

# الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun–Tiaret

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département des sciences de la nature et de la vie



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 : Biologie moléculaire et cellulaire

Présenté par :

BENASLA Menaoura

SELLAI Asmaa

Thème

**Investigation de la capacité de formation de biofilm et  
caractérisation membranaire des bactéries lactiques d'intérêt  
technologique**

Soutenu publiquement le 03/07/2019

Jury:

Grade

Président :<sup>Mlle</sup> MEDJEBER. N

MCB

Encadrante :<sup>Mlle</sup> BOUBAKEUR. B

MCB

Co Encadrante :<sup>Mme</sup> KHADEM. H

MAA

Examineur : Mlle AIT ABDERRAHIM. L

MCB

Année universitaire :2018/2019

## **Remerciements**

الشكر يقدم لله عز وجلّ

*Tout d'abord, grace à DIEU, le tout puissant, le miséricordieux, pour la force, le courage, la volonté, la santé qu'il nous a donnée pour la réalisation de ce travail.*

*A l'issue de la rédaction de ce manuscrit, nous sommes convaincues qu'un mémoire du mastrant est loin d'être un travail solitaire. En effet, on n'aurait jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de notre recherche nous ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti-chercheur ».*

*Nos encadrantes, Mlle BOUBAKEUR Badra et Mme KHADEM Hafidha, pour leur soutien, Leur patience, leurs précieux conseils, leurs encouragements, leur rigueur et leur confiance inébranlable ;*

*Mlle Ait Abderahim Leila, pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à présider le jury de la soutenance de ce mémoire ;*

*Mlle MEDJEBER Nacera, pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à ce travail en acceptant de l'examiner ;*

*Le personnel du laboratoire de microbiologie surtout Mlle Kheira et Zahra, pour leur accueil et leur soutien sans ménagement ;*

*Personnel d'administration, les enseignants de notre parcours et toute l'équipe de formation du master « Biologie moléculaire et cellulaire » pour les efforts consentis au Cours de notre formation ;*

*Nos collègues : Mechri, A. Mechtek, N ; DOUMA, A . Nougale, F . Mehddaoui, A) pour leur aide, soutien et l'ambiance du travail très agréables.*

*Enfin, Un grand merci à notre cher Dr. Taibi Khaled , responsable de la spécialité, pour tout le dévouement.*

# Dedicace

*Dieu tout puissant merci d'être toujours auprès de moi*

*Avec l'expression ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.*

*A l'homme, mon précieux offre de dieu, qui doit ma vie réussite et tout mon respect : mon cher père MOHAMED*

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère BEN EL HADJ DJELLOUL FATIMA.*

*A mon oncle Belgacem qui m'a soutenu et encouragé durant mes études et pour leur conseils et motivation*

*A mes frères OUSSAMA et AYOUB et mes sœurs AMINA et ISRAA qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils mon chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.*

*A mes amis Rachida, Souad, Fatiha ; Nacera, Amel méchri, Amel si Yahia, nour el houda, rima, Khadîdja et amina .qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.*

*A mes grand-mères, mes tantes, mes oncles, a tous les cousins, les voisins, que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.*

*Sans oublier ma binôme Menoura pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

# Dédicace

*A l'éternel, mon Dieu le tout puissant de m'avoir à arriver  
au bout de mes études, lui qui m'a accompagné dès le début  
jusqu'à la fin*

*A mes parents qui m'ont beaucoup aidé grâce à leurs  
précieux conseils, leurs amours démesurés, leurs présences  
dévouées et leurs confiances rassurantes*

*A mes frères et sœurs : Miloud, Karim, Keltoum, Rima, Najou,  
Rania, Nadwja, Mayada, Hafssa, Fatiha*

*A mes grandes mères : Keltouma, Rabha*

*A toute la famille BENASLA*

*A mes amies : Hanane, Ikram,  
Amoula, Amina, Asmaa, Khaira, Rachida, Souad, Nacira,  
Amel, Nessrin, Nouria, Hadjar, Assala, Rabia*

*A tous mes collègues d'études surtout de la promotion 2<sup>ème</sup>  
année master Biologie moléculaire et cellulaire*

*surtout A mon binôme Asmaa pour son soutien moral, sa  
patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

**MENAOURA**

# Sommaire

**Liste des abréviations**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des photos**

**Introduction**

<b>I. Donnés bibliographiques sur les bactéries lactiques.....</b>	<b>02</b>
<b>I.1. Définition.....</b>	<b>02</b>
<b>I.2. Caractéristiques généraux.....</b>	<b>02</b>
<b>I.3. Potentiel probiotique des bactéries lactiques .....</b>	<b>03</b>
<b>I.4. Facteur influencent les activités biologiques les LAB.....</b>	<b>04</b>

## **Chapitre II Matériel et méthodes**

<b>II.1 Objectif du travail .....</b>	<b>08</b>
<b>II.2 Lieu et période de travail .....</b>	<b>08</b>
<b>II.3 Démarche expérimentale .....</b>	<b>08</b>
<b>II.4 Matériel biologique, appareillage et produits chimiques .....</b>	<b>10</b>
<b>II.4.1 Souches lactiques .....</b>	<b>10</b>
<b>II.4.2 Appareillage et produits consommables .....</b>	<b>10</b>
<b>II.5 Tests microbiologiques.....</b>	<b>11</b>
<b>II.5.1 Vérifications de la pureté des souches et préparation des aliquotes .....</b>	<b>11</b>
<b>II.5.2 Effet de la sonication sur les performances des LAB testées .....</b>	<b>11</b>
<b>II.5.2.1 Evaluation de l'effet de la sonication sur certaines caractéristiques probiotiques des bactéries lactiques testées .....</b>	<b>11</b>
<b>II.5.2.2 Effet sur l'adaptation aux sels biliaires .....</b>	<b>11</b>
<b>II.5.2.3 Effet sur la croissance a différentes températures.....</b>	<b>12</b>
<b>II.5.2.4 Effet sur l'adaptation aux stress acide.....</b>	<b>12</b>

<b>II.5.2.5</b> Effet sur la résistance aux antibiotiques .....	12
<b>II.5 .3</b> Effet sur l'adhérence bactérienne .....	12
<b>II.5.3.1</b> Autoagregation .....	12
<b>II.5.4</b> Effet sur la formation de biofilm total.....	13
<b>II.5.5</b> Analyse statistique.....	13

### **Chapitre III Résultats et discussion**

<b>III.1</b> Résultats de la vérification de la pureté des souches ( <i>S.thermophilus</i> et <i>E.durans</i> )....	15
<b>III.1.1</b> Etude morphologique .....	15
<b>III.2 .</b> Résultats de l'effet de la sonication sur les performances biotechnologiques et les atouts probiotiques de <i>S.thermophilus</i> et <i>E.durans</i> .....	16
<b>III.2.1.</b> Evaluation de l'effet de la sonication sur certains attributs probiotiques des deux ferments lactiques.....	16
<b>III.2.1.1</b> Résistance aux sels biliaries.....	16
<b>III.2.1.2</b> Effet de la sonication sur le développement à différentes températures.....	17
<b>III.2.1.3</b> .Effet de la sonication sur la résistance aux antibiotiques.....	18
<b>III.2.1.4</b> Effet de la sonication sur la résistance à différents PH.....	19
<b>III .3</b> Résultats de l'effet de la sonication sur l'autoagregation .....	21

### **Conclusion**

### **Références Bibliographiques**

### **Annexes**

## *LISTE DES ABRÉVIATIONS*

---

<b>ATCC</b>	American type culture collection
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Sente

## *L I S T E   D E S   T A B L E A U X*

---

<b>Tableau N°01:</b> familles constituant le groupe phylogénétique des bactéries lactiques.....	03
<b>Tableau N°02:</b> Liste des produits chimiques, des réactifs et d'appareillage.....	10
<b>Tableau N°03:</b> Caractères généraux des deux ferments lactiques.....	10
<b>Tableau N°04:</b> Caractères morphologique de <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Entérocooccus durans</i> .....	15
<b>Tableau N°05:</b> Effet de la sonication sur la sensibilité aux antibiotiques.....	19

## *LISTE DES FIGURES*

---

Figure N°01	Etapes de formation de biofilm.....	04
Figure N°02	Protocole Expérimental.....	09
Figure N°03	Effet de la sonication et des sels biliaires sur la viabilité d' <i>E. durans</i> .....	16
Figure N°04	Effet de la sonication et des sels biliaires sur la viabilité de <i>S. thermophilus</i> ..	16
Figure N°05	Effet de la sonication et de la température sur la viabilité des deux ferments.	18
Figure N°06	Viabilité d' <i>E. durans</i> à differnts PH.....	20
Figure N°07	Viabilité de <i>S. thermophilus</i> à differnts PH.....	20
<b>Figure N° 08:</b>	Pourcentage d'autoagrégation de <i>S. thermophilus</i> (a) et <i>E. durans</i> (b) sous l'effet de la avec sonication.....	21

## ***L I S T E   D E S   P H O T O S***

---

**Photos N°01 :** Aspect des colonies de *S. thermophilus* après 24h d'incubation à 37°C

**Photos N°02 :** Aspect microscopique de *S. thermophilus* après coloration de Gram

**Photos N°03 :** Aspect des colonies d'*E. durans* après 24h d'incubation à 37°C

**Photos N°04 :** Aspect microscopique d'*E. durans* après coloration de Gram

# INTRODUCTION

## Introduction

---

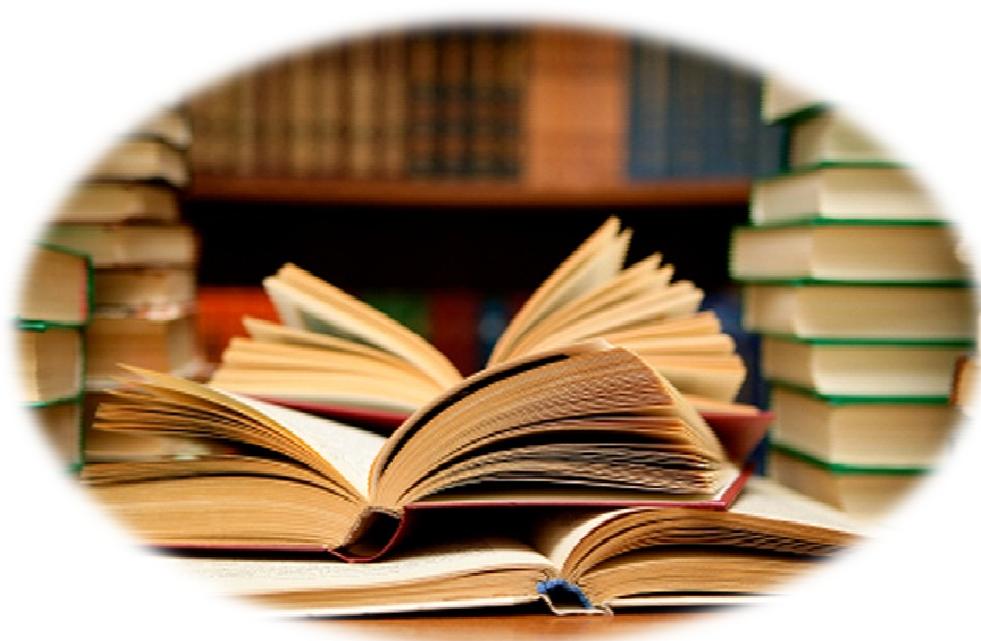
Tout au long de l'histoire humaine, les bactéries lactiques (LAB) ont eu un impact significatif sur la culture, les traditions et le bien-être humains. Dans les temps modernes, leur importance économique s'est considérablement accrue en raison de l'industrialisation des bio-transformations alimentaires. En particulier, ils ont une fonction clé dans le développement des caractéristiques sensorielles et de sécurité des produits alimentaires fermentés. Ainsi, la fiabilité des souches de départ est importante en termes de qualité et de propriétés fonctionnelles, de performance de croissance (croissance rapide, acidification rapide du substrat, résistance aux phages et aux bactériocines) et par rapport à l'entretien de ses aliquots industriels (manipulation, stockage et conservation par lyophilisation, congélation ou séchage par pulvérisation) (**Michael et Doule.2011**).

Sur le plan pharmaceutique, les bactéries lactiques tels que *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii subsp. lactis*, *Lb. gasseri*, *Lb. reuteri*, *Bifidobacterium bifidum*, *St. thermophilus* et *Enterococcus faecium* et *durans*, dont certains peuvent coloniser le tractus gastro-intestinal, jouent un rôle bénéfique dans cet écosystème. Par conséquent, à l'état vivant, ces bactéries peuvent être ajoutées aux denrées alimentaires et aux aliments pour bétails et utilisées ainsi comme probiotiques. De plus, ces bactéries sont potentiellement utiles comme support pour l'immunisation orale (**De vuyst et Vandamme, 1994**).

Pour exercer leurs effets, ces bactéries devraient survivre aux procédures de production et de manipulation industrielles ainsi qu'aux conditions environnementales. De plus, une fois qu'elles sont consommées (avec la denrée alimentaire ou en formulation thérapeutique commercialisée), elles devraient être métaboliquement actives dans la gamme de conditions stressantes typiques de l'environnement gastro-intestinal (pH gastrique, sels biliaires, antibiotiques dans le cas d'une consommation par une personne sous antibiothérapie), elles devraient avoir une bonne colonisation pour compétition le biofilm négatif (**Lahtinen et al., 2012**). Par conséquent, la recherche se focalise maintenant sur l'amélioration et la stabilisation de ces caractéristiques importantes pour l'industrie et la santé.

Ainsi, l'objectif de notre travail est l'étude de l'effet d'une stratégie mécanique, sonication à une fréquence et temps d'exposition maîtrisés, sur les caractéristiques technologiques et probiotiques de deux bactéries lactiques dans le but d'améliorer ses performances industrielles et pharmaceutiques.

# ***DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES***



## I. Données bibliographiques sur les bactéries lactiques

### I.1. Définition

Les bactéries lactiques (LAB : lactic acid bacteria) ont traditionnellement été associés aux fermentations alimentaires et sont généralement considérés comme des micro-organismes bénéfiques d'intérêt technologique. Elles sont parmi les bactéries domestiquées les plus étudiées et les plus exploitées dans de nombreuses applications industrielles, allant des cultures starters dans diverses industries aux probiotiques dans les compléments alimentaires et les agents de bioconversion (**Lahtinen et al.2012**).

Le terme «bactéries lactiques» ne se rapporte pas à une classe phylogénétique d'organismes, mais plutôt aux capacités métaboliques de l'espèce. Les bactéries lactiques sont historiquement définies comme une famille omniprésente et hétérogène de microbes qui peuvent fermenter divers nutriments produisant, principalement, de l'acide lactique (**Holzappel et Wood, 1995**).

### I.2. Caractéristiques généraux

Les LAB sont des bactéries à Gram positif, anaérobies, microaérophiles ou aérotolérantes, bâtonnets ou cocci, elles produisent toutes de l'acide lactique comme produit unique, majeur ou important de la fermentation énergétique des sucres (**Braim et Wood, 1992**). Elles n'ont pas de véritable catalase et sont dépourvus de cytochromes. Selon la classification taxonomique actuelle, elles appartiennent à l'embranchement des Firmicutes, classe *Bacilli*, et ordre *Lactobacillales*. Ce groupe phylogénétique est composé d'environ 500 espèces valablement décrites, appartenant à six familles à faible teneur en GC, en particulier :

1. *Aerococcaceae*, avec les genres *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella* et *Ignavigranum*.
2. *Carnobacteriaceae*, avec les genres *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Lacticigenium*, *Marinilactibacillus*, *Pisciglobus* et *Trichococcus*.
3. *Enterococcaceae*, avec les genres *Bavariicoccus*, *Catelicoccus*, *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus*, et *Vagococcus*.
4. *Lactobacillaceae*, avec les genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*.
5. *Leuconostocaceae*, avec les genres *Leuconostoc*, *Fructobacillus*, *Oenococcus* et *Weissella*.

6. *Streptococcaceae*, avec les genres *Lactococcus*, *Lactovum* et *Streptococcus*.

Les familles et leurs les principaux genres communs sont énumérées dans le tableau N° 01

**Tableau N°01** : familles constituant le groupe phylogénétique des bactéries lactiques (Felis et al., 2016)

Famille	Genres
Aerococcaceae	<i>Abiotrophia</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Dolosicoccus</i> , <i>Eremococcus</i> , <i>Facklamia</i> , <i>Globicatella</i> , and <i>Ignavigranum</i> .
Carnobacteriaceae	<i>Alkalibacterium</i> , <i>Allofustis</i> , <i>Alloiococcus</i> , <i>Atopobacter</i> , <i>Atopococcus</i> , <i>Atopostipes</i> , <i>Carnobacterium</i> , <i>Desemzia</i> , <i>Dolosigranulum</i> , <i>Granulicatella</i> , <i>Isobaculum</i> , <i>Lacticigenium</i> , <i>Marinilactibacillus</i> , <i>Pisciglobus</i> , and <i>Trichococcus</i> .
Enterococcaceae	<i>Bavariiococcus</i> , <i>Catelicoccus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Melissococcus</i> , <i>Pilibacter</i> , <i>Tetragenococcus</i> , and <i>Vagococcus</i>
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i> and <i>Pediococcus</i>
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i> , <i>Fructobacillus</i> , <i>Oenococcus</i> , <i>Weissella</i> .
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i> , <i>Lactovum</i> , and <i>Streptococcus</i>

### I.3. Potentiel probiotique des bactéries lactiques

Le tractus gastro-intestinal fournit un environnement anaérobie riche en activités enzymatiques, la bile et les conditions extrêmes de pH, par conséquent, le microbiote humain est composé d'un grand nombre d'espèces bactériennes non cultivables, comparativement à celles qui peuvent être cultivées et manipulées dans le laboratoire (Michael et Doule, 2011)

L'explosion des projets de séquençage des génomes, la détermination des composants individuels particuliers et des caractéristiques physiologiques spécifiques permettent l'identification de diverses bactéries lactiques composants ce microbiote et influençant ses activités fonctionnelles en exerçant un important pouvoir probiotiques (Mozzi et al.2016).

Les probiotiques sont définis par la FAO/OMS (2002) comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, procurent un avantage pour la

santé de l'hôte, comprennent les souches des LAB avec innombrables avantages tels que l'atténuation des problèmes gastro-intestinaux, la réduction des symptômes du rhume et de la grippe, le renforcement de la barrière épithéliale intestinale et la protection contre le biofilm négatif et l'infection(Mozzi *et al.* , 2016).

Les bactéries lactiques sont reconnues pour produire divers antimicrobiens tels que les bactériocines, les biosurfactants, les acides organiques, le peroxyde de carbone, diacétyle, des substances antimicrobiennes de faible poids moléculaire et du peroxyde d'hydrogène, qui empêchent la croissance d'agents pathogènes potentiels. En outre, leur application comme agents antibiofilms et anti-adhésifs contre les pathogènes communément connus spécifie leur efficacité et la perception de leur intérêt médicaux et thérapeutiques(Dee Pansh *et al.*2016).

. La propension à s'organiser en biofilm des souches et leur capacité d'immobilisation sont des critères clés recommandés pour une de grande performance technologique industrielle (Beremer *et Flint*, 2015).

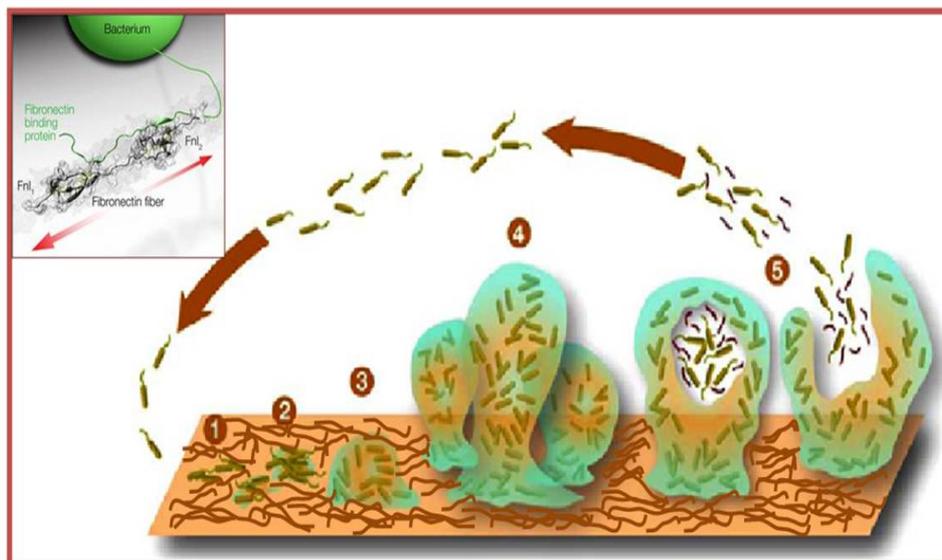


Figure N° 01 Etapes de formation de biofilm

#### I.4. Facteur influençant les activités biologiques des LAB

La fiabilité des souches starters est importante en termes de qualité et de propriétés fonctionnelles et en termes de performance industrielle, elles doivent avoir une croissance rapide, acidification rapide du substrat, résistance aux phages et aux bactériocines et une forte protection contre certaines opérations unitaires (pendant la manipulation, l'entreposage et la conservation par lyophilisation, congélation, ou séchage par atomisation)(Michael *et Doule*, 2011).

De plus, dans le cadre de l'élaboration de nouvelles applications telles que les aliments probiotiques, les préparations pharmaceutiques et les vaccins vivants, les bactéries lactiques devraient survivre lors des procédures de production et de manutention ainsi que les conditions environnementales rencontrés dans le produit auquel elles sont ajoutés, tels que les produits laitiers (laits fermentés, desserts laitiers fermentés surgelés, crème glacée et fromage). De plus, une fois qu'elles sont consommées, elles ont besoin de survivre et d'être actifs sur le plan métabolique sous l'effet du stress des conditions typiques de l'environnement gastro-intestinal. Ainsi, elles devraient faire preuve de résistance contre le microbiote autochtone, démontrent une capacité à coloniser le système digestif ou de la muqueuse urogénitale (bonne formation de biofilm et d'implantation), et expriment des fonctions probiotiques spécifiques dans des conditions défavorables à la croissance (**Zhang, 2014**).

# ***PARTIE EXPERIMENTALE***



# *Chapitre II*

## *Matériel et Méthodes*

**I.1. Objectif du travail**

Ce travail a été réalisé dans une perspective d'améliorer certains attributs biotechnologiques de deux bactéries lactiques d'intérêt technologique en appliquant une approche mécanique « la sonication ». Pour y arriver plusieurs objectifs ont été fixés :

- ✚ Evaluation de potentiel probiotique des deux souches lactiques ;
- ✚ Etude de l'effet de la sonication sur certaines caractéristiques probiotiques et technologique ;
- ✚ Evaluation de capacité de formation de biofilm total sous l'effet de la sonication.

**I.2. Lieu et période de travail**

Le travail a été réalisé au niveau de la faculté des sciences de la nature et de la vie dans les laboratoires de microbiologie et de biochimie sur une période de deux mois allant du mois de février au mois d'avril.

**I.3. Démarche expérimentale**

Les étapes de la démarche expérimentale permettant la bonne conduite du travail sont citées ci-dessous.

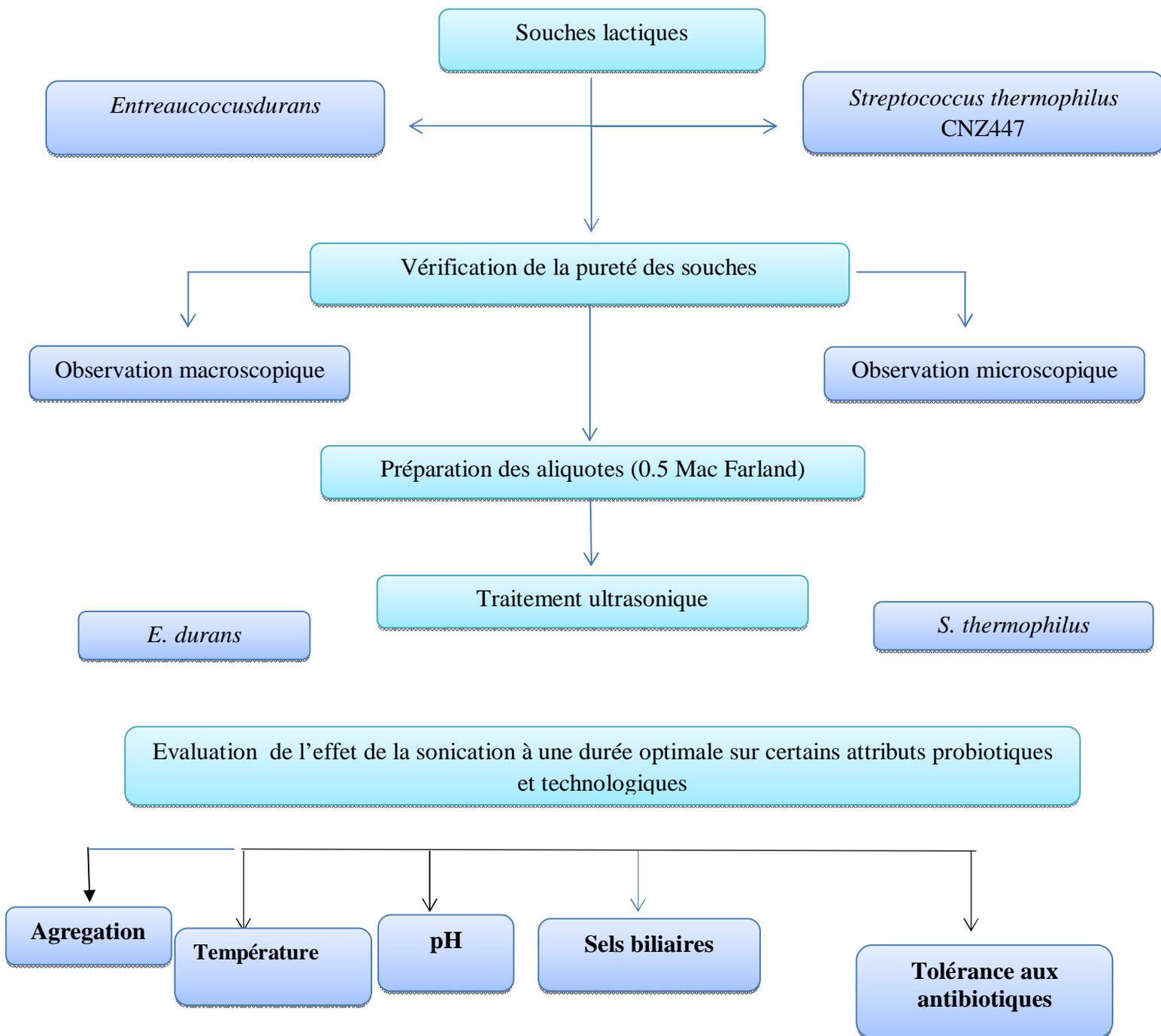


Figure N° 02 : Protocole Expérimental

## I.4 Matériel biologique, appareillage et produits chimiques

### I.4.1. Matériel biologique

#### 1.4.1.1. Souches lactiques

Les souches lactiques faisant objet de la présente étude sont *S.thermophilus* CNRZ447 et *E.durans* isolée puis identifiée par MALDI-TOF. Le tableau N° regroupe certains caractères de ces deux ferments lactiques.

**Tableau N°02** : Caractères généraux des deux ferments lactiques

Souches lactiques	Type de Gram	Forme	Famille	Origine
<i>S. thermophilus</i>	+	Cocoïde	Streptococcaceae	Yaourt
<i>E. durans</i>	+	Cocoïde	Enterococcaceae	Blé fermenté

#### I.4.2. Appareillage et produits consommables

La liste des produits chimiques, des réactifs et d'appareillage est citée dans le tableau N°03

Matériels et Appareillage	Produits chimiques et réactifs	Milieux de culture
- Sonicateur	Sels biliaires	Muller Hinton
- Autoclave ( <i>SANOCLAVE</i> )	Acide chlorhydrique	solide
- Agitateur magnétique chauffant ( <i>FISHERBRAND</i> )	Hydroxyde de sodium	M17 liquide/solide
- Balance de précision ( <i>KERN ALS 12C 4N</i> )	Acide acétique	
- Centrifugeuse ( <i>HETTICH</i> )	Solution saline de Phosphate (PBS)	
- Etuve ( <i>MEMMERT</i> )	Catalase	
- Spectrophotomètre (UV-1600PC)	Cristal violet	
- Incubateur ( <i>Haraeus</i> )	Lugol	
- Vortex	Violet de Gentiane	
- Réfrigérateur	Fuschine	

## II.5. Testes microbiologique

### II.5.1. Vérification de la pureté des souches et préparation des aliquotes

Les deux souches lactiques ont été conservées pendant une année, une vérification de leur pureté à travers un examen microscopique et macroscopique a été nécessaire.

Dans le but de préparer des aliquotes, des cultures jeunes de 18h sur gélose M17 ont été réalisées, ensuite deux séries de tube ont été préparées et inoculées par une colonie jeune de *S. thermophilus* ou *E. durans* et ont été incubées puis conservées. Avant chaque utilisation, les aliquotes sont réactivées et utilisés pour la préparation des inocula selon la méthode de Mac Farland à l'échelle 0.5 (Andrew, 2008).

### II.5.2. Effet de la sonication sur les performances des LAB testées

La durée d'exposition optimale de nos bactéries aux ultrasons a été déterminée ultérieurement par Khadem et coll (données non publiées). Les suspensions bactériennes ont subi un traitement ultrasonique doux pendant des durées croissantes.

Il est à noter que tous les tests ont été réalisés par des suspensions bactériennes exposées aux ultrasons, un tube contrôle a été réalisé (suspensions non exposées).

#### II.5.2.1. Evaluation de l'effet de la sonication sur certaines caractéristiques probiotiques des bactéries lactiques testée

#### II.5.2.2 Effet sur l'adaptation aux sels biliaires

La survie des souches lactiques sonifiées en présence des sels biliaires a été évaluée en adoptant le protocole de **Boke et al . (2010)**. Après incubation à 37 C°/18 h, les suspensions bactériennes ont été centrifugées à 10.000g pendant 10 min, le culot obtenu a été lavé trois fois au PBS (phosphate buffer sulfate), il a été reconstitué dans la même solution puis ajusté. Après incubation de 2 h à 37 C°, 100 µl de chaque suspension bactérienne ont été transférés dans des tubes contenant le M17 liquide supplémenté en sels biliaires à raison de 0.15%, 0.3%, 1% 0.5%. La survie des souches a été déterminée après 2 h d'incubation en lisant les densités optiques (DO) à 578 nm et en comptant le nombre de colonie sur gélose. Les résultats sont comparés à un contrôle (suspensions cultivées en présence de ses biliaires non sonifiées).

### II.5.2.3. Effet de la Croissance à différentes températures

L'effet de la température sur le développement des souches a été mis en évidence par la méthode décrite par **Ostlie (2004)** avec certaines modifications ; des suspensions jeunes de  $10^8$  germes/mL ont été préparées dans le M17 bouillon, sonifiées et incubés à différentes températures : 25°C, 37°C et 42°C. Pour l'expression des résultats, Les densités optiques ont été lues à 558 nm et converties en nombre du germe selon la corrélation de **Lambine et German (1969)** : 70% de lumière absorbée est l'équivalent de  $1,5 \cdot 10^8$  germes/ml pour les bactéries à Gram positif.

### II.5.2.4. Effet sur l'adaptation aux stress acide

L'effet du pH acide sur la survie bactérienne a été effectué selon la technique décrite par **Boke et al. (2010)** ; le culot récupéré après centrifugation (3000 g pendant 10 min) des suspensions bactériennes traitées par ultrasons a été lavé trois fois au PBS puis préparé est ajusté dans le même tampon. Après une durée d'incubation de 2 h, un volume de 100 µL a été transféré dans un tube de 10 mL de PBS à pH 2, 3,9 et 6 (le pH contrôle est 6), les résultats sont obtenus en lisant les DO et en comptant le nombre de colonie sur gélose.

### II.5.2.5. Effet sur la résistance aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des deux ferments lactiques aux antibiotiques a été déterminée selon la technique de **Mortazavi et al. (2015)** ; un volume de 100 µL d'une suspension bactérienne à  $10^6$  germes/ml a été étalé à la surface d'une gélose Mueller Hinton, des disques d'antibiotiques ont été déposés par la suite, les diamètres d'inhibition ont été calculés en mm après 24 h d'incubation. Le comportement des bactéries sonifiées et non sonifiées vis-à-vis de plusieurs antibiotiques a été évalué en comparant les zones d'inhibition.

## II.5.3 Effet sur la l'adhésion bactérienne

### II.5.3.1 Autoagrégation

Le test d'autoagrégation des souches bactériennes a été réalisé en adoptant la technique modifiée de **Kos et al. (2003)** ; chaque suspension bactérienne a été exposée aux ultrasons à la durée optimale. Après incubation de 18 h à 37°C, elles ont été centrifugées à 5000 g pendant 15 min puis lavées trois fois au PBS, une fois récupéré le culot a été ajusté à  $10^8$  germes/mL. Un test contrôle a été réalisé comme décrit précédemment mais sans traitement ultrasonique.

Le pourcentage d'agrégation a été calculé chaque heure lors d'une décantation de 5h en appliquant la formule suivante :

$$\% = (1 - A_t / A_0) \cdot 100$$

**A<sub>0</sub> : Absorbance à t<sub>0</sub>**

**A<sub>t</sub> : Absorbance après 1h, 2h,.....5h**

#### **II.5.4 Effet sur la formation de biofilm total**

La capacité de formation de biofilm a été estimée à l'issue des différents tests selon le protocole de **Boubakeur et al. (2016)** ; les suspensions bactériennes exposées ou non aux ultrasons ont été incubées dans des conditions convenables. Les tubes ont été colorés au cristal violet, incubés puis lavés à l'eau distillée. Le nombre des cellules formant un biofilm a été estimé après traitement acide.

#### **II.5.5 Analyse statistique**

Chaque test a été répété deux fois, les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type. Les analyses statistiques ont été réalisées par SPSS, un test **ANOVA** à deux facteurs a été appliqué. La différence est considérée comme significative à  $P \leq 0.05$ .

# Chapitre -III-

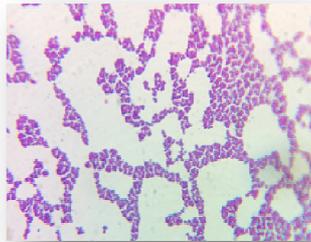
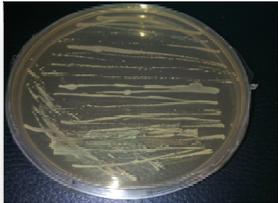
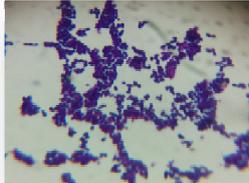
## Résultats et Discussions

### III.1 Résultats de la vérification de la pureté des souches (*S.thermophilus* et *E.durans*)

#### III.1.1 Etude morphologique

L'observation macroscopique et microscopique des deux souches étudiée est illustrée dans le **Tableau N°04**. Les deux souches ont été qualifiées comme catalase négative.

**Tableau N°04:** caractères morphologique de *Streptococcus thermophilus* et *Entérocooccus durans*.

Souche	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
<i>S. thermophilus.</i>	Colonies rondes, lisses, de couleur crèmeuse. 	Cellules colorées en violet (Gram+), forme de coques regroupées en longue chaîne 
<i>d'E durans.</i>	Clonies rondes, lisses, de couleur crèmeuse. 	Cellules colorées en violet (Gram+), forme de coques regroupées en courte chaîne 

### III.2. Résultats de l'effet de la sonication sur les performances biotechnologiques et les atouts probiotiques de *S. thermophilus* et *E.durans*

Lors de leur expérimentation, Khadem et ses collaborateurs ont noté une forte résistance des souches à la sonication à différentes durées d'exposition allant de 5 min à 65min, les optima de viabilité ont été obtenus à 15min pour *E.durans* et 30min pour *S.thermophilus* . Ces durées ont été retenues pour l'ensemble des tests d'évaluation de l'impact des ultrasons sur les performances biotechnologiques des bactéries lactiques testées.

#### III.2.1. Evaluation de l'effet de la sonication sur certains attributs probiotiques des deux ferments lactiques

##### III.2.1.1 Résistance aux sels biliaires

Les figures N° 03 et 04 montrent l'effet de la sonication sur le développement de *S.thermophilus* et *E. durans* en présence de concentrations croissantes en sels biliaires. Il est clairement notable que les deux souches lactiques ont pu survivre même à la concentration la plus élevée (1%) avec un taux de croissance non significatif par rapport au témoin (suspensions non sonifiées, incubées en absence des sels biliaires). D'autres part l'effet combiné sonication- sels biliaires affectait légèrement le nombre de germes mais il reste plus élevé que le témoin.

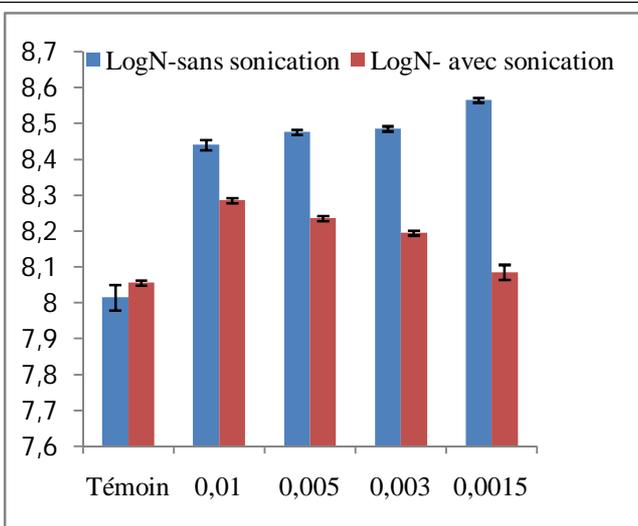


Fig N° 03: Effet de la sonication et des sels biliaires sur la viabilité d'*E. durans*

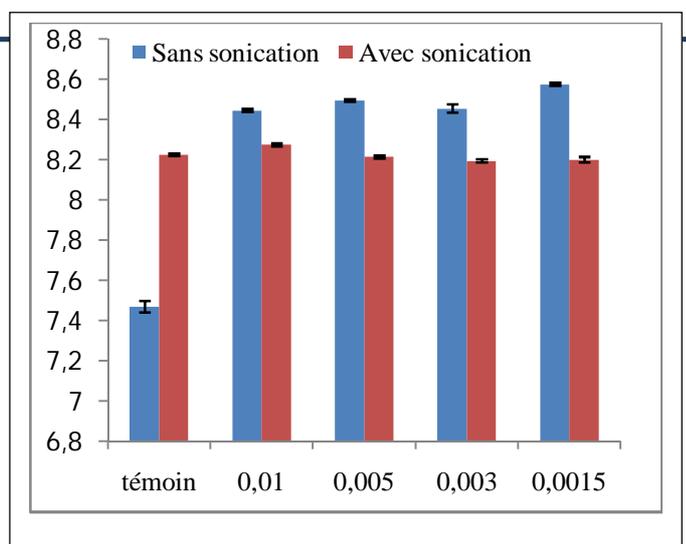


Figure N°04 : Effet de la sonication et des sels biliaires sur la viabilité de *S. thermophilus*

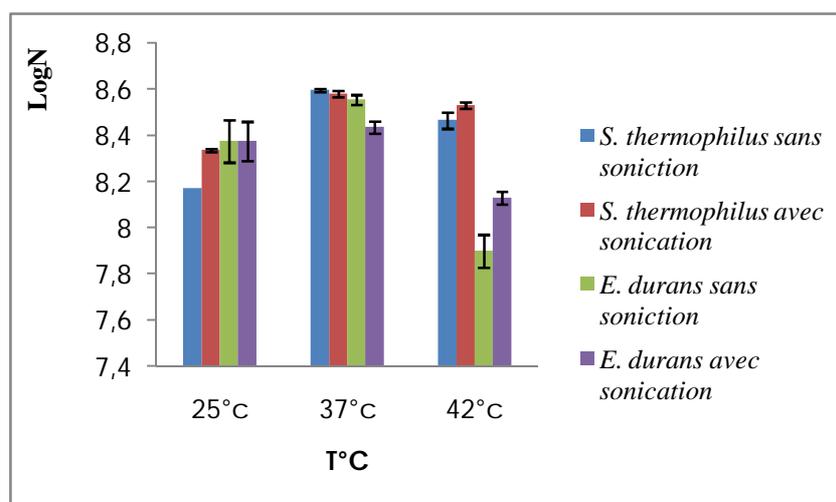
Les probiotiques sont largement consommés dans des produits fermentés ou des formulations fortifiantes, leur sélection est basée sur deux critères importants, le nombre et la viabilité lors de leur consommation ainsi que la persistance dans le tractus gastro-intestinal (Pingitore et al, 2016).

Shehata et ses collaborateurs (2016), ont montré que parmi 168 isolats lactiques, 68 résistaient à l'action des sels biliaries après 3 h d'incubation. Cette tolérance est essentielle pour la colonisation et l'activité métabolique des bactéries au niveau de l'intestin ceci peut contribuer à l'équilibre de la microflore intestinale.

Boke et al. (2010), ont montré que les bactéries productrices d'exopolysaccharides (*S. termophilus*) résistent mieux aux sels biliaries et au pH acide. Moncada et al. (2012) ont suggéré que cette tolérance est due à la rigidité membranaire et que lors du traitement ultrasonique d'autres facteurs peuvent être impliqués dans la protection de la cellule bactérienne.

#### **III.2.1.2.Effet de la sonication sur le développement à différentes températures**

La viabilité des souches bactériennes à des températures différentes était estimée dans le but d'étudier l'effet des traitements technologiques sur le comportement bactérien. Il est notable que les deux ferments se développent mieux à 37C° et que ce développement est maintenu même après traitement ultrasonique mais ce traitement reste sans effet significatif sur les deux souches aux trois températures testées.



**Figure N°05 :** Effet de la sonication et de la température sur la viabilité des deux ferments

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Moncada et al.(2010)** qui a montré lors de leur étude, portant sur l'évaluation de l'effet de la sonication sur certains attributs de *S. thermophilus*, que l'interaction sonication (20KHZ)- température (4°C, 25°C, 40°C) affectait significativement le nombre de germes après 12 h d'incubation et que cette interaction est plus efficace à 4°C; Dans de telles conditions, la physiologie cellulaire peut être affectée et donc le comportement bactérien.

**Adamberg et al . (2002)**, ont observé que *S. thermophilus* se développe mieux à 42°C et est sensible à pH inférieur à 5. Des études récentes ont rapporté que l'effet de l'intensité des cavitations générées lors du traitement ultrasonique peut être influencé par la température, ainsi plusieurs propriétés du milieu sont modifiées comme la viscosité.

**Kobayashi et al (2009)**, ont rapporté l'effet stimulateur de la prolifération cellulaire à l'induction des gènes liés à la croissance.

### III.2.1.3. Effet de la sonication sur la résistance aux antibiotiques

Les résultats montrant l'effet de la sonication sur la sensibilité des deux ferments aux antibiotiques sont regroupés dans le tableau ci-après. Nous remarquons que la sonication a modifié le comportement des deux bactéries vis-à-vis de certains antibiotiques, les deux souches non sonifiées étaient totalement résistantes à la colistine(30), cependant après

sonication elles présentaient une zone d'inhibition de l'ordre de 8 mm et 19 mm pour *S.thermophilus* et *E. durans* respectivement.

**Tableau N°05 : Effet de la sonication sur la sensibilité aux antibiotiques**

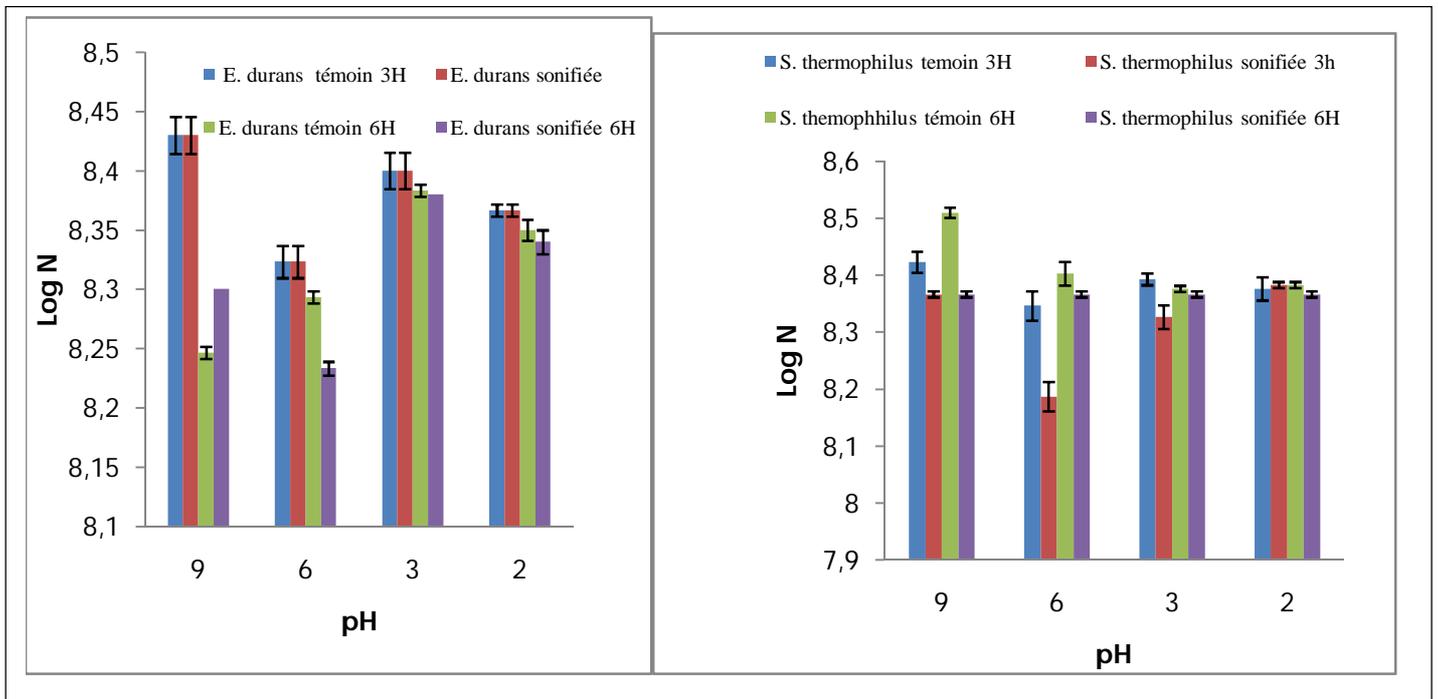
	C <sub>30</sub>	CS <sub>10</sub>	CAZ <sub>30</sub>	NA <sub>30</sub>	NV <sub>30</sub>	TIC <sub>75</sub>	MTZ <sub>5</sub>	TE <sub>30</sub>
<i>S.thermophilus</i> <i>sonifiée</i>	8mm	RT	RT	RT	10 mm	15mm	RT	13mm
<i>S.thermophilus</i> <i>témoin</i>	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	15 mm
<i>E durans</i> <i>sonifiée</i>	19mm	7mm	RT	18mm	17mm	RT	RT	15mm
<i>E durans</i> <i>témoin</i>	RT	RT	RT	RT	10mm	RT	RT	7mm

**OX<sub>1</sub> : Oxacillin ; NA<sub>30</sub> : Nalidixic Acide ; CS<sub>10</sub> : Calistin/Sulfate ; CAZ<sub>30</sub> : Ceftazidime ; TE<sub>30</sub> :Tetracycline ; MTZ<sub>5</sub> : Metronidazole ;C<sub>30</sub> : ChloiamPhenicol**

Ces résultats ont été aussi constatés par **Mortazavi et al. (2015)** lors d'un travail mené sur le comportement de certaines souches vis-à-vis des antibiotiques ; ils ont montré une différence majeure dans les diamètres des zones d'inhibition dans les échantillons exposés et non exposés. Il est intéressant à noter que le traitement ultrasonique était capable de rendre certaines bactéries résistantes aux antibiotiques sensibles et de rendre les sensibles résistantes.

#### **III.2.1.4.Effet de la sonication sur la résistance à différents pH**

Les figures N° 06 et 07 montrent les résultats de la viabilité des deux souches à pH croissants. Il est remarquable que les deux souches se sont adaptées au pH acide et basique, en général les bactéries traitées ou non peuvent survivre à pH 2,3 et 9 après 3h et 6h d'incubation, leur développement après traitement était légèrement important que le contrôle (pH=6).

Fig N° 06: Viabilité d'*E.durans* à différents pHFig N° 07: Viabilité de *S.thermophilus* à différents pH

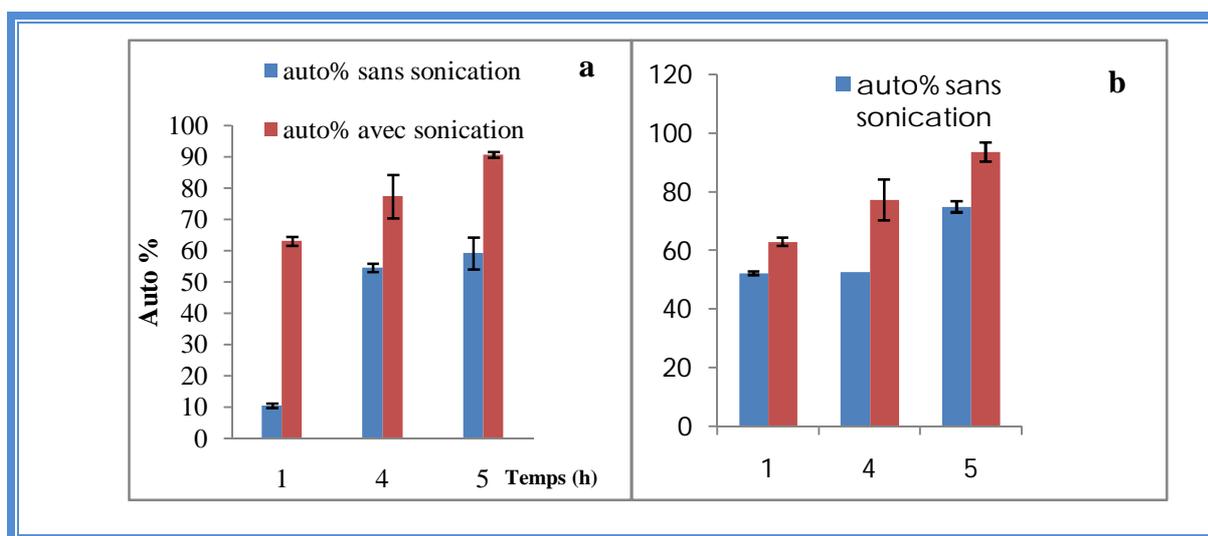
Nos résultats sont accord avec ceux de **Shehata et al (2016)** qui ont montré que tous les isolats ont pu survivre à pH 2 et 3 après 3h d'incubation, ainsi **Pieniz et al. (2014)** ont rapporté que *Enterococcus durans* LAB18s résistait mieux pH 3 et 4 mais aucune croissance n'a été observé à pH2. La tolérance bactérienne aux acides est importante non seulement pour la résistance aux stress gastriques, mais aussi lors de leur utilisation comme adjuvants alimentaires, ceci leur permettra aussi de survivre plus longtemps dans les aliments riches en acides (**Shehata et al., 2016**). D'ailleurs l'importante prévalence des entérocoques dans les aliments transformés est en partie attribuée à leur résistance à la chaleur, à l'extrême salinité et aux conditions difficiles. En général, la tolérance des bactéries lactique à l'acidité dépend du profil du pH de H<sup>+</sup>-ATPase et de la composition de la membrane cytoplasmique (**Madureira et al, 2005**).

### I.2.3. Résultats de l'effet de la sonication sur l'autoagrégation

Le phénomène d'adhésion, qui permet aux bactéries de coloniser un habitat et de s'y maintenir, procure aux espèces un avantage écologique. En effet, les cellules bactériennes sont directement en contact avec leur substrat ce qui évite la diffusion des enzymes dans le milieu extérieur, augmentant ainsi le pouvoir métabolique des souches (Akers *et al.* 2015).

Ce phénomène serait un processus dynamique complexe dont lequel de nombreux facteurs physico-chimiques peuvent être impliqués : la nature de la surface notamment sa rugosité et son hydrophobicité, les conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité du milieu, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique du fluide (Beloin *et al.*, 2008, Auger, 2012). Selon Kos *et al.*, (2003), l'adhésion est conditionnée par une bonne agrégation bactérienne (auto et coagrégation).

L'objectif de ce test était l'étude de l'effet de la sonication à une fréquence douce sur la capacité agrégative des souches lactiques. Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 02 (a et b)



**Figure N° 08:** Pourcentage d'autoagrégation de *S. thermophilus*(a) et *E. durans* (b) sous l'effet de la avec sonication.

L'effet de la sonication sur l'autoagrégation pendant 5 heures de décantation était monotone. Une amélioration notable a été enregistrée en exposant les deux inocula à 15 et

30min respectivement pour *S. thermophilus* et *E. durans* lors de la préparation des cultures jeunes destinées à la réalisation de ce test. Les meilleurs taux d'agrégation ont été enregistrés à la fin de l'expérimentation, soit 90% vs 60% pour *S. thermophilus* et 90% vs 76% pour *E. durans*.

Nous n'avons pas trouvé des travaux sur l'effet de la sonication sur l'agrégation des bactéries pour qu'on puisse discuter nos résultats. Toutefois **Khadem (2012)** ont discuté l'importance de la sonication à douce fréquence pour l'amélioration des capacités agrégatives des bactéries lactiques (données non publiées), ils ont attribué cet effet à la modification physicochimique de la paroi suite à l'action sonore et la sécrétion des adhésines suites aux cassures partielles engendrés par les ondes sonores.

# *Conclusion*

## Conclusion

---

### Conclusion

L'exploitation des bactéries lactiques dans l'industrie de la fermentation industrielle est largement développée visant essentiellement l'établissement des cultures starters plus performantes. Cependant, ces bactéries ont une faible production de certains métabolites à intérêt pharmaceutique et technologique, une résistance extrêmement instable et une capacité d'immobilisation modérée ce qui représente un inconvénient majeur. Nous avons projeté notre travail dans la perspective de trouver un traitement permettant l'amélioration ces atouts biotechnologiques des LAB d'intérêt technologique.

Il ressort de ce travail que l'utilisation des ultrasons devrait être jaugée en prenant en compte la physiologie de la souche elle-même et la nature des interactions qui peuvent être engendrées suite à l'application de ce traitement.

La croissance, l'agrégation et la perméabilité membranaire et la résistance aux certaines conditions extrêmes a été améliorée suite au traitement au ultrason. L'agrégation et la perméabilité sont dépendantes des structures de surface des cellules. Il est intéressant d'étudier le mécanisme moléculaire d'action des ultrasons sur l'hydrophobicité et les propriétés physicochimiques de la paroi cellulaire et de déterminer la consistance et la structure chimique de biofilm sous microscope électronique à fin de comprendre l'impact de cette stratégie.

L'influence de la sonication douce sur la capacité de formation du biofilm est difficilement appréciable. Mais, l'étude soulève aussi une question sur le conditionnement des deux souches par les ultrasons. Au-dessous de l'effet destructeur de la sonication, ces bactéries ont pu être conditionnées à développer un potentiel accru pour établir les biofilms et améliorer leurs résistances aux certaines conditions extrêmes. Ce phénomène pourrait bien être exploité pour améliorer les performances industrielles de ces souches.

Les résultats de cette étude laissent suggérer que la sonication pourrait avoir un effet appréciable sur les caractéristiques technologiques de ces bactéries lactiques en permettant de garantir leur viabilité au cours du passage à travers le tractus gastro-intestinal et d'acquérir ou maintenir des caractéristiques recommandées pour une bonne activité physiologique à l'échelle industrielle. Mais pour appréhender les effets positifs de la sonication sur ces bactéries, il est essentiel de disposer suffisamment de données sur leurs mécanismes d'action notamment d'étudier, à l'échelle moléculaire, l'influence des ondes sonores.

## *Références Bibliographiques*

## Références Bibliographiques

---

- ✚ **Adamberg . K, Kask.S,Laht.T-S,Paalme.T. (2003).** The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study.*Journal of Food Microbiology . 171 – 183 pp.*
- ✚ **Akers.K.S,Cardile. A. P, Wenke .J.Cet Murray.C. K. (2015).** Biofilm Formation by Clinical Isolates and Its Relevance to Clinical Infections. In:Biofilm-based Healthcare-associated Infections Volume I (ed. G. Donelli), p. 193, pp. 1-28.
- ✚ **Auger M. (2012).** Formation de biofilm in vitro par des souches cliniques d'Escherichia coli : impact de la modification des conditions expérimentales. Université de Nantes, faculté de pharmacie – France. P1-83
- ✚ **Bagher.S.M,Khaneghah.A.M.Saraiva.J.A,Jambrak.A.R,Barba.F.J,Mota.M.J.(2018).** Effect of ultrasound on lactic acid production by lactobacillus strains in date (phoenix dactylifera var . Kabkab) syrup . *applied microbiology and biotechnology .p.2635-2644.*
- ✚ **Barry, RG. (2011).** Probiotics and Health: From History to Future in Kneifel, W., Salminen, S. 2011. Probiotics and Health Claims. Ed. Blackwell Publishing Ltd. P. 357. Pp, 1-2.
- ✚ **Bessah, R et Touzi, A. (2001).** Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (P. O. U) à partir des Déchets de Dattes. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation - Biomasse, 37-40.*
- ✚ **Beloin C., Roux A., Ghigo G.M. (2008).** Escherichia coli, fimbriae. *curr Top Microbial immunology. P249-289*
- ✚ **Bjarnsholt T. (2013).** Role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS by Wiley Backwell. 867p*
- ✚ **Boke . H, Aslim .B. ALP . G.(2010).**The role of resistance to bile salts and acide tolerance of exopolysaccharides (EPSS) Produced by yogurt starter bacteria . *Arch. Biol, Belgrade .p 323-328.*
- ✚ **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. P 1-13*
- ✚ **Bremer, P. Flint, S, Brooks, J ET Palmer, J. (2015).** Introduction to Biofilms: Definition and Basic Concepts. In: Biofilms in the Dairy Industry (ed.K. H. The., S. Flint.,J. Brooks et G. Knight), John Wiley & Sons, Ltd. P. 290, pp.1-16.
- ✚ **Christi Y. (2003).****Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. Trends in biotechnology.P89-93****Cinar, A. Parcilekar, SJ, Undey, C. (2003).**

## Références Bibliographiques

---

Batch fermentation: Modeling, Monitoring, and Control. Ed. Taylor & Francis Group, LLC. P. 619. Pp, 19-21

✚ **Corrieu G. Luquent F . M. (2008).**Bactéries lactiques de la génétique aux ferments.Paris : Lavoisier ,TEC et DOC.

✚ **Dortu C. Thonart P.(2009).**Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires.Biotechnol.Agron.Soc.Environ.P 143-154.

✚ **Drouault. S. Corther G. (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. INRA, EDP Science. P 101-117.

✚ **Hobley L, Harkins C, MacPhee C. E, Stanley-Wall N. R. (2015).**Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes.FEMS Microbiology reviews. P649-669.

✚ **Isolauri, E., S. Salminen. (2004).** Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics." Best Pract Res ClinGastroenterol 18(2): 299-313.

✚ **GRACIN.L, Jambrak.A.R,Juretic.H,Dobrovic.S.Brukic . M, Smoljamic .G, (2015).**Influence of high power ultrasound on Brettanomyces and Lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment.*contents list available at science direct.5P*

✚ **Kos.B, Sukosic .J.Vukovic.S , Simpraga M, Frece.J , Matosic .S, ( 2003) :** *Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lb acidophilus M92* .Journal of applied Microbiology 94.Pp 981-987.

✚ **Kobayashi.H, Oethinger . M, Tuohy .M.J, Procop. G.W, Bauer . T .W. (2009).** Improved detection of biofilm-formative bacteria by vortexing and sonication: a pilot study . Clin Orthop Relat Res. 467(5), 1360-4

✚ **Khadem H. (2012).** Application d'une méthode alternative d'immobilisation de bactéries lactiques pour la production d'exopolysaccharides sous l'effet des flavonoïdes naturels. Université de Mascara –Algérie. p127

✚ **Leighton T. G. (2007).** What is ultrasound? Progress in biophysics and molecular biology. P3-83

✚ **Lahtinen,S.Ouwehand, A.C.Salminen,S.Wright,A.V.(2012).**Lactic acid bacteria. 4<sup>ème</sup> ed . London New York :Taylor et Francis Group

✚ **Margolles, A., Mayo, B et Ruas-Madiedo, P. (2009).** Screening, identification, and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. In. Lee et Salminen. Handbook of probiotics and prebiotic. Ed. John Wiley & Sons, Inc.P 608.Pp,4-7.

## Références Bibliographiques

---

- ✚ **Michael, P. Doyle, (2011)** .Stress responses of lactic acid bacteria. Newyork: Effie Tsakalido.
- ✚ **Monsen . T, Lovgren. E, Widerstrom . M,Wallinder . L. (2009)**. Effet in vitro des ultrasons sur les bacteries et le protocole suggéré pour sonication et diagnostic des infection prothetiques . journal de *Clinique micribiology*. P2496 – 2501.
- ✚ **Moncada M., Aryana K. J. (2012)**.Influence of “Mild” Sonication Conditions on the Characteristics of Streptococcus thermophilus ST-M5. *Advances in Microbiology*. P8-16
- ✚ **Mozzi, F. G. Savoy de Giori, G. Oliver, and G. Font de Valdez. (1996)**. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* in milk under different growth conditions. *Milchwissenschaft* 51:670–673.
- ✚ **Okafor, N. (2007)**. Modern industrial microbiology and biotechnology. Ed. Science publishers. P. 551. Pp, 3-5. Pp, 17-33. Pp, 54-63. Pp, 77-79.
- ✚ **Ostlie Hilde, M., Treimo, Janneke, Narvhus & Judith, A. (2005)**. Effect of temperatureon growth and metabolism of probiotic bacteria in milk.*International DairyJournal*, 15(10), 989–997
- ✚ **Sikyta, B. (1995)**. Techniques in Applied Microbiology: process in industrial microbiology. Ed. Elsevier.P. 437. Pp, 14-22. Pp, 3347. Pp, 50-51.
- ✚ **Steenbakker T. A. D, Cappon H. J. (2014)**.The use of ultrasound to prevent bacteriological biofouling in pipelines.
- ✚ **Tan C. H, Koh K. S, Xie C,Zhang J, Tan X. H., Lee G. P, Zhou Y, Ng W. G, Rice S. A,Kjelleberg S.(2015)**. Community quorum sensing signaling and quenching: microbial granular biofilm assembly. *Npj biofilm and microbiome*. 9p
- ✚ **Waites, MJ; Morgan, NL, Rockey, JS, Higton, G. (2001)**. *Industrial Microbiology: An Introduction*. Ed. Blackwell Science Ltd. P. 302. Pp, 21-47. Pp, 75-85. Pp, 218-228.
- ✚ **Zhang, W. Hunter, S I etTham, R (. 2011)**. *Microbial and Plant Cell Synthesis of Secondary Metabolites and Strain Improvement*. El-Mansi, E M T., Bryce, CFA, Dahhou, B., Sanchez, S., Demain A.L., Allman, A.R. *Fermentation Microbiology and Biotechnology*. 3<sup>rd</sup> ED. CRP press. P. 543. Pp, 77-100.
- ✚ **Zhang, H.Cai, Y. (2014)** .LACTIC ACIDE BACTERIA.NEW YORK LONDON : SPRINGER DORDRECHT HEIDELBERG.

# **Annexes**

## Annexes

---

**Annexe 01** : Préparation du PBS (phosphate buffer saline) et la composition des milieux de culture utilisées

### Pour 1l de PBS

Chlorure de sodium.....	8g
Chlorure de potassium.....	0,2g
Phosphate disodique.....	1,44g
Phosphate monopotassique.....	0,24g

### Milieu MRS

<b>Peptone.....</b>	<b>10g</b>
<b>Extrait de viande.....</b>	<b>10g</b>
<b>Extrait de levure.....</b>	<b>5g</b>
<b>Glucose.....</b>	<b>20g</b>
<b>Tween80.....</b>	<b>1ml</b>
<b>Phosphate bi potassique.....</b>	<b>2g</b>
<b>Acétate de sodium.....</b>	<b>5g</b>
<b>Citrate d'ammonium.....</b>	<b>2g</b>
<b>Sulfate de magnésium.....</b>	<b>0,2g</b>
<b>Sulfate de manganèse.....</b>	<b>0,5g</b>
<b>Agar.....</b>	<b>15g</b>

## Annexes

---

### Milieu M17

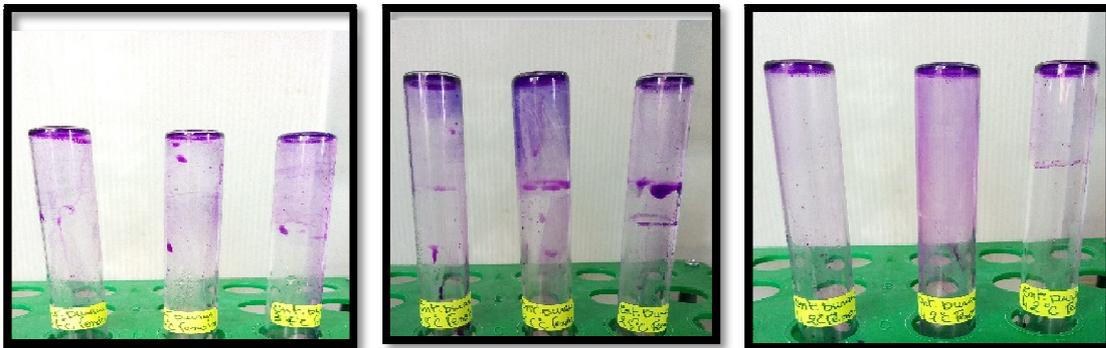
Tryptone.....	2,5 g
Peptone papaïnique de soja.....	5,0 g
Peptone pepsique de viande.....	2,5 g
Extrait de viande.....	5,0 g
Extrait autolytique de levur.....	2,5 g
Béta-Glycérophosphate de sodium.....	19,0 g
Sulfate de magnésium.....	0,25 g
Lactose.....	5,0 g
Acide ascorbique.....	0,5 g
Agar-agar bactériologique.....	15,0 g
pH à 25 °C.....	7,1 ± 0,2

### Gélose Miller Hinton

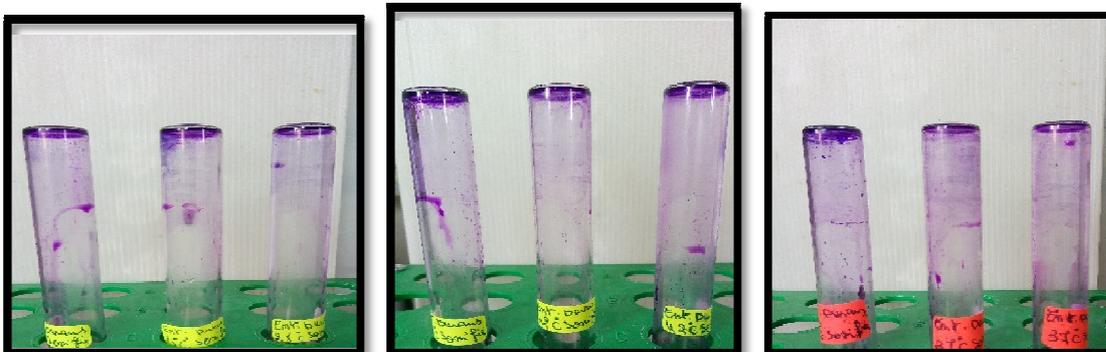
<b>Broyant de viande.....</b>	<b>2g</b>
<b>Hydrolysat acide de caséine.....</b>	<b>17,5g</b>
<b>Amidon.....</b>	<b>1,5g</b>
<b>Agar.....</b>	<b>10</b>
<b>PH.....</b>	<b>7.4</b>

## Test De L'effet De Sonication Sur La Croissance Et Formation De Biofilm

### 1) temoin

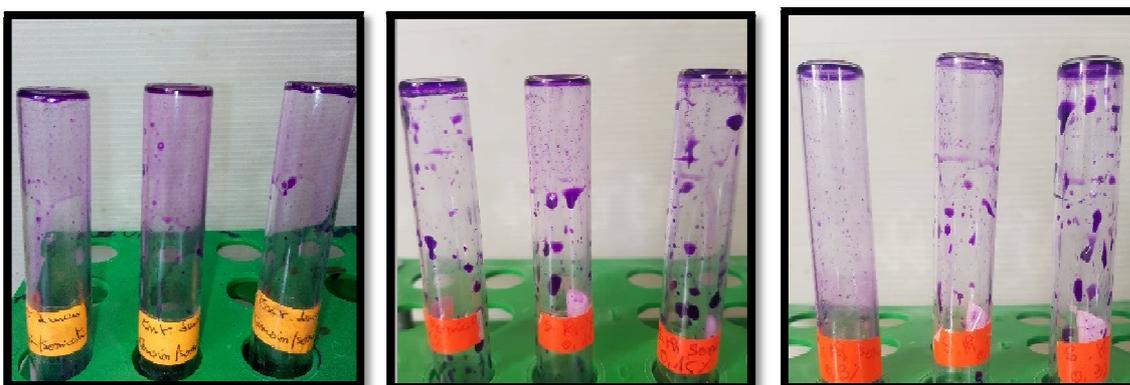


### 2) avec sonication

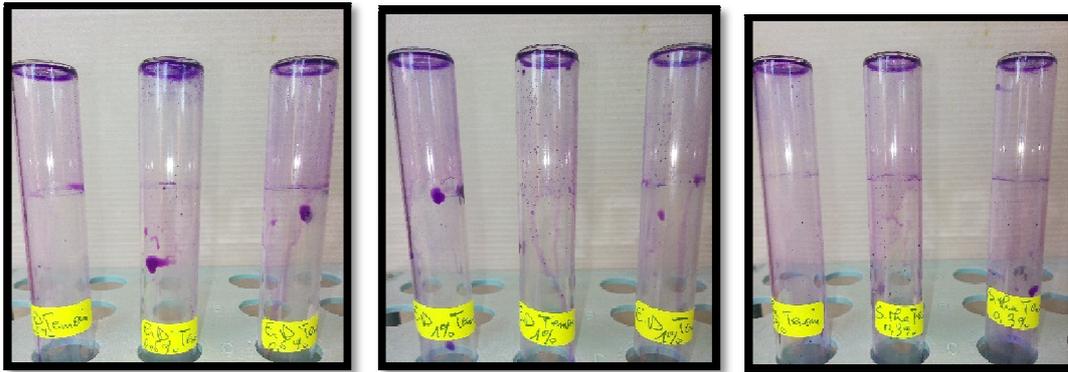


## Effet des sels biliaires sur la croissance et la formation de biofilm

### 1) Avec sonication



2) témoin



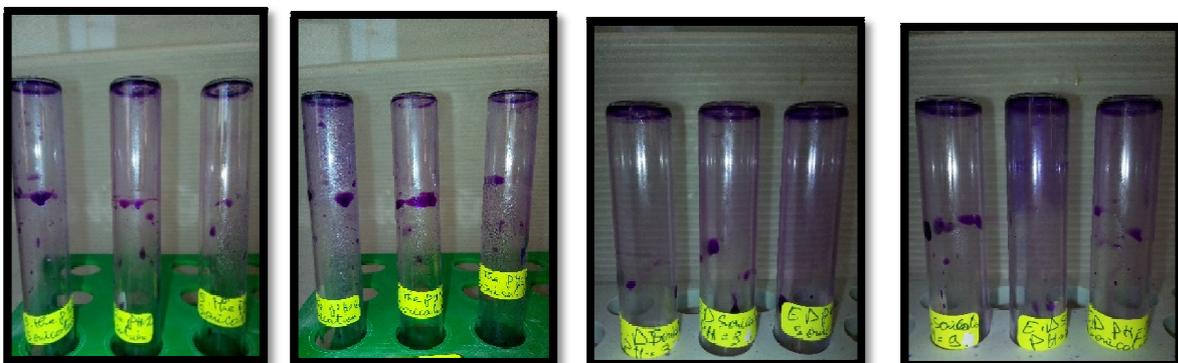
Effet du PH sur la croissance et la formation de biofilm

1) Apres 3 heures

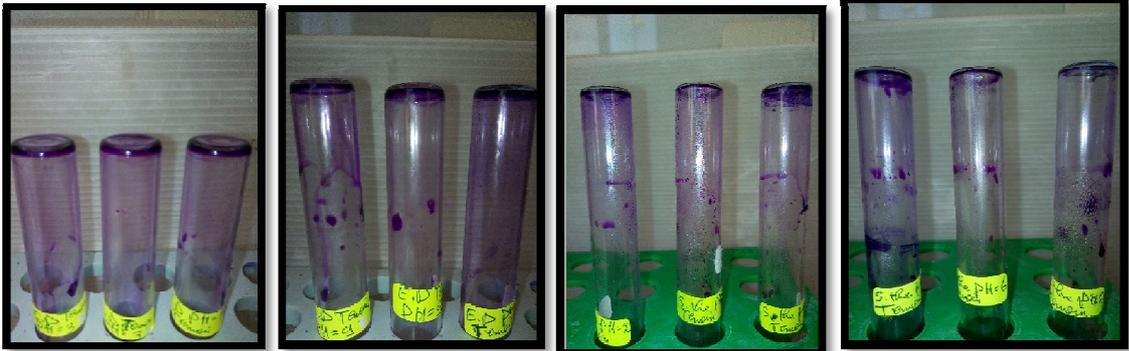
a) témoin



avec sonication



2) Apres 6 heures



a) Temoin

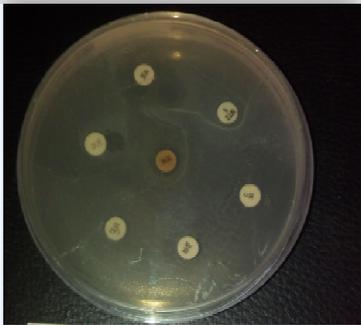
b) avec sonication



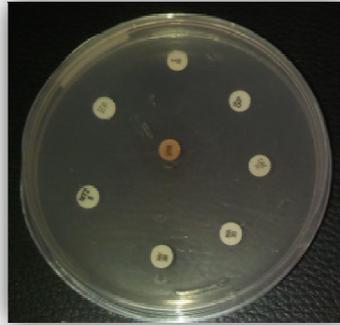
**Activité anti microbien**

**1) Témoin**

**E durans**

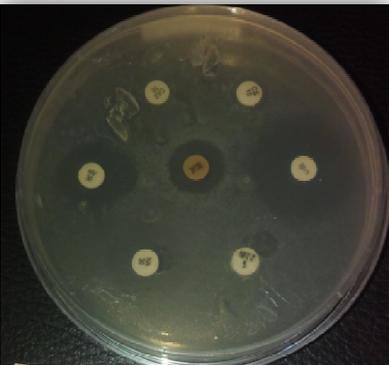


**S termophilus**



**2)**

**3) Avec sonication**



**test des sels biliaries**

**1) témoin**

**0.3%**

**0.15%**

**0.5%**

**1%**



**2) Avec sonication**

**0.3%**



**0.15%**



**0.5%**



**1%**



**Résumé :** Le but de cette étude était d'étudier l'effet d'une technologie mécanique, une technologie ultrasonore, sur les atouts biotechnologiques et les attributs probiotiques de deux bactéries lactiques d'intérêt technologique et pharmaceutique. Les effets bénéfiques des ultrasons sur les bioprocédés ont été rapportés pour plusieurs micro-organismes, en raison de l'amélioration de la croissance cellulaire, ainsi que la productivité microbienne. Par conséquent, un traitement sonore (30 kHz, 15min, 30min, 45°C) a été appliqué sur *S. thermophilus* et *E. durans*. Les effets de la sonication ont été évalués par l'analyse de la croissance cellulaire (mesure de trouble), agrégation, résistances aux conditions physicochimiques (T°C, pH, sels biliaire) et l'activité bactérienne. Les résultats de cette étude laissent suggérer que les ondes sonores, à fréquence douce peuvent être requises pour influencer la croissance et les propriétés adhésives des bactéries lactiques et améliorer leurs attributs probiotiques.

**Mots clés :** Probiotique- sonication- biofilm- agrégation.

**المخلص** كان الغرض من هذا العمل هو دراسة تأثير التكنولوجيا الميكانيكية ، تقنية الموجات فوق الصوتية ، على الخصائص التكنولوجية الحيوية و البروبيوتيكية لاثنتين من بكتيريا حمض اللبن ذات الأهمية التكنولوجية والصيدلانية. تم الحديث عن الآثار المفيدة للموجات فوق الصوتية على العمليات الحيوية للعديد من الكائنات الحية الدقيقة ، مثل تحسين نمو الخلايا ، و الإنتاجية الميكروبية. لذلك ، تم تطبيق هذه الاستراتيجية (30 كيلو هرتز ، 15 دقيقة ، 30 دقيقة ، 45 درجة مئوية) على *S. thermophilus* و *E. durans* لتقم تأثيرها على نمو التصاق. نفاذية و بعض الخصائص البروبيوتيكية (مقاومة الحرارة، الحموضة، الاملاح... الخ و القدرة على تثبيط البكتيريا الضارة) لهذه البكتيريا. اظهرت النتائج أن للموجات فوق صوتية المعتدلة قدرة مهمة على تحسين سلالات حمض اللبن و خصائصها المطلوبة في استخدامها كمنتج حيوي او معالج بروبيوتيك.

الكلمات المفتاحية بروبيوتيك- موجات فوق صوتية- بيوفيلم- التصاق- نفاذية.