

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الدكتور مولاي الطاهر، سعيدة

Université Dr MOULAY Tahar, Saïda



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de science de nature et de la vie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie

Thème

N° d'Ordre

Effet antioxydants et propriétés probiotique des bactéries lactiques

Présenté par :

Mme : Belhadi naima

Mme : Nezai asmaa

Sous la direction de :

Président

Mr.Bebabbou Ahmed Taha

MCA Université Dr Moulay Taher

Rapporteur

Me.Chahrour wassila

MCB Université Dr Moulay Taher

Examineur

Mr .Bellil Yehia

MCA Université Dr Moulay Taher

Année universitaire 2023/2024



Dédicaces

Je dédie ce travail à

Tous ceux qui sont donné toutes les peines

Et les sacrifices, Pour me voir réussir dans la vie.

Les deux personnes les plus chères à mon cœur, Ma mère

HADJAJ OUZZA et mon père NEZAI Ahmed qui m'ont apporté soutien

Et confort durant mon parcours scolaire.

A mes frères ZEGGAI, MOKHTAR, MUSTAPHA, DJELLOUL et mes sœurs

SAADIA, ILHEM

Ainsi à toute la famille NEZAI.

Mes chères amis MANAR, SIHEM, SOUHILA, OUSSAMA, MOUNIR,

AZZEDDINE, WALID qui ont étaient toujours avec moi avec leurs aides

et encouragements.

Tous les étudiants de notre promotion parcours de Master

« **Microbiologie** »

Nos amis qu'on aime sans exception.

Durant toutes nos années d'études.

NEZAI ASMAA



Dédicace

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :

Ma mère

Qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les Sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçoit à travers ce travail aussi modeste soit-il, L'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père

Qui m'a toujours encouragé et soutenu durant tout mon cursus et à la Réalisation de ce travail, c'est la lumière de mes jours, la source de mes Efforts, ma vie et mon bonheur que dieu le garde dans son vaste paradis.
À mes chers frères et sœur :MADJID, SOFIEN, BENDHIBA, OUSSAMA, FATIMA,
Que Dieu les garde pour moi.

À tous les membres de ma famille paternelle et maternelle, mes amies et Spécialement à ma très chère amie et binôme de travail :MANEL , ASMAA
À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer, je vous

Dis merci.

BELHADI NAIMA



e

Remerciement

Avant tout nous remercions « **Allah** »

Tout puissant de nous avoir donné le courage, la force

Et la patience qui nous a permis de réaliser ce modeste travail.

Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nos sincères remerciements à notre encadrant Me.CHAHROUR.W

Professeur à la faculté des sciences, département de biologie

Pour l'encadrement attentionné ; Ses conseils, sa disponibilité

Et son sérieux durant la période de réalisation de ce travail.

Nous adressons nos remerciements aux membres de jury Mr.BEBABBOU

et Mr.BELLIL qui ont accepté de faire soutenir ce mémoire.

Notre gratitude précieuse va également à tous les enseignants

Qui nous ont aidés de près ou de loin.



Nous n'oublions pas les techniciens de laboratoire
De notre faculté Dr. Moulay Taher Saida Mr. AHMED
Et Me .SLAMET qui ont participé à la réalisation de cette recherche
Grâce à leurs expériences et orientations.

Nos remerciements s'adressent aussi nos amies FATAH ZAHIRA
Et BENOUIS ARBIA qui ont partagé le travail et la fatigue avec nous
Tout le long de cette période.

Enfin, à mon chère binôme BELHADI NAIMA qui est Partagée avec
Moi les moments difficiles.

Et surtout à mes sœurs SAADIA, ILHEM et mon frère ZEGGAI qui m'ont
Aidés beaucoup dans la réalisation de ce travail.

Merci à tous

Liste des abréviations

AO : agents oxydants

BHA : Butylhydroxyanisol

BHT : Butylhydroxytuluène

D-Ala : D-Alanine

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EDTA : éthylène-diamine-tétra-acétique

EOA : Espèce oxygénées activées

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FAME : Esters méthyliques des acides gras

GC : Guanine-Cytosine

GlcNAc : N.acétylglucosamine

GPx : Glutathionperoxydase

GRO: Glycérol

LAB: lactic acide bacteria

L-Lys: L. lysine

LTA : lipoteichoic acids

MurNAc : N. acétylmuramique

MRS : Man,Rogosa,Sharpe

MH : Mueller Hinton

NACL : Chlorure de sodium

OMS : Organisation mondiale de santé'

ONU : Organisation des nations unies.

PG: peptidoglycan

PH: potentiel hydrique

RBO: Ribitol

ROS: reactive oxygen species

SII: le syndrome de intestine irritable

SOD: Superoxydedismutase

WTA: wall teichoic acids

Liste des tableaux

Tableau 1 : la forme des cellules des différents genres des bactéries lactiques.....	8
Tableau 3 : Classification des antioxydants.....	21
Tableau 4 : les marqueurs antioxydants, leur mode d'action et intérêt du dosage, ainsi que les valeurs de référence selon le CHU-Liège.	23
Tableau 5: : Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques.....	34
Tableau 6 : les caractéristiques d'échantillons	38
Tableau 7:Le profil physiologique et biochimique des isolats.	49
Tableau 8 : aspect microscopique des souches à gram positif.....	51
Tableau 9 :Résultats des interactions entre les souches de bactéries lactiques et les souches pathogènes.....	57
Tableau 10 : Résultats de l'antibiogramme des souches lactiques.....	62
Tableau 11 :Résultats de résistance des isolats aux sels biliaires par la méthode de dénombrement	65

Liste des figures

Figure 1: Mécanismes de défense antioxydant et sources des espèces réactives de l'oxygène"	20
Figure 2: Substances antimicrobiennes produits par les bactéries lactiques	32
Figure 3: Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl)	44
Figure 4 :un schéma représente les étapes du test de la capacité de piégeage des radicaux libres par le DPPH..	45
Figure 5 : Résultats d'examen macroscopique des souches en bouillon (A)et	48
Figure 6 : Le test fermentaire négatif qui présente le type homofermentaire.	52
Figure 7: Résultats de conservation des bactéries lactiques à long et à court terme(A : conservation long durée , B : conservation court durée)	53
Figure 8 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice Staphylococcus	54
Figure 9 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice Staphylococcus aureus	54
Figure 10 :Résultats de tests antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice Pseudomonas aeruginosa	55
Figure 11 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice C.q	55
Figure 12 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice Enterococcus faecalis	55
Figure 13 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice Klebsiella pneumoniae	56
Figure 14 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice Bacillus subtilis	56
Figure 15 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice Escherichia coli	57

Figure 16 :Résultat de sensibilité de la souche.....	60
Figure 17 :Résultat de sensibilité de la.....	60
Figure 18 :Résultat de sensibilité de la souche B13 aux antibiotiques	60
Figure 19 :Résultat de sensibilité de	61
Figure 20 :Résultat de sensibilité de.....	61
Figure 21 : Résultat de test d'hémolyse des isolats	63
Figure 22 :Test de résistance à l'acidité des 05 isolats	64
Figure 23 :Résultat de formation de biofilm des isolats sur une microplaque.....	66
Figure 24: test de DPPH des souches lactiques	68
Figure 25: Pourcentages d'inhibition du DPPH de 05 souches lactiques étudiées.....	68
Figure 25 :Pourcentages d'inhibition du DPPH de 05 souches lactiques étudiées.....	68

Résumé

Notre étude vise à explorer l'activité probiotique et antioxydant de 13 souches de bactéries lactiques isolées à partir du beurre traditionnel de la wilaya de Saida.

Les souches ont été testées pour leur pouvoir probiotique ce qui inclut des études de l'activité antimicrobienne, de sensibilité aux antibiotiques, d'activité hémolytique, de résistance à l'acidité et aux sels biliaires et de capacité de formation du biofilm ; et pour le pouvoir antioxydant qui concerne l'étude de piégeage des radicaux libres. Les résultats obtenus montrent que 03 isolats possèdent une très bonne activité probiotique et antioxydant.

Mots clés : Bactéries lactiques, produit laitier fermenté, activité probiotique, activité antioxydant.

Abstract

Our study aims to explore the probiotic and antioxidant activity of 13 strains of lactic acid bacteria isolated from the traditional butter of the wilaya of saida.

The strains were tested for probiotic potency, including studies of anti-microbial activity, antibiotic susceptibility, hemolytic activity, acid and bile salt resistance, and biofilm formation capacity; and for the antioxidant power that concerns the free radical trapping study. The results show that 03 isolates have a very good probiotic and antioxidant activity.

Keywords: Lactic acid bacteria, fermented dairy product, probiotic activity, antioxidant activity.

ملخص

هدف دراستنا إلى استكشاف نشاط البروبيوتيك ومضادات الأكسدة لـ 13 سلالة من بكتيريا حمض

اللاكتيك المعزولة عن الزبدة التقليدية في ولاية سعيدة

تم اختبار السلالات لفعالية البروبيوتيك، بما في ذلك دراسات النشاط المضاد للميكروبات، وقابلية المضادات الحيوية، ونشاط انحلال الدم، وقشور ملح الحمض والصفراء، وقدرة تكوين الأغشية الحيوية؛ وللقمل المضاد للأكسدة الذي يتعلق بدراسة محاصرة الجذور الحرة. تظهر النتائج أن 03 عزلة لها نشاط جيد جداً من البروبيوتيك ومضادات الأكسدة.

الكلمات الرئيسية: بكتيريا حمض اللاكتيك، منتجات الألبان المخمرة، نشاط البروبيوتيك، نشاط مضادات

الأكسدة.

Table des matières

Dédicaces	i
Dédicace.....	i
Remerciement	ii
Liste des abréviations	i
Liste des tableaux.....	ii
Liste des figures	iii
Résumé.....	v
Abstract.....	vi
ملخص	vii
Table des matières	viii
Introduction.....	2
I. Chapitre 01 : Les bactéries lactiques.....	6
I.1. Historique	6
I.2. Définition des bactéries lactiques.....	7
I.3. Habitat et origine des bactéries lactiques.....	7
I.4. Caractéristiques des bactéries lactiques :.....	8
I.4.1. Caractéristiques morphologiques :.....	8
I.4.2. Caractéristiques physiologiques :.....	8
I.4.3. Caractéristiques biochimiques :.....	9
I.5. Classification des principaux genres de bactéries lactiques.....	9
I.5.1. Le genre <i>Lactobacillus</i> sp.....	9
I.5.2. Le genre <i>Lactococcus</i> sp	10
I.5.3. Le genre <i>Leuconostoc</i> sp	10
I.5.4. Le genre <i>Enterococcus</i>	10
I.5.6. Le genre <i>Streptococcus</i> sp	11
I.5.7. Le genre <i>Pediococcus</i> sp	11
I.5.8. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	11
I.6. Intérêt des bactéries lactiques	12
I.6.1. Domaine alimentaire	12
I.6.1.1. Aptitude acidifiante	12

I.6.1.2. Aptitude texturant	13
I.6.1.3. Aptitude protéolytique	13
I.6.1.4. Aptitude aromatisant	14
I.6.2. Domaine médical	14
I.6.2.1. Probiotiques et Santé Digestive	14
I.6.2.2. Modulation du Système Immunitaire	14
I.6.2.3. Réduction du Cholestérol	14
I.6.2.4. Propriétés Anticancéreuses	15
I.6.2.5. Amélioration de la Santé Buccodentaire	15
II. Chapitre 02 : Stress oxydatif et l'activité antioxydant	17
II.1. Le stress oxydant :	17
II.2. La réaction oxydatif	18
II.2.1. Rôle des radicaux libres	18
III.3. Les antioxydants	19
II.3.1. Les types d'antioxydants	19
II.3.1.1. Antioxydants naturels	19
II.3.1.2. Antioxydant synthétiques	19
II.3.2. La nature des antioxydants	19
II.3.2.1. Antioxydant endogène " enzymatique " :	19
II.3.2.2. Antioxydants exogènes " non enzymatiques "	21
II.4. Rôle des antioxydants dans la prévention contre les maladies	21
II.5. Mécanisme d'action des antioxydants	22
III. Chapitre 03 : Les probiotiques	25
III.1. Historique	25
III.2. Définition	25
III.3. Probiotiques de nouvelle génération	26
III.3.1. Critères de sélection des probiotiques	28
III.4. Les souches probiotiques sélectionnées	28
III.5. Effet des probiotique	30
III.6. Mécanisme d'action des probiotiques	30
III.6.1. Inhibition de l'adhésion des pathogènes : phénomène de compétition/exclusion	31

III.6.2. Production de substances antimicrobiennes	31
III.6.2.1. Les bactériocines	32
III.6.2.2. Les acides organiques	32
III.6.2.3. Le diacétyle	33
III.6.2.4. Le peroxyde d'hydrogène	33
III.6.2.5. L'éthanol	33
III.6.2.6. Dioxyde de carbone	33
III.6.3. Stimulation de l'activité du système immunitaire intestinale	33
III.7. Propriétés et critères de sélection des probiotiques	34
Partie II : Etude expérimentale	38
I. Matériels et méthodes	38
I.1 l'objectif	38
I.2 présentation du lieu de l'étude expérimental	38
I.3 Présentation d'échantillons	38
I.4 Isolement et purification des souches lactiques	39
I.5 Etudes macroscopiques et microscopique	39
I.5.1 Coloration de Gram	39
I.6 Test de catalase	40
I.7 Conservation	40
I.7.1 Conservation à court terme :	40
I.7.2 Conservation à long terme :	40
I.8 Type de fermentation	41
I.9 études de pouvoir probiotique	41
I.9.1 Activité antimicrobienne	42
I.9.2 Sensibilité aux antibiotiques	42
I.9.3 Activité hémolytique	43
I.9.4 La résistance à l'acidité	43
I.9.5 La résistance aux sels biliaires	43
I.9.6 Biofilm	43
I.10 Etude de pouvoir antioxydant	44
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION	48
II.1 Isolement et caractérisation des BL	48

II.2. Etude de pouvoir probiotique.....	53
II.2.1. Activité antimicrobienne des isolats lactiques	53
II.2.2. Etude de sensibilité aux antibiotiques	59
II.2.3. Etude de l'activité hémolytique.....	63
II.2.4. Etude de résistance à l'acidité et sel biliaire	63
II.2.5. Etude de formation de biofilm.....	65
II.3. Etude de pouvoir antioxydant	66
CONCLUSION	70
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	72
ANNEXES.....	76

INTRODUCTION

Introduction

Les bactéries lactiques (LAB) sont un groupe diversifié de bactéries gram-positives largement présentes dans la nature, y compris chez les plantes et les animaux. Les souches LAB probiotiques, en particulier celles des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, ont divers effets bénéfiques sur la santé.

En raison de leurs avantages nutritionnels et fonctionnels pour les humains et les animaux, l'intérêt du public pour l'application des LAB probiotiques dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux s'est accru.

Cependant, au cours de la transformation industrielle et dans le tractus gastro-intestinal, les bactéries probiotiques sont exposées à des environnements défavorables, notamment à des températures élevées ou basses, à un pH faible, aux sels biliaires, à l'oxygène ou à une alimentation limitée, ce qui induit un stress (**Bron and Kleerebezem 2011**)(**Mills et al., 2011**).

Ces facteurs affectent la survie des bactéries pendant le traitement et la durée de conservation pendant le stockage, ainsi que la survie, la prolifération et la fonctionnalité dans le tractus gastro-intestinal.

Afin de garantir un nombre suffisant de bactéries viables dans le produit final et une action efficace de promotion de la santé chez l'hôte, il est essentiel d'isoler des souches qui présentent une viabilité et une fonctionnalité élevées, ainsi qu'une résistance élevée au stress (**Feng and Wang 2020**).

Les cultures probiotiques LAB avec une activité antioxydant élevée sont très demandées, puisqu'elles sont potentiellement capables de protéger l'organisme hôte des effets toxiques des ROS et de contribuer à la prévention des maladies cardiovasculaires, inflammatoires et oncologiques (**Bryukhanov et al., 2022**).

Lorsque les BL sont attachés à la lumière intestinale, les charges bactériennes des LAB et leurs métabolites augmentent pour éliminer les ROS ainsi l'équilibre d'oxydation-réduction intestinal. De plus, il est connu que les BL constituent un antioxydant xénogénique naturel puissant en considération de

la valeur nutritive, de la sécurité et des fonctions des probiotiques (**Tang et al.,2018**).

L'objectif de cette étude est de sélectionner des souches lactiques probiotiques ayant un effet antioxydant à partir de produits alimentaires préparés de manière traditionnelle. Notre travail se compose de trois parties :

1. Revue de la littérature : Cette partie présente les caractéristiques des bactéries lactiques, leur importance dans divers domaines et les pouvoir antioxydant.

2. Étude expérimentale : Nous avons évalué les propriétés probiotiques et antioxydants des souches,

3. Conclusion : Cette section résume les résultats obtenus.

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHPAITRE I :

Les bactéries lactiques

I. Chapitre 01 : Les bactéries lactiques

I.1.Historique

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes très anciens dont les ancêtres ont vu le jour il y a trois milliards d'années (avant les Cyanobactéries). Depuis plus de 4000 ans, elles ont été utilisées pour la fermentation des aliments, sans pour autant comprendre la base scientifique de leur application, tout en cherchant à produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité (Boudersa et al,2017).

Les bactéries lactiques (LAB) ont une histoire riche et ancienne, étroitement liée à la fermentation et à la production alimentaire. La fermentation lactique est l'une des plus anciennes méthodes de conservation des aliments, utilisée depuis des millénaires par des civilisations telles que les Égyptiens et les Babyloniens, qui produisaient des produits fermentés comme le yogourt et le fromage. **(Dutton, Y. (1996)** Au Moyen Âge, en Europe, la fermentation lactique était couramment employée pour produire divers produits laitiers et légumes fermentés, avec des techniques traditionnelles transmises de génération en génération. McGovern, P. E., et al. (2004)

Le XIXe siècle marque un tournant décisif avec la découverte par Louis Pasteur, en 1857, que la fermentation lactique est causée par des micro-organismes spécifiques, inaugurant ainsi la microbiologie moderne. En 1878, Joseph Lister, un chirurgien britannique, identifie une bactérie lactique particulière, *Lactobacillus lactis*, et note son rôle dans la production d'acide lactique. Pasteur, L. (1857), Lister, J. (1878)

Au XXe siècle, les scientifiques commencent à isoler et à caractériser différentes espèces de bactéries lactiques. L'immunologiste russe Eli Metchnikoff suggère, au début des années 1900, que la consommation de produits laitiers fermentés contenant des bactéries lactiques pourrait prolonger la vie humaine. Entre les années 1930 et 1950, le développement industriel des cultures starter permet de standardiser et d'améliorer la production de produits fermentés, avec des recherches axées sur l'amélioration des souches pour des

applications spécifiques. Les années 1980 et 1990 voient l'essor de la biotechnologie, avec une exploration des potentialités des bactéries lactiques pour la production de probiotiques, visant à améliorer la santé humaine et animale. Metchnikoff, E. (1907).

Au XXI^e siècle, les recherches sur les bactéries lactiques s'étendent aux domaines de la santé, de la nutrition et de la médecine (**Clément, J. C., et al. (2012)**). Les études sur le microbiote intestinal révèlent l'importance des LAB pour un microbiome équilibré. Aujourd'hui, les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire pour la production de produits fermentés tels que le yogourt (**Tamime, A. Y.**) le fromage, le kéfir et les légumes fermentés. Elles jouent également un rôle crucial dans les probiotiques, contribuant à la santé digestive et immunitaire (**Sanders, M. E. (2003)**).

1.2. Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes unicellulaires, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (**Roissart, 1986**). C'est-à-dire qu'elles tirent leur énergie de la dégradation de matière organique, les bactéries lactiques sont homofermentaires ou hétérofermentaire (**Latreche, 2016**).

1.3. Habitat et origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques (**Mechai, 2009**). Elles sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (**Makhloufi, 2012**).

Par exemple, dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages...) (**Makhloufi, 2012**). Aussi, elles peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que les genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu,

ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis* pathogène responsable de la trichomonas vaginale (Bjorkroth et Holzapfel, 2006, Ruiz et al, 2009). Et/ ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (Makhloufi, 2012).

I.4. Caractéristiques des bactéries lactiques :

I.4.1. Caractéristiques morphologiques :

Les bactéries lactiques sont des bactéries à gram-positive, asporulé, aéro-anaérobie facultatives ou des micro-aérophiles généralement immobiles et acido-tolérantes (Brahimi, 2015). Ils peuvent prendre diverses formes (Boullouf, 2017).

Tableau 1 : la forme des cellules des différents genres des bactéries lactiques

Forme	Cocci-ovoïde	Coccobacille
Genres	Lactococcus Enterococcus Pediococcus Lactobacillus Bifidobacterium	Leuconostoc Oenococcus Weissella

I.4.2. Caractéristiques physiologiques :

Ces bactéries sont mésophiles et peuvent se développer de 10 °C à 40 °C, avec une croissance optimale entre 25 et 35 °C, mais certaines peuvent se déve-

lopper à 5 °C ou 45 °C. Ils peuvent supporter des pH de 4 à 8 (exceptionnellement de 3,2 à 9.6).

1.4.3. Caractéristiques biochimiques :

L'aspect biochimique est une étude qui permet d'identifier une bactérie en utilisant ses caractéristiques biochimiques telles que la composition de la paroi cellulaire, le profil des acides gras de la membrane et analyse des protéines cellulaires entières, Cette caractérisation extensive de la biochimie est d'une grande valeur dans la pratique et l'application des bactéries lactiques.

1.5. Classification des principaux genres de bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen en 1919. Actuellement et suite à plusieurs révisions taxonomiques, ce groupe compte plusieurs genres qui appartiennent tous au phylum Firmicute (**Leonard, 2013**).

La taxonomie des bactéries lactiques repose sur l'approche classique ou bien l'identification phénotypique (morphologique, biochimique et physiologique). Cette identification a été élargie pour inclure des marqueurs chimio-taxonomiques (acides gras cellulaire), analyse des protéines totales de la cellule et autre composants cellulaires. Néanmoins, ces méthodes conventionnelles ont leurs limites, notamment dans le cas de variations du phénotype par la présence ou l'absence d'un plasmide codant pour des fonctions

métaboliques. Par conséquent, la classification moderne est basée sur les approches moléculaires, qui s'appuient sur des tests génotypiques telles que le séquençage de l'ARN16S, ribotypage et d'autres méthodes de typage basées sur l'ADN. Ces techniques moléculaires permettent une meilleure différenciation des microorganismes à différents niveaux (**Hassaine, 2013**).

1.5.1. Le genre *Lactobacillus* sp

Lactobacillus c'est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae, ils ont des aspects variés allant du bacille long et fins souvent groupés en chaînes, immobiles, a sporulés, catalase négative, qui se développent à un

optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les Lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexe en acide aminé, en vitamines, en acide gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux. (**Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994**).

1.5.2. Le genre *Lactococcus* sp

Schleifer et ses collaborateurs (1985); ont classé ce genre en fonction des critères physiologiques et du séquençage d'ARNr 16S. Le genre *Lactococcus* comprend 5 espèces: *Lactococcus garviea*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus plantarum* et *Lactococcus lactis*. Les espèces de *Lactococcus* sont des coques, à Gram positif au métabolisme homofermentaire produisant exclusivement de l'acide lactique. Elles ont un optimum de croissance voisin de 30°C et ne poussent pas à pH 9,6 ou en présence de 6,5 % de Na Cl., elles ne sont pas hémolytiques. (**Dellaglio et al., 1994**).

1.5.3. Le genre *Leuconostoc* sp

C'est un genre bactérien exigeant et auxotrophes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides. Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries. Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol (**Negadi et al., 2017**).

1.5.4. Le genre *Enterococcus*

Ils sont très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminant et surtout comme agents de fermentation homolactique (avec production d'acide lactique de type dextrogyre). Ils sont très exigeants sur le plan nutritionnel et se développent bien à 37 °C. Les *Enterococcus* composés de streptocoques fécaux (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*).

Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobile, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C(Rakhis et al,2016).

1.5.6.Le genre Streptococcus sp

Ce genre bactérien englobe l'espèce thermophile Streptococcus thermophiles qui se différencie des autres streptocoques par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène ; ainsi que ses propriétés technologiques, et c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique. Elle immobile, sphérique ou ovoïde avec un diamètre inférieur à 2µm et une disposition en paire ou en chaîne longue.La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique, et la température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH : 9,6 (Boudersa et al,2017).

1.5.7. Le genre Pediococcus sp

Rassemble des coques homofermentaires dont la particularité qui les différencie des autres genres est le regroupement en paires ou en tétrades. Les espèces du genre Pediococcus sont mésophiles, très exigeantes, ont une faible activité protéolytique et le plus souvent sont incapables d'utiliser le lactose, ce qui ne leur permet pas d'acidifier et de coaguler le lait. Leur fermentation homolactique donne parfois de l'acide lactique racémique (acide D. L-lactique) Mais, fréquemment la forme lévogyre L prédomine : les espèces homophiles non acidophiles ne donnent que cette forme. (Benhamada et al,2020)

1.5.8. Le genre Bifidobacterium

Les cellules de Bifidobacterium se caractérisent par leur forme très irrégulière, souvent en V et Y. Elles se différencient des autres bactéries lactiques par la présence d'une enzyme, la fructose-6- phosphate phosphocétolase. Celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique, ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et d'autres acides organiques. Cette fermentation « lactique » a conduit à les

rapprocher du groupe des bactéries lactiques. Leur température optimale de croissance est comprise entre 37°C et 41°C. Elles se développent à pH supérieur à 5(Aibeche et al,2020).

I.6.Intérêt des bactéries lactiques

I.6.1.Domaine alimentaire

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries qui possèdent le "statut GRAS" ce qui autorise officiellement leur usage dans les applications alimentaires. Ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les saucissons, les laits fermentés.

Les bactéries lactiques (LAB) jouent un rôle crucial dans l'industrie agroalimentaire, en particulier dans la fabrication de produits fermentés tels que le yaourt. Leur présence apporte de nombreux avantages à la fois pour la qualité nutritionnelle et organoleptique des aliments (Ferrer, F. P., & Boyd, L. J. (1955)).

- **Fermentation lactique:** Les LAB transforment les sucres du lait (principalement le lactose) en acide lactique, ce qui confère au yaourt son goût acidulé caractéristique. L'acidité produite par les LAB permet également de conserver le yaourt en inhibant la croissance de micro-organismes nuisibles (Brian J. LeBlanc et al. (2011)).
- **Valeur nutritive:** Les LAB enrichissent le yaourt en vitamines B, notamment B12 et B6, et en minéraux tels que le calcium et le phosphore. De plus, la fermentation lactique peut améliorer la digestibilité du lactose, rendant le yaourt plus accessible aux personnes intolérantes au lactose (Michael J. Gasson et al. (2014)).

I.6.1.1. Aptitude acidifiante

L'acidification provoque la formation d'un caillé +ou- ferme selon les bactéries lactiques présentes. Selon les produits, la texture recherchée est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé ; kéfir). Pour obtenir une consistance déterminée,

l' utilisation des souches plus ou moins acidifiantes peut être couplée à celle des souches productrices de polysaccharides (**Satura et Federighi, 1998**).

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (**Boullouf,2017**).

Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi par(**Allouache et al,2017**) :

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

1.6.1.2. Aptitude texturant

Certaines souches de bactéries lactiques ont la faculté de synthétiser des exopolysaccharides, glucines et fructoses, qui constituent la capsule cellulaire. Ces macromolécules contribuent à modifier la texture des produits dans lesquels se développent les souches compétentes cette aptitude texturant est aussi exercée par le pouvoir acidifiant(**Chemlal-Kheraz,2013**).

Les LAB contribuent à la texture crémeuse et onctueuse du yaourt en coagulant les protéines du lait.

1.6.1.3. Aptitude protéolytique

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzy-

matique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (**Hadef,2012**).

1.6.1.4. Aptitude aromatisant

Cette activité est très liée aux propriétés organoleptiques du produit " odeur, couleur, texture " dans lequel elles se développent. En effet, certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arômes sont issus du métabolisme du citrate, l'acétone et le diacétyl sont les plus importants. Ces propriétés aromatisants ne sont pas toujours souhaitables, car elles sont redoutables dans la brasserie et dans le cas de nombreux produits(**Chemlal-Kheraz,2013**).

1.6.2. Domaine médical

Les bactéries lactiques (LAB) ont une grande importance dans le domaine médical grâce à leurs nombreuses applications et bénéfiques pour la santé humaine. Voici quelques-unes des principales contributions des bactéries lactiques dans la médecine :

1.6.2.1. Probiotiques et Santé Digestive

Les LAB sont largement utilisées comme probiotiques pour améliorer la santé digestive. Elles contribuent à maintenir un équilibre sain du microbiote intestinal, ce qui peut prévenir et traiter diverses conditions gastro-intestinales telles que la diarrhée, le syndrome de l'intestin irritable (SII), et les infections à *Clostridium difficile* (**Sanders, M. E., et al. (2013). Hill, C., et al. (2014).**

1.6.2.2. Modulation du Système Immunitaire

Les LAB peuvent moduler le système immunitaire en stimulant la production de cytokines et d'anticorps, et en renforçant les réponses immunitaires innées et adaptatives. Cela peut aider à prévenir les infections respiratoires et autres maladies infectieuses.(**Bermudez-Brito, M., et al. (2012).**

1.6.2.3. Réduction du Cholestérol

Certaines souches de LAB ont montré la capacité de réduire les niveaux de cholestérol sérique, ce qui peut aider à prévenir les maladies cardiovasculaires. Elles peuvent agir

en décomposant les sels biliaires dans l'intestin, ce qui réduit l'absorption du cholestérol.(Roos, N. M., & Katan, M. B. (2000).

I.6.2.4. Propriétés Anticancéreuses

Les LAB peuvent avoir des effets anticancéreux en modifiant le microbiote intestinal, en inhibant la croissance des agents pathogènes et en produisant des composés bioactifs qui peuvent inhiber la prolifération des cellules cancéreuses.Rafter, J. (2004).

I.6.2.5. Amélioration de la Santé Buccodentaire

Les LAB sont également utilisées pour promouvoir la santé buccodentaire. Elles peuvent réduire la plaque dentaire, les caries et les maladies parodontales en inhibant la croissance des bactéries pathogènes dans la cavité buccale.Meurman, J. H., & Stamatova, I. (2007).

CHPAITRE II :

STRESS OXYDATIF ET ACTI-

VITE ANTIOXYDANTE

II. Chapitre 02 : Stress oxydatif et l'activité antioxydant

II.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme l'incapacité de l'organisme de se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants (AO). Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels. Plusieurs facteurs influencent le stress oxydatif, certains augmentant la production des ERO comme la consommation élevée d'O₂ au cours d'une activité sportive intense consommatrice d'énergie, d'autres réduisent les capacités anti oxydantes tels que le déficit enzymatique congénital en G6PD. En effet, l'oxygène est à l'origine du processus de vieillissement cellulaire et en 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant : le superoxyde dismutase (SOD) qui élimine le radical libre anion superoxyde produit par réduction univalente de l'oxygène. Cette découverte fondamentale montre indirectement que des radicaux libres sont produits dans notre organisme. **(Defraigne et al., 2008)**.

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques). A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement **(Desmier, 2016)**.

Le danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN, les lipides (peroxydation) et les protéines **(Ma, 2010 ; Defraigne et Pincemail, 2008)**. Pour éviter les conséquences du stress oxydant, il est important de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant **(Bensakhria, 2018)**. alors, les antioxydants aident à se protéger du stress oxydant **(Baudin, 2020)**.

Tableau 2: Exemples des pathologies liées au stress oxydatif (**Bensakhria, 2018**).

Maladies où le stress Oxydatif est la cause primordiale	Maladies où le stress Oxydatif est le facteur déclencheur	Maladies entraînant un stress oxydatif secondaire
Cancers, Auto-immunité, Cataracte	Maladie d'Alzheimer, Stérilité masculine, Rhumatismes, athéromes, asthmes.	Diabète, Insuffisance rénale

II.2. La réaction oxydatif

Les radicaux libres fréquemment appelés espèces réactives d'oxygènes (ERO), ont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié (électrons célibataires). Instable, doté d'une forte énergie. Les radicaux libres sont des éléments très réactifs, car leur électron a tendance à se ré-apparier en déstabilisant ainsi d'autres molécules, qui vont devenir à leur tour des radicaux libres en initiant une réaction en chaîne (**D'Acosta, 2003**).

L'oxygène, les ions superoxydes, les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène et les métaux de transition sont les principaux radicaux libres présents dans les cellules aérobies, notamment les cellules humaines. Les radicaux libres de la cellule oxydent les molécules (molécules à l'intérieur des cellules, en particulier les lipides), ce qui entraîne la mort des cellules. Cependant, le corps humain dispose de mesures de protection contre les effets des radicaux libres. Les peroxydes et les métaux de transition sont détruits par les enzymes, tandis que les protéines ou d'autres molécules emprisonnent les radicaux libres (**Hubert, 1998 et Halliwell, B. 1996**).

II.2.1. Rôle des radicaux libres

Les radicaux libres jouent un double rôle dans les systèmes vivants : ce sont des sous-produits toxiques du métabolisme aérobie, qui provoquent des dommages oxydatifs

et des dysfonctionnements tissulaires, et ils servent de signaux moléculaires activant des réponses bénéfiques au stress (Di Meo et Venditti, 2020).

III.3. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules oxydables qui, en agissant comme donneurs d'hydrogène vis-à-vis d'un radical hydroperoxyde, interrompent la réaction en chaîne de formation des peroxydes (White, 1994). Ce sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire (Poknory, 2001).

II.3.1. Les types d'antioxydants

II.3.1.1. Antioxydants naturels

Présents naturellement dans certains aliments, comme les fruits, les légumes, les noix, les graines et les huiles végétales. Parmi les exemples d'antioxydants naturels, on trouve la vitamine C, la vitamine E, les polyphénols, les caroténoïdes et le glutathion.

II.3.1.2. Antioxydant synthétiques

Ajoutés aux aliments ou disponibles sous forme de compléments alimentaires. Parmi les exemples d'antioxydants synthétiques, on trouve le BHA (butylhydroxyanisole), le BHT (butylhydroxytoluène) et l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique).

II.3.2. La nature des antioxydants

II.3.2.1. Antioxydant endogène "enzymatique" :

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydants (Super-oxydodismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge.

Trois types d'enzymes anti-oxydantes sont mis en œuvre pour la destruction des "ROS" (figure 1).

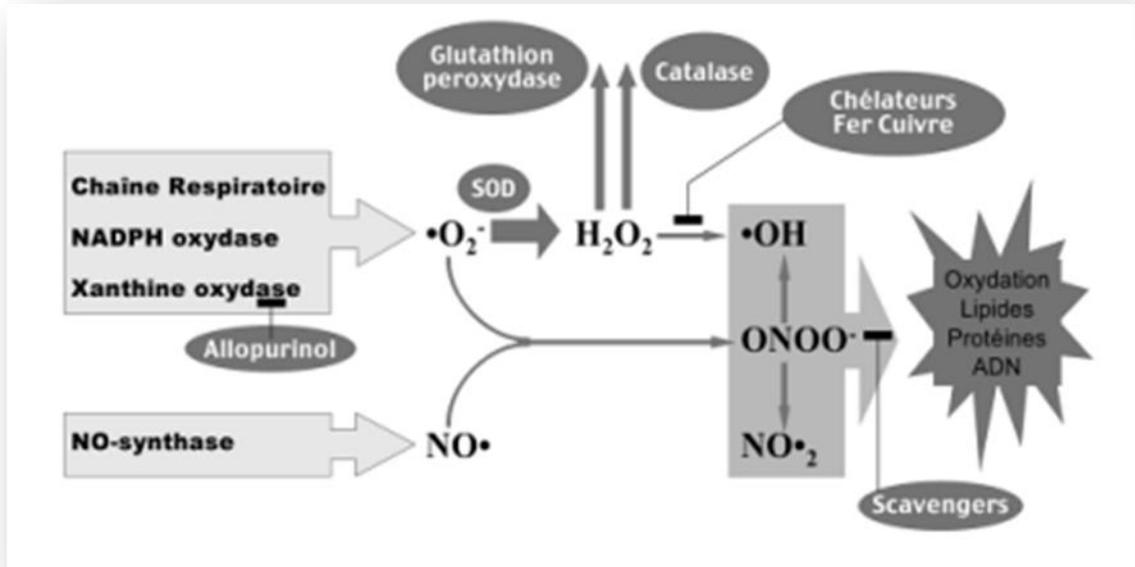


Figure 1: Mécanismes de défense antioxydant et sources des espèces réactives de l'oxygène"

- **La superoxyde dismutase (SOD)** : accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, il existe plusieurs iso enzymes de SOD :SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD)] (**Piquet et Hebuterne, 2007**).
- **La catalase** : présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Piquet et Hebuterne, 2007**).
- **La glutathion peroxydase (GPx)** : La glutathion peroxydase joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, de l'hydro-peroxyde résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH) (**Piquet et Hebuterne, 2007**).

II.3.2.2. Antioxydants exogènes " non enzymatiques "

Il Consiste en un ensemble de composés susceptibles de ralentir considérablement les effets des radicaux libres qui n’ont pas été piégés par les systèmes de défense endogène. Ce sont des molécules exogènes, c’est à dire qu’on ne les trouve pas spontanément dans l’organisme. Les antioxydants tels que les vitamines (A, E et C), les β-carotène, lycopène, ubiquinol, bilirubine, les oligo-éléments comme le zinc, le sélénium, le cuivre, le manganèse, certains polyphénols (les flavonoïdes, les acides phénols, les coumarines, les quinones), et certaines huiles essentielles, constituent la seconde source de défense de l’organisme contre les radicaux libres.

Tableau 3 : Classification des antioxydants

Origine	Nature	Exemples
Naturelle	Endogène	Glutathion, Superoxydismutase (SOD)
	Exogène	Vitamine C, Vitamine E, Polyphénols, Caroténoïdes
Synthétique	—	BHA, BHT, EDTA

II.4. Rôle des antioxydants dans la prévention contre les maladies

Les antioxydants jouent un rôle crucial dans le maintien de la santé humaine en neutralisant les radicaux libres, des molécules instables qui peuvent causer des dommages cellulaires. En prévenant le stress oxydatif, les antioxydants réduisent le risque de maladies chroniques telles que le cancer, diabète, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives. SIDA... Les cellules cancéreuses envahissantes et métastatiques génèrent de grandes quantités de peroxyde d’hydrogène qui fonctionnent comme des molécules de signal impliquées dans la survie de ces cellules. Les antioxydants peuvent supprimer le peroxyde d’hydrogène et inhibent la prolifération des cellules cancéreuses

(Willcox et al., 2004). Aussi, une étude *in vitro* a indiqué que les antioxydants possèdent une forte capacité d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate par intervention aux niveaux de l'activité des protéines de qui interviennent dans la croissance des cellules tumorales (Edeas, 2006).

L'augmentation de l'activité de SOD diminue les superoxydes contenus dans la cellule ce qui réduit les ROS médiateurs de croissance des cellules cancéreuses, ces SOD sont considérées comme une protéine suppresseur des tumeurs (Valko et al., 2007). Les neurones sont très sensibles aux radicaux libres car ils contiennent un niveau très faible de glutathion dans leurs cellules ce qui provoque la maladie d'Alzheimer. Des études *in vitro* sur la culture des neurones ont rapporté que la vitamine E et d'autres antioxydants empêchent la toxicité des radicaux libres conduisant à cette maladie qui est généralement initiée par le peroxyde d'hydrogène (Edeas, 2006).

En régulant la production des radicaux libres dans la cellule, les antioxydants ont la capacité d'améliorer la réponse immunitaire en modulant la réponse excessive du système immunitaire dans les processus anti-inflammatoires. (Wilcox et al., 2004 ; Edeas, 2006), Étant donné que les lymphocytes des patients atteints de SIDA présentent une carence en glutathion *in vivo*. On a suggéré l'utilisation du médicament N-acétylcystéine, un précurseur de GSH, contre cette maladie. En outre, la

La vitamine E est fortement liée à une diminution de la progression de l'infection par le HIV et à une augmentation du nombre de CD4+. (Willcox et al., 2004).

II.5. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants naturels sont divers, incluant le captage de l'oxygène singlet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition. Ce type d'antioxydants possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait

de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au sein des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques.

Tableau 4 : les marqueurs antioxydants, leur mode d'action et intérêt du dosage, ainsi que les valeurs de référence selon le CHU-Liège.

Marqueurs	Mode d'action et intérêt du dosage	Valeurs de référence (CHU-Liège)
Vitamine C	Piégeur de radicaux libres, indicateur de consommation de fruits, valeur plasmatique basse associée à l'apparition des pathologies	H : 8,6 à 18,3 µg/ml, F : 6,2 à 15,8 µg/ml
Vitamine A	Piégeur de radicaux libres, implication dans la vision	1200 à 3700 UI/l
Glutathion réduit/oxydé (GSH/GSSG)	Marqueur de stress oxydatif, interaction avec les antioxydants	GSH : 717 à 1110 µmol/l, GSSG : 0,66 à 1,52 µmol/l
Vitamines B6, B9 et B12	Régulation de la concentration plasmatique d'homocystéine	B9 : 2,2 à 17,5 ng/ml, B12 : 120 à 520 ng/l
Superoxyde dismutase (SOD)	Élimination de l'anion superoxyde	897 à 1143 UI/g Hb
Glutathion peroxydase (GPx)	Dégradation des peroxydes d'hydrogène et des lipides	F : 26-58 UI/g Hb

CHPAITRE III :

Les probiotiques

III. Chapitre 03 : Les probiotiques

III.1.Historique

L'origine du concept des probiotiques remonte au XXème siècle avec le biologiste Elie Metchnikoff, prix Nobel en 1908 pour ses travaux. Ce professeur de l'Institut Pasteur a émis l'hypothèse que la longévité des Bulgares dans les années 1900 était due à leur consommation régulière de grandes quantités de lait fermenté. Ce lait contenait deux bactéries que sont *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Il leur attribua le bienfait de « longue vie » et supposa « que la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour modifier la flore digestive de nos corps et remplacer les microbes dangereux par les microbes utiles».

A cette même époque, Henry Tissier, pédiatre français, a observé que les selles des enfants souffrant de diarrhée contenaient un petit nombre de bactéries caractérisées par une morphologie particulière en forme de Y. Ces bactéries « bifides » étaient au contraire abondantes chez les enfants sains. D'après lui, il serait alors possible d'administrer ces bactéries aux patients souffrant de diarrhée pour les aider à rétablir une flore intestinale saine.

En 1954, c'est Vergio qui a été probablement le premier à associer ce concept au terme « probiotique » qui signifie en langue grecque « pour la vie ». En 1965, Lilly et Stillwell utiliseront le mot « probiotique » pour désigner des substances produites par des microorganismes qui favorisaient la croissance d'autres micro-organismes.**.Matib, L., Hadeif, M., Boukhedena, N., & Alioua, S. E. (2020).**

III.2.Définition

les probiotiques sont des « microorganismes vivants qui, lorsqu' ils sont administrés en quantité adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l' hôte ». Ce sont des acteurs incontournables de développement et d' innovation dans les domaines des industries alimentaires et médicales. Ces

microorganismes, généralement des bactéries, influencent la santé humaine et animale et protègent par exemple de certaines infections intestinales, participent à la digestion et influencent le système immunitaire. Leur consommation régulière permet de contribuer à l'action des 600 espèces bactériennes (représentant environ 10¹⁴ bactéries) présentes dans l'intestin humain où, par exemple, elles participent à la digestion et à la stimulation du système immunitaire. Leur inclusion dans les aliments ou les compléments alimentaires est en constante progression depuis une dizaine d'années. De nombreux aspects du mode d'action et de l'effet de ces microorganismes sur l'être humain ainsi que de leur interaction avec l'aliment sont cependant inconnus à l'heure actuelle et limitent leur utilisation industrielle.(Fuller, 1991)(Metchnikoff, 1907).

III.3. Probiotiques de nouvelle génération

Outre les souches probiotiques traditionnelles, la recherche s'est sur la caractérisation de nouvelles souches à effet probiotique qui constituent des habitants naturels dans l'intestin. De nombreuses bactéries intestinales non caractérisées auparavant ont été associées à la progression de maladies spécifiques, de maladies spécifiques, ainsi désignés comme des probiotiques de nouvelle génération.

Par exemple, *Akkermansia muciniphila* a été étudié pour sa capacité à moduler le métabolisme et l'immunité de l'hôte. L'*Akkermansia muciniphila* a été utilisée pour moduler le métabolisme et l'immunité de l'hôte (Frakolaki et al 2020).

Les espèces de *Clostridium* (C.) ont également été considérées comme des PNB potentiels. Bien que certaines souches de *Clostridium*, telles que *Clostridium perfringens* et *Clostridium difficile*, figurent parmi les agents pathogènes de nombreuses souches de *Clostridium* sont non-toxicogènes de *Clostridium* sont actuellement utilisées comme probiotiques. Des souches spécifiques, dont *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. cellulolyticum*, *C. ljungdahlii* et *C. thermocellum* sont étudiés en tant que PNG (Frakolaki et al 2020).

De plus, l'autorisation de *Bacteroides xyloxydans* dans les aliments par la Commission européenne encourage la poursuite de l'étude des applications des espèces de *Bacteroides*. La famille des Eggerthellaceae comprend également des PNG potentiels, en raison de l'activité biologique de ses métabolites, qui présentent des avantages pour la santé et la sécurité; Telques les propriétés anti-inflammatoires, anti-cancérigènes, cardio-pulmonaires et anti-inflammatoires, et neuroprotecteurs.

Faecalibacterium prausnitzii a été signalé pour maintenir l'homéostasie et l'intégrité intestinales par la production de butyrate et améliorerait également les troubles intestinaux, tels que les maladies inflammatoires de l'intestin ou la maladie de Crohn.

En outre, il pourrait avoir des propriétés thérapeutiques potentielles contre le cancer. *Parabacteroides goldsteinii* peut également se comporter comme un potentielle, car elle possède des propriétés anti-obésité, anti-inflammatoires anti-inflammatoires et insulino-sensibilisantes (Lin et al. 2019).

En outre, il existe des preuves que les mélanges de probiotiques peuvent être plus efficaces que les souches individuelles. Par exemple, mélange de *Lb. Acidophilus* W70, *Lb. casei*, *Lb. salivarius*, *Lactococcus lactis*, *B. Bifidum* et *B. infantis*, ainsi que des mélanges de *Lb.*

Lb. paracasei B21060 et B21070 et *Lb. acidophilus* B21190, ainsi que le mélange de *Lb. B21190* et le mélange de *Lb. casei* et *Lb. acidophilus* inhibent plus avec plus de succès la croissance du pathogène que chaque souche seule. De même, la combinaison de *Lb. GG*, *Lb. rhamnosus*, *Propionibacterium freudenreichii* et *B. breve* ou *B. lactis*, *L. rhamnosus* GG, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* et *L. johnsonii* améliorent les propriétés de liaison au mucus des probiotiques.

Le mélange de *Lb. GG*, *Lb. rhamnosus*, *Propionibacterium freudenreichii* et *B. breve* est également plus efficace que les souches individuelles pour empêcher l'adhésion des agents pathogènes.

En outre, il a été déclaré que le mélange de *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. salivarius*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus*, *S. thermophilus* et *E. faecium* est plus efficace pour réduire les infections gastro-intestinales les enfants en bonne santé par rapport à *Lb. casei* ou *Lb. rhamnosus* seuls.

Parmi les différentes combinaisons, les mélanges de souches bactériennes non bifido ont été plus efficaces que les mélanges contenant une ou plusieurs souches de Bifido que les mélanges contenant une ou plusieurs souches de *Bifidobacterium*, *bifidobacterium*, ce qui indique que les bifidobactéries peuvent être inhibées par d'autres espèces au sein d'un mélange multi-souches.

Plus généralement, différentes espèces peuvent s'inhiber mutuellement en produisant des agents antagonistiques ou en entrant en compétition pour les nutriments. Ainsi, une grande de genres dans un mélange probiotique multi-souches peut donc diminuer (**Rowland 2011**).

III.3.1. Critères de sélection des probiotiques

Les souches probiotiques susmentionnées peuvent être incorporées dans les systèmes alimentaires, à condition que certains critères de sécurité et de qualité soient remplis. Plus précisément, les exigences en matière de sécurité imposent que les probiotiques proviennent d'un tractus gastro-intestinal humain sain, qu'ils ne déconjugent pas les sels biliaires et que les bactéries ne soient pas porteuses de gènes de résistance aux antibiotiques transmissibles et qu'elles ne soient pas pathogènes ou associées à des maladies ou des troubles.

III.4. Les souches probiotiques sélectionnées

Les souches probiotiques sélectionnées doivent être prouvées comme des substances GRAS et leurs effets sur la santé doivent être cliniquement vérifiés (**Daliri et Lee 2015 ; Saarela et al. 2000 ; Wessels et al. 2004**).

Les souches doivent être capables de survivre lors de leur passage dans les tractus gastro-intestinal.

Elles doivent tolérer l'acidité du suc gastrique, de la bile sécrétée dans le système digestif supérieur et des enzymes pancréatiques, afin d'atteindre l'intestin grêle.

En outre, ils doivent être capables d'adhérer aux surfaces intestinales afin d'atteindre l'intestin grêle.

Afin d'apporter leurs bienfaits, concurrencer les bactéries potentiellement pathogènes par la production de substances antimicrobiens et, éventuellement, de présenter des propriétés antimutagènes et anticancérigènes.

Enfin, ils doivent stimuler le système immunitaire sans effet pro inflammatoire (**Daliri et Lee 2015 ; Saarela et al. 2000**).

Les souches doivent également présenter des propriétés technologiques. En particulier, les cellules probiotiques doivent résistance aux conditions aérobies et une capacité de production à grande échelle.

En outre, elles doivent fournir des produits présentant des niveaux élevés et constants de probiotiques pendant la transformation et le stockage, des caractéristiques sensorielles satisfaisantes tout au long de leur durée de conservation (**Daliri et Lee 2015 ; Saarela et al. 2000 ; Tripathi et Giri 2014 ; Mattila-Sandholm et al. 2002**).

Les souches probiotiques doivent être contribuer à la fermentation lorsqu'elles sont incorporées dans les produits fermentés dans les produits fermentés aux côtés des cultures de départ, sans inhiber la croissance de l'une ou l'autre des souches ajoutées. En outre, les produits probiotiques finaux doivent être stables et présenter des propriétés similaires ou améliorées (c'est-à-dire viscosité, texture, etc.) par rapport aux produits conventionnels (**Mattila et al., 2006**).

Dans les cas où la matrice alimentaire constitue un environnement favorable pour les probiotiques, ces derniers peuvent se développer dans un environnement stable favorable aux ceux-ci sont ajoutés sous forme libre.

Dans le cas contraire, les bactéries doivent être protégées afin d'améliorer leur action et d'assurer leur viabilité au cours de la transformation alimentaire et le passage dans le tractus gastro-intestinal humain. Pour cette raison, la mi-

croencapsulation et/ou l'incorporation de substances prébiotiques sont proposées.

III.5. Effet des probiotique

Effets bénéfiques des probiotiques Les bactéries lactiques peuvent jouer un double rôle comme agents de fermentation alimentaire et potentiellement comme agents bénéfiques pour la santé. Les effets des bactéries probiotiques sont multiples: la modification du pH, augmentation d'IgA sécrétoires et la synthèse des bactériocines conduisant à limiter l'implantation de microorganismes pathogènes. Elles maintiennent la barrière physique qui représente l'épithélium intestinal et ont des effets sur l'immunité en conduisant à une diminution des cytokines pro-inflammatoires et une modulation de l'orientation de la réponse immune adaptative. Elles peuvent prévenir les maladies intestinales, atténuer l'intolérance au lactose, améliorer l'équilibre microbien intestinal, présentant des effets anti-hypercholestérolémies et anti-hypertenseurs, soulager des troubles post-ménopausiques et réduire la diarrhée du voyageur. Des études récentes ont également porté sur leurs utilisations dans le traitement des maladies de la peau et de la bouche. En outre, Ils peuvent améliorer la prévention du cancer par la réduction de la concentration des enzymes cancérogènes et des métabolites putréfiants dans l'intestin, l'atténuation des allergies et des maladies atopiques chez les nourrissons. Ainsi que la prévention des infections des voies respiratoires (rhume, influenza) et le traitement des infections urogénitales et la thérapie des cardiopathies ischémiques(Matib, L., Hadeif, M., Boukhedena, N., & Alioua, S. E. (2020).

III.6. Mécanisme d'action des probiotiques

Les probiotiques font actuellement l'objet d'un certain consensus dans la communauté scientifique grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Plusieurs mécanismes par lesquels certains probiotiques exercent des effets protecteurs ou thérapeutiques ont été proposés. Parmi ces principaux mécanismes d'action, on retrouve

le renforcement de la barrière intestinale, l'inhibition de l'adhésion des pathogènes à la muqueuse intestinale, la production de substances antimicrobienne et la modulation du système immunitaire.

III.6.1. Inhibition de l'adhésion des pathogènes : phénomène de compétition/exclusion

Les bactéries lactiques probiotiques peuvent exclure ou réduire la croissance d'autres micro-organismes dans le tractus gastro-intestinal, par compétition directe ou indirecte pour les nutriments ou la surface d'adhésion (**Saiz Vieco,2019**).

Les probiotiques exercent une action antimicrobienne en s'opposant à l'invasion des microorganismes pathogènes dans le tube digestif tout en empêchant leur adhésion aux parois intestinales (**Vanderpool et al., 2008**). En effet, il existe une compétition directe entre les souches probiotiques et les germes infectieux pour occuper les sites d'adhésion. Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif et peuvent le coloniser de manière prolongée. Cette propriété pourrait constituer un avantage écologique favorisant leur implantation ; par conséquent, l'inhibition de la fixation des germes pathogènes. Ainsi, les probiotiques jouent un rôle de barrière physique contre les microorganismes pathogènes.

Les probiotiques comme *Lb. plantarum* ou *Lb. rhamnosus* stimulent la production de mucine dans les cellules intestinales ce qui empêche l'adhésion des souches pathogènes de *Salmonella*, *Clostridium* et *E. coli*. (**Saiz Vieco,2019**).

III.6.2. Production de substances antimicrobiennes

Les probiotiques pourraient également limiter la croissance des pathogènes en exercent une action antimicrobienne indirecte. Cette dernière se réalise grâce à la production de différents composés antimicrobiens.

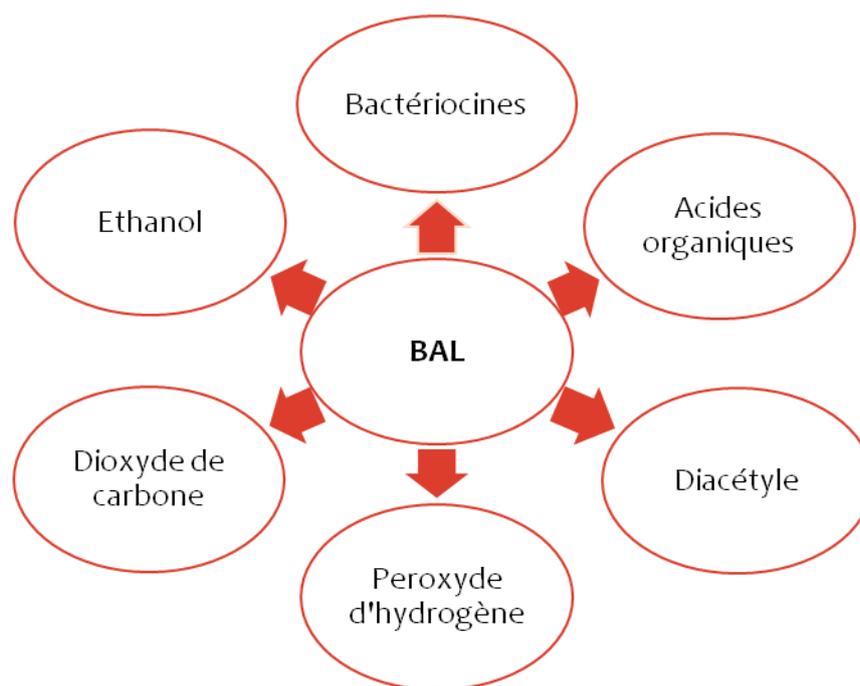


Figure 2: Substances antimicrobiennes produits par les bactéries lactiques (**Saiz Vieco,2019**)

III.6.2.1. Les bactériocines

Ce sont des composés protéiques qui ralentissent les invasions des souches bactériennes (**Klaenhammer, 1993**). Ces substances nocives produites par les probiotiques sont dirigées contre des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. Elles agissent principalement sur la membrane externe des bactéries cibles en formant des pores qui mènent à la libération du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie affectée. Les lactobacilles et les lactocoques, contrairement aux souches de bifidobactéries, sont le plus souvent associés à la production de bactériocines (**Fooks and Gibson, 2002**). La nisine, qui est produite par la bactérie *Lactococcus lactis*, est la bactériocine la plus documentée.

III.6.2.2. Les acides organiques

Les bactéries probiotiques ont la capacité de produire des acides organiques qui contribuent à l'inhibition des agents pathogènes, Il s'agit de l'acide lactique et l'acide acétique, qui sont produits respectivement par les lactobacilles et les bifidobactéries via la fermentation des hexoses. Ces acides organiques, produits à partir de glucides ingérés lors de la prise alimentaire, contribuent à faire baisser le pH intestinal. Leur diffusion passive à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée

permet, après leur dissociation, d'acidifier le cytoplasme et donc d'inhiber la propagation, la croissance et la survie des agents pathogènes acido-sensibles (**Servin, 2004**).

III.6.2.3. Le diacétyle

Le diacétyle est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arôme des produits laitiers. Les genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus* peuvent synthétiser le diacétyle.

Les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyle que les bactéries Gram positif. (**Tahlaiti, 2019**).

III.6.2.4. Le peroxyde d'hydrogène

Certaines bactéries lactiques produisent, en milieu humide, du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui inhibe de nombreuses souches bactériennes pathogènes, La production du peroxyde d'hydrogène accompagnée par celle d'acide lactique permet l'inhibition du développement des espèces pathogènes comme certains virus tel que le virus de la fièvre aphteuse, certains champignons comme *Candida albicans*, ou encore certaines bactéries comme *Escherichia coli*(**Ouwehand and Vesterlund, 2004**).

III.6.2.5. L'éthanol

L'éthanol, produit par les bactéries lactiques hétéro-fermentaires en tant que produit de la voie de la glycolyse, affecte la fluidité de la membrane. Le diacétyle généré par l'excès de pyruvate lors du métabolisme du citrate interfère avec l'utilisation de l'arginine en réagissant avec la protéine de liaison à l'arginine des bactéries à Gram négatif.

III.6.2.6. Dioxyde de carbone

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone (CO_2) Comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Son accumulation dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire. (**Tahlaiti, 2019**).

III.6.3. Stimulation de l'activité du système immunitaire intestinale

L'interaction des probiotiques avec le système immunitaire permet d'accroître la réponse immune de l'hôte contre les agents entéropathogènes. En effet, les probio-

tiques interviennent dans la stimulation de l'immunité adaptative, tel que la production des anticorps de type IgA (Shu and Gill, 2002), ainsi que l'immunité innée tel que la production des macrophages, des monocytes, etc.(Oelschlaeger, 2010). Par conséquent, les probiotiques agissent comme des adjuvants en modulant une réponse rapide de la muqueuse intestinale et renforçant ainsi le système immunitaire intestinal.

III.7. Propriétés et critères de sélection des probiotiques

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne. Une série de principes généraux et de critères pratiques selon la FAO/WHO (2002) ont été mis en place pour sélectionner les souches probiotiques les plus sécuritaires (tableau 05). (Tahlaiti, 2019).

Tableau 5: : Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques.(Alegre,2009)

<p>Critères de sécurité</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Critères de sécurité histoire de non pathogénicité. • Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques. • Souche déposée dans une collection de cultures internationale. • Aucune possibilité de transmission de gène de résistance aux antibiotiques. • Pas déshydroxylation des sels biliaires
<p>Critères fonctionnels</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tolérance à l'acidité gastrique. • Tolérance à la bile. • Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production des substances antimicrobiennes (bactériocines).

- Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou mucus.
 - Stimulation du système immunitaire.
-

Critères technologiques

- Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini.
 - Conservation des propriétés probiotiques
-

PARTIE II :

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I :

MATERIEL ET METHODES

Partie II : Etude expérimentale

I. Matériels et méthodes

I.1 l'objectif

Cette étude vise à isoler des bactéries lactiques à partir de différents échantillons élaborée à partir du lait de vache de la région Ouest de l'Algérie (Saida) afin d'étudier les caractéristiques phénotypiques et biochimiques des isolats et explorer l'effet probiotique et anti oxydant des souches .

I.2 présentation du lieu de l'étude expérimental

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire microbiologie 04 et biochimie 05 de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Moulay Taher « Saida » qui a été effectué durant la période du février jusqu'à 05 juin 2024.

I.3 Présentation d'échantillons

L'isolement des souches de bactérie lactique a été effectué à partir des produits laitiers " beurre, Lait (Lben) " fermentés traditionnellement par une famille utilisant " Chekoua " provenant de la wilaya de Saida ; les échantillons ont été prélevées dans des flacons stériles d'ou on les met dans une glacière tout on respectant les conditions aseptiques puis acheminé au niveau de laboratoire le jours même .

Tableau 6 : les caractéristiques d'échantillons

Echantillon	Code	Couleur	Texture	Nature	Region
Beurre	B	Blanc jaunâtre	SolideFerme et crémeux	Lait de vache	Saida (Ain el hdjer)
Lait "Lben"	L	Blanc	Liquide Onctueux	Lait de vache	Saida (Ain el hdjer)

I.4 Isolement et purification des souches lactiques

Puisque l'échantillon beur de nature solide, une suspension mère est nécessaire dans cela ; 1 g d'échantillon a été ajouté dans un tube stérile contenant 9 ml d'eau physiologique. Puis agiter au vortex pendant 5min pour obtenir la première dilution. Autrement l'échantillon du lait n'as pas besoin de cette préparation.

Des dilutions décimales sont ensuite réalisées en cascade jusqu'à la dilution $1/10^6$ dans l'eau physiologique.

1ml de chaque dilution a été prélevé etensemencé en profondeur puis on ajoute le milieu MRS, MRS saccharosé et MRS Rouge Congo,l'incubation a été faite à 30°C pendant 72h .

Après les 72h, les colonies qui apparaissent blanchâtres et crémeuses sont soumises à un enrichissement sur bouillon MRS incubé à 37°C pendant 24h pour effectuer une série de repiquage sur gélose MRS, MRSs, MRSr qui ont encore incubés à 37°C pendant 24h.

Les repiquages successifs représentent la purification des isolats obtenus

(ZAROUR et al., 2013)

I.5 Etudes macroscopiques et microscopique

L'examen macroscopique permet de mettre en évidence la morphologie des colonies obtenues sur le milieu solide, il s'agit d'une observation à l'œil nu qui consiste à déterminer les paramètres suivants : la forme, taille, pigmentation, viscosité.

Tandis que l'examen microscopique est une technique utilisée dans le but d'écartier tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique après que les isolats ont été soumis à la coloration de Gram.

I.5.1 Coloration de Gram

La coloration de Gram est effectuée sur frottis des isolats pures, grâce à la composition de paroi notamment l'épaisseur du peptidoglycane et par la présence d'une membrane externe , la coloration de Gram permet de distin-

guer deux types des bactéries, les bactéries Gram négatif (G-) et les bactéries positifs (G+) (LARPENT., 1990).

Cette technique nous renseigne sur la morphologie et le mode de regroupement des cellules.

I.6 Test de catalase

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède une enzyme catalase qui dégrade l'eau oxygénée (H_2O_2) en eau métabolique (H_2O) et en oxygène (O_2). L'activité catalytique est détectée en dissociant une colonie dans une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2); l'apparition des bulles révélant le dégagement d'oxygène (AHMED et IRENE., 2007) qui traduit la décomposition du H_2O_2 sous l'influence de l'enzyme à tester (Haddad, 2012)

Seules les souches de bactéries Gram positives et catalase négative seront considérées comme des bactéries lactiques, et il est nécessaire de les conserver pour des recherches ultérieures.

I.7 Conservation

Pour garantir la continuité des tests sur les souches, deux méthodes de conservation ont été employées

I.7.1 Conservation à court terme :

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée, après incubation de 18h à 37°C, les tubes sont conservés à 4°C. Le renouvellement des cultures se fait de 6 à 8 semaines (Badis et al., 2004).

I.7.2 Conservation à long terme :

A partir des cultures jeunes (18h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000t/min pendant 10 min, quand le surnageant est éliminé on ajoute le milieu de conservation sur le culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé 0.3% d'extrait de levure et 30% de glycérol. les cultures sont conservés en suspension dense et en tubes Ependorfs à -20°C.

En cas de besoin, les cultures sont récupérés dans le lait écrémé à 0.5% d'extrait de levure deux fois avant l'utilisation(SAIDI et al., 2002 ; GUESSAS et KIHAL., 2004).

I.8 Type de fermentation

Le caractère homo ou hétéro fermentaire est mis en évidence sur bouillon MRS sans extrait de viande, le milieu est réparti dans des tubes à essai dans lesquels des cloches de Durham remplies entièrement de bouillon. Après autoclavage, les tubes sont inoculés par une culture bactérienne jeune puis incubés pendant 24h à 37°C.

I.9 études de pouvoir probiotique

Les bactéries lactiques (LAB) sont les probiotiques les plus fréquemment utilisés dans les aliments et boissons fermentés et comme compléments alimentaires pour les humains ou les animaux, en raison de leurs multiples caractéristiques bénéfiques, qui semblent être partiellement associées à leurs propriétés antioxydants ;les LAB peuvent contribuer à améliorer la qualité et la saveur des aliments et à prévenir de nombreux troubles causés par l'oxydation chez l'hôte. Dans ce contexte les souches lactiques sont considérées comme probiotiques s'ils ont les critères major suivants :

- Antagoniste avec les souches pathogènes
- Sensibilité aux antibiotiques
- Aucune activité hémolytique
- Résistance à l'acidité
- Résistance aux sels biliaires
- Formation de biofilm

I.9.1 Activité antimicrobienne

Pour déterminer l'activité antimicrobienne de 13 souches de BL, plusieurs méthodes peuvent être utilisées. Dans cette étude en utilisant la méthode de diffusion des agents antimicrobien en disque ; l'effet inhibiteur de ces 13 souches a été évalué vis du-à-vis des 8 souches indicatrices suivant (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtili*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus*, *Klebseilla pneumoniae*, *Candida albicans*).

Pour chaque souche, un inoculum a été préparé sur une gélose MH à partir d'une culture bactérienne de 24 heures.

La densité cellulaire de cet inoculum a été ajustée en le diluant dans de l'eau physiologique stérile et en le comparant visuellement à la solution de Mc Farland, dont la concentration finale est de **10⁶ufc/ml**.

Les souches lactiques sontensemencées sur le milieu MRS et incubées pendant 24h à 30°C. Des cylindres de 6 mm de diamètre sont placés sur un milieu de MH inoculés par des souches indicatrices à l'aide d'écouvillons. Les plaques sont laissées à 4°C pendant 4 heures pour une bonne diffusion du métabolite lactiques (**Doumandji et al., 2010**), puis incubées à 37°C pendant 48 h. Après incubation du microorganisme cible, les largeurs des zones inhibitrices sont déterminées (**Boughachiche et al.,2012**).

I.9.2 Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques des BL a été réalisée par la méthode de l'antibiogramme illustrée par (**Leroy et al.,2006**),

Une culture jeune de 18h ont étéensemencé à la surface d'une gélose MRS ; chaque isolat a été testé en vers des disques (10 D'ATB) ; chaque disque a été déposé à la surface des boitesensemencées par des isolats lactiques , après incubation à 30°Cpendant 24h, les diamètre des zones d'inhibition ont été mesuré.

Les antibiotiques utilisée sont :**l'ampicilline (30µg)**, **FC (acide fusidique 10µg)**, **AK (Amikacine 30µg)**, **NTX(Nitroxoline 40µg)**, **CFP(Céfopérazone 30µg)**, **CX(**

Céfoxitine 30µg), LEV(Lévoﬂaxacine 5µg), TOB(Tobramycine 10µg), E(érythromycine 30 µg), FEP(Céféprime 30 µg) .

I.9.3 Activité hémolytique

Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en touche des cultures jeunes des isolats sur gélose Colombia (Sang 5%)(annexe 01) puis incubé à 37°C pendant 48h est nécessaire (jensen,M.A et al., 2008)

I.9.4 La résistance à l'acidité

La résistance des BL à l'acidité a été testée selon le protocole décrit par (Rajoka et al. 2018),qui consiste à inoculer 0.5 ml d'une culture bactérienne jeune de 18 heures dans 5 ml de bouillon MRS ajusté à pH 2.5 et 6.2 (MRS à pH 6.2 comme témoin), la densité optique a été mesurée à 620 nm après 2h d'incubation à 37°C

Le pourcentage de survie a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ de survie} = (\text{DO du MRS pH acide} / \text{DO du MRS pH 6.2}) * 100$$

I.9.5 La résistance aux sels biliaires

0.1 ml des souches sont ensemencées dans 10 ml de Na Cl ajusté à pH 8 supplémenté de 0.3% de sels biliaires et incubées à 37°C pendant 4h (Prasad et al., 1998)..

La croissance a été vérifiée à T₀, T=2h, T=4h par la méthode classique de dénombrement sur gélose MRS à partir des dilutions décimales.

T : temps

I.9.6 Biofilm

Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm in vitro ont été établies, tel que la méthode quantitative et qualitative de la microplaque 96puits (Freeman et al.1989 ; Mathuret al., 2006)

A partir d'une culture jeune de 18 h à 30°C dans le milieu MRS liquide.

Les puits d'une microplaque de 96 puits (polystyrène) sont inoculés avec 0.1ml de suspension diluée de bactéries à laquelle sont ajoutés 0,1ml de MRS à 5%, saccharose. Les microplaques sont incubées pendant 24 heures à 30°C. Les puits sont lavés

trois fois avec 0,2 ml de l'eau physiologique stérile afin d'éliminer les bactéries libres (Planctoniques). Après Ajouter l'alcool pendant 5 minutes fixé le biofilm formé puis laver, Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec du cristal violet (0,1%) (**Stepanovic et al., 2000**). L'excès de colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée et les plaques sont laissées pour le séchage, la formation de biofilm se manifeste par un dépôt violet (**Hola etRuzicka, 2011**).

I.10 Etude de pouvoir antioxydant

A. Principe

Le DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre, stable ou accepteur d'hydrogène de couleur violet intense (**Cavar et al., 2009**). Ce radical perd sa coloration native quand il se lie avec des substances antioxydants, qui lui transfèrent des électrons ou des protons. La forme réduite du DPPH confère à la solution une couleur jaune (**Gadow et al., 1997**). Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration découle, de la nature, de la concentration et de la puissance des principes actifs présents (**kroyer, 2003 ; Es Safi et al., 2007**).

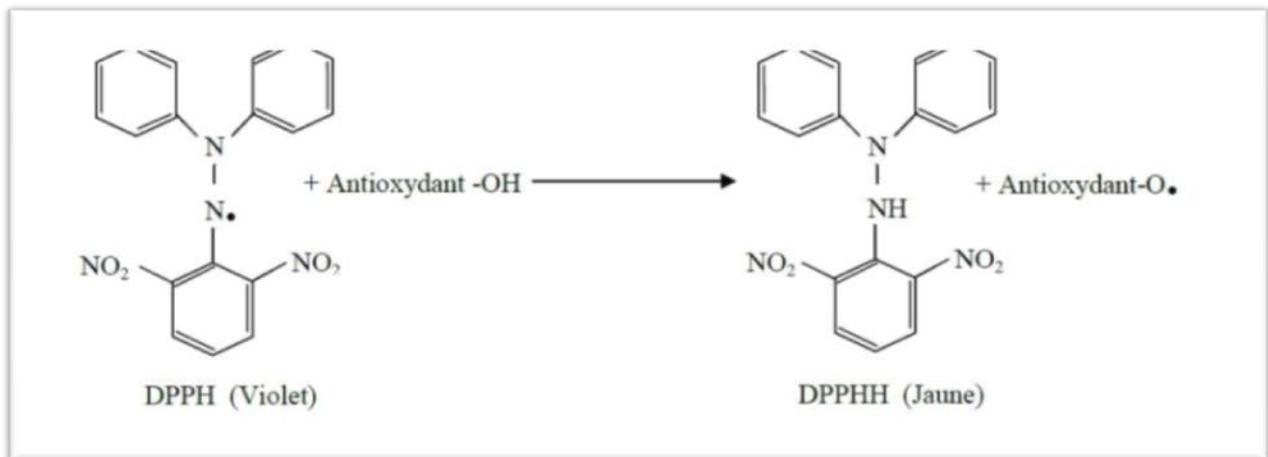


Figure 3: Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (**Congo, 2012**).

B. Mode opératoire

L'activité de piégeage de DPPH (0.2 mmol/l) a été examinée selon à la méthode de (**Bougatef et al. 2010**).

-1ml de solution DPPH préparée dans de l'éthanol a été ajoutée aux tubes stériles contenant 1ml de chaque souche bactérienne puis incubées 30 min dans l'obscurité à la température ambiante.

- Après l'incubation on effectue une centrifugation de 3000t/min pendant 10 min, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.

L'activité antioxydants a été calculée à l'aide de loi suivants :

$$\% \text{ Activité} = ((A_0 - A) / A_0) \times 100$$

A : absorbance

A₀ : absorbance de vitamine C (témoin)

A₀ : absorbance de dpph

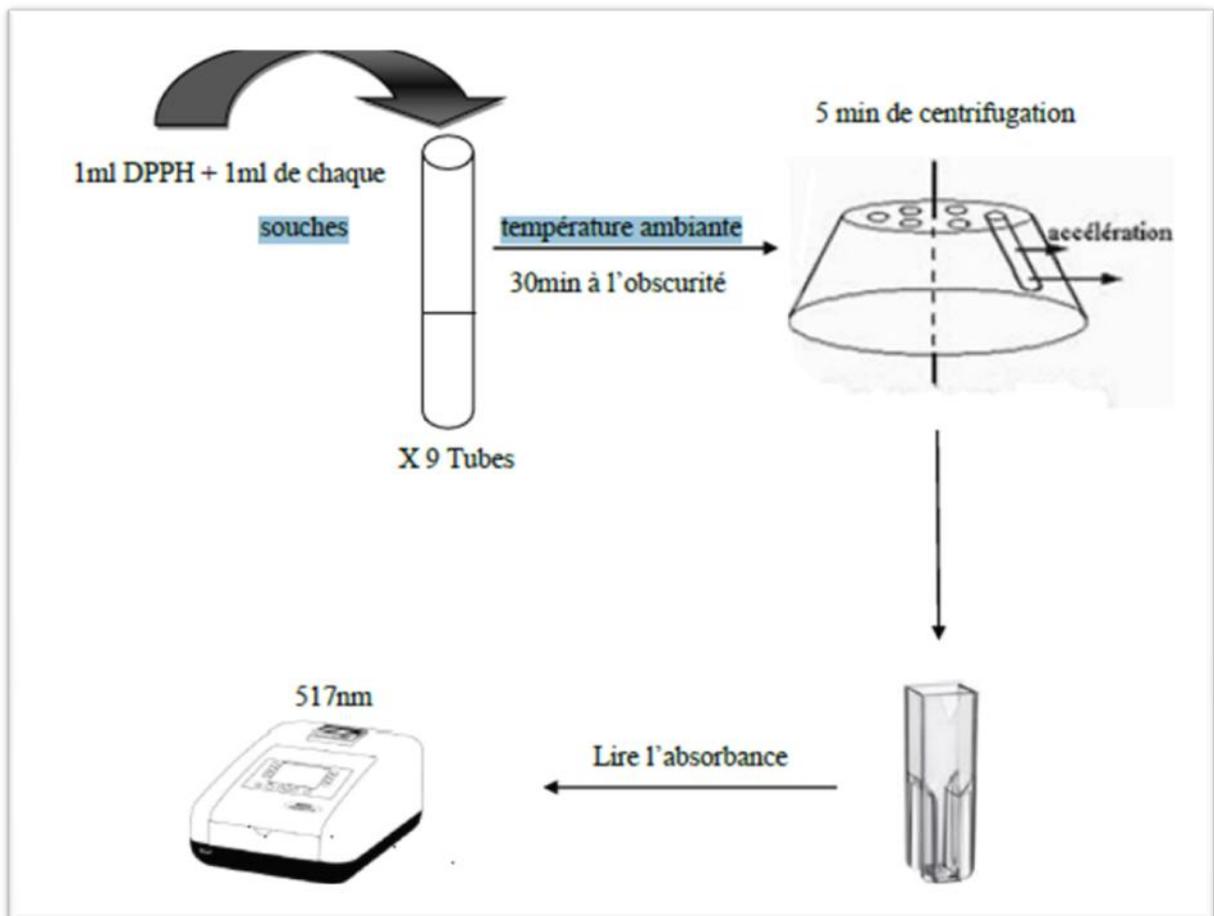


Figure 4 :un schéma représente les étapes du test de la capacité de piégeage des radicaux libres par le DPPH. (Hsu et al. 2008).

CHAPITRE II

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

II.1 Isolement et caractérisation des BL

trente isolats ont été isolée à partir des boites de MRS RC ,MRS saccharosé et MRS qui possèdent les caractères suivants : Sur milieu MRS+RC montre des colonies circulaire, bombés et de couleur marron ou noire leur taille est d'environ 1mm à 6mm de diamètre, Sur milieux MRS montre des colonies circulaires bombées lenticulaire et blanchâtres de taille moyenne environ 1 à 2 mm petites maximum 1mm de diamètres.

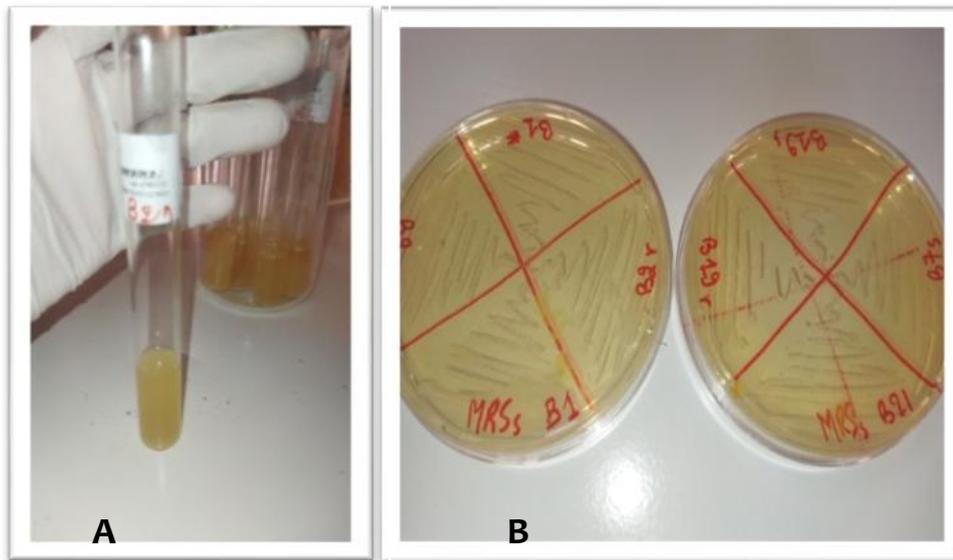


Figure 5 : Résultats d'examen macroscopique des souches en bouillon (A)et Gélose MRS (b) .

Les bactéries lactiques sont connues pour produire des EPS, soit visqueux ou non visqueux (**Roger.,2010**). La recherche de production conduit sur milieu MRS riche en saccharose et rouge Congo, qui donne des colonie de couleur marron ou noir pour souche productrice et rouge pour souche non productrice (**Oucharet al, 2013 ; Boukhelifa,2017**).

Puisque les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles ; la purification a été réalisée sur milieux MRS (Figure 5).

A partir 30 isolats, 15 isolats été catalase négative et le Gram+ (Cocci et bacille) l'observation microscopiques pour les isolats Gram + sont présent dans l'annexe 04. Toutes ces colonies isolées ayant un aspect macroscopique des souches lactiques sur milieu MRS solide (**Figure 5.B**) qui semble des colonies petites, rondes, blanches, et cette caractéristique indique que ces isolats appartiennent aux groupe bactéries lactiques (**De Vos et al.,2009, Ababsa, 2012**). Les résultats de cette étude est présenté sur le tableau suivant.

Tableau 7:Le profil physiologique et biochimique des isolats.

Souche	Gram	Forme	Catalase	Type fermentaire
B1	+	Bacille	-	Homo
B1*	+	Bacille	+	Homo
B2r	+	Cocci	+	Homo
B2s	+	Cocci	-	Homo
B3	+	Cocci	+	Homo
B4	+	Cocci	+	Homo
B5₁	+	Cocci	-	Homo
B5₂	+	Cocobacille	+	Homo
B6	+	Cocci	-	Homo
B7	+	Cocci	-	Homo
B7s	+	Cocci	-	Homo
B8	+	Cocci	-	Homo
B9	+	Cocci	-	Homo
B9r	+	Cocci	-	Homo

B9r*	+	Cocci	+	Homo
B10	+	Cocci	-	Homo
B11s	+	Cocci	+	Homo
B12	+	Cocci	+	Homo
B12r	+	Cocci	+	Homo
B13	+	Coco bacille	-	Homo
B13r	+	Coco bacille	-	Homo
B14s	+	Cocci	+	Homo
B15	+	Cocci	+	Homo
B17₁	+	Coco bacille	-	Homo
B17₂	+	Coco bacille	+	Homo
B17₃	+	Coco bacille	-	Homo
B18	+	Cocci	+	Homo
B19r	+	Cocci	+	Homo
B19s	+	Cocci	-	Homo
B21	+	Cocci	+	Homo

Le test de la catalase a révélé que les 15 souches étaient négatives à la réaction de la catalase. Selon le Bergey's Manuel de la Systématique Bactérienne « les Firmicutes », les lactobacilles sont catalase négative (**De Vos et al., 2009**)

L'observation microscopique a montré que a partir de 15 isolats on a que 13 isolats ont été des bactéries a gram positif(confirmation), se présentent

sous forme de coques et bacille disposés en diplocoques et en chainettes et leurs aspects microscopiques sont décrit dans le tableau 8. (Figure annexe 05)

Tableau 8 : aspect microscopique des souches à gram positif

Souches	Gram	Aspect microscopique
B1	+	Bacille, diplocoques ,en chaines
B2S	+	Cocci, diplo, en amas ,résine
B2r	+	Cocci ,diplo, en amas, en chainettes
B51	+	Bacille , polysate en chaines,diplo
B6	+	Bacille, allongé, en amas
B7	+	Bacille, en chaines, en amas ,diplocoque
B7S	+	Bacille, en amas ,diplocoque
B8	+	Cocci isoler , diplocoques ,en amas en chaines
B13	+	Coque, titrât , diplocoques, en chaines
B13r	+	Coque, titrât , diplocoques, en chaines
B171	+	Bacille, isolé, palysat , en chaines
B173	+	Bacille, isolé, diplocoques, en

		amas
B19S	+	Bacille, palysat , diplocoque, isolé

Le type fermentaire ce test permet de différencier les souches homolactiques des hétérolactiques après une incubation à 37°C pendant 24 heures. Nos isolats montrent aucune production de gaz (CO₂) à partir du glucose n'a été observée, ainsi, elles sont considérées comme homofermentaires. (**Figure 7**); On n'a observé aucune production de gaz dans la cloche de 12 tubes, Les souches sont homofermentaire; Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactobacilles(**Thompson et al., 1994**).

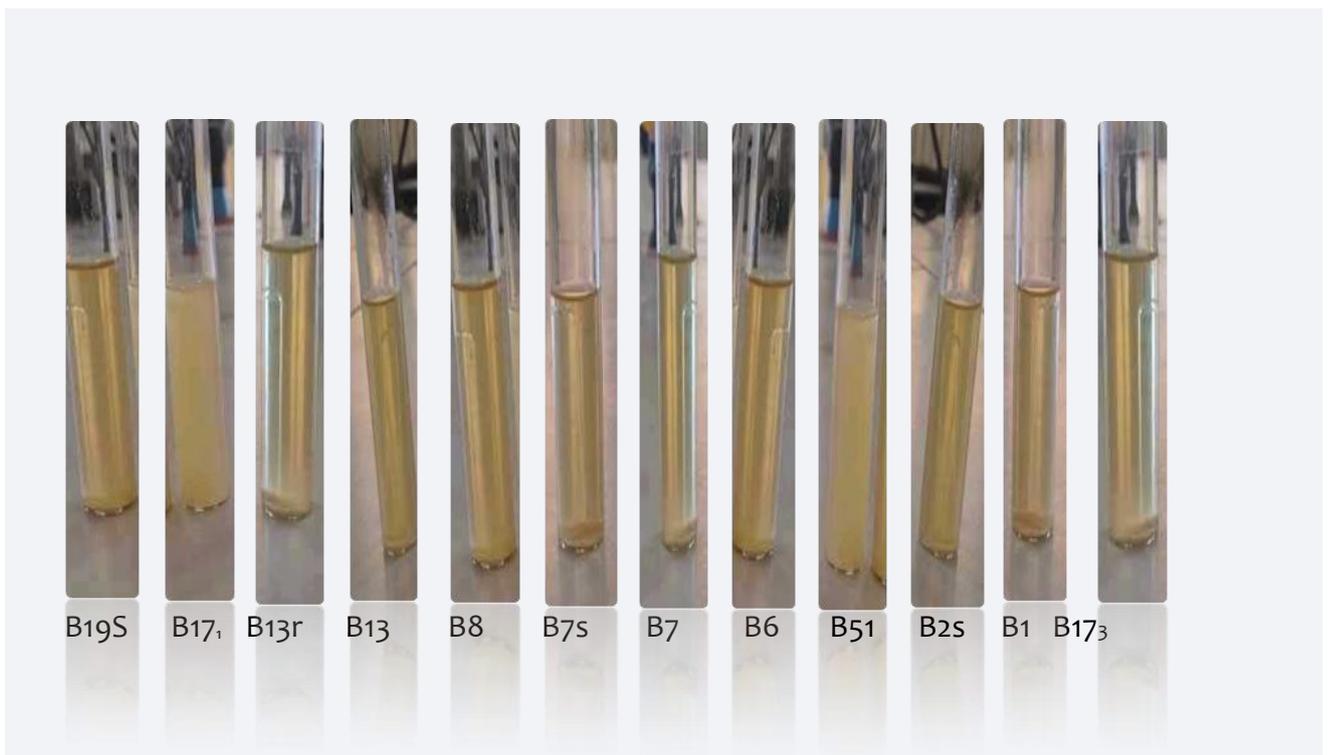


Figure 6 : Le test fermentaire négatif qui présente le type homofermentaire.

Afin de maintenir les microorganismes dans un état viable et stable sur une longue période, tout en préservant leurs caractéristiques génétiques et phénoty-

piques deux méthodes de conservation (figure 08) (A : conservation long durée ,B : conservation court durée)

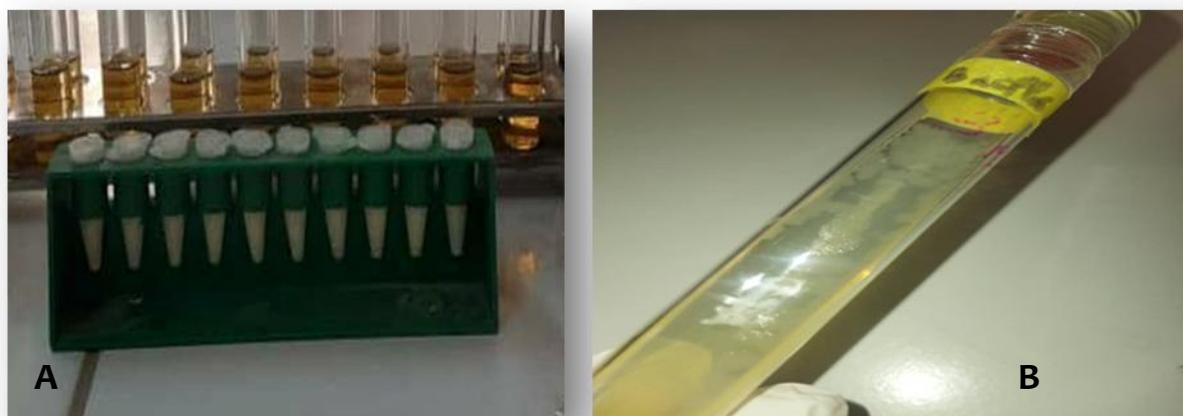


Figure 7: Résultats de conservation des bactéries lactiques à long et à court terme (A : conservation long durée , B : conservation court durée)

II.2. Etude de pouvoir probiotique

II.2.1. Activité antimicrobienne des isolats lactiques

L'évaluation du pouvoir antagoniste des isolats lactiques a été étudié vis-à-vis trois souches cibles, indicatrices d'altération, à savoir huit souches pathogènes. L'inhibition se traduit par la formation des zones claires, autour des souches ensemencées par disque. Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en centimètre et représentés dans le tableau (9) et les figures suivantes :

Les isolats exercent une activité inhibitrice qui se traduit par l'apparition d'un halo clair d'inhibition autour les disques.

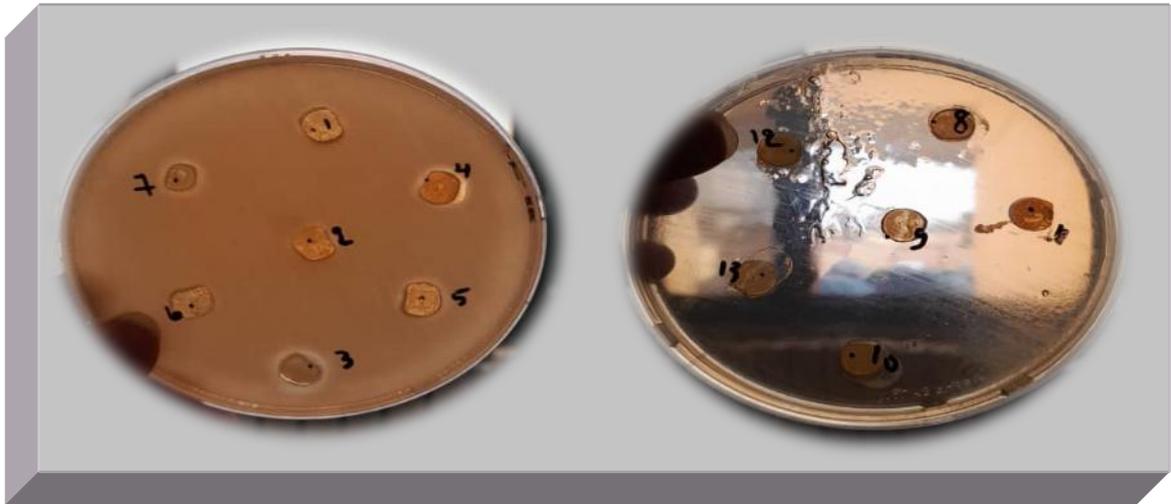


Figure 8 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice Staphylococcus



Figure 9 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice Staphylococcus aureus

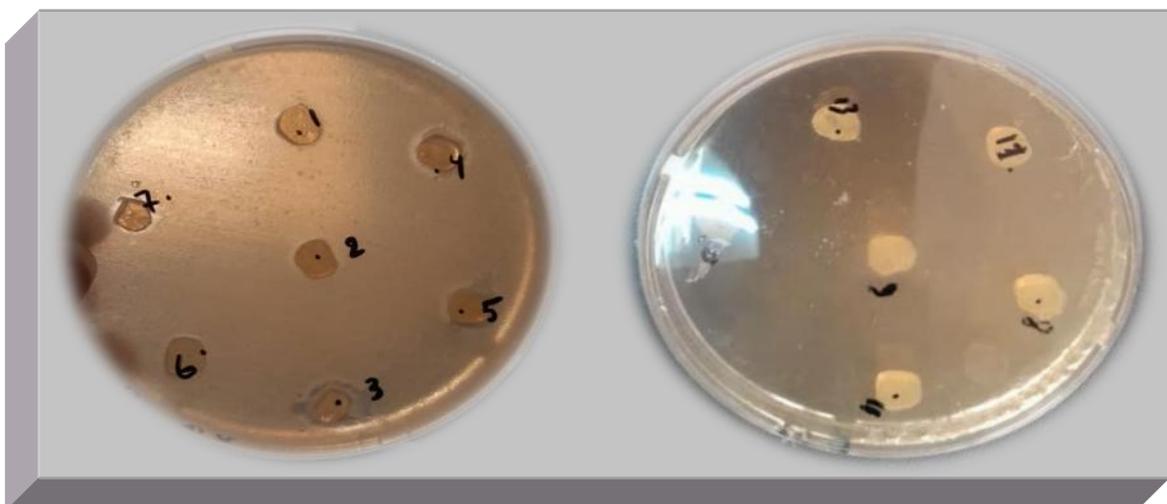


Figure 10 :Résultats de tests antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice *Pseudomonas aeruginosa*

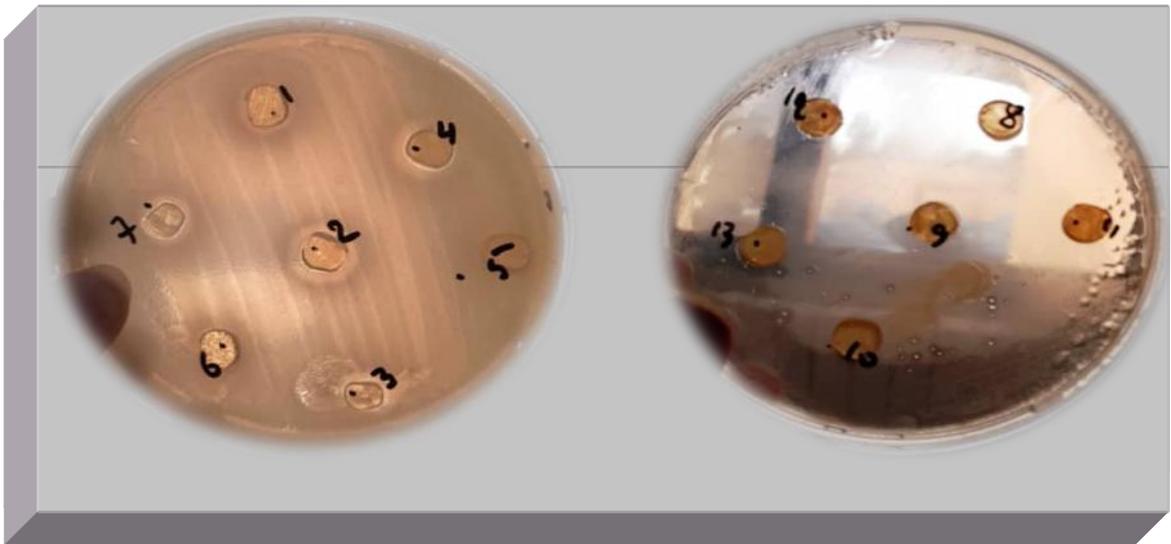


Figure 11 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice *C.q*

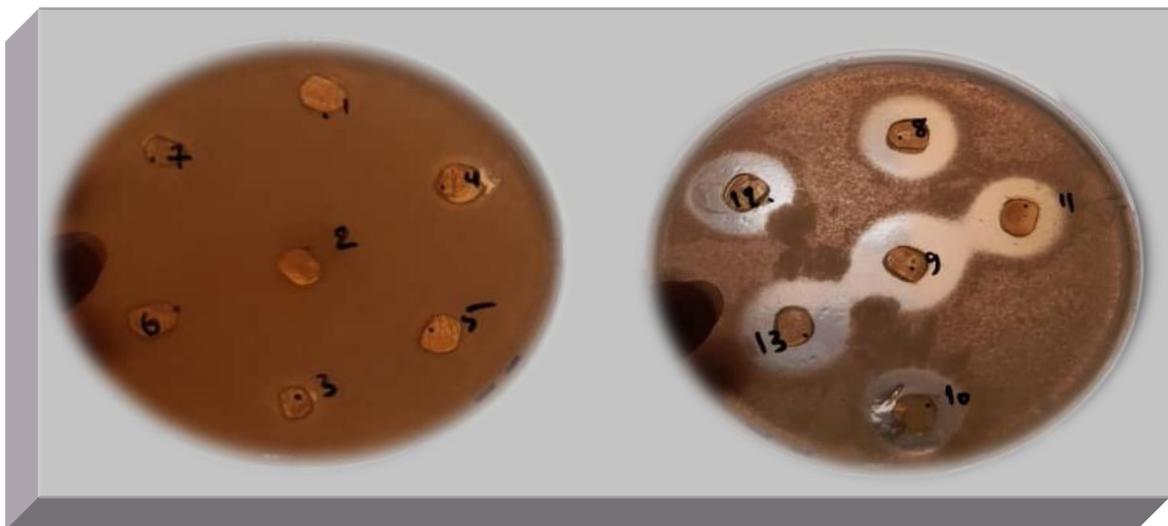


Figure 12 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice *Enterococcus faecalis*

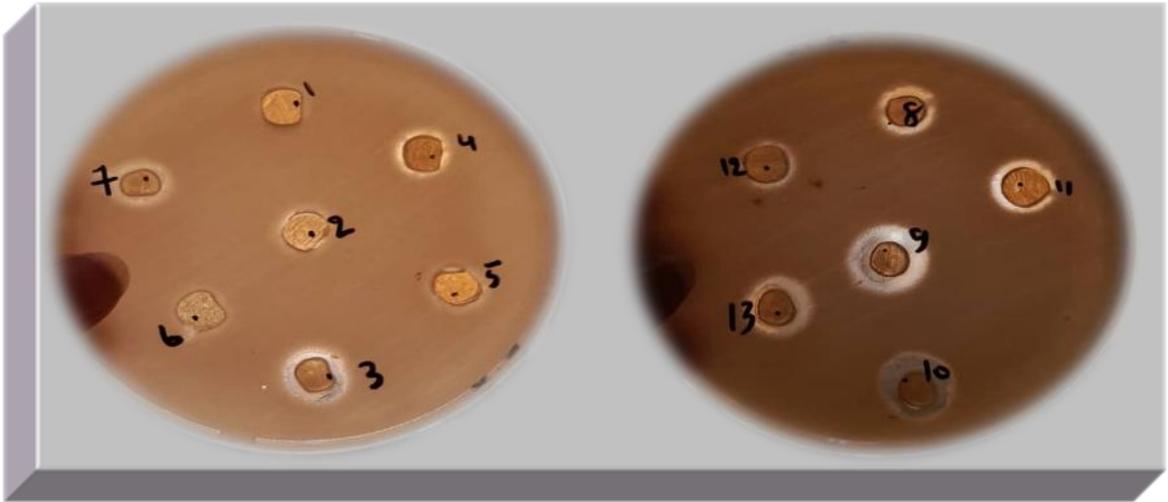


Figure 13 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice *Klebsiella pneumoniae*



Figure 14 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice *Bacillus subtilis*



Figure 15 :Résultats de test antimicrobien des 13 isolats vis-à-vis la souche indicatrice Escherichia coli

Tableau 9 :Résultats des interactions entre les souches de bactéries lactiques et les souches pathogènes.

Souche	P.a	S.a	E.C	B.S	E.f	S	K.p	C.p
B1	0	0	16	17	17	0	12	0
B2s	0	0	17	19	17	0	1	0
B2r	0	0	0	09	0	0	0	0
B5 ₁	0	0	17	18	19	0	11	0
B6	0	0	17	16	17	0	1	0
B7	0	0	18	18	20	0	13	0
B7s	11	9	0	9	0	1	7	1
B8	8	1	1	8	0	8	7	13
B13	0	0	16	16	19	0	9	0
B13r	1	1	11	1	11	9	9	12
B17 ₁	7	1	9	7	0	1	11	1
B17 ₃	0	0	11	0	0	0	0	1
B19s	12	12	1	1	7	1	11	7

D'après le tableau montrent que l'activité antimicrobienne de nos isolats ont fluctué entre la petite activité (zone d'inhibition de 7 mm) à l'activité la plus élevée (zone d'inhibition de 20 mm). Nos isolats marquent une forte activité antimicrobienne contre ces quatre agents pathogènes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*).

Sur la base des résultats obtenus (tableau9), il s'avère que tous les isolats possèdent une activité antibactérienne contre *E. coli*, avec des diamètres d'inhibition variant de 9cm pour B17₁ et B7 à 18cm, autrement aucune activité observée chez B2r et B7s. Le même résultat est noté pour les douze isolats qui ont exprimés une activité antibactérienne vis-à-vis *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sauf B17₃, dont l'inhibition la plus élevée est de 19 cm enregistrée avec le B2s.

Cependant une absence d'inhibition est remarquée avec la souche lactique B2s vis-à-vis *Pseudomonas aeroginosa*, cette dernière s'est montrée sensible à l'action du reste des souches lactiques avec un intervalle de 8 à 12mm.

Il faut signaler également que la plus forte activité antibactérienne est observée chez le B7 contre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (20 mm).

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603
<i>Pseudomonas aeroginosa</i> ATCC 31480
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231

En conséquence, l'activité inhibitrice des LAB sur les bactéries testées sous le test de superposition pourrait être due à tous les métabolites ; acide lactique, acide acétique, di-acétyle, bactériocine, etc. Par conséquent, la zone d'inhibition qui a été observée autour des disques dans la méthode de diffusion par disque de gélose pourrait être le résultat de la bactériocine ou bien des EPS.

En général, il a été constaté que les effets inhibiteurs des souches potentielles probiotiques contre les bactéries pathogènes à Gram positif sont plus faibles que ceux des souches probiotiques. Les Lactobacilles exercent des effets protecteurs ou thérapeutiques en produisant des composés antimicrobiens, en abaissant le pH, en entrant en compétition avec les pathogènes sur les sites de liaison, en stimulant les cellules immuno-modulatrices et

en entrant en compétition avec les pathogènes dans les aliments (**Abotsi, 2011**).

Le rôle de l'inhibition de la croissance des lactobacilles probiotiques dans le surnageant acellulaire a été prouvé dans de nombreuses études antérieures qui concordent avec nos résultats. (**Aminnezhad et al., 2015 ; Beristain et al., 2016 ; Koohestani et al., 2018 ; Moradi et al., 2019 ; Yang et al., 2021**).

En outre, la caractéristique commune de la plupart des souches probiotiques de *Lactobacillus* est la capacité de ces bactéries à produire des métabolites et divers composés antimicrobiens, y compris de petits peptides, des bactériocines et des acides organiques, tels que l'acide butyrique, acétique et lactique (**Jena, 2013**).

II.2.2. Etude de sensibilité aux antibiotiques

La relation entre l'antibiorésistance et les probiotiques est complexe et multidimensionnelle. Les probiotiques offrent une approche prometteuse pour prévenir et gérer l'antibiorésistance. Certains probiotiques peuvent produire des substances antimicrobiennes naturelles (**Bellil et al 2014**), comme les bactériocines, qui inhibent la croissance de bactéries résistantes aux antibiotiques. L'inquiétude fondamentale que suscitent les caractéristiques de résistance aux antibiotiques est leur tendance à se propager à d'autres bactéries potentiellement nocives, ce qui peut entraîner des difficultés et réduire l'efficacité de l'antibiothérapie.

Cinq isolats ont été choisis et subis l'étude de sensibilité aux antibiotiques cela a été basé sur leur activité antimicrobienne. La sensibilité aux antibiotiques est traduite par l'apparition d'un halo (figures suivantes).

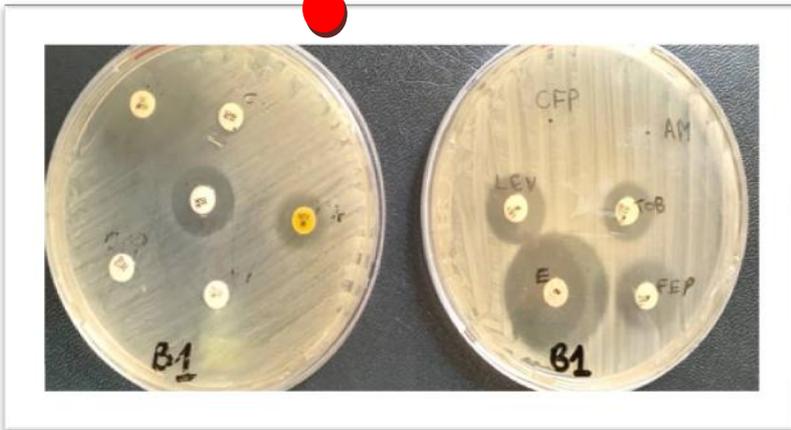


Figure 16 :Résultat de sensibilité de la souche B1 aux antibiotiques

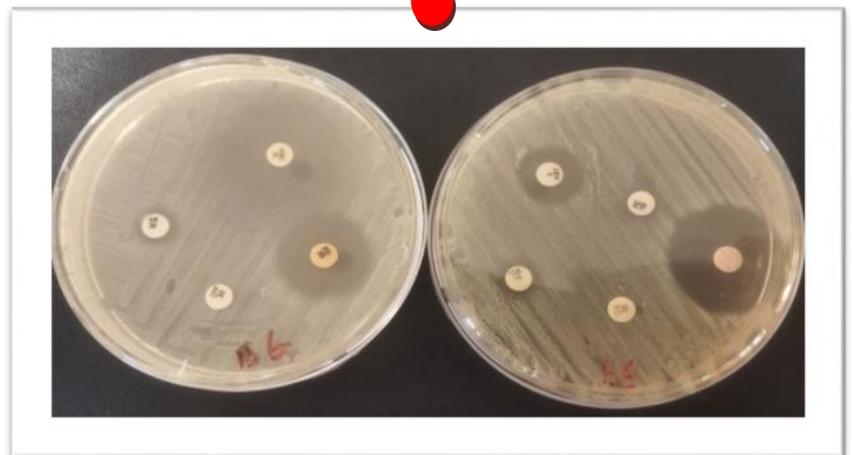


Figure 17 :Résultat de sensibilité de la souche B6 aux antibiotiques

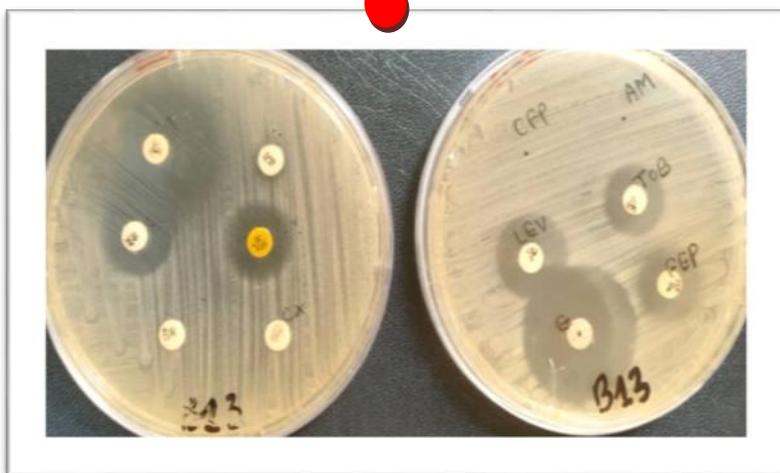


Figure 18 :Résultat de sensibilité de la souche B13 aux antibiotiques

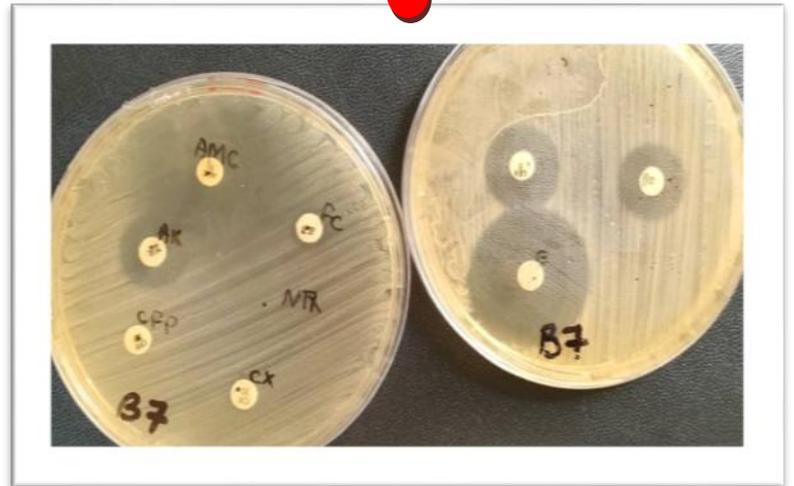


Figure 19 :Résultat de sensibilité de la soucheB7 aux antibiotiques



Figure 20 :Résultat de sensibilité de la souche B51 aux antibiotiques

Tableau 10 : Résultats de l'antibiogramme des souches lactiques

	AMC	FC	AK	NTX	CFP	CX	LEV	TOB	E	FEP
B1	28	8	16	13	08	08	16	13	29	17
B5₁	26	8	13	16	07	07	18	13	27	17
B6	30	8	10	/	07	07	15	9	27	/
B7	32	9	16	/	0	0	1.9	17	30	/
B13	33	9	18	17	0	0	1.8	16	30	17

/ : Sans antibiotique

R : Résistante

Les résultats obtenus montrent que les 03 souches (B1 , B5₁ , B6), sont sensibles à toutes les ATB ; par contre les souches (B7 , B13) présentent une résistance aux deux antibiotiques (CFP , CX)

les souches peuvent être classées comme sensibles ou résistantes aux antimicrobiens selon (EFSA,2012)

Sensible (S) : une souche bactérienne est définie comme sensible lorsqu'elle est inhibée à une concentration d'un antimicrobien spécifique égale ou inférieure à la valeur seuil établie ($S \leq x$ mg/L).

Résistante (R) : une souche bactérienne est définie comme résistante lorsqu'elle n'est pas inhibée à une concentration d'un antimicrobien spécifique supérieure à la valeur seuil établie ($R > x$ mg/L).

La résistance des probiotiques aux antibiotiques peut poser un problème si elle peut être transmise à des pathogènes chez lesquels la résistance thérapeutique pourrait avoir des conséquences néfastes. L'autorité Européenne de Sécurité Alimentaire, suggère que les probiotiques ne doivent pas avoir une résistance acquise aux antibiotiques (Zago et al., 2011).

II.2.3. Etude de l'activité hémolytique

L'étude de l'activité hémolytique a été étudiée sur gélose Colombia au sang. Ce milieu est utilisé pour la détection et la détermination des caractéristiques hémolytiques des isolats sélectionnés, les résultats présentés dans la **figure 23**.

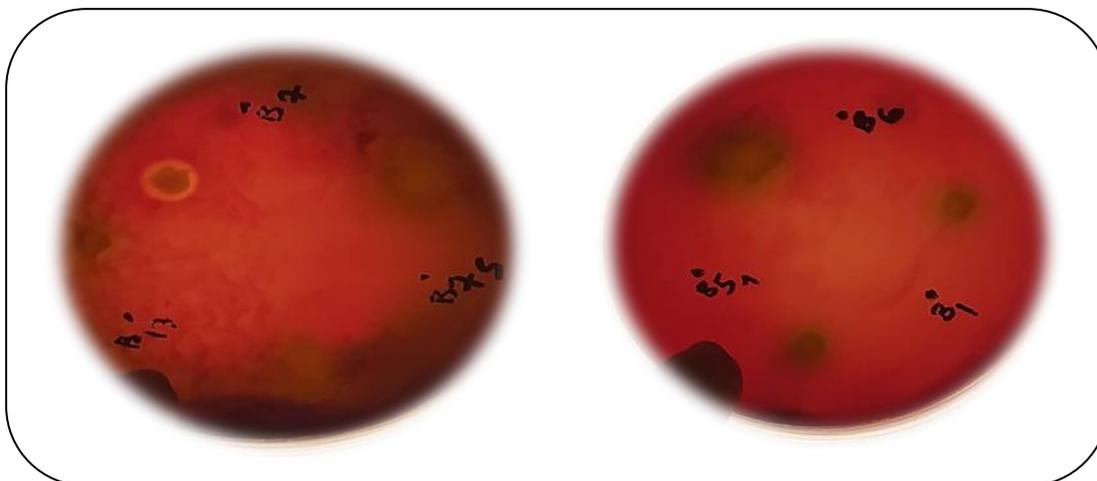


Figure 21 : Résultat de test d'hémolyse des isolats

Les 05 isolats lactiques ne présentaient aucune activité hémolytique, aucune zone d'hémolyse n'a été observée autour des colonies donc le type d'hémolyse pour ces 05 souches lactiques est gamma (**Boulahrouf et al., 2017**).

II.2.4. Etude de résistance à l'acidité et sel biliaire

Pour garantir la colonisation, la survie et l'activité métabolique dans l'intestin, les isolats probiotiques doivent être capables de survivre aux sels biliaires et à un faible pH, faute de quoi ils ne pourront pas bénéficier à la santé et au bien-être de l'hôte. La tolérance aux environnements acides et aux sels biliaires a été considérée comme deux caractéristiques permettant à une souche potentiellement probiotique de survivre dans l'intestin grêle (**Nami et al 2019**).

Un pH de 2,5 et une concentration de 0,3 % de sels biliaires ont été considérés comme des normes pour l'étude des souches probiotiques (**Sahadeva et al., 2011**).

Dans la présente étude, les souches de lactobacillus B6, B7, B13, B5, B1 a montré un taux de survie plus élevé, de l'ordre de 90 %, dans les tests de tolérance à l'acidité (pH 2,5) figure 24. On note aussi que les isolats B5, B6 et B7 présente une

croissance durant les 4h , ce qui indique que ces lactobacilles tolère les sels biliaire à 0,3 % (tableau11).

Il a été rapporté que *Lactobacillus* survit et prolifère abondamment dans un bouillon MRS enrichi de sel biliaire à 0,3 % (Jose et al. ; 2015), ce qui est similaire à notre observation. Selon (Shokryazdan et . 2016), les isolats de *Lactobacillus* étaient tolérants aux acides pendant 3 heures à un pH de 3,0.

Ehrmann et al. (2002) ont découvert que le niveau de tolérance à l'acide différait entre les isolats de *Lactobacillus* testés dans des conditions identiques, ce qui suggère que la capacité de tolérance peut être spécifique à la souche.

Il est toutefois essentiel de noter que les études in vitro portant sur le pH et la tolérance aux sels biliaires ne permettent pas de prédire les schémas de comportement dans le corps humain.

Le pH de l'estomac, qui se situe généralement entre 1,2 et 2,0, fluctue en fonction du repas consommé.

Il a été démontré que le pH de l'estomac augmentait de façon considérable à près de 5,0 après l'ingestion de yaourt et de lait fermenté (Cheng et al. ; 2004).

Test de résistance à l'acidité des 05 isolats sont présents dans la figure suivant :

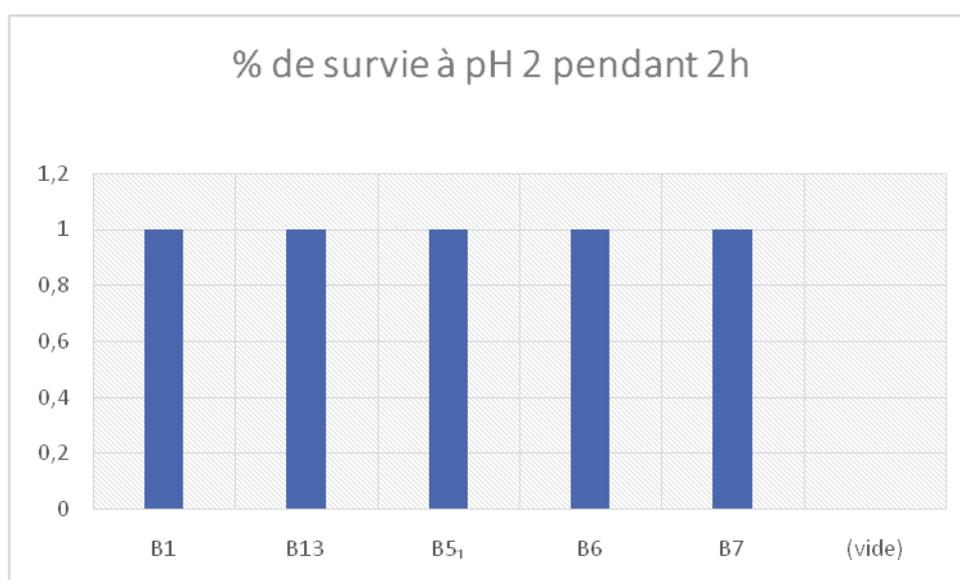


Figure 22 :Test de résistance à l'acidité des 05 isolats

Tableau 11: Résultats de résistance des isolats aux sels biliaires par la méthode de dénombrement

Souche	UFC à T0	UFC à T 2h	UFC à T= 4h
B1	380 ×10 ³	586×10 ³	11×10 ³
B5 ₁	590×10 ³	756×10 ³	596×10 ³
B6	494×10 ³	748×10 ³	524×10 ³
B7	628×10 ³	3632×10 ³	Indénombrable
B13	718×10 ³	Indénombrable	18×10 ³

Depuis ces résultats, on note que les isolats B5₁ , B6 , B7 continuent de multiplier durant les 4h , ce qui indique que ces 03 souches lactiques résistent aux sels biliaires.

II.2.5. Etude de formation de biofilm

La mise en évidence de formation des biofilms été révélé sur une multi-plaque, la croissance des souches été sur milieu MRS saccharose, le but est de confirmé la formation des EPS responsable d'adhésion ; puisque ces souche de Lactobacillus peuvent croitre dans le milieu MRS saccharose mais aussi présentent des colonies marron sur milieu MRS RC. Les études sur l'extraction des EPS en tant que molécules bioactives ont été menées par **FATEH ZAHIRA** et **BENOUIS ARBIA**.

Les résultats obtenus (Figure25) montre que la plupart des souches ayant un dépôt violet au fond des puits (**Stepanovicet al, 2000**).cela veut dire que la formation de biofilm dans le milieu MRS 5% représente le milieux favorable pour la production des EPS d'adhésion.

Après la coloration au violet cristallisée, les résultats de formation de biofilm sont observées et exprimées en positive (+) et négative (-)



Figure 23 :Résultat de formation de biofilm des isolats sur une microplaque

II.3.Etude de pouvoir antioxydant

les LAB probiotiques présentent une activité antioxydant substantielle dans l'intestin de l'hôte et favorisent la production d'enzymes antioxydants pour aider à éliminer les ROS dans l'intestin de l'hôte et atténuer ainsi les dommages oxydatifs(Tao Feng & Jing Wang (2020).

Lorsque les défenses de l'hôte sont affaiblies, divers stress peuvent facilement induire la production de ROS, ce qui peut entraîner un déséquilibre redox et une altération subséquente des biomolécules, pouvant conduire à divers troubles.

Outre leurs puissants systèmes d'oxydoréduction, les probiotiques ont de fortes propriétés antioxydants. Lorsque l'organisme est en état de stress oxydatif, les ROS accumulés provoquent des réactions radicalaires en chaîne en endommageant les biomolécules, ce qui nuit à l'organisme(Tao Feng & Jing Wang (2020).

Les résultats du pouvoir antioxydant des souches testées affichent des pourcentages d'inhibition du radical DPPH appréciables allant de 87,99% 89,95%_83,18%_59,83%_75,10%pour les souches: B1 , B51, b6, b7, b13(Figure 25).

L'étude de l'activité antioxydant souches B6 ,B7 et B13 appartenant aux genres lactobacillus peuvent avoir un potentielle probiotique possèdent une activité antioxydant plus aux moins importante

Le stress oxydatif contribue largement à de nombreux troubles, tels que les maladies cardiovasculaires, inflammatoires, cérébrovasculaires et dégénératives, ainsi que le vieillissement et le cancer(**Grajek et al., 2005, Vasquez et al., 2019**).

Les jeunes animaux sont facilement exposés aux dommages oxydatifs parce qu'ils n'ont pas de système antioxydant mature dans leur tractus intestinal, ce qui entraîne un déséquilibre entre les systèmes oxydatif et antioxydant ainsi qu'une augmentation des radicaux libres et du malondialdéhyde (MDA) et une diminution des capacités enzymatiques antioxydants (**Song et al., 2011, Mueller et al., 2012**).

De nombreuses études ont démontré que les probiotiques, tels que Lactobacillus et Bifidobacterium, possèdent une excellente capacité antioxydante qui leur permet de fournir un certain degré de protection contre le stress oxydatif. (**Wang et al., 2012, Wang et al., 2018**).

Des données suggèrent que certaines souches d'ABL probiotiques peuvent augmenter l'activité des enzymes antioxydantes ou moduler et soulager le stress oxydatif circulatoire afin de protéger les cellules contre les dommages induits par le stress oxydatif (**Dowarah et al., 2018**).

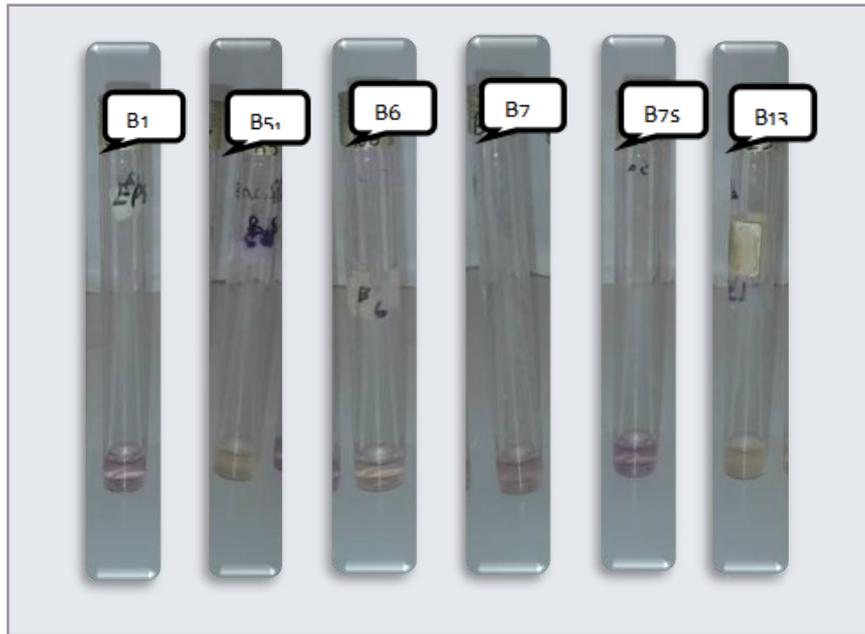


Figure 24: test de DPPH des souches lactiques

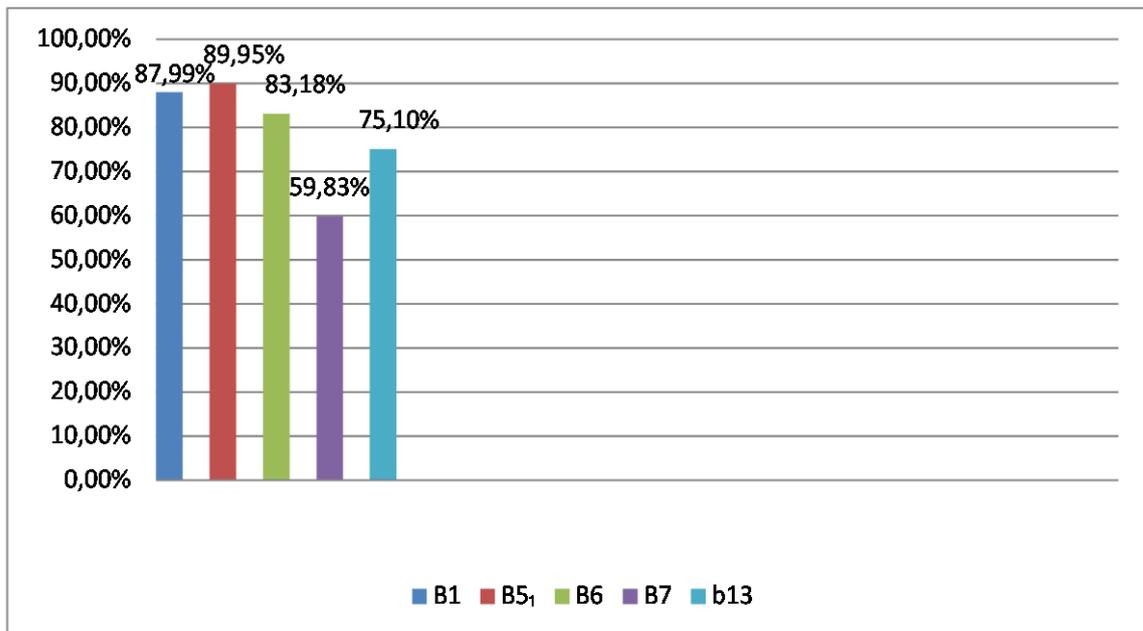


Figure 26 :Pourcentages d'inhibition du DPPH de 05 souches lactiques étudiées.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire pour la préparation et la conservation des produits laitiers qui sont exposés au stress oxydant qui conduit à des pertes de rendement et des menaces de la santé du consommateur

L'objectif de ce travail était de constituer une collection de souches de bactéries lactiques à partir du produit " Beurre " 'Lben' et de sélectionner des souches à effet probiotique et antioxydant.

A l'issue de travail, trente souches ont été isolées et purifiées à partir de notre échantillon de la région Ouest d'Algérie "Wilaya de Saida "

les souches isolées ont été des coques et des bacilles, homofermentaires à Gram positive dépourvues de catalase, Donc sont suspectées d'être des bactéries lactiques et ont été soumis aux tests d'étude de l'activité probiotique et antioxydante .

Les résultats des tests étudiés montrent que les 03 souches lactiques sous le code B1, B5, B6 possèdent un pouvoir probiotique et antioxydant à un potentiel important.

Les perspectives des souches lactiques probiotiques ayant une activité antioxydante sont vastes et prometteuses, couvrant une variété de domaines allant de l'alimentation et la nutrition à la santé publique et la biotechnologie. Leur développement et leur application pourraient apporter des bénéfices significatifs pour l'industrie et les consommateurs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBIOGHRAPHIQUES

- Nami, Y., Vaseghi Bakhshayesh, R., Mohammadzadeh Jalaly, H., Lotfi, H., Eslami, S., and Hejazi, M. A. Probiotic properties of *Enterococcus* isolated from artisanal dairy products. *Front Microbiol.* 10:300. doi: 10.3389/fmicb.2019.00300
- 63. Mueller K, Blum NM, Kluge H, Bauerfeind R, Froehlich J, Mader A. Effects of broccoli extract and various essential oils on intestinal and faecal microflora and on xenobiotic enzymes and the antioxidant system of piglets. *OJAS.* 2012;2:78–98.
 - Bermudez-Brito, M., et al. (2012). *Probiotic mechanisms of action.* *Annals of Nutrition and Metabolism.*
 - Boughachiche, F., Reghioia, S., Zerizer, H., Boulahrouf, A. (2012): Antibacterial activity of rare *Streptomyces* species against multidrug-resistant clinical isolates. In *Annales de Biologie Clinique* 70 (2): 169
 - Cheng, G., Feng, A. N., Mei-Juan, Z., Xiu-Hua Hao, S. J., and Yun-Xia, H. E. Time- and pH-dependent colonspecific drug delivery for orally administered diclofenac sodium and 5-aminosalicylic acid. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 1769 – 1774.
 - Clemente, J. C., et al. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6), 1258-1270.
 - de Roos, N. M., & Katan, M. B. (2000). *Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998.* *American Journal of Clinical Nutrition.*
 - Dowarah R, Verma AK, Agarwal N, Singh P, Singh BR. Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PLoS ONE.* 2018;13:e0192978. doi:10.1371/journal.pone.0192978
 - Dutton, Y. (1996). *Medieval Cuisine of the Islamic World: A Concise History with 174 Recipes.* University of California Press.
 - Ehrmann, M., Kurzak, P., Bauer, J., and Vogel, R. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J Appl Microbiol.* 2002; 92: 966-975.
 - Ferrer, F. P., & Boyd, L. J. (1955). Effect of yogurt with prune whip on constipation.
 - Grajek W, Olejnik A, Sip A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochim Pol.* 2005;52:665–671. doi:10.18388/abp.2005_3428. 61.

- Hill, C., et al. (2014). *Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.
- Holzapfel, W. H., et al. (2001). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1-2), 197-210.
- Jose, N. M., Bunt, C. R., and Hussain, M. A. Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*. 2015; 3: 198 – 212.
- Manzoor, M. (2022). Interview with Ana Langer, Professor of the Practice of Public Health, Harvard TH Chan School of Public Health. In *Women and Global Health Leadership: Power and Transformation* (pp. 81-84). Cham: Springer International Publishing.
- McGovern, P. E., et al. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(51), 17593-17598.
- Metchnikoff, E. (1907). *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. G.P. Putnam's Sons.
- Meurman, J. H., & Stamatova, I. (2007). *Probiotics: contributions to oral health*. *Oral Diseases*.
- Näse, L., et al. (2001). *Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, Lactobacillus rhamnosus GG, in milk on dental caries and caries risk in children*. *Caries Research*.
- Pasteur, L. (1857). Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *Annales de Chimie et de Physique*, 52, 404-418. Lister, J. (1878). On the lactic fermentation and its bearings on pathology. *Transactions of the Pathological Society of London*, 29, 425-467.
- Pereira, D. I., & Gibson, G. R. (2002). *Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*.
- Rafter, J. (2004). *Probiotics and colon cancer*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*.
- Roumaïssa, B. E. S. S. I. L. A., & Leïla, M. E. S. S. A. O. U. D. I. (2021). *Propriétés probiotiques des bactéries lactiques* (Doctoral dissertation, Université laarbi tebessi tebessa).
- Rowland, I., et al. (1998). *Role of bacterial metabolism in the protective effects of dietary fiber against colon cancer*. *Gastroenterology*.
- Sahadeva, R. P. K., Leong, S. F., Chua, K. H., et al. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *Int Food Res J*. 2011; 18(4): 1515 – 1522
- Salminen, S., et al. (1998). Demonstration of safety of probiotics—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2), 93-106.
- Sanders, M. E. (2003). Probiotics: Considerations for human health. *Nutrition Reviews*, 61(3), 91-99.

- Sanders, M. E., et al. (2013). *Probiotics and Prebiotics in Pediatrics*. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., Kalavathy, R., Sieo, C. C., and Ho, Y. W. Safety Assessment of Two New Lactobacillus Strains as Probiotic for Human Using a Rat Model. PLoS One. 2016; 11 (7): e0159851 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159851>
- Song P, Zhang R, Wang X, He P, Tan L, Ma X. Dietary grape-seed procyanidins decreased postweaning diarrhea by modulating intestinal permeability and suppressing oxidative stress in rats. J Agric Food Chem. 2011;59:6227–6232. doi:10.1021/jf200120y.
- Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (1999). *Yoghurt: Science and Technology*. CRC Press.
- Vasquez EC, Pereira TMC, Peotta VA, Baldo MP, Campos-Toimil M. Probiotics as beneficial dietary supplements to prevent and treat cardiovascular diseases: uncovering their impact on oxidative stress. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:3086270. doi:10.1155/2019/3086270.
- Vedamuthu, E. R. (1994). The dairy starter culture industry: an overview. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 14(5), 248-252.
- Vinderola, G., et al. (2005). *Interactions among lactic acid bacteria and Escherichia coli in mixed culture fermentations: influence on growth, acidification and curd-forming properties*. International Journal of Food Microbiology.
- Wang J, Ji HF, Wang SX, Zhang DY, Liu H, Shan DC, Wang YM. Lactobacillus plantarum ZLP001: in vitro assessment of antioxidant capacity and effect on growth performance and antioxidant status in weaning piglets. Asian-Australas J Anim Sci. 2012;25:1153–1158. doi:10.5713/ajas.2012.12079.
- Wang Y, Guo Y, Chen H, Wei H, Wan C. Potential of Lactobacillus plantarum ZDY2013 and Bifidobacterium bifidum WBIN03 in relieving colitis by gut microbiota, immune, and anti-oxidative stress. Can J Microbiol. 2018;64:327–337. doi:10.1139/cjm-2017-0716.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : préparation des milieux des cultures :

Pour 1 litre d'eau distillée, on ajoute 55.3 g de bouillons MRS (Biokar diagnostics) et 17.3 g d'agar (pour la gélose), le tous sur une plaque chauffante avec agitation jusqu'à la dissolution totales des produits. Après l'ajustement du pH (6.4 ± 2) la gélose (ou le bouillon) est répartie dans des flacons de 250 ml et autoclavé pendant 20 mn à 120°C.

Les ingrédients	MRS solide	MRS liquide	MRS sacharosé	MRS-E.V	Mrs rougr congo
peptone	10g	10g	2g	2g	1g
Extrait de viande	8g	8g	1,6g		0,8g
Extrait de levure	4g	4g	0,8g	0,8g	0,4g
glucose	20g	20g			2g
Acétate de soduim	5g	5g	1g	1g	0,5g
Cétrate d'ammonuim	2g	2g	0,4g	0,4g	0,2g
Tween 80	1ml	1ml	0,2ml		0,1ml
Hydrogénophosphate de potassium	2g	2g	0,4g	0,4g	0,2g
Sulfate de magnésuim heptahydrate	0,2g	0,2g	0,04g	0,04g	0,02g
Sulfate de manganése tetrahydrate	0,05g	0,05g	0,01g	0,01g	0,005g
Agar agar	10g		2g		1g
ph	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
Saccharose			20g	20g	
Rouge congo					0,8

préparation du gélose Colombia :

Après autoclavage pendant 20 mn à 120°C. on à ajoute 5ml de sang

Les ingrédients	Valeur
Mélange de peptone	1,8g
Extrait de levure	0,5g
Amidon de maïs	0,1g
Chlorure de soduim	0,5g
Agar	1g
Ph	7,3
Eau distillée	100 ml

préparation du milieu MH :

LES ingrédients	Valeur
MH	38 g
Agar	25 g
Eau distillée	1000 ml

Annexe 2 : préparation des colorants :

➤ Fushine

Fushine basique	1g
Alcool éthylique	10ml
Phénol	5g
Eau distillée	100ml

➤ Lugol

Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillée	300ml

➤ Violet de gentiane

Violet de gentiane	1g
Ethanol a 90%	10ml
Phénol	2g
Eau distillée	100ml

ANNEXE 03 : composition des solutions de titrage

➤ **Solution de NaOH 0,1N :**

Eau distillé 100ml
NaOH 0,4g

➤ **Solution de NaOH 1N :**

Eau distillé 100ml
NaOH 4g

➤ **Acide acétique :**

Acide acétique33ml
Eau distillé..... 100ml

➤ **Lait Ecrémé**

Eau distillée100ml
Lait en poudre10g
autoclavage 110°C/10 minutes.

➤ **Eau physiologique**

Chlorure de sodium.....9g
Eau distillée.....1000ml
Stérilisation à 120°C pendant 20 min

➤ **DPPH**

dpph0,00125
Eau distillée..... 50ml

✓ Agitation pendant 4 h dans l'obscurité

Annexe 04:Technique de Coloration de Gram et technique des dilutions.

Coloration de Gram

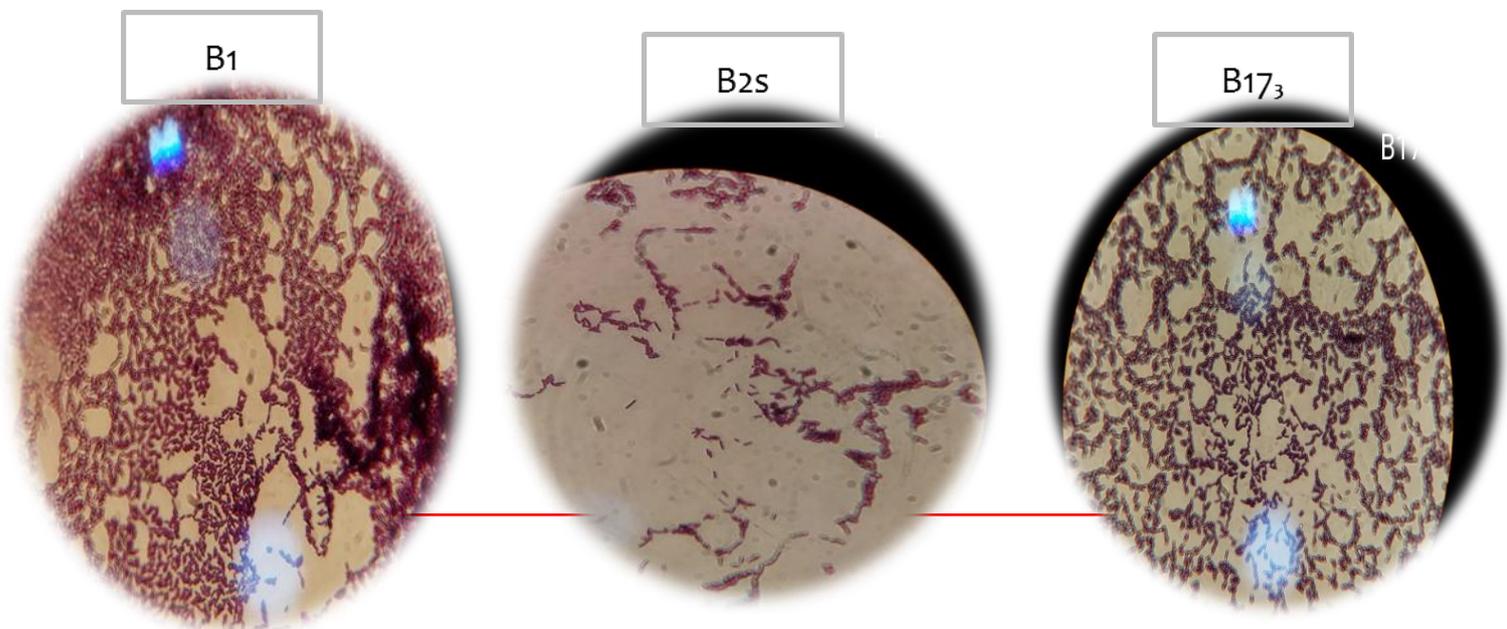
- Recouvrir le frottis fixé par une quantité de violet de Gentiane et laisser le en contact pendant 1 mn et rincer par l'eau de robinet.
- Fixer la coloration avec de lugol par un contact de 30 sec.

- Décolorer par l'ajout de l'acool sur la lame placée obliquement pendant 10 sec et lavé par l'eau de robinet.
- Recouvrir la lame avec la solution de fuschine et laisser en contact pendant 30 sec puis rincer et sécher.
- Observer après séchage à l'immersion (objectif x100) et à pleine lumière. Les bactéries à Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement celles à Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

Technique des dilutions:

- Marquer les tubs de diluant (Exemple : 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ... 10^{-5}).
- Prélever aseptiquement 1 ml de la suspension mère à l'aide d'une pipette graduée stérile de 1 ml munie d'un poire à aspiration ; l'homogénéisation du prélèvement se fait par aspiration et refoulement trois fois, ou par l'utilisation d'un homogénéisateur
- Transférer aseptiquement le 1ml prélevé dans le premier tube 10^{-1} , la pipette ne devant pas pénétrer dans les 9ml de diluant.
- Jeter la pipette utilisée dans un conteneur approprié. A l'aide d'une deuxième pipette stérile de 1ml, procéder de même du tube 10^{-2} au tube 10^{-2} .
- Faire de même pour les deux derniers tubes, en utilisant à chaque prélèvement une pipette nouvelle.

Annexe 05 : résultat de coloration de gram



Annexe 06 :liste de matériels utilisés

Bac
Microscope
Incubateur
Centrifugeus
Spectrophotomètre
Autoclave
Etuve
Réfrigérateur
Balance
PHmètre
Agitateur
Bain-marie
Emporte pièce
pince

Béchers
fioles jaugées
pipettes
micro-pipettes
tubes à essai
boîtes de Pétri
tubes à centrifuger
Erlenmeyers
Verres de montre
Flacons
Entonnoirs
L'anse de platine
Ecouillons
pointe