

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique Université Ibn Khaldoun –Tiaret–



**Faculté 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 : Toxicologie et sécurité alimentaire**

**Présenté par :**

**-ZERROUKI MIMOUNA**

**-FATNACI RAHMA**

**Thème**

**Exploitation du pouvoir de certaines bactéries lactiques :  
potentialités fonctionnelles et technologiques**

**Soutenu publiquement le 03/ 07/ 2024**

**Jury :**

**-Président :** Dr YEZLI Wassim

**- Encadrant :** Dr KHADEM Hafidha

**- Examineur :** Dr ABBES Abdelhaq M<sup>ed</sup>

**Grade :**

MCA

MCB

MCA

**Année universitaire 2023-2024**

## **Remercîments**

*Nous souhaitons exprimer notre gratitude envers Dieu pour nous  
Avoir guidés tout au long de ce travail.*

*Nous remercions sincèrement, notre encadrante, **Madame  
KHADEM. H** pour sa confiance, ses conseils précieux et sa  
Patience tout au long de ce processus.*

*Nous sommes également reconnaissantes envers les membres du  
Jury messieurs **YEZLI .W** et **Mr ABBES**. A pour avoir accepté  
D'examiner notre travail.*

*Nous tenons à remercier l'ensemble des enseignants qui ont  
Contribué à notre formation et qui ont joué un rôle crucial  
Dans notre parcours académique*

*Enfin, nous tenons à exprimer notre reconnaissance envers  
Toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la  
Réalisation de ce travail.*

## **Dédicace**

### ***À mon très cher père Mohamed***

*Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension.... Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.*

### ***À ma chère mère Samira***

*Qui à œuvrer pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude, Je t'aime Mama.*

### ***À mes Sœurs Asmaa, Hadj er, Meriem***

*Qui ont partagé avec moi les hauts et les bas, cette aventure.*

### ***À mes collègues et mes amis***

*Nesrine, Assia, Fatima, Ilham, Hanane, Khadîdja pour leur précieuse amitié et leurs encouragements sans faille.*

*Que cette recherche soit dédiée à ceux qui ont contribué de près ou de loin à son aboutissement et dont l'influence a marqué mon parcours académique.*

**FATNACI RAHMA**

## Dédicace

*Je dédie cet humble travail à mon cher père (**Rabeh**), qui m'a soutenu à chaque étape de mes études, et à ma mère attentionnée (**Rokia**), sans qui je ne serais pas là où je suis aujourd'hui .À mes frères (**Mourad. Abdelkader**) .Surtout mon frère (**Ahmed**). À ma petite sœur (**Wissam**) et aux épouses de mes frères et à leurs fils, chacun avec son propre nom, en particulier (**Younnes**) et enfin, je dédie ce travail à ma grand-mère, Que ALLAH ait pitié d'elle*

**ZERROUKI MIMOUNA**

## Liste des abréviations

- ATCC : American Type Culture Collection
- BL : Bactéries lactiques
- DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- DO : Densité optique
- EPS : Exopolysaccharides
- LDH : Lactate déshydrogénase
- MRS : Man Rogosa and Sharpe
- ONPG : Ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -galactoside
- ODC : Ornithine décarboxylase
- pH : Potentiel d'hydrogène
- PBS : Solution Tampon Phosphate Salin
- UFC : Unité Formant Colonie
- EFSA : Européen Food Safety Authority

## Liste de tableaux

-Tableau 01 : Matériaux utilisés dans cette étude .....	06
-Tableau 02 : Résultats de l'aspect macroscopique et microscopique de <i>L.rhamnosus</i> ....	14

## Liste de figures

- Figure 01 : Etapes essentielles du protocole expérimental.....05
- Figure02 : Lyophilisat de *Lactobacillus rhamnus* GG (ATCC 53103) ..... 15
- Figure 03 : L'effet de la température sur la croissance ..... 15
- Figure 04 : L'effet de pH sur la croissance ..... 16
- Figure05 : Tolérance a une solution similaire au suc gastrique ..... 17
- Figure06 : L'effet de sels biliaries sur la croissance ..... 18
- Figure07 : L'effet de Na cl sur la croissance.....19
- Figure08 : Optimisation de l'inoculum ..... 19
- Figure 09 : Optimisation de la température de production des ESP .....20
- Figure 10 : Optimisation de la durée d'incubation..... 21
- Figure 11 : Biofilm ..... 22

## Table des matières

Liste des abréviations .....	I
Liste des tableaux .....	II
Liste des figures .....	III

## Introduction

Introduction .....	4
--------------------	---

## Matériel et Méthodes

1. Objectif de travail .....	6
2. Lieu et période de travail .....	6
3. Protocole expérimental .....	7
4. Matériel utilisé .....	8
4.1. Souche lactique .....	8
4.2. Appareillage et produits chimiques .....	8
5. Méthode adoptée .....	9
5.1 Vérification de la pureté de l'espèce .....	9
5.2 Standardisation .....	9
5.3 Caractérisation de <i>L. rhamnosus</i> : étude du potentiel probiotique .....	9
5.3.1 Détermination de la température de croissance .....	9
5.3.2 Tolérance au pH acide .....	9
5.3.3 Tolérance a une solution similaire au suc gastrique .....	9
5.3.4 Croissance a différentes concentrations en sels biliaires .....	10
5.3.5 Tolérance a l' NaCl .....	10
5.4 Optimisation des conditions de production d'EPS par <i>L. rhamnosus</i> .....	10
5.4.1 .Optimisation de milieu de culture .....	10
5.4.2 .Optimisation de l'inoculum .....	11
5.4.3. Optimisation de la température .....	11
5.4.4. Optimisation de la durée d'incubation .....	11
5.5. Extraction, purification et dosage des EPS .....	11



5.6.1 La formation de biofilm.....	11
5.7 Aspect fonctionnel des cellules entières et de leur EPS : effet post biotique .....	12
5.7.1 Cellules entières .....	12
5.7.2 EPS : Exemple d'un postbiotique .....	12

## **Résultats et discussions**

1. Vérification de la pureté de l'espèce .....	14
2. Résultats de l'étape de caractérisation de <i>L. rhamnosus</i> .....	14
2.1 Températures de croissance.....	14
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> fait partie des organismes mésophiles, mais, selon la souche elle peut se développer à des températures inférieures à 15 °C ou plus élevées à une température de 40°C (Lubomir et al, 2008).....	
2.3 Tolérance a pH acide .....	15
2.4 Tolérance a une solution similaire au suc gastrique .....	16
2.4 Croissance a différentes concentrations de sels biliaires .....	16
2.5 Tolérance a l' NaCl .....	17
3 .Résultats de l'optimisation des paramètres de production des EPS .....	18
3.1 Le milieu de culture .....	18
3.2 L'inoculum .....	19
3.3 Effet de la température .....	20
3.4 La durée d'incubation.....	20
3.5. Formation de biofilm.....	21
5. Résultats du pouvoir antioxydant .....	22

## **Conclusion**

Conclusion.....	23
-----------------	----

## **Références bibliographiques**

Références bibliographiques

Annexe resume



---

# **Introduction**

---

# Introduction

---

Les bactéries lactiques (BAL) forment un groupe de micro-organismes bénéfiques naturellement présents dans de multiples environnements, dont le système digestif humain. Elles ont pour principale caractéristique de produire de l'acide lactique en tant que produit final de leur métabolisme fermentaire par la dégradation des hydrocarbonées comme sucres, alcools et acides organiques (**George et al ; 2018**).

Ces bactéries sont des Cocci ou des bâtonnets, à Gram+, généralement immobiles, non sporulées, anaérobies facultative, ce qui signifie qu'elles peuvent survivre en présence ou en absence d'oxygène, Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni oxydase (certaines souches ont une pseudo-catalase) (**Novell, 1993 ; Zhen et al, 2021**).

Les bactéries lactiques regroupent 60 genres avec plus de 168 espèces appartenant principalement aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pedicoccus*, *Entérocooccus* (**Carr et al. ; 2002**). Les cellules se présentent sous forme sphérique ou ovoïde de moins de 2 µm de diamètre, elles ont un aspect caractéristique et se regroupent-en paires (diplocoques), en chainettes ou tétrades, fréquemment exploitées pour la fermentation des aliments distincts (**Mc-Keon et al. ; 2017**).

L'utilisation de ce groupe de bactéries remonte à plus de 10 000 ans, commençant avec la fermentation du lait, du pain et des boissons en Mésopotamie et en Égypte (Wood,1998). Au Moyen Âge, les techniques de fermentation se sont perfectionnées en Europe et en Asie, notamment dans les monastères, améliorant la conservation et les qualités organoleptiques des aliments. Au XIXe siècle, Louis Pasteur a identifié les micro-organismes responsables de la fermentation lactique, et Joseph Lister a découvert spécifiquement les BL. Le XXe siècle a vu l'essor de l'industrie laitière, la standardisation des cultures de démarrage et l'émergence des

Produits probiotiques, soulignant les bénéfices des BAL pour la santé digestive et immunitaire (**Tammie,A et al ., 1999**). Au XXIe siècle, les avancées biotechnologiques ont permis de nouvelles applications des BAL dans la médecine,; agriculture et l'industrie, incluant la production de bioproduits d'autre part les recherches sur le microbiote intestinal, mettant en lumière leur importance continue pour la santé humaine et la technologie alimentaire. (**Hamme et Hertel, 2019**).

# Introduction

---

En effet, les BAL sont devenus de plus en plus populaires au fil des années, du fait de la diversité de ce groupe, avec plusieurs genres et espèces ayant des performances considérables en termes fonctionnels et technologiques.

De point de vue technologique, les BAL présentent de nombreux avantages. Elles contribuent aux propriétés organoleptiques et à la conservation des aliments fermentés. De plus, leurs capacités de fermentation en font des acteurs clés dans de nombreux processus alimentaires,

En effet, elles jouent un rôle essentiel dans la fabrication de produits laitiers fermentés tels que les yaourts et les fromages. Elles sont également présentes lors de la transformation d'autres produits alimentaires, tels que le saumurage et la fermentation des légumes, la panification, la vinification, la salaison de la viande et du poisson. Les LAB jouent un rôle essentiel dans le développement de processus industriels innovants. Elles peuvent notamment être exploitées pour la production de probiotiques (**Arioli et al ; 2019**) «des micro-organismes vivants qui, en quantités adéquates, peuvent avoir des effets positifs sur la santé du fait de leurs fonctions antibactériennes, protectrices, nutritionnelles et immunomodulatrices» (**Hill et al., 2014**).

Grâce à leurs caractéristiques bénéfiques et à leur polyvalence d'utilisation, le rôle des bactéries Lactiques dans de nombreux secteurs de industrie alimentaire devient de plus en plus Incontournable.

De point de vue fonctionnel, les bactéries lactiques possèdent plusieurs potentialités, elles peuvent produire des composés antimicrobiens, comme les bactériocines tels les plantaricines produit par *Lactobacillus planétarium* qui inhibent la croissance des pathogènes et des micro-organismes indésirables, renforçant ainsi la sécurité des aliments (**Chen et al., 2003**). De plus, certaines souches de BAL ont le statut probiotique et sont capables de produire une variété de produits tels les postbiotique (**Leroy et De Vuyst, 2004**) ; le terme postbiotique est employé pour définir les facteurs solubles, les produits ou les sous-produits métaboliques relâchés par les bactéries vivantes ou après la lyse bactérienne (**Santana ; 2024**).

Le terme postbiotique est quant à lui utilisé pour définir les facteurs solubles, les produits ou

# Introduction

---

les sous-produits métaboliques libérés par les bactéries vivantes ou après la lyse bactérienne. Ces produits sont libérés dans le surnageant acellulaire de la suspension bactérienne au cours de sa croissance et sont susceptibles d'avoir des effets bénéfiques sur la santé par un mécanisme direct ou indirect. Les postbiotiques ont un avantage sur les probiotiques car ils optimisent leurs effets bénéfiques, surmontent le défi technique de l'efficacité de la Colonisation et maintiennent les micro-organismes viables et stables dans le produit à des doses élevées, étant donné qu'ils sont influencés par des facteurs externes, tels que la température et le pH (**Moradi , 2019 ; Santana , 2024**).

Un exemple des postbiotiques consiste aux exopolysaccharides (EPS), c'est des polymères composés de sucres simples (monosaccharides) reliés entre eux par des liaisons glycosidiques. Ils sont produits par de nombreuses bactéries comme un produit de métabolisme secondaire et sont excrétés à l'extérieur de la cellule bactérienne (**Flemming, 2010**).

Elles sont essentielles pour la formation et la stabilité des biofilms, protégeant les micro-organismes contre les conditions environnementales défavorables et les agents antimicrobiens. Ils protègent également les cellules microbiennes contre le stress environnemental comme la dessiccation, les variations de pH, les substances toxiques, et les attaques immunitaires.

Facilitant l'adhésion et la colonisation des surfaces, les EPS sont cruciales pour la colonisation des environnements variés, y compris les interactions pathogènes avec les hôtes.

L'objectif premier de cette recherche est d'exploiter certaines performances de *Lactobacillus rhamnosus*, une espèce bactérienne de grande importance industrielle retrouvée dans le microbiote humain et animal, en mettant en valeur ces propriétés probiotiques et sa capacité à produire des postbiotiques : le cas de EPS. Il est donc nécessaire de déterminer certains critères de sélection retenus à l'échelle internationale ainsi que les conditions idéales permettant d'obtenir les meilleurs rendements en EPS, un bioproduit ayant des vertus technologiques et fonctionnelles que nous avons entrepris d'évaluer à travers son activité antioxydant. Ce mémoire est organisé en trois parties. À la suite de cette introduction, la section méthodologique décrira les techniques appliquées. Les résultats seront ensuite présentés et discutés, suivis d'une conclusion résumant les principales découvertes et leurs implications

# Introduction

---

---

# **Matériel et Méthodes**

---



## 1. Objectif de travail

L'objectif de la présente étude était de mettre l'accent sur certains attributs technologiques et fonctionnels d'une souche lactique commerciale considérée comme étant probiotique. Notre optique était donc de vérifier et ou confirmer ses potentialités et ceux à travers ces étapes :

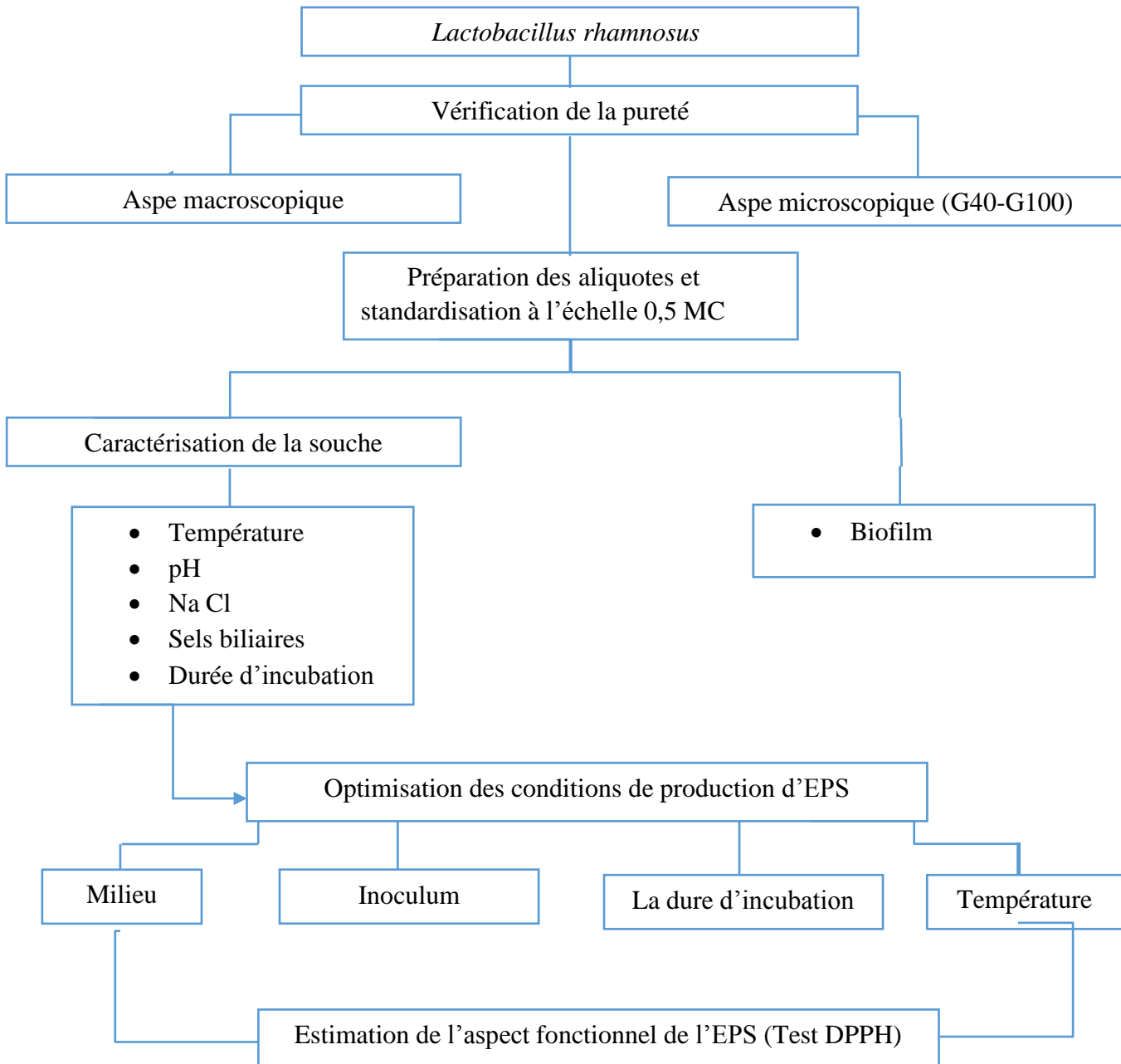
- Caractérisation de la souche selon les nouvelles normes de l'EFSA par l'étude de la croissance a différentes températures, la croissance dans des conditions extrêmes (pH Na cl sels biliaires).
- Estimation de la production totale d'un métabolite d'intérêt l'EPS après avoir optimisé certaines conditions liées à la production : milieu inoculum température durée d'incubation en présence d'oxygène.
- Estimation du pouvoir adhésif de la souche à travers le calcul de pourcentage d'autoaggregation, hydrophobicité, biofilm totale.
- Evaluation du pouvoir antioxydant de l'EPS produit par le test DPPH.

## 2. Lieu et période de travail

L'étude a été menée sur une période de deux mois allant de 18 Février au 09 Mars 2024 au niveau des laboratoires de microbiologie et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ibn-Khaldoun de Tiaret.

## 3. Protocole expérimental

Le diagramme ci-dessous offre une description claire et structurée des différentes étapes du processus expérimental suivi.



**Figure 01** : Etapes du protocole expérimental

## 4. Matériel utilisé

### 4.1. Souche lactique

La souche testée dans cette étude est l'espèce *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) sous forme lyophilisée de provenance de la Bulgarie.



Figure 02 : Lyophilisat de *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103)

### 4.2. Appareillage et produits chimiques

Les appareillages, la verrerie et les produits chimiques utilisés sont résumés dans le **tableau 1**

**Tableau 01** : Appareillage et produits chimiques

Appareillages	Verreries	Produits chimiques	Milieux de cultures
-Agitateur	-Béchers	-Ethanol à 96 %	-MRS (gélose)
-Réfrigérateur	- Lames	-Acide acétique (CH <sub>3</sub> COOH) 30%	-MRS (liquide)
-Balance	-Pipettes graduées	-Acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	-Bouillon hypersaccharose
-Autoclave	-Tubes à essai	Acide chlorhydrique HCL	-PBS
-Incubateur	-Epprouvettes	-Phénol 5%	
-Centrifugeuse	-Erlenmeyers	-Cristal violet à 1%	
-Microscope optique	- Cuves	-Chlorure de Sodium Nacl	
-Bain marin	-Spatule –verre de montre	-DPPH	
-Bec bunsen	-Pipettes pasteur	-Chloroforme	
-Vortex-PH mètre	-Des flacons	-Xylène	
-Chronomètre	-Pissette	-Ethyle-xylène	
-Micropipette			
-Spectromètre UV VIS			

## 5. Méthode adoptée

### 5.1 Vérification de la pureté de l'espèce

Le bouillon MRS a été inoculé par une quantité de lyophilisat de *L. rhamnosus*, la suspension a été par la suite incubée pendant 24 h à 37 °C en anaérobiose. Une gélose MRS a été étalée par un volume de suspension. Après incubation de 24 h, on a procédé à la vérification de la pureté de la souche par coloration de Gram et par observation macroscopique des colonies.

### 5.2 Standardisation

La standardisation de la densité optique (DO) est une pratique importante pour fixer la charge cellulaire des suspensions bactérienne et donc s'assurer de la précision et de la répétabilité des expériences (Giraud, 2015). L'estimation du nombre de germes a été établie par la méthode Mac Ferland. Un nombre de colonies de cultures pures ont été transférées dans un milieu MRS. La turbidité a été ajustée à 0,13 sur l'échelle 0,5 Mac Ferland, ce qui correspond approximativement à  $10^8$  UFC/ml.

### 5.3 Caractérisation de *L. rhamnosus* : étude du potentiel probiotique

#### 5.3.1 Détermination de la température de croissance

Selon le Protocole de Boubakeur et al. (2022), une série de tube contenant une suspension ajustée ( $10^8$  cellules par mL) de *L. rhamnosus* a été incubée à différentes températures (30°C, 37°C, 40°C, 42°C) puis a été incubée pendant une période de 24 et 48 h. Les DO ont été prise à 575 nm contre un blanc (milieu stérile).

#### 5.3.2 Tolérance au pH acide

La tolérance de *L. rhamnosus* aux conditions acides a été établie en adoptant le protocole de Chen et al. (2022). Le pH du bouillon MRS a été ajusté à des niveaux de pH de 2 et 3 par l'ajout de la solution HCl (1N). Les tubes ont été inoculés par une culture bactérienne fraîchement préparée et ajustée à  $10^8$  cellules par ml. La turbidité du milieu de culture a été estimée après 24 et 48 heures d'incubation. Un tube servant de contrôle négatif non inoculé a été utilisé.

#### 5.3.3 Tolérance a une solution similaire au suc gastrique

Le protocole décrit par Chartris (1998) a été adopté pour ce test avec quelques modifications. Une solution similaire au suc gastrique a été préparée par la dissolution de pepsine (0.3%) dans une solution saline stérile (0.5%). le PH a été ajusté à 2.5 et le milieu a été inoculé par  $10^8$  cellules/ml. La tolérance a été déterminée après incubation de 4h par lecture des DO à 575 nm. Une culture dans MRS a servie de contrôle.

Le nombre de survivants a été calculé par la suite en log N

### 5.3.4 Croissance a différentes concentrions en sels biliaries

Pour évaluer la tolérance aux sels biliaries, la méthode décrite par de **Berebon et al. (2018)** a été adoptée avec quelques modifications. Des tubes contenant le bouillon MRS supplémenté par des concentrations croissantes de sels biliaries à raison de 0.1%, 0.3 %, 0.5 % ,1.0 %. Ils ont été incubés dans les mêmes conditions, le nombre de survivants a été estimé par lecture de la DO à 575 après 24 h et 48h.

### 5.3.5 Tolérance a l' NaCl

Le test de résistance à l' Na Cl, a été envisagé en utilisant le bouillon MRS enrichi avec des quantités croissantes de Na Cl : 2 %, 4 %, 6 % et 8 %. La série de tube a été inoculée par une culture bactérienne jeune et a été par la suite incubée à 37°C. La turbidité des milieux de culture a été mesurée après 24 h et 48 h (**Chen et al. 2022**).

### 5.3.6 Sensibilité aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été analysée à l'aide de la méthode du disque (diffusion sur gélose) décrite par Bauer (1966). Au total cinq antibiotiques ont été testés métronidazole (30 µg), le chloramphénicol (30 µg), la gentamicine (10 µg) et la tétracycline (30 µg), la colistine. Les disques d'antibiotiques ont été appliqués à la surface d'une gélose Mueller Hinton inoculée avec 1mL de suspension bactérienne (10<sup>6</sup> CFU/mL). Après une incubation de 24 heures à +37°C, les diamètres des zones d'inhibition (mm) ont été mesurés.

## 5.4 Optimisation des conditions de production d'EPS par *L. rhamnosus*

L'optimisation est un processus qui permet d'évaluer le niveau de production en fonction des diverses conditions de culture. C'est une étape pivotante pour toute production de métabolite. Elle implique de faire varier successivement chaque facteur tout en maintenant les autres constants (**L'arpent et sanglier, 1989**). Les paramètres faisant partie de l'optimisation sont décrits ci-dessous et ont été établies selon : **L'arpent et Sanglier (1989)** ; **Kimmel (1998)** ; **Kumar et al, (2007)** ; **Khadem et al, (2021)**.

### 5.4.1 .Optimisation de milieu de culture

Deux milieux de production ont été testés, le MRS et le bouillon hyperssacharosrosé. Des tubes à essai content le milieu de culture ont été inoculés par un volume d'une suspension ajustée de *L. rhamnosus* (10<sup>8</sup>Ufc/ ml). L'ensemble de tubes a été incubé à la température optimale de la croissance (37°C pendant 24h).

## 5.4.2 .Optimisation de l'inoculum

La concentration de l'inoculum est un paramètre clé dont dépend toute expérience et toute production. Ce test a été réalisé en modifiant la taille de l'inoculum initial. Une série de tube a été inoculée par  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  UFC/mL et a été incubée par la suite à 37°C pendant 24 h. le milieu de production choisi était celui qui a favoriser une meilleur production.

## 5.4.3. Optimisation de la température

La production a été faite en adoptant les mêmes étapes décrites précédemment. Brièvement les suspensions ajustées à la taille d inoculum la plus convenable, dans le milieu de culture le plus idéale ont été incubées à différentes températures 25°C, 37°C, 45°C pendant 24h.

## 5.4.4. Optimisation de la durée d'incubation

Les paramètres idéals à la production des EPS fixés précédemment ont été maintenus pour ce test. Les suspensions ont donc été incubées pendant 18h et 24 h.

## 5.5. Extraction, purification et dosage des EPS

Le protocole standard de dosage des sucres totaux décrit par **Dubois (1956)** a été suivi pour cette étape. La suspension de *L. rhamnosus* maintenue dans des conditions optimales permettant d'avoir un rendement élevé en EPS a subi une thermisation à 80°C pendant 15 min dans un bain marie avec agitation chaque 5 min. Le surnagent a été récupéré après centrifugation puis a été filtré par filtre millipore (0,45 µm). L'EPS est ensuite récupérée après une série de précipitation par l'éthanol congelé.

Les solutions d'EPS à différentes dilutions ont été doses par la méthode du phénol sulfurique. Un volume de 0,5 mL de solution d'EPS est mélangé à un volume équivalent de phénol, puis 2,5 mL d'acide sulfurique sont ajoutés au mélange. L'absorbance des échantillons et des standards (blanc) sont lu ensuite à 490 nm en utilisant un spectrophotomètre UV VIS.

La quantité des EPS est exprimée en mg équivalent de glucose selon cette équation d'étalonnage :

$$Y=99,91x+0,118$$

## 5.6.1 La formation de biofilm

Le protocole permettant de quantifier le biofilm est celui décrit par **Boubakeur et al. (2016)**.

La suspension bactérienne de *L. rhamnosus* a été incubée dans des tubes à essais à 37°C

## **Matériel et méthodes**

pendant 24 h, 48h, 72h. Le contenu des tubes a été jeté et ils ont été lavés pour éliminer toute trace du milieu de culture. Le biofilm formé a été déterminé après coloration par le cristal

violet (0,1 %). Pour quantifier le nombre de cellules attachées, une étape de détachement réalisée par l'ajout de l'acide acétique (30 %) et l'absorbance a été lue à 570 nm. La capacité de la souche à former le biofilm est estimé selon l'intensité de la couleur.

### 5.7 Aspect fonctionnel des cellules entières et de leur EPS : effet post biotique

Les bactéries lactiques ont un potentiel fonctionnel exceptionnel. Cette particularité les rendent de plus en plus exploiter dans le domaine médicale, pharmaceutique et cosmétique et ceux via leur capacité antioxydante, anticholesterolemique, antibactérienne...etc

#### 5.7.1 Cellules entières

Le pouvoir antioxydant des LAB est de plus en plus étudié et ceux en testant plusieurs types de radicaux libres. Nous nous somme limite dans cette étude à l'estimation de la réduction du radical DPPH Selon le protocole de **Lepecha et al (2023)**.

La biomasse issue d'une culture jeune a été récupérée après centrifugation à 7000 rpm pendant 10min à 4C°. Elle a été ajustée après lavage au PBS à  $10^9$ .

Un volume de 1mL d'une solution de DPPH (0.2m mol) a été ajouté à un 1mL de la suspension bactérienne, après incubation de 30min, le mélange a été centrifugé à 9000g pendant 10min.

#### 5.7.2 EPS : Exemple d'un postbiotique

Le même protocole décrit précédemment a été adopté en testant plusieurs dilutions de solutions d'EPS 1 /10 et 1/ 100.

La DO du surnagent a été prise à 517nm contre un blanc et le pourcentage de réduction est calculé selon cette formule :

$$1-(A_1 - A_2)/A_0$$

Dont

A<sub>0</sub> : DO de 1ml éthanol +1ml DPPH

A<sub>1</sub> : DO de la suspension avec DPPH

A<sub>2</sub> : DO de 1ml alcool +1ml suspension



---


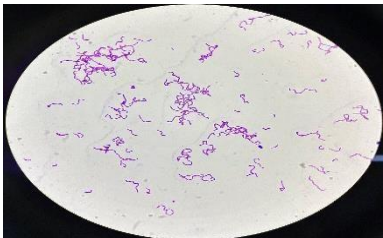
# **Résultats et discussions**

---

## 1. Vérification de la pureté de l'espèce

L'observation microscopique (après coloration de Gram) ainsi que l'observation macroscopique sont présentées dans le tableau ci-dessous, les deux observations ont confirmé la pureté de l'espèce étudiée.

**Tableau N 02** : Résultats de l'aspect macroscopique et microscopique de *L. rhamnosus*

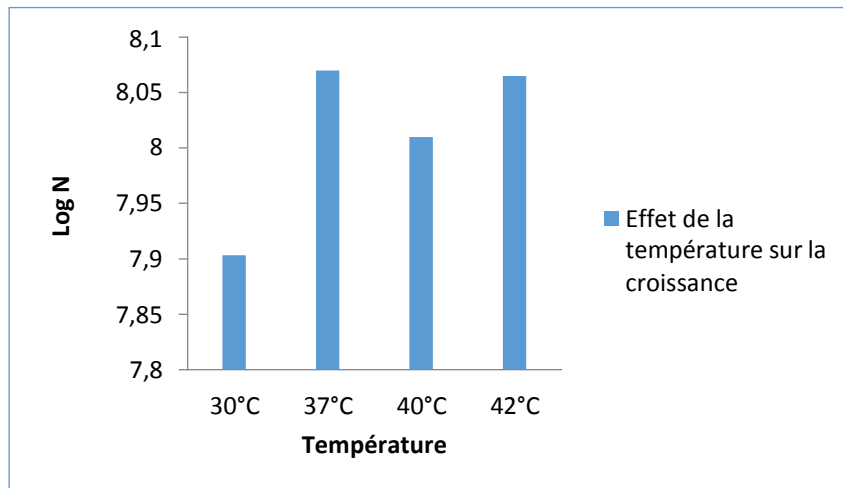
Aspect macroscopique	Aspect microscopique
<p>Colonie de couleur crème, aspect crèmeux, surface lisse bombée.</p> <div style="text-align: center;">  </div>	<p>La forme : des bacilles regroupés en chaînettes, Gram +</p> <div style="text-align: center;">  </div>

## 2. Résultats de l'étape de caractérisation de *L. rhamnosus*

### 2.1 Températures de croissance

La Figure N° 2 montre l'effet de la température sur la croissance de la souche lactique *L. rhamnosus*. Il est bien établi que les valeurs de température de 37 °C et 42 °C sont les plus idéales pour la croissance et correspondent aux concentrations cellulaires de 8,07 log UFC /mL et 8,06 log UFC /mL, respectivement. Il est donc évident que l'effet de ces deux températures n'est pas significatif, toutefois le nombre de germes est clairement faible à 30°C.

## Résultats et discussion

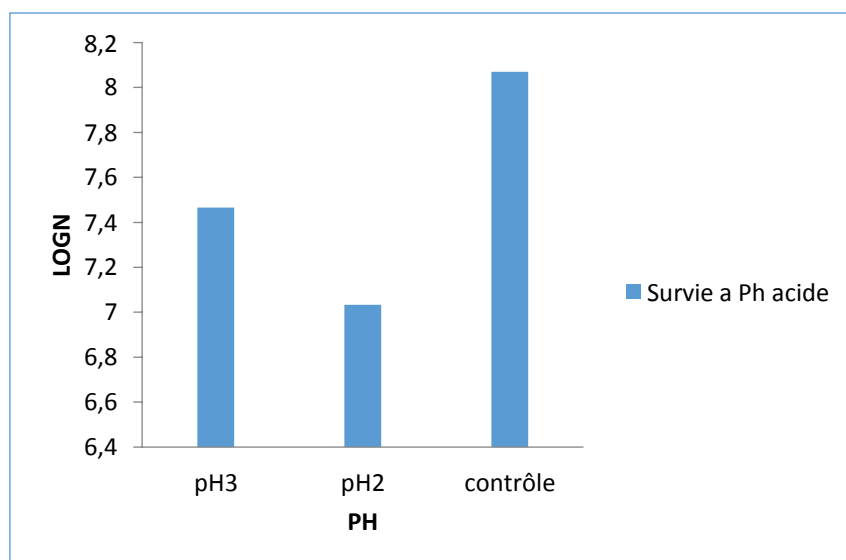


**Figure 02** : Effet de la température sur la croissance

*Lactobacillus rhamnosus* fait partie des organismes mésophiles, mais, selon la souche elle peut se développer à des températures inférieures à 15 °C ou plus élevées à une température de 40°C (Lubomir et al, 2008).

### 2.3 Tolérance a pH acide

L'effet du pH sur la croissance est montré sur la figure N 03. Il est évident que la croissance dans un milieu acide est réduite par rapport au contrôle (8 log 10 UFC). Elle reste plus considérable a pH 3 par rapport à pH 2, les taux enregistrés étaient de l'ordre de 7,46 et 7,03 Log UFC /mL.

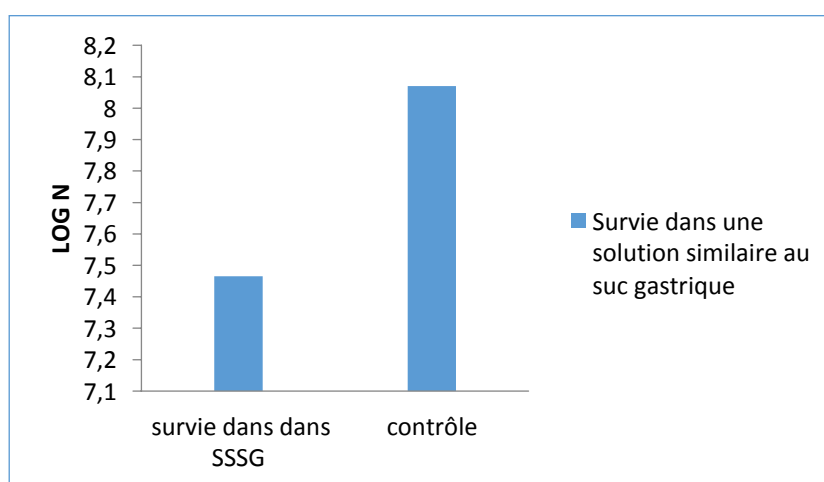


**Figure03** : Effet de pH sur la croissance

Les probiotiques sont efficaces selon leur qualité microbienne, leur résistance aux environnements gastriques hostiles et leurs caractéristiques fonctionnelles. En effet, le tube digestif humain est complexe et les probiotiques doivent posséder une certaine capacité à survivre dans cet environnement (Vecchione et al, 2018). Les études évaluant la viabilité des espèces de *L. rhamnosus* lors des expositions prolongée dans des conditions acides ont montrés que les souches ne peuvent pas survivre plus longtemps (Kyle et al, 2018). En effet, leur croissance est généralement sous-optimale dans ces conditions.

### 2.4 Tolérance a une solution similaire au suc gastrique

Les résultats de ce test sont montrés dans la figure N° 4. Il est caire que la survie de *L. rhamnosus* est affectée dans des conditions similaires au suc gastrique les taux enregistrés étaient de l'ordre de 7.4 log 10 VS 8 log10.



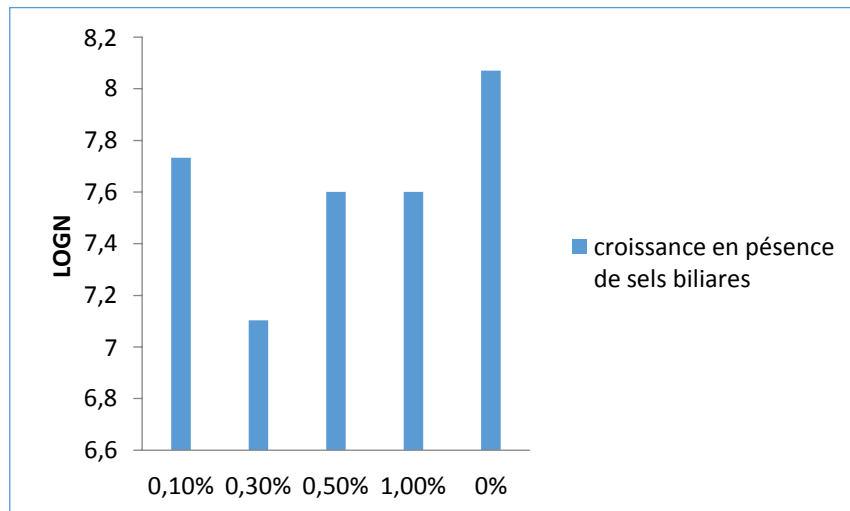
**Figure04** : Survie dans une solution similaire au suc

Toutefois, Boke et ses collaborateurs (2010) ont observé une considérable réduction de la viabilité à  $\text{pH} \leq 3.0$ , pour toutes plusieurs souches lactiques, y compris celle de *L. rhamnosus*, et que la sensibilité à l'acide est plus grande pour les souches peu productrices d'EPS.

### 2.4 Croissance a différentes concentrations de sels biliaries

Les résultats de l'effet de sels biliaries sont illustrés dans la figure N°05. L'espèce étudiée s'est comportée différemment en présence des sels biliaries. La croissance était de l'ordre de 7. log CFU et 7.log CFU après 24h et 48h. Le nombre de germe le plus faible était enregistré à 0.3% de sels biliaries.

## Résultats et discussion

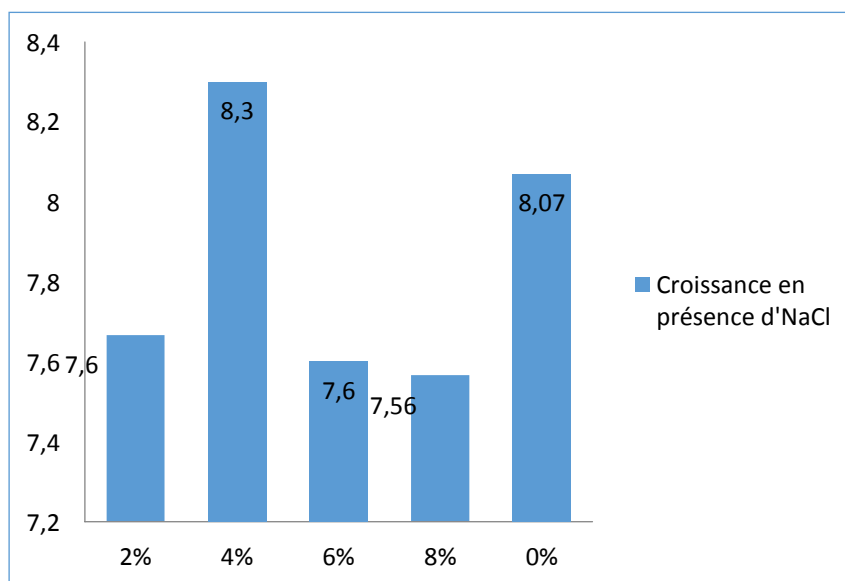


**Figure 05** : Croissance en présence de sels biliars

Les bactéries lactiques et plus particulièrement les probiotiques sont souvent impliqués dans la production de produits laitiers et d'aliments à base de légumes. La tolérance à la bile est donc une propriété cruciale liée souvent à leur capacité de résistance (**Begley et al., 2005**). Selon **reale et al (2015)**, la résistance aux sels biliars variait considérablement entre les différentes espèces du genre *Lactobacillus*. Cela dépendait également de la concentration ainsi que des propriétés spécifiques de la souche. La digestion des aliments et la régulation de l'équilibre des communautés microbiennes intestinales sont assurées par les acides biliars. La concentration en sels biliars dans l'intestin grêle des personnes en bonne santé se situe entre 0,3 et 3,0 g/L. De fortes concentrations en sels biliars sont susceptibles de freiner la croissance des probiotiques, de modifier la perméabilité de la membrane cellulaire, de décomposer les protéines membranaires et de provoquer la rupture et la mort des cellules (**Sharma et al.,201**).

### 2.5 Tolérance a l' NaCl

Les résultats de ce test sont présentés dans la figure N° 6. Il est évident que le développement de *L. rhamnosus* s'est affecté par la concentration et aussi la durée d'incubation. Par exemple à 4% de NaCl le nombre de germe était de l'ordre de 8.3 log UFC/mL.



**Figure 06** : Croissance en présence de NaCl

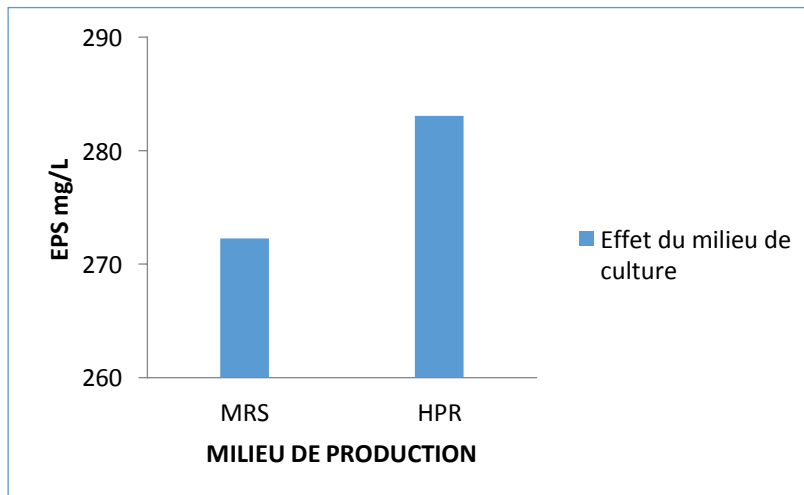
L'élément NaCl peut ralentir la croissance des *Lactobacillus* mais les concentrations testées n'étaient pas létale. Toutefois, à des niveaux élevés, le NaCl peut causer des dommages à la membrane cellulaire et engendrer une déshydratation ce qui peut provoquer la destruction bactéries (Papadimitriou et al, 2016).

### 3 .Résultats de l'optimisation des paramètres de production des EPS

#### 3.1 Le milieu de culture

La Figure N° 07 illustre les résultats de l'optimisation de milieu de production. *L.rhamnosus* produisant plus d' EPS de l'ordre de 275 mg/ L dans le milieu MRS, donc il a été maintenu comme milieu idéal à la production. Le rendement d'EPS était relativement faible dans le milieu hypersacharosé de l'ordre de 288 mg / L.

## Résultats et discussion

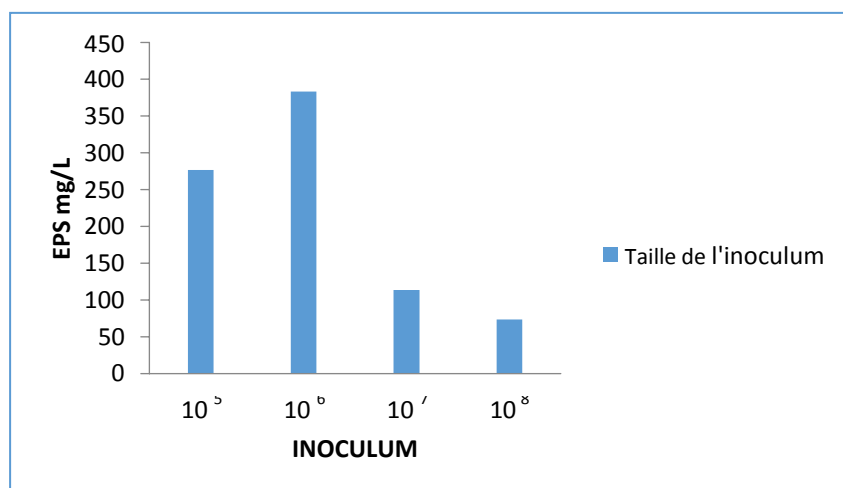


**Figure 07** : Optimisation milieu de production des EPS

**Adebayo-Tayo et Onilude (2009)** ont rapporté que la composition du milieu influence significativement la biomasse, la viscosité, ainsi que la production d'exopolysaccharides par des isolats de bactéries lactiques. D'autres parts la teneur en EPS varie non seulement entre les espèces de bactéries lactiques, mais aussi au sein d'une même espèce. **Cerning et al. (1994)** ont rapporté que, contrairement au lactose, le glucose est la source de carbone la plus appropriée pour la production d'EPS pour la majorité des bactéries lactiques.

### 3.2 L'inoculum

Les résultats de l'effet de la taille de l'inoculum sur la production des EPS figure sur la figure N°08, Nous remarquons qu'à  $10^6$  UFC /mL. Le rendement était plus important. Au-delà de cette charge la production commence à diminuer.



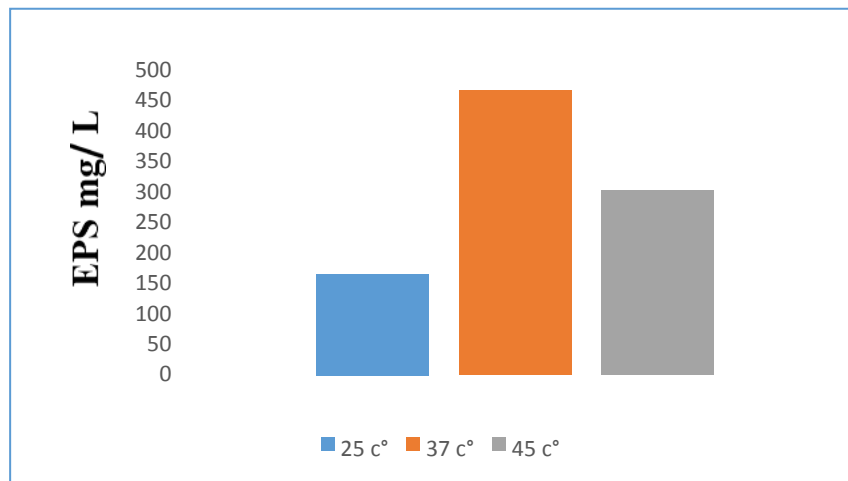
**Figure 08** : Optimisation de l'inoculum

## Résultats et discussion

Selon **L'arpent et Sanglier (1989)**, le succès de toute expérience et de toute production dépend largement de la quantité de l'inoculum. Et que le nombre de bactéries initiales doit varier de  $(10^5)$  et  $(10^8)$  cellules par millilitre.

### 3.3 Effet de la température

D'après cette figure la production est nettement affectée par la température, elle est plus considérable à 37°C qu'à 45°C et 25°C, les valeurs enregistrées étaient respectivement : 733 mg/L, 303 mg/L et 166 mg/L,



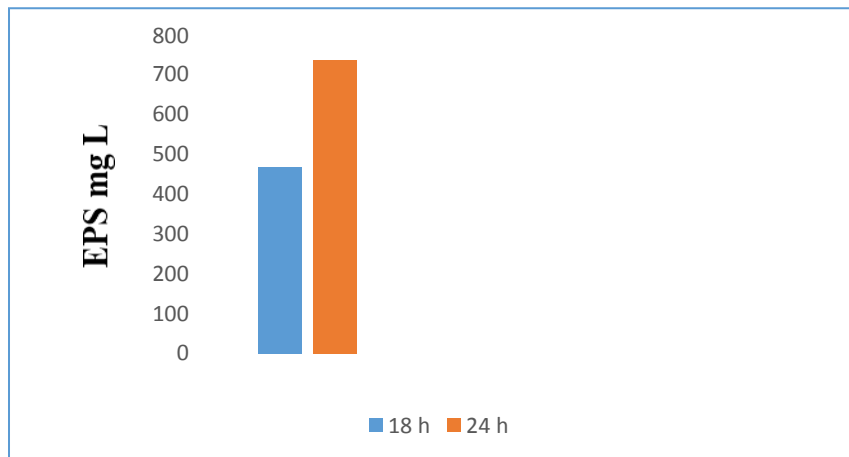
**Figure 09** : Effet de la température sur le rendement en EPS

Nos résultats sont comparables avec ceux de **Chen et al (2006)** ; **Kim et al (2008)**, qui ont observé que la plus grande production d'EPS par des souches de *Lactobacillus* était à 37°C. En revanche, d'autres études ont montré que les bactéries mésophiles produisent plus d'EPS au voisinage de 30°C (**Cerning et al, 1994** ; **Degeest et al, 2001**). Ces recherches suggèrent que la température optimale pour la production d'EPS varie en fonction de la souche.

### 3.4 La durée d'incubation

La figure N°10 décrit l'effet de la durée d'incubation sur la production des EPS. Il est à noter qu'après 24 h d'incubation, la souche testée produit plus d'EPS : 733 mg/mL VS 466 mg/mL. Enregistrée après 18 h d'incubation.



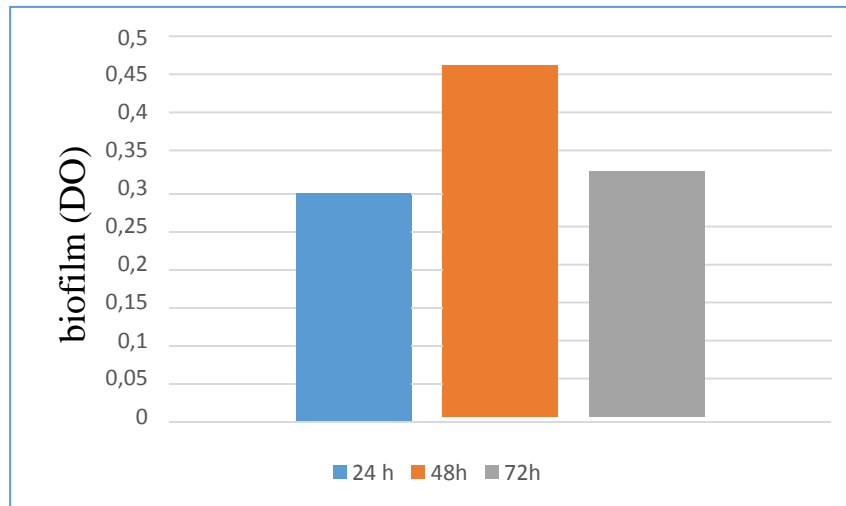


**Figure 10** : Production d'EPS après 18 H et 24H

La production d'EPS par *L.rhamnosus* est influencée par la phase de croissance de la bactérie et la durée d'incubation. Au début de la culture, pendant la phase de croissance exponentielle, la production d'EPS peut être plus faible car la bactérie utilise principalement les nutriments pour sa propre croissance. À mesure que la culture atteint la phase stationnaire, la production d'EPS peut augmenter, car la croissance cellulaire ralentit et la bactérie redirige son métabolisme vers la production de substances extracellulaires (**Ruas-Madiedo et al, 2005**), Selon **Richard et Marie (2003)**, la majorité des EPS sont produits pendant les 12 à 24 h d'incubation.

### 3.5. Formation de biofilm

Les résultats présentés dans la figure N °11 illustre la capacité de *L. rhamnosus* a formé un le biofilm. Il est évident que cette capacité varie en fonction du temps, un biofilm consistant était formé après 48h d'incubation, les DO= 0. 460. La puissance du biofilm est moins importante après 24 h et 72 h (0,322). Cette réduction est probablement due au détachement des cellules, de la mort cellulaire due à l'accumulation de déchets et à la diminution des nutriments, ou de la dégradation de la matrice extracellulaire par des enzymes ou des modifications environnementale.



**Figure 11** : Biofilm formé après 24-48-78h

### 5. Résultats du pouvoir antioxydant

Le stress oxydatif d'un système est un phénomène caractérisé par une activité excessive des espèces réactives de l'oxygène (ROS - Reactive Oxygen Species), qui résulte d'un déséquilibre entre la hausse de la production de ROS et/ou de radicaux libres et leur suppression par les systèmes antioxydants (Łepecka, 2023).

Les éléments antioxydants de la LLAB sont les exopolysaccharides bactériens (EPS), les peptides bioactifs, les enzymes antioxydantes et les ions de manganèse. En outre, les microbiotes intestinaux peuvent produire des antioxydants alimentaires bioactifs par le biais de processus de bioconversion reposant sur diverses réactions enzymatiques.

---

# **Conclusion**

---

## Conclusion

La souche *Lactobacillus rhamnosus* a montré de bonnes propriétés de croissance à des températures de 30°C à 42°C. Nos résultats indiquent également que le potentiel de croissance de cette souche à basse température pourrait être utilisé lorsqu'elle est ajoutée à des produits laitiers fermentés ou non fermentés. En raison de sa stabilité et de sa tolérance à un pH acide et à des conditions similaires à celles du suc gastrique, cette espèce lactique pourrait conserver. De plus, la capacité de cette espèce à générer un biofilm et des exopolysaccharides (EPS) lui confère une importance majeure dans le secteur alimentaire et dans d'autres domaines.

Les LAB probiotiques constituent une composante importante du contexte général de la santé. La biodiversité de ces organismes peut servir de base scientifique importante pour mener des recherches ciblées et développer des probiotiques, post et paraprobiotiques, des synbiotiques, et d'autres produits de santé connexe. En effet, Un intérêt grandissant est porté à la recherche de nouvelles sources d'antioxydants pouvant être utilisées en toute sécurité dans les aliments. Les probiotiques et leurs métabolites ont été reconnus comme une source inédite d'antioxydants efficaces. Le recours à des micro-organismes spécifiques offre la possibilité de réduire à l'avenir l'utilisation d'antioxydants synthétiques en tirant parti de leur potentiel antioxydant naturel.

En tant que probiotique, et sur la base des résultats de l'activité antioxydante des cellules cette espèce en particulier et les bactéries lactiques peuvent offrir des alternatives et d'un métabolite une alternative à certaines substances synthétiques. Cette étude ouvre la voie à d'autres travaux sur le potentiel d'autres espèces de ce groupe d'espèces bactériennes.

---

# **Références bibliographiques**

---

**A :**

- Areola, S., Montana RI, C., & Mora, D. (2019). Health-promoting properties of lactobacilli in fermented foods. *BioMed Research International*, 2019.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S., von Wright, A., & Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (3rd Ed.). CRC Press].
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of Microbiological Media*

**B :**

- Boubakeur, B., Tirtouil, A., Khadem, H., Meddah, B., AHCEN, S. (2016). An Assessment of the Effect of Aqueous Extract from *Thymus fontanesii* on Growth, Aggregation and Biofilm Formation of Pathogenic and Probiotic bacteria. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 6(7)1-1.
- Boubakeur, B., Drabo, M.S., Khadem, H., Mullier, C., Tirtouil, A. (2018). Influence of the exopolysaccharides of polyphenols-conditioned lactic acid bacteria on gut microecology and bacterial translocation (data accepted in Ukrainian journal of ecology-18-1).
- Bauer, A. W. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J clin pathol*, 45(4), 149-158

**C :**

- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370. doi : 10.1080/1040-840291046759.
- Chen, Z., Leng, X., Zhou, F., Shen, W., Zhang, H., Yu, Q., et al. (2022). Screening and identification of probiotic Lactobacilli from the infant gut microbiota to alleviate lead toxicity. *Probiot. Antimicrob. Proteins* 21, 9895. doi: 10.1007/s12602-021-09895-0.
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2013). *Microbiology: A Laboratory Manual*

**D:**

- DELARRAS C, 2007. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Editions TEC et DOC .Lavoisier .p 88-157.
- Dubois M, Gilles K.A, Hamilton J.K, Rebers P.A, Smith F (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. P. 28 ; Pp. 350-356.

**F :**

- Flemings, H.-C., & Winder, J. (2010). "The biofilm matrix." *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
- FRENEY J. RENAUD F, LECLERQ R. RIEGEL P, 2007. Précis de bactériologie clinique ,2ème éd. Editions ESKA, Paris. p. 1764

**G:**

- Giraud, E., & A, S. (2015). Bactéries lactiques et leurs applications en santé humaine. *Journal des Sciences Microbiologiques*, 45(2), 123-134. <https://doi.org/10.1000/jmsc.2015.2345>.
- George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F., et al. (2018). Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. *Front. Microbiol.* 9:2899. doi: 10.3389/fmicb.2018.02899 .

**H:**

- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2009). "The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*." In M. Dworkin (Ed.), *the Prokaryotes: Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*.
- Harrigan, W. F., & McCance, M. E. (1990). *Laboratory Methods in Food Microbiology*.
- Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014, 11, 506–514. [C

**K:**

- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., & Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by *Lactobacillus plantarum* under static conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(2), 491-497. doi:10.1271/bbb.70448.

**L:**

- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.

- Leboffe, M. J., & Pierce, B. E. (2010). *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory*. Morton Publishing Company.
- Łepecka, A., Szymański, P., Okoń, A., & Zielińska, D. (2023). Antioxidant activity of environmental lactic acid bacteria strains isolated from organic raw fermented meat products. *Lwt*, *174*, 114440
- Ľubomír Valík, Alžbeta Medved'ová, Denisa Liptáková, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Department of Nutrition and Food Assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, SK – 812 37 Bratislava, Slovakia.

### **M:**

- Mokena, M. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molécules* *22*:1255. doi : 10.3390/molecules22081255.
- Marchal, L., Bourdon, J.L (1982). *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. Edition Dion. Paris. 482 p
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2014). *Brock Biology of Microorganisms* (14th Ed.). Pearson.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., & Klein, D.A. (2002). *Microbiology* (5th ed.). McGraw-Hill.
- MacFaddin, J. F. (2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria* (3rd ed.). Lippincott William & Wilkins.

### **P:**

- Papadimitriou, K., et al. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, *15*, 51

### **R:**

- Richard, T. and C. U. Maria, 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, *154*: 705-712.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, *9*(1), 29-33.



## S:

- Sharma, D.; Kapila, S.; Kapila, R. Bile salt tolerance and adhesion mechanism of probiotic bacteria. In *Agricultural Science: Research and Reviews*; Bhumi Publishing: Kolhapur, India, 2013; Volume II, p. 20. ISBN 978-93-91768-12-6
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187-209. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705
- Santana, G.B. ; Quelemes, P.V. ; da Silva Neta, E.R. ; de Lima, S.G. ;Vale, G.C. Chemical Characterization and Effect of a Lactobacilli-Postbiotic on *Streptococcus mutans* Biofilm In Vitro. *Microorganisms* 2024, 12, 843.
- Moradi, M.; Mardani, K.; Tajik, H. Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus* spp. on *Listeria monocytogenes* in vitro and in food models. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 2019, 111, 457–464

## V:

- Vecchione, A.; Celandroni, F.; Mazzantini, D.; Senesi, S.; Lupetti, A.; Ghelardi, E. Compositional quality and potential gastrointestinal behavior of probiotic products commercialized in Italy. *Front. Med.* **2018**, 5, 59.

---

# **Annexe**

---

## ANNEXE N 01

### **1 : Identification biochimique de *L. rhamnosus***

#### **1. 2. Test de catalase :**

La catalase possède la capacité de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène, ce qui entraîne une action directe de l'enzyme dans la masse bactérienne, qui permet de survivre en présence d'O<sub>2</sub> et de la production de peroxyde d'hydrogène lors des phénomènes respiratoires. L'eau oxygénée est décomposée par ces enzymes en H<sub>2</sub>O, ce qui entraîne un dégagement d'oxygène selon la réaction :  $H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + \frac{1}{2} O_2$ . (Marchal et al .1982).

Nous avons réalisé le test selon les étapes suivantes :

Appliquer une goutte d'eau oxygénée sur une lame propre, en utilisant une pipette pasteur, pour émulsionner une quantité adéquate de culture bactérienne pendant 24 heures.

La réaction positive se traduit par formation de la bulle d'air. (Marchal et al .2001

#### **1.3. Test de l'oxydase :**

L'oxydase est un test basé sur la capacité d'une bactérie à synthétiser l'enzyme cytochrome C oxydase, qui participe à la chaîne de transport des électrons.

Pour réaliser ce test nous avons prélevé une petite quantité de culture bactérienne en utilisant une boucle de platine ou un coton-tige stérile. Sur un disque d'oxydase ou l'ajout de quelques gouttes de réactif d'oxydase sur la culture sur une lame en verre. Regardez la teinte du disque ou de la zone traitée pendant une période de 10 à 30 secondes. Analyse des conclusions  
Résultat favorable : La présence de cytochrome C oxydase est signalée par une couleur pourpre ou bleu foncé.

#### **1.4. Mannitol mobilité :**

La mobilité du mannitol est due à la formation de fructose lors de la dégradation du D-fructose. Cette dégradation entraîne la formation d'acides à chaîne courte (Marchal et Bourdon 1982). On a injecté une colonie bactérienne dans la gélose par piqûre centrale. S'il y a des stries au tour de la strie ensemencée, on peut dire que cette bactérie est en mouvement. }  
La transition du milieu de couleur de rouge à jaune.

#### **1.5. Test de citrate de Simmons :**

En microbiologie, le test de citrate de Simmons est une technique qui permet d'évaluer la capacité d'un microorganisme à utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Ce test s'avère très pratique pour distinguer les membres de la famille des Enterobacteriaceae, mais peut aussi être utilisé pour d'autres bactéries. (McFadden, J. F. (2000).

Analyse des résultats obtenus : En cas d'utilisation du citrate par le microorganisme, le milieu se colorera de bleu, ce qui témoigne d'une alcalinisation du milieu causée par la production de bicarbonate et de carbonate. Le milieu restera vert si le microorganisme ne peut pas utiliser le citrate.

### **1.6. Test de l'ONPG**

On utilise le test de l'ONPG (o-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside) pour évaluer la capacité d'une bactérie à hydrolyser l'ONPG, ce qui permet de détecter la présence de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase. (Leboffe, M. J., & Pierce, B. E. (2010).



Interprétation des résultats :

La couleur jaune indique que *Lactobacillus* est à l'origine de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase et peut hydrolyser l'ONPG. La couleur n'est pas modifiée : Cela signifie que *Lactobacillus* ne contient pas l'enzyme  $\beta$ -galactosidase ou que l'enzyme n'est pas active dans les conditions du test. (McFadden, J. F. (2000).

### **1.7. ODC**

Une enzyme appelée ornithine décarboxylase (ODC) libère le groupement carboxyle de l'acide aminé ornithine, ce qui entraîne la production de putrescine qui alcalinise l'environnement. (Joffin et Leyrol (2006) ; Dellarras (2007).

### **1.8. LDC**


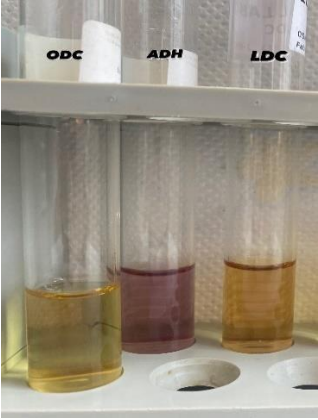
Une enzyme appelée lysine décarboxylase (LDC) libère le groupement carboxyle de l'acide aminé lysine, ce qui entraîne la production de cadavérisine qui alcalinise l'environnement. (Joffin et Leyrol (2006) ; Dellarras (2007).



## **2. Résultats de l'identification biochimique de *L. rhamnosus***

### **2.2 .oxydase, ONPG, Catalase**

TEST	Résultats
Oxydase	-
ONPG	-
Catalase	-

### **3.3. Mannitol, citrate de Simone, ODC, LDC, ADH**

Test	Avant	Après
<p>ODC - LDC ADH.</p>		

Test	Après	Avant
<p>Mannitol mobilité, citrate de Simone.</p>		

## ANNEXE N 02

### 2.1. Résultats d'Antibiogramme

Disque d'antibiotique	Zone diamètre (cm)	Interprétation
Spiromycine	3	S
Gentamicine	-	R
Tétracycline	4	S
Cefaclor	-	R
Aztreonam	-	R
Pénicilline	2	S
Chloramphénicol	3	S
TIC	1.5	S
Métronidazole	1	S
Colistine	-	R

**R (résistance), S (sensible).**

### ANNEXE N 03

Composition des milieux de culture utilisés :

#### MRS Bouillon

Ingrédients	Quantités
Peptone	10 g
fructose	20 g
Tween80	1 ml
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Phosphore diptossique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de tria Monique	2 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de manganèse	0,05 g

#### MRS Agar

Ingrédients	Quantités
Peptone	10 g
fructose	20 g
Tween80	1 ml
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	4 g
Phosphore diptossique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de tria Monique	2 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de manganèse	0,05 g
Gélose bactériologique	10 g

#### PBS

Ingrédients	Quantités
Nacl	8 g
Kcl	0,2 g
NA <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g

### **Bouillon hypersaccharose**

Ingrédients	Quantités
Tréptone	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g
Saccharose	5 g



## **Résumé**

L'objectif de cette étude est d'examiner certaines potentialités de *L. rhamnosus*, en étudiant des paramètres liés à leur potentiel probiotique et fonctionnel.

Les résultats obtenus montrent un comportement adaptatif de cette espèce dans des conditions extrêmes de pH, de sels biliaires et de salinité, ce qui approuve son exploitation en tant que probiotique. De plus, la capacité de cette espèce à produire des exopolysaccharides a été mise en évidence après optimisation de certaines conditions (milieu, inoculum, température, durée d'incubation). Cette espèce est capable de produire des quantités considérables en EPS (700 mg /L).

Par ailleurs, l'activité antioxydante a été démontrée par le test DPPH, les cellules probiotiques ainsi que les exopolysaccharides produits présentant un pouvoir antioxydant considérable. Cette souche peut donc présenter une source de substance naturelle et alternative aux antioxydants synthétiques.

### **Abstract:**

The objective of this study is to examine certain potentialities of *Lactobacillus rhamnosus* by studying parameters related to its probiotic and functional potential. The results obtained show an adaptive behavior of this species under extreme conditions of pH, bile salts, and salinity, which supports its use as a probiotic. Additionally, the ability of this species to produce exopolysaccharides was demonstrated after optimizing certain conditions (medium, inoculum, temperature, incubation duration). This species is capable of producing 700mg per liter. Furthermore, the antioxidant activity was demonstrated by the DPPH test, with both the probiotic cells and the exopolysaccharides produced showing considerable antioxidant power. Therefore, this strain may present a natural and alternative source to synthetic antioxidants.

