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 مولاي الطاهر، سعيدة

Université MOULAY Tahar, Saida

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En microbiologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Les fonctions biologiques des EPS produit par les bactéries lactiques.

Présenté par :

- Melle Fattah Zahira
- Melle Benouis Arbia

Soutenu le : 24-06-2024

Devant le jury composé de :

Président	Dr. Kebir Nasreddine	**MCA** Université MTS
Examinateur	Dr. Bellil Yahia	**MCA** Université MTS
Rapporteur	Dr. Chahrour Wassila	**MCA** Université MTS

Année universitaire 2023/2024

Dédicace

En avant, à Dieu qui m'a réconcilié à accomplir ce travail A mes chers parents Vous m'avez appris que la vie était remplie de petites batailles, Vainqueurs, vaincus, la guerre continue jusqu'à ce qu'on devienne très vieux. À la professeure qui a veillé sur nous pendant toute cette période, et aussi à mon amie Fattah Zahira, qui a partagé avec moi le même épuisement Les études sont mes exercices d'entraînement, Les diplômes seront mes armes de combat, La persévérance et l'assiduité seront le secret de mon couronnement, L'amour et l'amitié seront le répit du soldat.

Grâce à vous, vos enfants ont accompli beaucoup de succès Je vous aime. Qu'Allah puisse vous accorde la santé ,le bonheur ,la longévité. A mes chères frères

Benouis Arbia

Dédicace

En avant, à Dieu qui m'a réconcilié à accomplir ce travail

A mon très cher père Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, Et ses encouragements. Que ce travail, soit pour vous, un faible témoignage de ma Profonde affection et tendresse. Qu'ALLAH le tout puissant te préserve, t'accorde Santé, bonheur et te protège de tout mal.

A ma très chère mère Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Qu'ALLAH te protége et tedonne la santé, le bonheur et longue vie.

A mes frères Alaa, abdeljalil et iyad que j'aime tant Pour leur petit mots et leur soutien A ritadj ma petit sœur ,à mon binome Benouis Arbia qui a toujours viellé a me soutenir

A tous la promo microbiologie que j'aime tant un par un.

fattah zahira

Remerciements

El-Hamdou lillah de nous avoir donné le courage, la patience, la santé et la volonté Pour mener à bien ce présent travail. Je tiens tout d'abord à remercier mon amie et compagnon, Fattah Zahira, avec qui j'ai partagé le même travail et la même fatigue tout au long de cette période. Deuxièmement, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre superviseur Mme Chahrour Wassila, pour son aide et ses conseils précieux durant ces années Empathie, disponibilité et idées, ainsi que orientation, confiance et patience Ils ont apporté une contribution majeure sans laquelle ce travail n'aurait pas été possible. Je tiens également à remercier mes parents pour leur soutien, leur patience et leur confiance, ainsi que tous les professeurs qui nous ont enseigné et ceux à travers eux. Des compétences qui nous ont aidés à poursuivre nos études.

J'adresse mes remerciements à Kebir Nasreddine Maitre de Conférences A à l'Université de Saida Dr Moulay Tahar, pour avoir accepté la présidence du jury de soutenance de thèse. Je remercie également Bellil Yahia Maitre de Conférences A à l'Université de Saida Dr Moulay Tahar, d'avoir accepté la tâche de rapporteurs. Qu'ils acceptent ma sincère reconnaissance pour le temps consacré à la lecture de ma thèse et les améliorations suggérées.

Je tiens à remercier mes amis Nazai Asmaa et Belhadi Naima d'avoir partagé avec nous le même travail et la même fatigue pendant un certain temps. Nous adressons également nos sincères remerciements aux techniciens de laboratoire qui nous ont aidés. Offrez leur aide.

Enfin, nous tenons également à remercier tous ceux qui ont participé étroitement Ou loin d'avoir terminé ce travail. Merci à tous..

Liste des abréviations

% : pour cent

°C : Degré celsus

ADP : adénosine diphosphate**.**

ATP : Adénosine –triphosphate.

BL : bactéries lactiques .

ED : eau distillé

EPS : exopolysaccharides .

g : gramme

GYEA: gelose yeast extract agar.

h : heurs

H_2SO_4:acide sulfurique.

ml : millilitre

MRS : (Man, Rogosa et Sharpe)

NK : les cellules cytotoxiques naturelles

pH :potentiel Hydrogènemesure l'activité chimique des ions hydrogènes en solution (mesure l'acidité ou la basicité d'une solution chimique)

Rpm : En anglais ''Repm Per Minute'', en français tour par minute (tr/min) : est une unité pour mesurer de la vitesse de rotation (généralement pour les moteurs).

TCA: Tri-Chloroacétic

µg : microgramme

µl : microlitre

dpph:2.2-diphényl-1-picrylhydrazyle

ATB : Anti biotique

Liste des tableaux

Tableau 01: Les différents genres des bactéries lactiques 12

Tableau02: exemples d'utilisation des bactéries lactiques en industriealimentaire...13

Tableau 3 : les caractéristiques de notre échantillon… 31

Tableau 4 : préparation des dillution de glucose 37

Tableau 05 : les codes des souches indicatrices..... 38

Tableau 06 : Examen macroscopique des colonies sur le milieu MRSs et MRSRC 41

Tableau 07: Tableau représente l'aspect des colonies sur milieux MRS RC et MRS S… 43

Tableau 08 : les aspects microscopiques des isolats après coloration de gram 44

Tableau 09 : Résultats de l'antibiogramme des souches lactiques… 48

Tableau 10 : les résultats obtenus de test anti-biofilm 54

Tableau 11 : les différents mécanismes d'actions des disques de ATB utilisés 80

Tableaux 12 : Résultat de test l'antibiogramme 81

Liste des figures

Figure 01 : a Forme cocci, **b** Forme bacille des bactéries lactiques observe ou microscope électronique a transmission..... 07

Figure 2 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques 10

Figure 3 : Isolement des souche lactiques..... 32

Figure 04: Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées.....34

Figure 05 : Observations microscopiques des bactéries lactiques après une coloration de Gram avec un grossissement (G : 10x100)..... 45

Figure 06 : Type fermentaire des isolats BL 7 et BL 13.....46

Figure 07 : Aspect des souches lactiques pures en milieu MRS liquide 46

Figure 08 : la conservation des souche lactique sur les les eppendorf (longue durée).47

Figure 09: Résultats de l'antibiogramme des souches lactiques 47

Figure 10 : répresentative d'activité hémolytique des BL isolée 49

Figure 11: Les étapes de l'extraction des EPS 50

Figure 12: Les résultats obtenue de test anti-microbienne..... 51

Figure 13 : Résultats de l'activité anti-biofilm.....53

Figure 14 : Pourcentages d'inhibition du DPPH des EPS BL7s et EPSBL13 55

Figure 15 : les résultats de l'activité émulsifiante en 1h, 24h, 48h… 55

Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude des fonctions des EPS produits par les bactéries lactiques issues du beurre et lben nature lait de vache.

A partir de 15 souches gram positive et catalase négative susceptible d'être bactéries lactiques, ces souches ont été sélectionné grâce à l'utilisation des milieux sélectives, que deux souches LbB7 et LbB13 de genre lactobacillus ont été sélectionnée pour l'étude quelque fonction biologique des EPS : EPSBL7 et EPSBL13. Le rendement maximal obtenue par nos souches c'été B13 (0,7mg/l) et B7s (0,013mg/l). Une faible activité antioxydante été observée par EPS7 et EPS13 : 30.46% et 23.84% respectivement ; autrement on aobservé que l'activité emulsifiante été stable pour les deux EPS de l'ordre de 41%.

EPSBL13 a montré une activité anti biofilm envers *klebsiella pneumoniae* ATCC700603 et *Bacillus subtilis* ATCC6633, EPSBL7 a montré une activité anti biofilm envers *E.coli* ATCC25922.

Mots clés : Bactéries lactiques, Exopolysaccharides, Fermentation lactique, activité antioxydant, activité émulsification,anti biofilm.

Abstract

This work is part of the study of the functions of EPS produced by lactic bacteria derived from cow's butter.

From 15 gram-positive and catalase-negative strains likely to be lactic bacteria, these strains were selected using selective media, and two strains LbB7 and LbB13 of the genus lactobacillus were selected for the study of any biological function of EPS: EPSBL7 and EPSBL13. The maximum yield obtained by our strains was B13 (0.7mg/l) and B7s (0.013mg/l). Low antioxidant activity was observed by EPS7 and EPS13: 30.46% and 23.84% respectively; otherwise, emulsifying activity was stable for both EPS at around 41%.

EPSBL13 showed anti-biofilm activity against *klebsiella pneumoniae* ATCC000700603 and *Bacillus subtilis* ATCC6633, EPSBL7 showed anti-biofilm activity against *E.coli* ATCC25922.

Keywords: Lactic bacteria, Exo-polysaccharides, Lactic fermentation, antioxidant activity, emulsifying activity. anti biofilm

ملخص

ملخص:

هذا العمل جزء من دراسة وظائف EPS يتم إنتاجه بواسطة بكتيريا حمض اللاكتيك من الزبدة والحليب الطبيعي

بقرة.من 15 جرام السلالات الإيجابية والسلبية الكاتالاز عرضة لتكون بكتيريا حمض اللاكتيك، وقد تم اختيار هذه السلالات بفضل

استخدام الوسائط الانتقائية، التي تحتوي على سلالتين LbB7 وLbB13تم اختيار جنس العصيات اللبنية لدراسة بعض الوظائف

EPS البيولوجية: EPSBL7 وEPSBL13. الحد الأقصى للعائد الذي تم الحصول عليه وكانت سلالاتنا 0.7) B13 ملغم / لتر) و B7s 0.013) ملغم / لتر). نشاط منخفض تمت ملاحظة مضادات الأكسدة بواسطة EPS7 و30.46% :EPS13 و23.84%

على التوالى ؛ وإلا لاحظنا أن نشاط الاستحلاب كان مستقر الاثنين من ربحية السهم من أجل 41٪.

أظهر EPSBL13 نشاطًا مضادًا للأغشية الحيوية ضد الكليبسيلا الرئوية

ATCC700603 وBacillus subtilis ATCC6633، أظهر EPSBL7 نشاطًا مضاد حيوي ضد الإشريكية القولونية ATCC25922.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك، السكريات الخارجية، التخمر اللبني،نشاط مضاد للأكسدة، نشاط استحلاب، مضاد للبيوفيلم.

Table de matières

DEDICASES

REMERCIMENTS

LISTE DES ABREVIATIONS ..... **I**

LISTE DES TABLEAUX ..... **II**

LISTE DES FIGURES ..... **III**

RESUME ..... **III**

ABSTRACT ..... **IV**

ملخص: **V**

TABLE DE MATIERES ..... **VI**

INTRODUCTION GENERALE **1**

CHAPITRE I **4**

LES BACTERIES LACTIQUES **4**

1.1 Historiques 5

1.2 Définition 6

1.3 Généralité des bactéries lactiques 7

1.4 Classifications et taxonomie 11

1.5 Intérêt des bactéries lactiques 12

1.5.1 Dans l'industrie alimentaire 12

1.5.2 Dans le domaine thérapeutique 15

1.5.3 Dans le domaine médical 15

1.5.4 Dans le domaine cosmétique 15

CHAPITRE II : LES EXOPOLYSCCHARIDES **17**

2.1 Définition des polysaccharides 19
2.2 Classification des polysaccharides 19
2.3 Les exopolysaccharides 20
2.3.1 définition 20
2.3.2 Structure des exopolysaccharides 20
2.3.3 exopolysaccharides microbiens 21
2.3.4 La biosynthese des EPS 21
2.4 Classification des EPS des bactéries lactiques 22
2.4.1 Homopolysaccharides 22
2.4.2 Hétéropolysaccharides 23
2.5 Rôle des EPS dans la cellule procaryote 24

CHAPITRE III: LES FONCTIONS BIOLOGIQUES DES EPS PRODUIT PAR LES BACTERIES LACTIQUES 25

3.1 Propriétés rhéologiques et texturants 26
3.2 Activités biologiques 26
3.2.1 Ativité antioxydante 26
3.3 Applications de l'EPS dans les produits à base de viande fermentée 28
3.4 Protection contre les stress environnementaux et agent pathogène 29

CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODE 30

4.1 Prévenance des échantillons 31
4.2 Préparation des échantillons 31
4.3 Isolement et purification des souches lactiques 32
4.3.1 Purification 32
4.3.2 Pré identification 32
4.4 Coloration de Gram 33
4.5 Tests physiologiques et biochimiques 33
4.5.1 Test de catalase 33
4.5.2 Type fermentaire 33
4.6 Conservation des isolats 34
4.6.1 Conservation à court terme 34

4.6.2 Conservation à long terme 34
4.7 Test antibiogramme 35
4.7.1 Principe 35
4.8 Activité hémolytique 35
4.9 Screening des souches productrices d'EPS 35
4.10 Extraction des EPS 36
4.11 Quantification des EPS par la méthode du phenol-sulfurique 36
4.12 Test Antimicrobien 37
4.13 Activité anti-biofilm 38
4.14 Activité antioxydante 39
4.15 Activité d'émulsificationes 39

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION 41

5.1 La pré identification des souches 41
5.2 Conservation des souches 41
5.3 Détermination des profils de résistance des antibiotiques 44
5.4 Activité hémolytique 44
5.5 Extraction des EPS 46
5.6 Isolement des bactéries lactique productrice d EPS 46
5.7 Activité anti-microbienne 47
5.8 Activités anti biofilm 51
5.9 Activité anti –oxydant 54
5.10 Activité émulsifiante 55

CONCLUSION 56

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 59

ANNEXES 71

INTRODUCTION GENERALE

Les bactéries lactiques sont des microorganismes très anciens dont les ancêtres auraient pu émerger il y a environ trois milliards d'années, précédant ainsi les cyanobactéries photosynthétiques. Elles colonisent de nombreux milieux naturels et se retrouvent de manière ubiquitaire dans divers produits alimentaires, notamment les produits laitiers, la viande, les fruits, les légumes et les céréales, qui sont des environnements riches en sucres et en protéines (Carr et al., 2002; Drider et Prévost, 2009). Les techniques de biologie moléculaire ont révélé une grande diversité génomique, menant à la classification de treize genres : Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissella, Aerococcus, et Bifidobacterium (**Carine M. et al., 2009; Lahtinen S. et al., 2012).**

Les bactéries lactiques jouent un rôle crucial dans l'industrie alimentaire, étant largement utilisées pour la fermentation lactique. Elles apportent non seulement des caractéristiques spécifiques d'arômes et de texture, mais garantissent aussi la sécurité sanitaire des aliments. Cette sécurité est renforcée par la production d'acides organiques (acides lactiques et acétiques) qui abaissent le pH du milieu **(Bouygues, 2017; Ali Jumma et al., 2021).**

Les EPS bactériens sont biocompatibles et biodégradables par rapport aux polymères synthétiques destructeurs (Wang et al., 2014). Au cours des dernières décennies, la quantité d'EPS produite par fermentation microbienne a considérablement augmenté. Les EPS agissent comme stabilisants alimentaires, émulsifiants, agents viscosifiants et liants d'eau. Cependant, les coûts de production élevés et les processus de récupération sont les principales contraintes pour la production de PSE à grande échelle **(Natarajan et al., 2021).**

Outre leur fonctionnalité technique, les EPS des bactéries lactiques (BL) peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé, tels que la réduction du cholestérol sanguin, des propriétés anticancéreuses, antitumorales et prébiotiques **(Behare et al., 2009).**

Les EPS produits par les bactéries lactiques forment un groupe diversifié de polysaccharides avec des caractéristiques moléculaires et structurelles ainsi que des mécanismes de synthèse variés **(Jurášková et al., 2022).**

Des preuves récentes montrent que les EPS produits par les bactéries lactiques ont de nombreux rôles fonctionnels et avantages pour la santé humaine et l'industrie **(Lynch et al., 2018).**

Cette étude vise à sélectionner des souches lactiques produisant des EPS , en mettant en valeur leur caractère mucoïde et gluant. Notre objectif est d'étudier les activités des exopolysaccharides (EPS) isolés à partir de souches lactiques. Notre travail se compose de trois parties :

1. **Rappel bibliographique** : Cette section présente les caractéristiques des bactéries lactiques, leur importance dans divers domaines, et les bactéries lactiques productrices d'EPS.
2. **Étude expérimentale** : Nous avons évalué les propriétés fonctionnelles des EPS, en testant leur capacité d'émulsification, leurs activités antimicrobiennes et antioxydantes, ainsi que d'autres propriétés technologiques des EPS.
3. **Conclusion** : Cette partie résume les résultats obtenus.

Chapitre I :

Les bactéries lactiques

1.1 Historiques

Les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes dont les ancêtres ont pu voir le jour il y a trois milliards d'années (avant les Cyanobactéries). Elles ont été utilisées pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans, sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité (Boudersa & Nekkaa, (2017))

Il faudra attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries. La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de Lactococcus lactis obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873 cité par Penaud, (2006). Metchnikoff isole en 1904 le « bacille bulgare » (Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus) présent dans le yaourt. (Mechai, (2009))

Au début du XXème siècle, Elie Metchnikoff remarque que la longévité et la bonne santé des paysans bulgares est liée à leur consommation de produits laitiers fermentés et suggère que certains micro-organismes pourraient exercer des effets bénéfiques sur la santé humaine. (Daoudi & Khelef, (2018))

De nos jours les bactéries lactiques représentent le deuxième plus grand marché de production de biomasse, après les levures. Principalement utilisées dans l'industrie alimentaire, pour la production et la fermentation des aliments et aussi dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et bio polymères et acquièrent, depuis quelques années, un rôle croissant en santé humaine et animale. (Brahimi, (2015))

1.2 Définition :

Les bactéries lactiques (BL) constituant l'un des groupes incontournables de la microbiologie alimentaire (**Drider et Prevost, 2009**).

Il a été déterminé pour la première fois par Orla-Jensen en 1919 et a rassemblé plusieurs genres qui se distinguaient par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique. Un groupe hétérogène de microorganismes appelé bactéries lactiques produit de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles sont présentes dans de nombreux aliments, tels que les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales, et elles font partie de la flore intestinale et vaginale d'un être humain ou d'un animal. Les bactéries lactiques ont été définies pour la première fois par Orla- Jensen en 1919 et comprennent plusieurs genres de différentes morphologies :

Les coques (Cocci) sont des sphères ovoïdes de 0,5 à 1,5 µ m de diamètre qui peuvent être divisées pour former des paires, des tétrades, des tétrades, des chaînettes ou des amas. Il s'agit de bactéries sans spores et qui restent immobiles.

Les bacilles se présentent sous la forme de bâtonnets qui peuvent présenter diverses formes. Contrairement aux bâtonnets droits classiques, on peut également observer des coccobacilles ou de longues chaînes de bacilles. Dans certaines situations, le bâtonnet peut se rétrécir ou se former en filaments. Leur diamètre varie de 0,5 à 0,2 µm et leur longueur varie de 1,5 à environ 10 µm (Hermier & al, 1997)(voir figures 1a et 1b). Cependant, leur capacité à fermenter le lactose en est leur caractéristique commune (Novel, 1993)

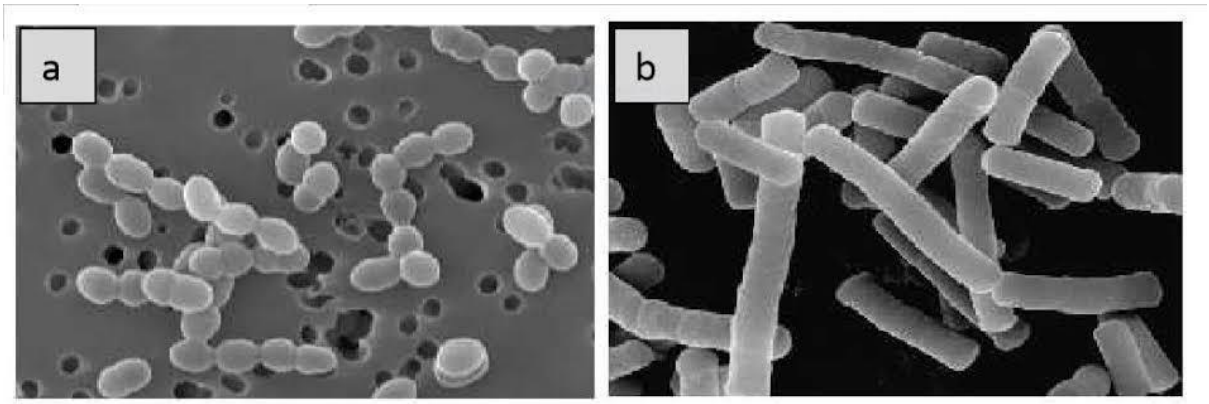


Figure 1 : a Forme cocci, b Forme bacille des bactéries lactiques observe ou microscope électronique a transmission (Makhloufi A. , (2012))

Se sont des microorganismes à Gram positif, non sporulant, non mobiles, anaérobies mais aérotolérants et ne possédant pas de catalase. Toutes les bactéries lactiques possèdent un métabolisme fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique.)((Raynaud, (2006)).

1.3 Généralité des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des bactéries à gram +, immobiles, asporulées,catalase et oxydase négative,nitrate et réductase négative, anaérobies ou aérotolérantes

-Les bactéries lactiques sont des cocci ou des bâtonnets.

-Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance:vitamineB, acides aminés, péptides, bases puriques et pyrimidiques.

-Elles produisent des quantités abondantes d'acides lactiques par fermentation de substances hydrocarbonées.

- En raison de leur métabolisme exclusivement fermentaire, elles produisent des quantités importantes d'acide lactique à partir du glucose, accompagnées parfois

d'autres métabolites tels que l'éthanol, le co2 et d'autres acides organiques , Elles ont une capacité de biosynthèse faible. (Boudjema, 2008)

-Les bactéries lactiques ne produisent ni indole ni acide sulfhydrique et certaines espèces hydrolysent la caséine. Ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol car elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine et ne forment pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux (Dellaglio & al, 1994)

-La fermentation lactique des glucides permet aux bactéries lactiques de produire leur ATP. Le glucose est principalement converti en acide lactique par les homofermentaires ou en acide lactique, en CO2, en éthanol ou en acide acétique par les hétérofermentaires figure 1 (Corrieu & Luquet, 2008)

-Bien qu'elles soient mésophiles, elles peuvent croître à des températures de 5 à 45°C. Bien qu'elles soient capables de tolérer des milieux acides (pH 3,2) et alcalins (pH 9,6), le pH idéal de croissance est de 5,0 à 9,0. (Leonard, 2013)

-Les bactéries lactiques sont ubiquistes et peuvent être trouvées dans de nombreux endroits écologiques, tels que le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et le tractus digestif. Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et sont qualifiées d'organismes gras (généralement considérés comme sûrs) (Adams & Marteau, 1995)

Cependant, quelques membres du genre Streptococcus et Enterococcus ainsi que d'autres bactéries lactiques sont considérées comme pathogènes opportunistes (Aguirre & Collins, 1993).

Les bactéries lactiques se divisent en deux groupes différents selon les voies métaboliques utilisées pour fermenter le glucose.

Homofermentaires :

Elles produisent de l'acide lactique comme un produit majeur de la fermentation de glucose.

$\boldsymbol{C_6H_{12}O_6}$+2 ADP +2$Pi$======== 2 $\boldsymbol{C_3H_6O_3}$ +2 ATP

Glucose Acide lactique

Hétérofermentaires :

Elles produisent de l'éthanol et /ou de l'acide acétique en plus de l'acide lactique.

$\boldsymbol{C6H12O6}$+2 ADP +2Pi ========== 2 $\boldsymbol{C2H5}$OH+2 CO2+2ATP

Glucose Ethanol

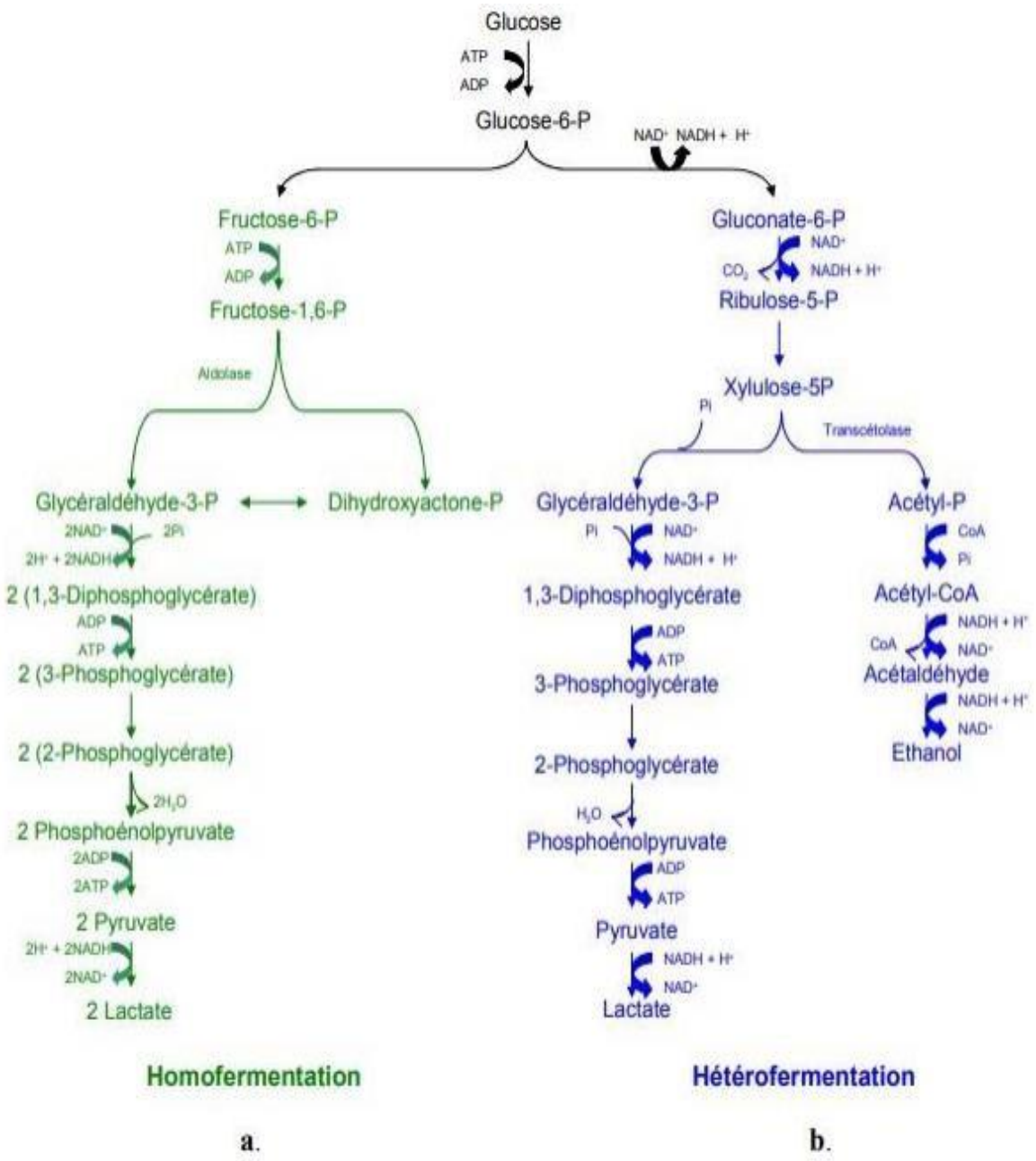


Figure 2 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (Makhloufi K. , 2011).

NAD+ / NADH, H+ : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adéninedinucléotide**. Pi :** phosphate inorganique.

1.4 Classifications et taxonomie :

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen sur divers critères morphologiques et physiologiques (activités catalase et nitrite réductase, type de fermentation) (Orla-Jensen, 1919).

Les méthodes phénotypiques permettant la classification des bactéries se sont ensuite étendues à la composition de la paroi, le type d'acides gras cellulaires, le type de quinones (accepteur d'électrons). Cependant ces méthodes phénotypiques ne rendent pas compte des relations phylogénétiques entre les groupes.

Dès 1974, selon le Bergey'smanual, les bactéries lactiques se retrouvent dissociées en deux familles : celle des *Streptococcacea* et celle des *Lactobacillacea*. En 1985, Schleifer et *al*., ont proposé la division des streptocoques en 4 genres génétiquement distincts : *Streptococcus, Enterrococcus, Vagococcus* et *Lactococcus*, ces deux derniers regroupant les streptocoques lactiques (MAKHLOUF, 2018).

En 1977, Woese et Fox introduisent la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques. Cette méthode va révolutionner la taxonomie des bactéries, et la classification des BL va être profondément modifiée. D'autres méthodes génotypiques (basées sur les acides nucléiques) sont aussi utilisées en classification, comme le pourcentage en GC ou l'hybridation ADN/ADN (MECHAI, 2009).

L'identification des espèces de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API 50CH (Curk & al, 1993).

L'analyse comparative des séquences d'ARN ribosomal 16S a entrainé des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (Salminen & al, 2004).

Le tableau suivant donne les différents genres des bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques :

Tableau 1: Les différents genres des bactéries lactiques (Federighi, 2005).

Genre	*Morphologie*	*Fermentation*	*Caractéristiques principale*	*Habitat principaux*
Lactobacillus	Bacilles	Homofermentaire ou Hétérofermentaire	Thermophilus ou mésophiles	Homme, produits laitiers, carnés, végétaux
Carnobacterium	Bacilles	Hétérofermentaire	Psychotropes, peu acidotolérants.	Produits carné, poissons, produits laitiers.
Lactococcus	Coques	Homofermentaire	Mésophiles, croissance à 10°C et non à 45°C	Produits laitiers, Végétaux.
Streptococcus	Coques	Homofermentaire	Thermophile	Produits laitiers.
Enterococcus	Coques	Hétérofermentaire	Mésophiles, croissance à 45°C et non à 10°, thermorésistante.	Intestin de l4homme et des animaux, produits laitiers.
Pediococcus	Coque	Homofermentaire	Mésophiles halotolérants.	Bière, produits végétaux, saucissons.
Tetragencoccus	Coque en tétrades	Homoferméntaire	Mésophiles halophiles	Saumures
Leuconostoc	Coques	Hétérofermentaire	Mésophiles	Produits végétaux, produits laitiers.
Oenococcus	Coque	Hétérofermentaire	Mésophile	Vin
Bifidobacterium	Forme irrégulière	Acide acétique et lactique	Mésophile	Intestin de l'homme et des animaux.
Vagococcus	Coque mobile	Homofermentaire	Mésophile	Intestin de l'homme et des animaux,

1.5 Intérêt des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique :

1.5.1 Dans l'industrie 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 fromages, les olives fermentés et certains vins. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux (Hassaine, 2013)

-L'utilisation des bactéries lactiques pour une application industrielle donnée (tableau 2) est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques qui recouvrent ces propriétés :

Tableau 2: exemples d'utilisation des bactéries lactiques en industrie alimentaire (Romain, 2011)

Genre	Substrat	Exemple et produits
Bifidobacterium	Lait	Laits fermentés
Lactobacillus	Lait, viande, végétaux, céréale	Yaourts, laits fermentés, kéfirs, fromages Saucissons secs, Jambons secs Choucroute, olives, «yaourts» au lait de soja ,Pain au levain, bière
Lactococcus	Lait	Fromages, kéfirs
Leuconostoc	Végétaux ; lait	Choucroute, olives, vin, fromages, kéfirs
Pediococcus	Végétaux, viande	Choucroute saucisses semi-séchées
Oenococcus	Végétaux	Vin
Streptococcus	Lait	Yaourt, lait fermentés, fromages

1.5.1.1 Aptitude acidifiante :

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 : 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. (Allouache & al, 2017).

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

1.5.1.3 Aptitude texturante :

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

.

1.5.1.4 Aptitude aromatisante :

Cette activité est très liée aux propriétés organoleptiques du produit 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'acetoine et le diacetyle sont les plus importants). Ces propriétés aromatisantes ne sont pas toujours souhaitables, car elles sont

redoutables dans la brasserie et dans le cas de nombreux produits. (Chemlal-Kheraz M. , 2013)

1.5.2 Dans le domaine thérapeutique :

-En 1907, le Russe Metchnikoff a proposé que les bactéries lactiques pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant la flore intestinale, suggérant ainsi l'intérêt des bactéries lactiques pour la santé humaine. Dans le cadre des probiotiques, les bactéries lactiques ont un impact sur la santé. Les bactéries lactiques sont de plus en plus étudiées pour leurs avantages, certains sont bien connus, d'autres sont encore contre- versés : Améliore la digestion de la lactose. Traitement de certaines infections ou diarrhées. Réduction du cholestérol sérique et déconjugaison des sels biliaires. Utilisation dans la création de vaccins (Calvez & al, 2009).

1.5.3 Dans le domaine médical :

Les bactéries lactiques interviennent dans le contrôle des infections intestinales comme la prévention des diarrhées par l'introduction d'une nouvelle flore intestinale qui agit sur les entérobactéries responsables de ces désordres intestinaux. Elles sont aussi connues pour la production des agents antimicrobiens évitant ainsi l'usage des antibiotiques.

Les bactéries lactiques colonisent l'intestin de la plupart des animaux, jouant un effet sur leur système immunitaire, souvent, en tant que probiotique pour améliorer certaines fonctions biologiques de leur hôte. (Mermouri, 2018)

1.5.4 Dans le domaine cosmétique :

Les bactéries lactiques (BL) sont des micro-organismes probiotiques largement utilisés dans l'industrie cosmétique pour leurs nombreux avantages. Elles peuvent être employées de différentes manières et offrent des solutions innovantes pour répondre aux besoins de beauté et de bien-être des consommateurs.

1. **Amélioration de la barrière cutanée**

Les bactéries lactiques contribuent au renforcement de la barrière cutanée en stimulant la production de céramides et de lipides intercellulaires, deux éléments essentiels pour maintenir l'hydratation et protéger la peau des agressions extérieures. (Marzio & al, 2019)

2. Action anti-inflammatoire et apaisante

Certaines BL ont la capacité de réduire l'inflammation et les rougeurs cutanées en modulant la réponse immunitaire et en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires. (Kim & al, 2018)

3. Propriétés antimicrobiennes et antioxydantes

Les BL peuvent aider à prévenir et à lutter contre les infections cutanées en produisant des substances antimicrobiennes et en neutralisant les radicaux libres responsables du vieillissement prématuré. (Hassoun & al, 2017)

4. Exfoliation douce et renouvellement cellulaire

L'acide lactique, produit par la fermentation des BL, est un agent exfoliant naturel qui permet d'éliminer les cellules mortes et de stimuler le renouvellement cellulaire pour un teint plus éclatant et uniforme.**(** (Draelos, 2014)**,** (Kang & al, 2002)**)**

5. Amélioration de l'absorption des actifs cosmétiques

Les BL peuvent également améliorer la pénétration des autres ingrédients cosmétiques dans la peau, optimisant ainsi leur efficacité.((Bonadio, Baptista, Horinouchi, & al, 2015)**,** (Lee, Moturi, Lee, & al, 2013)**)**

6. Ingrédients naturels et durables

Les BL constituent une alternative naturelle et durable aux conservateurs synthétiques et aux autres ingrédients controversés présents dans les cosmétiques traditionnels.**(** (Campos & al, 2019)**,** (Scholz, 2021)**)**

Chapitre II : les exopolyscharides

2.1 Définition des polysaccharides :

Les polysaccharides, également appelés polyosides, sont des hydrates de carbone plus ou moins polymérisés qui sont très répandus dans la nature car ils représentent la majorité des glucides chez les êtres vivants.Les polysaccharides se composent de nombreuses sous-unités différentes, telles que les sucres simple, ou leurs produits dérivés. Ils peuvent former des chaînes linéaires, ramifiées ou non, et ont une grande hydrophilie, ce qui les permet d'être utilisés pour modifier les propriétés des systèmes aqueux, comme par exemple une viscosité élevée à faibles concentrations, des propriétés gélifiantes, une bonne solubilité dans l'eau et des propriétés adhésives qui permettent aux bactéries qui les synthétisent de se lier fortement à divers supports (Sanin & al, 2003)

2.2 Classification des polysaccharides :

-Selon le produit visé et l'effet souhaité, diverses variétés de polysaccharides provenant de diverses sources peuvent être utilisées. Ils peuvent provenir de sources végétales telles que la cellulose, la pectine et l'amidon, de sources algales telles que l'agar-agar, l'alginate et la carraghénine, ou de sources fongiques ou bactériennes telles que la gomme gellan, la gomme xanthane et l'alginate (Duboc & Mollet, 2001)

Les polysaccharides peuvent être synthétisés par les microorganismes, qui peuvent être divisés en trois groupes en fonction de leur localisation dans la cellule Les polysaccharides de stockage comme le glycogène, qui sont présents dans le cytoplasme, sont regroupés dans le premier groupe. Le deuxième groupe comprend les polysaccharides structuraux de la paroi cellulaire, tels que le peptidoglycane et les acides lipotéichoïques des bactéries à Gram positif, ainsi que les lipopolysaccharides ancrés dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif **(figure 01)** (Ruas-Madiedo P. &.-G., 2005)

Le troisième groupe comprend les polysaccharides extracellulaires, qui peuvent être sécrétés par certaines bactéries sur leur surface, accompagnés de quelques glycoprotéines. Ce dernier groupe se présente sous deux formes principales, soit sous forme de capsules étroitement liées à la surface de la

cellule, soit sous forme d'exopolysaccharides (EPS) au sens strict (Cerning J. , 1990)

2.3 Les exopolysaccharides

2.3.1 définition :

Les exopolysaccharides (EPS) sont des macromolécules organiques à chaîne longue linéaires ou ramifiées qui comprennent principalement le glucose, le galactose, le rhamnose, etc., qui sont synthétisés par divers microbes à l'aide de différentes sources de carbone au cours du processus de fermentation (Paulo & al, 2012) . Les EPS sont constitués de métabolites secondaires lorsqu'un certain nombre de microorganismes ne sont pas dans des conditions propices à leur développement (Shailesh & al, 2016). Ces polysaccharides sont sécrétés dans leur environnement plutôt que de se fixer en permanence à la surface. Les exopolysaccharides et les polysaccharides capsulaires sont distingués par cette caractéristique (Chen & Narbad, 2018).

2.3.2 Structure des exopolysaccharides :

Les EPS comprennent principalement un petit nombre de types de monosaccharides ou de leurs dérivés, et ils présentent une grande variété grâce à diverses combinaisons d'unités de monosaccharides disposées en configurations linéaires ou ramifiées reliées entre elles par des liens glycosidiques.Les EPS bactériens ont de nombreuses structures chimiques différentes, et ils sont généralement des hétéropolysaccharides avec trois ou quatre monomères différentes organisées en groupes de 10 ou moins pour donner les unités répétitives. Les pentoses, les hexoses, les acides aminés ou les acides uroniques peuvent être les monosaccharides qui produisent les exopolysaccharides.

Les liaisons β-1,4 ou sont les liaisons de squelette les plus fréquentes dans les séquences non saccharidiques (Nicolaus & al, 2010).

La possibilité de liaisons différentes dans les polysaccharides ainsi que la variation des arrangements de monomères ont entraîné une large gamme de formes et de structures (Suresh Kumar & al, 2007)

2.3.3 exopolysaccharides microbiens :

Une grande variété de microorganismes procaryotes produisent des polysaccharides microbiens, mais les bactéries produisent la plus grande variété de molécules et produisent plus souvent des quantités supérieures à 10 g/l. Les EPS bactériens ne sont pas utilisés par les microorganismes producteurs comme sources d'énergie, mais les EPS microbiens sont parmi les composés les plus multifonctionnels et industriellement intéressants (Sanlibaba & Çakmak, 2016).

Plusieurs microorganismes isolés dans des environnements extrêmes, tels que les sources hydrothermales profondes, les écosystèmes antarctiques, les lacs salins et les sources géothermales, ont commencé à être étudiés en tant que sources potentielles de biopolymères précieux, notamment l'EPS. Les polysaccharides microbiens sont susceptibles à la biodégradation dans la nature et sont moins nocifs pour l'environnement que les polymères synthétiques (Shailesh, Pandey, Mahendra, & Tiwari, 2016)

2.3.4 La biosynthese des EPS :

La biosynthèse des EPS bactériens est un processus complexe impliquant de nombreuses enzymes et protéines régulières (Sanlibaba & Çakmak, 2016). Les bactéries lactiques distinguent deux principaux types de biosynthèse : la synthèse en dehors de la cellule (produisant des homopolysaccharides) ou la synthèse à la membrane cellulaire (produisant des hétéropolysaccharides).

- Les homopolysaccharides sont fabriqués en dehors de la cellule grâce à des enzymes excrétées par la bactérie. Dans la production de dextrane, par exemple, seul une enzyme est utilisée, la dextranesucrase, qui est spécifique au saccharose et fournit de l'énergie pour la polymérisation((Cerning J. , Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria., (1990))

-La synthèse des hétéropolysaccharides, par contre, a lieu à la membrane cytoplasmique. L'EPS est construit par polymérisation des unités répétitives formées dans le cytoplasme (Cerning J. , 1990) (Degeest & De Vuyst, 1999)).L'unité répétitive est assemblée à la membrane cytoplasmique par addition successive d'unités glucosyle au polysaccharide naissant, qui est probablement ancré sur un transporteur lipidique, probablement un phosphate d'ondécaprényle ou un isoprénoïde phosphate. Le polysaccharide est sécrété de la membrane cellulaire dans l'environnement extracellulaire et polymérisé à l'extérieur de la cellule pour former l'hétéropolysaccharide, qui an un poids (Donot F. , Fontana, Baccou, & Schorr-Galindo, 2012)

2.4 Classification des EPS des bactéries lactiques

Fondamentalement, en fonction de la composition des unités répétitives et voie de biosynthèse, les EPS peuvent être classés en deux classes homopolysaccharides ou des hétéropolysaccharides (figure 2) (Mishra & Jha, 2013). La masse moléculaire des hétéropolysaccharides varie de 104 à 106 Da, généralement inférieure à la masse moléculaire moyenne de homopolysaccharides (jusqu'à environ 107 Da) (Sanlibaba & Çakmak, 2016)

Les homopolysacchrides et hétéropolysaccharides respectivement diffèrent également par le nombre des enzymes et l'organisation des gènes impliqués dans leur synthèse. Enfin, en fonction des substituants présents dans les unités répétitives d'hétéropolysaccharides, il y a des polymères chargés ou neutres, ce dernier est appelée « zwitterionique». Les EPS se caractérisent d'avoir à la fois des radicaux chargés positivement (par exemple amine libre) ou chargés négativement (par exemple, des phosphates ou des carboxylates) dans leurs unités répétitives (Hidalgo-Cantabrana & al, 2012)

2.4.1 Homopolysaccharides :

Les homopolysaccharides contiennent un seul type de monosaccharide synthétisé par conversion de substrats extracellulaires par des enzymes sécrétées, par exemple, la dextransucrase, la lévansucrase (Jolly, L; Vincent, S. J. F; Duboc, P; Neeser, J. R; et al, 2002) ,composé de quatre sous-groupes

différents (α-D-Glucans, β-D-glucanes, fructanes et autres. ¬ Les α-D-glucanes sont plus répandus chez les bactéries lactiques et sont produits par des souches appartenant aux genres Lactobacillus, Leuconostoc et Streptococcus (Werning, Ibarburu, Soto, Dueñas, Irastorza, & Prieto, 2012)

Selon les liaisons de la chaîne principale, les α-glucanes sont subdivisés en dextrans (α-1,6) sont principalement constitués de monomères de glucose liés en α-1,6 avec diverses chaînes ramifiées en position 3, mais parfois en positions 2 et 4 avec une probabilité relativement plus faible tels que les EPS de Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides et dextranicum (Hongpattarakere & al, 2012), mutan (α-1,3), glucanes (α1,2), reutérans (α-1,4) et alternans (α-1,3 et α-1,6) (Werning, Ibarburu, Soto, Dueñas, Irastorza, & Prieto, Biosynthesis, purification, and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, 2012)

β-D-glucanes constitués de monomères de glucose liés en β-1,3 avec des chaînes ramifiées en β-1,2, tels que les EPS de Pediococcus spp. et Streptococcus spp (Hongpattarakere, Wichienchot, Nout, & Klaenhammer, 2012)

2.4.2 Hétéropolysaccharides

Les hétéropolysaccharides comprennent des unités répétitives de différents monosaccharides dont le nombre d'unités varie entre tri et octasaccharides (Hongpattarakere, Rekha, Komesu, & Nout, 2012). Leur composition, beaucoup plus diversifiée que celle des homopolysaccharides, inclue des oses neutres (D-glucose, D-galactose, L-rhamnose), acides (acide glucuronique, acide galacturonique, etc.) ou encore des amines (N-acétyl-D- glucosamine, N-acétyl-Dgalactosamine). Ils sont par ailleurs fréquemment sujets à des additions de substituants organiques (Exemples : acides aminés, pyruvate) ou inorganiques (Exemples : sulfate, phosphate) qui leur confèrent des propriétés physiques et biologiques supplémentaires et augmentent leur diversité (Sanlibaba & Çakmak, Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria, 2016).

2.5 Rôle des EPS dans la cellule procaryote :

Les EPS sont une composante importante des systèmes biologiques, bénéfiques pour les organismes qui les produisent, car ils remplissent diverses fonctions : Les EPS protègent les microorganismes en tant que barrière physique, leur production est une réponse directe aux pressions environnementales sélectives, y compris le stress osmotique, la température, pH, pression et intensité lumineuse. En cas d'espèces acidophiles ou de thermophiles et des Archaea, les EPS aident à l'adaptation aux conditions extrêmes (Kambourova M. , Mandeva, Dimova, & et Poli, 2015).

La capacité d'un microorganisme à s'en tourer d'une couche exopolysaccharidique hautement hydratée peut lui fournir une protection contre la dessiccation et ceci menant à la survie dans les régions déficientes en eau (Kambourova M. , Mandeva, Dimova, Poli, & al, 2015)

-Le glycocalyx est principalement composé d'EPS, est essentiel pour la formation d'un biofilm. La formation de biofilms occupe une place importante dans l'adaptation des bactéries aux conditions physico-chimiques de l'environnement et favorise l'association de différentes espèces microbiennes, comme dans le cas de la muqueuse intestinale de plus une fois associé au biofilm, les produits métaboliques d'une espèce peuventservir de substrats pour processus métaboliques d'une autre espèce. Ce biofilm confère une protection contre les forces mécaniques, les antibiotiques et les composés antimicrobiens (notamment lors du nettoyage) et la prédation par protozoaires (Donot F. , Fontana, Baccou, & Schorr-Galindo, 2012)

- Un autre avantage est indirect, en effet, les polysaccharides facilitent la communication entre les cellules, car ils agrègent les bactéries et réduisent les distances entre les cellules (Badel, Bernardi, & Michaud, (2011)).

Chapitre III:

Les fonctions biologiques des EPS produit par les bactéries lactiques.

Les exo polysaccharides (EPS) produits par les bactéries lactiques (BL) présentent une large gamme de fonctions biologiques importantes, dont :

3.1 Propriétés rhéologiques et texturants

Amélioration de la viscosité et du corps des produits alimentaires (yaourts, fromages, sauces, etc.) (Gänzle & & Gobbetti, 2007)

Formation de gels et de structures tridimensionnelles Stabilisation des émulsions et des suspensions (Dickinson, 2003).

Amélioration de la sensation en bouche et des propriétés organoleptiques (Drake & & Barbosa-Cánovas, 2009).

Amélioration de la stabilité des émulsions : Les EPS peuvent stabiliser les émulsions, ce qui peut être utile dans l'industrie alimentaire pour améliorer la texture des produits (Looijesteijn P. J., 2001).

Propriétés filmogènes : Les EPS peuvent former des films comestibles qui peuvent être utilisés comme agents d'enrobage pour protéger les aliments (Vinderola & al, 2005).

3.2 Activités biologiques

3.2.1 Ativité antioxydante

Les exopolysaccharides produits par les bactéries lactiques montrent une activité antioxydante significative, capable de piéger les radicaux libres et de réduire le stress oxydatif au niveau cellulaire. (Li, Y, & Wang, 2010).

Les propriétés antioxydantes des EPS sont essentielles pour prévenir les dommages oxydatifs aux cellules et aux tissus, contribuant ainsi à la prévention de maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer. (Zhang, Cui, & Zhao, 2015).

3.2.2 Activité antimicrobienne

Les exopolysaccharides produits par les bactéries lactiques possèdent des propriétés antimicrobiennes, inhibant la croissance de divers pathogènes (Ruas-Madiedo, Hugenholtz, & Zoon, 2002).

Les EPS de certaines souches de Lactobacillus ont montré une efficacité particulière contre les bactéries pathogènes telles que Escherichia coli et Staphylococcus aureus. (Yang, Wang, & Shen, 2014).

3.2.3 Activité anti-inflammatoire

Certaines études ont montré que les exopolysaccharides produits par les bactéries lactiques peuvent réduire les réponses inflammatoires, offrant une activité anti-inflammatoire bénéfique (Wang, Li, Rui, Jiang, & Dong, 2014).

Les EPS peuvent moduler la réponse immunitaire en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires (Zhao, Yang, & & Geng, 2016).

3.2.4 Activité immunomodulatrice :

Un agent immunomodulateur permet de stimuler ou d'inhiber divers acteurs du système immunitaire et de prévenir des maladies infectieuses ou cancéreuses. L'une des nouvelles tendances de la recherche dans le développement d'agents immunomodulateurs est l'identification de produits naturels présentant une toxicité faible ou tolérable dans les applications cliniques (Huang & al, 2014). Plusieurs polysaccharides d'origine fongique sont capables de stimuler simultanément les différentes composantes du système immunitaire, ce qui leur confère différentes propriétés thérapeutiques, notamment des propriétés antitumorales et anti - inflammatoires. Pour cette raison, ils sont appelés immunomodulateurs, immunostimulateurs ou modificateurs de la réponse biologique (Sanchez, Fungal Polysaccharides: Structural Characteristics and Their Modifying Properties on the Immune Response, 2006).

Puisque les polysaccharides, y compris les 3 glucanes, ne peuvent pénétrer dans les cellules en raison de leur grande taille moléculaire, Ils exercent leur action en se liant à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules Immunes telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules cytotoxiques naturelles (NK) et les lymphocytes T (Djabali, Benarba, Berroukeche, & al, 2016). Parmi ces récepteurs, le CR3, un des plus importants récepteurs membranaires chez les phagocytes impliqués dans la reconnaissance des pathogènes, a été identifié comme un des récepteurs des β-glucanes. L'affinité différentielle montrée par les récepteurs vis -à-vis les différents βglucanes varie en fonction du poids moléculaire, de la conformation acquise en solution, ainsi que du degré de ramification de ces molécules. Cette affinité différentielle affecte de manière significative leur activité immunomodulatrice (Sanchez, 2006).

Les polysaccharides sulfatés, y compris ceux provenant d'algues, possèdent des activités immunomodulatrices qui peuvent être utiles pour stimuler la réponse immunitaire ou contrôler l'activité des cellules immunitaires pour atténuer les effets négatifs associés tels que l'inflammation. Les polysaccharides sulfatés peuvent affecter plusieurs cibles dans les systèmes immunitaire et inflammatoire qui peuvent avoir un impact sur la progression de la maladie et les résultats, y compris la progression tumorale et la métastase (Jiao, Yu, Zhang, Ewart, & al, 2011).

3.2.5 Activité prébiotique :

Certains EPS sont des substrats pour les bactéries bénéfiques du microbiote intestinal, favorisant ainsi leur croissance et leur activité (Lebeer, Vanderleyden, De Keersmaecker, & al, 2008)

3.2.6 Activité antivirale :

Les maladies infectieuses virales mettent gravement en danger la santé humaine. Dans la recherche de médicaments antiviraux efficaces, les chercheurs ont trouvé que les polysaccharides ont une bonne activité antivirale. En tant que composant antiviral efficace et peu toxique, les polysaccharides ont de larges perspectives d'utilisation médicinale et méritent d'être étudiées plus avant. (Chen & Huang, 2018)

3.3 Applications de l'EPS dans les produits à base de viande fermentée :

Les exopolysaccharides produits par LAB sur les produits carnés ont été généralement considérés comme des facteurs de détérioration et leurs applications potentielles dans la viande transformée restent inexplorées (Prechtl, Pfeifer, Mauracher, Kneifel, & al, 2018)

Ont découvert que l'EPS pouvait améliorer les propriétés texturales des saucisses, en fournissant un produit plus dur, moins adhésif et plus résistant. (Loeffler, Falentin, Valence, Ennahar, Le Blay, & al, Impact of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria on the texture of meat products, 2020) ont examiné l'utilisation de LAB formant des EPS in situ dans les produits carnés, décrivant leur rôle positif dans différentes matrices de viande, telles que les saucisses fermentées à faible teneur en matières grasses. (Korcz & et Varga, 2021)

Ont rapporté que l'EPSS formé in situ a influencé la qualité des produits de viande fermentés, ce qui élargit sans aucun doute les possibilités de leur application, en particulier dans les produits de viande allégés, puisque leur consommation est actuellement en croissance. Ainsi, plusieurs études ont montré que la production d'EPS par LAB peut trouver une application pour améliorer la texture des produits carnés, notamment ceux à faible teneur en matières grasses.

Cependant, pour garantir leur qualité, la concentration d'EPS dans le produit carné doit se situer dans une fourchette bien définie (Loeffler, Falentin, Valence, Ennahar, et Le Blay, & al, 2020)

3.4 Protection contre les stress environnementaux et agent pathogène :

Formation d'un biofilm protecteur contre les dessèchements, les UV et les attaques chimiques aux cours de la colonisation des surfaces par l'adhésion et la formation de communautés microbiennes .Et cela empêcher la compétition avec les bactéries pathogènes dans cela en observe une inhibition de la colonisation des surfaces par les pathogènes ces EPS peuvent former une barrière physique contre les agents pathogènes, aidant ainsi à prévenir les infections (Lebeer, Vanderleyden, & et De Keersmaecker, 2008)

Chapitre IV :Matériel et Méthode

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique, département de Sciences Biologiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Moulay Taher « Saida », qui à été effectué durant la période du février jusqu'à 05 juin 2024.

Il consiste à étudier les activités des exopolysaccharides (EPS) isolés à partir de souches lactiques.

4.1 Prévenance des échantillons :

Au cours de cette étude, nous avons utilisé deux échantillons Lben et Beurre traditionnelle préparé de lait de vache de wilaya de Saida.

4.2 Préparation des échantillons :

L'isolement des souches de bactérie lactique a été effectué à partir d'un beurre et Lben de la wilaya de Saida, les échantillons ont été prélevé dans un flacon stérile d'où on les met dans une glacière tout en respectant les conditions aseptiques puis acheminé au niveau de laboratoire le jour même. Le tableau suivant montre les caractéristiques de notre échantillon

Tableau 3 : les caractéristiques de notre échantillon

Echantillon	Code	Couleur	Texture	Nature	Région
Beurre	B	Blanc jaunâtre	Lisse et crément	Lait de vache	Ain El Hadjar (Saida)
Lben	L	Blanc	Visqueux, gluant	Lait de vache	Ain El Hadjar (Saida)

4.3 Isolement et purification des souches lactiques :

Une solution mère a été préparée par l'ajout de 1g de beurre choisi dans 9 ml d'eau physiologique stérile **(Ulacio et al.,1997)** puis le mélange a été homogénéiser par vortex pendants 5min, ensuite une série de dilutions décimale sont été réalisée jusqu'à 10-6 (figure 3), chaque dilution subit une homogénéisation par agitation à l'aide d'un vortex.

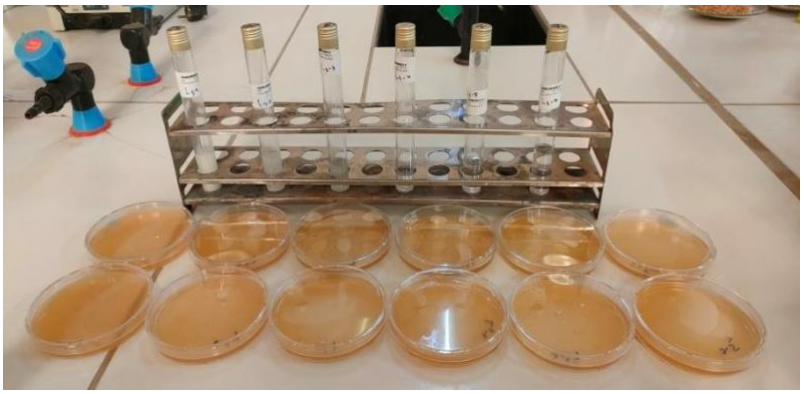


Figure 3 : Isolement des souches lactiques

4.3.1 Purification

La purification des souches isolées a été réalisée par repiquages alternés et successifs sur milieux MRS (bouillon /gélose) ; La pureté des souches a est révélée par l'apparition des colonies homogènes ayant le même aspect, la même couleur, la même taille et la même forme **(Heleni et al.,2006 ; Guiraud.,2004**) puis la vérification a été réalisée par l'étude macroscopique et microscopique.

4.3.2 Pré identification

Après purification, les isolats sont pré-identifiés en se basant sur différents caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques **(Mostefaoui et al., 2014; Badis et al.,2005; Zidani; 2015; Bai et al., 2016; Sandes et al., 2017)**

4.3.2.1 Examen macroscopique

Ce test est basé sur l'observation visuelle des colonies cultivées sur boites de Petrie afin de déterminer leur taille, leur forme et leur couleur (aspect macroscopique).

4.3.2.2 Examen microscopique

L'aspect microscopique est révélé par l'intermédiaire de la coloration de Gram(Annexe 8) elle permet de différencier les bactéries à Gram + de celles à Gram -, les bâtonnets et les coques ainsi que la détermination du mode d'association.

4.4 Coloration de Gram

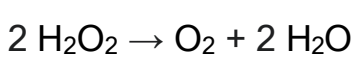
La coloration de gram est effectuée pour les isolats pures, elle permet de distinguer deux types des bactéries, les bactéries Gram négatif (G-)et les bactéries Gram positifs (G+), selon la composition de la paroi notamment l'épaisseur du peptidoglycane et par la présence d'une membrane externe (**LARPENT. ,1990**)

Ce test nous renseigne sur la morphologie et le mode de regroupement des cellules

4.5 Tests physiologiques et biochimiques

4.5.1 Test de catalase :

L'activité catalytique est mise en évidence en émulsionnant sur une lame la colonie bactérienne à tester dans une solution d'eau oxygénée. La présence d'une catalase se manifeste par l'apparition de bulles abondantes d'oxygène.



$$2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O$$

Les bactéries à Gram + et à catalase négatif ont été considérées comme des bactéries lactiques présomptives **(Silva et al., 2017).**

4.5.2 Type fermentaire :

Dans des tubes à essai contenant des cloches de Durham,et 10ml MRS sans extrait de viande ont été ensemence par les isolats. Les souches

consédiré comme homofermentaires ne produisent pas les CO_2 **(Carr et al, 2002)**

4.6 Conservation des isolats :

4.6.1 Conservation à court terme :

Les bactéries lactiques sont ensemencées sur gélose MRS incliné en tube. Après incubation à 30 °C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à 4°C. Les repiquages sont renouvelés tous les 06 à 08 semaines **(Badis et al., 2004).**

4.6.2 Conservation à long terme :

A partir des cultures jeunes (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé(**Annexe I),** 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes eppendorf à -20°C. **(Saidi et al., 2004**). Le protocole réalisé est représenté par la **(Figure suivante).**

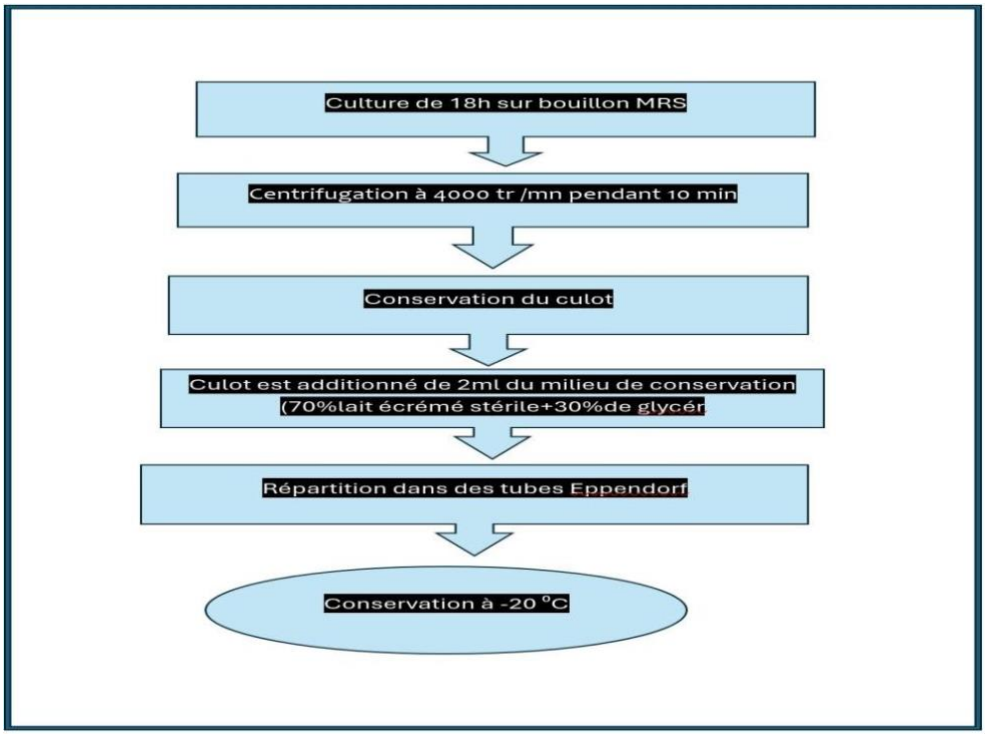


Figure 04: schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées (**Saidi et al, 2002**)

4.7 Test antibiogramme:

4.7.1 Principe :

L'antibiogramme permet de catégoriser une souche bactérienne en classe semi quantitatives (Sensible S, intermédiaire I ou résistante R) et d'orienter l'antibiothérapie. Il est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence des antibiotiques(ATB), ces ATB diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé.

Une culture jeune de 18h ont été ensemencé à la surface d'une gélose MRS ; chaque isolat a été testé en vers des disques de dix antibiotiques (annexe11) chaque disque a été déposé à la surface des boites ensemencées par des isolats lactiques , après incubation à 30°C pendant 24h, les diamètre des zones d'inhibition ont été mesuré **(Karam et al., 1994).**

4.8 Activité hémolytique :

Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en touche des cultures jeunes des 06 isolats (B1, B5 1 ,B7 ,B7S, B 13, B6)sur gélose Colombia (sang 5 %) (annexe I).l'apparition d'une zone de lyse aux tours ces isolat indiques des résultats positive autrement l'absence de cette zone indique des résultats négative (jensen,M.A et al.,2008).

4.9 Screening des souches productrices d'EPS :

La stratégie adoptée pour isoler des souches lactique productrice des EPS été par l'utilisation d'un milieu sélective qui est MRS rouge congo (MRS RC) (annexe I), L'observation du phénotype des colonies représente la première ligne de sélection des souches des colonies apparaissent noire et marron considérées comme productrice d'EPS ; colonie rouge considérées comme non productrice EPS Mais aussi leur capacité de croitre sur milieu MRS saccharosé à 10% .

4.10 Extraction des EPS :

Parmi 30 isolats, que Trois '02' souches ont été choisis pour l'extraction.

Des cultures jeunes standardisés (10%) incubé a 30°C /48h, L'extraction des EPS est faite par la méthode décrite par **Li *et al.*, (2014).** Après la récupération des cultures de l'incubateur, la suspension est centrifugée à4000 g pendant 20 minutes afin de récupérer le surnageant qui est additionné du TCA pour donner une concentration finale de 4% (w/v). Une autre centrifugation de 4000 g pendant 20minutes est faite pour précipiter et éliminer les protéines. Cette fois ci, on ajoute 2 volumes de l'éthanol au surnageant récupéré et laissé précipiter à 4 °C pendant une nuit. On est recueilli par une centrifugation de 4000g pendant 20 minutes à 4 °C. Puis, le culot a été suspendu dans de l'eau distillée.

4.11 Quantification des EPS par la méthode du phenol-sulfurique

Quantification des EPS par la méthode du phenol-sulfurique La quantification des glucides peut se faire par des méthodes colorimétriques dont souvent on utilise la méthode du phénol-acide sulfurique, qui repose sur le traçage d'une courbe d'étalon (annexe 03) à partie des dilutions réalisées d'une solution de stock 'ou le glucose est le standard (0.1gr/l)).

Dans des tubes à essai, 40µl de phénol (80%) et 2 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) sont additionnés à800 µl d'échantillon (solution d'EPS).

Les tubes sont maintenus en obscurité pendant une demi-heure à la température ambiante, après 30 minutes la densité optique est mesurée à 490 nm (BIBBY Anadéo) contre un blanc dans lequel 800 µl d'eau distillée remplace la solution d'EPS (**Dubois et al., 1956).**

Tableau 4 : préparation des dilutions de glucose.

Solution de glucose 0,1g/l(ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Eau distillée (ml)	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Glucose g/l (ml)	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1

4.12 Test Antimicrobien

La méthode de Barefoot et Kaenhammer (1983) a été adoptée. Des puits de 5 mm de diamètre sont stérilement creusés sur la gélose Muler Hilton inoculée avec la souche indicatrice pathogène, à l'aide d'un emporte-pièce (cloche de Durham). Chaque puits est ensuite rempli avec 100 µl d'EPS (EPSBL 7S et EPSBL 13). Les boîtes de Pétri sont placées à +4°C pendant 4 heures pour permettre une diffusion optimale de EPS (Doumandji et al., 2010). Ensuite, les boîtes sont incubées à 37°C. La présence de zones d'inhibition autour des puits est mesurée après 24 heures d'incubation (Hwanhlem et al., 2011).

Les souches indicatrice sont : *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus ,Escherichia coli , Bacillus subtilis , Enterococcus* faecalis *,klebseilla pneumonie, candida albicans*)

Tableau 05 : les codes des souches indicatrices

Souche pathogènes	Code
Escherichia coli	*ATCC 25922*
Bacillus subtilis	*ATCC 6633*
Klebsiella pneumonia	*ATCC 700603*
Enterococcus faecalis	*ATCC 29212*
Staphylicoccus aureus	*ATCC 29213*
Candida albicans	*ATCC 10231*

4.13 Activité anti-biofilm

L'activité anti-biofilm des deux extrait (EPS7s et EPS 13)à été évaluée vis-à-vis des 08 souches indicatrices (*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus ,Escherichia coli , Bacillus subtilis , Enterococcus faecalis ,klebseilla pneumonie, Candida albicans*)en inoculant 0 ,2 mg/l pour EPS 13 et 0,2 mg/l pour EPS 7s dans 5 ml de bouillon MH ensemencée par la souche indicatrice

Incubation se fait à 37 c° pendant 24 heure (phase statique),après verser le contenue des tubes et rincer avec eau physiologie puis ajoute éthanol 95% pendant 15 min ,puis éliminé et laisse séché à l'air libre pendant 30 min ,après ajouté de cristal violet de 2 % ,5 ml dans chaque tube (P/v) pendant 5 min après vider les tub et sécher à l'aire libre pendant 10 min .

4.14 Activité antioxydante

L'activité de scavenging des radicaux libres de l'EPS a été mesurée par DPPH (**Pieniz *et al.,* 2014).** Brièvement, un volume de 0,8 ml de solution de DPPH (0,005 g /100ml dans méthanol à 95 %) a été mélangé avec 0,2 ml des EPS et incubé à l'obscurité pendant 30minutes. ensuite les échantillons ont été mesurés à 517 nm. L' Acide ascorbique (10mg/ml)a été utilisé comme témoin positif. L'activité antioxydante a été calculée à l'aide de la formule suivant :

$$\%\,Activité\ = = \frac{(A0 - A)}{A0} \times 100$$

A:absorbance

A_0:absorbance de vitamin c (témoin)

A_0 : absorbance d'EPS 7s,13

4.15 Activité d'émulsificationes :

Les émulsions ont été préparées avec 1.5ml d'une des huiles (huile d'olive) et 500 ul D'EPS 7s et EPS13 plus 1 ml eau distillé le tous été versé dans un tube a essai à bouchon à vis ; ce mélange a été homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 5 min selon la méthode expliquée par **Freitas et al. (2009).** L'activité émulsifiante (EA) a été déterminée après 1h et 24 h et 48 h.

$$\%l'index\ \ d'émulsion = \frac{\text{hauteure de la couches emulsion}}{\text{hauteur de la mélange}} \times 100$$

Chapitre V : Résultats et Discussion

5.1 La pré identification des souches

Le pré identification des souches Cette étape a été réalisée sur 02 souches qui ont été bacille Gram positive, catalase négative et homofermentaire, donc susceptible d'être des lactobacilles ;

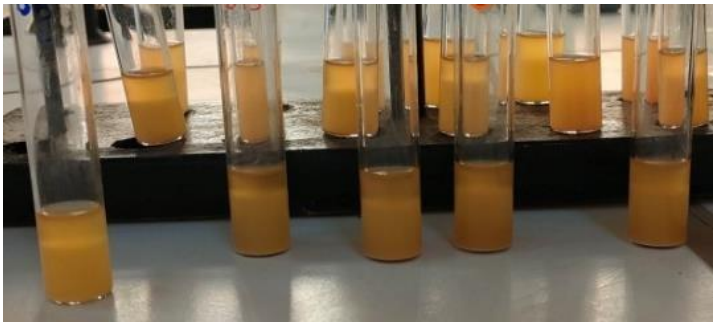


Figure 05 : Aspect des souches lactiques pures en milieu MRS liquide

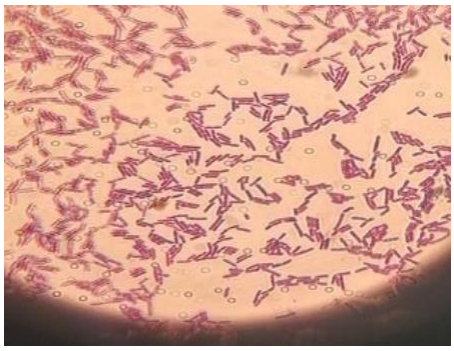
Tableau 08: les aspects microscopiques des isolats après coloration de gram.

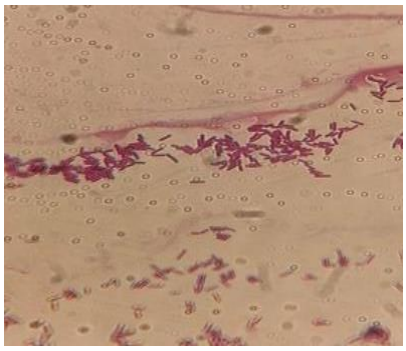
Code	Origine	Aspect	Couleur	cat	Coloration de Gram
B1	Beurre	Anticulaire	blanche	-	Bacille-G+ diplo/en chainette / En titrat
B2	Beurre	Bombé	blanche	+	
B3	beurre	Circulaire Petit taille	blanche	-	G+/ Coques/ grappe de résain /en titrat /en chainette / en amas
B4	beurre	Bombé petit taille	blanche	-	G+/Coques/ Isoler/en diplo/en titrat/en chainette/ en amas
B5(1) B5(2)	beurre	Circulaire petit taille	blanche	-	1:G+/Palissade/ Bacille/en diplo/en chainette 2 :G+/Ovoide/ Bacille
B6	beurre	Circulaire petit taille	blanche	-	G+/Bacille/en diplo /en titrat/grappe de résaine/en chainette /allongé
B7	B	Lenticulaire ,P etite taille	Beige Centre noire	-	G+/bacille/en diplo/ En titrat/en chainette
B8	B	Circulaire Petit taille	blanche	-	G+/Coques/en diplo/en titrat/en chainette/ solé s isoler
B9	B	Lenticulaire petite taill	Beige Centre noire	-	

B10	B	Lenticulaire Petit Taille	Beige Centre noire	-	
B 11	B	Bombé	Biege	+	
B 12	B	Circulaire Grand 2mm	blanche	+	
B13	B	irrégulaire	Blanche,biege centre noir	-	Bacille / G+
B16	B	Lenticulaire,petit taille	Biege	-	
B 17 1	B	Lenticulaire	Biege	-	G +/ Bacille / Isoler Palissade
B 17 2	B	Lenticulaire	Biege	-	G+/ diplo / palissade /En titrat /bacille
B 17 3	B	Lenticulaire	Biege	-	G+/ Bacille court
B 18	B	Lenticulaire	Biege	-	Bacille, Palysate -diplo / Isolé G+
B 21	B	circulaires	Blanche centre noire	+	

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 30 isolats on a que 15 isolats ont été des bactéries a gram positif, se présentent sous forme de coques bacille disposés en diplocoques et en chainettes et leurs aspects microscopiques sont notés dans le tableau 8.





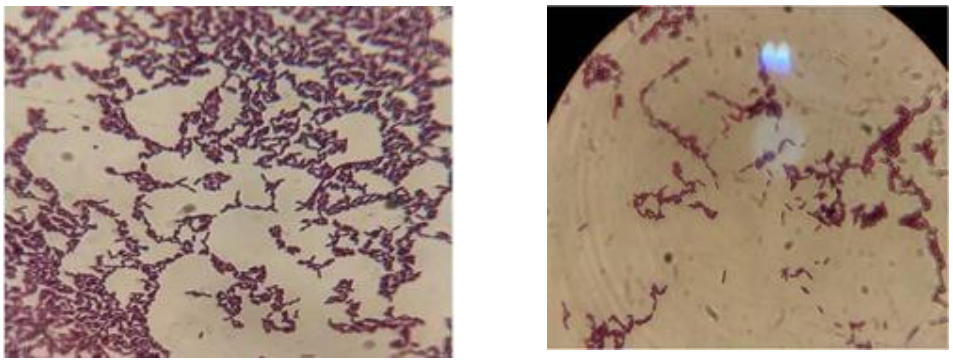


Figure 06: Observations microscopiques des bactéries lactiques après une coloration de Gram avec un grossissement (G : 10x100)

5.2 Le type fermentaire : ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de CO_2 qui est piégé dans une cloche de Durham en milieu MRS glucosé. Ce test permet de différencier les souches homolactiques de l'hétéro lactique après une incubation à 37°C pendant 24 heures. Nos isolats montrent aucune production de gaz (CO_2) à partir du glucose n'a été observée, ainsi, elles sont considérées comme homofermentaires**. (Figure 07)**

On n'a observé aucune production de gaz dans la cloche de 5 tubes , Les souches sont homofermentaire

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. **(Thompson et al., 1994)**

Figure 07 : Type fermentaire des isolats BL 7 et BL 13 .

5.3 Conservation des souches :

Le but de la conservation des souches bactériennes est de maintenir les microorganismes dans un état viable et stable sur une longue période, tout en préservant leurs caractéristiques génétiques et phénotypiques.

Figure 08 : la conservation des souches lactique sur les les eppendorf (longue durée)

5.4 Détermination des profils de résistance des antibiotiques :

La résistance ou la sensibilité des isoltas envers les antibiotiques été réalisé dons le but de connaitre les propriétés probiotiques des bactéries lactiques qui a été réalisée par nos collègue Belhadi Naima et Nezai Asma.

Dans ce but les isolats lactobacillus 7s et lactobacillus 13 ont subit le test de résistance aux antibiotiques vis–à-vis de 10 ATB de différentes familles, et la mesure de diamètre des zones d'inhibition (**Karam et Karam, 1994**) chaque souche pour chaque ATB testés permet de caractériser les souches comme étant sensibles ou résistantes.

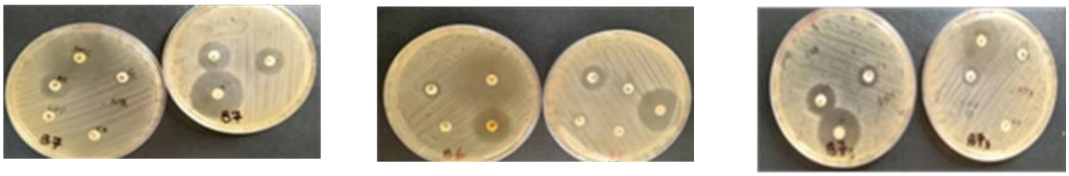


Figure 09: Résultats de l'antibiogramme des souches lactiques

Les résultats obtenus pour l'ensemble de souche sont présente dans le **Tableau 9.**

La résistance aux antibiotiques est une pré-occupation majeure en santé publique, car elle rend les infections plus difficiles à traiter, augmente le risque de propagation des maladies, et conduit à des taux de mortalité plus élevés.

Les bactéries résistantes aux antibiotiques sont des bactéries qui ont évolué ou acquis des mécanismes permettant de survivre et de se multiplier en présence d'antibiotiques qui normalement tueraient ou inhiberaient leur croissance. Cette résistance peut se développer par plusieurs mécanismes : Mutation génétique, Acquisition de gènes de résistance, Modification de la cible de l'antibiotique, Efflux des antibiotiques, Enzymes de dégradation tableau (annexe)

Tableau 9 : Résultats de l'antibiogramme des souches lactiques :

Anti biotiques	Abréviation	B7 S	B13
Aminoside	AK	S	S
Tobramycine	TOB	S	S
Macrolide	E	S	S
Amoxicilline	AMC	S	S
Céphalosporine	CFP	/	R
Céfépime	FEP	/	S
Nitroxoline	NTX	/	S
Levofloxacin	LEV	S	S
Acide fucidique	Fc	S	S
Céfoxitine	Cx	S	R

S : sensible, R :résistance

La sensibilité aux antibiotiques est considérée comme le critère d'innocuité le plus crucial lors de la sélection de souches à potentiel probiotique. Les bactéries lactiques sont sensibles à de nombreux inhibiteurs de la synthèse des parois cellulaires, tels que la pénicilline et l'ampicilline, ainsi qu'aux inhibiteurs de la synthèse protéique comme le chloramphénicol, l'érythromycine et la clindamycine (Microbiology, BMC) (Frontières in Microbiology). Les résultats montre que la souche B 13 est résistante à 2

antibiotiques (Céphalosporine et Céfoxitine), on observe aussi les deux souches lactobacillus B7s et B13 sont sensibles à 8 antibiotiques (Aminoside , Levofloxacin , Acide fucidique , Nitroxoline , Céfépime , Amoxicilline , Tobramycine , Macrolide).(Tableau 9).

Des études menées par El Jeni et al. (2008) ont rapporté que les souches d'**Enterococcus sp.** isolées à partir des intestins de mulets sont sensibles aux groupes d'antibiotiques suivants : rifampicine, chloramphénicol, gentamycine et vancomycine, mais résistantes à d'autres tels que l'oxacilline, la streptomycine, la céfazoline, la clindamycine et la pénicilline (El Jeni, 2008)

5.5 Activité hémolytique

Concernant la production d'hémolyse, les souches B7s et B13 ont montré une absence de dégradation du sang, manifestée par absence des zones de lyse autour des colonies. Ces résultats suggèrent que nos souches ne présentent pas de risque majeur pour l'hôte lors de leur application. Figure 10

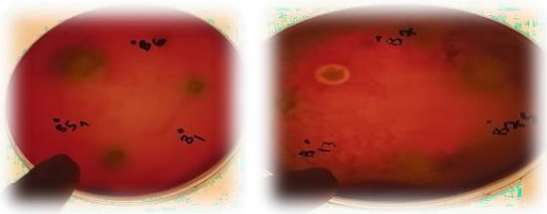


Figure 10 : Répresentative d'activité hémolytique des BL isolée

5.6 Extraction des EPS :

Le dosage des polysaccharides produits dans le bouillon MRS hyper- sucré peuvent être effectués après l'extraction des EPS par précipitation à l'alcool. Ces polysaccharides peuvent être quantifiés par des méthodes colorimétriques utilisant de l'acide sulfurique et du phénol. Cette quantification est basée sur le dosage des sucres totaux en se référant à une courbe d'étalonnage au glucose. Les seuils de production observés varient entre 0,013 g/L pour les souches Lb b7s et et pour la souche Lb Bl3, 0,7 g/L .

Ces résultats sont inférieurs à ceux rapportés par Abo Saif et Sakr (2020), qui ont réussi à isoler entre 0,5 g et 1 g d'EPS par souche.

Plusieurs condition tels que le type de souche, les conditions de culture et les substrats utilisés peuvent affecter la quantité d'exopolysaccharides (EPS) produite par les souches lactiques.

Figure 11: Les étapes de l'extraction des EPS

5.11 Isolement des bactéries lactiques productrices d'EPS

Trente isolats ont été isolée à partir des boites de MRS RC et MRS saccharosé 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 saccharosé montre des colonies circulaires bombées et de couleurs blanches de tailles petites maximum 1mmde diamètres.

Tableau 11: Examen macroscopique des colonies sur le milieu MRS s et MRS RC

Aspect macroscopique sur milieu de culture gélosé	Description

	Des colonies de tailles moyennes irréguliers brillants bombés et Visqueuses
	Des colonies de tailles moyennes irréguliers brillants bombés et Visqueuses

Aspect macroscopique sur milieu de culture gélosé	Description
	Des colonies de tailles ronds visqueuses, marrons et noirs

Des colonies de tailles ronds visqueuses, marrons et rouges

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,. A partir 30 isolats, 15 isolats été catalase négative et le Gram+ (cocci et bacille). Toutes ces colonies isolées ayant un aspect macroscopique des souches lactiques sur milieu MRS solide 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 12: Tableau représente l'aspect des colonies sur milieux MRS RC et MRS S.

Souches	Code	MRS saccharosé	MRS Rouge Congo
1	B17	Brillant, visqueuse	Rouge
2	B9 r	visqueuse	Maron
3	B12	Visqueuse	Maron
4	B13	Brillant	Maron
5	B18	Visqueuse	Rouge
6	B 3	Mate	Maron

7	B1	Visqueuse	Maron
8	B 6	Mate	Maron
9	B 5 1	Visqueuse	Maron
10	B 11 s	Visqueuse	Maron
11	B 7 s	Visqueuse	Maron
12	B 14 s	Brillant , Visqueuse	Maron
13	B 7	Brillant	Maron

5.7 Activité anti-microbienne :

Récemment, les EPS dérivées des LAB ont montré une activité antimicrobienne remarquable contre les pathogènes bactériens, tant à Gram positif qu'à Gram négatif. Cependant, le mécanisme fonctionnel sous-jacent doit être clarifié. Les EPS qui peuvent exercer une activité antagoniste

Les EPS de Lactobacillus spp. ont montré un effet antibactérien considérable (zone d'inhibition > 10 mm) contre *S. enterica* ATCC 43972 et *Micrococcus luteus* Ca6 (Trabelsi et al., 2017).

Les EPS formées par *L. johnsonii* FI9785 étaient responsables de l'augmentation de l'inhibition compétitive des pathogènes grâce à l'hydrophobicité de la surface et à l'auto-agrégation (Dertli et al., 2015).

Les EPS de Lactobacillus contiennent plusieurs groupes fonctionnels, par exemple des groupes carbonyle, phosphate et hydroxyle, qui joueraient un rôle essentiel dans l'exercice des effets antimicrobiens et antioxydants des EPS (Riaz Rajoka et al., 2020).

Ces polymères ont montré une inhibition in vitro ou in vivo des pathogènes Gram-positifs et Gram-négatifs avec différents degrés de résistance. La paroi cellulaire des bactéries à Gram positif comprend de nombreux composants structurels, qui sont des éléments essentiels impliqués dans l'interaction entre les cellules bactériennes et divers récepteurs sur d'autres surfaces (Al Kassaa et al., 2014).

Figure 12 : Les résultats obtenus de test anti-microbienne

Les EPS extraités des souches LB B 13 et LBB 7s, ne possèdent aucune activité envers toutes les souches indicatrices cela peut traduire par L'EPS produit par

L'effet était proportionnel à la concentration d'EPS ; cette concentration peut avoir un effet bactériocide ou bactériostatique contre les pathogènes ; telque *L. kefiranofaciens* DN1 a présenté des activités bactéricides et bactériostatiques contre *S. enterica serovar Enteritidis* et *L. monocytogenes*. L'effet était proportionnel à la concentration de l'EPS (Jeong et al., 2017).

5.8 Activités anti biofilm

Le terme biofilm fait référence à un arrangement de cellules bactériennes formant une communauté intégrée dans une matrice polymère extracellulaire auto-formée adhérant à une surface inerte ou vivante **(Vu et al., 2009 ; Simões et al., 2010).**

Il a été rapporté que les bactéries pathogènes forment des biofilms et s'y attachent en réponse à des stress environnementaux et pour se protéger contre l'activité antagoniste de l'hôte (**Kim et al., 2009).**

Les biofilms produits par les bactéries pathogènes sont reconnus comme une source importante d'infections chroniques et aiguës, principalement en raison de leur capacité à persister sur les surfaces et dans les dispositifs médicaux **(Kim et al., 2009).**

Ils sont également considérés comme une menace importante pour la sécurité alimentaire en raison de leur résistance aux traitements de

décontamination conventionnels. La recherche sur le contrôle, l'éradication ou la prévention des biofilms a récemment fait l'objet d'une attention accrue en raison des effets des biofilms sur la santé humaine. La matrice du biofilm produite par le pathogène Gram-négatif.

Gram négatif Pseudomonas aeruginosa est composée d'un mélange visqueux d'EPS (contenant les polysaccharides non mucoïdes Psl et Pel, ainsi que de l'alginate), de protéines telles que CdrA et d'ADN extracellulaire (eDNA) (Maunders et Welch, 2017).

Dans la cavité buccale et les voies respiratoires, ces communautés microbiennes structurées et adhérentes (biofilms) sont responsables des caries dentaires, de la parodontite et des infections respiratoires ; dans le tractus gastro-intestinal, ces communautés de biofilms contenant des organismes bénéfiques tels que les lactobacilles peuvent jouer un rôle essentiel dans la prévention des maladies infectieuses et des maladies infectieuses.

Les organismes bénéfiques tels que les lactobacilles peuvent jouer un rôle essentiel en tant qu'agents protecteurs (**Aoudia et al., 2016).**

Les EPS produites par *L. plantarum* YW32 ont montré la capacité de supprimer la formation de biofilms par des pathogènes Gram positifs et négatifs.

Wang et *al.* (2015) ont suggéré que les EPS pourraient interférer avec l'activité du biofilm en modifiant les surfaces des cellules bactériennes, en entravant l'attachement initial des cellules bactériennes à la surface, ou en régulant à la baisse l'expression des gènes impliqués dans la formation du biofilm en agissant comme une molécule de signalisation (**Wang et al., 2015).**

L'EPS produit par *L. casei* NA-2 a inhibé la formation de biofilm par B. cereus de plus de 95,5 %, suivi par *S. aureus* (30,2 %), *S. Typhimurium* (12,1 %), *E. coli* (16,9 %), comme le montre le tableau 3. Rani et *al.* (2018) ont rapporté que l'EPS de *L. gasseri* FR4 a montré l'effet antibiofilm le plus élevé contre *L.*

monocytogenes MTCC 657 (56% d'inhibition) et l'effet le plus faible (19,2%) contre *Enterococcus faecalis.*

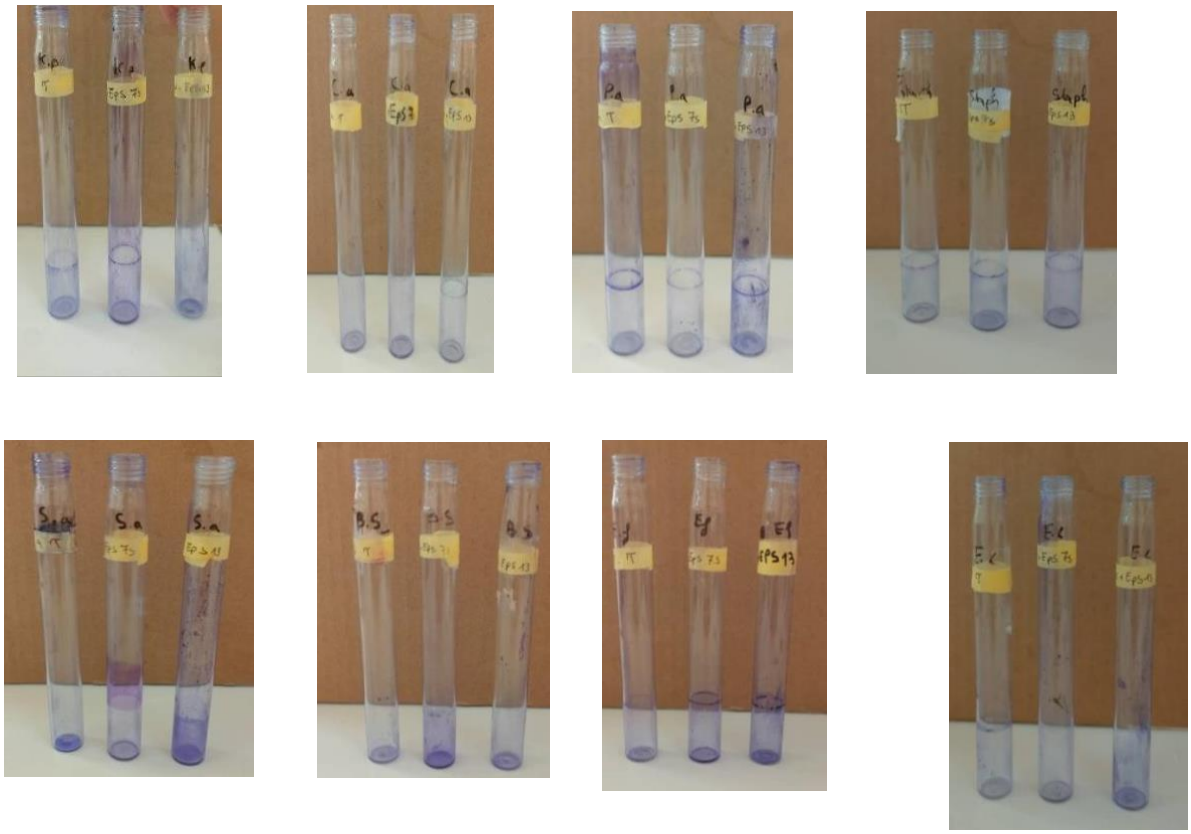


Figure 13 : Résultats de l'activité anti-biofilm.

Cette expérience réveille la formation qualitative de la formation ou l'absence des biofilms.

D'après le tableau on observe que certain pathogène ne forme pas des biofilms comme (Candida albicans , Staphylococcus aureus, Enterococcus faecium); Ce test réveille que EPS BL 7s a un effet positif envers (Escherichia coli et Pseudomonas aeruginosa) autrement EPS BL 13 possède un effet positif envers Klebseilla pneumonie et Bacillus subtilis. L'effet était proportionnel à la concentration d'EPS ; Ces résultats peut être due aux concentrations d'EPS non dosé et non standardisé.

Tableau 10 : les résultats obtenus de test anti-biofilm

Souches Pathogènes	Témoin	Souche pathogène	Souche pathogène

		+EPSBL7s	EPSBL13
Klebseilla pneumonie	+	+	-
Candidat albicans	-	-	+
Pseudomonas aeruginosa	+	+/-	+
Staphylococcus aureus	+	+	+
Bacillus subtilis	+	+	-
(Cq)	-	-	+
Enterococcus faecalis	-	+	+
Escherichia coli	+	-	+

5.9 Activité anti –oxydant :

L'activité antioxydante des EPS des souches de Lactobacillus sp. B7s et B13 a été évaluée par le piégeage des molécules du radical libre DPPH. Les résultats montrent des pourcentages d'inhibition du radical DPPH modéré, allant de 30,46%, et 23,84% pour les EPS BL 7s et EPS BL 13 respectivement (Figure 14). L'acide ascorbique a présenté la meilleure activité antioxydante, atteignant un pourcentage d'inhibition de 94% à une concentration de 20 mg/ml.

Ces résultats sont inferieurs aux travaux de Wang et al. (2017), tandis que Li et al. (2012) ont rapporté une activité de piégeage du radical DPPH de 53,05% avec Lactobacillus plantarum C88. Les EPS jouent un rôle vital en tant que piégeurs de radicaux libres, inhibant les dommages oxydatifs dans les organismes vivants, et peuvent être considérés comme des antioxydants potentiels uniques (Adebayo-Tayo et al., 2018). En conséquence, les EPS des

Lactobacillus peuvent être des substances antioxydantes potentielles, applicables dans les aliments fonctionnels.

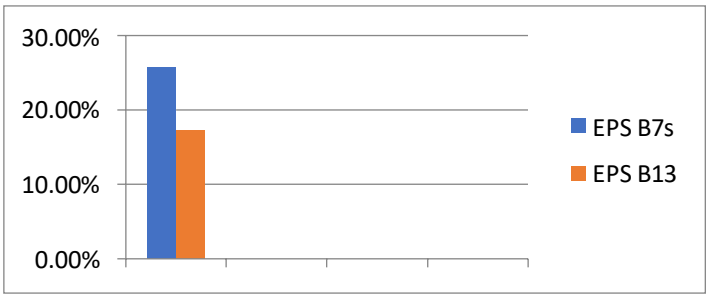


Figure 14 : Pourcentages d'inhibition du DPPH des EPS BL7s et EPSBL13.

5.10 Activité émulsifiante

Ce test d'émulsification a été réalisé entre EPS BL7s et EPS BL13 vis à vis L'huile d'olive ,Les indices d'émulsification (EI) des EPS ont été comme suivant dans la figure 15.

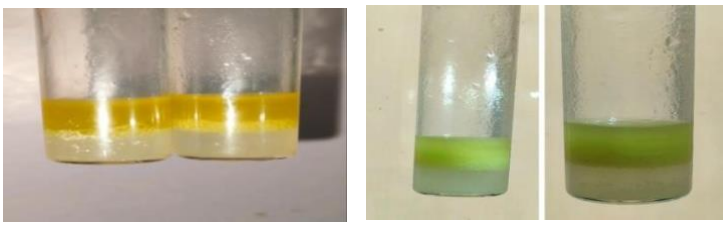


Figure 15 : les résultats de l'activité émulsifiante en 1h, 24h, 48h

$$\%\ \textbf{d'indice d'émulision} = \frac{Hauteur\ de\ la\ couche\ emulsion}{\text{Hauteur de le mélange}} \times 100$$

-La figure 15 Représente les résultats de l'activité émulsifiante en 1h, 24h, 48h.

- Entre une heure, 24h et même 48h on observe une stabilité de la valeur de l'indice émulsion dans toutes les souches d'où l'indice d'émulsion d'EPS LB 13 et LB 7s été (41%) avec l'huile d'olive.

Conclusion

Les bactéries lactiques sont connues pour être une source de nombreuses substances biologiquement actives qui diffèrent dans leur structure chimique, y compris le dioxyde de carbone, les acides organiques, les bactériocines, et une large gamme de composés de poids moléculaire, par exemple, les peptides antifongiques, la reutérine, la reutéricycline ainsi que l'EPS.

Les EPS dérivés de bactéries lactiques sont généralement considérés favorablement par les industries alimentaires, pharmaceutiques et nutraceutiques en raison de leur impact rhéologique et de leurs propriétés bénéfiques pour la santé.

Grâce au screening mis en place dans ce travail nous avons pu isolés 15 souches qui ont été purifiée, prés identifiés par quelques test classiques (caractéristique morphologique, des test biochimiques et physiologique) révèlent que ces isolats appartiennent des bactéries lactiques. Que deux souches ont été sélectionnés de Lactobacillus .Par la suite à des essais concernant la production des EPS, l'activité d'émulsifiant, antibiofilm, antimicrobiennes. Antioxydante.

Les résultats obtenus dans cette étude sont résumés dans les points suivants :

- Les souches sélectionnées sont aptes à produire des EPS avec une rendement maximale obtenue par la souche B13 (0,7g/l) et B7s (0,013).
- L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH des souches (BI7s, BI13) montre une activité antioxydante qui diffère d'une souche à l'autre.
- Une absence activité antimicrobienne de notre EPS contre la majorité des pathogènes utiliser.
- L'indice d'émulsification pour les deux Lactobacillus est stable (41%).
- Nous n’avons remarque aucun résultat pour un produit de lben

Sur la base de ces résultats, on suggère que les EPS obtenus de ces souches de bactéries lactiques nécessitent une étude approfondie envers les dosage et caractérisation de ces derniers.

Références bibliographiques

Adams, M., & Marteau, P. (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *International Journal of Food Microbiology, 27*(2-3), 263-264.

Aguirre, M., & Collins, M. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*, 95-107.

Allouache, R., & al, e. (2017). Effets des bactéries lactiques sur les produits alimentaires fermentés. *Journal de la Science Alimentaire, 25*(3), 123-135.

Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. ((2011)). *New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides.* (1): 54-66: Biotechnology Advances29.

Bonadio, R. S., Baptista, M. S., Horinouchi, C. D., & al, e. (2015). Lipid-based delivery systems for cosmetics: A review. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,, 51*(1), 99-110.

Boudersa, W., & Nekkaa, R. ((2017)). Étude de l'activité antibactérienne de bactéries lactiques isolées à partir d'un produit laitier fermenté : le yaourt brassé. . *Journal de la Société Algérienne de Microbiologie*, 17(1), 18-24.

Boudjema, K. (2008). les métabolites et la biosynthèse des bactéries lactiques. *15*(3), 45-58.

Boulal, A. K.-H., & al, e. (2017). Effectiveness of decimal dilution homogenization in microbial analysis. *Journal of Microbiological Methods, 139*, 35-42.

Boullouf, L. (2017). *Étude des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire(Thèse de doctorat).* Université de Paris.

Brahimi, S. ((2015)). *Isolement et Caractérisation Biotechnologiques desBactéries Lactiques Isolées à Partir des Margines d'Olives«AMOREDJ » Fermentés.* 203: thèse de doctorat. Université d'Oran1 AhmedBen Bella, Faculté de science département de biologie.

Calvez, D., & al, e. (2009). *Impact des bactéries lactiques sur la santé humaine : Avantages et controverses.* (É. S. France., Éd.) France.

Campos, P. M., & al, e. (2019). Natural lipids and lipid-based systems in cosmetic formulations: Use and future trends. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,* 55, e17218.

Carine M., D. J., & al, e. (2009). Mise en évidence de la diversité génomique des bactéries lactiques. *Journal of Microbial Diversity,* 25(3), 345-356.

Cerning, J. ((1990)). *Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria.* 113-130: FEMS Microbiology Letters87 (1):.

Cerning, J. (1990). *Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria FEMS Microbiology Letters,, 87*(1-2), 113-130.

Cerning, J. (1990). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait, 70*(1), 1-17.

Characklis, W., & Wilderer, P. (1989). Structure and Function of Biofilms. Dans W. e. Characklis (Éd.), *Structure and Function of Biofilms* (pp. 93-105).

Chemlal-Kheraz, M. (2013). *Étude des exopolysaccharides synthétisés par les bactéries lactiques et leur impact sur la texture des produits alimentaires (Thèse de doctorat).* Université de Béjaïa.

Chemlal-Kheraz, M. (2013). Propriétés aromatisantes des bactéries lactiques et leur impact sur les produits alimentaires. *Journal de la Science Alimentaire,* 45(2), 123-135.

Chen, X., & Huang, G. (2018). The Antiviral Activity of Polysaccharides and Their Derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77-85.

Chen, Y., & Narbad, A. (2018). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structures, functions and applications. *In R. R. Watson, & V. R. Preedy (Eds.), Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion* , 359-369.

Corrieu, G., & Luquet, F. (2008). *Bactéries lactiques. In Microbiologie industrielle.* Tec & Doc Lavoisier.

Curk, M. C., & al, e. (1993). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying lactobacilli. *Journal of Microbiological Methods, 18*(2), 97-105.

Daoudi, H., & Khelef, C. ((2018)). *Contribution à l'étude de l'activité.* 104: thèse.

De Vuyst, L., & & Degeest, B. (1999). *Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria.* FEMS Microbiology Reviews.

De Vuyst, L., & & Degeest, B. (1999). *Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews.*

De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). *Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria.* FEMS Microbiology Reviews,.

Degeest, B., & De Vuyst, L. L. (1999). Correlation of activities of the enzymes α-phosphoglucomutase, UDP-glucose pyrophosphorylase, and UDP- galactose epimerase with exopolysaccharide biosynthesis by Streptococcus thermophilus LY03. *Applied and Environmental Microbiology,* 65(1), 351-359.

Dellaglio, F. F., & al, e. (1994). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology,,* 24(1-2), 1-29.

Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, pp. 25-39.

Djabali, A., Benarba, B., Berroukeche, F., & al, e. (2016). Immunomodulatory activities of β-glucans: Implication in cancer therapy. *Journal of Cancer Therapy,*, 517-528.

Donot, F., Fontana, ,. A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers,, 87*(2), 951-962.

Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 76(4), 847-867.

Draelos, Z. D. (2014). L'acide lactique comme agent exfoliant naturel : Effets sur l'élimination des cellules mortes et le renouvellement cellulaire pour une peau plus éclatante. *Journal of Dermatology, 85*(2), 112-120.

Drake, M., & & Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). *Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. 1). Academic Press.

Drider, D. (s.d.).

Drider, D., & Prévost, H. ((2009)). *Microorganisms in Fermented Foods.* In Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition): 789-796.

Drider, D., & Prévost, H. (s.d.). *Microorganisms in Fermented Foods.Encyclopedia of Food Microbiology* (éd. 2nd ed, Vol. 2). (A. Press., Éd.) C. A. Batt & M. L. Tortorello.

Du, Y. C., & al, e. (2018). Extracellular Polymeric Substances in Biofilms: Formation, Function, and Applications. *Environmental Microbiology, 20*(6), 1845-1863.

Duboc, P., & Mollet, B. (2001). Applications des polysaccharides dans l'industrie alimentaire. *Cahiers de Nutrition et de Diététique, 36*(5), 351-360.

El Jeni, R. B.-Z. (2008). Activité antibactérienne d'Enterococcus sp. et Leuconostoc sp. sur les bactéries en pisciculture larvaire. *Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer*, 65-68.

Federighi, M. (2005). *Les bactéries lactiques. In : Brémaud P. (Ed.), Microbiologie des aliments,* (éd. Editions Tec & Doc,). Paris.

Frontiers in Microbiology. (s.d.). Antimicrobial Susceptibility of Lactic Acid Bacteria Strains of Potential Use as Feed Additives - The Basic Safety and Usefulness Criterion.

Gänzle, M. G., & & Gobbetti, M. (2007). *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering* (Vol. 1). Probiotic Bacteria and Enteropathogens in the Gastrointestinal Tract.

Garrido, M. S., & al, e. (2002). Role of Extracellular Polymeric Substances in Biofilm Formation and Stability. *Biofilms, 1*(3), 143-151.

Geesey, G. (1982). Extracellular Polymeric Substances: Their Role in Microbial Aggregation. *Microbial Ecology, 8*(2), 113-126.

Hadef, R. (2012). *Étude des systèmes protéolytiques des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire (Thèse de doctorat).* Université de Tizi-Ouzou.

Hassaine, N. (2013). Les bactéries lactiques : caractéristiques, rôles et applications dans l'industrie alimentaire. *Revue Scientifique et Technique, 30*(1), 67-77.

Hassoun, A., & al, e. (2017). Effets des bactéries lactiques sur la prévention des infections cutanées : Production de substances antimicrobiennes et neutralisation des radicaux libres. *Journal of Dermatological Science, 120*(5), 321-330.

Hermier, M. D., & al, e. (1997). Paris, France: Étude morphologique des bacilles : formes et dimensions.

Hermier, M. D., & al, e. (1997). *Étude morphologique des bacilles : formes et dimensions* (éd. Éditions Microbiologie). Paris,France.

Hermier, M. D., & al, e. (1997). *Étude morphologique des bacilles : formes et dimensions.* (éd. Éditions Microbiologie.). Paris, France.

Hidalgo-Cantabrana, C., & al, e. (2012). Microbial Exopolysaccharides: What is their role in health and disease? *Current Opinion in Microbiology,, 15*(1), 101-108.

Hongpattarakere, T., & al, e. (2012). *Journal of Food Science and Technology, 49*(2), 236-243.

Hongpattarakere, T., Rekha, R., Komesu, A., & Nout, M. J. (2012). Antioxidant activity and properties of fermented chitin-glucan prepared from shrimp shells by lactic acid bacteria. *Journal of Food Science and Technology, 49*(2), 236-243.

Hongpattarakere, T., Wichienchot, S., Nout, M. J., & Klaenhammer, T. R. (2012). Antioxidant activity and properties of fermented chitin-glucan prepared

from shrimp shells by lactic acid bacteria. . *Journal of Food Science and Technology,, 49*(2), 236-243.

Huang, X., & al, e. (2014). Polysaccharide from Ganoderma lucidum: Extraction, characterization and its immunomodulating properties. *Food Research International*, 1-8.

Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., Ewart, H. S., & al, e. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*, 196-223.

Jolly, L; Vincent, S. J. F; Duboc, P; Neeser, J. R; et al. (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Anton van Leeuwenhoek, 82*, 367-374.

Kambourova, M., Mandeva, ,. R., Dimova, D., Poli, A., & al, e. (2015). Exopolysaccharides produced by halophilic microorganisms. *In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1-16.

Kambourova, M., Mandeva, R., Dimova, D., & et Poli, A. (2015). Exopolysaccharides produced by halophilic microorganisms. *In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1-16.

Kang, S., & al, e. (2002). Utilisation de l'acide lactique dans les produits de soins de la peau : Effets sur l'éclat et l'uniformité du teint. *International Journal of Cosmetic Science, 55*(3), 201-210.

Kim, Y., & al, e. (2018). Action anti-inflammatoire des bactéries lactiques sur la peau : Modulation de la réponse immunitaire et inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires. *Journal of Dermatology, 105*(2), 87-95.

Korcz, E., & et Varga, L. (2021). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: Novel applications in the food industry. *Innovative Food Science & Emerging Technologies,, 67*.

Lahtinen S., O. A., & al, e. (2012). Advances in the Genomic Classification of Lactic Acid Bacteria. *Microbial Genomics, 15*(7), 489-499.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., & et De Keersmaecker, S. C. (2008). *Nature Reviews Microbiology, 8*(3), 171–184.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C., & al, e. (2008). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 58-71.

Lee, C. H., Moturi, V., Lee, Y., & al, e. (2013). Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *Journal of Controlled Release, 136*(1), 88- 98.

Leonard, R. (2013). Growth Characteristics of Lactic Acid Bacteria. Dans *In Fermented Foods and Beverages* (pp. 101-120). Springer.

Li, Y, & Wang, X. (2010). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from Lactobacillus plantarum C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, 445-450.

Loeffler, M., Falentin, H., Valence, F., Ennahar, S., et Le Blay, G., & al, e. (2020). *Journal of Food Science and Technology, 57*(5), 1749-1759.

Loeffler, M., Falentin, H., Valence, F., Ennahar, S., Le Blay, G. G., & al, e. (2020). Impact of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria on the texture of meat products. *journal of Food Science and Technology, 57*(5), 1749-1759.

Looijesteijn, P. J. (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis. *International Journal of Food Microbiology*, 71-80.

Looijesteijn, P. J., Trapet, L. d., Hugenholtz, J., & al, e. (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis. *International Journal of Food Microbiology,*, 71-80.

MAKHLOUF, A. (2018). *Méthodologie pour l'optimisation dynamique multicritère d'un procédé discontinu alimenté : Application à la production bactérienne d'arômes laitiers.* Institut National Polytechnique De Lorraine: Thèse Biotechnologie et Industries Alimentaires.

Makhloufi, A. ((2012)). Microscopic Observation of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Microscopy and Microanalysis,*, 15(3), 212-215.

Makhloufi, K. (2011). *Les bactéries lactiques : voies métaboliques de fermentation des hexoses et implications technologiques.* Thèse de doctorat, Université de Lorraine.

Marzio, L., & al, e. (2019). Rôle des bactéries lactiques dans le renforcement de la barrière cutanée : Stimulation de la production de céramides et de lipides intercellulaires. *Journal of Dermatological Science,*, 92(3), 198-210.

Mechai, A. ((2009)). *Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones : études physiologiques et biochimiques.* 99: thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar - Annaba.

MECHAI, A. (2009). *Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones : études physiologiques et biochimiques.* Université Badji-Mokhtar- Annaba: Thèse doctorat Biochimie.

Mermouri, A. (2018). Rôle des bactéries lactiques dans le contrôle des infections intestinales et la modulation du système immunitaire. *Journal de la Microbiologie et de la Santé,*, 30(5), 345-357.

Microbiology, BMC. (s.d.). Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products.

Mishra, S., & Jha, R. (2013). Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications. *Current Science,* 105(6), 737-746.

Nicolaus, B. K., & al, e. (2010). Polysaccharides from Extremophiles: From Fundamentals to Biotechnology. *In M. Konig (Ed.), Advances in Extremophiles Research*, 185-217.

Novel, A. (1993). *Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech* (Vol. 12). Lavoisier Paris.

Orla-Jensen, S. (1919). Dairy bacteriology, Fred Host and Son,. *the lactic acid bacteria*.

Paulo, A. M.-T., & al, e. (2012). Microbial exopolysaccharides: main examples of this biotechnological process. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 55*(6), 989-1002.

Prechtl, R. M., Pfeifer, C., Mauracher, S. G., Kneifel, W., & al, e. (2018). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria in fermented meat products and their influence on product quality and safety. *Food Control, 84*, 69-77.

Raynaud, S. ((2006)). . *Caractéristiques des bactéries lactiques.* 112-115: In Biologie et physiologie cellulaires .

Romain, A. C. (2011). Utilisation des bactéries lactiques en industrie alimentaire : exemples d'application. (E. Lavoisier., Éd.) *Dans Bactéries Lactiques: Aspects Fondamentaux et Applications*, 287-304.

Ruas-Madiedo, P. &.-G. (2005). In G. Mazza & B. S. Oomah (Eds.), Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects . *Polysaccharides from lactic acid bacteria*, 267-283.

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 163-171.

Salminen, S. v., & al, e. (2004). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects (3rd ed.).*

Sanchez, C. (2006). *Biotechnology and Bioprocess Engineering,*, 327-333.

Sanchez, C. (2006). Fungal Polysaccharides: Structural Characteristics and Their Modifying Properties on the Immune Response. *In Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 327-333.

Sanin, S. L., & al, e. (2003). Pathways for biodegradation of exopolysaccharides from activated sludge. *Water Environment Research, 75*(5), 467-475.

Sanlibaba, P., & Çakmak, G. (2016). *Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structural analysis, molecular weight measurement and rheological propertiesIn Polysaccharides,Springer, Cham*, 163-179.

Sanlibaba, P., & Çakmak, G. (2016). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structural analysis, molecular weight measurement and rheological properties. *In Polysaccharides,Springer, Cham*, 163-179.

Sanlibaba, P., & Çakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *GIDA - The Journal of Food, 41*(1), 10-21.

Sanlibaba, P., & Çakmak, Y. (2016). *Exopolysaccharides from Microorganisms Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*, 229-246.

Scholz, C. (2021). Sustainable use of natural ingredients in cosmetics. *Cosmetic Science and Technology, 40*(2), 155-170.

Shailesh, S. P., & al, e. (2016). Polysaccharides: Microbial Sources. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*, 205-227.

Shailesh, S., Pandey, S., Mahendra, R., & Tiwari, A. (2016). Polysaccharides: Microbial Sources. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*, 205- 227.

Stiles, M., & Holzapfel, W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol, 36*, 1-29.

Suresh Kumar, G. J., & al, e. (2007). Microbial Polysaccharides: An Overview. In B. P. Singh (Ed.), Developments in Microbial World . *APH Publishing Corporation*, 301-318.

Ulacio, R. A., & al, e. (1997). Preparation and homogenization of lipid-based solutions in sterile saline water. *Journal of Dairy Science, 80*(3), 576-583.

Vinderola, & al. (2005). Elle explore les propriétés adhésives des bifidobactéries sur la muqueuse intestinale du porc. *Journal of Food Protection*, 27-33.

Wang, K., Li, W., Rui, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Characterization of an exopolysaccharide produced by Lactobacillus plantarum YW11 and its effect on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 383-389.

Werning, M. L., Ibarburu, I., Soto, L. P., Dueñas, M. T., Irastorza, A., & Prieto, A. (2012). *Biosynthesis, purification, and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteriaFood Hydrocolloids,* 27(2), 197-203.

Werning, M. L., Ibarburu, I., Soto, L. P., Dueñas, M. T., Irastorza, A., & Prieto, A. A. (2012). Biosynthesis, purification, and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Food Hydrocolloids,* 27(2), 197-203.

Yang, Z., Wang, J., & Shen, H. (2014). Antimicrobial activity of exopolysaccharides from Lactobacillus plantarum against foodborne pathogens. *Food Control,*, 1-6.

Zhang, L., Cui, S. W., & Zhao, L. (2015). Characterization and antioxidant activities of exopolysaccharides produced by Lactobacillus plantarum. *Food Chemistry, 182,*, 186, 234-240.

Zhao, X., Yang, Z., & & Geng, W. (2016). Anti-inflammatory effects of exopolysaccharides from Lactobacillus helveticus on lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. *Microbial Pathogenesis*, 55- 61.

Annexes

Annexe I: compositions des milieux de culture

Milieu MRS solide (Man, Rogosa et Sharpe)

peptone	10 g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4 g
saccharose	20g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Tween 80	1 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2 g
Sulfate de mangnésium	0,2 g
Sulfate manganése tetrahyd	0.005 g
Agar agar	21 g
Eau distillée	1000 ml

-pH=6.2

-Autoclavage 20 min à 120 c°

Milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe) liquide

peptone	5g
Extrait de viande	4 g
Extrait de levure	2 g
saccharose	20g

Acétate de sodium	2,5 g
Citrate d'ammonium	1 g
Tween 80	0,5 ml
Hydrogénophosphate de potassium	1 g
Sulfate de mangnésium	0,1 g
Sulfate manganése tetrahydrate	0.025g
Eau distillée	500 ml

-PH =6.2

-Autoclavage 20 min à 120 c°

Milieu MRS saccharosé (Man, Rogosa et Sharpe)

peptone	2 g
Extrait de viande	1,6 g
Extrait de levure	0,8 g
saccharose	20g
Acétate de sodium	1 g
Citrate d'ammonium	0,4 g
Tween 80	0,2 ml
Hydrogénophosphate de potassium	0,4 g
Sulfate de mangnésium	0,04 g
Sulfate manganése tetrahyd	0.01g

Agar agar	2 g
Eau distillée	200 ml

-pH=6.2

-Autoclavage 20 min à 120 c°

Milieu MRS rouge congo (Man, Rogosa et Sharpe)

Peptone	1 g
Extrait de viande	0,8 g
Extrait de levure	0,4 g
glucose	2 g
Acétate de sodium	0,5 g
Citrate d'ammonium	0,2 g
Tween 80	0,1 ml
Hydrogénophosphate de potassium	0,2 g
Sulfate de mangnésium	0,02 g
Sulfate manganése tetrahydrate	0,005 g
rouge congo	0,8 g

-pH= 6.2

-Autoclavage 20 min à 120 c°

Milieu Mueller-hinton (MH)

MH	38 g
Eau distillé	1000 ml

-Autoclavage 20 min à 120 c°

Milieu MRS saccharosé 5% 200ml

peptone	10 g
Extrait de viande	8 g
Extrait de levure	4 g
saaccharose	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2g
Tween 80	1 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2 g
Sulfate de mangnésium	0,2 g
Sulfate manganése tetrahydrate	0,05 g
Agar agar	21 g
Eau distillée	1000 ml

-pH=6.2

-Autoclavage 20 min à 120 c°

Milieu colombia 100 ml

mélane de peptone	1.8 g
extrait de levure	0,5 g
amidon de mais	0,1 g

chlorure	0,5g
agar agar	1g
Eau distillée	100ml

-Ph=7.3

-Autoclavage 20 min à 120 c°

+sang 5 ml

Milieu lait écremé

Poudre lait écrémé	10 g
Extrait de levure	3 g
Eau distillée	100 ml

PH=7

Autoclavage 10 min

Eau physiologique :

NaCl	9g
Eau distillée	1000 ml

Autoclaver à 120°C/20mn

-Annexe II : coloration de gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les

propriétés de la paroi bactérienne. Le principe de cette méthode comme suit :

1. Préparation d'un frottis (Fixation de la culture bactérien sur la lame par chaleur).
2. coloration par le violet de gentiane pendant 1 min.

3. Ajouter du lugol pendant 30 min.

4. décolorer avec alcool et rincer avec l'eau distillée.

5. ajouter la fuchsine et laisser agir 20 à 30 secondes .laver à l'eau.

6. La lame après avoir été rincée et séchée, puis observée au microscope optique généralement à L'objectif x100, Avec l'huile à immersion.

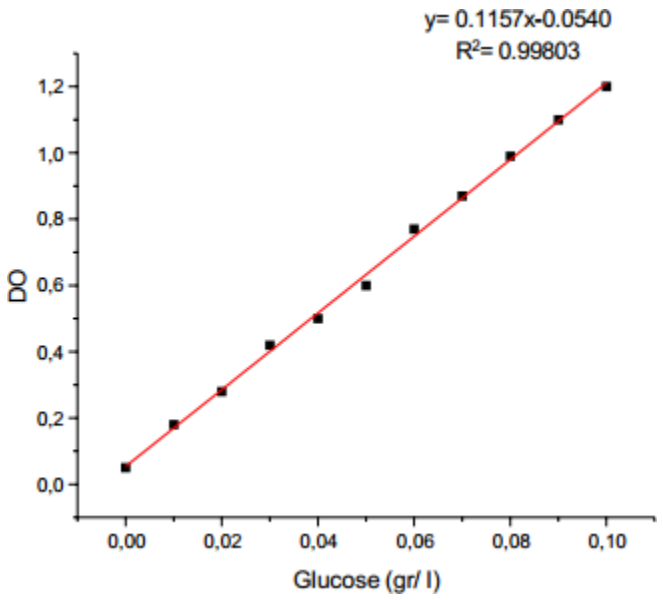
7. pour Les bactéries dit à Gram(+) sont apparaissent en violet et les bactéries à Gram(–) en rose.

Appareillage

L'appareillage utilisé est le suivant :

- Autoclave
- Bain Marie
- Balance
- Centrifugeuse électrique
- Compteur de colonies
- Etuves
- Four Pasteur
- Micropipettes (Microlite) ;
- Microscope optique (Mo tic) ;
- pH mètre
- Réfrigérateur
- Vortex électrique
- Spectrophotomètre

Annexe III: COURBE D'étalonnage de glucose



Annexe IV :

Tableau 01 : les différents mécanismes d'actions des disques de ATB utilisés

-Résultat de test l'antibiogramme

Antibiotique	Charge/disque	Famille	Mécanisme d'action
Amikacin (AK) Tobramycine(TOB)	30 µg 10 µg	Aminoside	Inhibition de la synthése proteique des bactérie
Erythromycine (E)	15 µg	Macrolide	Inhibition de la synthèse protéique des bactérie
Ampicilline (AMP)	10 µg	Béta lactamine	Inhibition de la

Amoxicilline(AMC) Céphalosporine (CFP) Céfépime (FEP)	20 µg/10µg 30 µg 30g		synthèse du peptidoglycan
Nitroxoline (NTX) Levofloxacin (LEV)	30 µg 5 µg	Quinolone	Inhibition de la synthèse de l'acide folique

Tableau 02 : Résultat de test l'antibiogramme

Souche/ ATB	B1	B7	B7 s	B5 1	B13	B6
AK	1,6	1,6	1,2	1,3	1,8	1
TOB	1,3	1,7	1,3	1,3	1,6	0,9
E	2,9	3	2,6	2,7	3	2,7
AMC	2,8	3,2	2,5	2,4	3,3	3
CFP	R	R	/	0,7	R	0,7
FEP	1,6	/	/	1,7	/	/
NTX	1,3	/	/	1,4	1,6	/
LEV	1 ,6	1,9	1,7	1,8	1,8	1 ,5
FC	0,7	0,9	0,8	0 ,3	0,9	0,8
CX	R	R	0,7	0,7	R	0,7