

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel

Faculté des Sciences de la Nature  
et de la Vie

Département de Microbiologie Appliquée  
et Sciences Alimentaires



جامعة جيجل

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و علوم التغذية

M.M.B. 02/13

**Mémoire de Fin d'Etudes pour l'Obtention du Diplôme  
Master 2 en Biologie**

**Option : Microbiologie Appliquée**

**Intitulé**

$\frac{2}{2}$

**Etude de quelques aptitudes technologiques et  
probiotiques des souches du genre *Lactobacillus*  
ruminal**

**Membres du Jury :**

**Présidente : M<sup>e</sup>. BAHRI Fathia**

**Examinatrice : D<sup>r</sup>. LAGGOUNE Souheila**

**Encadreur : M<sup>r</sup>. KHENNOUF Tarek**

**Présenté par :**

**M<sup>elle</sup> : MESKINE Siham**

**M<sup>elle</sup> : BENANE Fatima**

Année Universitaire 2012/2013



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

Introduction.....	1
-------------------	---

## Partie 1. Synthèse Bibliographique

### Chapitre I : Bactéries lactiques

I.1. Définition.....	2
I.2. Caractères généraux des bactéries lactiques.....	2
I.3. Habitat et origine des bactéries lactiques.....	2
I.4. Méthodes de classification des bactéries lactiques.....	3
I.5. Caractérisation des différents genres (groupes) des bactéries lactiques.....	4
I.5.1. Le genre <i>Lactobacillus</i> .....	4
I.5.2. Le genre <i>Lactococcus</i> .....	5
I.5.3. Le genre <i>Streptococcus</i> .....	5
I.5.4. Le genre <i>Bifidobacterium</i> .....	5
I.5.5. Les genres <i>Enterococcus</i> et <i>Vagococcus</i> .....	6
I.5.6. Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i> .....	6
I.5.7. Les genres <i>Pediococcus</i> , <i>Tetragenococcus</i> et <i>Aerococcus</i> .....	6
I.5.8. Le genre <i>Carnobacterium</i> .....	7
I.5.9. Le genre <i>Propionibacterium</i> .....	7
I.6. Les propriétés technologiques des bactéries lactiques.....	7
I.6.1. L'aptitude acidifiante.....	7
I.6.2. L'activité protéolytique.....	8
I.6.3. L'activité lipolytique.....	8
I.6.4. L'activité aromatisant.....	8
I.6.5. Propriété texturante.....	8
I.6.6. Production des substances antimicrobiennes.....	8
I.7. L'utilisation des bactéries lactiques.....	9

### Chapitre II: Les probiotiques

II.1. Historique de définition.....	10
II.2. Les micro-organismes probiotiques.....	10
II.3. Critères de sélection des probiotiques.....	11
II.4. Mécanisme d'action des probiotiques.....	11
II.5. Les effets bénéfiques des probiotiques.....	12

### Chapitre III: Les bactéries lactiques ruminales

III.1. Conditions physico-chimiques du rumen.....	14
III.2. Les microorganismes du rumen.....	14
• Les bactéries.....	14
• Les protozoaires.....	15
• Les champignons.....	15
III.3. Les bactéries lactiques prédominantes du rumen.....	16
III.4. Les lactobacilles ruminants.....	16

## Partie 2. Etude expérimentale

### I . Matériel et Méthodes

I.1. Matériel.....	17
I.1.1. Les souches bactériennes testées.....	17
I.1.2. Les souches bactériennes indicatrices.....	17
I.1.3. Les disques d'antibiotiques.....	17
I.1.4. Les milieux de culture.....	18
I.1.5. Tampons.....	18
I.1.6. Appareillage.....	18
I.1.7. Autres.....	18
I.2. Méthodes.....	18
I.2.1. Etude de quelques aptitudes technologiques des souches du genre <i>Lactobacillus</i> ruminal.....	18
I.2.1.1. La détection de l'activité amylolytique.....	18
I.2.1.2. Production d'exopolysaccharides.....	19
I.2.2. Etude de quelques aptitudes probiotiques des souches du genre <i>Lactobacillus</i> ruminal.....	19
I.2.2.1. Tolérance à l'acidité.....	19
I.2.2.2. Résistance aux sels biliaires.....	19
I.2.2.3. Résistance au 0.4 % (v/v) de phénol.....	19
I.2.2.4. Test d'hydrophobicité.....	19
I.2.2.5. La détection de l'activité antimicrobienne (Production des molécules antagonistes).....	20
I.2.2.6. Résistance aux antibiotiques.....	20
I.2.2.7. Agglutination de levure.....	20
I.2.2.8. Test d'auto-agrégation.....	21

### II . Résultats et Discussion

II.1. Les aptitudes technologiques des souches du genre <i>Lactobacillus</i> ruminal.....	22
II.1.1. L'activité amylolytique.....	22
II.1.2. Pouvoir texturant.....	22
II.2. Les aptitudes probiotiques des souches du genre <i>Lactobacillus</i> ruminal.....	22
II.2.1. Taux de survie aux milieux acides.....	22
II.2.2. Taux de survie aux sels biliaires (0.3%) et au (0.4 %) (v/v) de phénol.....	25
II.2.2.1. Taux de survie aux sels biliaires (0.3%).....	26
II.2.2.2. Taux de survie au (0.4 %) (v/v) de phénol.....	26
II.2.3. Pourcentages d'hydrophobicité.....	27
II.2.4. La production des molécules antagonistes.....	30
II.2.5. Résistance aux antibiotiques.....	32
II.2.6. La capacité d'agglutination de levure.....	34
II.2.7. Pourcentage d'auto-agrégation.....	35
<b>Conclusion.....</b>	<b>37</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>38</b>
<b>Annexes</b>	

<b>Tableau 01</b> :Critères différentiels des trois groupes de <i>Lactobacillus</i> .....	5
<b>Tableau 02</b> :Micro-organismes considérés comme probiotiques.....	11
<b>Tableau 03</b> :Les probiotiques – Bienfaits potentiels pour la santé.....	13
<b>Tableau 04</b> :Le taux de survie des souches de <i>Lactobacillus</i> ruminal à différent valeurs de pH.....	23
<b>Tableau 05</b> :Le taux de survie des souches de <i>Lactobacillus</i> ruminal en présence de 0.3% des sels biliaires ou 0.4% de phénol.....	25
<b>Tableau 06</b> :Le pourcentage d'hydrophobicité des souches de <i>Lactobacillus</i> ruminal pour trois solvants (Chloroforme, Xylène et Acétate d'éthyle).....	28
<b>Tableau 07</b> : Activité antibactérienne des lactobacilles ruminales sur les germes indicateurs.....	31
<b>Tableau 08</b> : Résistance des souches de lactobacilles aux antibiotiques suivant la méthode de diffusion de disque.....	33
<b>Tableau 09</b> : L'agglutination des souches de <i>Lactobacillus</i> ruminal avec la levure <i>Sacchromyces cerevisiae</i> .....	34
<b>Tableau 10</b> : Le pourcentage de l'auto-agrégation des souches de <i>Lactobacillus</i> ruminal....	35

<b>Figure 01</b> : Voies principales de fermentation de glucose.....	04
<b>Figure 02</b> : La résistance des souches de <i>Lactobacillus</i> ruminal au milieu acide (pH 2).....	24
<b>Figure 03</b> : La résistance des souches de <i>Lactobacillus</i> ruminal au milieu acide (pH 3).....	24
<b>Figure 04</b> : La résistance des souches de <i>Lactobacillus</i> ruminal au milieu acide (pH 4).....	25
<b>Figure 05</b> : La résistance des lactobacilles ruminales aux sels biliaires à 0.3%.....	26
<b>Figure 06</b> : La résistance des lactobacilles ruminales au phénol à 0,4 %.....	27
<b>Figure 07</b> : Pourcentages d'hydrophobicité des souches <i>lactobacillus</i> ruminal pour le Chloroforme.....	29
<b>Figure 08</b> : Pourcentages d'hydrophobicité des souches <i>lactobacillus</i> ruminal pour le Xylène.....	29
<b>Figure 09</b> : Pourcentages d'hydrophobicité des souches <i>lactobacillus</i> ruminal pour l'Acétate d'éthyle.....	30
<b>Figure10</b> : Activité inhibitrice des souches sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	31
<b>Figure 11</b> : Activité inhibitrice des souches sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29522.....	32
<b>Figure 12</b> : Le pourcentage de l'auto-agrégation des souches de <i>Lactobacillus</i> ruminal.....	35

**DO** : Densité Optique

**EPS**: Exopolysaccharides

**FAO**: Food and Agriculture Organization

**GRAS**: Generally Regarded As Safe

**MRS**: de Man-Rogosa et Sharp

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**sp.** : Espèce

**UFC** : Unité Formant Colonie

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**ATB** : Antibiotique

**HCl** : Chlorure d'hydrogène

**SB** : Sels biliaires

**H%** : Pourcentage d'hydrophobicité

De la naissance à leur mort, les animaux ainsi que l'homme vivent en équilibre avec une flore microbienne extrêmement dense et variée qu'ils abritent, pour l'essentiel, dans la cavité de leur tube digestif.

Parmi ces microorganismes on trouve les bactéries lactiques qui sont utilisées depuis long temps de façon consciente ou non pour leurs activités technologiques. Elles ne se réduisent pas à leur importance économique, mais jouent un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé (**Idoui et al., 2009**). Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation. En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les probiotiques ont établi leur efficacité comme traitement d'appoint alimentaire fournissent des avantages pour les consommateurs, mais la sélection des probiotiques avant l'incorporation dans l'alimentation nécessite un examen minutieux sous la forme de tests *in vitro* ainsi qu'*in vivo* (**Mishra et Prasad, 2005**).

En effet, de plus en plus, les bactéries lactiques sont recherchées pour d'autres performances probiotiques telles que la tolérance aux conditions hostiles du tractus gastro-intestinale (l'acidité et bile), ainsi que la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales et la résistance aux antibiotiques (**Corrieu et Luquet, 2005**).

Parmi les écosystèmes où on peut trouver les bactéries lactiques, on a le rumen qui est le fermenteur ouvert dont leurs caractéristiques sont favorables au développement des différents micro-organismes (**Mcsweeney et al., 2005**).

Notre présente étude est consacrée à l'étude de quelques aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries du genre *Lactobacillus*, isolés et identifiés à partir du rumen de la chèvre dans le but de sélectionner des souches performantes que ce soit dans le cote technologique et surtout probiotique afin de les utiliser ultérieurement dans les différents produits à base de probiotiques.

### I.1. Définition

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomiques. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres de bactéries à Gram positif possédant des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes, mais avec parfois peu d'homologie de leurs acides nucléiques (**Hassan et Frank, 2001 ; Pilet et al., 1998**). Les bactéries lactiques sont des microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme (**Dortu et Thonart, 2009**).

### I.2. Caractères généraux des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes (**Doleyres, 2003**). D'un point de vue phylogénétique, ces bactéries appartiennent à la branche des *Clostridia*, regroupant des genres tels que *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (**Pilet et al., 2005**). Elles sont des bactéries à Gram positif, dépourvues des activités catalase et nitrate réductase, et ce sont des coques, coccobacilles ou bâtonnets qui possèdent moins de 55 % de bases GC dans leur génome (**Pilet et al., 2005 ; Hassan et Frank, 2001**).

Elles sont généralement immobiles, asporulées, non pathogènes, non pigmentées, oxydase négative, anaérobies ou aérotoles et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentes cibles (**Badis et al., 2005 ; Hassan et Frank, 2001 ; Pilet et al., 1998**).

- Elles fermentent les glucides en acide lactique, d'où une diminution du pH favorable à la conservation des aliments. Leur pouvoir antagoniste résulte aussi d'une compétition pour les substrats et, si les conditions de développement sont favorables, de l'élaboration de bactériocines comme la nisine (**Labioui et al., 2005**).
- Il est possible de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides. En effet les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique, alors que les bactéries hétérolactiques peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> en plus de l'acide lactique (**Drouault et Corthier, 2001**) (Figure 1).
- Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les genres de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, ainsi que certains espèces de *Lactobacillus*, fermentent les sucres par la voie d'Embden Meyerhoff (EMP) en pyruvate, qui est converti par la suite en acide lactique par l'enzyme lactate déshydrogénase (**Mayo et al., 2010**). Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (**Raynaud, 2006**).
- Les bactéries lactiques qui fermentent les sucres en produisant, en plus de l'acide lactique (moins de 1,8 mole par mole de glucose), de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> sont dites hétérofermentaires. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et certains espèces de *Lactobacillus* (**Mayo et al., 2010 ; Raynaud, 2006**).

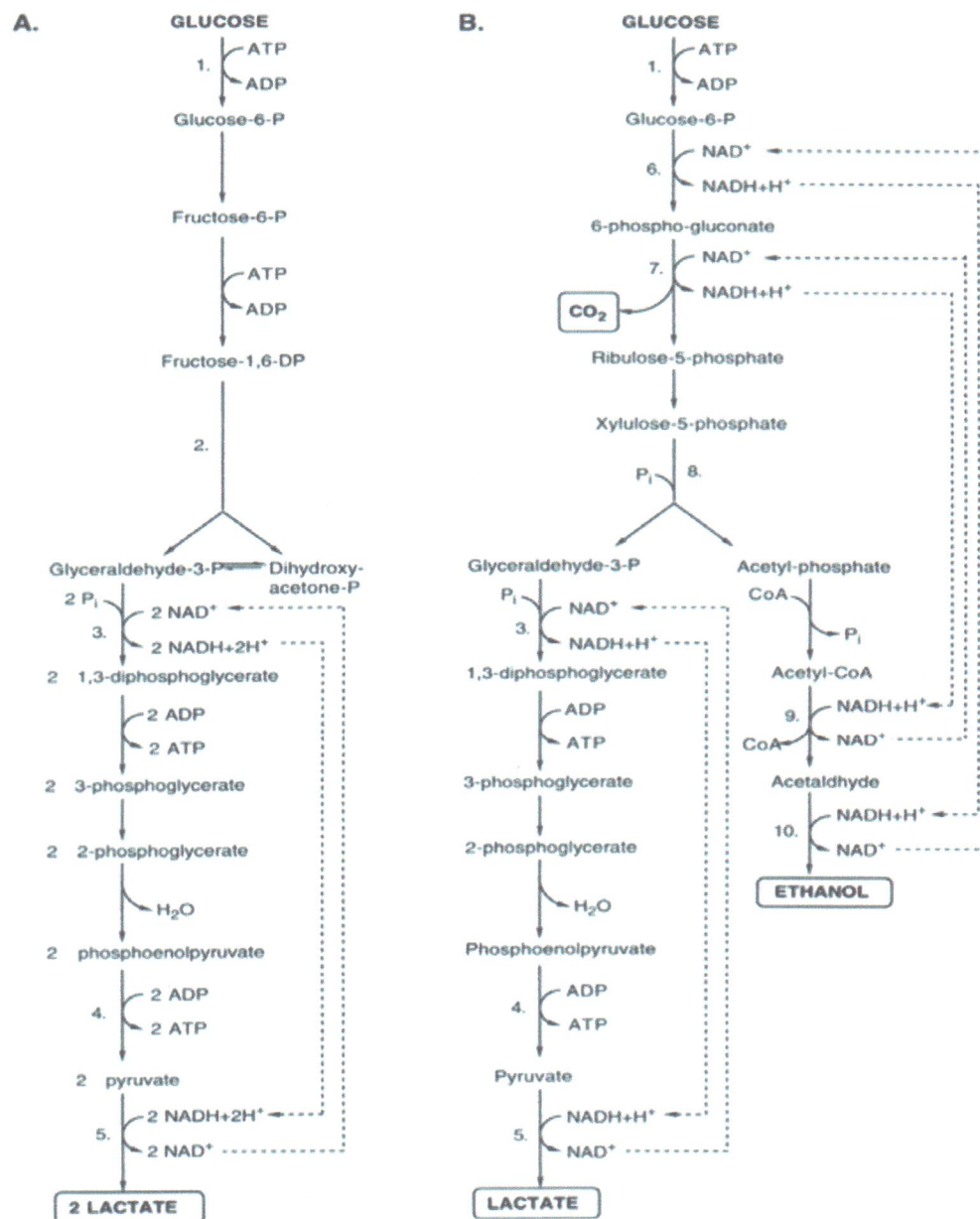
### I.3. Habitat et origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, le poisson, les végétaux et les céréales. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (**Yao et al., 2009 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Drouault et Corthier, 2001 ; Hassan et Frank, 2001**).



#### I.4. Méthodes de classification des bactéries lactiques

Les critères phénotypiques et taxonomiques les plus importants sont l'aspect morphologique (Bacilles ou coques), les produits finaux de fermentation (homofermentaire ou hétérofermentaire), la fermentation des glucides, les limites de température de croissance, la configuration optique de l'acide lactique produit, et la tolérance de sel (Pilet *et al.*, 1998). Les séquences d'ARNr sont utilisées pour déterminer avec précision phylogénétique les relations entre les bactéries. Ceci et d'autres méthodes génétique sont conduit à la réorganisation de certains genres de bactéries lactiques (par exemple, le reclassement des streptocoques lactiques de *Lactococcus* spp.) (Hassan et Frank, 2001).



**Figure 01:** Voies principales de fermentation de glucose : (A) fermentation homolactique (glycolyse, voie d'Embden Meyerhof-Parnas); (B) fermentation hétérolactique (voie 6-phosphogluconate/phosphokétolase).

Des enzymes choisies sont numérotées : 1. Glucokinase; 2. Fructose-1,6-diphosphate aldolase; 3. Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase; 4. Pyruvate kinase; 5. Lactate déshydrogénase; 6.

Glucose-6-phosphate déshydrogénase; 7. 6-phosphogluconate déshydrogénase ; 8. Phosphokétolase; 9. Acétaldéhydedéshydrogénase; 10. Alcool déshydrogénase (Axelsson, 2004).

### I.5. Caractérisation des différents genres (groupes) des bactéries lactiques

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent plusieurs genres bactériens:

*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Dolosigranulum*, *Olsenella*, *Paralactobacillus*, *Parascardovia*, *Scardovia*, *Sporolactobacillus* et *Propionibacterium* (Dortu et Thonart, 2009 ; Pot, 2008).

#### I.5.1. Le genre *Lactobacillus*

*Lactobacillus* est le genre principal de la famille *Lactobacillaceae*, ordre *Lactobacillales*, la class *Bacilli*, Phylum *Firmicutes* (Felis et al., 2009). Il a été décrit en 1901 pour regrouper des bactéries à Gram positif isolées de produits laitiers et à métabolisme fermentaire. Il regroupe environ 140 espèces (Singh et al., 2009 ; Pot, 2008 ; Guiraud et Rosec, 2004). Les micro-organismes appartenant au genre *Lactobacillus* se distinguent des autres bactéries à Gram positif par le fait qu'ils sont anaérobies facultatifs, stricts ou microaérophiles, immobiles ou mobiles grâce à des flagelles péritriches, dépourvus de catalase et d'oxydase (certains ont une pseudo-catalase). Très polymorphes, leur morphologie microscopique varie d'une espèce à l'autre de coccobacilles aux bacilles fins et allongés, isolés ou en chaînettes de tailles variables (Privat et Thonart, 2011 ; Singh et al., 2009;Guiraud et Rosec, 2004).Les lactobacilles sont rarement pathogènes, asporulés. Leurs exigences nutritionnelles sont complexes, ils sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques, et leurs températures de croissance (2 à 53 °C) sont très variables d'une espèce à l'autre, mais elles sont toutes acidophiles avec un pH optimal de croissance de 5,5 à 6,2. Leurs pourcentages en GC sont de 36 à 47 (Privat et Thonart, 2011 ; Guiraud et Rosec, 2004). Leur métabolisme énergétique est fermentaire (Pilet et al., 2005), et donne lieu à une classification répartie en trois groupes distincts :

- **Le groupe I «*Thermobacterium*»** : regroupe les lactobacilles homofermentaires stricts qui ne fermentent que les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof en produisant presque exclusivement du lactate (Privat et Thonart, 2011 ; Hassan and Frank, 2001). Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces généralement thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C (Pilet et al., 2005 ;Guiraud et Rosec, 2004). Telles que *L. acidophilus* issu de la flore intestinale, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *aulgaricus* qui participent à la fermentation des produits laitiers, *L. farciminis*, *L. johnsonii*, *L. amylovorus*, *L. paralimentarius* (Privat et Thonart, 2011).
- **Le groupe II «*Streptobacterium*»** : renferme les lactobacilles homo-hétérofermentaires facultatifs qui fermentent les hexoses, mais aussi les pentoses en lactate et acétate par la voie d'Embden-Meyerhof (Privat et Thonart, 2011 ; Hassan et Frank, 2001). Il est constitué d'une vingtaine d'espèces majoritairement mésophiles qui se développe à 15°C (Pilet et al., 2005;Guiraud et Rosec, 2004) dont *L. alimentarius*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. graminis*, *L. paracasei*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. sakei*. Ces espèces bactériennes sont présentes dans les végétaux fermentés comme l'ensilage et dans les produits carnés et laitiers fermentés (Privat et Thonart, 2011).
- **Le groupe III «*Betabacterium*»** : regroupe les lactobacilles hétérofermentaires stricts qui fermentent les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol) et CO<sub>2</sub>. Les pentoses aussi sont fermentés en lactate et en acétate (Hassan et Frank., 2001). Ces *Lactobacillus* ont un faible pouvoir acidifiant et produisent des substances aromatiques (Privat et Thonart, 2011). Ce groupe rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles (Pilet et al., 2005) il s'agit notamment de *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. hilgardii*, *L. fructivorans*, *L. panis*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. hammersii*, *L. sanfranciscensis*,

*L. spicheri*, *L. kimchi* et *L. frumenti*. Ces espèces se retrouvent dans les levains de panification et les produits laitiers fermentés (Privat et Thonart, 2011).

**Tableau 01** : Critères différentiels des trois groupes de *Lactobacillus* (Larpent, 1996)

	<i>Thermobacterium</i>	<i>Streptobacterium</i>	<i>Betabacterium</i>
ADH	-	±	+
Glucose (gaz)	-	-	+
Glucosides	±	+	-
Gluconate (gaz)	-	+	+
Aldolase	+	+	-
Pentoses	-	±	±
Thiamine	-	-	+
Acide lactique	DL ou L	D ou DL	DL
G+C%	34,7 -50,8	33-46,4	35-53,4

Les *Lactobacillus* sont présents naturellement chez l'homme et l'animal et constituent la flore autochtone dominante de la partie supérieure du tractus intestinal. Les *Lactobacillus* sont également naturellement présents dans les aliments tels que la viande et ses dérivés ainsi que les produits laitiers (Felis et al., 2009). Dans l'environnement, on peut les rencontrer sur les végétaux, le sol, dans les eaux de surface et dans les eaux usées (Caramia et Silvi, 2011; Pilet et al., 2005).

#### 1.5.2. Le genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* représente les streptocoques dits « lactiques » qui concerne les streptocoques non hémolytiques ( $\gamma$ ) appartenant au groupe sérologique N, car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al., 2005 ; Guiraud et Rosec, 2004). Les lactocoques se présentent sous forme de coques et forment des chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+) (de l'isomère L), anaérobies facultatives à micro-aérophiles. Leur température de croissance optimale est proche de 30°C. Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6.5% de NaCl, ou lorsque le pH est supérieur à 9.6. L'espèce type de ce genre est *Lactococcus lactis* (Raynaud, 2006 ; Doleyres, 2003 ; Hassan et Frank, 2001).

#### 1.5.3. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* appartient à la famille *Streptococcaceae* du l'ordre *Lactobacillales*, la classe *Bacilli* du phylum *Firmicutes*. Il contient environ 67 espèces des coques Gram positive (Felis et al., 2009), avec un contenu en G+C de 35 à 46% (Larpent, 1996). Ce genre comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S. pyogenes* et *S. agalactiae*, d'autres sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*S. mutans*), ces espèces étant rarement rencontrées dans les aliments. L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène (Pilet et al., 2005).

#### 1.5.4. Le genre *Bifidobacterium*

Les bifidobactéries sont des bâtonnets de morphologie variée, cellules courts, coccoïdales, cellules ramifiées, bifurquées, spatulées, isolées ou en chaînes, disposées en V ou en palissade. Ces bactéries sont des Gram positif, non mobiles, non sporulant. Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie strict, leur contenu GC élevé, et la présence d'une enzyme caractéristique, la fructose-6-phosphate phosphocétolase. Ces bactéries

jouent un rôle majeur dans l'équilibre et la stabilité de la flore intestinale, d'où l'appellation de culture probiotique (Pilet et al., 2005 ; Larpent, 1996). Parmi les 32 espèces de bifidobactéries répertoriées, 10 sont considérées comme étant d'origine humaine, alors que les autres sont isolées dans les matières fécales d'animaux divers. *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis* et *B. breve* ont été les plus étudiées à cause de leur aptitude à fermenter le lait ou à être incorporées dans les aliments. Les conditions optimales de croissance des bifidobactéries se situent à des températures comprises entre 37°C et 41°C, et à des valeurs de pH comprises entre 6.5 et 7. Aucune croissance n'est observée à des températures inférieures à 25°C et supérieures à 45°C et à des valeurs de pH inférieures à 4.5 ou supérieures à 8.5. Les bifidobactéries produisent de l'acide acétique et de l'acide lactique. (Pilet et al., 2005 ; Doleyres, 2003).

#### I.5.5. Les genres *Enterococcus* et *Vagococcus*

Le genre *Enterococcus* rassemble la plupart des espèces du groupes sérologiques D et comprend notamment les espèces anciennement désignées sous le terme « streptocoques fécaux », comme *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* (Hassan et Frank, 2001). Ce sont également des coques homofermentaires qui se caractérisent par leur développement à 10 et 45°C. Leur habitat est très varié : intestin de l'homme et des animaux, produits végétaux, sol, produits laitiers. Certaines espèces de *Streptococcus* et *Lactococcus* isolées de poissons et d'eau douce et qui possèdent des particularités d'être mobiles, ont été répertoriées dans le nouveau genre *Vagococcus* mais ne concernent pas les aliments (Pilet et al., 2005).

#### I.5.6. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Les espèces du genre *Leuconostoc* se présentent sous forme d'éléments coccoïdes à lenticulaires et/ou coccobacilles à Gram positif. Ils sont immobiles, non sporulés et se développent en aérobiose et en anaérobiose. Les enzymes protéolytiques sont absentes et l'arginine n'est pas catabolisée (Hassan et Frank, 2001). Le glucose est fermenté avec une production de gaz par voie hétérofermentaire. La température optimale de croissance de ces bactéries se situe entre 20 et 30°C. Ils sont généralement capsulés, cette propriété entraîne fréquemment l'apparition d'une viscosité dans le milieu (Guiraud et Rosec, 2004). Les *Leuconostoc* sont habituellement rencontrés sur les végétaux ainsi que les produits laitiers, le vin (Pilet et al., 1998) et les liquides à base de sucre. Leur présence intervient dans le goût et l'arôme du lait est dû à la production de certains composés aromatiques comme l'acétoïne et le diacétyle. Il n'est donc pas surprenant de retrouver des espèces du genre *Leuconostoc* dans la cavité buccale et dans le tube digestif de l'homme ou des animaux. *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum* ont souvent présentes naturellement dans les produits à base de viande (Axelsson, 2004).

L'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Pilet et al., 2005).

Les espèces de ce dernier genre sont de courts bacilles se présentant par paires ou courtes chaînes. Ils se différencient des autres bacilles hétéro-fermentaires par la présence d'une alanine et/ou une sérine dans le pont inter-peptidique du peptidoglycane (Axelsson, 2004).

#### I.5.7. Les genres *Pediococcus*, *Tetragenococcus* et *Aerococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires ou hétérofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, anaérobies facultatives le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolèrent jusqu'à 18% de NaCl. Ils sont souvent présents dans la bière, le vin, les produits végétaux et les saumures (anchois salés) (Pot, 2008 ; Pilet et al., 2005). Les pédiocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries. Les *Aerococcus* sont proche des *Pediococcus* (Guiraud et Rosec, 2004).

### I.5.8. Le genre *Carnobacterium*

*Carnobacterium* est morphologiquement proche de *Lactobacillus* les espèces de ce genre se différencient par leur tendance psychrotrophe et leur production majoritaire de l'isomère L de l'acide lactique. Les carnobactéries sont phylogénétiquement plus proche du genre *Enterococcus* et ils sont hétérofermentaires. Ce genre comprend 9 espèces isolées des produits carnés ou des produits de la mer, 4 espèces sont fréquemment associées aux aliments *C. divergens*, *C. piscicola* (ou *maltaromicus*), *C. mobile* et *C. gallinarum*. (Pot, 2008 ; Pilet et al., 2005 ; Guiraud et Rosec, 2004).

### I.5.9. Le genre *Propionobacterium*

Les bactéries propioniques appartiennent au phylum des *Actinobacteria*, ils ne sont pas considérées comme appartenant à des bactéries lactiques, mais sont étroitement liées à des bactéries corynéformes du groupe *Actinomycetaceae*. Ce sont des bactéries Gram+, catalase positive, non mobiles, non sporulantes, anaérobies à aérotolescentes, mésophiles et leurs pH optimal de croissance est entre 6,5 et 7, mais supporte des pH de 5,1 à 8,5. Elles n'ont pas d'exigences nutritionnelles particulières mais nécessitent la présence de la biotine (vitamine H) et de vitamine B5 (acide pantothénique) pour croître. Elles produisent de grandes quantités de l'acide propionique et acétique et du dioxyde de carbone à partir des sucres et de l'acide lactique. (Normand et al., 2006 ; Hassan et Frank, 2001). Les bactéries propioniques sont des ferments importants en technologie fromagère, elles sont plus utilisées pour leur rôle dans la formation de la saveur spécifique des fromages à pâte pressée cuite. Ces caractéristiques sensorielles sont liées aux produits de la fermentation, ainsi qu'à leur action lipolytique et au catabolisme des acides aminés (Normand et al., 2006).

## I.6. Les propriétés technologiques des bactéries lactiques

Dans les aliments fermentés, le rôle principal des bactéries lactiques est l'acidification qui participe à la saveur et à la texture des produits mais elles exercent au travers de leur métabolisme d'autres rôles sur les caractéristiques organoleptiques et technologiques des aliments fermentés ou non (Pilet et al., 2005). Elles permettent, de part leur métabolisme, d'augmenter la durée de conservation d'origine des denrées et leur confèrent une saveur et une texture différente (Badis et al., 2005).

### I.6.1. L'aptitude acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires (Monnet et al., 2008). L'acide lactique, qui est le produit principal du métabolisme fermentaire, joue un rôle majeur dans la conservation des aliments puisqu'il inhibe fortement la croissance des bactéries pathogènes à pH bas. Il a également un rôle direct dans l'industrie laitière puisqu'il permet la formation du caillé à pH bas (Raynaud, 2006). Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent être résumées ainsi par (Monnet et al., 2008):

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés ;
- Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires ;
- Limitation des risques de développement des flores pathogènes et d'altération dans les produits finaux ;
- Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.

Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, les quelles vont conditionner le choix des souches (Béal et al., 2008).

### I.6.2. L'activité protéolytique

Du fait de leurs nombreuses auxotrophies pour les acides aminés, la croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines (Atlan et al., 2008). Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée (Béal et al., 2008). Les bactéries lactiques sont douées d'activités protéolytiques variées et complexes incluant des protéases et des peptidases intracellulaires et extracellulaires. La protéolyse dépend du temps de la fermentation, de la température, des espèces bactériennes et de la richesse du produit en protéines (Zinedine, 2004).

### I.6.3. L'activité lipolytique

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal et al., 2008). D'une manière générale, on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2 à C8), et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (Atlan et al., 2008).

### I.6.4. L'activité aromatisante

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que: l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses (Béal et al., 2008 ; Monnet et al., 2008). Les bactéries lactiques aromatisantes comme *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar. *Diacetylactis* produisent des composés aromatisants qui contribuent au goût des produits frais et la production de CO<sub>2</sub> responsable d'ouvertures dans le fromage (Doleyres, 2003).

### I.6.5. Propriété texturante

Certaines bactéries lactiques produisent des exopolysaccharides qui influencent l'aspect et la texture des produits fermentés (Doleyres, 2003). Le rôle principal des exopolysaccharides est d'améliorer les propriétés mécaniques des produits en augmentant leur texture et leur viscosité (Monnet et al., 2008).

### I.6.6. Production des substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites ont des propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009 ; Doleyres, 2003).

La production d'acides organiques, notamment l'acide lactique et acétique, est la base de la diminution du pH du milieu et, par conséquent, de la chute du pH<sub>int</sub> des bactéries cibles. Au niveau de la bactérie cible, les premières structures touchées par l'acidification du milieu extracellulaire sont évidemment les macromolécules de surface (flagelle, pili, récepteur chimique, paroi, etc.). Au cours de la fermentation, lorsqu'on atteint des niveaux de pH bas, une grande quantité de l'acide lactique est contenue dans sa forme indissociée (AH). Cette forme indissociée, étant lipophile, elle peut diffuser passivement à travers la membrane, se dissocier dans le cytoplasme et provoquer une chute du pH<sub>int</sub> par la libération des protons. L'acide acétique produit à faible échelle lors de la fermentation peut interagir avec les membranes cellulaires pour causer une acidification intracellulaire et une dénaturation protéique. Son activité antimicrobienne est plus efficace que celle de l'acide lactique (Privat et Thonart, 2011). Le peroxyde d'hydrogène ou les dérivés de l'oxygène produits par les bactéries lactiques peuvent exercer un effet inhibiteur sur certaines flores d'altération comme les *Pseudomonas* (Pilet et al., 2005).

Les bactériocines sont définies comme étant des molécules de nature protéiques, synthétisées par voie ribosomale de certaines souches bactériennes, et sécrétés dans le milieu extracellulaire. Ils présentent une action antibactérienne dirigée essentiellement contre des bactéries taxonomiquement proches de la souche productrice et contre certaines espèces telles que *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* et *Listeria*. Les bactériocines de bactéries lactiques sont généralement des peptides cationiques et amphiphiles, responsables de la perméabilisation de la membrane des cellules cibles (Privat et Thonart, 2011 ; Diop et al., 2010; Dortu et Thonart, 2009 ; Morisset et al., 2005).

Ces bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action. Toutes les bactériocines produits par des bactéries lactiques décrits jusqu'à présent ont une activité dirigée uniquement contre les bactéries Gram+ car la membrane externe des bactéries Gram- ne permet pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Privat et Thonart, 2011 ; Dortu et Thonart, 2009). Les bactériocines présentent des modes d'action similaires. Il se forme en effet un pore dans la membrane de la cellule cible, occasionnant une perméabilité de celle-ci et donc une dissipation de la force proton motrice, entraînant la mort cellulaire (Privat et Thonart, 2011).

### I.7. L'utilisation des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (Streit, 2008).

- Dans l'industrie alimentaire : Ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits. Les laits fermentés et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins (fermentation malolactique) sont des exemples de transformation de matières premières d'origine végétale (Streit, 2008). L'action des bactéries lactiques au cours de la fermentation a été associée à l'élaboration de l'arôme et de la texture du produit final mais aussi au maintien d'une bonne sécurité alimentaire grâce aux acides organiques produits (Tabak et Bensoltane, 2012 ; Yao et al., 2009). Les bactéries lactiques sont de bons candidats pour la technologie de bio-préservation car, elles produisent souvent une large gamme de composés inhibiteurs (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, bactériocines, reutéline ... etc.) (Tabak et Bensoltane, 2012; Doleyres, 2003). De plus elles ont souvent le statut GRAS (generally recognise as safe) par l'US-FDA (the American Food and Drug Association) et elles bénéficient d'une image associée à la santé dans les produits laitiers (Leroi, 2009).
- Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides et de mannitol). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins (Streit, 2008). Les propriétés probiotiques des bactéries lactiques et l'inhibition des bactéries pathogènes sont particulièrement importantes (Tabak et Bensoltane, 2012 ; Yao et al., 2009).

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation de cultures lactiques à effets bénéfiques pour la santé ou "probiotiques" (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale (Ninane et al., 2009).

### II.1. Historique de définition

Le terme "probiotique" est un mot relativement nouveau qui signifie "en faveur de la vie" et qui est actuellement utilisé pour désigner des microorganismes associés à des effets bénéfiques chez l'homme et les animaux (Patterson, 2008).

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. En 1907 le scientifique russe Elie Metchnikoff avait remarqué que des populations rurales bulgares consommaient régulièrement des produits laitiers fermentés et que cela semblait améliorer leur longévité. Il en conclut que ces produits contenaient des bactéries ayant des effets bénéfiques sur la santé du consommateur (Singh et al., 2011). A cette époque, Henry Tissier, pédiatre français, a observé que les selles des enfants souffrant de diarrhée contenaient un petit nombre de bactéries caractérisées par une morphologie particulière en forme de Y. Ces bactéries "bifides" étaient au contraire abondantes chez les enfants sains. Ce sont Metchnikoff et Tissier qui ont été les premiers qui ont avancé dans leurs travaux des propositions scientifiques au sujet de l'utilisation probiotique des bactéries (FAO/OMS, 2001).

Une des premières définitions des probiotiques comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposée par Lilly et Stillwell en 1965. Ensuite, en 1974, Parker choisit d'élargir la définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore intestinale » (Caramia et Silvi, 2011 ; Marteau et Seksik, 2005). Plus tard, Fuller en 1989 a redéfini les probiotiques comme étant des microorganismes vivants pouvant avoir un effet bénéfique chez l'hôte qui les ingère grâce à une amélioration de l'équilibre de la microflore intestinale. Puis Havenaar et al. (1992) ont proposé de les définir comme étant des monocultures ou des cultures mixtes de microorganismes vivants qui, lorsqu'elles sont administrées à un animal ou à un être humain, ont un effet bénéfique grâce à l'amélioration des propriétés de sa microflore indigène (Caramia et Silvi, 2011; Harun-ur-Rashid et al., 2007). En fin en 2001, un comité d'experts de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (Food and Agricultural Organization, FAO) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définissait les probiotiques comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante dans l'alimentation, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (YAO et al., 2009 ; Collado et al., 2008; FAO/OMS, 2001).

### II.2. Les micro-organismes probiotiques

Sont considérés comme probiotiques différentes souches bactériennes ainsi que les levures (*Saccharomyces*). Les bactéries probiotiques sont principalement des bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*,...), des bifidobactéries et de moindre existence des *Propionibacterium* et *Bacillus* (Tableau 1) (Caramia et Silvi, 2011; Muller et al., 2009 ; Guarner et al., 2008 ; Vinderola et Reinheimer, 2003). Les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* abritent des espèces considérées comme probiotiques. D'autres bactéries, qui ne colonisent pas naturellement le tractus digestif des mammifères, mais sont utilisées comme starters dans l'industrie laitière sont également considérées comme des probiotiques, *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* (Raynaud, 2006).



Tableau 02: Micro-organismes considérés comme probiotiques (Caramia et Silvi, 2011)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>L. acidophilus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. casei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. salivarius</i>	<i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i> <i>B. thermophilum</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Propionibacterium</i>	Levures		Autres	
<i>P. freudenreichii</i> <i>P. freudenreichii</i> subs <i>p. shermanii</i> <i>P. jensenii</i>	<i>Kluveromyces lactis</i> <i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus acidilactici</i>	

### II.3. Critères de sélection des probiotiques

Le comité d'experts sur les probiotiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture et Organisation Mondiale de la Santé a proposé des lignes directrices pour l'évaluation des micro-organismes probiotiques. Les probiotiques doivent :

- Pouvoir survivre au passage à travers le tube digestif;
- Pouvoir croître dans l'intestin;
- Être des organismes à Gram positif, incluant, sans nécessairement s'y limiter, les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*;
- Démontrer un bienfait précis pour la santé mesuré par des tests définis (*in vitro*, animaux ou humains);
- Avoir des régimes de dosage et des durées d'utilisation définies (Patterson, 2008 ; FAO/OMS, 2001).

Et doivent être aussi caractérisées par: le manque de pathogénicité, la tolérance aux conditions gastro-intestinales (acide et la bile), la stabilité en milieu acide, la capacité d'adhérer aux muqueuses gastro-intestinales, l'exclusion des pathogènes compétitifs, activité immunostimulante, activité antioxydante et l'origine (l'origine de préférence de l'homme) (Mishra et Prasad, 2005; Béal et al., 2008 ; Collado et al., 2008 ; Kalliomaki et al., 2008).

### II.4. Mécanisme d'action des probiotiques

Différents mécanismes d'action des probiotiques ont été proposés mais la plupart sont hypothétiques (Guillot, 2001). Par exemple, ceux-ci sécrètent diverses substances antimicrobiennes telles que des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines. De plus, les probiotiques entrent en compétition avec les agents pathogènes pour les sites d'adhésion situés sur les muqueuses. Les probiotiques peuvent également modifier l'environnement où ils se retrouvent en modulant le pH et/ou le potentiel d'oxydo-réduction, ce qui peut compromettre l'établissement des pathogènes. Enfin, les probiotiques peuvent procurer des effets bénéfiques en stimulant l'immunité non spécifique et en modulant la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Une combinaison de souches probiotiques est souvent

utilisée dans le but d'amplifier ces effets bénéfiques (**Bonifaitet al., 2009 ; Guarner et al., 2008**).

### II.5. Les effets bénéfiques des probiotiques

L'effet favorable peut résulter soit d'un effet nutritionnel direct, soit d'un effet sanitaire, les probiotiques agissant alors comme des bio-régulateurs de la microflore intestinale en renforçant les défenses naturelles de l'hôte (**Guillot, 2001**). Les probiotiques ont été utilisés en premier temps comme outil thérapeutique, Les effets bénéfiques comprennent le contrôle de la diarrhée infectieuse aigue, l'inhibition de la croissance et de l'activité métabolique des micro-organismes pathogènes, la modulation de la croissance et de l'activité de la flore commensale, et la régulation de la réponse inflammatoire et immunitaire intestinale. Les probiotiques limitent également l'adhésion des micro-organismes pathogènes entéro-invasifs (Salmonelles, Shigelles, *E. coli* entérotoxigène, *Vibrio cholerae*) aux cellules épithéliales intestinales (**Piquet et al., 2007**).

La plupart des études réalisées avec différents probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei shirota*, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB-12, *Enterococcus faecium* SF68, *S. boulardii*...etc.) ont rapporté leur efficacité, en association avec la réhydratation, en traitement de la diarrhée infectieuse aigue virale ou bactérienne chez l'enfant et l'adulte (**Guarner et al., 2008; Patterson, 2008 ; Piquet et al., 2007**). Dans la diarrhée associée aux antibiotiques, il y a une forte évidence d'efficacité pour *Saccharomyces boulardii* ou *L. rhamnosus* GG chez l'adulte et l'enfant avec thérapie antibiotique. Autres recherches ont indiqués l'efficacité de *L. casei* DN-114 001 chez l'adulte hospitalisé pour prévenir une diarrhée associée aux antibiotiques (**Guarner et al., 2008**).

Concernant les applications des probiotiques dans l'inhibition des pathogènes de l'intestin, la FAO/OMS ont également rapportés qu'ils sont actifs contre *Helicobacter pylori*, un agent pathogène Gram négatif responsable de la gastrite de type B, d'ulcères peptiques et du carcinoïde gastrique. Les données *in vitro* et sur les animaux indiquent que les bactéries lactiques peuvent inhiber la croissance des agents pathogènes et diminuer l'activité des uréases nécessaires pour que l'agent pathogène reste dans le milieu acide de l'estomac. Les probiotiques seuls ne sont pas capables d'éradiquer *H. pylori* donc certains probiotiques (essentiellement des souches de lactobacilles) pourraient augmenter le taux d'éradication d'*H. pylori* en combinaison avec le traitement antibiotique spécifique, diminuer les effets secondaires des antibiotiques prescrits en traitement d'éradication, et diminuer l'intensité de la gastrite à *H. pylori* (**Guarner et al., 2008 ; Piquet et al., 2007**). Les données concernant l'homme sont limitées, mais il y a des preuves d'un effet induit par *L. johnsonii* La1 (**FAO/OMS, 2001**).

De façon générale, très peu de données sont disponibles concernant les effets des probiotiques sur l'activité du système immunitaire *in vivo* chez l'Homme. La plupart des travaux sont expérimentaux, *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal, et suggèrent que certains probiotiques ont la capacité d'augmenter ou de moduler la réponse inflammatoire et immunitaire (**Piquet et al., 2007**). Il y a des expériences montrent que certaines bactéries lactiques ingérées peuvent moduler des fonctions du système immunitaire. Certains constituants des parois cellulaires auraient un effet dans l'immunomodulation. L'ingestion d'un lait fermenté contenant *L. acidophilus* La1 augmente *in vivo* l'activité phagocytaire des granulocytes du sang chez l'homme. Une étude est montrée que l'ingestion d'un mélange de *B. bifidum* et *L. acidophilus* (Infloran®) entraîne une augmentation du pourcentage de lymphocytes B dans le sang. Des études plus spécifiques portant sur la production d'anticorps ont montré que l'ingestion de *L. rhamnosus* GG raccourcit la durée des diarrhées causées par les rotavirus et stimule en parallèle la production d'anticorps contre les rotavirus (**Drouault et Corthier, 2001**). En clinique humaine, quelques études suggèrent que les probiotiques pourraient avoir une place dans la prévention et/ou le traitement de l'allergie (**Piquet et al., 2007**).

*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* améliorent la digestion du lactose et réduisent les symptômes liés à l'intolérance au lactose. Ceci a été

confirmé par un grand nombre d'études contrôlées portant sur des individus consommant des yaourts avec des cultures vivantes (**Guarner et al., 2008 ; Drouault et Corthier, 2001**). Jusqu'à maintenant, les propriétés d'exclusion compétitive des souches adhérentes de bactéries lactiques ont été uniquement démontrées *in vitro*. Par exemple, *B. bifidum* et *L. acidophilus* LB sont capables d'inhiber l'adhésion de *Salmonella typhimurium* et de la bactérie entéropathogène *E. coli* aux cellules Caco-2. Les résultats obtenus avec ces modèles *in vitro* restent là encore à valider par des données *in vivo* (**Drouault et Corthier, 2001**). L'effet des bactéries lactiques sur le métabolisme du cholestérol reste encore controversé. Alors que plusieurs études rapportent que la concentration en cholestérol sérique diminue pendant la consommation de grandes quantités (680 à 5 000 ml par jour) de produits laitiers fermentés (**Drouault et Corthier, 2001**). (**Guarner et al., 2008 ; Mishra et Prasad, 2005**).

**Tableau 03** : Les probiotiques – Bienfaits potentiels pour la santé (**Patterson, 2008**).

Effets intestinaux	Effet sur le système immunitaire	Autres effets
Contrôle des troubles suivants : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mauvaise digestion du lactose</li> <li>• Diarrhée</li> <li>• Syndrome du colon irritable</li> <li>• Constipation</li> <li>• Infection par <i>Helicobacter pylori</i></li> <li>• Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle</li> <li>• Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (colite ulcéreuse et maladie de Crohn)</li> </ul> Prévention de l'entérocolite nécrosante du nouveau-né.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulation immunitaire</li> <li>• Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation</li> <li>• Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>)</li> </ul>	Réduction du risque de : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Certains cancers (colorectal, Vessie, colutérin, sein)</li> <li>• Coronaropathie</li> <li>• Maladie des voies urinaires</li> <li>• Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes</li> </ul> Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle

Le rumen a longtemps été considéré comme un simple compartiment digestif pré gastrique où environ 50% des aliments ingérés par le ruminant sont hydrolysés puis fermentés par une population microbienne dense et variée qui fournit de 70 à 90% des nutriments utilisés par l'animal hôte (Mackie et al., 2001). Cette fermentation microbienne convertit les composants alimentaires en un mélange d'acides gras volatils (AGV) acétate, propionate et butyrate (Weimer, 2001), de gaz : gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) et méthane (CH<sub>4</sub>) et d'ammoniac (NH<sub>3</sub>) (Durand, 1982). Le rumen est un fermenteur anaérobie qui permet d'utiliser efficacement les glucides des parois des cellules végétales et l'azote non protéique pour satisfaire tout ou partie des besoins en énergie et en acides aminés de l'animal (Egan, 2005 ; Thivend et al., 1985).

### III.1. Conditions physico-chimiques du rumen

Le développement des micro-organismes du rumen est directement dépendant des conditions physicochimiques du milieu (Zened, 2011). Ainsi, si la température, l'humidité, la pression osmotique et l'anaérobiose sont des conditions relativement fixés, le pH et la nature du substrat alimentaire varient et constituent donc des facteurs de sélection des populations microbiennes (Robles, 2006). La température est plus élevée d'au moins un degré par rapport à la température du reste du corps : soit 39,5 à 40°C. Elle peut atteindre 41°C lorsque les fermentations sont très intenses, mais aussi chuter de plusieurs degrés après ingestion d'une grande quantité d'eau froide : de 5 à 10°C pour une à deux heures (Zened, 2011 ; Robles, 2006). L'humidité est en moyenne élevée : 85 % (Zened, 2011 ; Thivend et al., 1985) mais non homogène dans l'ensemble du rumen. La partie supérieure contient les éléments les plus grossiers, la partie inférieure les particules de petite taille baignant dans un milieu très liquide. L'eau du rumen représente une masse liquidienne plus importante en quantité que l'eau plasmatique et elle peut être utilisée, dans le cas échéant, comme réserve pour l'organisme (Robles, 2006).

Le rumen est caractérisé par une pression osmotique constante proche de celle du sang et comprise entre 200 et 400 mosm/l chez l'animal sain (Zened, 2011 ; Thivend et al., 1985). Le milieu ruminal est du fait de l'anaérobiose très réducteur et le métabolisme des microorganismes qu'il héberge donne donc lieu à des fermentations qui entraînent la libération de composés organiques (acétate, propionate, butyrate, lactate...) et non pas seulement de gaz carbonique et d'eau (Robles, 2006). La teneur en dioxyde de carbone est toujours élevée (60% de la poche des gaz), celle en CH<sub>4</sub> est en moyenne de 27%, 7% en N<sub>2</sub>, et 0,2% en H<sub>2</sub> (Zened, 2011).

Le pH a un rôle prédominant dans la sélection des microorganismes du rumen et dans l'orientation des fermentations. Dans les conditions normales (Robles, 2006), le pH est toujours acide, proche de la neutralité: 6 à 6,8 (Thivend et al., 1985). Les éléments responsables des fluctuations de pH du rumen sont, pour les acides : les AGV et l'acide lactique produits lors des fermentations, et pour les bases, les bicarbonates et les phosphates, ainsi que, le cas échéant, l'ammoniac venant de la protéolyse ou de l'uréolyse. Le pouvoir tampon est assuré essentiellement par les bicarbonates apportés par la salive (Zened, 2011).

### III.2. Les microorganismes du rumen

Le rumen est l'un des milieux le plus riche en microorganismes puisqu'un millilitre de son contenu renferme 10<sup>11</sup> bactéries, 10<sup>6</sup> protozoaires et 10<sup>4</sup> champignons anaérobies (Mackie et al., 2001 ; Chaucheyras-Durand et al., 2012 ; Mcsweeney et al., 2005). Il semble y avoir quelques différences entre les bovins, les chèvres, et moutons à l'égard soit à la digestibilité des aliments ou les espèces de microbes habitant le rumen (Weimer, 2001).

#### III.2.1. Les bactéries

La population bactérienne constitue environ 50 % de la biomasse microbienne et représente la catégorie de micro-organismes la plus complexe et la plus importante. Elle est composée essentiellement de bactéries anaérobies strictes non sporulées et elle est caractérisée par sa très grande diversité (Robles, 2006 ; Thivend et al., 1985). Plus de 200 espèces

bactériennes différentes ont été isolées de contenu du rumen et leurs propriétés déterminées (Mcsweeney et al., 2005), mais seulement environ 24 espèces sont considérées ayant une importance majeure dans le métabolisme ruminal (Weimer, 2001). Les bactéries du rumen sont probablement le principal agent de la digestion ruminale des glucides et des protéines dans l'alimentation et sont généralement classées selon les substrats qu'elles sont capables de fermenter ou de dégrader : bactéries cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, uréolytiques...etc. Elles peuvent réaliser pratiquement toutes les réactions enzymatiques qui se produisent dans le rumen à l'égard de la digestion des matières premières (Weimer, 2001 ; Thivend et al., 1985).

Les fonctions d'une espèce donnée peuvent être limitées ou au contraire très larges. Ainsi, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola*, *Selenomonas ruminantium* peuvent utiliser de nombreuses sources d'énergie alors que les bactéries cellulolytiques par exemple, n'utilisent que la cellulose et ses produits d'hydrolyse. De même, *Bacteroides amylophilus* ne fermente que l'amidon, les dextrines et le maltose (Thivend et al., 1985).

Les bactéries du rumen sont mésophiles, mais sont très sténotherme (ils croîtront dans une étroite plage de températures). La plupart ont une croissance optimale proche de la température moyenne du rumen de 39°C, et beaucoup présentent peu ou pas de croissance à température ambiante. En plus les bactéries du rumen ont également des besoins en vitamines et acides aminés qui sont présents en faibles concentrations dans le liquide ruminal (Weimer, 2001).

Les espèces de bactéries les plus importantes appartiennent au groupe des cellulolytiques (ou encore fibrolytiques) qui comprennent principalement *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*. Une dizaine d'espèces sont connues pour leur pouvoir amylolytique mais *B. amylophilus*, *Succinimonas amylolytica* et *Streptococcus bovis* sont les plus importantes. Les mono et disaccharides sont fermentés par la plupart des bactéries du rumen. La protéolyse est aussi une fonction bactérienne très active, les désaminations étant réalisées par *Bacteroides ruminicola* et par *Megasphaera elsdenii*, l'urée hydrolysée en ammoniac par les uréases de plusieurs espèces bactériennes. La lipolyse enfin, est assurée en grande partie par *Anaerovibrio lipolytica* (Robles, 2006).

Dans le rumen, les bactéries occupent trois biotopes distincts. Elles peuvent être libres dans le liquide de rumen, ou attachées soit à la paroi interne du rumen, soit aux particules alimentaires. Enfin, certaines espèces bactériennes vivent également liées à la surface des protozoaires (Thivend et al., 1985).

### III.2.2. Les protozoaires

Les protozoaires du rumen sont essentiellement des ciliés mais on observe également la présence des flagellés, en nombre plus réduit. Les protozoaires ciliés sont distribués en 25 genres et sont généralement libres dans le liquide de rumen mais certains se fixent également aux particules végétales (Mcsweeney et al., 2005 ; Thivend et al., 1985).

### III.2.3. Les champignons

Plusieurs espèces de levures et de champignons ont été isolées du rumen mais leur fonction et leur rôle dans la digestion microbienne n'ont été que peu étudiés. La plupart de ces micro-organismes apportés par l'aliment seraient simplement en transit dans le rumen (Thivend et al., 1985). Les champignons du rumen sont strictement anaérobies et ont un catabolisme basée sur la fermentation des hydrates de carbone. Toutes les espèces décrites peuvent digérer la cellulose et / ou hémicelluloses par des enzymes extracellulaires qui sont produites en faible titre, mais ont des activités spécifiques très élevées (Weimer, 2001). Les champignons sont également étroitement associés aux particules alimentaires (Thivend et al., 1985).

### III.3. Les bactéries lactiques prédominantes du rumen

Les bactéries lactiques prédominantes du rumen sont des lactobacilles, les streptocoques et les bifidobactéries. Le nombre de ces organismes varient selon l'âge et le régime alimentaire de l'animal, mais chez les moutons et les bovins adultes ils sont normalement un composant relativement mineur de la flore microbienne du rumen (Yanke et Cheng, 1998 ; Stewart, 1992). Les bactéries lactiques ont été trouvés dans les surfaces épithéliales, les surfaces de la matière alimentaire et dans la phase liquide en vrac. En règle générale, le nombre de lactobacilles et de streptocoques dans le rumen est plus élevé chez les jeunes animaux. Mais chez les animaux âgés, les nombres relatifs de streptocoques et de lactobacilles dépendait de la composition de l'alimentation. Parmi les streptocoques il y avait une nette tendance à *S. faecium* d'être présent dans un nombre relativement élevé chez les jeunes animaux, et pour *S. bovis* à prédominer dans le rumen des animaux plus âgés. Les lactobacilles anaérobies comme *L. ruminis* et *L. vitulinus* semblent être vraies bactéries du rumen (Stewart, 1992). De même, *Streptococcus bovis* est un organisme du rumen commun associé à une fonction spécifique du rumen (Stewart, 1992). Elle est une espèce amylolytique majoritaire chez les ruminants recevant une alimentation riche en céréales. La croissance de cette espèce est très rapide et son activité génère de grandes quantités d'acide lactique. Par conséquent, *S. bovis* est l'agent souvent responsable des phénomènes d'acidose lactique (Zened, 2011).

### III.4. Les lactobacilles ruminales

Les lactobacilles ruminales sont plus résistants au pH bas, qui explique pourquoi elles deviennent dominantes dans le rumen (pH <5.6). L'augmentation significative de la population des lactobacilles ruminaux est la cause commune d'acidose aiguë et subaiguë. Nombreuses espèces isolé du rumen ne sont pas habituellement identifiés, mais elles sont souvent décrites en tant que "*Lactobacillus sp.*". Le rumen contient les deux types de lactobacilles homofermentaires et hétérofermentaires. Plusieurs espèces des lactobacilles ont été isolées à partir le rumen des bétails et des moutons, *L. brevis*, *L. bifidus*, *L. fermenti*, et *L. buchneri*. Deux espèces prédominantes de lactobacilles ont été identifiés et bien caractérisés, en particulier chez les animaux grain-adaptés, inclure *L. ruminis* et *L. vitulinus* (Nagaraja et Titgemeyer, 2007).

## I.1. Matériel

Notre travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, pendant un mois et demi.

Les objectifs de cette étude s'articulent autour des points suivants :

- Etude de quelques aptitudes technologiques des souches du genre *Lactobacillus* ruminal : L'activité amylolytique et la production d'exopolysaccharides;
- Evaluation des aptitudes probiotiques *in vitro* : Tolérance à l'acidité, résistance aux sels biliaires, résistance au 0.4 % (v/v) de phénol, l'hydrophobicité, la détection de l'activité antimicrobienne, la résistance aux antibiotiques, l'agglutinement de levure, et l'auto-agrégation.

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

### I.1.1. Les souches bactériennes testées

Les souches de *Lactobacillus* ruminal utilisées dans notre étude sont : *Lactobacillus fermentum* A1, *Lactobacillus mucosae* A2, *Lactobacillus fermentum* A3, *Lactobacillus fermentum* A4, *Lactobacillus fermentum* B1, *Lactobacillus fermentum* B2, *Lactobacillus fermentum* B3, *Lactobacillus animalis* B4, *Lactobacillus fermentum* C1, *Lactobacillus fermentum* C2, *Lactobacillus fermentum* C3, *Lactobacillus fermentum* C4, *Lactobacillus fermentum* D1, *Lactobacillus fermentum* D2, *Lactobacillus fermentum* D3, *Lactobacillus fermentum* D4, *Lactobacillus mucosae* E1, *Lactobacillus frumenti* E3, *Lactobacillus mucosae* E4.

Ces souches ont été isolées à partir de la microflore lactique du rumen de chèvre de la région de Djimla, purifiées et identifiées l'année passée par M<sup>f</sup>. Khennouf T. Puis elles sont conservées à -20°C dans le bouillon MRS inoculé par chacune des souches, supplémenté de glycérol. Elles sont revifiées par deux repiquages, où les souches ont été cultivées sur bouillon MRS puis incubées à 37°C pendant 24h. Le développement des bactéries se traduit par un trouble.

La pureté des souches a été vérifiée sur gélose MRS, les boîtes de Pétri contenant la gélose MRS préalablement coulées et solidifiées sont ensemencées par stries, l'incubation a été faite à 37°C pendant 24h, les souches sont dites pures si on obtient des colonies homogènes de même forme, même taille et de même couleur, pour confirmer la pureté on réalise une coloration de Gram.

### I.1.2. Les souches bactériennes indicatrices

Il s'agit de cinq souches indicatrices représentées par les espèces suivantes :

- *Escherichia coli* ATCC 25922;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29522;
- *Salmonella* sp. ;
- *Listeria* sp.;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ces souches ont été utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne.

- *Saccharomyces cerevisiae* utilisées pour l'étude de l'agglutination de levure (S.I.Lesaffre).

### I.1.3. Les disques d'antibiotiques

Pour étudier le comportement des lactobacilles ruminants vis-à-vis des antibiotiques, Huit antibiotiques ont été utilisés pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide, il s'agit de l'Amikacine (AK 30µg), Chloramphénicol (C 30µg), Gentamicine (Gen 10µg), Colistin

sulfate (CT 50 $\mu$ g), Acide Nalidixique (AN 30 $\mu$ g), Ciprofloxacine (CIP 5 $\mu$ g), Kanamycine (K 30 $\mu$ g), et Vancomycine (VA 30 $\mu$ g).

#### I.1.4. Les milieux de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

- Milieux MRS (Man-Rogosa et Sharp) liquide (déshydraté) et gélose : utilisés pour la culture des lactobacilles (Annexe 1);
- Gélose Mueller Hinton pour étudier l'activité antimicrobienne et pour réaliser l'antibiogramme.

#### I.1.5. Tampons

La réalisation de la présente étude a nécessité le tampon suivant :  
Tampon PBS, pH 7.2 (préparé au laboratoire) (Annexe 1);

#### I.1.6. Appareillage

L'appareillage utilisé est le suivant :

- Autoclave (pbibrand) ;
- Bain Marie (Heidolph);
- Balance (KERN) ;
- Centrifugeuse électrique (Hettich) ;
- Etuves (25°C) (Memmert) ;
- Etuves (37°C) (Memmert) ;
- Four Pasteur (Controls) ;
- Plaque chauffante, agitateur magnétique ;
- Micropipettes (Microlit) ;
- Microplaque ;
- Microscope optique (Olympus) ;
- pH mètre (HANNA) ;
- Réfrigérateur (ENIEM) ;
- Spectrophotomètre (Shimadzu);
- Vortex (VWR).

#### I.1.7. Autres

- Bleu de méthylène ;
- Lugol ;
- Mannose ;
- Disques de papier Wattman stériles.

### I.2. Méthodes

#### I.2.1. Etude de quelques aptitudes technologiques des souches du genre *Lactobacillus* ruminal

##### I.2.1.1. La détection de l'activité amylolytique

L'activité amylolytique est déterminée selon la méthode décrite par Guo *et al.* (2010) avec certaines modifications :

Un milieu MRS modifiée a été préparé : MRS sans extrait de viande, et le glucose a été remplacé par 1% d'amidon soluble (p/v). Ce dernier a été coulé et solidifié. Des disques de papier Wattman stérile ont été déposés en surface de cette gélose, puis chaque disque reçoit 50 $\mu$ l d'une culture jeune. Après une incubation à 37°C pendant 72h dans des conditions anaérobies, les boîtes ont été inondées avec lugol pour mettre en évidence les zones d'hydrolyse de d'amidon (vérifier les halos autour des disques).



### I.2.1.2. Production d'exopolysaccharides

La production d'exopolysaccharides a été déterminée selon la méthode décrite par **Smitinont et al. (1999)** avec certaines modifications : Les souches à tester ont été ensemencées en stries sur gélose MRS hypersaccharosée (Milieu MRS contenant 20% de saccharose) déjà coulée et solidifiée. Après incubation à 37°C pendant 24h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes.

## I.2.2. Etude de quelques aptitudes probiotiques des souches du genre *Lactobacillus* ruminal

### I.2.2.1. Tolérance à l'acidité

L'aptitude des lactobacilles ruminants à résister l'acidité gastrique, a été déterminée selon la technique décrite par **Khalil et al. (2007)** avec quelques modifications:

Les cultures jeune, des 19 souches bactériennes testées, ont été inoculées (1% v/v) dans le bouillon MRS préalablement ajusté à pH 2, 3 et 4 avec le HCl : 200µl des cultures bactériennes sont inoculées dans 20ml du bouillon MRS ajusté à différentes valeurs du pH. Les cultures ont été incubées en aérobie à 37 °C pendant 21 h. La turbidité des cultures a été mesurée à 650 nm. Le contrôle composé de bouillon MRS ajusté à pH 6,2. L'expérience a été réalisée en trois exemplaires. Le pourcentage de la densité optique (DO) à pH2 ; 3 ou à 4 ( $DO_{pH2; 3 \text{ ou } 4}$ ) sur la densité optique (DO) à pH6.2 ( $DO_{pH6.2}$ ) donne un index de la survie des souches de lactobacilles ruminants qui peut être exprimé comme suit :

$$\text{La survie (\%)} = \frac{DO_{pH 2; 3 \text{ ou } 4}}{DO_{pH 6.2}} \times 100$$

### I.2.2.2. Résistance aux sels biliaries

Pour la détermination de l'aptitude de souches de *Lactobacillus* ruminal à résister à la bile, la méthode décrite par **Khater et al. (2010)** a été appliquée:

Les cultures jeune ont été inoculées (1%. v/v) dans le bouillon MRS contenant 0,3 % (p/v) des sels biliaries : 100µl des cultures bactériennes sont inoculées dans 10ml du bouillon MRS contenant 0,3% de sels biliaries. Puis incubées à 37°C pendant 21 heures. Les cultures ont été suivies pendant la croissance par spectrophotométrie à 650 nm. La comparaison des cultures a été basée sur leur taux de croissance dans chaque bouillon. Le contrôle composé de bouillon MRS ajusté à pH 6,2. Les expériences ont été répétées trois fois en trois exemplaires. Le pourcentage de la densité optique (DO) de la culture contenant 0. 3% de sels biliaries ( $DO_{0.3\%SB}$ ) sur la densité optique de la culture sans sels biliaries ( $DO_{0\%SB}$ ) donne un index de la survie des souches de lactobacilles ruminants qui peut être exprimé comme suit :

$$\text{La survie (\%)} = \frac{DO_{0,3\%SB}}{DO_{0\%SB}} \times 100$$

### I.2.2.3. Résistance au 0.4 % (v/v) de phénol

Ainsi, la détermination de la résistance au phénol peut produire principalement des informations sur le potentiel de la survie des lactobacilles en conditions gastro-intestinales. Par conséquent, la capacité des souches de *Lactobacillus* de se développer en présence du phénol par l'inoculation de 1 % (v/v) d'une culture de 21 h dans le bouillon MRS avec 0.4 % (v/v) de phénol a été examinée, un contrôle contient le MRS sans phénol a été ensemencé également. Puis incubées à 37°C pendant 21 heures. Les cultures ont été suivies pendant la croissance par spectrophotométrie à 650 nm. La comparaison des cultures a été basée sur leur taux de croissance dans chaque bouillon. Les expériences ont été répétées trois fois en trois exemplaires (**Ji et al., 2013**).

### I.2.2.4. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité est déterminée selon la méthode décrite par **Shakirova et al. (2013)** avec certain modifications : Les cellules d'une phase appropriée de croissance étaient récupéré



par la centrifugation (6000 rpm, 10 minutes), suivie de deux lavage successif avec la solution tampon de PBS (pH 7.2), La densité optique initiale de la suspension a été ajustée approximativement à 0,5 à 660nm ( $DO_{\text{initiale}}$ ) ( $DO_{660} = 0.5$ ) (contenu viable de  $10^8$  à  $10^9$  UFC.  $\text{ml}^{-1}$ ) pour effectuer des mesures de l'hydrophobicité de la surface cellulaire. Ensuite 3 ml de la suspension cellulaire respective ( $DO_{660} = 0.5 \pm 0.01$ ) a été mélangé avec 0.75 ml d'hydrocarbure comme : xylène, chloroforme, acétate d'éthyle. Ce mélange a été agité en utilisant un vortex pendant 2 minutes. Après 40 min de la séparation, la phase aqueuse est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur et on procède à la mesure de la densité optique finale ( $DO_{\text{finale}}$ ) à 660 nm. La différence de la densité optique est considéré comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) calculé par l'équation suivante (Sica et al., 2012):

$$\% \text{ Hydrophobicité} = \text{DO initiale} - \text{DO finale} / \text{DO initiale} \times 100.$$

#### I.2.2.5. La détection de l'activité antimicrobienne (Production des molécules antagonistes)

Ce test consiste à étudier l'activité inhibitrice des lactobacilles ruminants vis-à-vis des souches indicatrices. Il s'agit de cinq souches : *Staphylococcus aureus* ATCC29522, *Listeria sp.*, *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella sp.*, et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 qui ont été ensemencées au bouillon nutritif et incubées à 37°C pendant 24h.

La méthode des disques décrite par Guo et al. (2010) a été appliquée avec certaines modifications pour la détection de l'activité antimicrobienne: elle consiste à inoculer en surface le milieu Mueller-Hinton par la souche indicatrice à l'aide d'un coton tige stérile (seule la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 a été inoculée en surface de la gélose nutritif). En suite, des disques stériles (de 5 mm de diamètre) ont été déposés à la surface de la gélose. Chaque disque reçoit 10 $\mu$ l d'une culture lactique jeune. Une fois les boites sont séchées à température ambiante, elles sont incubées à 37°C pendant 24h. L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques.

#### I.2.2.6. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un facteur principal pour les organismes probiotiques car ils doivent survivre dans l'intestin même après des traitements par les antibiotiques (Vidhyasagar et Jeevaratnam., 2013). Pour réaliser ce test, la méthode d'antibiogramme en milieu solide a été appliquée, chaque culture bactérien a été ensemencée dans le bouillon MRS, et incubée à 37°C /24h. Puis les boites coulée par la gélose Mueller Hinton et solidifiée, ensuite les cultures ont été inoculée dans des boites par l'utilisation des cotons tiges stériles. Les disques d'antibiotique de l'Amikacine (AK 30 $\mu$ g), Chloramphénicol (C 30 $\mu$ g), Gentamicine (Gen 10 $\mu$ g), Colistine sulfate (CT 50 $\mu$ g), Acide Nalidixique (AN 30 $\mu$ g), Ciprofloxacine (CIP 5 $\mu$ g), Kanamycine (K 30 $\mu$ g), et Vancomycine (VA 30 $\mu$ g) ont été déposés dans les boites, Après incubation à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés. Les résultats ont été exprimés en tant que (S) sensible, intermédiaire (I) et (R) résistant selon les normes recommandées (Lavanya et al., 2011).

#### I.2.2.7. Agglutination de levure

Le test d'agglutination entre des levures et les bactéries a été réalisé pour évaluer la capacité des souches à l'adhésion avec le mannose. La méthode décrite par Turchi et al. (2013) a été appliquée :

Avant de réaliser ce test, le culot bactérien de chaque culture (culture jeune sur bouillon MRS incubée à 37°C / 24 h) a été récupéré par centrifugation à 3.500 rpm pendant 10 minutes, et suspendu en 0,1 ml du tampon PBS stérile. Ensuite 100  $\mu$ l ont été suspendus en 4ml de du même tampon. 50 $\mu$ l ont été transférés au microplaque. 50  $\mu$ l du BPS a été ajoutés, puis addition de 100 $\mu$ l de 1% (p/v) *Saccharomyces cerevisiae*. La microplaque a été agitée pendant 10 minutes à la température ambiante, puis incubée pendant 20 minutes à 25 °C. La capacité de chaque souche d'agglutiner avec la levure a été évaluée au microscope optique (L'objectif  $\times 40$ ) après la

coloration par le bleu de méthylène. Pour évaluer la participation des récepteurs de mannose dans le mécanisme d'adhérence, l'agglutination avec l'addition du 50  $\mu$ l de mannose (concentration finale 2%) a été exécutée.

#### **I.2.2.8. Test d'auto-agrégation**

Le test d'auto-agrégation a été effectué selon **Kos et al. (2003)** avec certaines modifications. Les bactéries ont été cultivées à 37°C pendant 18h dans le bouillon MRS. Puis les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5000 rpm pendant 15 min, lavées deux fois et remises en suspension dans le tampon PBS pour donner un contenu viable d'environ  $10^8$  UFC.  $\text{ml}^{-1}$  ( $\text{DO}_{600}=0.25$ ). Les suspensions cellulaires (4 ml) ont été mélangées au vortex pendant 10s et l'auto-agrégation a été déterminée pendant 2h d'incubation à température ambiante. 0,1 ml de la suspension supérieure était transférée dans un autre tube avec 3,9 ml de PBS et l'absorbance (A) a été mesurée à 600 nm. Le pourcentage d'auto-agrégation est exprimé en tant que:  $1-(A_t/A_0) \times 100$ , où  $A_t$  représente l'absorbance au temps  $t = 2\text{h}$  et  $A_0$  l'absorbance à  $t = 0$ .

## II.1. Les aptitudes technologiques des souches du genre *Lactobacillus* ruminal

### II.1.1. L'activité amylolytique

Plusieurs espèces des bactéries ruminales peuvent dégrader l'amidon et utilisent les produits intermédiaires (amylodextrines, maltose, et glucose). La proportion des bactéries amylolytiques ruminal est comprise entre 90 à 95%. Les bactéries ruminales amylolytiques prédominantes sont : *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*...etc. (Nagaraja et Titgemeyer, 2007).

D'après les résultats obtenus nous avons constatés que toutes les souches testées dépourvus de l'activité amylolytique car il n'y a aucune zone d'hydrolyse de d'amidon autour des disques. Contrairement aux nos résultats, Guo et al. (2010), ont isolé des lactobacilles à partir du porc ont une activité amylolytique. L'amidon est la source principale des hydrates de carbone dans des régimes alimentaires mixtes, et également utilisé comme principale source d'énergie. La production instable d'amylase par le pancréas est l'un des causes de mal digestion d'amidon chez des jeunes animaux. Guo et al. (2010) ont rapporté qu'il existe des espèces amylolytiques naturels de lactobacilles contribuant à la digestion d'amidon dans les intestins. Nagaraja et Titgemeyer (2007) ont montré que *Streptococcus bovis* possède une forte activité amylolytique.

### II.1.2. Pouvoir texturant

Les exopolysaccharides sont des biopolymères de carbohydrates produits par les bactéries lactiques. D'un point de vue technologique, ces polymères hydrophiles de haut poids moléculaire, variant de  $3 \cdot 10^4$  à  $10^5$  Dalton, présentent un intérêt industriel car elles sont considérées comme des ingrédients alimentaires et comme additif en tant qu'épaississant, stabilisant, émulsifiant, gélifiant...etc. qui modifient fortement la texture des milieux où ils sont excrétés (Atlan et al., 2008 ; Seesuriyachan et al., 2011). De plus, les effets bénéfiques des bactéries lactiques sur la santé ont été attribués à la production d'EPS qui ont des activités anti-tumoral, anti-ulcère, immunomodulateurs et qui abaissant le taux de cholestérol (Boke et al., 2010 ; Zhang et al., 2011).

Les résultats de ce test montrent qu'il n'y a aucune apparition des colonies larges et gluantes avec aspect brillant sur la gélose MRS hypersaccharosée. Donc toutes les souches étudiées sont incapables de produire des polysaccharides et ne possède aucun pouvoir texturant. Les résultats obtenu par Zhang et al. (2011) ont montré que *L. fermentum* F6 cultiver à une température (37°C) et un pH (6.5) optimale de croissance étaient également favorables pour la production d'EPS. Alors qu'une hypothèse montre que la croissance bactérienne et la production d'EPS sont habituellement influencées par la concentration initiale de sucres. Une étude réalisée par Seesuriyachan et al. (2011) montre que la concentration optimale de saccharose nécessaire pour la croissance de *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 sur milieu MRS est 10%, et lorsqu'elle est supérieure à cette valeur il y a une diminution de rendement d'EPS et de production de biomasse. Probablement nos souches n'ont pas pu supporter la concentration élevée de saccharose (20%). Ces observations rejoignent celles de van Geel Schutten et al. (1998) qui avaient constaté que le criblage de bactéries lactiques synthétisantes d'EPS est habituellement effectué sur des milieux gélosés avec des concentrations relativement basses en glucose ou en lactose.

## II.2. Les aptitudes probiotiques des souches du genre *Lactobacillus* ruminal

### II.2.1. Taux de survie aux milieux acides

Chaque jour l'estomac humain secrète environ 3L de jus gastrique avec un pH aussi faible que 1,5 et la période de passage du bol alimentaire à travers l'estomac est estimée à environ 90 min où le stress pour les microorganismes commence (Khater et al., 2011). La tolérance à l'acidité est l'une des conditions principales pour qu'une souche réponde à la définition de probiotique est qu'elle doit être viable de la production à la consommation et

pendant le transit gastro-intestinal. Avant de pouvoir adhérer et s'installer, même de façon transitoire, les bactéries probiotiques doivent survivre au passage par l'estomac.

La plupart des essais *in vitro* sont réalisés à pH 3.0. L'examen préalable de toutes les cultures étudiées pour les tolérances à faible pH 2.0 et 3.0 est exigé (Khater et al., 2011). Afin de déterminer la capacité de survie chez des souches de *Lactobacillus* ruminants, l'effet de l'exposition à un milieu acide simulé sur ces bactéries a été examiné. Les souches ont été exposées à des pH acides pendant 21h, et ensuite la proportion de cellules viables a été évaluée par la spectrophotométrie. L'effet de l'acidité sur la viabilité des souches de *Lactobacillus* ruminants est indiqué dans le Tableau 04 et représentés par les figures : 02, 03 et 04.

**Tableau 04 :** Le taux de survie des souches de *Lactobacillus* ruminal à différent valeurs de pH.

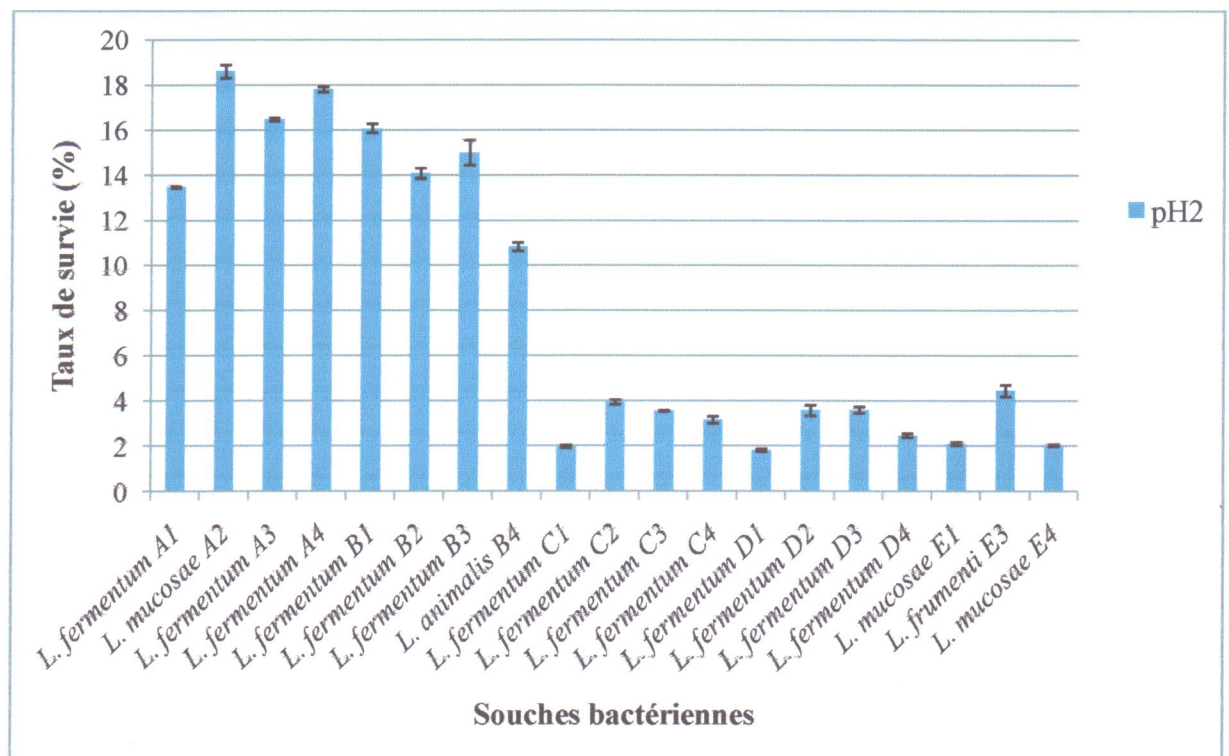
Les souches	Taux de survie (%)		
	pH 2	pH 3	pH 4
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	13.479 ± 0.045	51.518 ± 1.383	86.599 ± 0.316
<i>Lactobacillus mucosae</i> A2	18.587 ± 0.302	58.205 ± 0.218	90.006 ± 0.388
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	16.475 ± 0.079	57.056 ± 0.412	90.006 ± 0.388
<i>Lactobacillus fermentum</i> A4	17.795 ± 0.121	56.713 ± 1.038	89.782 ± 0.673
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	16.085 ± 0.201	44.903 ± 3.558	89.178 ± 0.694
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	14.081 ± 0.227	47.094 ± 1.405	90.635 ± 0.394
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	15.003 ± 0.563	58.624 ± 1.229	90.862 ± 0.681
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	10.845 ± 0.191	52.881 ± 1.006	89.850 ± 0.907
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	1.994 ± 0.054	5.396 ± 0.165	81.219 ± 0.913
<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	3.943 ± 0.104	6.612 ± 0.138	80.113 ± 0.799
<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	3.562 ± 0.022	3.733 ± 0.164	79.850 ± 0.805
<i>Lactobacillus fermentum</i> C4	3.181 ± 0.149	7.426 ± 0.694	81.769 ± 1.30
<i>Lactobacillus fermentum</i> D1	1.830 ± 0.063	6.325 ± 0.369	80.383 ± 2.595
<i>Lactobacillus fermentum</i> D2	3.590 ± 0.230	3.786 ± 0.046	79.096 ± 1.528
<i>Lactobacillus fermentum</i> D3	3.606 ± 0.136	1.945 ± 0.213	78.271 ± 1.548
<i>Lactobacillus fermentum</i> D4	2.486 ± 0.089	2.576 ± 0.257	78.606 ± 2.388
<i>Lactobacillus mucosae</i> E1	2.125 ± 0.067	2.692 ± 0.321	79.328 ± 1.807
<i>Lactobacillus frumenti</i> E3	4.466 ± 0.255	3.978 ± 0.267	78.917 ± 0.442
<i>Lactobacillus mucosae</i> E4	2.056 ± 0.038	3.833 ± 0.058	80.249 ± 0.930

Il apparaît que la résistance des lactobacilles ruminants étudiés à l'acidité varie selon les souches et selon le pH testé. D'après les résultats obtenus, les souches A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3 et B4 résistent à pH2 et même à pH3 avec des variances notables entre les souches, alors que les autres souches sont sensibles (taux de survie faible). Par contre le taux de survie des souches bactériennes est important et presque le même pour le pH4. D'une manière générale, la résistance aux conditions acides diminue avec la diminution du pH du milieu jusqu'à atteindre un minimum de 1.830 ± 0.063 % de viabilité enregistré par la souche *Lactobacillus fermentum* D1 à pH 2.

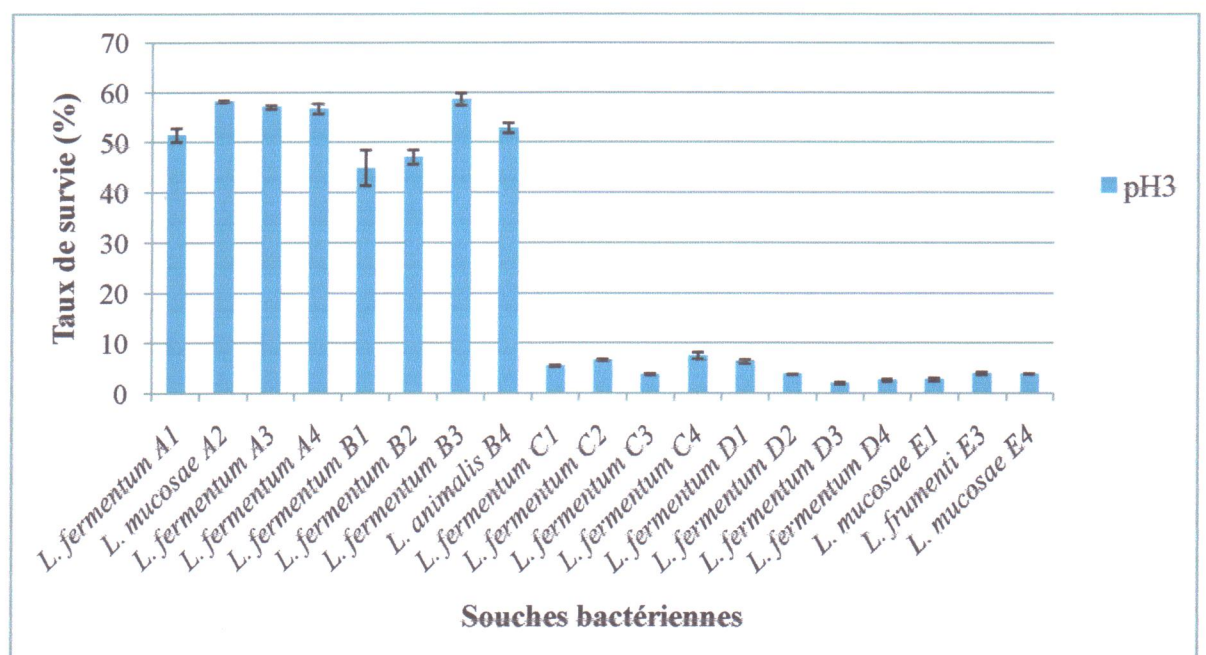
Les bactéries entreraient en contact avec des milieux différents où les valeurs du pH varié de 2.0 à 8.0 dans le tractus gastro-intestinal Rashid et al. (2007), et plusieurs études indiquent qu'elles ne survivent pas en nombre suffisant au cours de leur passage dans ce dernier (Khater et al., 2011). Rashid et al. (2007) ont montrés que *Lactobacillus fermentum* ne peut pas se développer à pH 3.0 à 4.0 mais possède une forte viabilité à pH 4.0 à 5.0. Ces résultats sont similaires aux résultats observées avec les souches C1, C2, C3, C4, D1, D2, D3 et D4.

Les résultats d'une étude menée par **Thirabunyanon et al. (2009)** montrent que *Lactobacillus fermentum* se développe à pH 2.5 et ces résultats sont proches de ceux obtenus avec les souches A1, A3, A4, B1, B2 et B3.

**Khalil et al. (2007)** ont montrés qu'à pH 2, le taux de survie des souches bactériens est faible, où cette valeur du pH a été considérée en tant que mortel pour toutes les cultures. Et ont montrés aussi que les *Lactobacillus salivarius*, *L. pentosus* et *L. acidophilus* sont sensible au pH3 après 3 h d'incubation, alors que *L. fermentum* possède une résistance significative à ce pH.



**Figure 02 :** La résistance des souches de *Lactobacillus* ruminal au milieu acide (pH 2).



**Figure 03 :** La résistance des souches de *Lactobacillus* ruminal au milieu acide (pH 3).

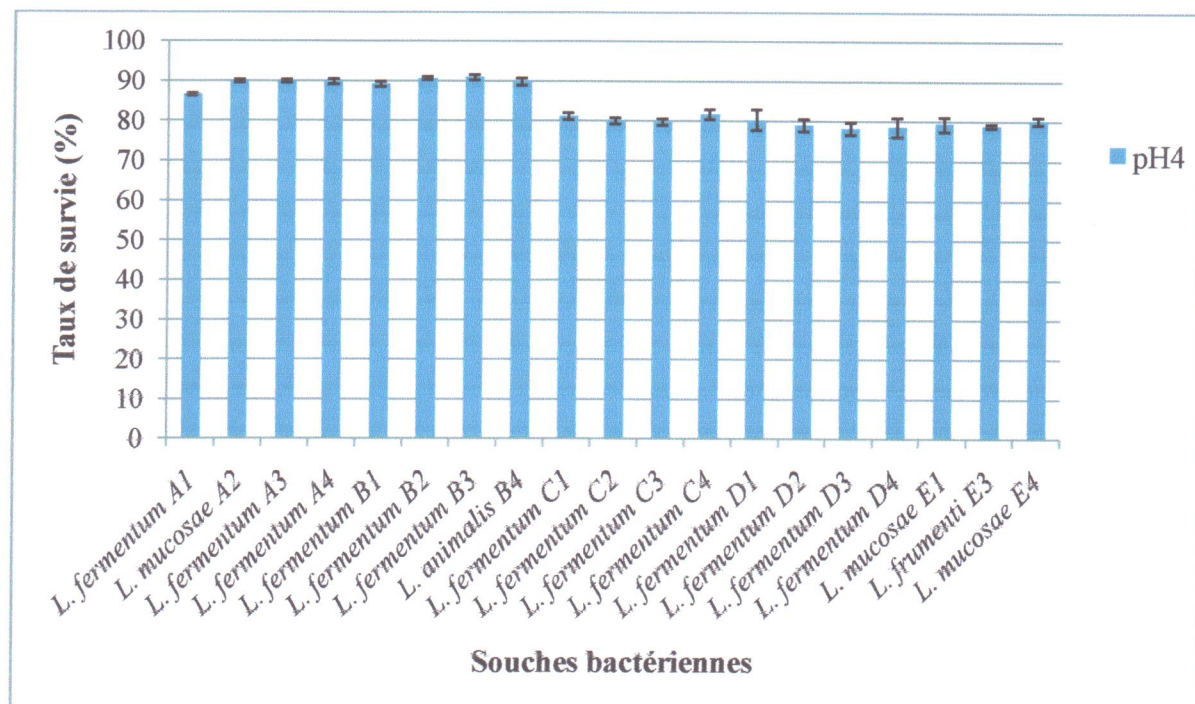


Figure 04 : La résistance des souches de *Lactobacillus* ruminal au milieu acide (pH 4).

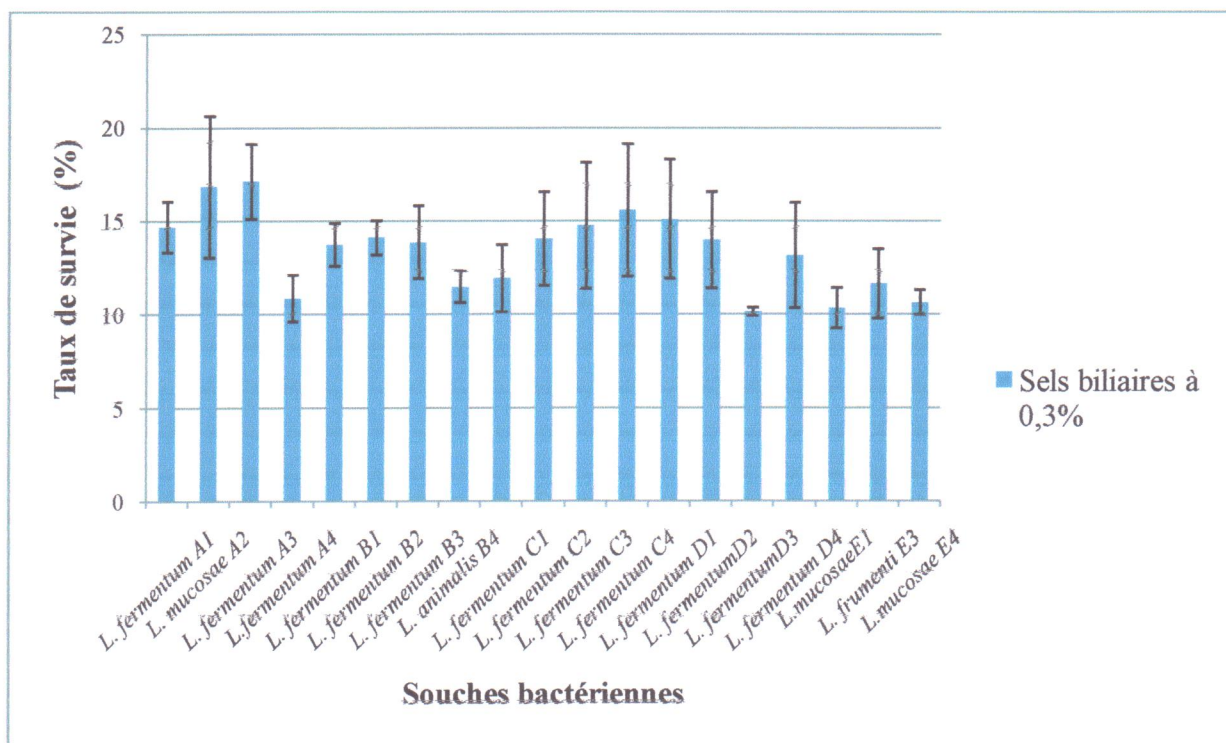
## II.2.2. Taux de survie aux sels biliaires (0.3%) et au (0.4 %) (v/v) de phénol

Tableau 05 : Le taux de survie des souches de *Lactobacillus* ruminal en présence de 0.3% des sels biliaires ou 0.4% de phénol.

Les souches	Taux de survie (%)	
	Sels biliaires (0.3%)	Phénol (0.4%)
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	14.706 ± 1.347	16.146 ± 0.814
<i>Lactobacillus mucosae</i> A2	16.866 ± 3.785	11.004 ± 0.118
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	17.123 ± 2.010	18.138 ± 1.144
<i>Lactobacillus fermentum</i> A4	10.887 ± 1.251	11.733 ± 0.429
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	13.750 ± 1.145	13.095 ± 0.674
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	14.131 ± 0.918	13.143 ± 0.746
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	13.883 ± 1.961	13.228 ± 0.668
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	11.500 ± 0.857	13.821 ± 0.669
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	11.952 ± 1.815	17.881 ± 1.220
<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	14.071 ± 2.507	13.774 ± 0.375
<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	14.760 ± 3.380	10.355 ± 0.181
<i>Lactobacillus fermentum</i> C4	15.599 ± 3.539	15.975 ± 0.466
<i>Lactobacillus fermentum</i> D1	15.117 ± 3.187	36.381 ± 1.684
<i>Lactobacillus fermentum</i> D2	14.010 ± 2.574	18.538 ± 1.445
<i>Lactobacillus fermentum</i> D3	10.174 ± 0.227	10.116 ± 0.277
<i>Lactobacillus fermentum</i> D4	13.179 ± 2.822	09.848 ± 0.487
<i>Lactobacillus mucosae</i> E1	10.375 ± 1.084	09.840 ± 0.400
<i>Lactobacillus frumenti</i> E3	11.670 ± 1.860	11.694 ± 1.180
<i>Lactobacillus Mucosae</i> E4	10.668 ± 0.657	09.848 ± 0.434

### II.2.2.1. Taux de survie aux sels biliaires (0.3%)

Les sels biliaires sont l'une des barrières à franchir par les bactéries probiotiques pour gagner leur site d'action, pour cette raison la tolérance des souches *Lactobacillus* ruminal a été évaluée et les résultats sont illustrés dans le tableau 05 et représenté par la figure 05.



**Figure 05 :** La résistance des lactobacilles ruminales aux sels biliaires à 0.3%.

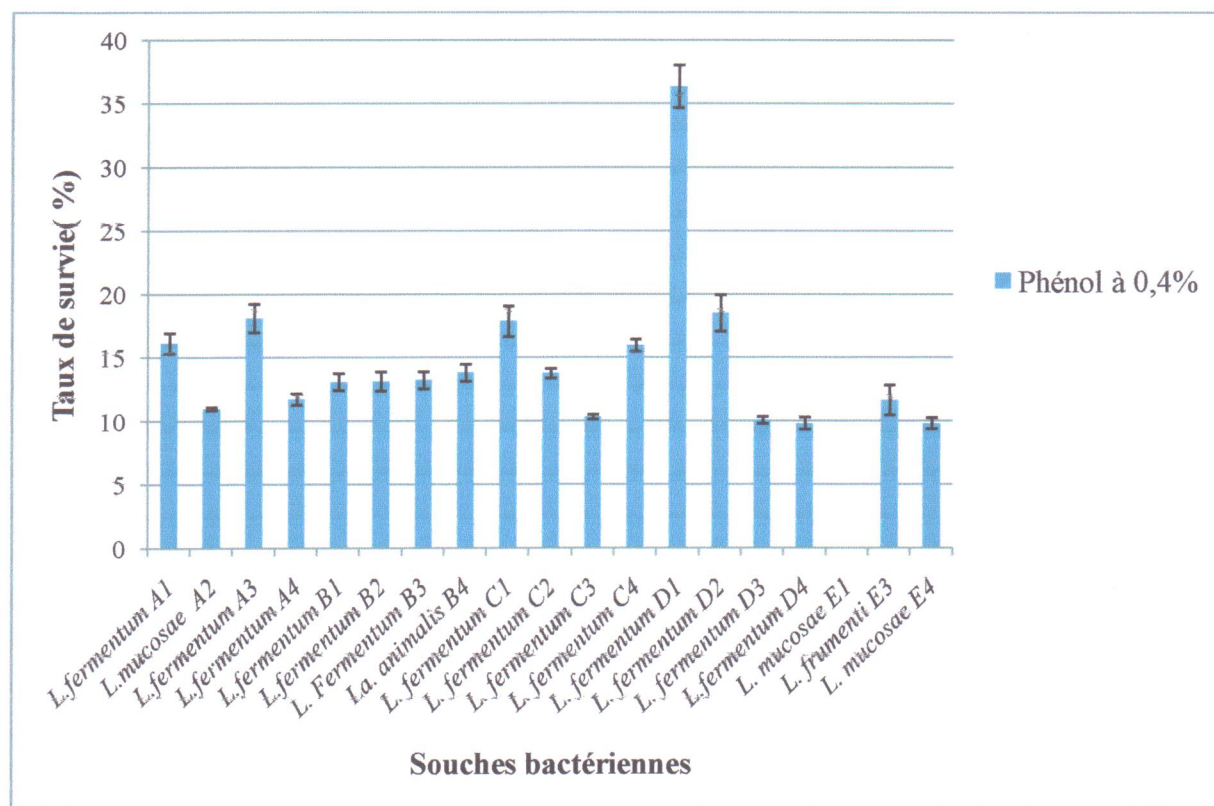
D'après ces résultats, toutes les souches possèdent une tolérance aux sels biliaires (0.3%) et le taux de survie varie entre  $10.174 \pm 0.227\%$  pour *Lactobacillus fermentum* D3 et  $17.123 \pm 2.010\%$  pour *Lactobacillus fermentum* A3.

Nos résultats sont similaires aux résultats de ceux obtenus par **Khalil et al. (2007)**, **Thirabunyanon et al. (2009)** et **Lee et al. (2012)** où certains souches de *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus acidophilus* présentaient une forte tolérance aux sels biliaires. **Guo et al. (2009)** ont rapporté que les sels biliaires sont toxiques pour les cellules vivantes, puisqu'ils détruisent la structure de la membrane et la tolérance à la bile est considérée l'une des propriétés essentielles requises des bactéries lactiques pour survivre dans les intestins. **Lee et al. (2012)** ont montrés que la résistance d'un microorganisme aux sels biliaires (0.3%) est une propriété utilisée pour la sélection des souches probiotiques. D'après **Gu et al. (2008)** dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité.

### II.2.2.2. Taux de survie au (0.4 %) (v/v) de phénol

Quelques acides aminés aromatiques dérivés des protéines diététiques ou des protéines produites de manière endogène peuvent être désaminés dans l'intestin par des bactéries menant à la formation des phénols. Ces composés peuvent exercer un effet bactériostatique contre quelques souches de *Lactobacillus*. De ce fait la tolérance des souches *Lactobacillus* ruminants au phénol (0.4%) a été évaluée. Les résultats de ce test sont illustrés dans le tableau 05 et représenté par la figure 06.





**Figure 06 :** La résistance des lactobacilles ruminales au phénol à 0,4 %.

D'après les résultats, toutes les souches possèdent une faible tolérance au phénol (0.4%) et le taux de survie varie entre  $9.84 \pm 0.40$  % pour *Lactobacillus mucosae* E1 et  $36.381 \pm 1.684$  % pour *Lactobacillus fermentum* D1. Des résultats trouvés par Ji et al. (2013) ont montré que la plus part des souches des lactobacilles présentent une faible résistance au phénol (0.4%) pendant la période d'incubation (24 h).

### II.2.3. Pourcentages d'hydrophobicité

Ce test permet d'évaluer l'hydrophobicité des souches *Lactobacillus* ruminales vis-à-vis du chloroforme, acétate d'éthyle et xylène qui peut refléter le potentiel de colonisation des *Lactobacillus* aux mucus intestinale. La répartition des cellules entre la phase aqueuse et le chloroforme, xylène et acétate d'éthyle résulte de l'interaction hydrophobe entre les microorganismes et les hydrocarbures. Les pourcentages obtenus de l'adhérence des souches *Lactobacillus* ruminants au chloroforme, xylène et acétate d'éthyle indiquent l'hydrophobicité de leur surface. Les résultats de ce test sont représentés dans le tableau 06 et illustrés dans les figures 07, 08 et 09.

Sica et al. 2012 ont montré que les souches possèdent une forte hydrophobicité quand les valeurs étaient  $> 50\%$ , hydrophobicité modéré quand les valeurs étaient comprises entre  $20-50\%$ , et (hydrophile) faible quand étaient de valeurs  $< 20\%$ .

D'après Sica et al. (2012) nos résultats d'hydrophobicité pour le chloroforme montrent que les souches *L. fermentum* A4, *L. fermentum* C1 testées présentent une bonne hydrophobicité (52.880%, 52.627%), cela témoigne une bonne sélectivité des surfaces membranaires, et pour les souches *L. fermentum* D4, *L. mucosae* E4 ont une faible hydrophobicité dont les valeurs sont 16.661 et 14.380% respectivement. Nous avons constaté aussi des pourcentages d'hydrophobicité modéré pour les autres souches et le pourcentage d'hydrophobicité varie entre 42.625% pour *L. fermentum* A1 et 20.051% pour *L. fermentum* B3. Concernant le xylène les résultats montrent que toutes les souches ayant une hydrophobicité modéré sauf que les souches

*L. fermentum* C3, *L. fermentum*D2, *L. fermentum*D4, *L. frumenti* E3 ayant une faible hydrophobicité.

Pour l'acétate d'éthyle nous avons constaté que toutes les souches possèdent une hydrophobicité modérée et le pourcentage varie entre 23.107% pour *L. fermentum* C2 et 44.200% pour *Lactobacillus mucosae* A2.

**Tableau 06 :**Le pourcentage d'hydrophobicité des souches de *Lactobacillus* reminal pour trois solvants (Chloroforme, Xylène et Acétate d'éthyle).

Les souches	Hydrophobicité (%)		
	Chloroforme	Xylène	Acétate d'éthyle
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	42.625 ± 4.541	22.920 ± 1,201	30.800 ± 5.685
<i>Lactobacillus mucosae</i> A2	31.007 ± 2.625	36.897 ± 6,676	44.200 ± 1.636
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	24.344 ± 8.466	45.382 ± 3,667	39.057 ± 6.228
<i>Lactobacillus fermentum</i> A4	52.880 ± 2.947	21.415 ± 6.044	25.033 ± 20.504
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	36.864 ± 0.202	15.96 ± 2,776	28.240 ± 9.049
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	35.474 ± 4.075	26.987 ± 5,15	24.340 ± 11.690
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	20.051 ± 12.187	39.28 ± 1,639	27.617 ± 12.028
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	22.553 ± 0.797	22.743 ± 4,521	25.160 ± 12.028
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	52.627 ± 2.435	22.357 ± 3,239	30.550 ± 8.759
<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	40.937 ± 8.837	26.810 ± 3,13	23.107 ± 13.785
<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	33.529 ± 2.933	5.960	36.345 ± 2.609
<i>Lactobacillus fermentum</i> C4	27.320 ± 4.136	25.77 ± 6,36	36.753 ± 2.532
<i>Lactobacillus fermentum</i> D1	38.460 ± 7.925	ND	ND
<i>Lactobacillus fermentum</i> D2	38.740 ± 1.689	10.320	ND
<i>Lactobacillus fermentum</i> D3	30.221 ± 3.677	23.05 ± 13,199	ND
<i>Lactobacillus fermentum</i> D4	16.661 ± 1.175	1.23 ± 0,039	ND
<i>Lactobacillus mucosae</i> E1	41.083 ± 4.535	30.930 ± 9,432	ND
<i>Lactobacillus frumenti</i> E3	37.121 ± 12.192	10.640	ND
<i>Lactobacillus mucosae</i> E4	14.115 ± 0.525	19.123 ± 4,402	ND

ND : Non Déterminer

**Collado et al. (2008)** ont constaté que l'adhérence bactérienne avec les hydrocarbures est utilisée pour mesurer l'hydrophobicité extérieure des bactéries lactique, bien que les souches des lactobacilles possèdent des pourcentages plus élevés. Et l'hydrophobicité de la surface cellulaire était démontré par adhérence élevée au xylène. Des résultats trouvés par **Shakirova et al. (2013)** ont montré que des bactéries Gram positive possèdent un pourcentage d'hydrophobicité élevé par rapport à des Gram négative, et qui ont évalué l'hydrophobicité de *Lactobacillus acidophilus* par l'utilisation du xylène comme hydrocarbure, dont le pourcentage est de 66.87%. L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes. Ainsi, elle semble être un facteur aidant à l'adhérence, mais elle ne contribue pas à une bonne adhésion (**Schillinger et al., 2005**).

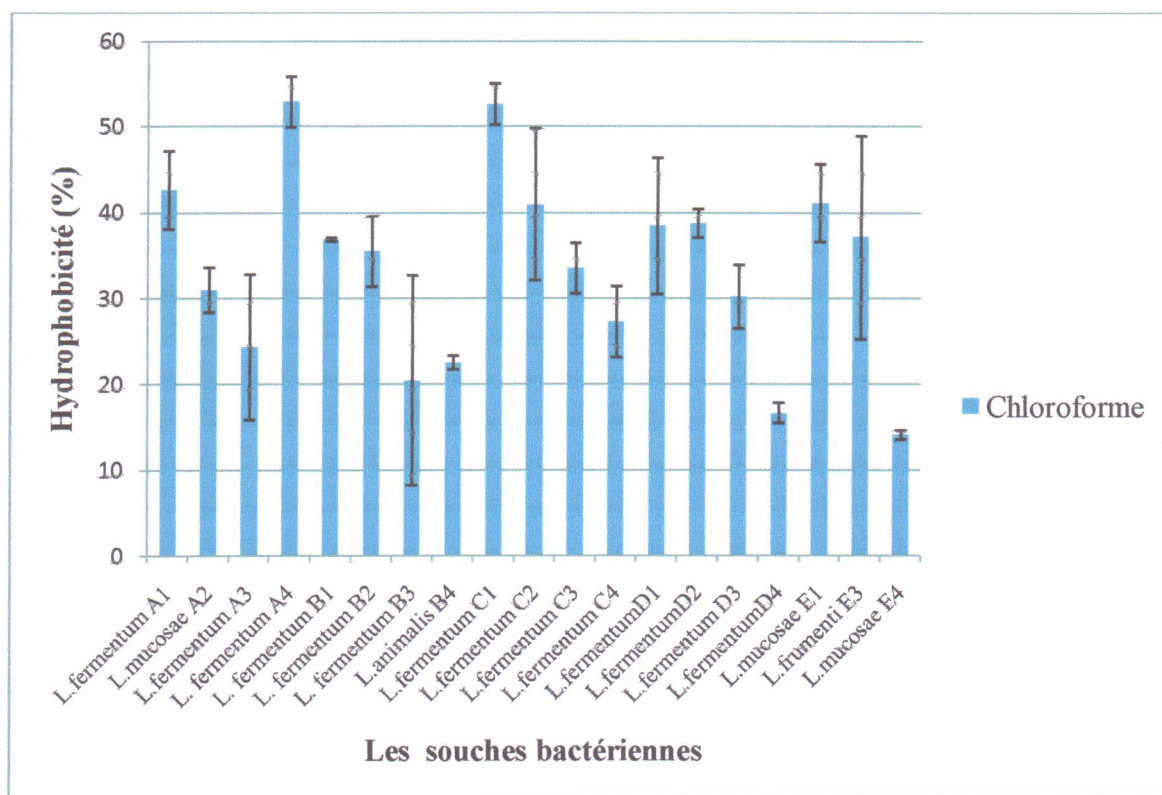


Figure 07 : Pourcentages d'hydrophobicité des souches *lactobacillus* ruminal pour le Chloroforme.

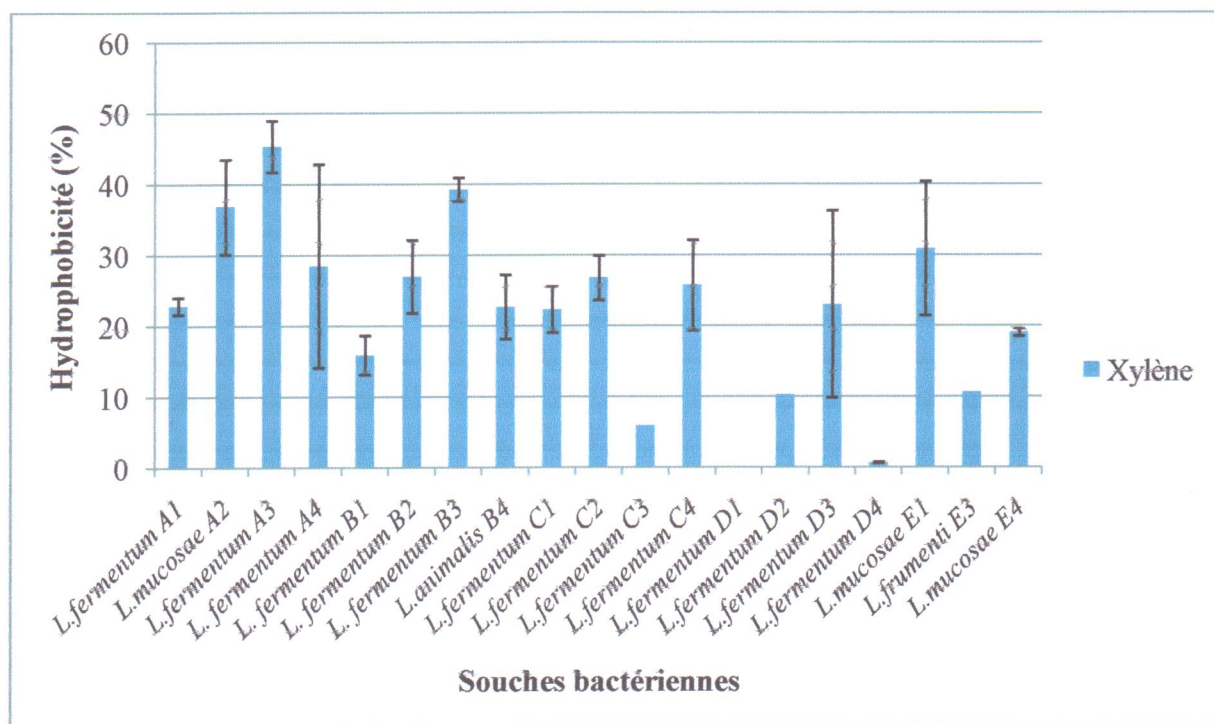


Figure 08 : Pourcentages d'hydrophobicité des souches *lactobacillus* ruminal pour le Xylène.

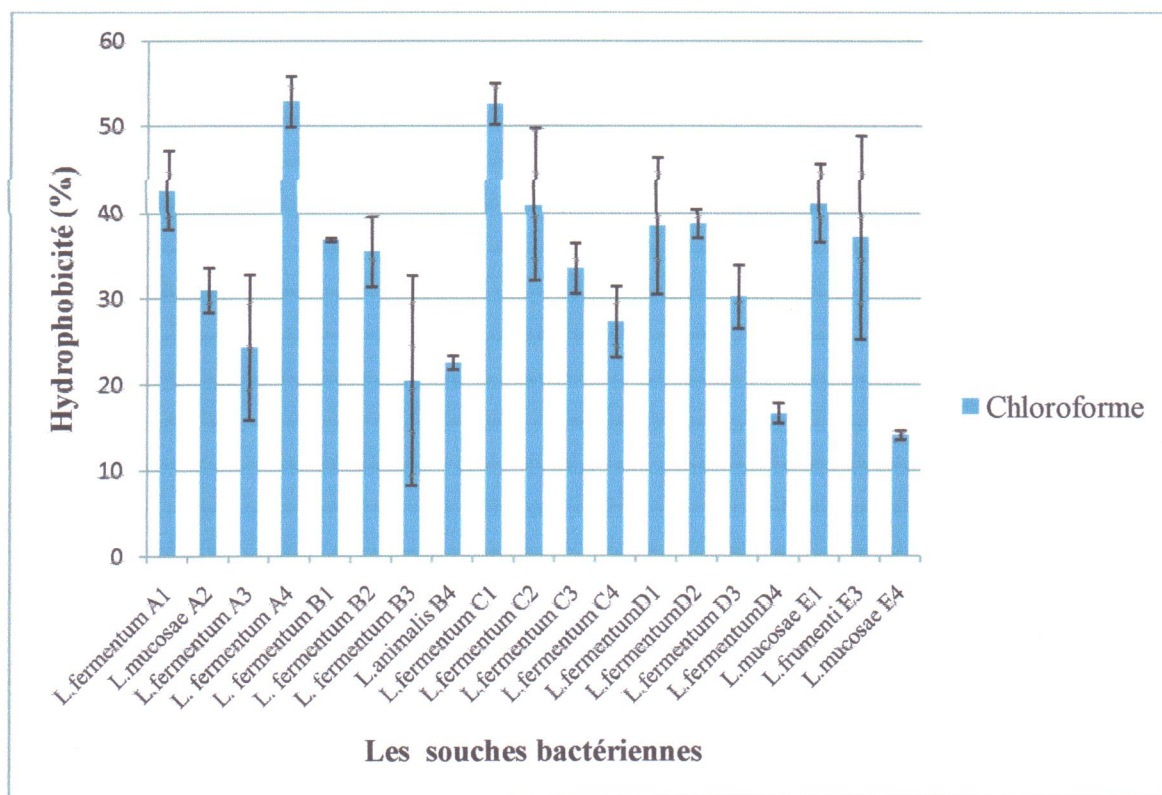


Figure 07 : Pourcentages d'hydrophobicité des souches *lactobacillus* ruminal pour le Chloroforme.

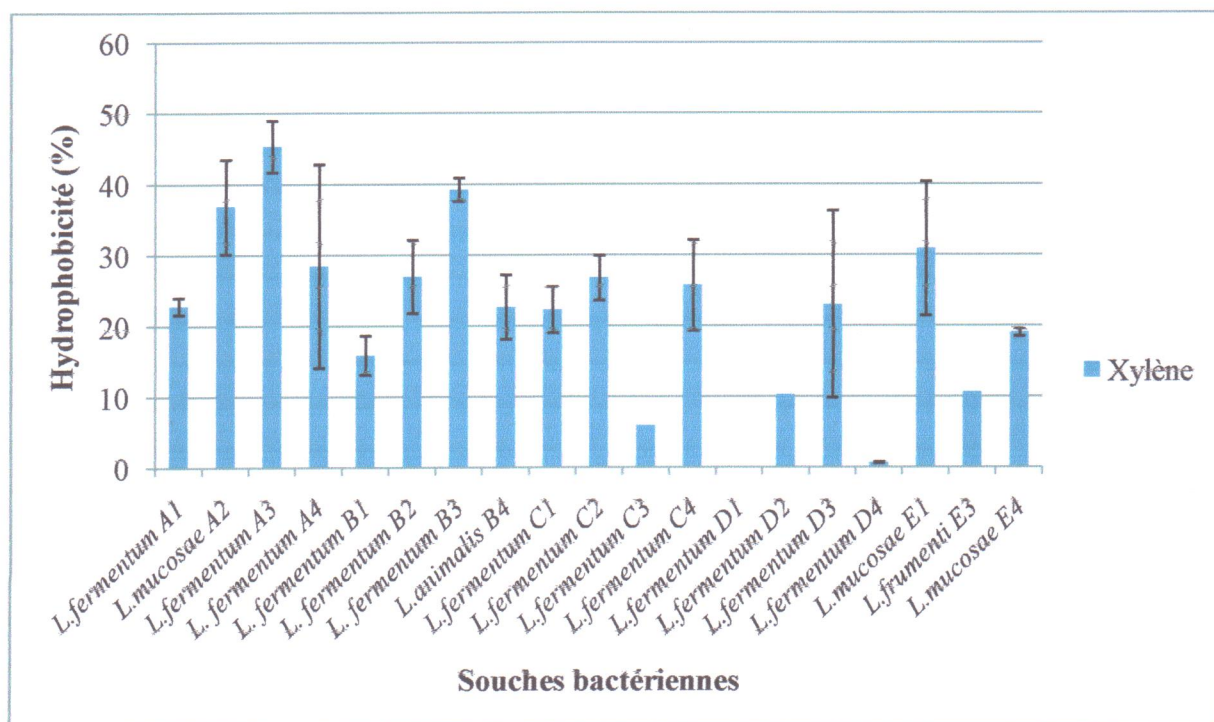
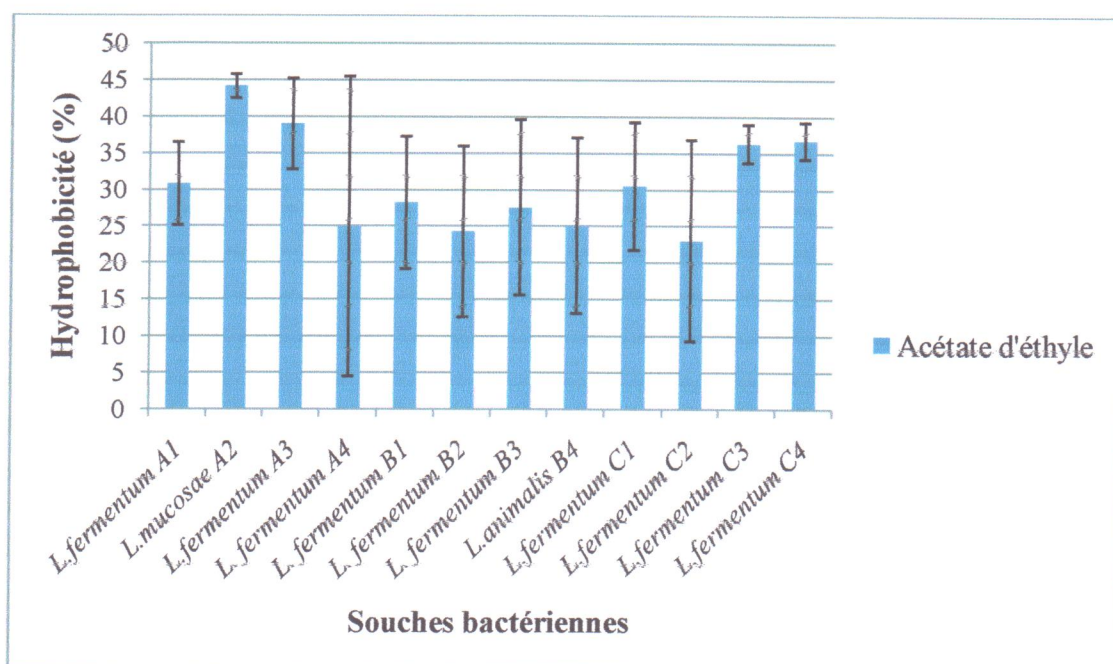


Figure 08 : Pourcentages d'hydrophobicité des souches *lactobacillus* ruminal pour le Xylène.



**Figure 09 :** Pourcentages d'hydrophobicité des souches *Lactobacillus* ruminal pour l'Acétate d'éthyle.

#### II.2.4. La production des molécules antagonistes

L'activité antibactérienne des lactobacilles ruminants contre cinq souches pathogènes a été évaluée afin de mettre en évidence un éventuel pouvoir antagoniste. Les résultats de ce test sont illustrés dans le tableau 07.

D'après les résultats obtenus, toutes les souches étudiées présentent une forte activité inhibitrice contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec des zones d'inhibition comprises entre 13 et 20 mm (figure10), et une activité faible contre *Escherichia coli* ATCC 25922 avec un diamètre de zones d'inhibition situé entre 6 et 10 mm.

Nous avons constaté que seules les souches (B3, C2, C4 et E1) sont actives contre *Salmonella sp.* Et les zones d'inhibition sont claires avec un diamètre d'inhibition variable entre 6 et 8 mm suivant la souche testée. L'inhibition est positive lorsqu'elle est supérieure à 1 mm (Allouche et al., 2010). La plupart des souches ne présentent aucun effet inhibiteur contre *Listeria sp.*, à l'exception des souches A1, A3, B1, B2, C2, D2, D4 et E4 qui ont un faible pouvoir antagoniste (un diamètre entre 7 et 10 mm). Les deux souches E1 et E4 ne manifestent aucun effet antagoniste contre *Staphylococcus aureus* ATCC 29522, et les deux autres souches A1 et A4 présentent une activité inhibitrice modérée avec un diamètre de la zone d'inhibition de 11 à 12 mm, et le reste des souches possèdent un pouvoir antimicrobien faible (figure11).

Tableau 07 : Activité antibactérienne des lactobacilles ruminales sur les germes indicateurs.

Diamètres de zones d'inhibition (mm)	Souches				
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29522	<i>Listeria</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	08	11	09	00	15
<i>Lactobacillus mucosae</i> A2	08	08	00	00	20
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	07	10	09	ND	20
<i>Lactobacillus frumentum</i> A4	09	12	00	00	19
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	09	09	07	00	14
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	07	10	09	00	15
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	07	07	00	08	18
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	08	08	00	00	19
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	07	08	00	00	14
<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	07	09	10	08	15
<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	06	10	00	00	13
<i>Lactobacillus fermentum</i> C4	09	09	00	08	16
<i>Lactobacillus fermentum</i> D1	10	09	00	00	14
<i>Lactobacillus fermentum</i> D2	10	09	07	00	15
<i>Lactobacillus fermentum</i> D3	07	10	00	00	13
<i>Lactobacillus fermentum</i> D4	09	08	10	00	17
<i>Lactobacillus Mucosae</i> E1	09	00	00	06	19
<i>Lactobacillus frumenti</i> E3	10	09	00	00	13
<i>Lactobacillus Mucosae</i> E4	10	00	10	00	13

ND : Non Déterminer

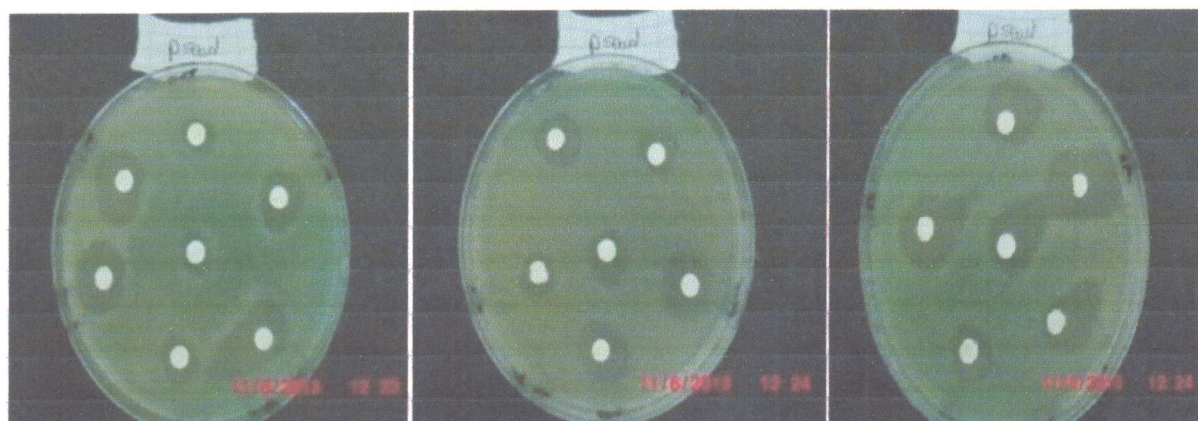


Figure10: Activité inhibitrice des souches sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



**Figure 11:** Activité inhibitrice des souches sur *Staphylococcus aureus* ATCC 29522

Ces résultats indiquent que nos lactobacilles sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne. Les lactobacilles ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis des bactéries pathogènes. La majorité des souches sont actives sur quelques bactéries à Gram positif tel que *Staphylococcus aureus* ATCC 29522, mais pas tous sur les bactéries à gram négatif. **Dortu et Thonart (2009)** suggèrent que les bactéries Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques. **(Labioui et al., 2005)** ont montré que chez *Listeria*, bactéries à Gram positif, les cellules résistantes aux bactériocines ont une membrane de composition différente que celle des cellules sensibles. Par ailleurs, les bactéries lactiques peuvent exercer une activité inhibitrice sur le développement de microorganismes indésirables et pathogènes grâce à la production d'acides organiques (l'acide lactique en particulier), de peroxyde d'hydrogène ou d'inhibiteurs spécifiques (bactériocines) **(Divya et al., 2012)**. **Allouche et al. (2010)** ont montrés que toutes les souches de *Lactobacillus* produisent et excrètent dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

### II.2.5. Résistance aux antibiotiques

Les résultats de la résistance et la sensibilité des lactobacilles ruminants sont groupés dans le tableau 08:

Les résultats obtenus montrent que :

- Toutes les souches montrent une résistance à quatre antibiotiques testés (Colistin sulfate, Acide Nalidixique, Ciprofloxacine et Vancomycine), sauf les deux souches *Lactobacillus fermentum* A1 et *Lactobacillus fermentum* B2 qui présente une sensibilité pour la Vancomycine ;
- Douze souches sont sensibles au Gentamicine alors que onze sont sensibles à l'Amikacine;
- La souche *Lactobacillus mucosae* A2 est la seule qui résiste le Chloramphénicol ;
- Douze souches sont résistantes pour la Kanamycine.

Il faut signaler que cette résistance et sensibilité trouvées dans notre étude, peuvent être liées à la concentration de chaque antibiotique d'où la nécessité de tester plusieurs concentrations pour confirmer les résultats.

Une étude récente a indiqué que les lactobacilles isolés à partir des produits commerciaux en Europe ont comportés des souches résistantes au chloramphenicol (8.5%) et à la combinaison, plus de 68% des isolats ont montrés la résistance à deux antibiotiques ou plus **(Sieladie et al. 2011)**.

Une autre étude réalisée par **Turchi et al. (2013)** ont montrés que les souches de *L. plantarum* présente une sensibilité pour Chloramphénicol.

**Sieladie et al. (2011)** démontré qu'en général, les lactobacilles ont montré une résistance significative au ciprofloxacine, et la résistance des souches de *L. plantarum* au ciprofloxacine peut être due à leur résistance naturelle et intrinsèque, probablement due à la structure de la paroi cellulaire et à l'imperméabilité membranaire. Selon **Yu et al. (2013)** *L. plantarum* résiste bien la Kanamycine, la Vancomycine et Gentamicine. De même que pour l'espèce *Lactobacillus fermentum* qui a présenté une résistance à la Kanamycine (**Thirabunyanon et al., 2009**) et à la Vancomycine (**Kirtzalidou et al., 2011**). **Lavanya et al. (2011)** ont montrés que certains bactéries lactiques tels que *L. casei*, *L. plantarum*, *Leuconostoc* spp., *L. bulgaricus* et *L. fermentum* présentent une résistance a Vancomycine. Cette résistance est habituellement intrinsèque c-à-d. portée sur le chromosome et non pas transmissible.

**Tableau 08** : Résistance des souches de lactobacilles aux antibiotiques suivant la méthode de diffusion de disque

Les souches	Diamètre de zone d'inhibition en millimètre (mm)							
	AK 30µg	C 30µg	Gen 10µg	CT 50µg	AN 30µg	CIP 5µg	K 30µg	VA 30µg
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	20 <sub>(S)</sub>	28 <sub>(S)</sub>	23.5 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	16 <sub>(I)</sub>	20 <sub>(S)</sub>
<i>Lactobacillus mucosae</i> A2	18 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	18 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	16 <sub>(I)</sub>	0 <sub>(R)</sub>
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	20.5 <sub>(S)</sub>	26.5 <sub>(S)</sub>	23.5 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	16 <sub>(I)</sub>	0 <sub>(R)</sub>
<i>Lactobacillus fermentum</i> A4	20.5 <sub>(S)</sub>	27 <sub>(S)</sub>	17.5 <sub>(I)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	15 <sub>(I)</sub>	0 <sub>(R)</sub>
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	20 <sub>(S)</sub>	28.5 <sub>(S)</sub>	24.5 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	15 <sub>(I)</sub>	0 <sub>(R)</sub>
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	25 <sub>(S)</sub>	30 <sub>(S)</sub>	25 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	14 <sub>(R)</sub>	17 <sub>(S)</sub>
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	ND	ND	ND	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	15 <sub>(I)</sub>	ND
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	ND	ND	ND	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	ND
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	17 <sub>(S)</sub>	29 <sub>(S)</sub>	18.5 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>
<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	20.5 <sub>(S)</sub>	26 <sub>(S)</sub>	20.5 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>
<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	15 <sub>(I)</sub>	27.5 <sub>(S)</sub>	19 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	12 <sub>(R)</sub>	16 <sub>(R)</sub>	13 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>
<i>Lactobacillus fermentum</i> C4	19 <sub>(S)</sub>	27 <sub>(S)</sub>	26 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	12 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>
<i>Lactobacillus fermentum</i> D1	15 <sub>(I)</sub>	28 <sub>(S)</sub>	17.5 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	14 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>
<i>Lactobacillus fermentum</i> D2	18.5 <sub>(S)</sub>	28 <sub>(S)</sub>	18.5 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	15 <sub>(I)</sub>	0 <sub>(R)</sub>
<i>Lactobacillus fermentum</i> D3	ND	ND	ND	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	12 <sub>(R)</sub>	ND
<i>Lactobacillus fermentum</i> D4	19.5 <sub>(S)</sub>	27 <sub>(S)</sub>	19 <sub>(S)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	13 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>
<i>Lactobacillus mucosae</i> E1	ND	ND	ND	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	ND
<i>Lactobacillus frumenti</i> E3	ND	ND	ND	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	ND
<i>Lactobacillus mucosae</i> E4	ND	ND	ND	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	0 <sub>(R)</sub>	ND

ND : Non Déterminer

**AK 30µg:** Amikacine, **C 30µg:** Chloramphénicol, **Gen 10µg:** Gentamicine, **CT 50µg:** Colistin sulfate, **AN 30µg:** Acide Nalidixique, **CIP 5µg:** Ciprofloxacine, **K 30mcg:** Kanamycine, **VA 30µg:** Vancomycine.

(S): sensible, (I): intermédiaire, (R): résistant.



### II.2.6. La capacité d'agglutination de levure

Dix-neuf souches sont évaluées pour leur capacité d'agglutination avec *S. cerevisiae*. Onze souches sont considérées positives pour ce test en absence de Mannose, alors que tous les souches sont positifs après l'addition de Mannose sauf les deux souches *Lactobacillus animalis* B4 et *Lactobacillus fermentum* C3 (Tableau 09).

**Tableau 09** : L'agglutination des souches de *Lactobacillus* ruminal avec la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Les souches	Sans Mannose	Avec Mannose
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	+	+
<i>Lactobacillus mucosae</i> A2	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> A4	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	-	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	-	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	+	+
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	-	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> C4	-	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> D1	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> D2	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> D3	-	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> D4	+	+
<i>Lactobacillus Mucosae</i> E1	+	+
<i>Lactobacillus frumenti</i> E3	+	+
<i>Lactobacillus Mucosae</i> E4	ND	+

ND : Non Déterminer

Les résultats montrent que les souches *Lactobacillus animalis* B4 et *Lactobacillus fermentum* C3 ne peuvent pas d'agglutiner la levure.

Le niveau d'agglutination des cellules indique la capacité d'adhérence entre les bactéries et la cellule hôte, la surface cellulaire des levures exprime une variété d'hydrates de carbone qui peut former un corps obligatoire réticulé avec le lectine bactérien et finalement diriger l'agrégation. Pour cette raison, dans un essai *in vitro* la cellule de levure est habituellement employée comme une cellule hôte (Liu et al., 2011). Gross et al. (2010) ; Pretzer et al. (2005) ont étudié la capacité d'adhérence de mannose pour les différentes souches de *Lactobacillus plantarum* en utilisant le test d'agglutination de levure. Les résultats ont montré que toutes les souches de *Lactobacillus plantarum* possèdent un effet positif, et peuvent être empêchées d'agglutiner par l'addition de suspension du  $\alpha$ -methylmannoside, pour confirmer le mécanisme de liaison spécifique du mannose. Une étude conduite par Turchi et al. (2013) a montré que la capacité de *Lactobacillus plantarum* pour adhérer à des cellules *S. cerevisiae* ont été comparées à la présence du gène de *msa* dans le génome, et ont observé que 63.6 % des souches pouvaient agréger aux cellules de levure *in vitro*, bien que peu des souches ont présenté le gène de *msa* (21.2 %). d'ailleurs, deux souches ont présenté le gène de *msa*, mais ne pouvaient pas adhérer aux cellules de levure. Ceci peut être dû à la variation des séquences de gène de *msa* des souches *L. plantarum*.

### II.2.7. Pourcentage d'auto-agrégation

L'agrégation des bactéries entre eux est un mécanisme à l'origine de la formation de biofilms. Elle est l'un des mécanismes d'inhibition des microorganismes pathogènes. Pour mettre en évidence la capacité des cellules de *Lactobacillus ruminal* à s'autoagréger entre elles un test d'agrégation a été réalisé. Les résultats sont illustrés dans la Figure 12.

Tableau 10 : Le pourcentage de l'auto-agrégation des souches de *Lactobacillus ruminal*

Les souches	Pourcentage d'auto-agrégation %
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	97.924 ± 0,915
<i>Lactobacillus mucosae</i> A2	98.564 ± 1,454
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	97.169 ± 0,962
<i>Lactobacillus fermentum</i> A4	98.987 ± 0,977
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	98.079 ± 0,196
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	99.036 ± 0,417
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	98.794 ± 0,978
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	99.062 ± 0,696
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	97.421 ± 2,066
<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	96.354 ± 0,983
<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	97.642 ± 1,450
<i>Lactobacillus fermentum</i> C4	97.491 ± 0,621
<i>Lactobacillus fermentum</i> D1	98.329 ± 2,026
<i>Lactobacillus fermentum</i> D2	97.254 ± 1,401
<i>Lactobacillus fermentum</i> D3	95.718 ± 0,667
<i>Lactobacillus fermentum</i> D4	99.119 ± 0,577
<i>Lactobacillus Mucosae</i> E1	98.305 ± 0,000
<i>Lactobacillus frumenti</i> E3	98.473 ± 0,673
<i>Lactobacillus Mucosae</i> E4	98.940 ± 0,727

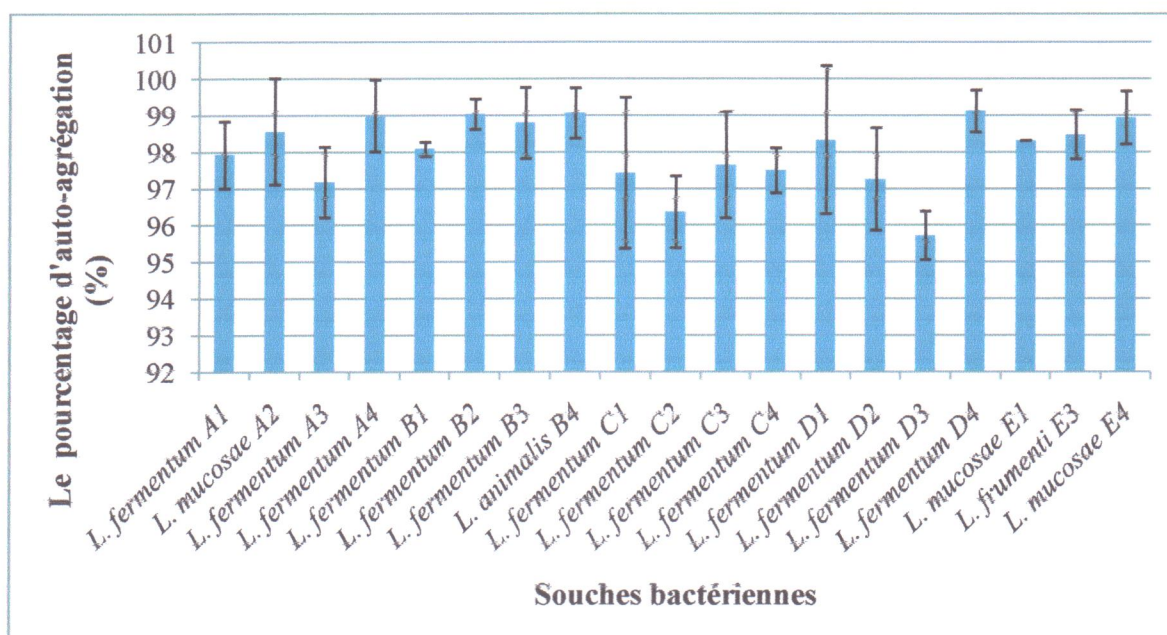


Figure 12 : Le pourcentage de l'auto-agrégation des souches de *Lactobacillus ruminal*

Les valeurs d'auto-agrégation sont comprises entre 95.718 % et 99.119 %, et sont généralement fort. La capacité d'auto-agrégation est l'un des facteurs clé qui déterminent la capacité des souches probiotiques d'adhérer à la cavité buccale, au tractus gastro-intestinal, et à l'appareil urogénitale. Les lactobacilles possédant une capacité d'agrégation et une surface cellulaire hydrophobe peuvent avoir plus de chance pour l'adhérence aux cellules intestinales (Divya et al., 2012). D'après Juarez Tomas et al. (2005), l'auto-agrégation de la souche *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294 a été égale à 81.57% après 3h d'incubation dans le milieu MRS, et presque les mêmes résultats sont obtenus dans une autre étude réalisée par Vidhyasagar et Jeevaratnam (2013), qui a montré que *P. pentosaceus* VJ41 possède un pourcentage d'agrégation maximum de 89%. La capacité d'auto-agrégation, ou la formation des blocs multicellulaires entre les micro-organismes de la même souche, est l'un des mécanismes proposés pour expliquer le rôle protecteur des lactobacilles. Cette propriété, liée à la capacité d'adhérence aux cellules épithéliales (Juarez Tomas et al., 2005). L'auto-agrégation observée dans notre étude pourrait être liée à la composition de la surface cellulaire, parce qu'il n'a pas été perdu après lavage et suspension des cellules dans le PBS. La même remarque a été proposée dans un travail réalisé par Kos et al. (2003) qui a montré que *L. acidophilus* M92 possède un pourcentage d'auto-agrégation fort après la mesure de taux de sédimentation pendant 5h. Une étude similaire réalisée par Collado et al. (2008) montre que les souches *L. rhamnosus* LC-705 and *L. fermentum* ME-3 ont une forte capacité d'auto-agrégation après 2h d'incubation.

Le principal objectif de ce travail est d'étudier quelques aptitudes technologiques et probiotiques de dix-neuf souches des lactobacilles ruminales. Ces souches ont été isolées et identifiées à partir de la microflore lactique du rumen de chèvre originaire de la région de Djimla (Jijel), cette collection renferme quatre (4) espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* représentés par *L. fermentum*, *L. animalis*, *L. frumenti*, *L. mucosae* dont *L. fermentum* est le plus dominant.

D'après les résultats d'étude des aptitudes technologiques, nous avons pu déduire que, toutes les souches dépourvues d'activité amylolytique et ne produisent pas des exopolysaccharides, alors que à partir des résultats fournis par l'étude *in vitro* des aptitudes probiotiques de *Lactobacillus* ruminants nous avons pu déduire que, même au sein d'une même espèce, il existe des variations entre les souches au niveau de la résistance à des conditions hostiles : acidité (pH2, pH3, pH4) sels biliaires (0.3%) et phénol (0.4%).

Concernant l'activité antimicrobienne on a observé que toutes les espèces sont capables de synthétiser des substances inhibitrices et possèdent une résistance différente aux antibiotiques. Comme elles ont montré une bonne hydrophobicité et une forte capacité d'auto-agrégation.

Enfin, les résultats obtenus dans cette étude montrent que la plupart de nos souches avaient des bonnes fonctionnalités probiotiques mais elles nécessitent d'autres études approfondies pour mieux juger ces souches. Donc ils permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives pour compléter ce travail sur la flore lactique ruminale de chèvre surtout *Lactobacillus* ruminal, Donc nous proposons sur le plan technologique:

Les souches de *Lactobacillus* ruminal isolées peuvent faire l'objet :

- D'une étude du comportement vis-à-vis des traitements de conservation, la congélation et la lyophilisation.
- D'une meilleure caractérisation des activités enzymatiques des souches bactériennes, car la qualité des produits fermentés passe par une meilleure connaissance des activités métaboliques des bactéries lactiques.
- D'une étude *in vivo* des propriétés probiotiques des souches possédant des bonnes aptitudes *in vitro* (par exemple l'adhésion aux cellules épithéliales humaines).

## Références Bibliographiques

- Allouche F-N., Hellal A. et Laraba A., 2010.** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière, *Nature et Technologie*, **03**: 13-20.
- Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M-C., Chapot-Chartier M-P., Chouayekh H., Coccagn- Bousquet M., Deghorain M., Gadu Ph., Gilbert Ch., Goffin Ph., Guédon E., Guillouard L., Guzzo J., Hols P., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet Ch., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R et Yvon M., 2008.** Métabolisme et ingénierie métabolique. In : **Corrieu G et Luquet F.M.**, Bactéries lactiques de la génétique aux ferments, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 271-509.
- Axelsson L., 2004.** Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In : **Salminen S, Wright A-V and Ouwehand A.**, Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, 3<sup>rd</sup> Edition, Food Science and Technology, Marcel Dekker, New York, USA, 1-72.
- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M et Ouzrout R., 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabie et kabyle", *Sciences & Technologie*, **23** :30-37.
- Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J-Ph., 2008.** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : **Corrieu G et Luquet F-M.**, Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 661-785.
- Boke H., Aslim B. and Alp G., 2010.** The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPS) produced by yogurt starter bacteria, *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, **62** (2), 323-328.
- Bonifait L., Chandad F et Grenier D., 2009.** Les probiotiques en santé buccale : mythe ou réalité?, *JADC*, **75**(8) :585-590.
- Caramia Gand Silvi S., 2011.** Probiotics: From the ancient wisdom to the actual therapeutical and nutraceutical perspective. In: **Malago J-J., Koninkx J-F-J-G and Marinsek-Logar R.**, Probiotic bacteria and enteric infections: Cytoprotection by probiotic bacteria, *Springer Science+Business Media B.V.*, 3-37.
- Chaucheyras -Durand F., Chevaux E., Martin C and Forano E., 2012.** Use of yeast probiotics in ruminants: effects and mechanisms of action on rumen pH, fibre degradation, and microbiota according to the diet. In: **Everlon Cid Rigobelo.**, Probiotic in animals, In Tech, Croatia, 119-152.
- Collado M-C., Meriluoto J and Salminen S., 2008.** Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains, *Eur Food Res Technol*, **226**:1065-1073.
- Corrieu G. et Luquet F.M., 2005.** Bactéries lactiques et probiotiques, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, P : 91.
- Diop M-B., Destain J., Tine E et Thonart Ph., 2010.** Les produits de la mer au Sénégal et le potentiel des bactéries lactiques et des bactériocines pour la conservation, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **14**(2), 341-350.
- Divya J-B., Varsha K- K. and Nampootheri K-M., 2012.** Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry, *Appl Biochem Biotechnol.*, **167**:1314-1324.

- Doleyres Y., 2003.** Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées, Thèse de Doctorat, Université Laval Québec, Canada.
- Dortu C et Thonart Ph ., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13** (1), 143-154.
- Drouault S et Corthier G., 2001.** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé, *Vet. Res.*, **32** : 101–117.
- Durand M., 1982.** Orientation du métabolisme du rumen au moyen des additifs, *Ann. Zootech.*, **31**(1) :47-76.
- Egan A. R., 2005.** Experimental designs for rumen microbiology *In: Makkar H. P.S and Mcswenney Ch.S.*, Methods in gut microbial ecology for ruminants, Springer, Netherlands, 3-19.
- FAO/OMS., 2001.** Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes, Cordoba, Argentine.
- Felis G-E., Dellaglio F and Torriani S., 2009.** Taxonomy of probiotic microorganisms. *In: Charalampopoulos D and Rastall R-A.*, Prebiotics and probiotics science and technology, Springer Science+Business Media, 591- 637.
- Gross G., Snel J., Boekhorst J., Smits M A., and Kleerebezem M., 2010.** Biodiversity of mannose-specific adhesion in *Lactobacillus plantarum* revisited: strain-specific domain composition of the mannose-adhesin, *Beneficial Microbes*, **1** (1): 61-66.
- Gu R-X., Yang Z-Q., Li Z-H., Chen S-L., Luo Z-L., 2008.** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China, *Anaerobe*, **14**: 313–317.
- Guarner F., Khan A-G., Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A., Krabshuis J et Mair T-L., 2008.** Recommandation Pratique: Probiotiques et prébiotiques, *World Gastroenterology Organisation*.
- Guillot J-F., 2001.** Consequences of probiotics release in the intestine of animals. *In: Brufau J. (ed.)*, Feed manufacturing in the Mediterranean region. Improving safety: From feed to food. Zaragoza: CIHEAM, *Cahiers Options Méditerranéennes*, **54**: 17-21.
- Guiraud J-P et Rosec J-Ph., 2004,** Pratique des normes en microbiologie alimentaire, *AFNOR*, France, pp 240, 241.
- Guo X-H., Kim J-M., Nam H-M., Park S-Y. and Kim J-M., 2010,** Screening lactic acid bacteria from swine origin for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties, *Anaerobe*, **16**: 321-326.
- Guo Z., Wang J., Yan L., Chen W., Liu X., Zhang H., 2009.** *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains, *LWT - Food Science and Technology*, **42**:1640–1646.
- Harun-ur-Rashid Md., Togo K., Ueda M and Miyamoto T., 2007.** Probiotic characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Milk 'Dahi' in Bangladesh, *Pakistan Journal of Nutrition*, **6** (6): 647-652.

- Hassan A-N and Frank J-F., 2001.** Starter cultures and their use. *In: Marth E-H and Steele J-L, Applied dairy microbiology, 2<sup>nd</sup> Ed, Marcel Dekker, New York, USA, 151-206.*
- Idoui T., Boudjerda D., Leghouchi E et Karam N., 2009,** Activité probiotique de *Lactobacillus plantarum*: étude réalisée chez le poulet de chair isa 15, *Huitièmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo.*
- Ji Y., Kim H., Park H., Lee J., Lee H., Shin H., Kim B., Franz Ch-M-A-P. and Holzapfel W-H., 2013.** Functionality and safety of lactic bacterial strains from Korean kimchi, *Food Control, 31:* 467-473.
- Juarez Tomas M-S., Wiese B. and Nader-Macias 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:*1383-1391.
- Kalliomaki M., Salminen S and Isolauri E., 2008,** Positive interactions with the microbiota: Probiotics *In: Huffnagle G-B and Noverr M-C. GI microbiota and regulation of the immune system, Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA, 57- 66.*
- Khalil R., Mahrous H., El-Halafawy K., Kamaly K., Frank J and El Soda M., 2007.** Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt, *African Journal of Biotechnology,6 (7):* 939-949.
- Khater K-A- A., Ali M-A.and Ahmed E-A-M., 2010,** Effect of encapsulation on some probiotic criteria, *Journal of American Science, 6(10):* 836-845.
- Kirtzalidou E., Pramateftaki P., Kotsou M. and Kyriacou A., 2011.** Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota, *Anaerobe, 17:* 440-443.
- Kos B., S`us`kovic` J., Vukovic`S.,S`impraga M., FreceJ and Matos`ic`S., 2003.** Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92, *Journal of Applied Microbiology, 94:* 981-987.
- Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M et Ouhssine M., 2005,** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 144 :*237-250.
- Larpent J-P., 1996,** Les bactéries lactiques. *In: Bourgeois C-M et Larpent J-P., Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaire, 2<sup>ème</sup> édition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 3-33.*
- Lavanya B., Sowmiya S., Balaji S. and Muthuvelan B., 2011.** Screening and characterization of lactic acid bacteria from fermented milk, *British Journal of Dairy Sciences,2(1):* 5-10.
- Lee K W., Park J Y., Jeong H R., Heo H J., Han N S., KimJ H., 2012.** Probiotic properties of Weissella strains isolated from human faeces, *Anaerobe, 18:* 96-102.
- Leroi F., 2009.** Bactéries lactiques et applications alimentaires Partie 2 : les produits de la mer, *In : "Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications Industrielles des bactéries lactiques"* Djamel Drider et Hervé Prévost coordonnateurs, Préface Dr. Alexandra GRUSS, ÉCONOMICA, 459-474.
- Liu H., Xu W., Luo Y., Tian H., Wang H., Guo X., Yuan Y., Huang K.,2011.** Assessment of tolerance to multistresses and in vitro cell adhesion in genetically modified *Lactobacillus plantarum* 590, *Antonie van Leeuwenhoek, 99:*579-589.

- Mackie R L, McSweeney Ch S., Aminov R I., 2001, Rumen, *Encyclopedia Of Life Sciences*, John Wiley & Sons, 1-11.**
- Marteau P et Seksik P., 2005, Probiotiques et alicaments. In: Luquet FM et Corrieu G., Bactéries lactiques et probiotiques, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 255-289.**
- Mayo B., Aleksandrak - Piekarczyk T., Fernández M., Kowalczyk M., Álvarez - Martín P and Bardowski J., 2010. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In: Mozzi F., Raya R-R and Vignolo G-M., Biotechnology of lactic acid bacteria, Novel Applications, Wiley-Blackwell, USA, 3-34.**
- Mcsweeney C-S., Denman S-E and Mackie R-I., 2005. Rumen bacteria. In: Makkar H-P-S., Mcsweeney C-S., Methods in gut microbial ecology for ruminants, Springer, Netherlands, 23-37.**
- Mishra V and Prasad D-N., 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics, *International Journal of Food Microbiology*, 103: 109-115.**
- Monnet Ch., Latrille E., Béal C. et Corrieu G., 2008. Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Corrieu G et Luquet F-M., Bactéries lactiques de la génétique aux ferments, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 511-611.**
- Morisset D, Berjeaud JM, Frère J et Héchard Y., 2005. Bactériocines de bactéries lactiques. In : Luquet F-M et Corrieu G., Bactéries lactiques et probiotiques, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 113-194.**
- Muller J-A., Ross R-P., Fitzgerald G-F and Stanton C., 2009. Manufacture of probiotic bacteria. In: Charalampopoulos D and Rastall R-A., Prebiotics and probiotics science and technology, Springer Science+Business Media, LLC, 725-759.**
- Nagaraja T-G. and Titgemeyer E-C., 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook, *J. Dairy Sci.* 90:E17-E38.**
- Ninane V., Mukandayambaje R. et Berben G., 2009. Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé de kéfir, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(3) : 459-466.**
- Normand M., Roland N., Richoux R et Kerjean J-R., 2006. Propriétés probiotiques des bactéries propioniques laitières, *Programme Nutrition Santé en Bretagne*.**
- Patterson C-A., 2008. Probiotiques : Bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base, *Agriculture and Agri- Food Canada*.**
- Pilet M.F., Magras C et Federighi M., 1998. Bactéries lactiques. In: Sutra L., Federighi M et Jouve J-L., Manuel de bactériologie alimentaire, Polytechnica, Paris, 235-260.**
- Pilet M.F., Magras C et Federighi M., 2005. Bactéries lactiques. In: Federighi M., Bactériologie alimentaire, 2<sup>ème</sup> Ed, Economica, Paris, 219-242.**
- Piquet M-A., Gloro R., Justum A-M et Reimund J-M., 2007. Les probiotiques, des outils thérapeutiques pour moduler les effets biologiques de la flore intestinale : une introduction, *Obes*, 2: 227-233.**
- Pot B., 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Corrieu G et Luquet F-M., Bactéries lactiques de la génétique aux ferments, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1-152.**



- Pretzer G., Snel J., Molenaar D., Wiersma A., Bron P A., Lambert J., Willem M. de Vos., van der Meer R., M A. Smits, and M Kleerebezem., 2005.** Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*, *Journal of bacteriology*, **187**: 6128–6136.
- Privat K et Thonart Ph., 2011.** Action des cultures protectrices : cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable, *Biotechnol. Agron.Soc. Environ.*, **15** (2): 339-348.
- Rashid Md., Togo K., Ueda M. and Miyamoto T., 2007.** Probiotic characteristics of lactic acid Bacteria isolated from traditional fermented milk 'Dahi' in Bangladesh, *Pakistan Journal of Nutrition* **6** (6): 647-652.
- Raynaud S., 2006.** Regulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*, Thèse de Doctorat, *L'institut National des Sciences Appliquées de Toulouse*.
- Robles V-R-E., 2006,** Effet de la fréquence de distribution de l'aliment sur l'ingestion, le comportement d'ingestion et la fermentation ruminale chez des génisses en engraissement intensif, Thèse de Doctorat, *Université Paul-Sabatier de Toulouse*.
- Schillinger U., Guigas C, Holzapfel W H., 2005.** *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products, *International Dairy Journal*, **15**: 1289-1297.
- Seesuriyachan Ph., Kuntiya A., Hanmoungjai P., and Techapun Ch., 2011.** Exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as an alternative carbon source: the effect of peptone, yeast extract and beef extract, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, **33** (4): 379-387.
- Shakirova L., Grube M., Gavare M., Auzina L. and Zikmanis P., 2013.** *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cell surface hydrophobicity and survival of the cells under adverse environmental conditions, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **40**: 85-93.
- Sica M-G., Brugnoli L-L, Marucci P-L. and Cubitto M-A., 2012.** Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming, *Antonie van Leeuwenhoek*, **101**: 869-879.
- Sieladie D-V., Zambou N- F., Kaktcham P-M., Cresci A. and Fonteh F., 2011.** Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, **9**: 12-28.
- Singh K., Kallali B., Kumar A and Thaker V., 2011.** Probiotics, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S287-S290.
- Singh S., Goswami P., Singh R and Heller K-J., 2009.** Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species, *Food Science and Technology*, **42**, 448–457.
- Smitinont T., Tansakul C., Tanasupawat S., Keeratipibul S., Navarini L., Bosco M. and Cescutti P., 1999,** Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization, *International Journal of Food Microbiology*, **51**: 105-111.
- Stewart C-S., 1992.** Lactic acid bacteria in the rumen. *In: Wood B-J-B., The lactic acid bacteria: Volume 1 (The lactic acid bacteria in health and disease), Elsevier Applied Science, England, 49-68.*

- Streit F., 2008**, Influence des conditions de récolte et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolérance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1, Thèse de Doctorat, L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement.
- Tabak S et Bensoltane A., 2012.** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales, *Nature & Technologie*, **06** :71-79.
- Thirabunyanon M., Boonprasom P. and Niamsup P., 2009.** Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells, *BiotechnolLett.*, **31**: 571-576.
- Thivend P., Fonty G., Jouany J-P., Durand M et Gouet Ph., 1985**, Le fermenteur rumen, *Reprod. Nutr.Dévelop.*, **25** (4B): 729-753.
- Turchi B., Mancini S., Fratini F., Pedonese F., Nuvoloni R., Bertelloni F., Ebani V-V. and Cerri D., 2013**, Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products, *World J Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s11274-013-1356-7.
- vanGeel-Schutten G. H., Flesch F., ten Brink B., Smith M- R. and Dijkhuizen L., 1998.** Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides, *ApplMicrobiolBiotechnol*, **50**: 697-703.
- Vidhyasagar V and Jeevaratnam K., 2013.** Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro, *Journal of Functional Foods*, **5**: 235-243.
- Vinderola C-G and Reinheimer J-A., 2003.**Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance, *Food Research International*, **36**: 895-904.
- Weimer P-J., 2001**, Microbiology of the dairy animal. In: **Marth E-H and Steele J-L**, Applied dairy microbiology, 2<sup>nd</sup> Ed, Marcel Dekker, USA, 1-58.
- Yanke L-J. and Cheng K-J., 1998.** A method for the selective enumeration and isolation of ruminal *Lactobacillus* and *Streptococcus*, *Letters in Applied Microbiology*, **26**: 248-252.
- Yao A-A., Egounlety M., Kouame L-P et Thonart P., 2009.** Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest : leur utilisation actuelle, *Ann. Méd. Vét.*, **153**: 54-65.
- Yu Z., Zhang X., Li Sh., Li Ch., Li D. and Yang Z., 2013.** Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut, *World J Microbiol Biotechnol*, **29**: 489-498.
- Zened A., 2011.** Particularités du microbiote et son activité lors de la déviation de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique de la voie trans-11 à la voie trans-10, Thèse de Doctorat, *Université de Toulouse*.
- Zhang Y., Li S., Zhang C., Luo Y., Zhang H. and Yang Z., 2011.** Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* F6 in skim milk, *African Journal of Biotechnology*, **10** (11): 2080-2091.

**Zinedine A., 2004.** Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels, Thèse de Doctorat, *Universite Sidi Mohammed Ben Abdellah*, Fes.

## Annexes

### Annexe01

- Milieu MRS modifié (préparé au laboratoire) : utilisé pour la détection de l'activité amylolytique ;
- Milieu MRS hypersaccharosé (20% de saccharose): pour la détection de la production d'exopolysaccharides
- Bouillons MRS pH 2, pH 3, pH 4 et pH 6,2 (déshydraté) : pour la réalisation des tests de résistance à l'acidité ;
- Bouillons MRS 0,3 % sels biliaires;
- Bouillons MRS 0,4 % phénol;

#### Gélose MRS modifiée :(1% amidon 10g)

Peptone.....	10 g
Extrait de levure.....	04 g
Acétate de sodium .....	05 g
Phosphate bipotassique .....	02 g
Sulfate de magnisium 7 H <sub>2</sub> O.....	0.2 g
Sulfate de manganèse 4 H <sub>2</sub> O.....	0.05 g
Amidon.....	10 g
Tween 80.....	1 ml
Agar.....	15 g
Eau distillée qsp.....	1000 ml

pH 6.2

Stérilisation 15 min à 120°C

#### La composition de PBS (Phosphate-Buffered Saline) (pH 7.2)

Nacl	08g
Kcl	0.20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44g

Mélanger dans 1000ml d'eau distillée

### Annexe 02

Les DO des souches de *Lactobacillus* ruminal à différent valeurs de pH

Les souches testés	DO <sub>650</sub> après 21h d'incubation			
	pH6.2 (contrôle)	pH2	pH3	pH4
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	2.557	0.344	1.277	2.205
	2.557	0.346	1.332	2.219
	2.557	0.344	1.343	2.219
<i>Lactobacillus mucosae</i> A2	2.525	0.461	1.464	2.267
	2.525	0.471	1.470	2.267
	2.525	0.476	1.475	2.284
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	2.525	0.414	1.449	2.267
	2.525	0.418	1.444	2.267
	2.525	0.416	1.429	2.284
<i>Lactobacillus fermentum</i> A4	2.525	0.446	1.403	2.250
	2.525	0.450	1.439	2.267

	2.525	0.452	1.454	2.284
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	2.495	0.402	1.021	2.205
	2.495	0.396	1.148	2.235
	2.495	0.406	1.192	2.235
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	2.495	0.345	1.139	2.250
	2.495	0.353	1.177	2.267
	2.495	0.356	1.209	2.267
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	2.495	0.361	1.429	2.250
	2.495	0.373	1.470	2.267
	2.495	0.389	1.489	2.284
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	2.495	0.267	1.293	2.235
	2.525	0.272	1.338	2.250
	2.495	0.276	1.343	2.267
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	2.536	0.049	0.132	2.069
	2.568	0.052	0.141	2.059
	2.568	0.052	0.141	2.103
<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	2.536	0.098	0.171	2.009
	2.536	0.099	0.168	2.038
	2.536	0.103	0.164	2.048
<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	2.536	0.091	0.090	2.009
	2.536	0.090	0.098	2.018
	2.536	0.090	0.096	2.048
<i>Lactobacillus fermentum</i> C4	2.536	0.078	0.172	2.038
	2.536	0.079	0.186	2.080
	2.536	0.085	0.207	2.103
<i>Lactobacillus fermentum</i> D1	2.440	0.045	0.145	1.893
	2.440	0.046	0.155	1.973
	2.440	0.043	0.163	2.018
<i>Lactobacillus fermentum</i> D2	2.553	0.094	0.098	1.981
	2.553	0.096	0.096	2.018
	2.553	0.085	0.096	2.059
<i>Lactobacillus fermentum</i> D3	2.588	0.090	0.045	1.990
	2.588	0.093	0.050	2.018
	2.588	0.097	0.056	2.069
<i>Lactobacillus fermentum</i> D4	2.588	0.063	0.061	1.964
	2.588	0.063	0.065	2.059
	2.588	0.067	0.074	2.080
<i>Lactobacillus mucosae</i> E1	2.588	0.053	0.063	1.999
	2.588	0.056	0.067	2.080
	2.588	0.056	0.079	2.080
<i>Lactobacillus frumenti</i> E3	2.588	0.123	0.095	2.048
	2.626	0.115	0.108	2.059
	2.626	0.112	0.109	2.080
<i>Lactobacillus mucosae</i> E4	2.626	0.053	0.099	2.115
	2.626	0.054	0.101	2.080
	2.626	0.055	0.102	2.127

## Annexe 03

Les DO des souches de *Lactobacillus* ruminal à 0.3% de sels biliaries et au 0.4% de phénol

Les souches testés	DO <sub>650</sub> après 21h d'incubation		
	MRS contrôle	MRS 0.3% sels biliaries	MRS 0.4% phénol
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	2.593	0.341	0.405
	2.593	0.402	0.408
	2.593	0.401	0.443
<i>Lactobacillus mucosae</i> A2	2.593	0.324	0.282
	2.593	0.494	0.286
	2.593	0.494	0.288
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	2.593	0.384	0.439
	2.593	0.470	0.474
	2.593	0.478	0.498
<i>Lactobacillus fermentum</i> A4	2.593	0.245	0.308
	2.800	0.322	0.315
	2.800	0.328	0.338
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	2.800	0.348	0.346
	2.800	0.404	0.371
	2.800	0.403	0.383
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	2.800	0.366	0.354
	2.800	0.411	0.358
	2.800	0.410	0.392
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	2.800	0.326	0.355
	2.800	0.412	0.365
	2.727	0.417	0.381
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	2.800	0.295	0.366
	2.800	0.330	0.393
	2.800	0.341	0.402
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	2.800	0.276	0.471
	2.800	0.363	0.493
	2.800	0.365	0.538
<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	2.800	0.313	0.375
	2.800	0.432	0.386
	2.800	0.437	0.396
<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	2.762	0.300	0.281
	2.762	0.466	0.286
	2.762	0.457	0.291
<i>Lactobacillus fermentum</i> C4	2.762	0.318	0.428
	2.800	0.493	0.448
	2.800	0.495	0.460
<i>Lactobacillus fermentum</i> D1	2.762	0.316	0.956
	2.762	0.472	1.010
	2.800	0.471	1.063
<i>Lactobacillus fermentum</i> D2	2.727	0.301	0.472
	2.762	0.428	0.502
	2.762	0.428	0.556
<i>Lactobacillus fermentum</i> D3	2.762	0.274	0.277
	2.762	0.283	0.288
	2.800	0.290	0.277
<i>Lactobacillus fermentum</i> D4	2.762	0.274	0.257
	2.762	0.408	0.276
	2.762	0.410	0.283

<i>Lactobacillus mucosae</i> E1	2.762	0.252	0.261
	2.800	0.307	0.275
	2.800	0.309	0.287
<i>Lactobacillus frumenti</i> E3	2.762	0.263	0.292
	2.762	0.353	0.320
	2.762	0.351	0.357
<i>Lactobacillus mucosae</i> E4	2.762	0.274	0.260
	2.762	0.302	0.272
	2.762	0.308	0.284

## Annexe 04

Résultats d'hydrophobicité des espèces du genre *Lactobacillus* remunal

### Chloroforme

Les souches bactériennes	DO <sub>660</sub> initiale	DO <sub>660</sub> finale			L'hydrophobicité (%)		
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	0.531	0.282	0.330	0.302	46.893	37.853	43.126
A2 <i>Lactobacillus mucosae</i>	0.516	0.343	0.355	0.370	33.527	31.201	28.294
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	0.508	0.385	0.427	0.341	24.212	15.945	32.874
A4 <i>Lactobacillus fermentum</i>	0.544	0.255	0.241	0.273	53.125	55.698	49.816
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	0.576	0.363	0.352	0.365	36.980	36.980	36.632
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	0.545	0.328	0.355	0.372	39.816	34.862	31.743
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	0.517	0.363	0.393	0.484	29.787	23.984	6.383
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	0.504	0.388	0.388	0.395	23.016	23.016	21.627
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	0.520	0.235	0.260	0.244	54.808	50	53.077
<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	0.526	0.257	0.338	0.337	51.140	35.741	35.931
<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	0.511	0.331	0.357	0.331	35.225	30.136	35.225
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0.521	0.388	0.354	0.394	25.529	32.054	24.376

C4							
<i>Lactobacillus fermentum</i> D1	0.527	0.370	0.315	0.288	29.791	40.228	45.351
<i>Lactobacillus fermentum</i> D2	0.536	0.327	0.320	0.338	38.99	40.228	36.940
<i>Lactobacillus fermentum</i> D3	0.514	0.380	0.344	0.352	26.070	33.074	31.520
<i>Lactobacillus fermentum</i> D4	0.510	0.419	0.425	0.431	17.843	16.670	15.49
<i>Lactobacillus mucosae</i> E1	0.529	0.339	0.294	0.302	35.917	44.423	42.911
<i>Lactobacillus frumenti</i> E3	0.523	0.353	0.355	0.377	32.505	50.950	27.916
<i>Lactobacillus mucosae</i> E4	0.503	0.429	0.433	0.434	14.711	13.916	13.718

### Xylène

Les souches bactériennes	DO <sub>660</sub> initiale	DO <sub>660</sub> finale			L'hydrophobicité (%)		
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	0.509	0.387	0.391	0.399	23.968	23.183	21.611
<i>Lactobacillus mucosae</i> A2	0.552	0.390	0.320	0.355	29.348	42.029	39.311
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	0.545	0.320	0.285	0.288	41.284	47.706	47.156
<i>Lactobacillus fermentum</i> A4	0.518	0.390	0.388	0.433	24.710	25.096	14.44
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	0.520	0.453	0.499	0.425	12.88	16.731	18.27
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	0.541	0.426	0.372	0.387	21.257	31.238	28.46
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	0.577	0.347	0.361	0.343	39.861	37.43	40.55
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	0.532	0.434	0.413	0.386	18.421	22.37	27.44
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	0.571	0.463	0.426	0.448	19.34	25.78	21.95
<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	0.511	0.590	0.374	0.358	23.68	26.81	29.94



<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	0.570	0.682	0.570	0.536	/	/	5.96
<i>Lactobacillus fermentum</i> C4	0.507	0.406	0.342	0.381	19.92	32.54	24.85
<i>Lactobacillus fermentum</i> D1	0.518	0.681	0.583	0.549	/	/	/
<i>Lactobacillus fermentum</i> D2	0.523	0.469	0.593	0.525	100.32	/	/
<i>Lactobacillus fermentum</i> D3	0.525	0.365	0.363	0.484	30.48	30.86	7.81
<i>Lactobacillus fermentum</i> D4	0.568	0.558	0.622	0.564	1.76	/	0.7
<i>Lactobacillus mecosea</i> E1	0.555	0.324	0.423	0.403	41.62	23.78	27.39
<i>Lactobacillus frementi</i> E3	0.573	0.578	0.512	0.512	-	10.646	10.646
<i>Lactobacillus mucosea</i> E4	0.502	0.381	0.414	0.423	24.10	17.53	15.74

#### Acétate d'éthyle

Souches	DO <sub>660</sub> initiale	DO <sub>660</sub> finale (Acétate d'éthyle)			L'hydrophobicité(%)		
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	0,560	0,410	0,677	0,365	26.785	/	34.821
<i>Lactobacillus mucosea</i> A2	0,543	0,296	0,313	0,300	45.488	42.360	44.751
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	0,501	0,294	0,283	0,341	41.317	43.513	31.94
<i>Lactobacillus fermentum</i> A4	0,506	0,315	0,324	0,499	37.747	35.968	1.383
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	0,530	0,406	0,325	0,410	23.396	38.679	22.641
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	0,556	0,486	0,356	0,420	12.590	35.97	24.460
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	0,548	0,338	0,468	0,384	38.321	14.60	29.271
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	0,530	0,338	0,468	0,384	36.236	11.698	27.552
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	0,551	0,342	0,436	0,370	37.931	20.871	32.851

<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	0,502	0,307	0,415	0,436	38.845	17.331	13.147
<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	0,542	0,335	0,355	0,600	38.192	34.502	/
<i>Lactobacillus fermentum</i> C4	0,575	0,350	0,362	0,379	39.130	37.043	34.09

## Annexe 05

Les résultats de test d'auto-agrégation

Les souches	DO initiale	DO après 2h			Pourcentage d'autoagrégation(%)		
<i>Lactobacillus fermentum</i> A1	0.289	0.008	0.003	0.007	97.232	98.962	97.578
<i>Lactobacillus mucosae</i> A2	0.325	0.001	0.003	0.010	99.692	99.077	96.923
<i>Lactobacillus fermentum</i> A3	0.365	0.010	0.007	0.014	97.260	98.082	96.164
<i>Lactobacillus frumentum</i> A4	0.329	0.007	0.002	0.001	97.872	99.392	99.696
<i>Lactobacillus fermentum</i> B1	0.295	0.006	0.006	0.005	97.966	97.966	98.305
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2	0.415	0.003	0.003	0.006	99.277	99.277	98.554
<i>Lactobacillus fermentum</i> B3	0.387	0.002	0.003	0.009	99.483	99.225	97.674
<i>Lactobacillus animalis</i> B4	0.462	0.002	0.008	0.003	99.567	98.268	99.351
<i>Lactobacillus fermentum</i> C1	0.349	0.011	0.001	0.015	96.848	99.713	95.702
<i>Lactobacillus fermentum</i> C2	0.256	0.007	0.012	0.009	97.266	95.312	96.484
<i>Lactobacillus fermentum</i> C3	0.311	0.012	0.003	0.007	96.141	99.035	97.749
<i>Lactobacillus fermentum</i> C4	0.279	0.005	0.008	0.008	98.208	97.133	97.133
<i>Lactobacillus fermentum</i> D1	0.399	0.002	0.002	0.016	99.499	99.499	95.990
<i>Lactobacillus fermentum</i> D2	0.352	0.012	0.013	0.004	96.591	96.307	98.864
<i>Lactobacillus fermentum</i> D3	0.397	0.015	0.016	0.020	96.222	95.970	94.962
<i>Lactobacillus fermentum</i> D4	0.265	0.002	0.004	0.001	99.245	98.490	99.623
<i>Lactobacillus Mucosae</i> E1	0.354	0.006	0.006	0.006	98.305	98.305	98.305
<i>Lactobacillus</i>	0.393	0.009	0.005	0.004	97.710	98.728	98.982

---

<i>frumenti</i> E3							
<i>Lactobacillus</i>	0.346	0.006	0.001	0.004	98.266	99.711	98.844
<i>Mucosae</i> E4							

Réalisé par :

- MESKINE Siham
- BENANE Fatima

Président : M<sup>e</sup>. BAHRI Fathia

Examineur : D<sup>r</sup>. LAGGOUNE Souheila

Encadreur : M<sup>e</sup>. KHENNOUF T

Thème :

## Etude de quelques aptitudes technologiques et probiotiques des souches du genre *Lactobacillus* ruminants

الملخص

في هذه الدراسة قمنا بتحديد الكفاءات التكنولوجية و البروبيوتيكية لتسعة عشر سلالة من العصيات اللبنية معزولة من كرش الماعز لمنطقة جيملة بجيجل. نتائج الاختبارات حول القابلية التكنولوجية أظهرت أن كل السلالات المعزولة ليس لها القدرة على هدم النشاء و ليس لها القدرة على إنتاج السكريات، بينما الاختبارات حول القابلية البروبيوتيكية أثبتت أن كل السلالات لها القدرة على مقاومة الحموضة كما أن لها القدرة على مقاومة الأملاح الصفراوية و الفينول. أما الاختبارات البروبيوتيكية فاثبتت أن السلالات لها القدرة على تخثير الخميرة، و لها فاعلية مضادة للجراثيم، كما لاحظنا أن هناك اختلاف بين السلالات فيما يخص مقاومة المضادات الحيوية واثبتت الدراسة كذلك قدرة عالية على الالتصاق الذاتي.

الكلمات المفتاحية : العصيات اللبنية , البكتيريا اللبنية، القابلية التكنولوجية، البروبيوتيك.

### Résumé

Dans cette étude nous avons testés Dix-neuf souches de *Lactobacillus* ruminal pour déterminer quelques aptitudes technologiques et probiotiques. Les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques indiquent que l'ensemble des souches ne présentent aucun pouvoir texturant et aucune activité amylolytique, alors que le pouvoir probiotique donne des résultats remarquables. Toutes les souches sont résistantes à l'acidité (pH 4) et quelques souches résistent même au pH 3 et le pH 2. La capacité des *Lactobacillus* ruminants à résister les sels biliaires et le phénol *in vitro* a été étudiée, et les résultats montrent que les souches peuvent survivre en présence des sels biliaire (0.3%) et peuvent résistent le phénol à (0.4%). L'activité antimicrobienne, la résistance aux antibiotiques, l'agglutination de levure et l'hydrophobicité *in vitro* ont été également étudiée. Les résultats ont montrés que les souches sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne, ainsi les résultats ont montrés que les souches ayant une bonne hydrophobicité, une capacité d'agglutination avec les levures, et une différence de résistance aux antibiotiques entre les souches.

**Mots clés :** *Lactobacillus* ruminal, bactéries lactiques, aptitudes technologiques, probiotique.

### Abstract

In this study we tested Nineteen strains of ruminal *Lactobacillus* to determine some technological and probiotic aptitudes. The results of the evaluation of the technological aptitudes indicate that the all strains have any texturing capacity and any amylolytic activity, whereas the probiotic capacity gives remarkable results. All the strains are resistant to acidity (pH 4) and some strains resist even the pH 3 and pH 2. The capacity of ruminal *Lactobacillus* to resist bils salts and phenol was studied *in vitro*, and the results shown that the strains could survive in the presence of bils salts (0.3%) and could resist the phenol (0.4%). The antimicrobial activity, resistance to antibiotics, the yeast agglutination and hydrophobicity were also studied *in vitro*. The results shown that the strains are able to synthesize inhibiting substances which have an antibacterial activity, also the results show that the strains have a good hydrophobicity, a capacity of agglutination with yeasts, the resistance to antibiotics differ between strains.

**Key words:** Ruminal *Lactobacillus*, lactic acid bacteria, technological aptitudes, probiotic.

