



**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Ibn Khaldoun–Tiaret**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie**

**Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master académique**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

**Présenté par :**

**BENRABAH YASMINE**

**BENAOUMEUR FATMA**

**Thème**

**Etude du potentiel probiotique des isolats lactiques**

**Soutenu publiquement le 03 juillet 2023**

**Jury :**

**Présidente:** M<sup>me</sup>BOUDALI S.

**Encadrante:** M<sup>me</sup> BENGUIAR R.

**Co-encadrante:** M<sup>me</sup> BENARABA R.

**Examinatrice :** M<sup>me</sup> MIHOUB F.

**Grade**

MAA

MCA

Pr.

Pr.

**Année universitaire 2022-2023**

# *Remerciements*

*Nous remercions tout d'abord **Allah** le tout puissant de m'avoir donné la foi, la patience, la volonté et le courage afin d'arriver à faire ce modeste travail.*

*Nous exprimons notre profonde gratitude à Madame **BENGUIAR R.** pour la confiance qu'elle a bien voulu nous accorder en acceptant de diriger les travaux de recherches du présent mémoire, Nous la remercions pour ses conseils, ses encouragements, son dynamisme et pour les orientations et les précieux conseils et surtout pour sa patience et ses compétences scientifiques qui nous ont permis de mener à bien cette étude.*

*Nous remercions Madame **BENARABA R.** pour nous avoir fait l'honneur d'être notre Co-promotrice, nous avoir laissé toute la liberté de gérer et d'organiser ce travail et aussi pour ses conseils judicieux et son aide précieuse.*

*Nous tenons à remercier profondément Madame **BOUDALI S.** pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance. Aussi,*

*Nous tenons à remercier profondément Madame **MIHOUB F.** d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous n'oublions pas de remercier les enseignants de Faculté des Sciences Biologiques de l'Université Ibn Khaldoun Tiaret pour nous avoir offert.*

*Nos plus sincères remerciements à mes **parents** pour leurs encouragements, leur confiance, leurs soutiens, leurs sacrifices*

*Ainsi au tous nos camarades de la promotion, une bonne formation au bout des cinq années qu'on a passé ensemble sous le toit de notre Faculté.*

# Dédicaces

*Avant de dédier ce travail nous remercions  
ALLAH le clément, le miséricordieux pour le  
courage,*

*la patience et la santé qu'il m'a donnée pour  
venir à bout de ce travail après 5 ans d'étude*

*A toi ma chère maman, quoi que je fasse, quoi  
que je dise, je ne saurai point te remercier  
comme il se doit ton affection me coudre, ta  
bienveillance me guide et ta présence à mes  
côtés a toujours été ma source de force face aux  
aléas de la vie*

*Toi mon cher papa*

*Tu as toujours été à mes côtés, me soutenir et  
m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude  
et mon affection*

*A ma chère sœur Lydia, pour son soutien morale  
et ses conseils précieux tout au long de mes  
études*

*A mes chères grandes mères*

*A tous mes amies, à ma chère tante Fatiha, à  
toute ma famille et à tous ceux que j'aime*



Yasmine

# ***Dédicaces***

*Je tiens vivement à dédier ce modeste travail :*

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en  
retour ;*

*A ceux qui m'ont aidé, encouragé et soutenu  
dans les moments*

*les plus difficiles et ceux à qui je dois tant*

*A mes très chers parents pour leur amour,*

*Tendresse et leur soutien continu ; qu'ils  
trouvent dans ce travail*

*La preuve modeste d'une reconnaissance infinie  
et d'un profond*

*Amour.*

*A mes chers frères qui m'ont soutenu avec leurs  
encouragements et qui m'ont mené à Cet  
aboutissement, auxquels je souhaite beaucoup  
de réussite et tout le bonheur du monde.*

*A tous mes amis, à mes copines à toute la  
promotion microbiologie appliqué.*



Fatma

## LISTE DES ABREVIATIONS

|                                   |                                  |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| <b>CO<sub>2</sub> :</b>           | Dioxyde de carbone               |
| <b>DO :</b>                       | Densité optique                  |
| <b><i>E. coli</i> :</b>           | <i>Escherichia coli</i>          |
| <b>Hétéro :</b>                   | Hétérofermentaire                |
| <b>Homo :</b>                     | Homofermentaire                  |
| <b><i>Lb. acidophilus</i> :</b>   | <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| <b><i>Lb. fermentum</i> :</b>     | <i>Lactobacillus fermentum</i>   |
| <b><i>Lb. gasseri</i> :</b>       | <i>Lactobacillus gasseri</i>     |
| <b><i>Lb. plantarum</i> :</b>     | <i>Lactobacillus plantarum</i>   |
| <b><i>Lb. paracasei</i> :</b>     | <i>Lactobacillus paracasei</i>   |
| <b><i>Lb. rhamnosus</i> :</b>     | <i>Lactobacillus rhamnosus</i>   |
| <b><i>Ln. mesenteroides</i> :</b> | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| <b>LB1 :</b>                      | Isolat lactique 1                |
| <b>LB2 :</b>                      | Isolat lactique 2                |
| <b>LB3 :</b>                      | Isolat lactique 3                |
| <b>LB4 :</b>                      | Isolat lactique 4                |
| <b>MRS:</b>                       | Man Rogosa Sharpe                |
| <b>PBS :</b>                      | Sodium phosphate dibasique       |
| <b>pH :</b>                       | Potentiel Hydrogène              |
| <b>UFC :</b>                      | Unité formant colonie            |

## LISTE DES FIGURES

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Figure 1</b> | : Diagramme récapitulatif de la démarche expérimentale.....  | 7  |
| <b>Figure 2</b> | : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de l'isolat LB1 après la coloration de Gram (objectif ×100).....           | 13 |
| <b>Figure 3</b> | : Aspect macroscopique (C) et microscopique (D) de l'isolat LB2 après la coloration de Gram (objectif ×100).....           | 13 |
| <b>Figure 4</b> | : Aspect macroscopique (E) et microscopique (F) de l'isolat LB3 après la coloration de Gram (objectif ×100).....           | 13 |
| <b>Figure 5</b> | : Aspect macroscopique (G) et microscopique (H) de l'isolat LB4 après la coloration de Gram (objectif ×100).....           | 14 |
| <b>Figure 6</b> | : Croissance des isolats LB1 (A), LB2 (B), LB3 (C), LB4 (D) à différents pH après 3h d'incubation.....                     | 16 |
| <b>Figure 7</b> | : Croissance des isolats lactiques LB1 ; LB2;LB3 et LB4 en présence de 0,3% de sels biliaires après 4 h d'incubation ..... | 17 |
| <b>Figure 8</b> | : Hydrophobicité de surface des isolats LB1 ; LB2 ; LB3 et LB4 au toluène...   | 20 |
| <b>Figure 9</b> | : Capacité d'auto-agrégation des isolats lactiques LB1 ; LB2 ; LB3 et LB4 .....  | 21 |

## LISTE DES TABLEAUX

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Tableau 1</b> | : Matériel, milieux de culture et produits chimiques utilisés.....  | 6  |
| <b>Tableau 2</b> | : Identification biochimique et physiologique des isolats LB1, LB2, LB3 et LB4 issus du blé fermenté..... | 14 |
| <b>Tableau 3</b> | : Sensibilité des isolats lactiques testés aux antibiotiques .....  | 18 |



## **LISTE DES ANNEXES**

- Annexe 1** : Composition des milieux de cultures utilisés
- Annexe 2** : Préparation de tampon phosphate
- Annexe 3** : Identifications biochimiques des isolats lactiques
- Annexe 4** : Sensibilité des isolats lactiques aux antibiotiques
- Annexe 5** : Coloration de Gram
- Annexe 6** : Résultats de test de sensibilité des isolats aux antibiotiques.

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| Liste des abréviations..... | i   |
| Liste des figures.....      | ii  |
| Liste des tableaux.....     | iii |
| Liste des annexes.....      | iv  |

## SOMMAIRE

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>Introduction</b> ..... |  |
| 1                         |  |

### *Partie expérimentale*

#### Chapitre I. Matériel et Méthodes

|   |    |
|---|----|
| <b>I.1. Objectifs de l'étude</b> .....                          | 5  |
| <b>I.2. Lieu et durée de travail</b> .....                      | 5  |
| <b>I.3. Isolats des bactéries lactiques</b> .....               | 5  |
| <b>I.5. Matériel du laboratoire et produits chimiques</b> ..... | 5  |
| <b>I.5. Méthodes</b> .....                                      | 6  |
| <b>I.5.1. Procédure expérimentale</b> .....                     | 6  |
| <b>I.5.2. Revivification des isolats lactiques</b> .....        | 8  |
| <b>I.5.3. Purification</b> .....                                | 8  |
| <b>I.5.4. Pré-identification des isolats</b> .....              | 8  |
| <b>I.5.4.1. Caractères morphologiques</b> .....                 | 8  |
| <b>I.5.4.2. Caractères biochimiques</b> .....                   | 8  |
| <b>I.5.4.3. Caractères physiologiques</b> .....                 | 9  |
| <b>I.5.5. Evaluation des propriétés probiotiques</b> .....      | 10 |
| <b>I.5.5.1. Tolérance à l'acidité</b> .....                     | 10 |
| <b>I.5.5.2. Tolérance aux sels biliaires</b> .....              | 10 |
| <b>I.5.5.3. Sensibilité aux antibiotiques</b> .....             | 10 |

|   |    |
|---|----|
| I.5.5.4. Propriétés adhésives in vitro..... | 11 |
| I.5.5.4.1. Hydrophobicité de surface.....   | 11 |
| I.5.5.4.2. Auto-agrégation.....             | 11 |

## **Chapitre II. Résultats et Discussion**

|   |           |
|---|-----------|
| II.1. Identification des isolats lactiques issus de blé fermenté .....    | 13        |
| II.1.1. Caractères morphologiques .....                                   | 13        |
| II.1.2. Caractères biochimiques et physiologiques .....                   | 14        |
| II.2. Etude du potentiel probiotique des isolats lactiques étudiées ..... | 16        |
| II.2.1. Résistance à l'acidité .....                                      | 16        |
| II.2.2. Résistance aux sels biliaires .....                               | 17        |
| II.2.3. Sensibilité aux antibiotiques .....                               | 18        |
| II.2.4. Propriétés adhésives.....   | 19        |
| II.2.4.1. Hydrophobicité de surface cellulaire .....                      | 19        |
| II.2.4.2. Auto-agrégation .....   | 21        |
| <b>Conclusion et Perspectives.....</b>                                    | <b>25</b> |

## **Références Bibliographiques**

### **Annexes**

### **Résumé**

### **ملخص**

# *Introduction*

## ***Introduction***

---

Le microbiote intestinal joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Le déséquilibre, dysbiose, de ce dernier, induit une altération du fonctionnement du système immunitaire qui favorise le développement de certaines pathologies telles que les allergies, les maladies inflammatoires chroniques et les infections intestinales (**Delzenne et al., 2008**). Les causes de cette dysbiose sont complexes et probablement attribuables à plusieurs facteurs tels que l'environnement, la génétique et le régime alimentaire. En effet, sa modulation par l'alimentation peut constituer un facteur clé pour assurer et restaurer son équilibre et par conséquent le maintien de la santé et du bien-être de l'hôte. Pour cela, les chercheurs donnent beaucoup d'intérêt aux produits de nature biologique à l'instar des bactéries bénéfiques essentiellement les probiotiques. Ces derniers sont des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, exerceraient un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (**FAO/OMS, 2002**).

A l'heure actuelle, les affirmations sur le bénéfice apporté par les probiotiques sont variées ; ces microorganismes sont capables d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes par différents mécanismes tels que l'adhérence aux cellules épithéliales, la modulation du système immunitaire et la sécrétion des composés antimicrobiens. En outre, ils aident à la réduction du cholestérol sérique, la prévention des infections intestinales, la réduction des symptômes de l'intolérance au lactose et la réduction du risque de cancer du côlon (**Rafter et al., 2007 ; Choi et Chang, 2015**).

Les bactéries lactiques font partie des souches bactériennes vivantes choisies pour leur rôle crucial dans le maintien de l'écosystème intestinal et dans la conservation des aliments (**Yadav et Shukla, 2017**). Elles ont des effets bénéfiques potentiels pour être considérées comme un bon candidat probiotique pour leurs perspectives prometteuses pour les domaines agroalimentaire et pharmaceutique. Néanmoins, il convient de souligner que toutes les bactéries ne peuvent pas être qualifiées de probiotiques et qu'il est essentiel d'évaluer leurs propriétés probiotiques ainsi que leur profil d'innocuité. Ces bactéries doivent avoir une tolérance élevée à l'acidité afin de survivre dans des conditions très acide de l'estomac

## ***Introduction***

---

(**Brodkorb et al., 2019**). De même, la résistance à la bile est également requise par les bactéries probiotiques pour faciliter leur passage à travers le duodénum jusqu'à leur site d'action dans le tractus gastro-intestinal (**Riaz Rajoka et al., 2017**). La capacité des bactéries probiotiques à adhérer aux cellules épithéliales et à inhiber l'action des bactéries pathogènes

sont également importantes pour leurs viabilités dans le tractus gastro-intestinal (**Jeronymo-Ceneviva et al., 2014**).

Par ailleurs, les bactéries lactiques jouent un rôle crucial dans la fermentation des produits végétaux et animaux, ainsi que dans la préparation et la conservation de nombreux aliments fermentés (**Chen, 2021**). Parmi les aliments fermentés les plus riches en bactéries lactiques, le blé fermenté. Le Hamoum, une forme de blé traditionnellement fermenté en Algérie est réputée pour ses vertus préventives contre les complications physiopathologiques intestinales. Cette denrée alimentaire ancestrale est obtenue par fermentation naturelle dans un silos souterrain appelé Matmora (**Benmehel et al., 2019**). Les bactéries lactiques isolées de blé fermenté peuvent représenter une solution prometteuse, largement utilisée dans les secteurs médicaux et alimentaires. Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'évaluation *in vitro* et *in vivo* des propriétés probiotiques des bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté traditionnel.

Dans cette optique, l'objectif de cette étude s'intéresse dans un premier temps à l'identification phénotypique des quatre isolats lactiques LB1, LB2, LB3 et LB4 issus du blé fermenté, et dans un deuxième temps à l'évaluation *in vitro* de leurs propriétés fonctionnelles et ce dans le but de sélectionner un nouveau candidat probiotique. Cette propriété fonctionnelle a été évaluée par le biais de la capacité de tolérance à l'acidité et aux sels biliaires ainsi que l'évaluation des propriétés adhésives.

# *Partie expérimentale*

# **Chapitre I**

## **Matériel et méthodes**



**I.1.Objectifs de l'étude**

Cette étude s'intéresse à l'identification morphologique biochimique et physiologique de quatre bactéries lactiques LB1, LB2, LB3 et LB4 isolées à partir de blé fermenté traditionnel (**Hamoum**). Elle s'intéresse aussi à l'évaluation de leurs propriétés probiotiques. Et ce afin de sélectionner parmi ces dernières, la souche ayant le potentiel probiotique le plus important et susceptible d'être utilisé dans le domaine biotechnologique ou bien dans les stratégies nutritionnelles préventives contre certaines pathologies chroniques.

**I.2.Lieu et durée de travail**

La démarche expérimentale relative à ce travail a été réalisée aux laboratoires de Microbiologie et de Biochimie au sein de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret durant la période du 25 Décembre 2022 jusqu'au 12 Janvier 2023.

**I.3.Isolats des bactéries lactiques**

Pour étudier le potentiel probiotique des bactéries lactiques, nous avons travaillé sur quatre bactéries lactiques LB1, LB2, LB3 et LB4 isolées à partir de blé fermenté traditionnel de type Hamoum durant l'année 2022 au niveau de laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Ibn Khaldoun, Tiaret. Ces isolats ont été conservés en présence de 70% de lait écrémé et 30% de glycérol et stockés à -20°C.

**I.4.Matériel du laboratoire et produits chimiques**

Le matériel, les produits chimiques et les milieux de culture nécessaires à l'accomplissement de ce travail sont cités dans le tableau 1 :

**Tableau 1** : Matériel, milieux de culture et produits chimiques utilisés.

| <b>Appareillages</b>  | <b>Milieux de cultures</b>  | <b>Produits chimiques et réactifs</b>   | <b>Verreries et autres</b>   |
|---|---|---|--|
| Vortex(Velp)<br>Etuve (Memmert)<br>Microscope optique (Optica)<br>pH mètre (Ohaus)<br>Centrifugeuse (Sigma)<br>Bain marie(GFL)<br>Spectrophotomètre (Jenway 7205)<br>Balance analytique (Ohaus)<br>Bec bunsen<br>Agitateurs (Stuart)<br>Autoclave (Sanoclave) | Gélose MRS<br>Bouillon MRS<br>Gélose de Muller Hinton<br>Citrate de Simmons | Violet de gentiane<br>Fuchsine<br>Lugol<br>Alcool<br>Huile à immersion<br>Chlorure de sodium (NaCl)<br>Toluène<br>Acide chlorhydrique Hcl (1N)<br>Sels biliaires<br>Disque d'antibiotiques<br>Tampon PBS (pH=7,2) | Les embouts jaune et bleu<br>Dessiccateur<br>Boîtes de Pétri<br>Pipette Pasteur<br>Tubes à essai<br>Bécher<br>Anse de platine<br>Membranes filtrantes (0,45µm) |

**I.5.Méthodes****I.5.1.Procédure expérimentale**

La démarche expérimentale globale concernant cette étude est illustrée par l'organigramme suivant :

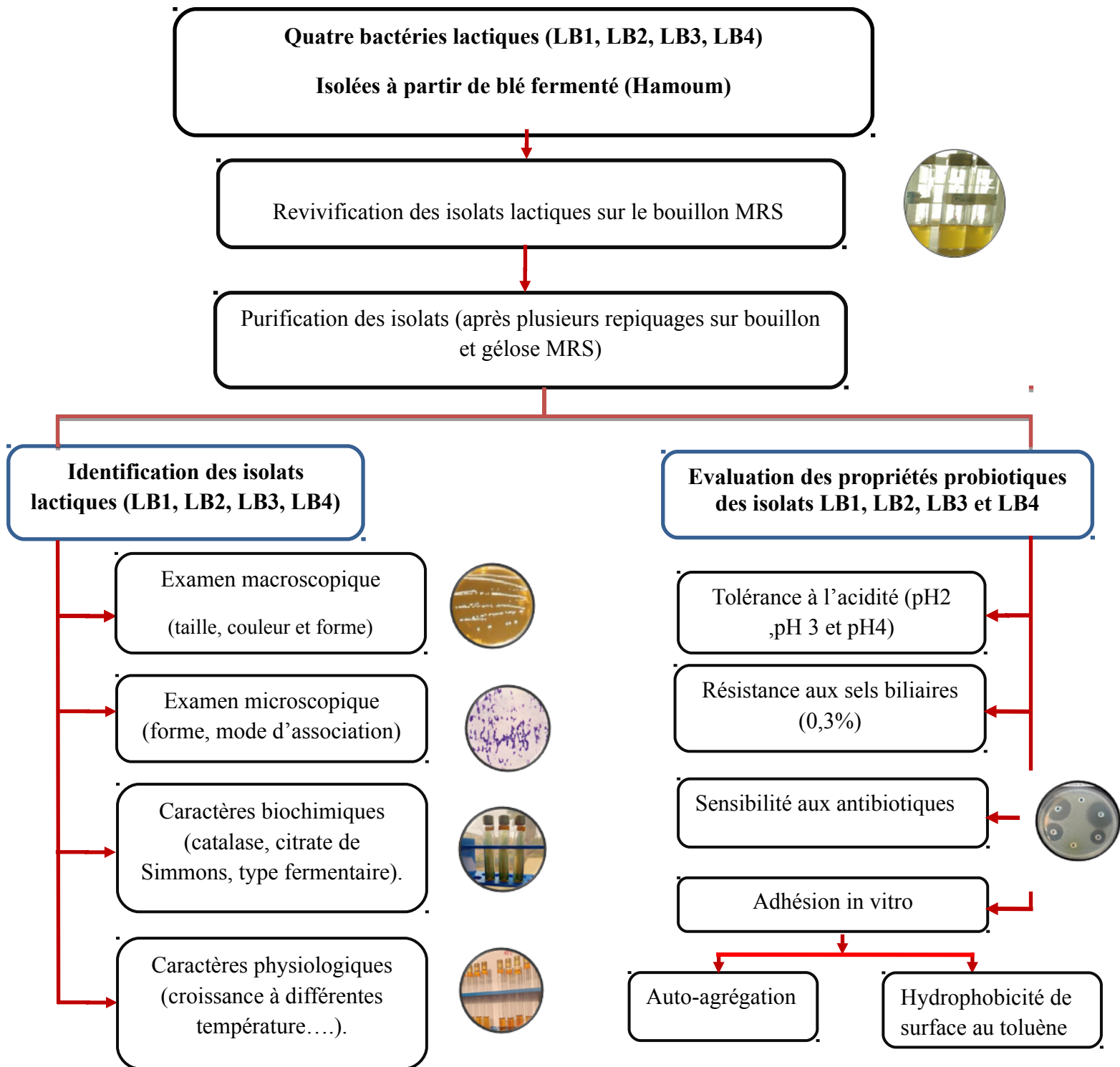


Figure 1. Diagramme récapitulatif de la démarche expérimentale

**I.5.2. Revivification des isolats lactiques**

A partir des cultures préalablement conservées à -20°C dans un milieu contenant 70% de lait écrémé et 30% de glycérol, des prélèvements des isolats ont été inoculés dans un bouillon MRS. Ces inoculations ont été suivies d'une incubation, soit en aérobiose (LB1, LB2, LB3) ou en anaérobiose (LB4), pendant 24h et à 37°C.

**I.5.3.Purification**

La purification de ces isolats a été effectuée par plusieurs repiquages successifs sur le milieu MRS (liquide-solide/solide-liquide) à partir des colonies bien isolées. Avant une conservation à court terme à 4°C, dans une gélose MRS inclinée, ces derniers ont subi une pré-identification basée sur des caractéristiques morphologiques (examen macroscopique, microscopique) et biochimiques (test de catalase).

**I.5.4.Pré-identification des isolats**

Après la purification, les isolats obtenus ont subi une pré-identification en se basant sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques (**Labioui et al., 2005**)

**I.5.4.1.Caractères morphologiques**

- **Examen macroscopique**

Cet examen est réalisé par une observation visuelle qui consiste à décrire les colonies obtenues sur la gélose MRS après incubation (couleur, taille, contour, aspect, ...)

- **Examen microscopique**

Il a été effectué sur un frottis bactérien préparé à partir des colonies en culture pure puis fixé et coloré par la méthode de coloration Gram (annexe 5). Cet examen permet de déterminer la morphologie des cellules bactériennes (taille, forme et mode d'association).

**I.5.4.2.Caractères biochimiques**

- **Test de la catalase**

- **Principe**

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques entraînent la formation de peroxyde d'hydrogène. La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène (**Delarras, 2014**).

- **Technique**

Cette technique consiste à prélever une colonie et à l'émulsionner dans une goutte de Peroxyde d'oxygène. La libération de bulles indique une réaction positive (**Delarras, 2014**).

- **Type fermentaire**

- ❖ **Principe**

Ce test permet d'évaluer le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de CO<sub>2</sub> dans la cloche de Durham sur le bouillon MRS. Cet examen permet de distinguer les isolats homolactiques des hétéro lactiques après une incubation à 37° C pendant 24 à 48h (**Bourgeois et al., 1996**).

- ❖ **Technique**

Des cultures jeunes des isolats lactiques ont été cultivées dans des tubes contenant MRS avec cloches de Durham. Ensuite ces tubes ont été incubés à 37°C pendant 24h à 48h en anaérobiose ou en aérobie selon le type d'isolat testés. La production de gaz (CO<sub>2</sub>) se traduit par l'apparition de bulles dans la cloche.

- **Test de citrate de Simmons**

Ce test a été réalisé par l'ensemencement de la pente de milieu par des cultures jeunes des isolats lactiques ensuite ont été incubés à 30°C pendant 5 jours. Le virage de la couleur du milieu du vert au bleu indique l'utilisation de citrate (**Marchal et al., 1991**).

#### **I.5.4.3.Caractères physiologiques**

- **Croissance à différentes températures**

Des cultures jeunes de chaque isolat lactique issues de blé fermenté ont été inoculées séparément dans trois tubes contenant le bouillon MRS. Ces tubes ont été incubés à des températures différentes, 30°C, 37°C et 45°C pendant 24h à 72h. La croissance bactérienne se traduit par l'apparition de trouble dans le milieu en comparaison au tube témoin non ensemencé (**Badis et al., 2005 ; Hariri et al., 2009**).

- **Test de croissance à pH différents**

Des tubes contenant le bouillon MRS ajusté à des pH différents 4,4 ; 6,2 et 9,6 ont été inoculés séparément par des cultures jeunes des isolats de bactéries lactiques. Ensuite, ces tubes ont été incubés à 37°C pendant 24h à 72h. La croissance est appréciée par l'apparition des troubles en comparaison avec un témoin non ensemencé (**Carr et al., 2002**).

### **I.5.5.Evaluation des propriétés probiotiques**

#### **I.5.5.1.Tolérance à l'acidité**

La résistance des bactéries lactiques aux acides a été évaluée selon le protocole décrit par **Anandharaj et al. (2015)**, avec des modifications mineures. Des bouillons MRS contenus dans des tubes à essai ont été ajustés à des pH différents (pH 2, pH 3, pH 4 et pH 6,5 (témoin)). Ces tubes ont été inoculés par 10<sup>8</sup>UFC/ml des cultures jeunes de chaque isolat lactique, puis incubés à 37°C. La croissance a été évaluée par la mesure de la densité optique, à une longueur d'onde de 625nm, pendant 3h.

#### **I.5.5.2.Tolérance aux sels biliaires**

La résistance aux sels biliaires des isolats de bactéries lactiques a été testée selon la méthode **d'Anandharaj et Sivasankari (2014)**.

Afin d'étudier la résistance des isolats de bactéries lactiques aux sels biliaires, des bouillons MRS additionnés par 0,3% (p/v) de sels biliaires ont été inoculés par un inoculum 10<sup>8</sup> UFC/ml de chaque isolat. Ces derniers ont été ensuite incubés à 37° pendant 4h. L'évaluation de la croissance bactérienne a été faite par la mesure de la densité optique à 625 nm. Bouillon MRS sans sels biliaires ont été utilisés comme témoin.

#### **I.5.5.3.Sensibilité aux antibiotiques**

L'étude de la sensibilité des isolats lactiques aux antibiotiques, a été réalisée par la méthode de diffusion (méthode des disques) sur gélose Muller-Hinton (**Tarique et al., 2006**), en utilisant les antibiotiques suivants : Chloramphénicol(C<sup>30</sup>), Colistine(CT<sup>10</sup>), Métronidazole (MTZ<sup>6</sup>), Streptomycine(S<sup>10</sup>), Pénicilline (P<sup>10</sup>), Ceftazidime(C<sup>10</sup>), Gentamicine(CN<sup>10</sup>).

Les surfaces de gélose Muller Hinton, ont été ensemencées (méthode d'écouvillonnage) par une suspension bactérienne de chaque isolat lactique ajustée à l'échelle

0,5 de Mc Farland, puis les disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24h. La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres des zones d'inhibition apparues. Les résultats de deux répétitions ont été exprimés en termes de résistance lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieure ou égale 15mm : ( $\leq 15$ mm), Intermédiaire entre 16-20 mm ou de sensibilité supérieure à 20 ( $\geq 20$ mm) (Vlková et al., 2006).

#### **I.5.5.4. Propriétés adhésives in vitro**

##### **I.5.5.4.1. Hydrophobicité de surface**

La mesure de l'hydrophobicité cellulaire évaluée par le test d'adhésion aux hydrocarbures a été déterminée selon la méthode décrite par **Abushelaibi et al. (2017)** avec des modifications. Des cultures jeunes de 18h ont été préparées dans des bouillons MRS. Le culot bactérien a été récupéré par centrifugation à 4500 g pendant 15 min et à 4 °C. Après élimination du surnageant, les culots cellulaires ont subi trois rinçages successifs avec PBS stérile (pH 7,2). Ces derniers ont été remis en suspension dans 3ml du tampon cité précédemment. Le nombre total des cellules bactériennes obtenues a été ajusté à un inoculum initial de  $10^8$  UFC/ml ( $A_0$ ). Ensuite 1ml de toluène a été additionné à 3 ml de la suspension bactérienne puis incubée à 37°C pendant 1h. Après une heure d'incubation, la phase aqueuse a été récupérée et l'absorbance finale a été lue à 625nm ( $A_1$ ). Le pourcentage de l'hydrophobicité a été calculé selon la formule suivante :

$$H\% = 1 - \left(\frac{A_1}{A_0}\right) \times 100$$

$A_0$  : DO à 0h

$A_1$  : DO à 1h

##### **I.5.5.4.2. Auto-agrégation**

L'auto-agrégation de surface cellulaire a été réalisée selon la méthode décrite par **Abdulla et al. (2014)** avec des modifications. Les cultures bactériennes de chaque isolat lactique incubées à 37°C pendant 18 h ont été centrifugées à 4500 g pendant 15 min et à 4°C. Après centrifugation, les cellules récoltées ont été lavées deux à trois fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS ; pH 7,2). Ces derniers ont été remis en suspension dans 4ml du tampon cité précédemment. Les suspensions cellulaires ainsi obtenues ont été ajustées à un inoculum initial  $10^8$  UFC/ml( $A_0$ ). Ensuite 4ml de chaque suspension bactérienne ont été vortexés pendant 10 s et incubées à 37 °C pendant 3h. Après 3h d'incubation, la suspension supérieure a été récupérée et l'absorbance finale à 625nm a été

lue ( $A_1$ ). Le pourcentage de l'auto-agrégation des cellules bactériennes a été calculé par la formule suivante :

$$A \% = 1 - \left( \frac{A_1}{A_0} \right) \times 100$$

$A_0$ : DO à 0h

$A_1$ : DO à 3h



# **Chapitre II**

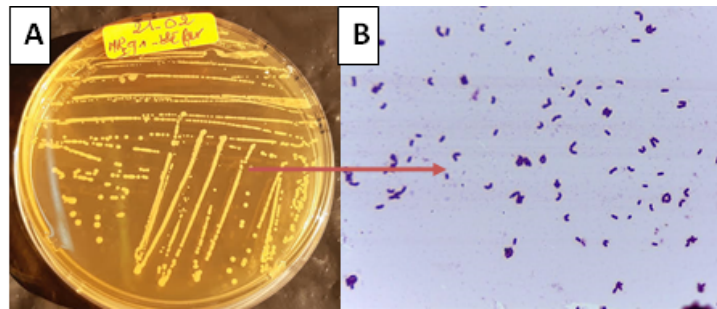
## **Résultats et Discussion**

**II.1. Identification des isolats lactiques issus de blé fermenté**

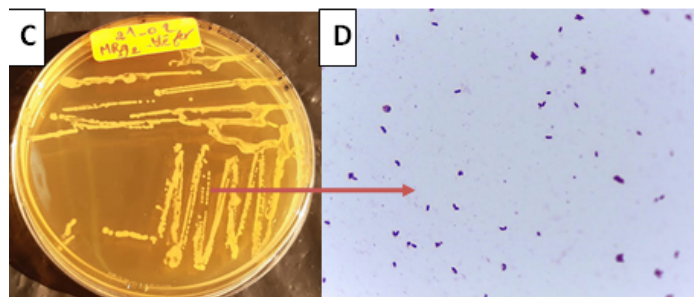
Les résultats de l'identification morphologiques sont indiqués dans les figures 2, 3, 4 et 5.

**II.1.1. Caractères morphologiques**

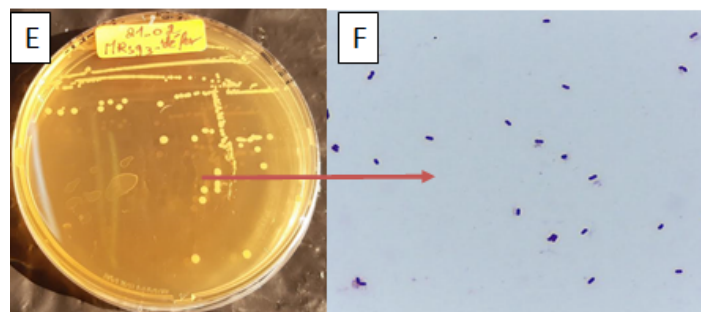
L'examen macroscopique montrent que les isolats lactiques codés LB1 LB2 et LB3 cultivés sur la gélose MRS donnent des colonies de forme circulaires, moyennes, avec une surface lisse plus ou moins bombées de couleur blanchâtre ayant un contour régulier (figures 2A,3C,4E). Cependant, les colonies de l'isolat LB4 sont de petites tailles lisses arrondies de couleur blanche (figure 5G).



**Figure 2** : Aspects macroscopique (A) et microscopique (B) de l'isolat LB1 après la coloration de Gram  
(objectif  $\times 100$ )



**Figure 3** : Aspects macroscopique (C) et microscopique (D) de l'isolat LB2 après la coloration de Gram  
(objectif  $\times 100$ )



**Figure 4** : Aspects macroscopique (E) et microscopique (F) de l'isolat LB3 après la coloration de Gram  
(objectif  $\times 100$ )

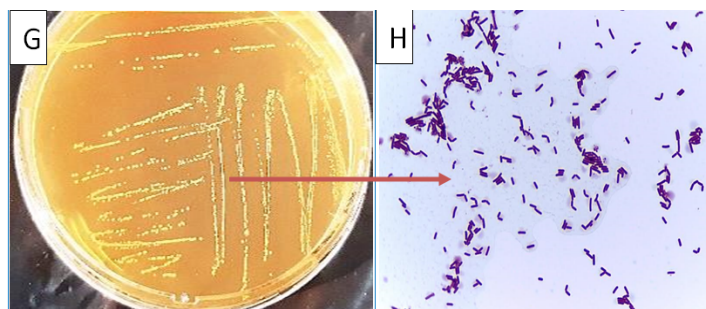


Figure 5 : Aspects macroscopique (G) et microscopique (H) de l'isolat LB4 après la coloration de Gram  
(objectif ×100)

Parallèlement, l'examen microscopique a révélé que les quatre isolats lactiques étudiés sont de Gram positive ayant des formes différentes. Les cellules de trois bactéries LB1 LB2 et LB3 se présentent sous forme coque, ovoïdes isolées, ou regroupées en paires (figures 2B,3D,4F) par ailleurs, l'isolat LB4 présente des cellules de forme bacillaire, isolées ou disposées en amas (figure 5H).

### II.1.2. Caractères biochimiques et physiologiques

Les résultats des caractères biochimiques et physiologiques sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Identification biochimique et physiologique des isolats LB1, LB2, LB3 et LB4 issus du blé fermenté.

| Isolats Tests                         | LB1    | LB2    | LB3    | LB4  |
|---------------------------------------|--------|--------|--------|------|
| Catalase                              | -      | -      | -      | -    |
| Type fermentaire                      | Hétéro | Hétéro | Hétéro | Homo |
| Citrate de Simmons                    | -      | -      | -      | -    |
| Croissance à différentes températures |        |        |        |      |
| 30°C                                  | +      | +      | +      | +    |
| 37°C                                  | +      | +      | +      | +    |
| 45°C                                  | -      | -      | -      | +    |
| Croissance à différents pH            |        |        |        |      |
| 4,4                                   | +      | +      | +      | +    |
| 6,2                                   | +      | +      | +      | +    |
| 9,6                                   | +      | +      | +      | +    |

- : Résultats négatif  
Homo : Homofermentaire

+ : Résultats positif  
Hétéro : hétérofermentaire

Les résultats indiquent que les quatre bactéries étudiées ne produisent pas de catalase, elles n'utilisent pas le citrate comme unique source de carbone.

Les isolats LB1, LB2 et LB3 produisent le gaz (CO<sub>2</sub>) à partir de glucose, elles sont donc considérées comme hétérofermentaire. Cependant la bactérie LB4 ne produit pas de gaz (CO<sub>2</sub>) lors de la fermentation de glucose, elle est donc homofermentaire.

L'identification physiologique a révélé que les isolats codés LB1, LB2, et LB3 se développent à une température de 30C°, mais pas à 45C° à l'exception de l'isolat LB4 qui est capable de croître à une température de 45°C. L'ensemble des bactéries étudiées sont aussi capables de se multiplier dans un intervalle de pH compris entre 4,4 et 9,6.

L'ensemble des résultats obtenus concernant les caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques des trois isolats codés LB1, LB2 et LB3 confirment les caractères d'identification phénotypiques de *Leuconostoc* ou *Weissella*, ceci sont identiques aux caractéristiques principales de l'identification décrites dans le manuel de Bergey de la bactériologie systématique (**Kandler et Weiss., 1986**) et Procaryotes (**Hammes et al., 1992**).

D'autre part, les résultats d'identification de l'isolat lactique codé LB4 ont permis de confirmer que cette bactérie appartenant au genre *Lactobacillus*.

Les genres identifiés dans nos échantillons de blé fermenté sont en accord avec **Tahaiti et al. (2017)** qui ont étudié l'identification phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté hamoum, ces auteurs ont constaté que les isolats appartiennent essentiellement aux *Lactobacillus* (69%), *Pediococcus* (15%), *Leuconostoc* (8%) et *Enterococcus* (8%).

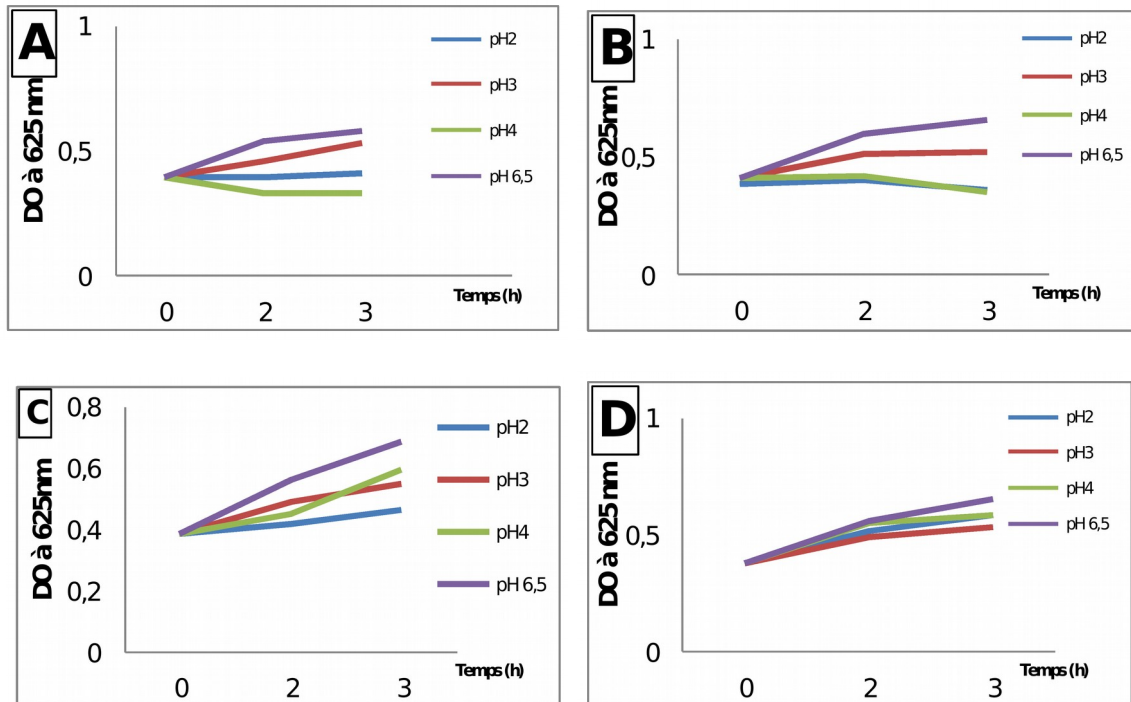
Aussi, une étude réalisée par **Benakriche et al. (2016)** a été démontrée la dominance du genre *Lactobacillus* dans le blé fermenté de la région de Mostaganem.

Les résultats des caractéristiques phénotypiques obtenus nécessitent des tests complémentaires afin de distinguer entre les deux genres *Leuconostoc* et *Weissella*.

## II.2. Etude du potentiel probiotique des isolats lactiques étudiés

### II.2.1. Résistance à l'acidité

La résistance des isolats lactiques au pH acide a été testée in vitro, les résultats sont indiqués dans la figure 6.



**Figure 6 :** Croissance des isolats LB1 (A) ,LB2 (B) , LB3 (C) et LB4 (D) à différents pH après 3h d'incubation.

Selon les résultats obtenus en évaluant la croissance des isolats lactiques, après une durée d'incubation de 3h à 37°C, on a remarqué une résistance des isolats LB1, LB2 et LB3 à pH 3 mais avec une légère diminution de croissance en comparaison au témoin (pH 6,5). En revanche, la résistance de l'isolats LB4 aux pH 2, pH 3 et au pH 4 a été clairement constatée par une augmentation de l'absorbance mais d'une façon réduite par rapport au témoin (pH 6,5) dont la densité optique a été respectivement (0,587vs0,657);(0,536vs0,657) ; (0,589vs0,657). Ceci est dû à leur capacité à produire des acides et d'autre métabolites qui peuvent aider à réguler leur environnement. De plus, les lactobacilles ont des mécanismes de régulation du pH internes tels que l'échange de protons, qui leur permettent de survivre dans des conditions acides (**de Souza et al.,2019**).

Une bactérie lactique probiotique doit être capable de tolérer des conditions acides pour survivre lors du passage dans l'estomac où le pH est acide (1,5 à 3) en raison de la sécrétion de sucs gastriques (**Hassanzadazar et al., 2012**).

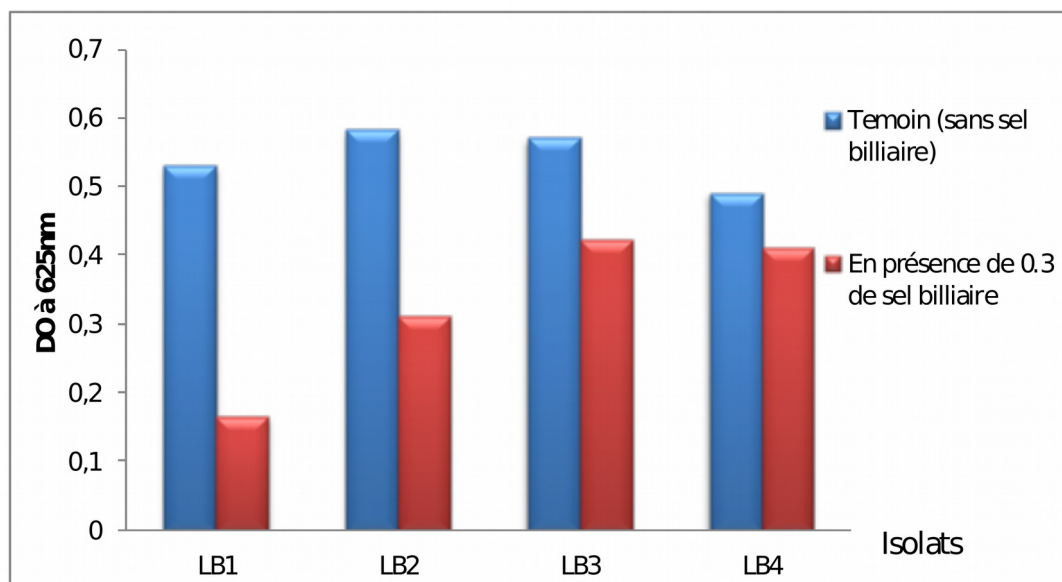
Ces résultats confirment ceux obtenues par **Argyri (2013)**, évoquant la tolérance et la capacité de survivre de *Lactobacillus* à pH 2,5 et 4. Cela dépend du type de souche de lactobacilles et de la durée de l'exposition à ce pH spécifique.

**Jothi et al. (2012)**, ont également constaté l'augmentation du nombre de cellules de *Lb. fermentum* viables à pH 3,0 après 4 h d'incubation. Ces résultats sont en bon accord avec les rapports antérieurs qui ont montré que la souche probiotique a une survie optimale à un pH 3 (**Azat et al., 2016**). Aussi, dans une étude réalisée sur les propriétés probiotiques des bactéries lactiques isolées de blé fermenté traditionnel les auteurs ont confirmé que *Lb. plantarum* a la capacité de survivre et de tolérer le pH acide après 3h d'incubation (**Tahaiti et al., 2017**).

**Manini et al. (2016)** ont étudié la tolérance de 13 souches des bactéries lactiques isolées à partir de levain de son de blé fermenté. Seules six souches ont résisté à une exposition de 2 h aux conditions acides (pH 2,5).

### II.2.2. Résistance aux sels biliaires

Les résultats de la tolérance des isolas lactiques testés aux sels biliaires sont illustrés dans la figure 7.



**Figure 7.** Croissance des isolats lactiques LB1 ; LB2; LB3 et LB4 en présence de 0,3% de sels biliaires après 4 h d'incubation

Les résultats obtenus démontrent que les isolats LB3 et LB4 issus du blé fermenté présentent une forte tolérance au 0,3% des sels biliaires après 4h d'incubation et ce avec des

valeurs de DO de l'ordre de 0,42 et 0,41 en comparaison avec les témoins (sans sels biliaries), où les DO sont évaluées à 0,57 et 0,48, respectivement. Cependant, les isolats LB1 et LB2 dévoilent une faible résistance aux sels biliaries, ceci est indiqué par des DO de l'ordre de 0,16 et 0,31 en comparaisons avec les témoins, on note 0,52 et 0,58, respectivement.

La résistance des bactéries lactiques probiotiques aux sels biliaries peut être attribuée à leur capacité de modifier la composition de leur membrane cellulaire. Certaines bactéries ont développé des systèmes d'efflux actifs pour éliminer les sels biliaries (Villani et al., 2007). Elles sont également capables d'hydrolyser les sels biliaries à l'aide d'une enzyme de bile salt hydrolase (Bustos et al., 2018). La capacité des bactéries probiotiques à résister aux sels biliaries est un facteur important dans leur capacité à coloniser et à survivre dans l'intestin.

Les résultats obtenus corroborent ceux indiqués par Tahaiti et al. (2017), ces derniers ont constaté que toutes les souches isolées du blé fermenté de la région de Mostaganem montrent une viabilité élevée en présence de toutes les concentrations testées en sels biliaries.

Aussi, Mulaw et al. (2019) ont rapporté une tolérance de quatre souches des bactéries lactiques isolées à partir des aliments fermentés traditionnels éthiopiens à 0,3 % de sels biliaries. En outre, une étude réalisée par Adesulu-Dahunsi et al. (2018) sur des bactéries lactiques isolées à partir d'un aliment fermenté à base de céréales ont montré que les souches *Lactiplantibacillus plantarum* et *Pediococcus pentosaceus* présentent une bonne tolérance à 0,3 % de sels biliaries après 4 h d'incubation par rapport à la souche *Weissella cibaria*.

**II.2.3. Sensibilité aux antibiotiques**

Les diamètres des zones d'inhibition en (mm) des antibiotiques contre les isolats lactique sont indiqués dans le Tableau 3 et (Annexe 4).

**Tableau 3.** Sensibilité des isolats lactiques testés aux antibiotiques

|                               | <b>LB1</b>                 | <b>LB2</b>                 | <b>LB3</b>                 | <b>LB4</b>                 |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Antibiotiques</b>          | Résistance ou sensibilités | Résistance ou sensibilités | Résistance ou sensibilités | Résistance ou Sensibilités |
| <b>Chloramphénicol</b> (30µg) | I                          | S                          | S                          | S                          |
| <b>Colistine</b> (10µg)       | I                          | S                          | I                          | R                          |
| <b>Métronidazole</b> (6µg)    | R                          | R                          | R                          | R                          |
| <b>Streptomycine</b> (10µg)   | S                          | S                          | R                          | I                          |
| <b>Pénicilline</b> (10µg)     | S                          | S                          | I                          | R                          |
| <b>Ceftazidime</b> (10µg)     | R                          | R                          | R                          | R                          |
| <b>Gentamicine</b> (10µg)     | S                          | S                          | S                          | I                          |

R : résistant ( $\leq 15$ mm); S : sensible ( $\geq 20$ mm); I: Intermédiaire (16-20 mm)

Le tableau 3 reporte les résultats de profil de résistance des isolats lactiques issus du blé fermenté aux antibiotiques. Les souches présentant un diamètre de zone d'inhibition inférieur à 15mm sont considérées comme résistantes (Viková et al., 2006).

Les quatre isolats lactiques étudiés présentent une résistance remarquable vis-à-vis Métronidazole et Ceftazidime (absence de zone d'inhibition). En revanche, ces souches ne présentent pas de résistance aux antibiotiques suivants : Chloramphénicol (30<sup>µg</sup>) Streptomycine et Gentamicine (10<sup>µg</sup>) où les diamètres d'inhibition sont supérieurs à 15mm. Ce résultat est en accord avec des études ayant rapportées que les lactobacilles sont généralement sensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines comme le chloramphénicol, l'érythromycine, et la tétracycline (D'aimmo et al., 2007 ; Tahlaïti et al., 2017 ; de Souza et al., 2019).

Par ailleurs, Aucun effet sur la croissance de l'isolat LB4 n'a été observé en présence de Colistine (10<sup>µg</sup>) et Pénicilline. Ces résultats confirment ceux obtenus par Riaz Rajoka et al. (2017), ces derniers ont démontré la résistance de *Lb. rhamnosus* à la pénicilline et à la kanamycine. Cette diversité des profils de résistance des souches lactiques peut-être due au genre auquel appartient la bactérie, à l'état physiologique et à la nature des antibiotiques (Tahlaïti et al., 2017).

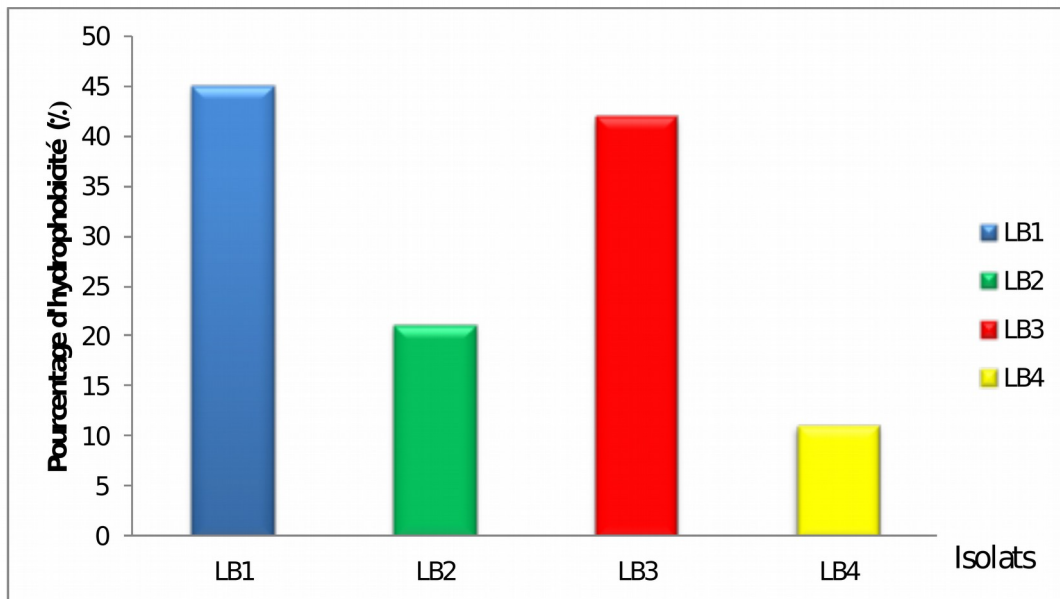
Grace à sa résistance naturelle aux antibiotiques cliniquement importants, les lactobacilles peuvent être utilisés comme probiotiques ou dans le cadre d'une thérapie combinée antibiotique / probiotique pour lutter contre les infections bactériennes.

#### **II.2.4. Propriétés adhesives**

##### **II.2.4.1. Hydrophobicité de surface cellulaire**

Ce test permet d'évaluer l'hydrophobicité de la surface cellulaire des isolats lactiques vis-à-vis du toluène, ce qui peut être un indicatif de leur capacité à coloniser les mucus intestinaux. Les pourcentages obtenus de l'adhérence de ces bactéries au toluène montre l'hydrophobicité de leur surface (figure 8).





**Figure 8.** Hydrophobicité de surface des isolats lactiques LB1 ; LB2 ; LB3 et LB4 au toluène

Ces résultats dévoilent que les isolats lactiques LB1 et LB3 présentent des pourcentages d'hydrophobicité élevés supérieur à 40%. Cela confirme d'une bonne sélectivité des surfaces membranaires. Par ailleurs, les isolats LB2, LB4 montrent une hydrophobicité faible avec des pourcentages de 21 et 11, respectivement.

Dans notre étude, les isolats étudiés ont montré différents pourcentages d'hydrophobicité vis-à-vis du toluène. Cette différence existait entre les souches, peut être attribuée à la variation des proportions de parties hydrophiles/hydrophobes dans la paroi cellulaire des isolats de bactéries lactiques (Kaushik et al., 2009). En effet, dans une étude réalisée par Schär-Zammaretti et Ubbink (2023) portant sur la composition physicochimie des surfaces cellulaires microbiennes, ils ont été révélés que la présence de glycoprotéines à la surface cellulaire augmente son hydrophobicité, tandis que la présence de polysaccharides est associée à une grande hydrophilie.

Rokana et al. (2018) ont suggéré que la plus haute affinité des souches de *Lactobacillus* pour le chloroforme et le toluène (solvants aliphatiques et aromatiques monopolaires, respectivement) montre la présence des composants de surface cellulaire à faible accepteurs d'électrons/acides.

Ce résultat va de pair avec ceux obtenus par Srinivash et al. (2023), ces derniers ont montré que quatre souches lactiques isolées à partir des produits alimentaires fermentés présentent une forte hydrophobicité supérieure à 40 % contre le toluène et xylène.

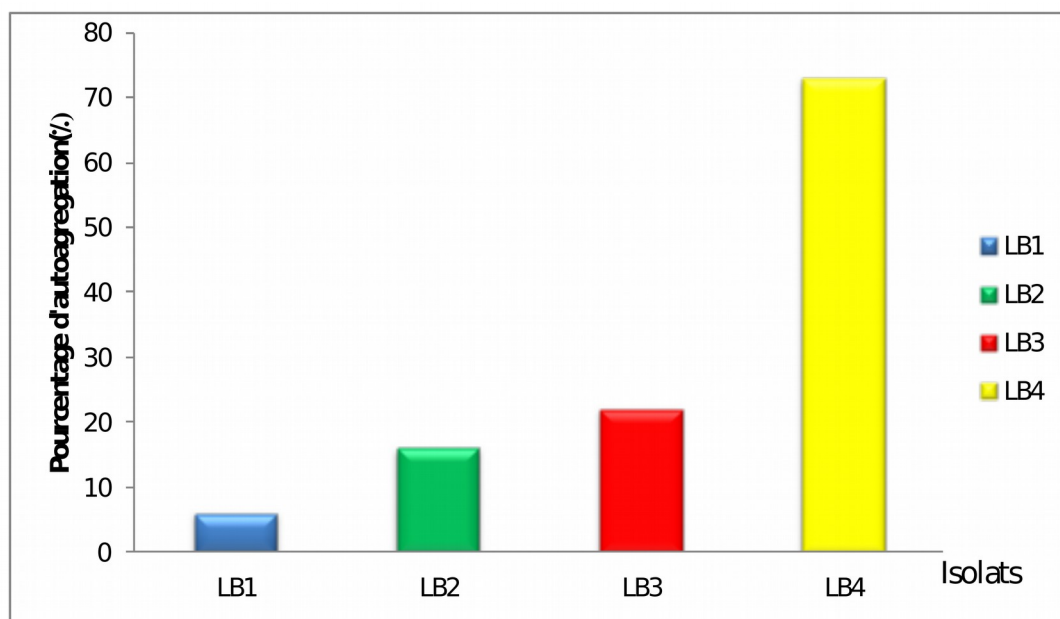
Aussi, **Rocha-Mendoza et al.(2020)** ont rapporté que sept souches des bactéries lactiques provenant de babeurre présentant une hydrophobicité de plus de 30% vis-à-vis du toluène.

En outre, **Luan et al. (2022)** ont constaté que l'hydrophobicité de la souche *Leuconostoc mesenteroides* LVBH107 isolée à partir du produit alimentaire fermenté chinois est de l'ordre de 18,95 % vis-à-vis le xylène et le toluène, ce qui révèle une hydrophobicité similaire à celle obtenue avec notre isolat LB2 présumé *Leuconostoc*.

Les interactions hydrophobes des bactéries contribuent de manière cruciale dans l'adhésion et la formation de biofilm. En effet, l'hydrophobicité des bactéries est associée à leur milieu environnant, leurs phases de croissance et à la composition de leur structure cellulaire (**Wu et Shah, 2014 ; Nivoliez et coll, 2015**).

#### II.2.4.2.Auto-agrégation

Les résultats d'auto-agrégation des isolats lactiques après 3h d'incubation à 37°C sont présentés dans la figure 9.



**Figure 9.** Capacité d'auto-agrégation des isolats lactiques LB1 ; LB2 ; LB3 et LB4.

Cette figure montre que l'isolat LB4 présumé *Lactobacillus* présente un pourcentage d'auto-agrégation très élevé estimé à 73 %. Cependant, les autres isolats LB1, LB2 et LB3 révèlent les plus faibles capacités d'auto-agrégation avec des pourcentages de 6, 16 et 21, respectivement. La perte de la capacité d'auto-agrégation de ces isolats lactiques présumés *Leuconostoc* est probablement causée au rinçage au PBS. Ces résultats sont conformes avec

ceux de **Sathyapriya et Anitha (2019)**, qui ont trouvé que la capacité d'auto-agrégation de la souche *Ln.mesenteroides subsp. mesenteroides* SJRP55 isolée de l'eau du fromage mozzarella du buffle à un taux faible de l'ordre de 14,2 % à 38 %.

Une étude comparative menée par **Srinivash et al. (2023)** confirme ces données en rapportant que les quatre souches lactiques de *Lactobacillus* isolées à partir des produits alimentaires fermentés exhibent une forte auto-agrégation supérieure à 40 %. Cette auto-agrégation élevée des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* peut être due à plusieurs facteurs, notamment la production des substances polysaccharidiques extracellulaire, les interactions électrostatiques entre les charges de surfaces des bactéries, les forces de Van der Waals et les liaisons hydrophobes, ces facteurs peuvent varier selon les espèces et les souches de bactéries lactiques (**Nikolic et al., 2010**). Dans le même sens, une investigation réalisée par **Gomaa (2013)** indique que plusieurs souches à potentiel probiotiques : *Lb. plantaire*, *Lb. paracasei* et *Lb. acidophilus* ont un pouvoir d'auto-agrégation compris entre 51,12% et 78,17%.

Aussi, **Gunyakti et Asan Ozusaglam (2019)** ont rapporté que la souche *Lb. Gasseri* a présenté une forte capacité d'auto-agrégation estimée à 95 %.

Les propriétés de surface cellulaire des bactéries probiotiques sont influencées par différents facteurs tels que l'auto-agrégation, la co-agrégation et l'hydrophobicité. Ces propriétés de surface sont importantes dans le tractus gastro-intestinal humain car elles empêchent la colonisation des agents pathogènes grâce à des interactions positives (**Abushelaibi et al., 2017**).

# *Conclusion et perspectives*

## Conclusion

---

Les aliments fermentés traditionnels représentent une source très riche en bactéries bénéfiques. Parmi ces microorganismes, les bactéries lactiques probiotiques occupent une place d'excellence et un choix à prendre en considération dans les domaines alimentaires et médicaux. Dans ce contexte, l'objectif de cette présente étude s'intéresse à continuer l'identification phénotype de quatre bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté traditionnel, puis évaluer leurs potentialités probiotiques via la détermination de leurs propriétés fonctionnelles in vitro.

L'identification phénotypique (morphologique, biochimiques et physiologiques) des quatre isolats lactiques testés, en utilisant des méthodes classiques a permis de déterminer les genres suivant : *Leuconostoc* ou *Weissella* pour les isolats LB1 ; LB2, LB3 et *Lactobacillus* pour l'isolat LB4.

Concernant la tolérance des isolats lactiques à l'acidité indiquent que l'ensemble des souches étudiées ont présenté une bonne résistance à pH3 en comparaison au témoin (pH 6,5). Par contre, l'isolat LB4 a montré une capacité de survie à tous les pH testés (pH 2 et pH 4) mais d'une façon réduite par rapport au témoin (pH 6,5) dont la densité optique a été respectivement 0,536 vs 0,657 et 0,589 vs 0,657.

Les quatre souches bactériennes LB1, LB2, LB3 et LB4 présentent une résistance importante à 0,3% des sels biliaires durant 4h d'incubation celle-ci varie entre les quatre bactéries testées. On constate que les deux isolats LB3 et LB4 montrent une meilleure croissance en présence de 0,3 % de bile avec des DO évaluées à 0,57 et 0,48, respectivement.

Parallèlement, l'ensemble des bactéries étudiées ont exhibé une résistance importante vis-à-vis Métronidazole et Ceftazidime et une sensibilité aux Chloramphénicol et Gentamicine.

L'hydrophobicité de surface évaluée par le test d'adhésion aux hydrocarbures dévoilent que les isolats lactiques LB1 et LB3 ont enregistré des taux d'hydrophobicité élevés supérieurs à 40% en comparaison avec les souches LB2 et LB4. D'autre part, la capacité d'auto-agrégation montre que l'isolat LB4 a présenté un pourcentage très élevés estimé à 73 %. Cependant les souches LB1, LB2 et LB3 ont révélé des faibles pourcentages évalués à 6%, 16% et 21%, respectivement.

L'ensemble de ces résultats nous laisse suggérer que les deux souches de bactéries lactiques LB3 et LB4 contenues dans le blé fermenté présentent des propriétés fonctionnelles

## ***Conclusion***

---

in vitro plus élevées par rapport aux autres souches étudiées, par conséquent, elles peuvent être considérées comme des bons candidats probiotiques, pourraient être proposées dans la prévention des pathologies associées à la dysbiose intestinale et dans le développement des aliments fonctionnelles. Cependant, il est clair que des tests supplémentaires et des investigations in vivo sont nécessaires à entreprendre afin de valider et consolider ces résultats. Les perspectives de cette présente étude visent à :

- Identifier les isolats lactiques par le bais des galeries api 50CH et par les techniques moléculaires telles que la PCR...).
- Compléter l'étude des propriétés probiotiques (innocuité, adhésion aux cellules,,,) )
- Déterminer les propriétés probiotiques des bactéries lactiques iv vivo.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

## Références bibliographiques

---

### A

**Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., T. Bohn, C. Bourlieu-Lacanal, R. Boutrou, F. Carrière, A. Clemente, M. Corredig, D. Dupont, C., Recio, I. et al. (2019).** INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991-1014.

**Jeronymo-Ceneviva, A.B., de Paula A.T., Silva, L.F. Todorov, S.D. Franco, B.D.G.M. Penna, A.L.B. (2014).** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from water buffalo mozzarella cheese, *Probiotic Antimicrobial Protein*, 6, 141–156

**Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P., Ayyash, M. (2017).** Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 316–325.

**Abdulla, A.A., Abed, T.A., Saeed, A.M. (2014).** Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of six *Lactobacillus* strains. *British Microbiology Research Journal*, 4(4), 381–391.

**Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P. Ayyash. (2017).** Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk, *Lebensmittel-Wissenschaft – Technol*, 79, 316–325

**Adesulu-Dahunsi, A. T., K. Jeyaram, and A. I. Sanni. (2018).** Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based Nigerian fermented food products. *Food Control*, 92, 225–231

**Argyri, AA., Zoumpopoulou G., Karatzas KAG., Tsakalidou E., Nychas GJE., et al. (2013).** Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiol*, 33, 282-291

**Anandharaj, M., Sivasankari, B., Parveen Rani, R. (2014).** Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Hypercholesterolemia. *Chinese Journal of Biology*, 1–7.

**Anandharaj, M., Sivasankari, B., Santhanakaruppu, R., Manimaran, M., Rani, R. P., & Sivakumar, S. (2015).** Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. *Research in microbiology*, 166(5), 428-439.

**Azat, R., Liu, Y., Li, W., Kayir, A., Lin, D. B., Zhou, W. W., & Zheng, X. D. (2016).** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 17(8), 597.



## Références bibliographiques

### B

**Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M et Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « arabia et kabyle ». *Science and Technology*, 23, 30-37.

**Ben Mehel, B. B., Bousbahi, S., Gérard, P., & Bousbahi, S. (2019).** Impact nutritionnel d'un blé fermenté type Hamoum sur la translocation bactérienne intestinale chez le rat malnutri en phase de réalimentation. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 33(1), 102.

**Benakriche, B. M., Benabde, Imoumen, D. & Mortet, A. (2016).** Lactic acid bacteria diversity in the fermented wheat Hamoum in West Algeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15(7), 639-648.

**Bustos, A. Y., G. Font de Valdez, S. Fadda, and M. P. Taranto. (2018).** New insights into bacterial bile resistance mechanisms: The role of bile salt hydrolase and its impact on human health. *Food Research International*. 112,250–262.

**Bourgeois, C.M., Larpent, J.P. (1996).** Microbiologie alimentaire in : aliments fermentes et fermentation alimentaire. 2<sup>ème</sup> Ed : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, P : 4.

### C

**Carr, F. J., Chill, D., Maida, N. (2002).** The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4) ,281-370.

**Chen, P. (2021).** Lactic acid bacteria in fermented food. In *Advances in probiotics* Academic Press. p. 397-416.

**Choi ,EA., Chang ,HC.(2015) .**Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWT Food Science Technology*, 62, 210-217.

### D

**D'aimmo, M.R., Modesto, M., et Biavati, B.(2007).**Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* isolated from dairy and Pharmaceutical products. *International Journal Food of Microbiology*, 115, 35- 42.

**Delarras, C. (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissures Lavoisier-Tec & Doc P :476.

**Delzenne, N. M., Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., & Burcelin, R. (2008).** Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet–induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57(6), 1470-1481.

**de Souza, B. M. S., Borgonovi, T. F., Casarotti, S. N., Todorov, S. D., & Penna, A. L. B. (2019).** *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* strains isolated from mozzarella

## ***Références bibliographiques***

---

cheese: probiotic potential, safety, acidifying kinetic parameters and viability under gastrointestinal tract conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 382-396.

### **F**

**FAO/WHO (2002).** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations/World Health Organization (WHO) working group on drafting guidelines for the evaluation for the probiotics in food

### **G**

**Gomaa, E. Z. (2013).** Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *The journal of general and applied microbiology*, 59(6), 425-436.

**Gunyakti, A., & Asan-Ozusaglam, M. (2019).** *Lactobacillus gasseri* from human milk with probiotic potential and some technological properties. *LWT*, 109, 261-269.

### **H**

**Hammes, W. P., Weiss, N. et Holzzapfel, W. (1992).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: *The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, (2nd ed.), edited by Balows, A., et al. Springer-Verlag, New York, 535-1573.

**Hassanzadazar, H. Ehsani, A. Mardani, K. Hesari, J. (2012).** Investigation of antibacterial, acid and bile tolerance properties of lactobacilli isolated from Koozeh cheese, *Veterinary Research Forum : International Quart Journal*, 3, 181-186.

### **J**

**Jothi, V.V., Anandapandian, K.T.K. Shankar, T.(2012).** Bacteriocin Production by Probiotic Bacteria from Curd and its Field Application to Poultry, 4, 336–347.

### **K**

**Kandler, O., Weiss, N. (1986).** Regular, non-sporing gram-positive rods. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1, edited by Krieg, N. et al. Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co, 1208 -1234.

**Kaushik, J. K., Kumar, A., Duary, R. K., Mohanty, A. K., Grover, S., Batish, V. K. (2009).** Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PloS one*.4, 12, e8099.

### **L**

## Références bibliographiques

---

**Labioui, H., El Moualdi L., El, Yachioui, M et Ouhssine, M. (2005).** Selectin de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux, (144) , 237.

**Luan, C., Yan J, Jiang N, Zhang C, Geng X, Li Z, Li C.** Leuconostoc mesenteroides LVBH107 Antibacterial Activity against Porphyromonas gingivalis and Anti-Inflammatory Activity against P. gingivalis Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells Nutrients. 2022 Jun 22;14(13):2584

### M

**Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., et al. (2016)** Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, 66,275-283.

**Marchal et al., (1991), Guiraud, (2003). Marchal, N., Bourdon, JL., Richard, CL. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3ème Edition Doin éditeurs, Paris

**Riaz Rajoka, M.S. Mehwish, H.M. Siddiq, M. Haobin, Z. Zhu, J. Yan, L. Shao, D. Xu, X. Shi, J.(2017).** Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk, *LWT - Food Science Technology*. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.) ,84, 271–280.

**Tarique, M., Abdalla, A., Masad, R., Al-Sbiei, A., Kizhakkayil, J., Osaili, T., Olaimat, A., Liu, S.Q., Fernandez-Cabezudo, M., al-Ramadi, B., Ayyash, M. (2022).** Potential probiotics and postbiotic characteristics including immunomodulatory effects of lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt-like products, *LWT (Lebensm.-Wiss. & Technol.)* , 159.

**Mulaw, G., T. Sisay Tessema, D. Muleta, and A. Tesfaye. (2019).** In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products. *International Journal of Microbiology*,7179514

### N

**Nikolic, M., Jovicic, B., Kojic, M., Topisirovic, L. (2010).** Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *European Food Research and Technology*, 231(6), 925–931.

**Nivoliez, A., Veisseire, P., Alaterre, E., Dausset, C., Baptiste, F., Camarès ,O., Paquet-Gachinat ,M., Bonnet ,M., Forestier, C., & Bornes S .(2015).** Influence of manufacturing processes on cell surface properties of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 399–411.

### R

## Références bibliographiques

---

**Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P. C., ... & Collins, J. K. (2007).** Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *The American journal of clinical nutrition*, 85(2), 488-496.

**Rocha-Mendoza, D., Kosmerl, E., Miyagusuku-Cruzado, G., Giusti, M. M., Jiménez-Flores, R., & García-Cano, I. (2020).** Growth of lactic acid bacteria in milk phospholipids enhances their adhesion to Caco-2 cells. *Journal of dairy science*, 103(9), 7707-7718.

**Rokana, N., Singh, B., Thakur, N., Sharma, C., Gulhane, R., & Panwar, H. (2018).** Screening of cell surface properties of potential probiotic lactobacilli isolated from human milk. *Journal of Dairy Research*, 85(3), 347-354.

### S

**Sathyapriya, A., Anitha, A. (2019).** Assessment of Probiotic Potential *Leuconostoc mesenteroides* from Natural Microbiota. *International Journal of Scientific Research Biological Sciences*, 5(6), 26–33.

**Schär-Zammaretti, P., & Ubbink, J. (2003).** The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and acromolecular conformations. *Biophysical Journal*, 85(6), 4076-4092.

**Srinivash, M., Krishnamoorthi, R., Mahalingam, P. U., Malaikozhundan, B., & Keerthivasan, M. (2023).** Probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from homemade fermented food products. *Journal of Agriculture and Food Research*, 11, 100517.

### T

**Tahlaïti, H., Dalache, F., Homrani, A., & Nemmiche, S. (2017).** Caractérisation et criblage du potentiel probiotique de bactéries lactiques isolées à partir de blé " Hamoum " traditionnellement fermenté. *Journal sud-asiatique de Biologie experimentale*, 7 (4), 181-190.

### V

**Villani, F., Casaburi, A., Pennacchia, C., Filosa, L., Russo, F., et al. (2007)** Microbial Ecology of the Soppressata of Vallo di Diano, a Traditional Dry Fermented Sausage from Southern Italy, and In Vitro and In Situ Selection of Autochthonous Starter Cultures. *Applied of Environmental Microbiololy*, 73, 5453-5463.

**Vlková, E., Rada, V., Popelářová, P., Trojanová, I., & Killer, J. (2006).** Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves. *Livestock Science*, 105(1-3), 253-259.

### W

## *Références bibliographiques*

---

**Wu Q & Shah NP 2014 Effects of elaidic acid, a predominant industrial trans fatty acid,** on bacterial growth and cell surface hydrophobicity of lactobacilli. *Journal of Food Science*, 79 M2485–M2490

Y

**Yadav, R., & Shukla, P. (2017).** Probiotics for human health: current progress and applications. *Recent advances in applied microbiology*, 133-147.

# *ANNEXES*

## *Annexe 1*

### Composition des milieux de cultures utilisés

#### Milieu MRS (de De Man Rogosa et Sharpe)

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone bactériologique  
.10g
- Extrait de viande  
..8,0g
- Extrait autolytique de levure  
..4,0g
- Glucose .....  
.20g
- Phosphate dipotassium  
..2,0g
- Acétate de sodium  
.5,0g
- Citrate d'ammonium  
....2,0g
- Sulfate de magnésium  
.2,0g
- Sulfate de manganèse  
..0,05g

Stérilisation à 121°C pendant 15min pH 6,5

#### Gélose de Mueller-Hinton :

Pour 1 litre de milieu :

- Infusion de viande de bœuf.....300g
- Hydrolysate de caséine .....17g
- Amidon .....1,5g
- Gélose.....17g

Stérilisation à 121°C pendant 15min

## *Annexe 2*

### Préparation de tampon phosphate (pH 7,2)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

.....  
.....1.27g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....

..... 0.44g

NaCl.....

.....8g

Eau

distillée

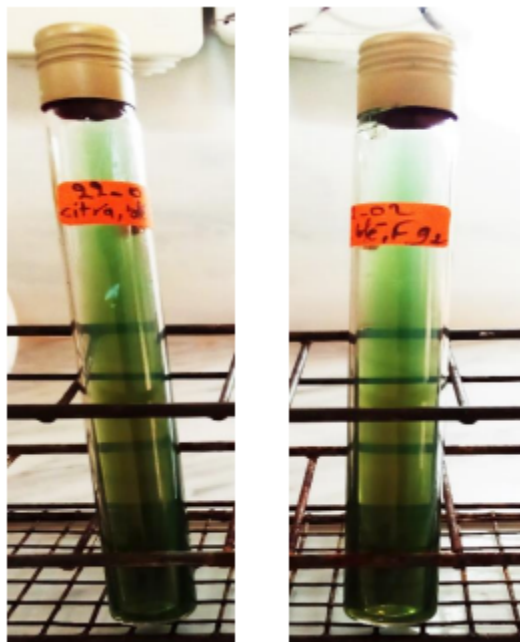
.....  
.....1L



### *Annexe 3*

**Résultats d'identification biochimique (test de Citrate de Simmons),**

(photo prise lors de l'expérimentation)



*LB3*

*LB4*

**Figure 1.** Résultats du test de Citrate de Simmons des isolats lactiques.

- **Standardisation de l'inoculum à l'échelle 0,5Mc Farland**

## *Annexes*

---

Choisir des colonies bien isolées avec l'anse de platine et les transférer dans un tube de solution salée stérile. Émulsionner une quantité suffisante de culture bactérienne dans la solution salée la densité optique correspondante de cette solution doit être comprise entre {0,08-0,13}, dont la longueur d'onde est 625 nm.

### *Annexe 4*

#### *Sensibilité des isolats lactiques aux antibiotiques*

| <b><i>LB1</i></b>         | <b><i>LB2</i></b>         | <b><i>LB3</i></b>         | <b><i>LB4</i></b>         |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Diamètres<br/>(mm)</i> | <i>Diamètres<br/>(mm)</i> | <i>Diamètres<br/>(mm)</i> | <i>Diamètres<br/>(mm)</i> |
| <i>17,5</i>               | <i>42</i>                 | <i>21</i>                 | <i>21</i>                 |
| <i>18</i>                 | <i>21</i>                 | <i>16,5</i>               | <i>13</i>                 |
| <i>/</i>                  | <i>/</i>                  | <i>/</i>                  | <i>/</i>                  |
| <i>30</i>                 | <i>25</i>                 | <i>7,5</i>                | <i>16,5</i>               |
| <i>24,5</i>               | <i>31</i>                 | <i>20</i>                 | <i>15</i>                 |
| <i>/</i>                  | <i>/</i>                  | <i>/</i>                  | <i>/</i>                  |
| <i>24,5</i>               | <i>73</i>                 | <i>21,5</i>               | <i>18,5</i>               |



## *Annexe 5*

### **Technique de coloration de Gram selon Prescott et *al.* (2003)**

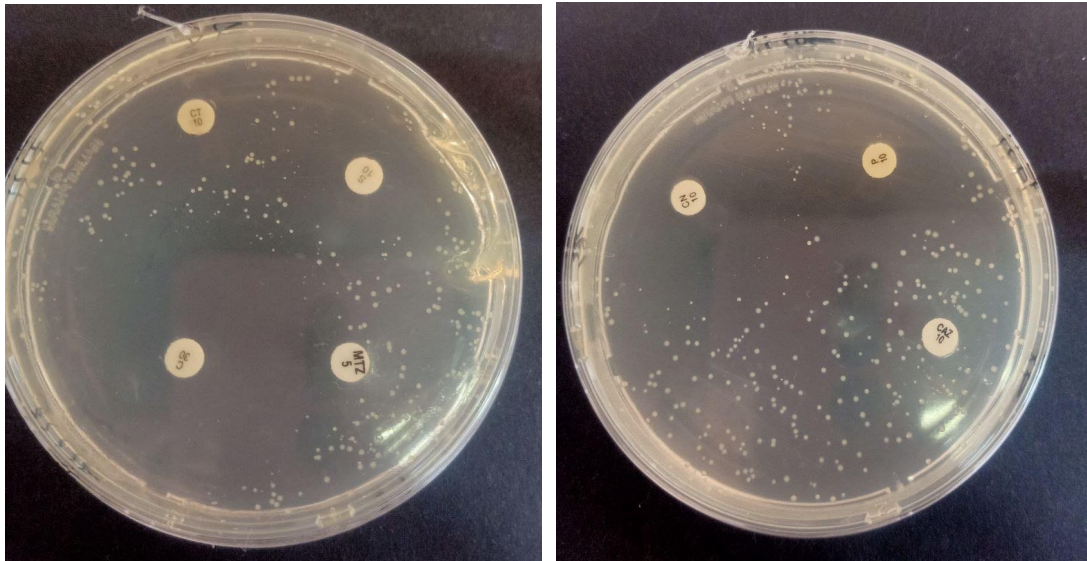
La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

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

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

## *Annexe 6*

Résultats de test sensibilité des isolats aux antibiotiques (photo prise lors de l'expérimentation)



*Figure 3.* Résultats de test sensibilité aux antibiotiques

## Résumé :

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans la production des aliments fermentés, en raison de leurs multiples propriétés bénéfiques, qui semblent relativement associées à leurs potentialités probiotiques.

Dans cette optique, l'objectif de cette étude vise dans un premier temps à l'identification phénotypique de quatre bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté traditionnel (Hamoum) et dans un deuxième temps à étudier in vitro leurs propriétés fonctionnelles.

La pré-identification des quatre isolats lactiques LB1, LB2, LB3 et LB4 a été effectuée par les tests morphologiques, biochimiques et physiologiques. Alors que les propriétés fonctionnelles ont été évaluées par les tests suivants : la tolérance à l'acidité, la tolérance aux sels biliaires, la résistance aux antibiotiques et la capacité d'auto-agrégation.

Les résultats de l'identification phénotypique des quatre isolats lactiques testés, a permis de confirmer les deux genres de *Leuconostoc ou weissela* et *Lactobacillus*. Par ailleurs, les résultats d'évaluation de leurs propriétés probiotiques in vitro montrent que les deux souches LB3 et LB4 sont capables de maintenir leurs croissances à pH 3 et à pH 4 et ce après une exposition de 3 h, et de 4 h et en présence de 0,3 % de sels biliaires, en comparaison aux autres isolats lactiques testés. Elles ont présenté également une bonne capacité d'auto-agrégation qui varie de 20 à 73 %. En revanche, la mesure de l'hydrophobicité cellulaire évaluée par le test d'adhésion au toluène a montré des niveaux d'hydrophobicité supérieurs à 40% pour les souches LB1 et LB3. Une résistance importante aux métronidazole et ceftazidime a été constaté chez toutes les souches de bactéries lactiques testées.

Ces résultats laissent à suggérer que les deux bactéries lactiques sélectionnées LB3 et LB4 présentent un bon potentiel probiotique.

**Mots clés :** bactéries lactiques, blé fermenté traditionnel (Hamoum), probiotique, propriétés probiotiques

## الملخص

تُستخدم بكتيريا حمض اللاكتيك على نطاق واسع في إنتاج الأطعمة المخمرة ، نظراً لخصائصها المفيدة و المتعددة ، والتي تبدو مرتبطة نسبياً بإمكانياتها الحيوية . من هذا المنظور ، فإن الهدف من هذه الدراسة هو أولاً متابعة التحديد الظاهري لأربعة بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من القمح التقليدي المخمر (الحموم) وثانياً دراسة خصائصها الوظيفية في المختبر . تم إجراء التحديد المسبق للسلاسل الأربعة (LB1 و LB2 و LB3 و LB4) عن طريق الاختبارات المورفولوجية والكيميائية الحيوية والفسولوجية . بينما تم تقييم الخصائص الوظيفية عن طريق اختبار الحموضة وتحمل الملح الصفراوي ومقاومة المضادات الحيوية وقدرة التجميع الذاتي . جعلت نتائج التعرف على النمط الظاهري للعزلات الأربعة المختبرة انه من الممكن تأكيد الجنس من *Leuconostoc* و *Lactobacillus* . علاوة على ذلك ، أظهرت نتائج تقييم خصائص البروبيوتيك الخاصة بهم في المختبر أن السلالتين LB3 و LB4 كانتا قادرتين على الحفاظ على نموها عند درجة الحموضة 3 وعند الرقم الهيدروجيني 4 لمدة 3 ساعات ، و 4 ساعات في وجود 0.3% من الأملاح الصفراء مقارنة بعزلات اللاكتيك الأخرى المختبرة . كما لها قدرة تجميع ذاتي تتراوح من 20 إلى 73% . من ناحية أخرى ، أظهر قياس مضاد الماء الخلوي الذي تم تقييمه بواسطة اختبار التصاق التولوين أن مستويات كره الماء أكبر من 40% لسلاسل LB1 و LB3 . لوحظ وجود مقاومة كبيرة للميترونيدازول والسيفتازيديم في جميع سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك المختبرة . تشير هذه النتائج إلى أن بكتيريا حمض اللاكتيك المختارة LB3 و LB4 لها إمكانات بروبيوتيك جيدة .

**الكلمات المفتاحية:** بكتيريا حمض اللاكتيك ، القمح المخمر (الحموم) ، البروبيوتيك ، خواص البروبيوتيك