

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

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 des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

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

Filière : "Sciences Biologiques"

Spécialité: "Biologie Moléculaire et Cellulaire"

Présenté et soutenu publiquement par :

- BOUMEDIENE Bouaajaja
- BELGUENDOZ Fatima Zohra
- BEN BA Nabil

Thème

Evaluation de la production d'un métabolite bactérien
par *Lactococcus lactis* immobilisée

JURY :

- Président : ^{Mme} BOUBAKEUR.B
- Promoteur : ^{Mme} KHADEM. H
- Examineur : ^{Mr} ABBAS Mohamed Abdelhak

Grade

MCB
MAA
MCB

Année universitaire : 2017-2018

Remerciements

*Tout d'abord, Nous tenons à remercier Dieu le
tout puissant et miséricordieux, qui nous a
donné la force et la patience d'accomplir ce
Modeste travail.*

*Nous tenons à remercier notre encadreur Mme
KHADEM. H pour son précieux conseil et son
aide durant toute la période du travail.*

*Nos vifs remerciements vont également aux
membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à
notre recherche en acceptant d'examiner notre
travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Enfin, nous tenons également à remercier toutes
les personnes qui ont participé de près ou de loin
à la réalisation de ce travail.*

*Un grand merci à Mr TAIBI K pour ses conseils
précieux et ses encouragements durant les
années de formation ainsi que tous les
enseignants et les étudiants de notre promotion.*

Dédicace

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu vous garde dans son vaste paradis, à toi mon père. A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore. Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à tous mes sœurs et mes frères, mes nièces Amira, Nour Djihane et Hiba, Rahaf et mes neveux Imed et Radoiane.

Je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements. Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude, surtout Boumediene et Nabil.

Fatima Zohra

Dédicace

Avant tous, mes profonds remerciements vont à «ALLAH» qui m'a aidé et ma donnée le courage et la patience pour effectuer ce travail.

Je dédie ce modeste travail à

A mes très chers parents qui ont été toujours à mes côtés pour leur générosité et leurs sacrifices.

Merci beaucoup et je vous aime beaucoup

A mon frère Hadj et toutes mes sœurs Amel, Sondos, Fatima..

A mes collègues Fatima et Nabil

A tous mes amis(es) sans exception surtout : Mohamed , Fadhila ,Soraya.

A tous mes collègues d'études surtout de la promotion 2^{ème} année master biologie moléculaire et cellulaire (2017-2018).

Boumediene

Dédicace

El hamdelilah de m'avoir donné la patience et le courage a fin d'achever

Toutes ces années d'étude

Je dédie ce travail à ma chère grande –famille

A la mémoire de mon Père, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour,

l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu

pour vous.

A ma très chère mère que dieu la protège, merci maman pour tes sacrifices,

ton amour, ton soutien et tes prières.

A mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur

Soutien moral.

A mes chers frères, Ahmed, Abderrahmane, Abdelaziz, Abdelkrim,

Khaled, Farouk, Mes fidèles amis avec lesquelles j'ai passés les belles

Ma trinôme Fatima et Boumediene

années : ziani, Alfaiz, Ismail, Aslafi, Abdelhamid et tous les étudiants de

ma promotion

Nabil

Liste des abréviations

ATCC : American type culture collection

BAL : Bactérie d'acide lactique

CAZ30 : Ceftazidine 30ug

CL10 : Colistine 10ug

CM : Clindamycine 2ug

D.O : Densité optique

EPS : Exopolysaccharides

FAO : Food and Agriculture Organization

FOS : Fosfomycin

GM : Gentamicine

GRAS : Generally regarded as safe

MTZ5 : Métronidazole

NA30 : Acide nalidixique 30ug

OMS : Organisation mondiale de la santé

OX : Oxacilline 1mcg

PBS : Phosphate Buffer saline

pH : Potentiel d'hydrogène

S10 : Streptomycine 10ug

SB : Sels biliaires

TE30 : Tétracycline 30ug

Liste des figures

Figure N° 01 : Schéma du Protocole expérimental.....	6
Figure N° 02 : Pourcentage d'autoagrégation de <i>L. lactis</i> à l'état libre et sessile.....	12
Figure N° 03 : Affinité de <i>L. lactis</i> libre et immobilisée au xylène.....	13
Figure N° 04 : Croissance de <i>L. lactis</i> à différentes températures.....	14
Figure N° 05 : Résistance de <i>L. lactis</i> aux sels biliaries.....	15
Figure N° 06 : Tolérance aux bas PH après incubation.....	16
Figure N° 07 : Sensibilité de <i>L. lactis</i> aux antibiotiques.....	17
Figure N° 08 : Production finale en EPS par <i>L. lactis</i> immobilisée.....	19
Figure N° 09 : Courbe d'étalonnage des EPS.....	iv

Liste des tableaux

Tableau N°1: Liste des souches pathogènes	4
Tableau N°2 : Matériel, verrerie et produits chimiques utilisés	5
Tableau N°3 : Caractères morphologiques de <i>Lactococcus lactis</i>	11
Tableau N°3: Résultats des tests d'identification biochimique	11
Tableau N°5 : Activité antibactérienne de <i>L. lactis</i>	18

Liste des photos

Photos N°01 : Aspect macroscopique et microscopique (Gx100) de <i>L. lactis</i>	11
Photos N°02 : Biofilm de <i>L. lactis</i>	18

Sommaire

Liste des abréviations.....	I
Liste des figures	II
Liste des tableaux	III
Liste des photos.....	IV
Sommaire	V
Introduction générale	01

Partie expérimentale

Chapitre I: Matériel et méthodes

I.1. Objectifs du travail.....	4
I.2. Lieu et période de travail	4
I.3. Matériel	4
I.3.1. Matériel biologique	4
I.3.2. Matériel du laboratoire.....	5
I.4. Méthodes.....	6
I.4.1. Protocole expérimental	6
I.4.2. Vérification de la pureté de la souche « <i>Lactococcus lactis</i> »	7
I.4.2.1. Pré identification biochimique	7
I.4.3. Préparation des aliquotes / standardisation 0.5 Mac Farland	7
I.4.4. Mesure du pouvoir adhésif.....	8
I.4.5. Evaluation du potentiel probiotique.....	8
I.4.5.1. Croissance à différentes températures.....	8
I.4.5.2. Résistance aux sels biliaires.....	8
I.4.5.3. Tolérance aux bas pH	9
I.4.5.4. Antibiogramme	9
I.4.5.5. Activité antibactérienne	9
I.4.6. Evaluation du biofilm	9
I.4.7. Dosage des EPS	10

Chapitre II : Résultats et Discussion

II.1. Résultats de la vérification de la pureté de <i>L. lactis</i>	11
II.1.1. Etude morphologique	11
II.1.2. Etude biochimique	11

II.2. Résultat du test d'adhésion	12
II.3. Mesure de l'hydrophobicité.....	13
II.4. Résultats de l'évaluation du potentiel probiotique	14
II.4.1. Croissance à différentes températures	14
II.4.2. Résistance aux sels biliaires	15
II.4.3. Tolérance aux bas pH	16
II.4.4. Antibiogramme	17
II.4.5. Activité antibactérienne	18
II.5. Evaluation du biofilm	18
II.6. Résultats de l'optimisation des paramètres de production d'EPS	19
Conclusion.....	21
Références Bibliographiques	22
Annexes	
Résumé	

Introduction générale

Introduction générale

Depuis très longtemps, les bactéries lactiques (BALs) ont été utilisées grâce à leur impact important sur la culture, les traditions et le bien-être de l'homme. Par définition ces dernières sont un groupe de microorganismes ayant comme propriété commune la fermentation des glucides en acide lactique, elles sont Gram positif, dépourvues de catalase, anaérobies facultatives non sporulantes et très rarement pathogènes. Certaines sont dites homofermentaires car elles produisent majoritairement de l'acide lactique en anaérobiose alors que d'autres sont dites hétérofermentaires et produisent de l'acide lactique ainsi que d'autres acides organiques et d'autres composés (CO₂, acétate, éthanol...) (Axelsson, 2004).

C'est un groupe d'une grande diversité avec actuellement six familles et une quarantaine de genres dont les plus connus sont : *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium* et le genre *Bifidobacterium* (Stiles et al., 1997).

Elles sont généralement associées aux habitats riches en nutriments comme divers produits alimentaires (lait, viande, boisson, végétaux) mais d'autres sont aussi membres de la flore normale de la bouche et l'intestin (Casalta et al., 2008). Ces bactéries jouent un rôle clé dans la préservation des aliments fermentés ainsi que dans l'amélioration de leurs qualités sensorielles et technologiques (texture – arôme) par ailleurs leur implication dans les nouvelles applications (aliments probiotiques, préparations pharmaceutiques, vaccins) demande qu'elles soient résistantes (Franz et al., 2011).

Les effets santé des BALs sont reconnus depuis longtemps, d'ailleurs un grand nombre de ces bactéries est qualifié de probiotique. Selon la FAO et l'OMS (2001), les probiotiques sont : « des micro-organismes (bactéries ou levures) qui, ingérés vivants en quantités suffisantes, sont capables d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte ».

Introduction

Les effets bénéfiques des BALs et de leurs métabolites sont les suivants :

Les effets bénéfiques potentiels cités sont nombreux et variés. Certains sont maintenant bien établis tels que (**Sophie et Gérard, 2001**)

- ✓ L'amélioration de la digestion du lactose et le traitement des désordres diarrhéiques.
- ✓ La diminution du cholestérol sérique ou encore la réduction de la formation de tumeurs.
- ✓ Effets probiotiques.

Notre étude était faite sur une espèce lactique d'un grand usage industrielle « *Lactococcus lactis* » ; c'est une bactérie mésophile, homofermentaire appartenant à la famille des streptococaceae. Généralement trouvé dans le lait et les crèmes fermentées ainsi que dans le fromage (**Pot et al., 1996**). Elle se présente sous forme de coques isolées en paires ou en chainettes (**Singleton, 1984**).

Elle est la principale bactérie composant les starters utilisés dans l'industrie et l'artisanat laitiers pour l'élaboration d'une large gamme de produits (crèmes aigres, fromages à pâte molle, ...) et joue un rôle clé dans la préservation de la qualité de ces produits (**Smit et al., 2005**).

Dans le domaine médical cette espèce est utilisée pour la production de protéines hétérologues ou comme système de délivrance de molécules thérapeutiques dans le tractus gastro-intestinal (**Norton et al., 1995**).

L'application majeure des BALs, concerne l'industrie laitière où leur principale fonction consiste à produire de l'acide lactique à partir des sources de carbones disponibles (**Yadav et al., 2009**). En plus des acides organiques, ces bactéries produisent aussi des vitamines, bactériocines et des exopolysaccharides (EPS) ; responsables de la texture conférée aux aliments (**Schmidt et al., 1994**).

Ces derniers sont des polymères de haut poids moléculaire composés de glucides sous forme de chaînes polysaccharidiques contenant des unités répétitives des sucres simples (glucose, fructose et galactose) ou des dérivés des sucres. Les EPS peuvent être excrétées dans le milieu environnant, ou restés lié à la surface de la cellule sous forme de capsule et selon leur composition on peut les classer en homopolysaccharides et hétéro polysaccharides (**Poli et al., 2010**).

Généralement la production des EPS par les bactéries lactiques est souche dépendante; chez les mésophiles la production est meilleure dans des conditions de croissance sous optimales (température basse), tandis que les thermophiles

Introduction

produisent plus d'EPS dans des conditions optimales de croissance (**Leclerc et al., 1995**).

En plus de leur utilisation dans l'industrie alimentaire, cosmétologique et médicale, ces polymères sont aussi utilisés dans le domaine l'irrigation (**Hassan et al., 1996**).

L'inconvénient majeur des polysaccharides d'origine microbienne, en particulier ceux produits par les BALs est leur faible production ; les polymères d'origine naturelle ou synthétique sont souvent meilleur marché à produire. De ce fait les EPS des BALs doivent avoir d'autres avantages tel un bénéfice pour la santé du consommateur (**Hassan et al., 1996**).

Dans le présent travail on opte pour une stratégie alternative d'immobilisation pour améliorer le rendement en EPS de *Lactococcus lactis*

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et Méthodes

I.1. Objectifs du travail

Le but principal de la présente étude était l'amélioration de la production d'exopolysaccharides par l'application d'une technologie d'immobilisation alternative. Pour ce faire on a procédé comme suit:

- Evaluer la capacité d'agrégation de *L. lactis* immobilisée
- Evaluer qualitativement son biofilm
- Optimiser les paramètres de production de l'EPS produit

I.2. Lieu et période de travail

L'étude a été réalisée sur une période de deux mois allant du mois de Février au mois d'Avril au sein des laboratoires de :

- Microbiologie et de Biochimie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Université Ibn khaldoun de Tiaret ;
- Laboratoire de recherche « Amélioration et Valorisation des Productions Animales Locales » Université Ibn khaldoun de Tiaret.

I.3. Matériel

I.3.1. Matériel biologique

- ❖ **La souche lactique** « *L. lactis* » utilisée dans la présente étude a été isolée à partir du blé fermenté (Hamoum).
- ❖ **Les bactéries pathogènes** : Deux bactéries de référence ont été utilisées *E. coli* et *S. aureus* dont la description est résumée dans le tableau ci dessous.

Tableau N°01: Liste des souches pathogènes

Nom de la souche	N° ATCC	Gram	Famille
<i>Staphylococcus aureus</i>	25922	+	Micrococcaceae
<i>Escherichia coli</i>	25923	-	Enterococaceae

I.3.2. Matériel du laboratoire

Le matériel nécessaire utilisé dans notre étude est représenté dans le tableau suivant :

Tableau N°02 : Matériel, verrerie et produits chimiques utilisés

Appareillage	Verreries et autres
-Autoclave	-Anse de platine
-Agitateur (HEITO)	-Barreau magnétique
-Bain marie (HEIDOLPH)	-Béchers
-Balance (SARTORIUS) et (KERN)	-Burette
-Réfrigérateur	-Boites de Pétri
-Centrifugeuse	-Flacons en verre
-Etuve (MEMMERT)	-Lames et lamelles
-pH-mètre	-Micropipettes
-Plaque chauffante(IKA)	-Pipettes graduées
-Spectrophotomètre	- Pipettes Pasteur
-Vortex	-Tubes à essai
-Microscope optique (OPTIKA)	-Verre de montre
	-Ecouillons
Milieux de culture et d'identification	Autres produits
-Bouillon nutritif	-Xylène
-Gélose nutritive	-Ethanol/ phénol
-MRS (liquide/ solide)	-Acide sulfurique
-M ₁₇ (liquide/solide)	-Colorants de Gram
-Milieu hyper saccharose	-Eau physiologique stérile
-Mueller Hinton(MH)	
-Gélose citrate de Simmons	
-Milieu mannitol mobililé	
-Agar	

I.4. Méthodes

I.4.1. Protocole expérimental

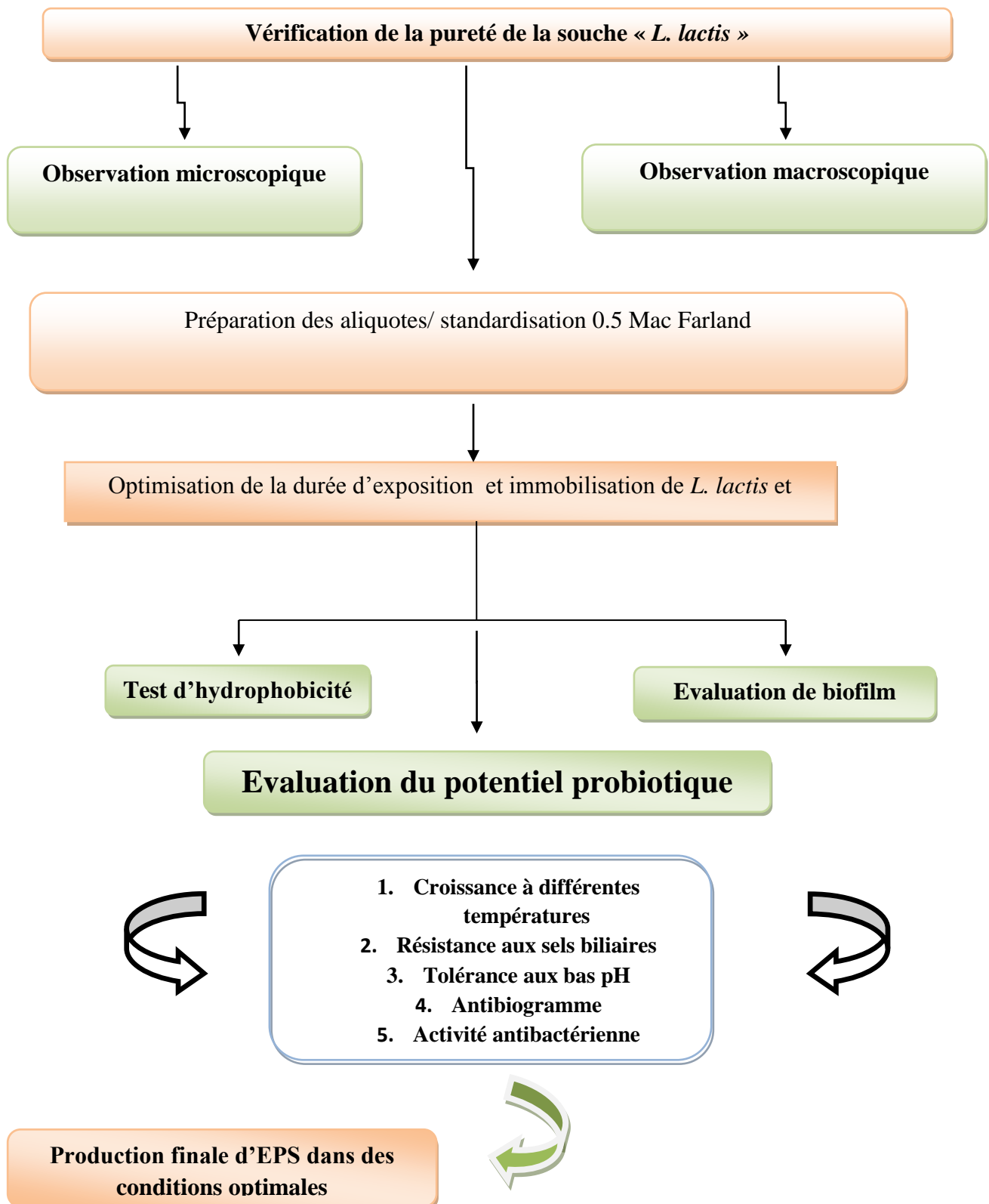


Figure N° 01: Schéma du Protocole expérimental

I.4.2. Vérification de la pureté de la souche « *Lactococcus lactis* »

La vérification de la pureté de la souche a été faite par un examen microscopique après coloration de GRAM et un examen macroscopique.

✓ Etude macroscopique

Cet examen permet de constater la morphologie des colonies obtenues sur milieu solide afin de déterminer la forme, la taille, la couleur et l'aspect des colonies la formation du trouble dans le milieu liquide (**Philippon, 2007**).

✓ Etude microscopique

L'observation microscopique permet de classer les bactéries selon leur type de Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 1996**). La double coloration de Gram permet de distinguer les bactéries Gram positif (colorés en violet et Gram négatif de couleur rose). La technique de coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par **Prescott et al (2003)** (**Annexe I**).

I.4.2.1. Pré identification biochimiques

L'identification des caractères biochimiques a été faite en quelques tests : test catalase, recherche d'oxydase, type fermentaire, test Mannitol mobilité, test Citrate de Simmons et le test ADH.

I.4.3. Préparation des aliquotes/ standardisation 0.5 Mac Farland

La préparation des aliquotes était faite en inoculant le M17 stérile par une colonie (prélevée d'une culture jeune), les cultures bactériennes ont été incubées par la suite puis conservées dans le réfrigérateur, avant chaque manipulation une standardisation des suspensions bactériennes à l'échelle 0.5 Mac Farland était faite.

I.4.4. Mesure du pouvoir adhésif

L'adhérence a été évaluée selon la méthode de **Kos et al (2003)**. L'étude de l'auto-agrégation consiste à faire décanter une charge bactérienne de l'ordre de **10⁷ germes/ml**. Après centrifugation les bactéries sont lavées deux fois à l'aide d'une solution tampon Phosphate Buffered Saline (PBS) et l'autoagrégation est déterminée après 5heures d'incubation à la température de laboratoire. Le pourcentage est calculé comme suit :

$$\% \text{ d'adhérence} = 1 - (A_t/A_0) \times 100$$

A_t= Absorbance après **5h**

A₀=Absorbance à **t=0**

I.4.5. Evaluation du potentiel probiotique

I.4.5.1. Croissance à différentes températures

Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries thermophiles (**Bottazi, 1988**). Les suspensions bactériennes ont été ajustées à 10⁸germes/ml, elles ont été incubées à des températures croissantes (15°C, 37°C, 45°C, 50°C) puis les DO ont été pris après 24h d'incubation.

La thèrmorésistance a été effectuée en incubant les cultures à 60°C pendant 90 minutes et à 65°C pendant 120 minutes, puis une lecture des DO a été faite à 578 nm.

I.4.5.2. Resistance aux sels biliaires

Ce test est réalisé en adoptant le protocole de **Hydrominus et al (2000)**.

Le milieu M17 liquide a été supplémenté par des quantités croissantes en sels biliaires (0.3g, 0.5g et 1g), puis le milieu a été inoculé par une suspension de *L. lactis* standardisée **10⁷ germes/ml**. La **DO** a été prise après 24 h d'incubation à 37°C et les résultats sont comparés à un tube contrôle (sans sels biliaires).

I.4.5 .3. Tolérance aux bas pH

La méthode adoptée pour étudier la tolérance aux bas pH est celle décrite par **Charteris et al (1998)** avec certaines modifications. La culture de 18h a été centrifugée à 6000g /20 min/ 5 C°, le culot est ensuite récupéré après lavage par une solution de **K₂HPO₄**, puis 1 ml de suspension est ajouté à une solution similaire au suc gastrique à pH 2 et 3. Les **DO** sont prise après 3 h d'incubation à 37°C et sont comparées à un tube contrôle.

I.4.5.4 .Antibiogramme

La résistance aux antibiotiques a été évaluée par la méthode de diffusion en disques selon **Charteris et al (1998)**. 0.5 ml de l'inoculum de *L. lactis* (10⁶ germes/ml) est étalé sur la surface d'une gélose Mueller –Hinton. Après séchage de la boîte Pétri pendant 15 min; des disques d'antibiotiques ont été déposés et les diamètres de la zone d'inhibition ont été ensuite calculés après 24 h d'incubation (**Joffin et Leyral, 2009**).

I.4.5 .5.Activité anti bactérienne

L'activité antibactérienne décrite par **Hechard et al (1990)** a été adoptée. Des disques vierges ont été imbibés par un volume de suspension bactérienne de *L. lactis* (10⁸germes/ml); ils ont été déposés sur une gélose de Mueller Hintonensemencée par une suspension pathogène (*Staphylococcus aureus*- *E. coli*), les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 h et les diamètres d'inhibition ont été calculés (**Pulusani et al., 1979**).

I.4.6. Evaluation du biofilm

Le biofilm a été évalué qualitativement après culture sur microplaque, les puits ont été rincés et colorés (colorant basique) puis incubés par la suite, la microplaque a été ensuite lavée par de l'eau distillée stérile. La propension des bactéries à s'organiser en biofilm est proportionnelle à la coloration au niveau des puits (**Boubakeur et al., 2016**).

I.4.7. Dosage des EPS

Le dosage des EPS a été réalisé après une étape d'extraction et purification décrite par **Ricciro et al (2002)** et leur quantification était faite selon la méthode de **Dubois (1956)** comme suit :

- Ajouter à 1 ml de solution d'EPS, 1 ml de phénol et 5 ml d'acide sulfurique.
- Agiter par vortex.
- Lire la densité optique à 490 nm.

Chapitre II

Résultats et Discussion

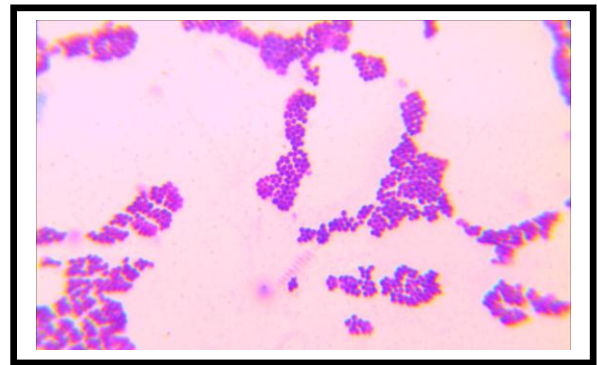
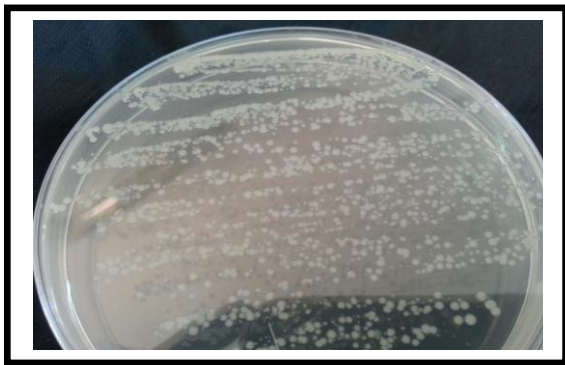
II.1. Résultats de la vérification de la pureté de *L.lactis*

II.1.1. Etude morphologique

L’aspect macroscopique et microscopique de la souche étudiée est résumé dans le tableau N° 03 et la photo N° 01.

Tableau N°03 : Caractères morphologiques de *Lactococcus lactis*

Souche	<i>Lactococcus lactis</i>
Aspect macroscopique	Colonies rondes, lisses, de couleur crémeuse.
Aspect microscopique	Cellules colorées en violet (Gram+) sous forme de coques, regroupées en chaînes.



Photos N°01:Aspect macroscopique et microscopique(Gx100) de *Lactococcus lactis*

II.1.2. Etude biochimique

Les résultats de l’identification biochimique sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau N°04: Résultats des tests d’identification biochimique

Tests	Résultats
Catalase	-
Citrate de Simmons	-
Mannitol mobilité	-
Type fermentaire	Homofermentaire
ADH	-

II.2. Résultat du test d'adhésion

Sur la **figure N° 03** sont montrés les résultats du test d'agrégation de *L. lactis* à l'état libre et sessile. Nous remarquons que l'immobilisation affectait positivement l'adhésion après 5h de décantation qui s'est améliorée de 50 à 68%.

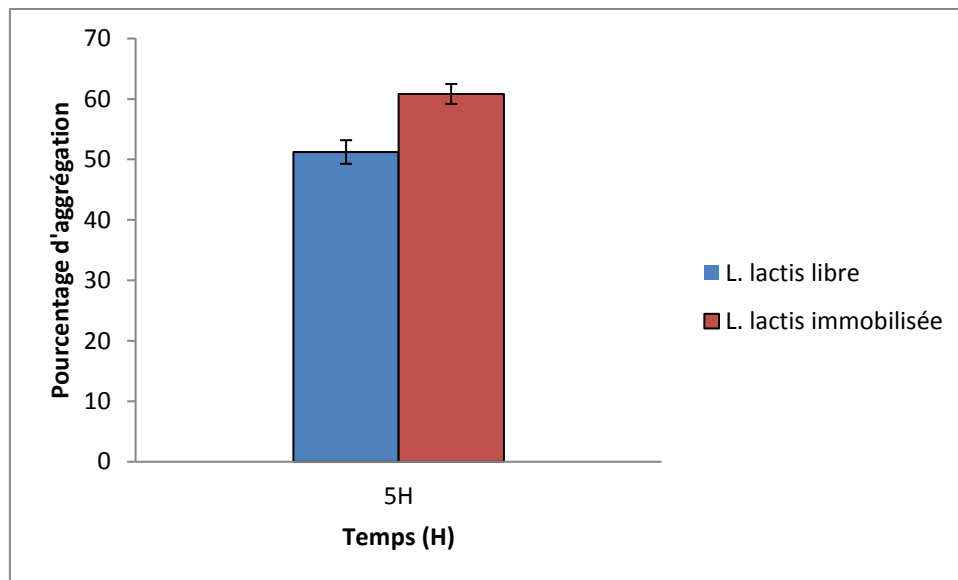


Figure N° 02: Pourcentage d'autoagrégation de *L. lactis* à l'état libre et sessile

Ce résultat est en accord avec celui de Kos et ses collaborateurs qui montraient que l'adhérence de certaines souches lactiques comme *Lactobacillus acidophilus M92* pouvait atteindre les **80%**.

Selon **Kos et al (2003)** l'adhérence pourrait être liée à la présence de certaines composantes de la surface cellulaire qu'on suggère d'être plus apparentes et efficaces après traitement mécanique ; ainsi cette propriété peut être perdue après traitement enzymatique.

II.3. Mesure de l'hydrophobicité

Les résultats de l'affinité au xylène de *L. lactis* à l'état libre et immobilisé sont indiqués dans la figure N° 04. *L. lactis* libre présente une forte adhérence au xylène avec un pourcentage supérieur à 68% ce qui est différent de celui des cellules immobilisées (72%).

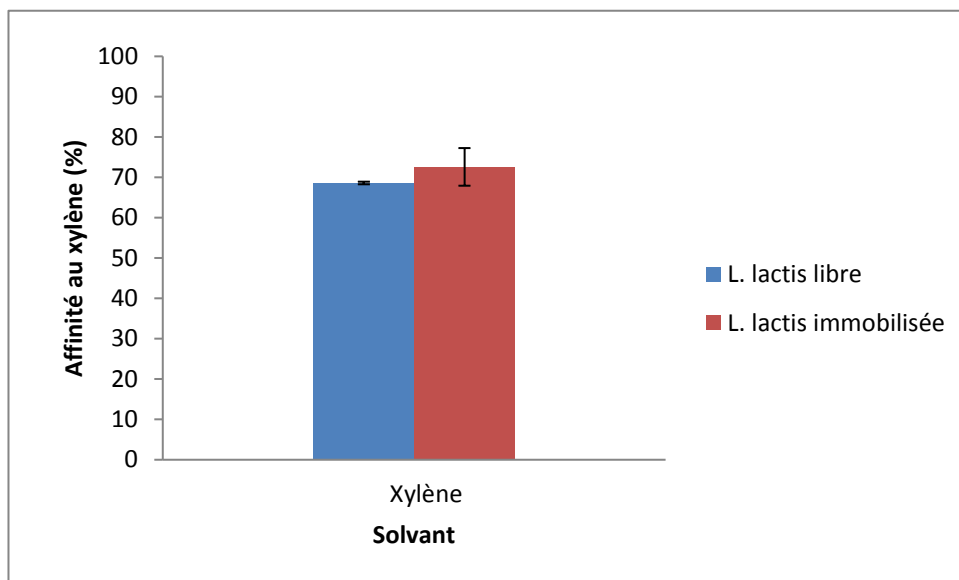


Figure N° 03: Affinité de *L. lactis* libre et immobilisée au xylène

Contrairement à nos résultats, **Yerlikaya et Akpinar (2015)** ont trouvé que l'affinité de *L. lactis* L21 au n-héxadécane était de 31% et que cette affinité est souche dépendante. En effet **Kos et al (2003)** ont montré que *L. acidophilus* présentait une paroi hydrophobe contrairement *L. plantarum* LA et *E. faecium*.

Selon **Donlan (2002)**, la nature hydrophobe de la paroi est du à la présence du matériel glycoprotéique tandis que la nature hydrophile des parois est liée à la présence des polysaccharides.

II.4. Résultats de l'évaluation du potentiel probiotique

II.4.1. Croissance à différentes températures

Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des thermophiles. Selon la figure N°05, le meilleur taux de croissance (9 log10) était enregistré à 37 °C tandis qu'il a diminué significativement à 15°C, 40°C et 50°C

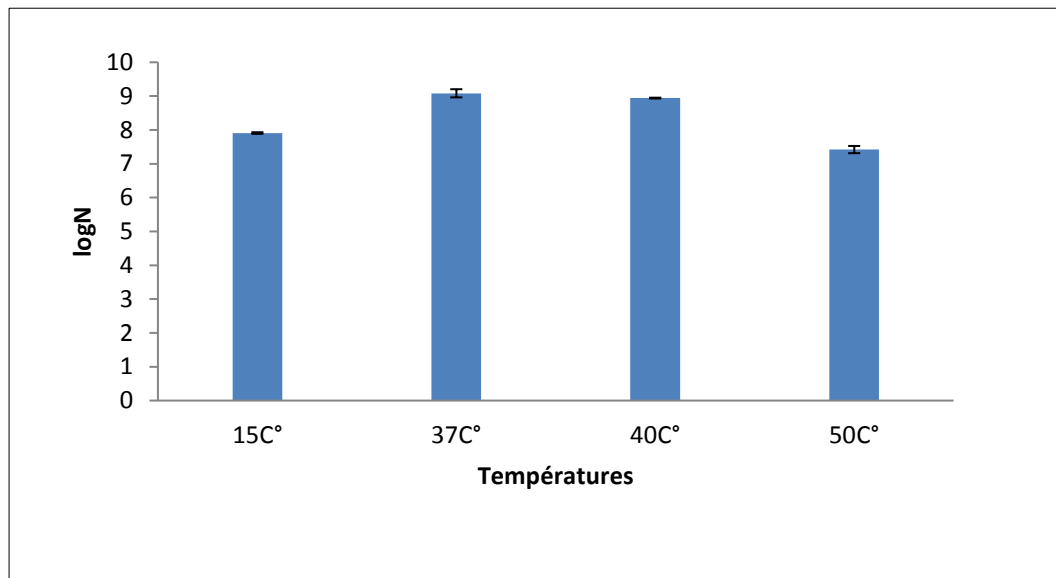


Figure N° 04 : Croissance de *L. lactis* à différentes températures

Selon Hassaine (2013), la plupart des souches lactiques poussent entre 15 C° et 37C° ; d'autres peuvent supporter des températures plus élevées telle que *Streptococcus thermophilus* (42°C). Tsvetkov et Shishkova (1982), ont constaté lors de leur étude concernant la résistance des cultures starters au froid, que les caractéristiques morphologiques et les propriétés biochimiques de toutes les souches étudiées ont été préservées. Ainsi Beal et al (2001) ont constaté que la résistance de *S. thermophilus* au froid est étroitement liée à la composition membranaire en acides gras. Van et al (2002), ont montré que les BALs peuvent développer des mécanismes de défense contre le stress ce qui leur permettent de résister à des conditions difficiles comme le choc thermique ou pH acide ; ils ont attribué cette adaptation et résistance à plusieurs gènes qui varient considérablement d'une espèce à l'autre.

II.4.2. Résistance aux sels biliaries

Les résultats de test de croissance à différentes concentrations en sels biliaries sont résumés sur la figure qui suit. Nous remarquons que la souche avait une bonne viabilité à toutes les concentrations (0.3, 0.5, 1g), ainsi la souche a pu tolérer 1g de SB.

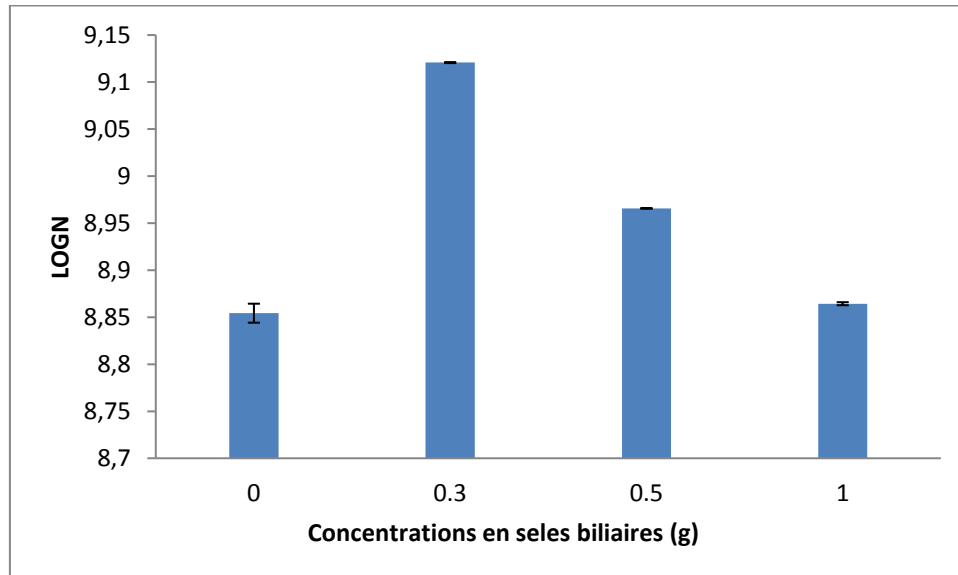


Figure N° 05 : Résistance de *L. lactis* aux sels biliaries

Notre résultat est comparable à celui de **Yerlikaya et Akpinar (2015)** qui montraient que *L. lactis* présentait une meilleure résistance aux sels biliaries parmi plusieurs souches lactiques, ainsi **Sanders et al (1996)** ont montré que les lactobacilles peuvent se développer à 0,3% en SB ; cette tolérance est liée à la l'assimilation de ces derniers grâce à l'action des hydrolases des sels biliaries (BSH) (**Roy et al., 2005**).

II.4.3. Tolérance aux bas pH

Selon la **figure N° 07** nous remarquons que la souche a pu tolérer le pH acide, ainsi le nombre de germe était de 7 log₁₀ à pH 2 et 3 respectivement.

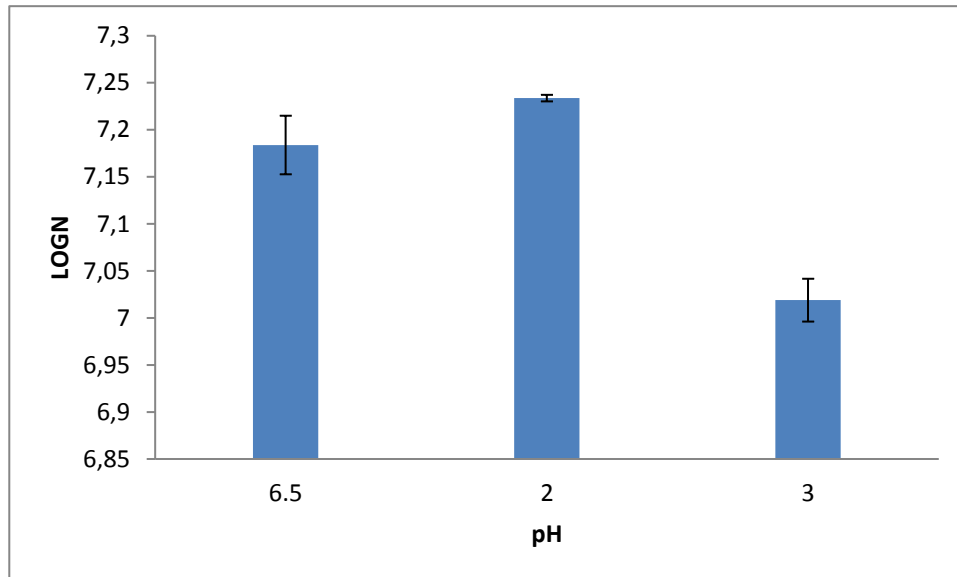


Figure N° 06 : Tolérance aux bas pH après 'incubation

Ce résultat est en accord avec celui de **Olejnik et al (2005)**, qui ont noté que certaines souches bactériennes appartenant au genre *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ont pu survivre à pH 2 après 3 d'incubation.

Selon **Boke et al (2010)**, la résistance de certaines souches lactiques aux conditions de stress (pH acide) peut être expliquée par le fait que ces bactéries sont productrices d'EPS, et que ces polymères pouvaient jouer un rôle protecteur.

II.4.4. Antibiogramme

Les résultats de l'antibiogramme sont mentionnés dans la **figure N°08**. Nous remarquons que la souche réagit différemment aux antibiotiques, elle présente une résistance importante aux **TE₃₀** et **CL₁₀**, alors qu'elle présente une sensibilité totale à **CM** et **MTZ₅**.

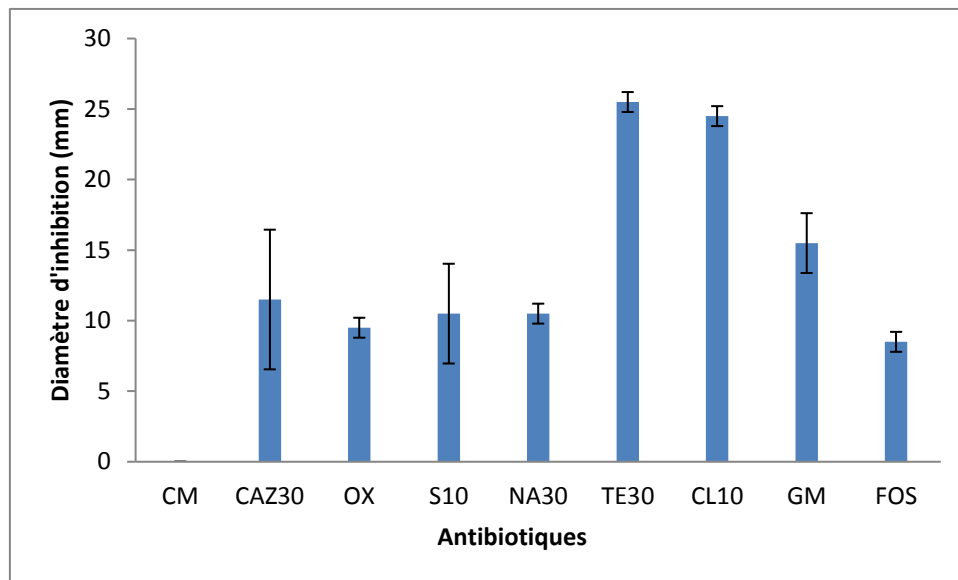


Figure N° 07 : Sensibilité de *L. lactis* aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure physiologique. Les travaux de **Temmerman et al (2003)**. Ont montré que 68.4% des bactéries lactique ont une résistance à un antibiotique ou plus, Les souches lactiques présentant un diamètre de zone d'inhibition supérieur à 15 mm sont considérées comme résistantes.

II.4.5 Activité antibactérienne

Les résultats représentés sur le **tableau N°05** montrent que *L. lactis* présente une faible activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et *E. coli* (Diamètre < 30) (Schillinger et Lucke, 1989)

Tableau N°05 : Activité antibactérienne de *L. lactis*

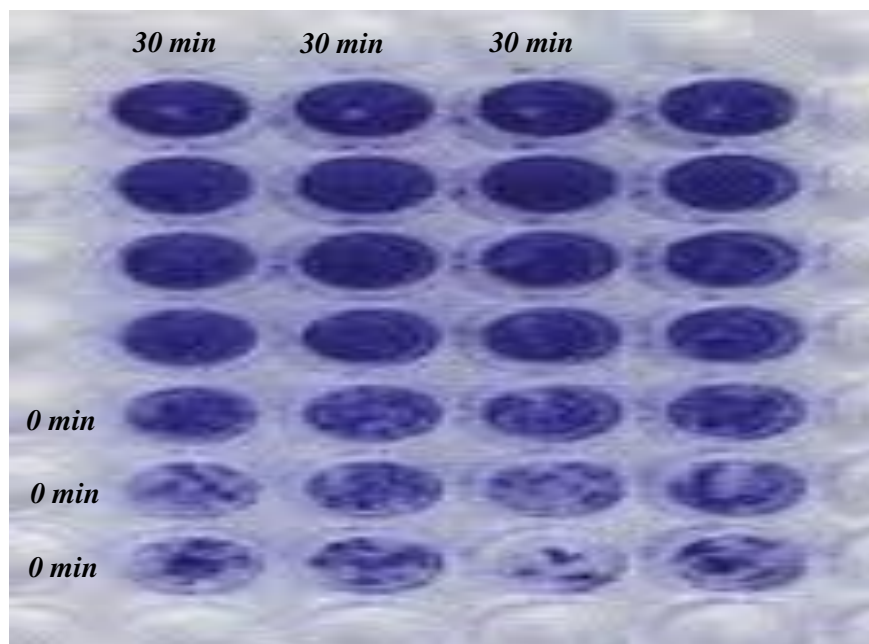
Souches bactériennes	Diamètre d'inhibition	Ecart type
<i>S. aureus</i>	9.5	±2.12
<i>E. coli</i>	7.5	±0.7

Selon **Barefoot (1983)**, *L. lactis* présente une faible activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* et *E. coli*, en comparaison à d'autres souches (**BLh5, BLh10 et BLh2**). L'activité est importante lorsque le diamètre d'inhibition est entre 8 à 12 mm.

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques est due selon certains auteurs à la sécrétion de molécules bioactives tels que les bactériocines, les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène (**Allouche et al., 2010**).

II.5. Evaluation du biofilm

Le biofilm de *L. lactis* a été mesuré qualitativement après coloration, nous remarquons que la coloration est plus intense lors d'une inoculation par des cellules immobilisées et est proportionnelle à la charge microbienne attachée dans les puits (**voir la photo N 02**).



Photos N° 02 : Evaluation qualitative du biofilm

II.6. Résultats de l'optimisation des paramètres de production d'EPS

La production d'EPS par les bactéries lactiques varie énormément et dépend de la souche productrice et des conditions de culture (Bergmaier, 2002), sur la figure N°09 sont montrés les paramètres optimaux du milieu de production, inoculum, température et pH. Selon cette figure nous remarquons que l'optimisation des paramètres de production affectait positivement le rendement, la production finale est meilleure dans un milieu hypersaccharosé à pH 3,5, avec un inoculum de 10^8 germes/ml et à 37°C.

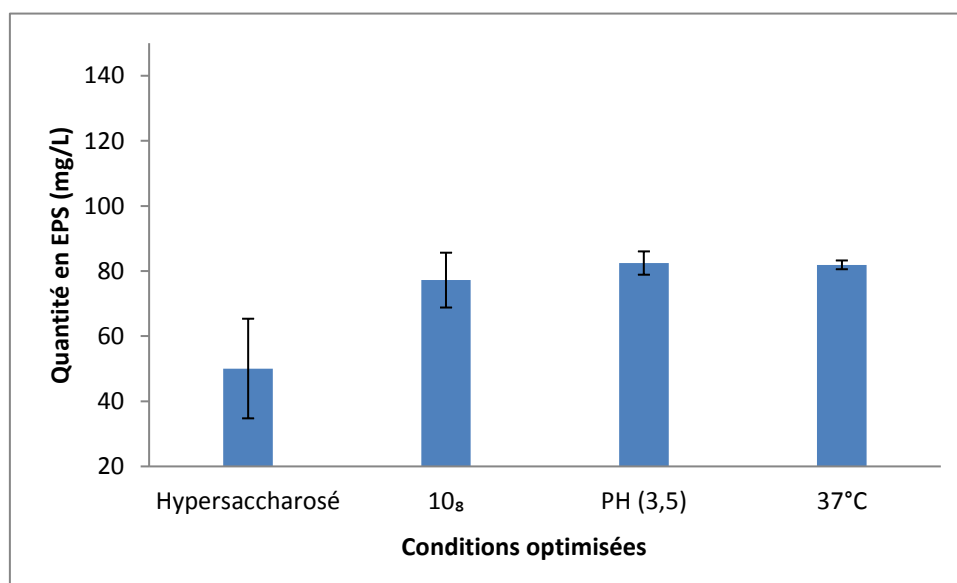


Figure N° 08 : Production finale en EPS par *L. lactis* immobilisée

Les EPS des BALs sont d'une grande importance industrielle, grâce à leur caractère épaississant et gélifiant, ces substances peuvent être utilisées comme une alternative aux substances synthétiques. La production d'EPS par les bactéries lactiques est variable et faible même lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions optimales, la plupart produisent moins de 3g/L d'EPS. Le rendement en EPS de *L. lactis* subsp. *cremosis* varie de 80 à 600 mg/L (Cerning, 1992).

Nous remarquons que la production d'EPS dans des conditions optimales par *L. lactis* immobilisée s'est augmentée de 22 mg/L EqG à 82 mg/L EqG. La technologie d'immobilisation est de plus en plus appliquée dont le but d'améliorer la production des métabolites bactériens (acide lactique, vitamines...), la documentation concernant l'effet de l'action mécanique sur l'amélioration des

processus de fermentation et de production de métabolites est minimes, de ce fait nous n'avons pas pu discuter les mécanismes permettant d'améliorer la production d'ESP.

Conclusion

Conclusion

Grace à leurs vertus thérapeutiques, les exopolysaccharides des bactéries lactiques ont suscité l'attention de plusieurs recherches non seulement pour les produire à grande échelle mais aussi pour améliorer leur rendement à travers l'adoption de nouvelles technologies.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail dont le but principal est d'augmenter le rendement en EPS en appliquant une stratégie d'immobilisation.

Le choix de la souche bactérienne était basé sur : d'une part l'importance technologique qu'elle occupe surtout en industrie fromagère et d'autre part sur le fait que peu de travaux existe concernant l'évaluation des propriétés physiologiques et métaboliques de *L. lactis* à l'état sessile.

A l'instar des résultats, nous pouvons dire :

- ✚ La souche est d'un potentiel probiotique ; sa capacité d'adhérence est importante (72%), son pouvoir antibactérien est notable contre deux pathogènes fréquemment présents lors des infections, sa résistance en milieu acide et aux sels biliaires lui confère une protection 'taux de viabilité' lors de leur passage à travers le tractus gastro-intestinal.
- ✚ L'immobilisation appliquée par l'effet de l'action mécanique présenté un effet positif sur tous les paramètres étudiés ; la viabilité était maintenu même pendant des durée prolongées, les propriétés physicochimique de la paroi n'ont été modifié et la souche présentait toujours une affinité vis-à-vis le solvant hydrophobe (xylène), le pourcentage d'agrégation, le biofilm ainsi que le rendement en EPS ont été positivement affecté (82% contre 22%) respectivement.
- ✚ L'application de cette technologie d'immobilisation pourrait être une alternative aux techniques classique

Perspectives

- ✓ Mesure quantitative du biofilm formé
- ✓ Caractérisation de l'EPS produit
- ✓ Comprendre les mécanismes cellulaire et moléculaire impliqués lors de l'immobilisation

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- **Allouche, F.N., Hellal, A., et L'araba A. (2010)** Etude de l'activité antimicrobienne des Souches de *Lactobacillus thermophiles* utilisées dans l'industrie laitière. *Revue Nature et Technologie*, 30, 13-20.
- **Axelsson, L. (2004)** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., Wright, A.T and Ouwehand, A. 3rd Eds. *Lactic Acid Bacteria : Microbiological and Functional Aspects*. Marcel Dekker, Inc. 20-89.
- **Barefoot, S.F.et Klaenhammer, T.R. (1983)** Detection and activity of Lactic in B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. -*Appl. Environ. Microbial*, 45(6), 1808-1815.
- **Beal, C., Fonseca, F.et corrieu G. (2001)** Resistance to Freezing and Frozen Storage of *Streptococcus thermophilus* is Related to Membrane Fatty Acid Composition, 84, pp.2347–2356.
- **Bergmaier, D., Lacroix, C.et Champagne C.P. (2002)** Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-959M.J *Biotechnol* soumis pour publication.
- **Boke et al., (2010)** The role of resistance to bile salts and acid tolerance of Exopolysaccharide (esp) produced by yogurt starter bacteria, 62 (2), pp323-328.
- **Boubakeur, B., Tirtouil, A., Khadem, H., Meddah, B.et 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.
- **Boutazi, V.(1988)** An Introduction to rod shaped lactic acid bacteria, *Biochimie* .70, 25-88.

Références bibliographiques

- **Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. et Smith F. (1956)** Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28 (3) 350-35.
- **Casalta, E. et Montel, M.C. (2008)** "Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus." *Int J Food Microbial*, 126 (3), 271-273.
- **Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. et Desmazeaud M. (1992)** Isolation and characterization of Exopolysaccharide des from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J Dairy Sei* 75, 692-699.
- **Charteris, W.P., O'Neill, E.T. et Kelly P.M. (1994)** An in vitro method to determine human gastric transit tolerance among potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Irish Journal of Agricultural Food Research* 33(2), 203.
- **Donlan, R.M. (2002)** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 881–890.
- **FAO/WHO. (2001)** Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation.
- **Franz, C.M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. et Gálvez A. (2011)** Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbial*. 151 125–140.
- **Hassan, A.N., Frank, J.F., Schmidt, K.A. et Shalabi S.I. (1996)** Textural properties of yogurt made with encapsulated non-ropy lactic cultures. *J Dairy Sci*, 79:2089.
- **Hechard, Y., Dherbomez, M., Cenatiempo, Y. et Letellier F. (1990)** Antagonism of lactic acid bacteria from goats' milk against pathogenic strains assessed by the 'sandwich method.' *Lett. Appl. Microbiol.* 11, 185–188.

Références bibliographiques

- **Hydrominus, B., Marecc, P., Hadj Sassi, A. et Deschamps A. (2000)** Acid and bile tolerance of spore forming lactic acid bacteria. *Int.J.Food Microbial.*61:193-197.
- **Jean-Noël, J. et Guy, L. (2009)** Microbiologie technique. Espagne : 4^{ème} éd. pp.30-57.
- **Joffin, J.N., Leyral, G. (2006)** Microbiologie technique. 4^{ème} éd. Espagne : CRDP D'aquitaines, Bordeaux, 363pp.
- **Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simprag, M., Frece, J. et Matosic S. (2003)** Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology.*94:981-987.
- **Leclerc, H.J., Gaillard, L. et Simonet M. (1995)** Morphologie-Structure dans Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. p 58-59. Doin Editeur-Paris.
- **Norton, P., Page, R. et Wells J. (1995)** Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiologica* 40: 225-230.
- **Olejnik, A., Lewandowska, M., Obarska, M., Grajek W. (2005)** Tolerance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains to low pH, bile salts and digestive enzymes. *EJPAU* 8, 25–32.
- **Philippon, A. (2007)** Cours de bactériologie médicale. Faculté de médecine Cochin-Port-Royal, France, 150-155pp.
- **Poli. et al., (2010)** Annarita Poli, Gianluca Anzelmo and Barbara Nicolaus, 2010 Bacterial Exopolysaccharide from Extreme Marine Habitats: Production, Characterization and biological Activities.

Références bibliographiques

- **Pot, B., Devriese, L.A., Ursi, D., Vandamme, P., Haesebrouck, F. et Kersters K. (1996)** Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst. Appl. Microbiol.*; 19:213-222.
- **Prescott, L., Harley, J. et Klein D. (2003)** Microbiologie, 2^{ème} Ed. De Boeck, France, 27-28pp.
- **Pulusani, S.R., Rao, D.R. et Sunki G.R. (1979)** Antimicrobial activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compound(s) produced by *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.*, **44**, 575–578.
- **Riccio, H., Jhonsen, G. et Herikstad H. (2002)** Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy production. *Int J food microbiol.*; 67:147-152.
- **Roy, D. (2005)** Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products le lait 85(1-2),39-56.
- **Sanders, M.E., Walker, D.C., Walker, K.M., Aoyama, K. et Klaenhammer, T.R. (1996)** Performance of commercial cultures in fluid milk applications. *J. Dairy Sci.*, 79(6): 943-955.
- **Schillinger, U. et Luke, F.K. (1989)** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1901-1906.
- **Schmidt, A. et al. (1994)** Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, TAT1 and TAT2, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan up take. *Mol Cell Biol* 14(10):6597-606.
- **Singleton, P. (1984)** Abrégés de bactériologie. Ed. Masson, paris. P353-364.
- **Smits, H.H., Engering, A., Van Der Kleij D. et al. (2005)** Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell

Références bibliographiques

- function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J. Allergy Clin. Immun.* 115: 1260-1267.
- **Sophie, D.et Gérard, C. (2001).** effet des bactérie lactique ingérées avec des laits fermentés sur la santé
 - **Stiles, M.E., Holzapfel W.H. (1997)** "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." *Int J Food Microbial.*, 36 (1), 1-29.
 - **Temmerman, R., Pot, B., Huys, G.et Swings J. (2003)** Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbial.* 81: 1-10.
 - **Tsvetkov, Shishkova. (1982)** Studies on the Effects of Low Temperatures on Lactic Acid Bacteria,19,pp.211-214 .
 - **Van, G.M., Ehrich, S.D.et Maguin E. (2002)** production of grothe-inhibiting factors by lactobacillus delbrueckii.J Appl.Microbiol.91:147-153
 - **YADAV, K., BHARDWAJ, A., KAUR, G., IYER, R.et MALIK R.K. (2009).** Potential of *Lactococcus lactis* as a probiotic and functional lactic acid bacteria in dairy industry. *Inter. J. Probiotics*, 4: 219-228.
 - **Yerlikaya, O., Acu, M., Akpinar, A.et Kinik Ö. (2015)**"A study on the determination of bile salt de conjugation, bile salt resistance and hydrophobic properties of some lactic acid bacteria", *AGRO FOOD INDUSTRY HI-TECH*, vol.26, pp.46-49.

Annexes

Annexes

Annexe I : Coloration de Gram

Protocole des différentes étapes de la coloration de Gram

Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;

- Prélever une colonie et mélanger avec la goutte d'eau, fixer puis sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- Couvrir le frottis par le cristal violet pendant 60 sec
- Jeter l'excès du colorant et rincer par de l'eau distillée
- Couvrir par le lugol pendant 30 sec
- Décolorer la lame immédiatement par l'ajout de l'alcool (30s) puis l'incliner jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- Laver à l'eau distillée
- Couvrir avec de la fuschine pendant 60 sec
- Laver à l'eau distillée
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Annexes

Annexe II : Préparation des milieux de culture

❖ Milieu MRS (g/l)

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	10 g
Extrait de Levure	5 g
Glucose	20 g
Phosphate di potassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Tween 80	1 g
Citrate d'ammonium.....	2 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de manganèse.....	0,1 g
Agar	15 g

pH 5,7 ± 0,1. Stérilisation à 120°C

❖ MRS Gélose

Il s'agit du milieu précédent gélosé à 1.5 .Autoclavage à 120C° pendant 15 min

pH= 6.5 Autoclavage à 120C° pendant 15 min

❖ PBS

Composition du PBS (phosphate Buffer saline)

Chlorure de sodium.....	8g
Chlorure de potassium.....	0.2g
Phosphate di sodique	1.15g
Phosphate mono potassique	0.2g

1L d'eau distillé / pH = 6.5 Autoclavage à 120C° pendant 15 min

❖ Gélose Muller - Hinton (g /l)

Infusion de viande de bœuf	300 ml
Peptone de caséine.....	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar.....	17 g

pH = 7,4

Annexes

❖ Milieu M17

Peptone papainique de soja.....	5g
Peptone trypsique de caséine.....	2,5g
Peptone pepsique de viande.....	2,5g
Extrait de levure.....	2.5g
Extrait de viande.....	5g
Glycérophosphate de sodium.....	19g
Sulfate de magnésium.....	0.25g
Acide ascorbique.....	0.5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	950ml

pH=7,1 ± 0.2 50 ml de lactose à 10 % sont ajoutés après autoclavage à 120°C pendant 20min

❖ Milieu M17 Gélose

- ❖ Il s'agit du milieu précédent gélosé à 15 .Autoclavage à 120C° pendant 15 min
pH= 6.5 Autoclavage à 120C° pendant 15 min

Annexe III : Courbe d'étalonnage

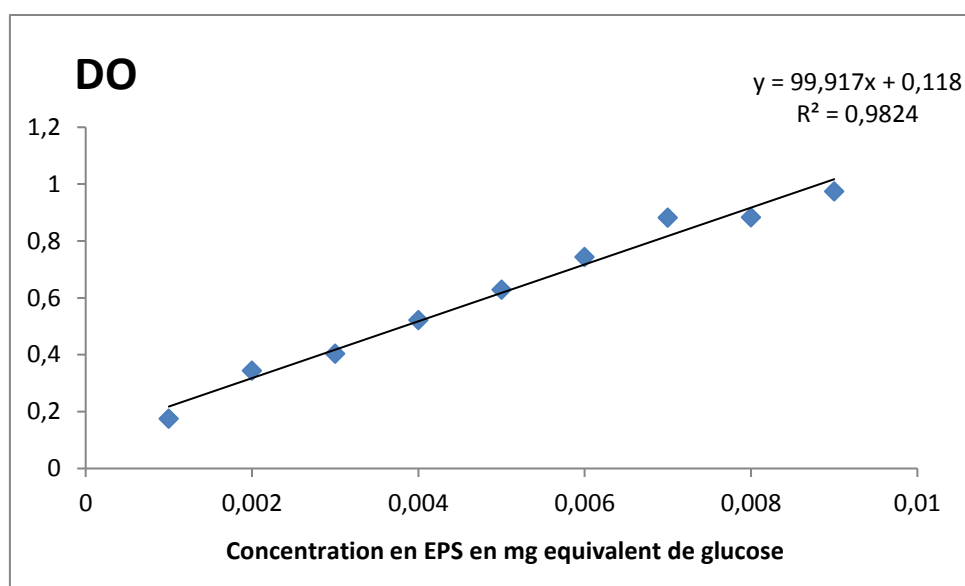


Figure N° 09 : Courbe d'étalonnage des EPS

RESUME

L'utilisation des bactéries lactiques et de leurs métabolites dans la formulation des aliments et d'autres produits est très réponde ; cependant pour être plus efficaces ces dernières doivent posséder certaine résistance aux traitements technologiques généralement appliqués dans le but d'améliorer leur durée de vie ; les processus de fermentation et de production. L'objectif de la présente étude était d'améliorer la production d'un métabolite bactérien connu par ses vertus santé « les exopolysaccharides » à travers l'application d'une des stratégies innovantes « l'immobilisation ». Les résultats obtenus montrent une tolérance de la souche lactique étudiée vis-à-vis l'action mécanique même pendant des durées prolongées. D'autre part l'immobilisation a affectait positivement plusieurs propriétés physiologiques et métaboliques de *L. lactis* ; ainsi la capacité d'adhérence a été considérablement améliorée (68,61 à 72,6%) ; le rendement en EPS s'est aussi augmenté (22 à 82). L'immobilisation a prouvé son efficacité lorsque la durée d'exposition est contrôlée.

Mot clés

Lactococcus lactis-Exopolysaccharides-immobilisation-biofilm.

تعد بكتيريا حمض اللبن والجزيئات المنتجة لها من أهم مكونات الأغذية ولكي تكون ذات فعالية أكبر يجب أن تتصف هذه الأخيرة بمقاومة أكبر لمختلف العلاجات التكنولوجية المطبقة من أجل تحسين عمر البكتيريا وكذا عملية التخمر والإنتاج.

الهدف من هذه الدراسة هو تحسين إنتاج المادة الأيضية لدى إحدى بكتيريا حمض اللبن والمعروفة بمزاياها الصحية متعدد السكريات وذلك من خلال تطبيق إستراتيجية حديثة لتثبيت البكتيريا. أثبتت النتائج المتحصل عليها مدى قدرة هذه السلالة البكتيرية المثبتة على التأقلم في وسط غير ملائم من جهة أخرى، أثبتت عملية التثبيت نجاحها من خلال تحسين بعض الخصائص الأيضية والفيزيولوجية للسلالة فقد تحسنت نسبة الالتصاق من (68 % إلى 72 %) لدى السلالة المثبتة , كما ان منتج متعدد السكريات ازداد من (22 % إلى 82 %) و لذلك يمكن القول إن الطريقة المنتهجة لتثبيت تعد فعالة .

الكلمات المفتاحية : تثبيت - *L. Lactis* - متعدد السكريات - بكتيريا حمض اللبن