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique), CaCl₂ et en présence de l'enzyme (trypsine).

Synthèse Bibliographique

I.1 Historique et Définition :

D'après l'étude de L. Pasteur sur la fermentation lactique (entre 1857et 1863), la première culture pure d'une bactérie lactique *Bacterium Lactis* a été obtenue par J. Lister. En 1890, les ferments lactiques ont été introduits pour la production de lait caillé et de fromage, alors que les aliments fermentés ont été utilisés par l'Homme depuis plus de 5000 ans, donc traditionnellement appliquée dans les produits laitiers industriels et autres fermentations alimentaires (**König et Fröhlich, 2009**). Au début du siècle XXe, la première monographie de Orla-Jensen apparue en 1919 qui servir dans la classification actuelle des bactéries lactiques et reste remarquablement inchangée (**Sutra et al, 1998**). Elles constituent un groupe hétérogène de bactéries à Gram positif unis par des caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques (**Axelsson, 2004**).

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents. Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés et dans la production de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut comme inoffensives GRAS (Salvucci et al, 2016; Yang et al, 2012). Historiquement les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* forment le noyau du groupe. Leur principale caractéristique est la production d'acide lactique comme un produit majeur du catabolisme du glucose par un métabolisme exclusivement fermentaire et qui

accentuer à faire l'objet d'un intérêt considérable (**Dortu et Thonart, 2009**).

I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont ubiquitaires, très répandue dans l'environnement. Elles occupent de niches écologiques variées et généralement associées à des matières premières y compris le lait et les produits laitiers, les légumes et les plantes, les céréales, la viande, les poissons et les produits carnés. Certaines espèces se développent également dans les voies respiratoires intestinales et génitales humaines et animales (Wassie et Wassie, 2016; Rahman et al, 2016).

I.3. Les Caractéristiques générales :

- ❖ Les bactéries lactiques sont habituellement décrites comme des micro-organismes ayant comme propriété commune un métabolisme exclusivement fermentaire et acido-tolérantes (Ladha et Jeevaratnam, 2016).
- ❖ Elles sont généralement considérées comme sûrs (GRAS) reconnues par leur application dans le secteur alimentaire et de la santé (**Zamfir et** *al*, **2014**).
- ❖ Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes à Gram positif de forme coque, bacille ou coccobacille, généralement immobiles, non sporulantes, anaérobies ou aérotolérantes, catalase négative, dépourvues de

- cytochrome oxydase et nitrate réductase, ont moins de 50 % de contenu G+C dans leur ADN. Ces bactéries ont des besoins nutritionnels complexes en glucides, en acides gras, en acides aminés et en vitamines (**Pot, 2008**; **Ismaili et** *al***, 2016** ; **Khalid, 2011**).
- ❖ Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. Elles sont subdivisées en deux groupes en fonction de leur métabolisme des glucides (Khalid, 2011). Les bactéries lactiques homo-fermentaires produisant seul l'acide lactique en fermentent les sucres par la voie de glycolyse Embden Meyer Hoff Parnas (EMP) en pyruvate, qui est convertis par la suite en acide lactique par l'enzyme lactate déshydrogénase. Les principales bactéries homo-fermentaires appartiennent au genre Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Enterococcus et certaines espèces de Lactobacillus (Saeed et al, 2014). Les bactéries lactiques hétéro-fermentaires (Leuconostoc, Oenococcus et certains Lactobacillus) fermentent les sucres par la voie des pentosesphosphate et produisent l'acide lactique et en même temps que d'autres composés comme l'acétate, l'éthanol et le dioxyde de carbone (Pessione, 2012). Le rendement énergétique est différent selon la voie homofermentaire ou voie hétérofermentaire (Fugelsang et Edwards, 2006).

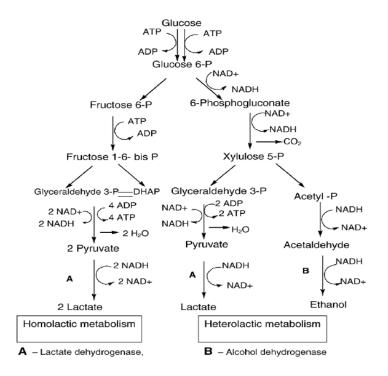


Figure 1: Dégradation du glucose par les bacéries lactiques (Reddy et al, 2008).

I.4. Taxonomie, Classification et Phylogénie :

Le concept de bactérie lactique comme groupe des micro-organismes date de 1900. Ce groupe est caractérisé par un ensemble des caractéristiques phénotypiques et phylogénétiques communes, et avec une composition de base de l'ADN de moins de 50 % de G + C (Vandamme et al, 2014). La classification classique est basée sue les caractéristiques morphologiques (cocci ou bacille) et physiologiques (fermentation, température de croissance, pH, dégradation des sucres). Mais actuellement les méthodes moléculaires sont devenu plus importantes et qui conduisent à des changements remarquables dans la classification des bactéries lactiques (Alexandre et al, 2008). Les bactéries lactiques appartenant aux deux phylums distincts, à savoir Firmicutes et Actinobacteria (Sun et al, 2014). Les familles appartenant au le phylum des Firmicutes sont : Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae et Streptococcaceae où les genres les plus importants sont: Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus et Weissella, qui appartiennent tous à l'ordre des Lactobacillales et la classe des Bacilli. Dans le phylum Actinobacteria (G+C %≥ 50), on trouve le genre Bifidobacterium (Pot, 2008).

I.5. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques regroupent 13 genres dont les plus étudiés sont : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Béfidobactérium*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium*. (Mourad et al, 2015).

I.5.1. Le genre *Lactobacillus* :

Le genre *Lactobacillus* représente le plus large groupe des bactéries lactiques. Il contient un grand nombre d'espèces qui peuvent être isolées de différents biotopes (produits laitiers, humain, plantes...etc.) (**Savadogo et Traore, 2011**), Avec des aspects variés allant du bacille long et fin ou coccobacille, Gram positif, non sporulées. Les cellules sont généralement immobiles, homo-ou hétérofermentaire, acidophiles et peuvent croitre à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C (**Salvetti et al, 2012**). *Lactobacillus* a été utilisés pour la production alimentaire et contribuer à la fermentation d'une majorité des aliments fermentés (**Zheng et al, 2015**). Les lactobacilles sont divisés en trois groupes selon leurs types de fermentation :

- **Groupe A:** lactobacilles homofermentatifs obligatoires. Les hexoses sont Presque exclusivement (> 85%) fermentés à l'acide lactique par l'EMP.
- **Groupe B:** lactobacilles facultativement hétérofermentaires. Les hexoses sont Presque exclusivement fermentés à l'acide lactique par la voie EMP.

• **Groupe C:** lactobacilles hétérofermentaires obligatoires. Les hexoses sont fermentés par la voie phosphogluconate produisant du lactate, de l'éthanol (Acide acétique) et de CO₂ en quantités équimolaires (**Pilet et al, 2005**).

Les caractéristiques des autres genres sont mentionnées dans le tableau 1.

Tableau 1: les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Pilet et al, 2005 ; Vorobjeva, 1999).

Genre	Caractéristiques principaux	Fermentation	Habitats
Streptococcus	Cocci, sphérique ou ovoïde, regroupées en paire ou en chainette de 0,5-1,5 µm de taille, thermophiles	homofermentaire	Produits laitiers
Lactococcus	streptocoques du groupe N, coque, disposées en paires ou en chaînettes, mésophiles	homofermentaire	Produits laitiers, végétaux
Bifidobacterium	Forme irrégulière (V ou Y), mésophiles	hétérofermentaire	Intestin de l'homme et des animaux
Leuconostoc	coques ovoïdes ou sphériques, généralement en paires ou en chaînes courtes, mésophiles	hétérofermentaire	Produits végétaux, Produits laitiers
Pediococcus	coques sphériques sous forme de tétrade de diamètre compris entre 0,6 et 1,0 µm, mésophiles	homofermentaire	Bière, produits végétaux, saucissons
Carnobacterium	bacilles minces, mobiles ou immobiles, isolées ou groupées par deux ou en court chaine, psycrophiles et psycrotopes	hétérofermentaire	Produits carnés, poissons, produits laitiers
Propionibacterium petites bâtonnets irrégulières, coccoïde de 1.5 μm de long, regroupées en masse, psychrotolérants		Hétérofermentaire (production de l'acide propionique)	produits laitiers, la peau, les muqueuses

I.6. Les domaines d'applications des bactéries lactiques :

En raison de leur capacité à préserver les aliments et de promouvoir leur santé, la demande de bactéries productrices d'acide lactique (LAB) est augmentée dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et chimiques (**Vijayakumar et** *al*, **2015**).

I.6.1. L'utilisation des bactéries lactiques dans le domaine alimentaire :

Les bactéries lactiques sont des auxiliaires de fabrication alimentaire, que ce soit dans les produits laitiers (yaourt, fromages), certains produits végétaux (choucroute) ou produits carnés (saucissons). (Liu et al, 2011). Elles élaborent lors de la fermentation des glucides, l'acide lactique qui réduit le pH du milieu. Cette acidification contribue aussi à la saveur des aliments (Lazzi et al, 2016). Les bactéries lactiques occupent un rôle important dans la préservation de la qualité nutritive des aliments grâce à la biosynthèse de divers métabolites ayant des activités antimicrobiennes, y compris les acides organiques (diacétyl, acétoïne) (Özcelik et al, 2016; Mayo et al, 2010), les bactériocines et le peroxyde d'hydrogène (Avaiyarasi et al, 2016) ces derniers ont un effet inhibiteur sur certains flores d'altérations pour cette raison ils sont employé comme des additifs naturels dans les aliments (Woraprayote et al, 2016), aussi les exopolysaccharides comme des agents stabilisants et texturants (Buldo et al, 2016). Certains de ces bactéries sont capables de produire des composés aromatiques tels que les acides gras et les acides aminés qui participent aux qualités organoleptiques des produits alimentaires (Cappello et al, 2016).

I.6.2. Dans le domaine de la santé :

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du XXe siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff (**Behnsen et** *al*, **2013**).

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe des organismes probiotiques industriellement importants reconnus pour leur capacité fermentative, et leurs effets bénéfiques pour la santé du consommateur en inhibant la croissance des bactéries nuisibles et pathogènes telles que Salmonella typhimurium, Helicobacter pylori et Escherichia coli, Listeria, Staphylococcus, Clostridium et Bacillus spp en stimulant la fonction immunitaire au niveau intestinal et systémique et en augmentant la résistance aux infections (Kasra-Kermanshahi et Mobarak-Qamsari, 2015; Cuvas-Limón et al, 2016).

Aujourd'hui, Les bactéries lactiques peuvent avoir une application potentielle dans le traitement biomédical. Certaines des utilisations sont la synthèse de produits chimiques, les exopolysaccharides, vitamines, produits pharmaceutiques (Vaccins) sucres hypocaloriques, la réduction du risque de diarrhée, l'activité antifongique, une activité antimutagène, l'amélioration de

la dégestion du lactose, la prévention du cancer du côlon et diminution des concentrations sériques de cholestérol (Jagadeesh, 2015 ; Mattu et Chauhan, 2013).

II.1. Historique de la définition des probiotiques

Il y a un siècle, Elie Metchnikoff (microbiologiste russe, élève de Louis Pasteur et lauréat du prix Nobel et grâce à ses travaux sur le bénéfice santé des laits fermentés et leur composés actifs « les bactéries lactiques » qui sont considérés comme pionniers dans l'histoire des probiotiques, a postulé que la consommation de yogourt bulgare favorise la bonne santé (Butel, 2014). Une recherche de Tissier en 1900 sur l'importance des bifidobactéries dans l'intestin des nourrissons permette à Metechinkoff d'expliqué la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour moduler la microflore intestinale dans nos corps et de remplacer les microbes nuisibles par des microbes utiles ou bénéfiques (Kaur et al, 2012). Le terme probiotique est dérivé du mot grec « pro bios » qui signifier littéralement « en faveur de la vie », par opposition aux effets des antibiotiques, ce terme a été utilisé la première fois en 1965 par Lilly et Stillwell pour décrire des substances sécrétées par un organisme qui stimulent la croissance d'un autre. Depuis ce temps, la définition du terme probiotique a été modifiée à plusieurs reprises jusqu'à 2002 où Food and Agriculture Organization (FAO) et l'OMS ont adopté la définition suivante : « des micro-organismes vivants qui l'lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère » (FAO/OMS, 2002).

Tableau 2: Une brève histoire des probiotiques.

Auteur, Année	Contribution	Référence	
Elie Metchnikoff, 1907	Ayant suggéré que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes accroît la longévité.	(Butel, 2014)	
Henry Tissier, 1900	Le premier qui est isolé les bifidobactéries à partir de l'intestin des nourrissons.	(Chong, 2014)	
Lilly et Stillwell ,1965	Ont proposé une des premières définitions : « Facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes ».	Gasbarrini et al, 2016)	
Parker, 1974	Élargit la définition des probiotiques par « Organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ».	(Taibi et Comelli, 2014)	
Roy Fuller, 1989	A redéfini les probiotiques par « Supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ».	(Iyer et <i>al</i> , 2011)	

FAO/OMS, 2002	Définit les probiotiques comme étant « des microorganismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte ».	` /
International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics(ISAPP),2014	« Des microorganismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte ».	(Raman et <i>al</i> , 2015)

II.2. Principales souches microbiennes au potentiel probiotiques :

La plupart des microorganismes employés comme probiotiques sont cités dans le tableau 3.

Les probiotiques incluent différentes espèces bactériennes dont les plus couramment utilisés appartiennent aux bactéries lactiques y compris les espèces *Lactobacillus*, *Bifidobactirium* et *Enterococcus* (**Kumar et Kumar**, **2015**). Ces organismes peuvent jouer un double rôle comme agents de la fermentation alimentaire et comme agents bénéfiques pour la santé (**Lawande**, **2012**). D'autres microorganismes conne des espèces d'*Aspergillus*, *Propionibacterium*, *Sacharomyces*, *E.coli*, *Clustridium butyricum*, ont démontré des propriétés probiotiques (**Song et al, 2012**).

Tableau 3: Les microorganismes les plus utilisées pour leurs effets probiotiques (Foligné et al, 2013; Stefan et al, 2014).

Microorganismes	Genre	Espèces
Lactobacilles	Lactobacillus	L. acidophilus, L. amylovorus, L. brevis, L. bulgaricus, L. casei, L. crispatus, L. delbrueckii spp. Bulgaricus, L. fermentum, L. gallinaruma, L. gasseri, L. helveticus, L. johnsonii, L. lactis, L. reuteri, L paracasei, L. plantarum, L. rhamnosus, L. salivarius.
Bifidobacteries	Bifidobacterium	B. adolescentis, B. animalisc, B. bifidum, B. breve, B. essensis, B. infantis, B. laterosporus, B. longum.
Autres bactéries Lactique	Streptococcus Lactococcus Leuconostoc Pediococcus Enterococcus	S. salivarius sub sp. S. thermophilus, L. lactis, L. mesenteroides, P. pentosaceus, P. acidilactici E. faecalis, E. faecium
Autres Microorganismes	Propionibacterium Bacillus Escherichia Sporolactobacillus Saccharomyces Clostridium	P. acidipropionici, P. freudenreichii, P. jensenii, B. alcalophilus, B. cereus, B. clausii, B. coagulans, B. subtilis E. coli S. inulinus S. cerevisiae (boulardii) Clostridium butyricum

II.3. Les Critères de sélection des probiotiques :

Une souche au potentielle probiotique devrait avoir plusieurs propriétés souhaitables pour exercer ses effets bénéfiques. Il été rapporté que les critères de base pour les souches de microorganismes à utiliser comme probiotiques sont les suivants :

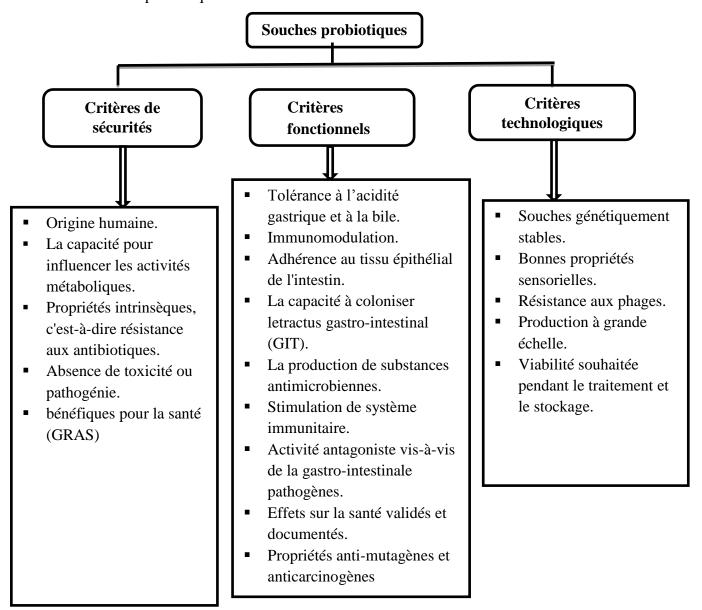


Figure 3 : Principaux critères de sélection des probiotiques (Wedajo, 2015 ; Mehrabani et al, 2014 ; Feng et al, 2017).

II.4. Les mécanismes d'actions des probiotiques :

Les probiotiques sont des microorganismes qui lorsque pris en quantité suffisante apporte un bénéfique à l'hôte (Gogineni et al, 2013). Dans des études antérieures sur les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé, en particuliers dans le domaine de défense de divers troubles de la muqueuse humaine, ont démontré un certain degré de potentiel pour renforcer l'intégralité de

l'épithélium intestinal et comme options thérapeutiques pour guérir d'une variété de maladies (Gayathri et Rashmi, 2017), mais la plupart des mécanismes responsable de ces effets n'ont pas encore été entièrement élucidés.

Plusieurs mécanismes d'action des probiotiques importants et sous-jacents ont des effets antagonistes sur divers microorganismes (Banerjee et Kumar Ray, 2017), parmi ces propriétés: l'adhérence compétitive à la muqueuse et à l'épithélium, production des substances antimicrobiennes, modulation du système immunitaire, renforcement de la barrière épithéliale de l'intestin et la dégradation ou la neutralisation des toxines. Il existe 3 mécanismes généraux par lesquels les probiotiques semblent exercer leur effets bénéfiques, avec des différences importantes observées entre les espèces probiotiques et les souches (Patel et DuPont, 2015):

- La concurrence pour l'adhésion avec les pathogènes ;
- Production des substances antimicrobiennes ;
- Modulation du système immunitaire.

II.5. Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé :

II.5.1. Amélioration de la digestion du lactose :

L'intolérance au lactose signifie que le système digestif est incapable de dégrader le lactose le principal glucide du lait. Celle-ci est la conséquence d'un défaut de synthèse de lactase, l'enzyme digestive du lactose produite par les cellules de la paroi intérieure de l'intestin grêle (**Burgain et al, 2012**). De multiples travaux ont montré que la lactase de certaines bactéries lactiques participe à la digestion du lactose dans l'intestin (**Martinez et al, 2011**), le remplacement du lait par le yaourt conduit à une meilleure absorption et à une meilleure tolérance du lactose chez les sujets présentant une intolérance au lactose (**Ibarra et al, 2012**).

II.5.2. Diminution d'allergie alimentaire:

L'allergie alimentaire est une réaction du système immunitaire qui se produit peu de temps après avoir consommé une certaine nourriture (Allen et Koplin, 2016). Les probiotiques ont été proposés comme un nouveau procédé préventif ou thérapeutique pour les maladies immunologiques par leur capacité à moduler l'allergie intestinale en raison de leur aptitude à modifier la microflore intestinale, réduisent le passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale et stimulent le système immunitaire (Huange et al, 2016).

II.5.3. Réduction du risque de diarrhée :

La diarrhée infectieuse est un problème de santé mondial majeur, responsable de plusieurs millions de décès chaque année (**Verma et** *al***, 2016**). Il existe plusieurs types comme celle causée par les rotavirus (**Prasetyo et** *al***, 2015**).

Les probiotiques constituent un important moyen de réduire ces problèmes, par l'utilisation de plusieurs espèces comme: Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophillus, Bifidobacterium bifidus, qui ils capables de diminuer le temps des diarrhées (O'Grady B et Gibson, 2005). Par ailleurs, les traitements antibiotiques perturbent l'équilibre au sein de la flore intestinale, ce qui induit des diarrhées qui sont associées à l'émergence de pathogènes tels que Clostridium difficlile. Néanmoins, l'usage des probiotiques pendant l'administration d'antibiotiques peut réduire l'effet de cette diarrhée (Varughese et al, 2013).

II.5.4. Diminution de cholestérol sanguin :

La concentration du cholestérol sérique est le facteur majeur dans les maladies cardiaques. Une alimentation à base de lait fermenté supplémenté de probiotique administrée à des personne souffrant d'hypercholestérolémie a pour résultant la diminution de la concentration du cholestérol (Thushara et al, 2016). Lactobacillus acidophilus est connue par son utilisation du cholestérol durant sa croissance (Ishimwe et al, 2015; Miremadi et al, 2014).

II.5.5. Prévention du cancer du côlon et autre cancer :

La flore intestinale et le système immunitaire jouent un rôle dans la cancérogenèse colique, ces deux paramètres peuvent être eux-mêmes modulés par des probiotiques (**Kumar et al, 2015**). Plusieurs études ont montré que certains probiotiques modifient les activités métaboliques de la microflore intestinale et l'état physicochimique du côlon, en éliminant les carcinogènes, en produisant des substances anti-tumorigènes ou anti-mutagènes, en augmentant l'immunité de l'hôte et en empêchant la croissance d'autres souches qui transforment les procancérogenèses en cancérogenèses (**Sadeghi-Aliabadi et al, 2014**).

II.5.6. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin :

Le terme de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) est une appellation générale désignant un ensemble de lésions inflammatoires chroniques, d'étiologie inconnue, atteignant le tractus digestif tels que la maladie de Crohn et Colite ulcéreuse (Cummins et Crean, 2017). Dans une étude, l'ingestion de *Lactobacillus GG* entraîne une amélioration notable de l'état clinique chez des enfants souffrant de l'inflammation par la modulation de la flore intestinale et la stimulation du système immunitaire (Bruzzese et al, 2014; Wang et al, 2014).

Partie Expérimentale

Matériels et Méthodes

III. Matériels et méthodes :

Les démarches expérimentales de notre travail ont été réalisées au sein du Laboratoire de Microbiologie, de la faculté des sciences de la Nature et de la Vie à l'Université de Mohammed Seddik Ben Yahia - Jijel.

L'objectif de ce travail est l'étude de la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales de poulet, d'hydrophobicité, et l'auto-agrégation de la souche *Lactobacillus* sp BC12 dans différentes conditions : différents pH, en présence de différents sucres (galactose, lactose, maltose, fructose), EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique), CaCl₂ et en présence de l'enzyme (trypsine).

III .1. Matériels :

Pour la réalisation de différentes parties expérimentales, on s'est servi du matériel suivant :

III.1.1. Les souches bactériennes testées :

Dans ce travail une souche de bactérie lactique du genre *Lactobacillus* laitière a été utilisée dont elle est codée BC12 fournir par Mr Khennouf Tarek. Elle a été isolée et identifiée à partir du lait de chèvre. Cette souche a été conservée à -20 °C dans le bouillon MRS (Man, Rogosa, Sharpe), supplémenté de glycérol (20% v/v) jusqu'à l'utilisation.

III.1.2. Les cellules épithéliales intestinales :

Pour étudier la capacité d'adhésion *in vitro* du *Lactobacillus* sp BC12 aux cellules épithéliales, nous avons utilisé les tissus épithéliaux du tube digestif du poulet.

III.1.3. Les milieux de cultures, les tampons, les produits chimiques et les réactifs :

Au cours de cette étude expérimentale, nous avons utilisé ce qui suit :

Les milieux de cultures :

Bouillon MRS; préparé au laboratoire pour la culture des bactéries lactiques.

Les tampons :

- Tampon PBS « tampon phosphate salin » pH 7.4, préparé au laboratoire pour le lavage et la conservation des cellules bactériennes et pour la réalisation des tests d'auto-agrégation, d'hydrophobicité et d'adhésion.
- Tampon PBS pH 4, 5 et 8, préparé au laboratoire pour la réalisation de test de tolérance aux conditions acides et basiques.

Les solutions :

Galactose (50mM), Lactose (50mM), Maltose (50mM), Fructose (50mM), EDTA (50mM), CaCl₂ (50mM).

Les produits chimiques et les réactifs :

• Colorants : violet de Gentianes ; fuschine ; lugol ; alcool (pour la coloration de Gram) ; cristal de violet (pour la coloration des cellules épithéliales dans le test d'adhésion).

- Enzymes: l'enzyme utilisée dans cette étude est latrypsine (1mg/ml).
- **Produits chimiques :** HCl 1N et la soude (NaOH) 1N (pour l'ajustement du pH) xylène, chloroforme, acétate d'éthyle (pour le test d'hydrophobicité).
- L'huile à immersion pour l'observation microscopique.

III.1.4. Appareillage:

L'appareillage utilisé lors de notre travail est le suivant :

- Autoclave (Pbibrand);
- Bain Marie (Gerharth);
- Balance (KenRN440-35A);
- Balance analytique (KERNALS220-4N);
- Centrifugeuse électrique (EBA20HEHICH);
- Etuves 37C° (memmert);
- Four Pasteur (Controls);
- Plaque Chauffante (VELP scietifica);
- Agitateur Magnétique ;
- Barreau Magnétique, Micropipettes (Microlit);
- Microplaques;
- Microscope Optique (Olympus);
- Microscope à caméra (PARALOX);
- pH mètre (HANNA instrument);
- Réfrigérateur ;
- Spectrophotomètre;
- Vortex électrique (VELP);

III.2. Méthodes:

III.2.1. Revivification et vérification de la pureté la souche :

La souche a été revivifiée par des repiquages successifs, où la souche a été cultivée sur bouillon MRS puis incubé à 37°C pendant 24h. Le développement des bactéries se traduisent par un trouble. La pureté de la souche a été vérifiée par un examen microscopique après coloration de Gram.

III.2.2. Test d'hydrophobicité:

L'adhésion microbienne à des solvants a été faite selon la méthode décrite par **Jacobs et Chenia**, (2009) avec quelques modifications. Pour la réalisation de ce test trois solvants différents sont utilisées : le xylène qui est un solvant apolaire, chloroforme qui est un solvant mono-polaire acide et l'acétate d'éthyle qui est un solvant mono-polaire basique. Des cultures jeunes de 18h ont été préparées dans le bouillon MRS. Le culot bactérien a été récupéré par centrifugation à 6000 rpm/15min suivi de deux lavages successifs par une solution saline tamponnée au phosphate (PBS; pH 7.4) et resuspendu dans le même tampon. La densité optique initiale de la suspension a été ajustée approximativement à 0.6 à 600 nm (DO initiale). Ensuite 0.4ml du chaque solvant a été ajouté doucement à 3 ml de la suspension bactérienne. Les deux phases mélangées par vortex pendant 2 min. Après 1 heure d'incubation, la phase aqueuse a été récupérée à l'aide d'une pipette pasteur stérile et on procède à la mesure de la densité optique finale (DO finale). La même méthode est réalisée aux différents pH (pH 4, 5et 8) et en présence de différents sucres (galactose, lactose, maltose, fructose), EDTA, CaCl₂ et la trypsine.

La déférence de la densité optique est considérée comme une mesure de pourcentage de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%), elle est calculée par l'équation suivante :

III.2.3. Test d'auto-agrégation :

Les essaies d'auto-agrégation ont été réalisés selon la méthode de **Tomas et al**, (2005) avec quelques modifications. Les bactéries ont été cultivées à 37°C pendant 18h dans le bouillon MRS, les cellules jeunes ont été récoltées par centrifugation à 6000 rpm/15min, lavées 2 fois par le PBS et remises en suspension dans le PBS (pH=7.4) et standardisées pour obtenir une DO de 0.6 à 600 nm. Ensuite, les suspensions bactériennes ont été incubées à température ambiante pendant des périodes différentes (0h, 1h, 2h, 3h, 4h). A chaque heure, 0.1ml de la phase supérieure de la suspension bactérienne a été prélevé et transférée dans un autre tube avec 3.9ml de PBS et a été homogénéisée par vortex pendant 15 secondes et nous procédé de la mesure de la densité optique à 600 nm.

La même méthode est réalisée aux différents pH (pH 4, 5 et 8) et en présence de différents sucres (galactose, lactose, maltose, fructose), EDTA, CaCl₂ et la trypsine.

Le pourcentage d'auto-agrégation est calculé selon l'équation suivante :

% d'auto-agrégation= (DO initiale DO finale / DO initiale) x100.

III.2.4. Adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales :

La méthode décrite par Lin et al, (2007) a été appliquée, elle est réalisée en trois étapes :

III.2.4. Préparation des cellules épithéliales

Avant de mettre en œuvre le test d'adhésion, une portion de l'iléon du poulet de chair a été ouvert et lavé avec du tampon phosphate salin stérile (pH: 7.4) pour le débarrasser de tout son contenu, il est ensuite tenu dans le PBS et soumis à une réfrigération à 4°C pendant 30min, afin de faciliter la récupération des cellules de la moqueuse. Après ce temps d'incubation, la préparation est soumise à 10 lavages dans le PBS, suivi d'un repos pendant 3h à 4C°. Par la suite, les tissus ont été repris, ouverts et laissés au repos pendant 5 min. Les cellules ont été récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin (muqueuse) par une lame stérile. Les cellules épithéliales obtenues ont été resuspendu dans du PBS stérilisé. La suspension cellulaire a été examinée par microscopie pour s'assurer que des bactéries contaminées avaient été enlevées.

III.2.4.2 Préparation des bactéries lactiques

Des cultures bactériennes jeunes sur bouillon MRS a été centrifugées à 6000 rpm/15min et le culot cellulaire a été récupéré dans 2 ml de PBS (pH= 7.4) et standardisées pour obtenir une DO de 0.8 à 600 nm.

III.2.4.3 Adhésion

Un millilitre de la suspension bactérienne a été mélangé avec 1 ml de la suspension de cellules épithéliales provenant de poulet dans un tube. Ce mélange a été mis en rotation à 20 tours / min à 37 ° C pendant 45 min. L'adhésion a été observée après préparation d'un frottis et une coloration au Cristal violet 0.5% pendant 1min a été réalisée pour observer l'adhésion des cellules au microscope optique à l'objectif x100.Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérées est supérieur à 15 cellules des bactéries lactiques/cellules épithéliales.

L'adhésion des cellules épithéliales a été réalisé avec les cellules bactériennes exposées à différentes conditions : différents pH (pH 4, 5, 7, 8), et en présence de différents sucres (galactose, lactose, maltose, fructose), EDTA, CaCl₂ et la trypsine.

Résultats et Discussion

IV.1. L'hydrophobicité, l'auto-agrégation et l'adhésion de la souche du genre *Lactobacillus* sp BC12 :

Dans notre étude, nous avons testé la susceptibilité de la souche *Lactobacillus* sp BC12 d'être probiotique par l'étude de l'effet de différents facteurs sur l'hydrophobicité, la capacité d'autoagrégation et l'adhésion de la surface cellulaire de cette souche qui sont considéré comme critère de sélection des probiotiques.

IV.1.1. L'hydrophobicité:

Ce test est une mesure de l'hydrophobicité de la paroi des cellules bactériennes et qui est basée sur la répartition des bactéries en 2 phases liquides aqueuses non mélangeable et organique, donc permet d'évaluer la capacité d'adhésion de ces bactéries aux solvants. Les solvants sont, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et le xylène. L'affinité pour le chloroforme, solvant acide, reflète la nature du donneur d'électrons de la bactérie (réaction de base). Pour l'acétate d'éthyle, solvant basique, reflète la nature d'accepteur d'électrons de la bactérie (réaction acide) et l'affinité pour le solvant apolaire (xylène) reflète le caractère hydrophobe de la bactérie (kos et al, 2003). L'hydrophobicité de *Lactobacillus* sp est classée en trois groupes : hydrophobicité faible (0-35%), hydrophobicité modéré (36-70%), hydrophobicité forte (71-100%) (Ekmekci et al, 2009).

IV.1.1.1. L'effet de pH:

D'après les résultats obtenus et illustrés par la **figure 3** (Tableaux 4, 5, 6, 7, annexe), nous avons remarqué que la souche *Lactobacillus* sp BC12 a des pourcentages variables d'hydrophobicité avec les trois solvants. L'affinité de la souche au xylène est faible au différents pH (4, 5, 8) dont les pourcentages d'hydrophobicité était de 0%, 0.04%, 1.13%, respectivement par apport au pH 7 qui possède un pourcentage de 5.59%, cela indique que la souche est hydrophile et a montré un pouvoir d'adhésion faible.

Nos résultats sont en désaccord avec celles trouvés par **Kos et al**, (2003) sur l'hydrophobicité de la souche de *Lb. acidophilus* M92 à pH 7.2 et qui montrent une bonne hydrophobicité avec le xylène. Les caractéristiques basiques et acides de la surface cellulaire de notre souche ont été étudiées par l'estimation de la capacité d'adhésion au chloroforme et l'acétate d'éthyle. La souche a montrée une adhérence élevée au chloroforme au différents pH (4, 5, 8) dont le pourcentage d'hydrophobicité le plus élevé a été enregistré avec le pH 5 avec une valeur de 31.29 %. Lorsqu'on compare ces résultats avec notre témoin (pH7) on constate une augmentation d'hydrophobicité dans les différents pH.

Ainsi nous remarquons une affinité élevée du *Lactobacillus* sp BC12 à l'acétate d'éthyle dans les différents pH (4, 5, 8) dont les pourcentages d'hydrophobicité respectifs étaient de l'ordre de

36.14%, 26.46%, 37.96%. L'affinité la plus élevée est obtenus avec le pH 8. Donc l'hydrophobicité de la souche est augmenté par rapport au pH 7 à l'exception au pH 5 qui est diminué.

Les différentes valeurs de pH ont montré une adhérence plus élevé avec l'acétate d'éthyle que le chloroforme et le xylène cela indique que la souche *Lactobacillus* BC12 est un accepteuse d'électrons.

A côté de cela, on constate que le changement de pH du milieu modifie la charge de surface bactérienne ce qui peut etre comme conséquence sur la réduction ou l'augmentation des interactions électrostatiques.

Ces résultats sont en désaccord à l'étude qui a été rapporté par **Sharma** et *al*, (2016) où ils ont montré que *Pediococcus acidilactici* KM0 et *Lactobacillus casei* KL14 présentait une affinité élevée vis-à-vis du xylène qui est un solvant polaire et une surface cellulaire hydrophobe démontrée qui est un attribut probiotique hautement souhaitable. Ainsi **Wang et Han**, (2007) a trouvé que la variation de pH n'a aucune influence sur l'hydrophobicité des souches bactériennes, donc n'a aucun effet sur la surface de la paroi des bactéries.

La possibilité d'une haute hydrophobicité est due à la présence de glycoprotéines sur la surface des parois des cellules, cependant qu'une faible hydrophobicité peut être liée à la présence des polysaccharides à la surface de la paroi des cellules (**Branger**, 2007). Par contre de nos résultats, une étude de **Bunt et** *al*, (1993) a montrée qu'*E. coli* à une affinité prononcée pour le chloroforme et le dichlorométhane, et une affinité intermédiaire pour le xylène. L'abaissement du pH et l'augmentation de la force ionique du tampon de suspension ont entraîné une adhérence accrue.

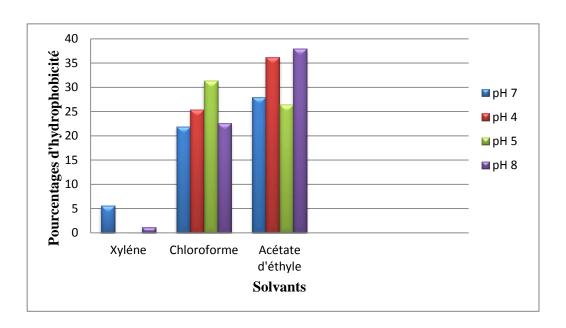


Figure 3 : Pourcentages d'hydrophobicité de la souche *Lactobacillus* sp BC12 a différents pH.

IV.1.1.2. L'effet des sucres :

Les résultats de l'effet de différents sucres (galactose, lactose, fructose, maltose) sur l'hydrophobicité sont illustrés sur la **figure 4** (Tableau 8, annexe).

A partir de cette figure nous remarquons une affinité faible avec le xylène aux différents sucres galactose, lactose, fructose, maltose) dont les pourcentages d'hydrophobicité étaient de 5.1%, 4.83%, 4.83%, 3.06% respectivement. Par comparaison en absence de sucre, on constate une diminution d'hydrophobicité dans les différents sucres. Ces résultats signifient que la souche à une surface cellulaire hydrophile et a montré un pouvoir adhérence faible.

Concernant le solvant acide mono-polaire, la souche possède une affinité faible aux différents sucres dont le pourcentage d'hydrophobicité le plus élevé a été enregistré avec le lactose (25.58%). Lorsqu'on compare ces résultats en absence de sucres on constate une augmentation d'hydrophobicité en présence de différents sucres.

Ainsi nous remarquons une affinité élevée à l'acétate d'éthyle du *Lactobacillus* sp BC12 dans les différents sucres (galactose, lactose, fructose, maltose) dont les pourcentages d'hydrophobicité respectifs étaient de l'ordre de 34.3%, 34.84%, 35.53%, 31.55%. L'affinité la plus élevée est obtenue avec le fructose. Donc l'hydrophobicité de la souche a augmenté en absence de sucre.

Les différentes valeurs de sucres ont montré une adhérence plus élevé avec l'acétate d'éthyle que le chloroforme et le xylène cela indique que la souche *Lactobacillus* sp BC12 est un accepteur d'électrons. La modification de l'hydrophobie des surfaces est due à la capacité des sucres à capter plus au moins l'eau et à interagir ou non avec les sites lectiniques des bactéries. Cette fonctionnalisation permet la formation d'une couche d'eau plus ou moins dense, limitant l'adhésion des bactéries (**Branger**, 2007).

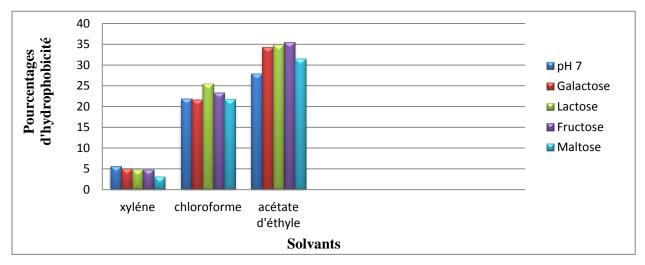


Figure 4 : Pourcentages d'hydrophobicité de la souche Lactobacillus sp BC12 a différents sucres.

IV.1.1.3. L'effet de CaCl₂, EDTA et Trypsine :

Les résultats représentés dans la **figure 5** (Tableau 9, annexe) montrent que l'hydrophobicité de la souche de *Lactobacillus* sp BC12 enregistré avec EDTA est élevé avec le solvant apolaire (18.26 %) par rapport en absence de CaCl₂, EDTA et trypsine qui montre un pourcentage de 5.59%.On considère que la souche est hydrophile puisque elle possède une valeur d'hydrophobicité inférieure à 36 % d'après **Ekmekci et** *al*, (2009).

D'une manière générale, si on compare nos résultats à ceux du contrôle, nous trouvons que ces résultats est en désaccord avec l'étude de **Taweechaisupapong et Doyle**, (2000) qui ont démontré que l'hydrophobicité diminué avec l'EDTA qui est un agent chélateur et également un inhibiteur de plusieurs adhésines bactériennes. Nous pouvons déduire que l'EDTA ne présente aucun effet sur les constituants et les propriétés de surface de la bactérie parce que selon **Kos et al**, (2003), les pourcentages les plus élevés d'hydrophobicité du *Lactobacillus* sp sont généralement associé à la présence des structures fibrillaires sur la surface des cellules et des protéines spécifiques de la paroi cellulaire.

Ce qui concerne le CaCl₂, l'affinité de la souche au xylène est plus faible (2.39%). Donc la souche est plus hydrophile par apport à l'absence de CaCl₂, EDTA et trypsine .Cela veut dire que le traitement alcalin avec le CaCl₂ affect la propriété de la surface bactérienne par la solubilisation des protéines. D'après les résultats de l'effet d'un traitement enzymatique par la trypsine qui est un enzyme protéolytique avec le xylène nous constatons qu'il y a une diminution d'hydrophobicité de la souche (3.17%) par rapport au contrôle alors la souche est hydrophile. A la lumière de ces résultats recueillis on peut dire que la trypsine altère plus ou moins spécifiquement les constituants des surfaces cellulaires responsables de l'adhésion.

L'affinité de l'EDTA, CaCl₂ et la trypsine avec le chloroforme est presque la même dont les pourcentages d'hydrophobicité étaient 21.93%, 21.3% et 21.93% respectivement et par rapport en l'absence de l'EDTA, CaCl₂ et la trypsine. Par contre leur affinité avec l'acétate d'éthyle a été augmentée dont les pourcentages d'hydrophobicité étaient 33.4%, 30.66% et 33.77%, respectivement par rapport l'absence de l'EDTA, CaCl₂ et la trypsine et aussi augmenté avec au chloroforme et au xylène. Donc ces résultats signifiaient que la souche est accepteuse d'électrons.

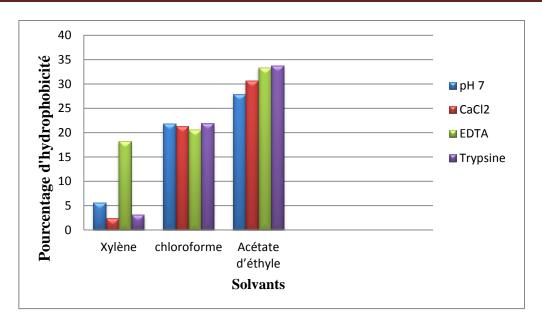


Figure 5: Pourcentages d'hydrophobicité de la souche *Lactobacillus* sp BC12 aux CaCl₂, EDTA et Trypsine.

IV.2.1. L'auto-agrégation

La capacité à former de grumeaux multicellulaires entre les microorganismes de la même souche, ou l'auto-agrégation semble être nécessaire pour l'adhérence aux cellules épithéliales intestinales. (Sadrani et *al*, 2014 ; Tomás et *al*, 2005).

IV.2.1.1. L'effet de pH:

Les propriétés d'auto-agrégation de la souche *Lactobacillus* sp BC12 sont présentés sur la **figure 6** (Tableau 10, 11, 12, 13, annexe). Nous avons constaté que la souche montre une capacité d'auto-agrégation très importantes avec les différents pH (4, 5,8) après 4 heures d'incubation dont le pH 4 et pH5 ont montré les plus fortes capacités d'auto-agrégation (91,26%) et (91.8 %) suivie par le pH8 (90,92%). Par comparaison avec le pH 7, on constate une valeur d'auto-agrégation inferieur à celles les autres pH (90.8%).

De façons générales le temps d'incubation est influence le taux d'agrégation et les pH acides et alcalins n'avaient aucun effet sur l'auto-agrégation des cellules bactériennes.

Nos résultats sont en désaccord avec ceux de **Ekmekci et al, (2009)** qui ont trouvé une autoagrégation très élevé (98%) avec la souche *Lactobacillus salivarus* I1 a pH 3.

Une étude de **Tomas et al**, (2005) a montré une auto-agrégation élevée de la souche *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294 au pH 5. Cette augmentation au milieu acide a été expliquée par des modifications de la charge bactérienne extérieure, qui pourrait favoriser le rapprochement des cellules.

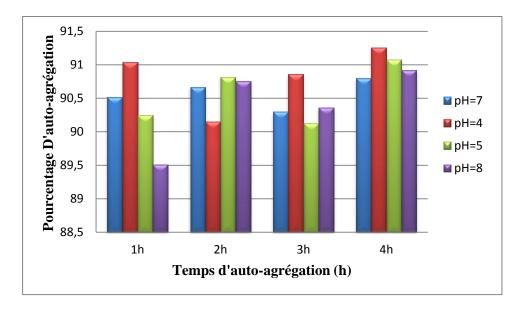


Figure 6 : Pourcentages d'auto-agrégation de la souche du Lactobacillus sp BC12 a différents pH.

IV.2.1.2. L'effet des sucres :

L'effet des sucres (galactose, lactose, fructose et maltose) sur la capacité d'auto-agrégation de *Lactobacillus* sp BC12 a été étudies et les résultats sont affichées dans la **figure 7** (Tableau 14, annexe).

D'après les résultats obtenus nous avons remarqué une très faible augmentation d'auto-agrégation au cours du temps dont les pourcentages d'auto-agrégation avec le galactose, lactose et maltose dans la première heure sont de 90.66%,89.95% et 89.63%, respectivement et arrivent à des valeurs de 91.6%, 91.41%, 90.61% la 4ème heure à l'exception avec le fructose où on observe une diminution d'auto-agrégation dans la 4ème heure qui peut être due à une erreur au cours de la manipulation.

Une tendance similaire a été observé avec le pH 7 avec un pourcentage d'auto-agrégation croissant de la 1^{ère} à la 4^{ème} heure (90.52% jusqu'à 91.6%).

Ces résultats sont en accord à celles trouvé avec **Jacobs et Chenia**, (2011) qui montre une augmentation du pourcentage d'auto-agrégation avec le lactose et le galactose et d'autres sucres. Autre étude de **Simões et al**, (2008) a montré aucune inhibition a été observé sur l'auto-agrégation de *Acinitobacter calcoaceticus* avec les mêmes sucres.

Nos résultats sont en contraires à celle rapporté par Tareb et *al*, (2013) qui démontrée que la diminution d'auto-agrégation de *Lactobacillus rhamnosus* 3698 et *Lactobacillus farciminis* 3699 est due par un renversement des interactions carbohydrate-lectine et/ou des composants protéinés présents à la surface des bactéries. En terme générale on peut dire que le traitement par les sucres n'a pas produit une inhibition partielle ou complète de l'auto-agrégation pour la souche *Lactobacillus* BC12 et que les interactions lectine-saccharide n'ont pas été inversées par les sucres

et sont généralement très spécifiques. L'absence de l'effet de sucre sur l'auto-agrégation donc était inattendue et on peut dire qu'une variété plus large de sucres autres que ceux testés pourrait provoquée un renversement des réactions d'auto-agrégation.

Cependant, l'influence générale des sucres sur l'agrégation dépend non seulement du type de sucre mais aussi de la bactérie spécifiquement isolée (**Ramalingam et** *al***, 2013**).

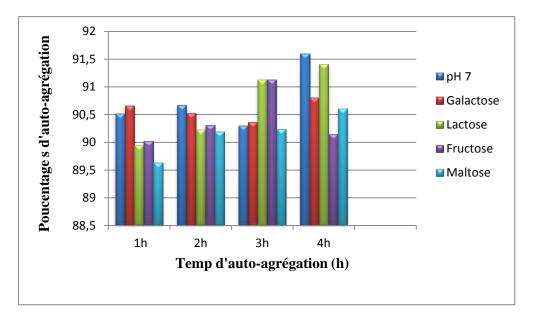


Figure 7 : Pourcentages d'auto-agrégation de la souche du *Lactobacillus* sp BC12 a différents sucres.

IV.1.2.3. L'effet de Cacl₂, EDTA et Trypsine :

D'après les résultats illustrés dans la **figure 8** (Tableau 15, annexe), nous avons remarqué que la capacité d'auto-agrégation de la souche de *Lactobacillus* sp BC12 après une heure d'incubation est caractérisée par des pourcentages élevés avec l'EDTA, le CaCl₂ et la trypsine, étaient de l'ordre de 90.72%, 91.18% et 90.35% respectivement mais après trois heures d'incubations on a trouvé qu'il y a une faible diminution dans les valeurs d'auto-agrégation. Si on compare ces résultats avec l'auto-agrégation à pH 7 en absence l'EDTA, le CaCl₂ et la trypsine on remarque une augmentation avec le temps d'incubations et la valeur la plus élevé est enregistré après trois heures d'incubation (91,9%). Donc on peut dire que l'auto-agrégation de la souche était changée en présence de l'EDTA, le CaCl₂ et la trypsine.

Ce qui concerne la trypsine nos résultats sont en accord et ceux de Yadav et al, (2015), qui ont également démontré que la capacité d'adhésion des souches Lactobacillus plantarum Lp9, Lactobacillus plantarum Lp71, Lactobacillus plantarum Lp72 et Lactobacillus plantarum Lp91 ainsi que la souche de référence Lactobacillus plantarum NCDO5276 a été affecté par les trois enzymes (la trypsine, la pepsine et le Lysozyme) et suggère fortement que les composants bactériens impliqués dans leur adhérence étaient des protéines et / ou des glycoprotéines.

Une autre étude de **Ekmekei et al, (2009)** montrent que la capacité d'auto-agrégation des souches *Lactobacillus salivarius* 11, *Lactobacillus cellobiosus* 13, *Lactobacillus acidophilus* R9et *Lactobacillus acidophilus* S1 a été affecté par les deux enzymes testées (la pepsine et la lipase).

Pour l'EDTA, des résultats similaires ont été également rapportés dans une étude de **Taweechaisupapong and Doyle**, (2000) qui ont démontré que l'EDTA pourrait inhiber les adhésines des membres des genres *Actinomyces*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* et *Prevotella*. Certaines des adhésines sont des lectines capables de lier des hydrates de carbone, tandis que d'autres sont spécifiques pour les protéines et / ou les hydrophobines.

Pour le CaCl₂ nos résultats sont en accord à ceux de **Min et al**, (2010) qui ont démontré que les solutions salines inorganiques (CaCl₂, Na₂SO₄, MgCl₂ ou MgSO₄) peuvent être influence sur la charge de des ions. Des changements dans la concentration ionique peuvent également induire des changements dans la conformation des structures et des appendices associées à la surface cellulaire. Il s'agit notamment des polysaccharides de surface, des fibrilles, des fimbrias et des flagelles tous présents à la surface.

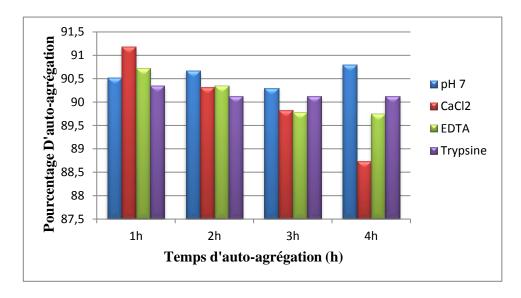


Figure 8 : Pourcentages d'auto-agrégation de la souche du *Lactobacillus* sp BC12 aux Cacl₂, EDTA, Trypsine.

IV.1.3. Adhésion :

Avant de mettre les cellules bactériennes en contact avec les cellules épithéliales, on a réalisé un test de confirmation de l'efficacité des lavages pour l'élimination de la microflore adhérente. La **figure 9**, illustre clairement que le tissu et dépourvu de contaminants.

L'adhésion cellulaire correspond à l'ensemble des mécanismes cellulaires résultant essentiellement entre les bactéries et les surfaces abiotiques par des interactions électrostatiques et hydrophobes non

spécifiques tandis que l'adhérence aux tissus vivants est complétée par des molécules spécifiques (ligand ou adhésines) (**Dunne**, **2002**).

L'adhésion aux cellules épithéliales intestinales est un trait physique très important à l'agrégation et la colonisation des bactéries probiotiques dans les voies gastro-intestinales de l'hôte. Cette propriété permet d'assurer une protection vis-à-vis de l'invasion d'un grand nombre d'agents enterpathogènes qui perturbent l'équilibre d'écosystème intestinal (**Kos et** *al*, **2003**).

Ce processus est régit par de nombreux facteurs, liés à la fois aux caractéristiques des microorganismes, le caractère hydrophile ou hydrophobe des bactéries, les charges de surface, la force ionique du milieu, pH, la présence de structures spécifiques à la surface des bactéries.

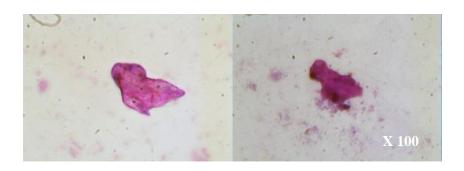


Figure 9 : Photo-microscopique des cellules épithéliales.

IV.1.3.1. L'effet de pH:

La capacité d'adhésion de Lactobacillus sp BC12 sur le tissu épithélial a été montrée après une comparaison entre les valeurs d'hydrophobicité et d'auto-agrégation.

L'observation microscopique a révélé clairement une forte agrégation à la muqueuse intestinale dans les différant pH (4, 5,8) dont leur densité est supérieure à celle de pH7.

Pour revenir au test d'hydrophobicité et d'auto-agrégation avec les mêmes pH oùnous avons constaté une faible hydrophobicité et une auto-agrégation croissante au cours du temps.

Bien que la règle générale soit que l'adhésion est proportionnelle avec les valeurs de l'hydrophobicité, un certain nombre d'études ont montré des résultats en accord à nos résultats où aucune relation n'a été trouvée entre l'hydrophobicité de la surface de la souche bactérienne et l'adhésion au tissu intestinal. Ces résultats sont confirmés par l'étude de **Jacobs et** *al*, (2011) qui trouve qu'*Elizabethkingia meningoseptica* CH2B était hydrophile mais donne une forte adhésion.

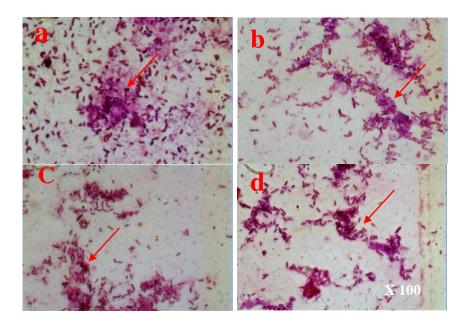


Figure 10: Photo-microscopique de l'effet du pH sur l'adhésion de souche de *Lactobacillus* sp BC12 aux cellules épithéliales. (a) adhésion à pH 4, (b) adhésion à pH 5, (c) adhésion à pH8, (d) adhésion à pH 7.

IV.1.3.2. L'effet des sucres :

L'observation microscopique représentée par la **figure 11** montre l'effet des différents sucres (galactose, lactose, fructose et le maltose) sur l'adhésion de la souche *Lactobacillus* sp BC12 aux cellules épithéliales a montré une adhésion élevée avec tous les sucres par rapport le contrôle. Alors que ces sucres avaient un effet sur l'hydrophobicité mais ils influent négativement sur l'autoagrégation des cellules bactérienne.

Des études similaires sur l'effet des sucres sur l'adhésion aux cellules épithéliales comme celle de Jin et al, (2004) ont montré des résultats similaires à nos résultats, dont le traitement avec les sucres (glucose et galactose) augmente la capacité d'adhésion de candida albicans et donc la formation d'un biofilm. Par contre Guhathakurta et al, (1992) qui démontré aucun effet inhibiteur du glucose et mannose en revanche avec le frucose il y avait une affection de capacité d'adhésion de Shigella dysenteriae type 1 et Shigella flexneri. Ce résultat lui a permis de conclure qu'il est possible que la spécificité du sucre à une molécule d'adhésine différents d'une souche à l'autre est impliquée dans le processus d'adhésion.

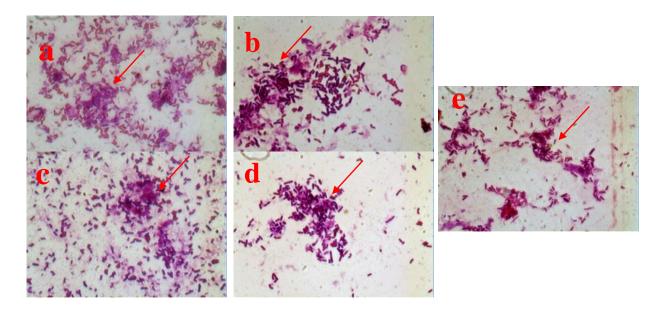


Figure 11 : Photo-microscopiquede l'effet des sucres sur l'adhésion de la souche *Lactobacillus* sp BC12 aux cellules épithéliales.

(a) Adhésion à galactose, (b) Adhésion à Lactose, (c) Adhésion à Fructose, (d) Adhésion à maltose, (e) Adhésion en absence de sucre.

IV.1.3.3. L'effet deCaCl₂, EDTA et Trypsine :

L'observation microscopique représentée dans la **figure 12** montre clairement une adhérence élevée de la souche de *Lactobacillus* sp BC12 aux cellules épithéliales avec l'EDTA, CaCl₂, trypsine par rapport au contrôle .A la base des résultats précédemment sur l'effet d'EDTA, CaCl₂ et la trypsine sur l'auto-agrégation et d'hydrophobicité qui montrent que la souche était fortement auto-agrégée (pourcentage d'auto-agrégation ≥ 90) et faible hydrophobicité et que l'EDTA influence négativement sur l'hydrophobicité des cellules bactérienne. Nos résultats sont en d'accord avec l'étude de **Dos Santos et al, (2009)** qui a montré que le prétraitement des cellules bactériennes avec l'EDTA a influencé négativement sur les propriétés adhésives de *Streptococcus agalactiae* aux cellules A549. L'EDTA inhibe les polypeptides de surface bactérienne qui agissent comme des adhésines.

Selon l'étude de **Lim**, **2012** qui démontre que le CaCl₂ a entraîné une augmentation de la capacité d'adhésion de *Lactobacillus acidophilus* GK20, *Lactobacillus paracasei* GK74 et *Pediococcus pentosaceus* MLK67 aux cellules Caco-2.Les ions de calcium sont connus parleur augmentation de l'adhésion des souches probiotiques aux surfaces des cellules intestinales et sont impliquées dans des interactions non spécifiques telles que neutralisation de la double couche électrique entre cellule et la surface du substrat.

L'étude de **Li et al, 2008** qui démontre qu'avec le prétraitement par trypsine, par la protéinase K, l'adhérence de *Lactobacillus fermentum* I5007 au mucus intestinal porcin a été significativement

diminuée. La trypsine et la protéinase K peuvent détruire la structure de la glycoprotéine et des glucides dans le mucus, qui sont considérés comme les récepteurs contribuant à l'adhésion du *Lactobacillus* au mucus.

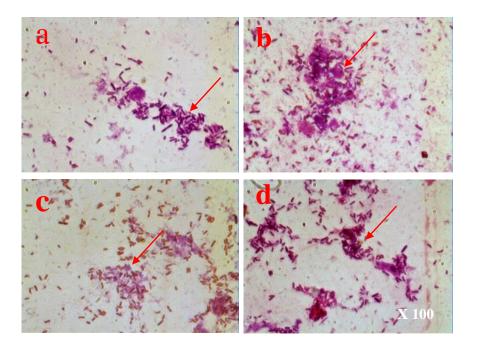
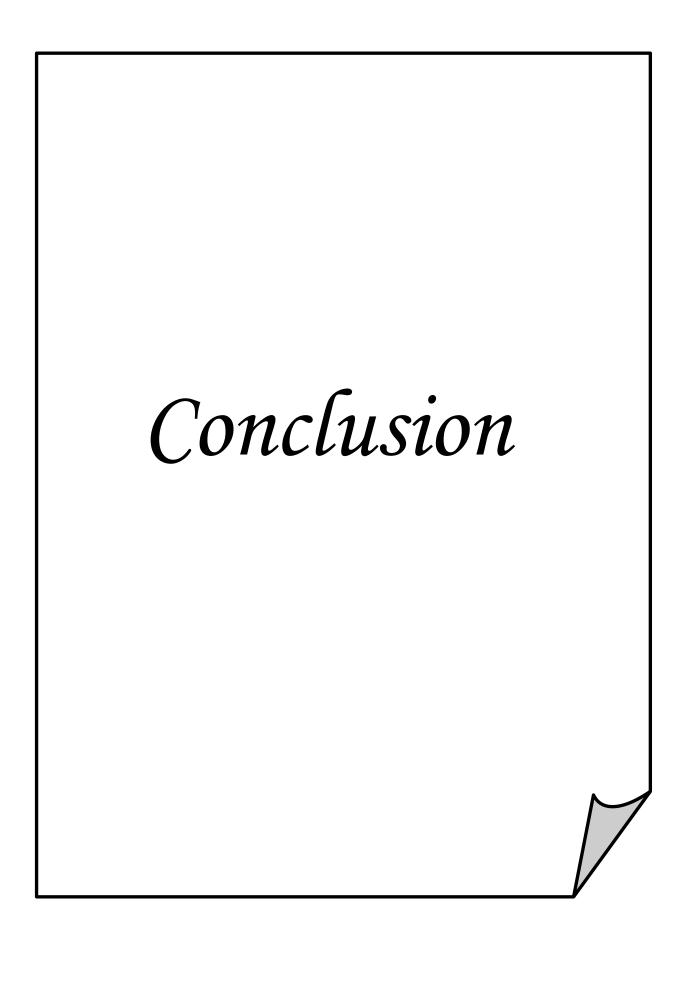


Figure 12: Photomicrographie de l'effet de trypsine, EDTA, CaCl₂ sur l'adhésion de la souche *Lactobacillus* sp BC12 aux cellules épithéliales.

(a) Adhésion à CaCl₂, (b) Adhésion à EDTA, (c) Adhésion à trypsine, (d) Adhésion en absence des solutions étudiées.



Dans notre étude, nous avons étudié les propriétés de surface de la souche *Lactobacillus* sp BC12 telles que l'hydrophobicité, l'auto-agrégation et l'adhésion sous l'effet du pH, sucres, EDTA, CaCl₂ et de la trypsine.

Les résultats fournis par l'étude *in vitro* ont montrée des faibles valeurs d'hydrophobicité dans les différant pH, cette faible hydrophobicité a été liée avec la modification de charge de la surface bactérienne ce qui peut avoir comme conséquence une réduction des interactions électrostatiques et donc affecter le rapprochement des cellules. De plus notre souche montre une capacité d'autoagrégation et d'adhésion très importante avec les différents pH (4, 5,8) dont les pH acides montrent les plus fortes valeurs, Cette augmentation au milieu acide a une relation directe avec la modification de charge bactérienne extérieure, qui pourrait affecter le rapprochement des cellules.

Les résultats de l'effet des différents sucres (galactose, lactose, fructose et le mannose) sur l'hydrophobicité et l'auto-agrégation montrent des valeurs d'hydrophobicité faibles enregistrée avec tous les sucres.

Pour l'auto-agrégation et l'adhésion, aucun effet inhibiteur a été observé dont les pourcentages d'auto-agrégation reste élevé et atteint 91.41% avec le lactose.

Pour l'effet du traitement alcalin et enzymatiques sur la souche *Lactobacillus* sp BC12 a révélé que ce traitement réduit le pourcentage d'hydrophobicité à des valeurs moins importantes et affecte les propriétés de surface bactérienne, par contre l'EDTA aucun effet observé.

Pour l'auto-agrégation de *Lactobacillus* sp BC12 nous avons constaté une diminution considérablement après un traitement de l'EDTA, CaCl₂, trypsine donc ces paramètres affect les constituants des surfaces cellulaires responsables de l'adhésion.

Enfin et à la lumière de nos résultats recueillis, nous avons conclu que notre souche présente un caractère hydrophile avec un taux d'auto-agrégation élevé et un pouvoir adhésif important. Ces études ne permettent pas de biens jugés les performances de souche, d'autres études seront nécessaires sur d'autres paramètres afin de trouver des souches performantes susceptibles d'être utilisées comme probiotique

Références Bibliographiques

Alexandre H., Granvalet C., Guilloux-Benatier M., Remize F and Tourdot-Maréchal R. (2008). Les bactéries lactiques en œnologie. Technique et documentation, Paris, P9.

Allen K-J and Koplin J-J. (2016). Prospect for prevention of food allergy. *The Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 4(2): 215-220.

Avaiyarasi N-D., Ravindran D., Venkateshp and Arul V. (2016). In vitro selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control*, 69: 124-133.

Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. **IN, Salminen S., Von Wright A and Ouweh A.** (2004). Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. CRC Press, New York, PP19-85.

Banerjee G and Kumar Ray A-K. (2017). The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Research in Veterinary Science*, 115: 66-77.

Behnsen J., Deriu E., Sassone-Corsi M and Raffatellu M. (2013). Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(3): 1-15.

Branger A. (2007). Microbiochimie et Alimentation, Educagri Editions, Paris, P137.

Bruzzese E., Callegari M-L., Raia V., Viscovo S., Scotto R., Ferrari S and Guarino A. (2014). Disrupted intestinal microbiota and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis and its restoration with *lactobacillus* GG: a randomised clinical trial. *PLoS One*, 9(2): 87796.

Buldo P., Benfeldt C., Carey J-P., Folkenberg D-M., Jensen H-B., Sieuwerts S., Vlachvei K and Ipsen R. (2016). Interactions of milk proteins with low and high acyl gellan: effect on microstructure and textural properties of acidified milk. *Food Hydrocolloids*, 60: 225-231.

Bunt C-R., Jones D-S and Tucker I-G. (1993). The effects of pH, ionic strength and organic phase on the bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) test. *International Journal of Pharmaceutics*, 99(2-3): 93-98.

Burgain J., Gaiani C., Jeandel C., Cailliez-Grimal C., Revol A-M and Scher J. (2012). Maldigestion du lactose : formes cliniques et solutions thérapeutiques. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 47(4) : 201-209.

Butel M-J. (2014). Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *Journal des Anti- infectieux*, 16(2): 33-43.

Cappello M- S., Zapparoli G., Logrieco A and Bartowsky E-J. (2016).Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavor. *International Journal of Food Microbiology*, 243: 16-27.

Chong E-S-L. (2014). A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention:review of possible mechanisms of action. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 30(2): 351-374.

CumminsE-P and Crean D. (2017). Hypoxia and inflammatory bowel disease. *Microbes and Infection*, 19(3): 210-221.

Cuvas-Limón R-B., Julio M-S., Carlos C-E-J., Mario C-H., Mussatto S-I and Ruth B-C. (2016). Aloe vera and Probiotics: A New Alternative to Symbiotic Functional Foods. *Annual Research & Review in Biology*, 9(2): 1-11.

Deepika G., Green R., Frazier R-A and Charalampopoulos D. (2009). Effet of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. Journal of Applied Microbiology, 107(4): 1230-1240.

Del Re B., Sgorbati B., Miglioli M and Palenzona D. (2000). Adhesion, auto-agregation andhydrophobicity of 13 strains *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(6): 1230-1240.

Dortu C et Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy, Society et Environment*, 13(1): 143-154.

Dos Santos M-H-B., Da Costa A-F-E., Santos G-D-S., Dos Santos A-L-S and Nagao, P-E. (2009). Effect of chelating agents on the growth, surface polypeptide synthesis and interaction of *Streptococcus agalactiae* with human epithelial cells. *Molecular Medicine Meports*, 2(1), 81-84.

Dunne W-M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2): 155-166.

Ekmekci H., Aslim B and Ozturk S. (2009). Characterization of Vaginal Lactobacilli coagregation ability with Escherichia coli. *Microbiology and Immunology*, 53(2): 59-65.

FAO/OMS (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). Working Group Report. London, Ontario, Canada.

Feng Y., Qiao L., Liu R., Yao H and Gao C. (2017). Potential probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the intestinal mucosa of healthy piglets. *Annals of Microbiology*, 67(3): 239-253.

Foligné B., Daniel C and Pot B. (2013). Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 16(3): 284-292.

Fugelsang K and Edwards C. (2006). Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures. Springer Science & Business Media, 2^{éme}édition, New York, P37.

Gasbarrini G., Bonvicini F and Gramenzi A. (2016). Probiotics History. *Journal of Clinical and Gastroenterol*, 50: 116-119.

Gayathri D and Rashmi B-S. (2017). Mechanism of development of depression and probiotics as adjuvant therapy for its prevention and management. *Mental Health & Prevention*, 5: 40-51.

Gogineni V-K., Morrow L-E and Malesker M-A. (2013). Probiotics: mechanisms of action and clinical applications. *Journal of Probiotics & Health*, 1(101): 2.

Guhathakurta B., Sasmal D and Datta A. (1992). Adhesion of *Shigelladysenteriae* type 1 and *Shigella flexneri* to guinea-pigcolonic epithelial cells *in vitro*. *Journal of Medical Microbiology*, 36(6): 403-405.

Huang C-H., Shen C-C., Liang Y-C and Jan T-R. (2016).The probiotic activity of *lactobacillus murinus* against food allergy. *Journal of Functional Foods*, 25: 231-241.

Ibrarra A., Acha R., Calleja M-T., Chiralt-Boix A and Wittig. (2012). Optimization and shelf life of a low-lactose yogurt with *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *Journal of Dairy Science*, 95(7): 3536-3548.

Ishimwe N., Daliri E-B., Lee B-H., Lee B-H., Fang F and Du G. (2015). The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics. *Molecular Nutrition&Food Research*, 59(1): 94-105.

Ismaili M-A., Guilal J., Hamama A., Saidi B et Zahar M. (2016). Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *The International Journal of Multi-disciplinary Sciences*, 1(2): 81-94.

Iyer B-K., Singhal R-S and Ananthanarayan L. (2013). Characterization and in vitro probiotic evaluation of lactic acid bacteria isolated from idli batter. *Journal of Food Scientists & Technologists*, 50(6): 1114-1121.

Jacobs A and Chenia H-Y. (2009). Biofilm-forming capacity, surface hydrophobicity and aggregation characteristics of myroides odoratus isolated from south African oreo chromismos sambicus fish. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6): 1957-1966.

Jacobs A., and Chenia H-Y. (2011). Biofilm formation and adherence characteristics of an *Elizabethkingia meningoseptica* isolate from *Oreochromismos sambicus*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10(1): 16.

Jagadeesh K-S. (2015). Lactic acid bacteria as a source of functional ingredients. *South Indian Journal of Biological Sciences*, 1(2): 70-71.

Jin Y., Samaranayake L-P., SamaranayakeY and Yip H-K. (2004). Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietarysugars. *Archives of Oral Biology*, 49(10): 789-798.

Kasra-Kermanshahi R and Mobarak-Qamsari E. (2015). Inhibition Effect of Lactic Acid Bacteria against Food Born Pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Applied Food Biotechnology*, 2(4): 11-19.

Kaur M-S., Pannu P-K and Galhotra V. (2012). Probiotics-A new way to maintain oral health. *Indian Journal of Dentistry*, 3(2): 77-80.

Khalid K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1 (3): 1-13.

König H and Fröhlich J. Lactic acid bacteria .IN, König H., Unden G and Fröhlich J. (2009). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine, Heidelberg Springer, Germany, PP3-149.

Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J and Matošić S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6): 981-987.

Kumar A and Kumar D. (2015). Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. *Clinical Microbiology*, 33: 117-123.

Kumar K-S., Sastry N., Polaki H and Mishra V. (2015). Colon cancer prevention through probiotics: an overview. *Cancer Science & Therapy*, 7(2): 81-92.

Ladha G and Jeevaratnam K. (2016). Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from rumen liquor of goat. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13(4): 2155-2159.

Lairini S., Beqqali N., Bouslamti R., Belkhou R et Zerrouq F. (2014). Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie, 10(4): 267-277.

Lauzon H-L., Dimitroglou A., Merrifield D-L., Ringø E and DaviesS-J. (2014).Probiotics and prebiotics-concepts, definitions and history. *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, 169-184.

Lawande S. (2012). Probiotics for management of periodontal disease: a novel therapeutic strategy. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2(4): 41-46.

Lazzi C., Povolo M., Locci F., Bernini V., Neviani E and Gatti M. (2016). Can the development and autolysis of lactic acid bacteria influence the cheese volatile fraction? The case of grana padano. *International Journal of Food Microbiology*, 233: 20-28.

- Li Q., Liu X., Dong M., Zhou J and Wang Y. (2015). Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, 3(2): 84-92.
- **Li X-J., Yue L-Y., Guan X-F and Qiao S-Y. (2008).** The adhesion of putative probiotic *lactobacilli* to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4): 1082-1091.
- **Lim, S. M.** (2012). Factors affecting adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and inhibitory effect on infection of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12): 1731-1739.
- Lin W-H., Yu B., Jang S-H and Tsen H- Y. (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated froms wine and poultry. *Anaerobe*, 13(3): 107-113.
- Liu S-N., Han Y and Zhou Z-j. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 44(3): 643–651.
- Martinez R-C-R., Aynaou A-E., Albrecht S., Schols H-A., De Martinis E- C-P., Zoetendal E-G., VenemaK., Saad S-M-I and Smidt H. (2011). In vitro evaluation of gastrointestinal survival of *lactobacillus amylovorus*dsm 16698 Alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *bifidobacterium*. *Animalis* subsp. *Lactis* bb-12. *International Journal of Food Microbiology*, 149(2): 152-158.
- Mattu B and Chauhan A. (2013). Lactic Acid Bacteria and Its Use in Probiotics. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 4: 8.
- Mayo B., Tamara A-P., Fernández M., Kowalczyk M., Pablo Á-M and Bardowski J, Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. IN, Fernanda M., Raúl R- R and Graciela M-V. (2010). Biotechnology of lactic acid bacteria novel applications. Wiley-Blackwell, USA, P3.
- Mehrabani M., Ghaderian S-M-H and Khodaii Z. (2014). Important Features of Probiotic Microorganisms in Pharmaceutical and Dairy Products. *International Journal of Enteric Pathogens*, 1(2): 53-62.
- Min K-R., Zimmer M-N and Rickard A-H. (2010). Physicochemical parameters influencing coaggregation between the freshwater bacteria *Sphingomonas natatoria*2.1 and *Micrococcus luteus* 2.13. *Biofouling*, 26(8): 931-940.
- Miremadi F., Ayyash M., Sherkat F and Stojanovska L. (2014). Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *lactobacilli* and *bifidobacteria*. *Journal of Functional Foods*, 9: 295-305.

Mourad G., Bettache G., Samir M and Omrane T. (2015). Technological and biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from algeria traditional dairy products . *World Applied Sciences Journal*, 33(2): 234-241.

O'Grady B and Gibson G-R,(2005). Microbiota of the Human Gut. IN, Tamime A, Probiotic dairy products.Oxford: Blackwell, Australia, P8.

Özcelik S., Kuley E and Özogul F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 73: 536-542.

Patel R and Dupont H-L. (2015). New Approaches for Bacteriotherapy: Prebiotics, New-Generation Probiotics, and Synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(2): 108-121.

Pessione E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 86.

Pilet M-F., Magras C and Federighi M. Bactéries lactiques. IN, Federighi M. (2005). Bactériologie Alimentaire compendium d'hygiène des aliments. Economica, 2^{éme} edition, Paris, PP220-223.

Pot B, The taxonomy of lactic bacteria. IN, Corrieu G and Luquet F-M. (2008). Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments, Lavoisier, Editions Technique et Documentation, Paris, PP1-19.

Prasetyo D., Ermaya Y., Martiza I and Yati S. (2015). Correlation between climate variations and rotavirus diarrhea in under-five children in bandung. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(11): 908-911.

Rahman M-M., Hossain K-M and Rahman S-M. (2016). Isolation, characterization, and properties study of probiotic lactic acid bacteria of selected yoghurt from Bangladesh. *African Journal of Microbiology Research*, 10(1): 23-31.

Ramalingam B., Sekar R., Boxall J-B and Biggs C. (2013). Aggregation and biofilm formation of bacteria isolated from domestic drinking water. *water Science and Technology: Water Supply*, 13(4):1016-1023

Raman M., Ambalam P and Doble M, Introduction: Gastroinstestinal system and colorectal cancer.IN, Raman M., Ambalam P and Doble M. (2015). Probiotics and bioactive carbohydrates in colon cancer management, Springer, India, P2.

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

Sadeghi-Aliabadi H., Mohammadi F., Fazeli H and Mirlohi M. (2014). Effects of *lactobacillus* plantarum a7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 17 (10): 815-819.

Saeed M., Yasmin I., Issa Khan M., Pasha I., Khan M-R., Shabbir A and Khan W-A. (2014). Lactic acid bacteria in sourdough fermentation: a safe approach for food preservation. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 24(4): 211-217.

Salvetti E., Torriani S and Felis G-E. (2012). The genus *Lactobacillus*: ataxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4): 217-226.

Salvucci E., LeBlanc J-G and Perez G. (2016). Technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *LWT-Food Science and Technology*, 70:185-191.

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

Sharma K., Sharma N and Sharma R. (2016). Identification and Evaluation of In vitro Probiotic Attributes of Novel and Potential Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Dairy Products of North-West Himalayas. *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology*, 2(1): 018-025.

Simões L-C., Simões M., and Vieira M-J. (2008). Acinetobacter calcoaceticus plays a bridging function in drinking water biofilms.

Song D., Ibrahim S and Hayek S, Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. **IN, Rigobelo E-C.** (2012). Probiotics. InTech, Croatia, P4.

Stefan D., Gabriela Elena B and Gabriela I, Sources, Production and Microencapsulation of Probiotics. **IN, Ötleş S. (2014).** Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health, CRC Press, Boca Raton, P27.

Sun Z., Yu J., Dan T., Zhang W and Zhang H, Phylogenesis and Evolution of lactic acid bacteria. IN, Zhang H and Cai Y. (2014). Lactic acid bacteria: Fundamentals and practice, Springer Dordrecht Heidelberg, New York London, PP1-102.

Sutra L., Federichi M et Jouve J-L. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Polytechnica, paris, PP236-239.

Taibi A and Comelli E-M. (2014). Practical approaches to probiotics use. *Applied Physiology Nutritional and Metabolic*, 39 (8): 980-986.

Tareb R., Bernardeau M., Gueguen, M and Vernoux J-P. (2013). In vitro characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology*, 62(4): 637-649.

Taweechaisupapong S and Doyle R-J. (2000). Sensitivity of bacterial coaggregation to chelating agents. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 28(4): 343-346.

Thushara, R- M., Gangadaran, S., Solati, Z., and Moghadasian M-H. (2016). Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. *Food & Function*, 7(2): 632-642.

Tomás J., Wiese B., and Nader-Macías M-E. (2005). Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. *Journal of Applied Microbiology*, 99(6): 1383-1391.

Vandamme P., De Bruyne K and Pot B, Phylogenetics and systematics. IN, Holzapfel W-H and Wood B-J-B. (2014). Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy. Wiley Blackwell, India, PP31-39.

Varughese C-A., Vakil N-H and Phillips K-M. (2013). Antibiotic-associated diarrhea. *Journal of Pharmacy Practice*, 26(5): 1-18.

Verma S., Kumar V and Singh P. (2016). Managing childhood diarrhoea at homes in india: An opportunity to reduce child morbidity and mortality. *Infection, Disease & Health*, 21(4): 176-183.

Vijayakumar M., Ilavenil S., Kim D-H., Arasu M-V., Priya K and Choi K-C. (2015). In-vitro assessment of the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* KCC-24 isolated from Italian ryegrass (Loliummultiflorum) forage. *Anaerobe*, 32: 90-97.

Vorobjeva L-I. (1999). Propionibacteria. Kluwer Academic publishers, London, P27.

Wang Y-B and Han J-Z. (2007). The Role of Probiotics Cell Wall Hydrophobicity in Bioremediation of Aquaculture. *Aquaculture*, 269(1): 349-354.

Wassie M and 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.

Wedajo B. (2015). Lactic Acid Bacteria: Benefits. Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food. *Probiotics & Health*, 3(2): 1-9.

Woraprayote W., Malila Y., Sorapukdee S., Swetwiwathana A., Benjakul S and Visessanguan O. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, 120: 118-132.

Wyszyńska A., Kobierecka P., Bardowski J and Jagusztyn-Krynicka E-K. (2015). Lactic acid bacteria-20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7): 2967-2977.

Yadav A-K., Tyagi A., Kumar A., Saklani A-C., Grover S and Batish V-K. (2015). Adhesion of indigenous *Lactobacillus plantarum* to gut extracellular matrix and its physicochemical characterization. *Archives of Microbiology*, 197(2): 155-164.

Yang E., Fan L., Jiang Y., Doucette C and Fillmore S. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB express*, 2: 1-12.

Zamfir M., Cornea C-P., Vuyst L-D and Grosu-Tudor S-S. (2014). Biodiversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria. *AgroLife Scientific Journal*, 3(1): 169-176.

Zheng J., Ruan L., Sun M and Gänzle M. (2015). A genomic view of *lactobacilli* and *pediococci* demonstrates that phylogeny matches ecology and physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (20): 7233-7243.

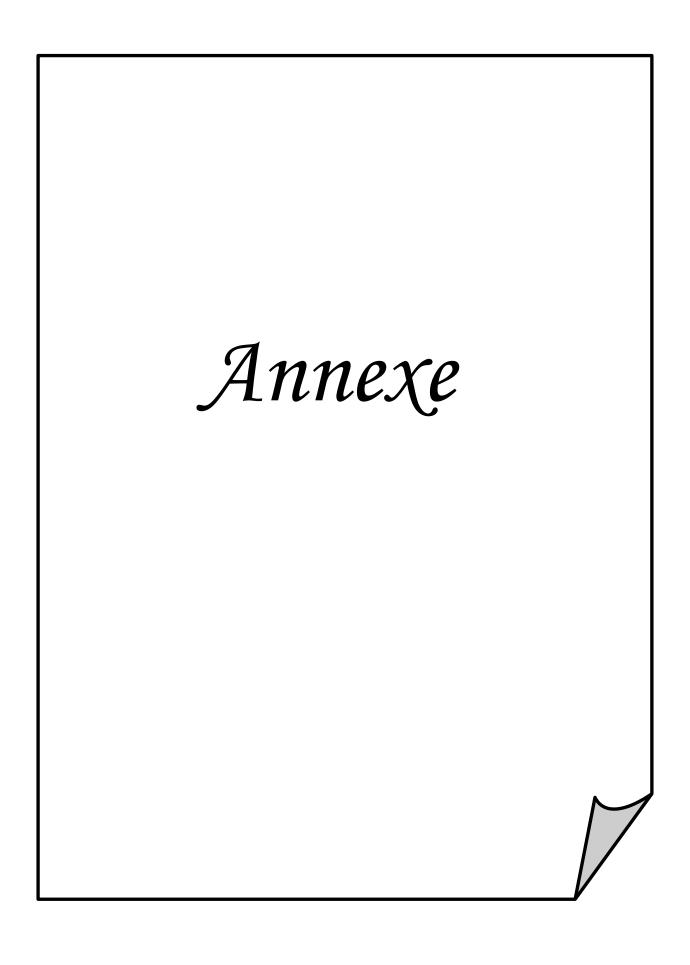


Tableau 4: Résultats de pourcentages d'hydrophobicité de la souche Lactobacillus sp BC12 à pH 4.

	Po	ourcentage d'hydrophobicité	5 %			
Souche	ouche Solvants					
	Xylène Chloroforme Acétate d'éthyle					
BC 12	0	25.32	36.14			

Tableau 5: Résultats de pourcentages d'hydrophobicité de la souche Lactobacillus sp BC12 à pH 5.

	Po	ourcentage d'hydrophobici	té %			
Souche		Solvants				
	Xylène Chloroforme Acétate d'éthyle					
BC 12	0.04	31.29	26.46			

Tableau 6: Résultats de pourcentages d'hydrophobicité de la souche Lactobacillus sp BC12 à pH 7.

	P	ourcentage d'hydrophobici	té %		
Souche		Solvants			
	Xylène Chloroforme Acétate d'é				
BC 12	5.59	21.90	27.92		

Tableau 7 : Résultats de pourcentages d'hydrophobicité de la souche *Lactobacillus* sp BC12 à pH 8.

	Po	ourcentage d'hydrophobicit	é %			
Souche		Solvants				
	Xylène Chloroforme Acétate d'éthyle					
BC 12	1.13	22.56	37.96			

Tableau 8 : Résultats de pourcentages d'hydrophobicité de la souche *Lactobacillus* sp BC12 à Galactose, Lactose, Fructose, Maltose.

Тотого		Pourcentage d'hydrop	ohobicité %	
Temps (heure)	Souche: BC12			
	Xylène	Chloroforme	Acétate d'éthyle	
Galactose	5.1	21.62	34.3	
Lactose	4.83	25.58	34.84	
Fructose	4.83	23.38	35.53	
Maltose	3.06	21.76	31.55	

Tableau 9 : Résultats de pourcentages d'hydrophobicité de la souche *Lactobacillus* sp BC12 à $CaCl_2$, EDTA, Trypsine.

		Pourcentage d'hydropho	obicité %	
Tomas	Souche: BC12			
Temps (heure)	Xylène	Chloroforme	Acétate d'éthyle	
CaCl ₂	2.39	21.3	30.66	
EDTA	18.26	20.62	33.4	
Trypsine	3.17	21.93	33.77	

Tableau 10 : Résultats de pourcentage d'auto-agrégation de la souche *Lactobacillus* sp BC12 à pH 4.

		Pourcentage d'au	uto -agrégation %	
Souche				
	1h	2h	3h	4h
BC 12	90.8	90.15	90.86	91.26

Tableau 11 : Résultats de pourcentages d'auto-agrégation de la souche Lactobacillus sp BC12 à pH 5.

Souche		Pourcentage d'au	to -agrégation %	
	Temps (heure)			
	1h	3h	4h	
BC 12	90.25	90.82	90.13	91.08

Tableau 12 : Résultats de pourcentages d'auto-agrégation de la souche *Lactobacillus* sp BC12 à pH 7.

		Pourcentage d'au	to -agrégation %			
Souche		Temps (heure)				
	1h	2h	3h	4h		
BC 12	90.52	90.67	90.3	90.8		

Tableau 13 : Résultats de pourcentages d'auto -agrégation de la souche *Lactobacillus* sp BC12 à pH 8.

		Pourcentage d'au	ito-agrégation %			
Souche		Temps (heure)				
	1h	2h	3h	4h		
BC 12	90.25	90.76	90.36	90.92		

Tableau 14 : Résultats de pourcentages d'auto-agrégation de la souche *Lactobacillus* sp BC12 à Galactose, Lactose, Fructose, Maltose.

Temps		Pourcentage d'a	uto -agrégation %		
(heure)	Souche: BC12				
	1h	2h	3h	4h	
Galactose	90.66	90.53	90.36	90.81	

Lactose	89.95	90.23	91.13	91.41
Fructose	90.02	90.31	91.13	90.15
Maltose	89.63	90.19	90.24	90.61

Tableau 15 : Résultats de pourcentages d'auto-agrégation de la souche *Lactobacillus* sp BC12 à CaCl₂, EDTA, Trypsine.

	Pourcentage d'auto –agrégation % Souche : BC12			
Tomns				
Temps (heure)	1h	2h	3h	4h
CaCl ₂	91.16	90.32	89.83	88.74
EDTA	90.72	90.35	89.79	89.75
Trypsine	90.35	90.13	90.13	90.12

Bouillon MRS (Man-Rogosa-Sharpe)

Ingrédients	Unité
Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	2g
Sulfate de manganèse	0.05g
Tween 80	1ml
Eau distillée	1000ml

Autoclave 15min à 120°C.

PBS (Bouillon Phosphate Saline)

Ingrédients	Unité	
$Na_2H_2PO_4$		1.44g
K_2HPO_4		0.24g
NaCl		8g
Kcl		0.20g
Eau distillée		1000ml

pH =4, 5,7.4, 8.

Autoclave 15min à 120°C

Réalisé par :

- Abdelli Nadjet
- Aloui Wafa
- Siffour Samia

Membres du Jury:

Présidente : M^{me}. Roula Moussoui S.

Examinateur : *Pr. Sifour M*. Encadreur : *Mr. Khennouf T*.

Thème

Influence de quelques facteurs sur le pouvoir adhésif d'une Souche de *Lactobacillus* d'origine laitière.

Résumé

Les microorganismes probiotiques mis en œuvre dans les aliments fonctionnalisés, sont capables de produire des effets bénéfiques sur la santé du consommateur. Ces effets dépendent à la capacité d'adhésion des probiotiques aux constituants de l'épithélium intestinal.

Le but de ce travail était d'étudier les propriétés adhésives et les caractéristiques de surface de la souche de *lactobacillus* sp BC 12 isolée du lait de chèvre. À cette fin nous avons étudiées l'effet de différents facteurs : pH, sucres, l'EDTA, CaCl₂ et la trypsine sur l'adhésion, l'auto-agrégation et l'hydrophobicité de la souche *lactobacillus* sp BC12.

Les résultats obtenus montrent que la souche *Lactobacillus* sp BC12 a une auto-agrégation élevée et une hydrophobicité faible, ainsi qu'une forte capacité d'adhérence sous l'effet du traitement physico-chimique et enzymatique.

Mots clés: Lactobacillus, Hydrophobicité, Auto-agrégation, Adhésion, lait de chèvre.

Abstract

The probiotic microorganisms implemented in functionalized foods can produce beneficial effects on consumer health. These effects depend on the adhesion ability of probiotics to the constituents of the intestinal tract.

The purpose of this work was to study the adhesive properties and surface characteristics of *lactobacillus* strain sp BC12 isolated from goat milk. To this end we studied the effect of different factors: pH, sugars, EDTA, CaCl₂ and trypsin on the adhesion, auto-aggregation and hydrophobicity of *lactobacillus* sp BC12 strain.

The obtained results showed that *Lactobacillus* sp BC12 strain has a high auto-aggregation and a lowed hydrophobicity as well as a high adhesion capacity under the effect of the physico-chemical and enzymatic treatment.

Key Words: Lactobacillus, Hydrophobicity, Auto-aggregation, Adhesion, goat milk.

الملخص

الكائنات الدقيقة بروبيوتيك المستخدمة في الأغدية يمكن أن تنتج آثار مفيدة على صحة المستهلك. تعتمد هذه التأثيرات على قدرة التصاق مكونات البروبيوتيك على سطح الأمعاء.

كان الهدف من هذا العمل دراسة خصائص الالتصاق والخصائص السطحية لسلالة Lactobacillus sp BC12 المعزولة من حليب الماعز. تحقيقا لهذه الغاية قمنا بدراسة تأثير العوامل المختلفة: درجة الحموضة، السكر، EDTA، من حليب الماعز. درجة الحموضة، السكر، Lactobacillus BC12 sp.

أظهرت النتائج المتحصل عليها أن سلالة Lactobacillus sp BC12 لها أعلى مستوى من التجميع الذاتي و الخاصية الكارهة للماء ضعيفة والإلتصاق كبير تحت تأثير المعالجة الفيزيوكيميائية و الأنزيمية .

الكلمات المفتاحية: Lactobacillus, الخاصية الكارهة للماء, التجمع الذاتي, الالتصاق, حليب الماعز.