

**Annexe I** : composition des milieux de culture**1. Milieu solide (Gélose MRS)**

<b>Gélose MRS pH=6.2</b>	
Extrait de levure .....	5g/L
Extrait de viande .....	10g/L
Peptone .....	10g/L
Acétate de sodium .....	5g/L
Citrate de sodium .....	2g/L
Glucose .....	20g/L
KH <sub>2</sub> PO .....	2g/L
MgSO <sub>4</sub> .....	0,2g/L
MnSO <sub>4</sub> .....	0,05g/L
Agar .....	15g/L
Tween80.....	1ml/L
Eau distillée .....	1000 ml
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

**2. Milieu liquide (Bouillon MRS)**

<b>Bouillon MRS pH=6.2</b>	
Peptone .....	10g/L
Extrait de viande .....	8g/L
Extrait de levure .....	4g/L
Glucose .....	20g /L
Acétate de sodium trihydraté .....	5g/L
Citrate d'ammonium .....	2g/L
Tween 80.....	1ml/L
Hydrogénophosphate de potassium .....	2g/L
Sulfate de magnésium heptahydraté .....	0,2g/L
Sulfate de manganèse tétrahydraté .....	0,05g/L
Eau distillée .....	1000 ml
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

**Annexe II**

Eau physiologique

NaCl.....9g

Eau physiologique.....1L

**Annexe III : les colorants**

<b>Cristal violet</b>	
Violet de gentiane.....	1 g
Ethanol à 96% .....	10ml
Eau distillé.....	90ml
Les 3 composants sont mélangés ensemble après agitation et filtration en aura le colorant	

**Annexe III : les solutions**

<b>Solution de PBS (pH 7.3)</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	7mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3mM
NaCl.....	130mM
Eau distillé .....	1l
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

<b>Solution de PBS-citrate (pH 7.3)</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	7mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3mM
NaCl.....	130mM
Citrate.....	2.34mM
Eau distillé .....	1l
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

**Annexe IV** : coloration de Gram**Coloration de Gram**

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène ;
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes ;
- 4- Ajouté du lugol pendant 30 secondes ;
- 5- Décoloré avec l'alcool 95% ;
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Ajouter la fuschine et laisser pendant 15 à 30 secondes ;
- 8- Laver à l'eau;
- 9- Après séchage déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à au grossissement ( $\times 100$ ).

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

**Annexe V** :

**Tableau I** : résultats d'absorption des souches *Lactobacillus* sur la microplaque en polystyrène :

Les souches	A <sub>630</sub> avant incubation	A <sub>630</sub> après lecture microplaque	Adhésion
<i>Lactobacillus</i> 16 Lb	0,426	0,415	Forte
<i>Lactobacillus</i> 12Lb	0.425	0,115	Faible
<i>Lactobacillus</i> 7Br	0,436	0,137	Faible
<i>Lactobacillus</i> 9B	0,430	0,149	Modérée

<i>Lactobacillus Plantarum</i>	0,531	0,319	Forte
<i>Lactobacillus</i> 8Lb <sub>1</sub>	0,445	0,464	Forte

**Tableau II :** Résultats de la DO et le pourcentage d'hydrophobicité des souches *Lactobacillus*.

Les souches	DO <sub>initial</sub> =450	DO <sub>final</sub> =450	%
<i>Lactobacillus</i> 16 Lb	0,520	0,375	27,88
<i>Lactobacillus</i> 12Lb	0,541	0,436	19,40
<i>Lactobacillus</i> 7Br	0,637	0,311	51,17
<i>Lactobacillus</i> 9B	1,277	1,082	15,27
<i>Lactobacillus Plantarum</i>	0,162	0,151	06,79
<i>Lactobacillus</i> 8Lb <sub>1</sub>	0,943	0,411	56,41

## Annexe VI

**Tableau I:** Identification de la souche *Lactobacillus* 8Lb<sub>1</sub>. par API50CH

	24h	48h
0 TEMOIN	-	-
1 Glycerol	-	-
2 Erythritol	-	-
3 D-Arabinose	-	-
4 L-Arabinose	+	+
5 D-Ribose	+/-	+
6 D-Xylose	+	+
7 L-Xylose	-	-
8 D-Adonitol	-	-
9Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-
10 D-Galactose	-	+/-
11 D-Glucose	+	+

12 D-Fructose	+	+
13 D-Mannose	+	+
14 L-Sorbose	-	+
15 L-Rhamnose	-	-
16 Dulcitol	-	-
17 Inositol	-	-
18 D-Mannitol	-	-
19 D-Sorbitol	-	+/-
20 Méthyl- $\alpha$ D-Mannopyranoside	-	-
21 Méthyl- $\alpha$ D-Glucopyranoside	-	-
22 N-Acetyl-Glucosamine	-	-
23 Amygdaline	-	-
24 Arbutine	-	-
25 Esculine citrate de fer	+	+
26 Salicine	-	+/-
27 D-Celiobiose	-	+
28 D-Maltose	-	+
29 D-lactose	-	+/-
30 D-Melibiose	-	-
31 D-Sacharose	+	+
32 D-Trehalose	-	-
33 Inuline	-	-
34 D-Mélézitose	-	-
35 D-Raffinose	-	-
36 Amidon	-	-
37 Glycogène	-	-
38 Xylitol	-	-
39 Gentiobiose	-	+/-
40 D-Turanose	-	-
41 D-Lyxose	-	-
42 D-Tagatose	-	-

---

43 D-Fucose	-	-
44 L-Fucose	-	-
45 D-Arabitol	-	-
46 L-Arabitol	-	-
47 Potassium Gluconate	-	-
48 Potassium 2- Cétogluconate	-	-
49 Potassium 5- Cétogluconate	-	-

## Résumé

---

*Lactobacillus* sont des bactéries à Gram positive, appartient au groupe des bactéries lactiques. Une propriété importante de ces microorganismes est leur capacité d'adhérer aux différentes surfaces.

Dans ce travail, 6 souches de *Lactobacillus* ont été testées il s'agit de : *Lactobacillus* 12Lb, *Lactobacillus* 8Lb<sub>1</sub>, *Lactobacillus* 16 Lb, *Lactobacillus* 7Br, *Lactobacillus* 9B, *Lactobacillus plantarum*. Parmi celle-ci, 3 souches démontrant une forte adhésion au microplaque en polystyrène et aux cellules épithéliales. Le test d'hydrophobicité a permis de révéler leur potentiel le plus élevé qui est de 56,41% pour *Lb. plantarum* et de 51,17% pour *Lactobacillus* 8Lb<sub>1</sub>, et chez *Lactobacillus* 16Lb avec 27,88%.

L'ensemble des résultats de la présente étude, nous a permis de montrer la capacité d'adhésion de certaines souches *Lactobacillus* aux surfaces abiotiques (polystyrène) et biotiques (cellules épithéliales) et leurs propriétés d'hydrophobicité.

**Mots clés :** bactéries lactiques, *Lactobacillus*, adhésion, hydrophobicité.

## Abstract

---

*Lactobacillus* are Gram-positive bacteria, belongs to the group of lactic bacteria. An important property of these microorganisms is their ability to adhere to the different surfaces.

In this work, 6 *Lactobacillus* were tested: *Lactobacillus* 12Lb, *Lactobacillus* 8Lb<sub>1</sub>, *Lactobacillus* 16 Lb, *Lactobacillus* 7Br, *Lactobacillus* 9B, *Lactobacillus plantarum*. Among these, 3 strains demonstrating imported adhesion to the polystyrene microplate and the epithelial cells, the hydrophobicity test revealed their highest potential, which is 56,41% for *Lb. Plantarum* and 51,17% for *Lactobacillus* 8Lb<sub>1</sub>, and *Lactobacillus* 16Lb with 27,88%.

The results of this study allowed us to show the adhesion of certain *Lactobacillus* strains to the abiotic (polystyrene) and biotic (epithelial cells) surfaces and their hydrophobicity properties.

**Key words:** lactic bacteria, *Lactobacillus*, adhesion, hydrophobicity.

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université Abderrahmane MIR-Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie  
Filière: Sciences Biologiques  
Option: Microbiologie Alimentaire Santé



Réf.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

## **MASTER**

### *Thème*

**Etude des propriétés adhésives d'une  
bactérie lactique du genre "*Lactobacillus*"**

Présenté par:

**GHEBRIOUA LINA & OURAMDANE SABRINA**

Soutenu le : 17 Juin 2017

Devant le jury composé de :

	<b>Grade</b>	
M <sup>r</sup> . BENSALD k.	MAA	Président
Mme. BENACHOUR K.	MAA	Encadreur
Mme. CHIBANE N.	MAA	Examinatrice

**Année universitaire: 2016/2017**



# Dédicaces

*A ma chère maman malgré que vous n'êtes pas entre nous mais vous restez et vous resterez toujours dans mon cœur, que Dieu te donne Arahma et vous serez dans le paradis*

*A mon père vous êtes un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours, que Dieu te donne la santé et longue vie*

*A mon cher frère « MAZIGH », A mes chères sœurs « RANA » et « YAMINA »*

*A ma grand-mère « YEMA LILI »*

*A ma belle mère « GHANIA »*

*A ma petite ange ma nièce « MELINA »*

*A mes oncles SALEM et sa femme WARDA et AB.NOUR et sa femme HAYAT A tous mes tante, cousin et cousine*

*Qui ont été là lors de mes heures les plus sombres et mes moments les plus heureux,*

*Qui m'ont soutenu dans tout ce que j'ai entreprise,*

*Qui ont veillé jour et nuit pour que je réussisse*

*A tous mes amis sans exceptions surtout à toi « SORAYA »*

*A toi la lumière de ma vie « SOUFYANE »*

*Je dédie ce travail.*

*LINA*



# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à mes très chers :*

*« Parents ».*

*A mes sœurs : Lamia, Nabila, Soraya*

*A mes frères*

*A mon neveu amine*

*A ma binôme Lina*

*A mes amies : ninou*

*Yasmina, Zahra,*

*A toute la promotion : MAS*

*SABRINA*



# Remerciements

*Avant tous nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné*

*la santé, le courage, la volonté et la patience de réaliser ce travail.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements à notre enseignante et promotrice Madame BENACHOUR, K. d'avoir accepté de nous encadrer, pour l'aide compétente qu'elle nous a apportée, pour sa confiance, son encouragement et son œil critique qui nous a été très précieux pour améliorer la qualité de notre mémoire.*

*Nos remerciements les plus vifs vont Monsieur BENSALD qui nous a fait le très grand honneur d'accepter la présidence du jury de ce travail.*

*Toute notre reconnaissance et nous sincères remerciements, A Madame CHIBANE, qui nous a fait l'honneur d'être examinatrice et bien voulu accepter de juger ce travail*

*Hommages respectueux aux ingénieures de laboratoire microbiologie et pour toute l'équipe de Laboratoire Biologie animale au Bloc 12.*

*Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# *Sommaire*



# Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
---------------------------	----------

## Partie I : Synthèse bibliographique

1. Les bactéries lactiques .....	3
1.1. Généralités et caractéristiques.....	3
1.2. Taxonomie et classification.....	4
2. <i>Lactobacillus</i> .....	4
2.1. Caractères culturels et exigences nutritionnelles.....	5
2.1.1. Exigences en vitamines.....	5
2.1.2. Exigences en bases azotées .....	5
2.1.3. Exigences en cations.....	5
2.2. Habitat.....	5
2.3. Taxonomie et classification des Lactobacilles.....	6
3. Identification.....	7
4. Adhésion des lactobacilles.....	8
4.1. Rappels sur la structure de la paroi des lactobacilles.....	8
4.2. Facteurs d'adhésion.....	9
4.2.1. Facteurs physico-chimique.....	9
4.2.2. Structures protéiques.....	10
4.2.3. Les acides téichoïques et les EPS.....	11

## Partie II: Matériel et méthodes

1. Objectif du travail.....	13
2. Origines des souches.....	13
3. Revivification et vérification de la pureté des bactéries.....	13
3.1. Revivification des bactéries.....	13
3.2. Vérification de la pureté de souches utilisées.....	14
3.2.1. Caractérisation macroscopique .....	14

3.2.2. Caractérisation microscopique.....	14
3.2.3. Réalisation du test de catalase.....	14
4. Préparation de l'inoculum standard des souches de <i>Lactobacillus</i> .....	14
5. Tests d'adhésion.....	17
5.1. Adhésion à la microplaque en polystyrène.....	17
5.2. Adhésion aux cellules épithéliales.....	19
6. Test d'hydrophobicité.....	19
7. Identification.....	20

### **Partie III : Résultats et discussion**

1. Revivification des souches utilisées.....	22
2. Vérification de la pureté des souches.....	22
2.1. Observation macroscopique.....	22
2.2. Observation microscopique.....	23
2.3. Test de catalase.....	24
3. Standardisation de l'inoculum .....	24
4. Adhésion à la microplaque en polystyrène.....	25
5. Adhésion aux cellules épithéliales.....	27
6. Test d'hydrophobicité.....	28
7. Identification.....	29

<b>Conclusion.....</b>	<b>31</b>
------------------------	-----------

### **Références bibliographique**

### **Annexes**

# *Liste des tableaux*

*Liste des tableaux*

<b>Tableau n°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Répartition du genre <i>Lactobacillus</i> .	<b>07</b>
<b>II</b>	Présentation des souches testées et leurs origines	<b>13</b>
<b>III</b>	Résultats de coloration de Gram, aspect microscopiques des souches.	<b>23</b>
<b>IV</b>	Résultats de dénombrement des souches de <i>Lactobacillus</i> .	<b>24</b>
<b>V</b>	Adhésion des souches <i>Lactobacillus</i> aux cellules épithéliales de colon d'un bovin.	<b>27</b>



# *Liste des figures*

Liste des figures

Figure n°	Titre	Page
<b>1</b>	Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram positif.	<b>08</b>
<b>2</b>	Standardisation de l'inoculum des souches de <i>Lactobacillus</i> .	<b>16</b>
<b>3</b>	Protocole d'adhésion à la microplaque en polystyrène.	<b>18</b>
<b>4</b>	Protocole d'identification de la souche de <i>Lactobacillus</i> 8Lb <sub>1</sub> sur la galerie API50.	<b>21</b>
<b>5</b>	Culture des souches de <i>Lactobacillus</i> sur bouillon MRS.	<b>22</b>
<b>6</b>	Aspect macroscopique des souches de <i>Lactobacillus</i> sur gélose MRS.	<b>22</b>
<b>7</b>	Morphologie des souches de <i>Lactobacillus</i> (G× 100).	<b>23-24</b>
<b>8</b>	Adhésion des six souches de <i>Lactobacillus</i> sur la microplaque en polystyrène de 96 puits.	<b>25</b>
<b>9</b>	Capacité d'adhésion des souches de <i>Lactobacillus</i> sur microplaque en polystyrène.	<b>25</b>
<b>10</b>	Répartition des cellules entre la phase aqueuse et le xylène avant incubation (A), après incubation à 37°C pendant 10min (B).	<b>28</b>
<b>11</b>	Pourcentages d'hydrophobicité des souches du genre <i>Lactobacillus</i> .	<b>29</b>
<b>12</b>	Photo d'une souche de <i>Lactobacillus</i> 8Lb <sub>1</sub> identifier par API 50 CH, après 24h et 48h d'incubation.	<b>30</b>

# *Liste des abréviations*

## *Liste des abréviations*

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique.

**API 50 CH** : Application Programming Interface 50 Carbohydrates.

°C: Degré Celsius.

**DO**: densité optique .

**EPS** : exopolysaccharides.

**Fe<sup>2+</sup>** : Ion Fer.

**G** : Grossissement.

**GC%**: Pourcentage en guanine et cytosine.

**GRAS**: Generally Recognized As Safe.

**KDa** : Kilodalton.

**Lb**: *Lactobacillus*.

**Mg<sup>2+</sup>** : Ion Magnésium.

**Mn<sup>2+</sup>** : Ion Manganèse.

**MRS**: Man, Rogosa et Sharpe.

**PBS**: Tampon phosphate salin.

**PG** : peptidoglycane.

**PSD** : Protéines Sortase-Dépendantes.

**QPS**: Quality Presumption of Safety.

**rpm**: Round per minute.

**SLP** : S- layer protéins.

**Sp**: Espèce non précisée.

**UFC**: Unité formant colonies.

# *Introduction*

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique, comme produit principal du métabolisme. Elle colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Stiles *et al.*, 1997 ; Klaenhammer *et al.*, 2005). Elles regroupent plusieurs genres bactériens parmi eux les *Lactobacillus*.

Le genre *Lactobacillus* est le plus important de groupe des bactéries lactique, qui comprend au moins 145 espèces reconnues, qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême (Corrieu et Luquet, 2008 ; Barinov *et al.*, 2011). Une propriété importante de ces microorganismes est leurs capacités d'adhérées aux surfaces solides, qui a été étudiée par différentes méthodes tel que la microplaque en polystyrène. Ce qui est déterminé par les propriétés physico-chimiques (hydrophobicité) de ces bactéries et leur interaction avec ces surfaces solides (Virginia *et al.*, 2005).

Les *Lactobacillus* sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales du tractus intestinale (Vesterlund *et al.*, 2005; Gueimonde *et al.*, 2006 ; Kučan *et al.*, 2012). Les protéines présentés en surface de ces bactéries sont parmi les acteurs majoritaires de l'adhésion, qui peuvent adhérer aux surfaces biotiques (cellules intestinales) (Archibald *et al.*, 1993 ; Buck *et al.*, 2005).

Une corrélation à été trouvé entre l'adhérence des *Lactobacillus* au polystyrène et l'hydrophobicité de la surface cellulaire (Rosenberg, 1981).

Le présent travail a pour objectif d'étudié la capacité des souches *Lactobacillus* d'adhérer à la microplaque en polystyrène, et aux cellules épithéliales. Une API50 est utilisé pour indiqué le profile de fermentation des sucres pour la souche la plus importante, qui exprime un degré élevé d'adhésion.

Pour bien aborder le thème, ce manuscrit est scindé en trois parties. La première sera consacrée a une synthèse bibliographique qui porte sur les connaissances actuelles des bactéries lactiques et *Lactobacillus*, et leurs propriétés d'adhésions. La seconde partie présente le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de réalisation des tests d'adhésion, sur surface biotique et abiotique, et identification de la souche la plus active

via une galerie API50 CH. Les résultats obtenus au cours de cette étude seront ensuite exposés et discutés dans la troisième partie.

Enfin, nous présentons les principales conclusions de ce travail et les ouvertures vers de nouvelles voies de recherche.

*Synthèse  
bibliographique*



## 1. les bactéries lactiques

### 1.1. Généralités et caractéristique

Les bactéries lactiques sont de très anciens microorganismes (**Dridier et Prevost, 2009**). Ce groupe a été défini pour la première fois par **Orla-Jensen (1919)**. Il réunit plusieurs genres caractérisés par leurs capacités à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Novel, 1993**).

Ces bactéries sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (**Dellaglio et al., 1994**). Ce sont des microorganismes à Gram positifs, non sporulants, immobiles, anaérobies mais aérotolérants et ne possédant pas de catalase, de nitrate réductase, et de cytochrome oxydase. Elles ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux. Ce sont des cocci ou des bâtonnets, de forme variante d'un long et mince bâtonnet parfois courbé à court coccobacille souvent coryneforme ou sphérique, exigeant en facteurs de croissance, acides aminées, bases nucléiques, acides gras, peptides, sels, vitamines (**Larpent, 1989; Schleifer, 2009**).

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) (**Dellaglio et al., 1973; Raynaud, 2006**). Sur la base des caractéristiques de fermentation, ces microorganismes sont capable de fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique sous les deux formes lévogyre et dextrogyre. Cette fermentation peut être homolactique (70 à 90% d'acide lactique) ou hétérolactique (50% d'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol et le CO<sub>2</sub>) (**Leveau et Bouix, 1993**).

Les bactéries lactiques regroupent plusieurs genres bactériens : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* (**Carine et Tonart, 2009**).

Elles sont ubiquistes, se trouvent dans différentes niches écologiques (lait, les produits laitiers, viande, le poisson, les végétaux...), mais d'autres sont aussi membres de la flore normale de la bouche, les muqueuses humaines et animales, dans le tractus digestif, et le

vagin des mammifères (Drouault et Corthier, 2001; Salminen, 2004; Carina Audisio et al., 2010).

Ces microorganismes sont depuis des siècles associés à l'alimentation. Ils sont tolérés par l'Homme et les animaux (Ström et al., 2005). Ces bactéries sont considérées comme GRAS (Generally Recognized As Safe), excepté certaines espèces d'entérocoques et certains ont obtenu le statut QPS (Quality Presumption of Safety) (Streit, 2008).

### 1.2. Taxonomie et classification

Depuis la description du *bacterium lactis* (actuellement *lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des *Firmucutes*, à la classe des *bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales* (De vos et al., 2009). Cet ordre comporte 33 genres répartis entre six familles qui sont : *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostococcae* et *Streptococcaceae* classées en se basant sur les analyses phylogénétiques des séquences de l'ARNr 16S (Ludwig et al., 2009).

## 2. *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* regroupent de nombreuses espèces bactériennes, comprend actuellement, au moins 145 espèces reconnues qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême (Corrieu et Luquet, 2008 ; Barinov et al., 2011).

Les *Lactobacillus* sont des bactéries à Gram positif, en forme bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux, souvent groupés en chaîne, non sporulés et généralement immobiles ( Siegumfeldt et al., 2000 et Singh et al., 2009 ). Ils sont de catalase négative, certains ont une pseudocatalase, dépourvus de cytochrome. Généralement, nitrate réductase négative, gélatinase négative et ils sont microaérophiles ou anaérobies (Prescott et al., 2003).

## 2.1. Caractères culturels et exigences nutritionnelles

La plupart des *Lactobacillus* se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55°C (Adams et Moss, 2000; Tailliez, 2004). Ils se développent au mieux dans des conditions acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4, mais leur croissance s'arrête lorsque le pH avoisine 3,5 (De Vos *et al.*, 2009).

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc *et al.*, 1994). Ces bactéries sont classées selon De Man *et al.* (1960) ; De Vos *et al.* (2009) comme suit :

### 2.1.1. Exigences en vitamines

Toutes les espèces ont un besoin absolu en vitamines telles que la pantothenate (B5), en niacine (B3) et en cobalamine (B12). Les déficiences en vitamine B12 peuvent induire une diminution de la synthèse de l'ADN et entraîner des changements morphologiques et les cellules deviennent filamenteuses. Une telle élongation cellulaire a été observée avec *Lb. helveticus* sp *jugurti* lors de déficiences en cobalamine (B12), ou en acide folique.

### 2.1.2. Exigences en bases azotées

Dans les milieux synthétiques, les lactobacilles, exigent la présence d'adenine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile. Ces exigences sont variables selon les espèces.

### 2.1.3. Exigences en cations

Les ions  $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  ou  $Fe^{2+}$  sont nécessaires pour la croissance des lactobacilles. Il a été démontré que le manganèse et le magnésium interviennent comme activateurs d'un grand nombre de réactions enzymatiques, et comme stabilisateurs de la structure des acides nucléiques, de l'intégrité des ribosomes et de la membrane cellulaire des lactobacilles.

## 2.2. Habitat

Les lactobacilles ont un habitat vaste et ils sont présents dans de nombreux biotopes : Humains, animaux, plantes, eau, sol, lait et produits laitiers, produits carnés, bière, vin, fruits et jus de fruits ...etc) (Stiles et Holzappel, 1997).

Les lactobacilles constituent, entre autres, une part importante du microbiote Humain et animal. Chez l'Homme sain, ils se retrouvent tout au long du système digestif : de la bouche au côlon. Les espèces les plus rencontrées sont : *Lb. salivarius*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, le groupe *Lb. casei*, *Lb. gasseri*, *Lb. reuteri*, *Lb. fermentum*, *Lb. vaginalis* et *Lb. ruminis* (Reuter, 2001; Eckburg *et al.*, 2005 ; Walter, 2008; Ozgun et Vural, 2011).

### 2.3. Taxonomie et classification des lactobacilles

Le genre *Lactobacillus* à été subdivisé selon leur type fermentaire en trois groupes selon la classification d'Orla-Jensen (1919) :

#### Groupe I : *Thermobacterium*

Ce groupe rassemble les espèces homofermentaires obligatoires. Ces bactéries se développent à 45°C. Il est constitué d'espèces thermophiles qui participent à la fermentation des produits laitiers comme : *Lb. delbrukii*, et *Lb. helviticus*, et celles qui sont présentes chez l'Homme et les animaux qui participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme tel que : *Lb. acidophilus* et *Lb. gasseri*.

#### Groupe II : *Streptobacterium*

Ce groupe comprend les espèces hétérofermentaire facultatif. Ces espèces métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhoff-Parnas, et dégradent les pentoses par voie hétérofermentaires en acides lactique. Elles ne produisent pas de CO<sub>2</sub> lors de la fermentation du glucose, mais elles en produisent lors de la fermentation du gluconate. Ce groupe constitué des espèces mésophiles intervenant dans la fermentation des produits carnés et céréaliers comme : *Lb. curvatus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*.

#### Groupe III : *Betabacterium*

Ce sont des *Lactobacillus* hétérofermentaires obligatoires. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles comme : *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. sanfransisco* qui font partie de la flore des levains de panification et *Lb. kéfir* isolé du grain de kéfir.

L'hétérogénéité est reflétée par le type de pourcentage moléculaire GC% de l'ADN des espèces incluses dans ce genre. La série varie de 32-55% (Schleifer et Ludwig, 1995 ; Axelsson, 2004 ; Hammes et Hertel, 2006). Le **tableau I** montre les caractéristiques

qui distingue entre les trois groupes, et quelques espèces les plus connues de chaque groupe.

**Tableau I:** Répartition du genre *Lactobacillus* (Axelsson, 2004).

Caractéristiques	<b>Groupe I :</b> homofermentaires obligatoires ( <i>Thermobacterium</i> )	<b>Groupe II :</b> hétérofermentaire facultatif ( <i>Streptobacterium</i> )	<b>Groupe III :</b> hétérofermentaires obligatoires ( <i>Betabacterium</i> )
Fermentation du pentose	-	+	-
CO <sub>2</sub> à partir du glucose	-	-	+
CO <sub>2</sub> à partir du gluconate	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
FDP aldolase présente	+	+	-
Phosphokétolase présente	-	+ <sup>b</sup>	+
Exemple d'espèces	<i>Lb. acidophilus</i>  <i>Lb. delbrückii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. casei</i>  <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. brevis</i>  <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i>

<sup>a</sup> pendant la fermentation.

<sup>b</sup> inductible par les pentoses.

### 3. Identification

L'identification d'espèces de lactobacilles peut être difficile à réaliser par les méthodes biochimiques en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Elle repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres. La galerie API 50 CH avec l'utilisation du milieu pour les lactobacilles, est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (Roissart et Luquet, 1994 ; Ozgun et Vural, 2011).

#### 4. Adhésion des Lactobacilles

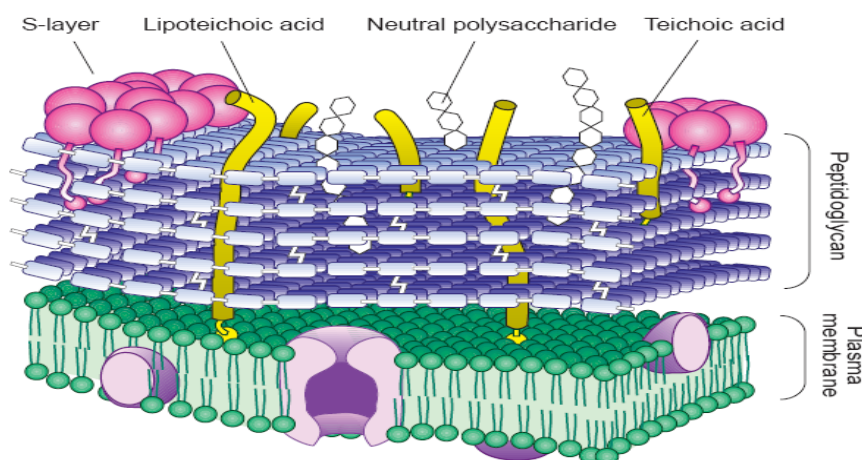
L'adhésion est une action qui se caractérise par l'ensemble des phénomènes physicochimiques et biologiques, permettant à une bactérie de s'unir à une surface de façon durable (**Quiryren et Bollen, 1995**). Elle dépend de :

- L'environnement (température, pH) ;
- L'aspect et la rugosité de la surface ;
- Le caractère hydrophile ou hydrophobe des bactéries ;
- Les charges de surface et même la force ionique du milieu ;
- La présence de structures spécifiques à la surface des bactéries.

##### 4.1. Rappels sur la structure de la paroi des lactobacilles

L'enveloppe des cellules bactériennes à Gram positif tels que les lactobacilles, est constituée d'une membrane cytoplasmique recouverte d'une couche épaisse de peptidoglycane (PG) de 30 nm d'épaisseur environ, bien que cette dernière puisse varier en fonction des conditions de croissance. Les PG sont entourés d'une couche secondaire de polymères tels que les polysaccharides (**Rogers, 1984**) (**figure 1**).

Le réseau de PG est constitué de chaînes d'unités répétitives de disaccharides d'acides N-acétylglucosamine et N-acétylmuramique. Ces chaînes polysaccharidiques sont réticulées par de courts ponts pentapeptidiques (L-alanine, D-glutamate, L-lysine, D-alanine, D-alanine). Toutefois, la composition de cette partie peptidique peut varier entre les espèces bactériennes. Notamment chez certaines souches de *Lactobacillus* tels *Lb. plantarum* et *Lb. casei*, le résidu D-alanine terminal peut être substitué par un résidu D-lactate (**Ferain et al., 1996** ; **Handwerger et al., 1994**).



**Figure 1 :** Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram positif (**Delcour et al., 1999**).

Il existe des protéines associées à la surface de ces bactéries, de manière non-covalente (couche S) (**Bath et al., 2005 ; Sleytr et al., 1993**), une autre famille de protéines liées de manière covalente à la paroi est constituée par les lipoprotéines (**Navarre et Schneewind, 1999**).

#### 4.2. Facteurs d'adhésion

##### 4.2.1. Facteurs physico-chimique

L'hydrophobie d'une bactérie est due en grande partie à la nature des composés présents à sa surface et utiles pour l'adhésion (**Rosenberg et Doyle, 1990**). Il ya des travaux consacrés à l'étude de l'adhésion, sur des cellules intestinales de la lignée Caco-2, de lactobacilles ainsi que la souche de *Lb. plantarum* 423 possédant une l'hydrophobie de plus de 50%, adhèrent toutes de manière significative aux cellules Caco-2. Tous ces constats récents sont corroborés par les études antérieures de **Savage (1992), et Schillinger et al. (2005)**. L'ensemble de ces auteurs conclut sur l'impossibilité d'établir une relation directe entre une propriété donnée de la surface bactérienne, et la capacité des microorganismes à s'adsorber sur des cibles du tractus gastro-intestinal tels que le mucus ou une lignée de cellules épithéliales.

La paroi bactérienne des lactobacilles présente une charge électrique globale relativement négative à pH physiologique, et plus on tend vers les pH acides plus on se rapproche du point Isoélectrique de la bactérie, valeur de pH à laquelle sa mobilité électrophorétique est nulle. Une charge nette faiblement négative semble favoriser l'adhésion sur plusieurs surfaces cibles (**Giaouris et al., 2009**). Cependant, très peu de travaux ont été rapportés dans la littérature, concernant la relation entre la charge électrique globale de surface et la capacité d'adhésion des lactobacilles.

L'adhésion des bactéries lactiques probiotiques aux cellules intestinales tel que lactobacilles mettent en place un mode d'attachement plus stable et plus spécifique, dû à la présence au niveau de leur paroi, d'entités moléculaires présentant une affinité pour certains des constituants de la cible. Parmi les structures moléculaires de la surface de la paroi, impliquées dans l'adhésion, existent des protéines, des acides lipotéichoïques, des lipides (**Nousiainen et Setälä, 1998**) ou des appendices externes (lectines), et (ou) des polymères extracellulaires tels que les polysaccharides (**Busscher et Weerkamp, 1987**).



#### 4.2.2. Structures protéiques

##### ❖ Protéines sortase-dépendantes

Les facteurs de surface de la famille des protéines sortase-dépendantes (PSD) comportent un peptide signal N-terminal pour le transport à travers la membrane plasmique et un motif d'ancrage C-terminal reconnu spécifiquement par les sortases, clivé et lié de façon covalente au peptidoglycane de la paroi bactérienne. Plusieurs PSD sont à ce jour apparues comme des déterminants de la capacité de diverses souches de lactobacilles. Parmi celles-ci la protéine de type lectine, spécifique du mannose, de *Lb. plantarum* WCFS1 (Pretzer *et al.*, 2005). Ainsi la protéine Mub de *Lb. acidophilus* NCFM, ont été identifiées comme adhésines du mucus (Buck *et al.*, 2005).

##### ❖ Couche S

Les protéines de la couche S ou "S-layer proteins" (SLP) forment une catégorie spéciale de protéines associées à la paroi de manière non-covalente. Elles sont constituées d'une sous unité protéique unique d'une masse moléculaire allant de 40 à 200 kDa, qui s'associent entre elles pour former des feuilletts en structure bidimensionnelle, et paracrystalline (Sleytr *et al.*, 1993). Les "S-layers proteins" s'organisent à la surface des cellules bactériennes de façon à former une couche qui peut avoir une fonction de protection pour le microorganisme. Les protéines de la couche S se lient de manière non covalente à la paroi bactérienne, et peuvent être ainsi dissociées par des agents altérant les liaisons hydrogène, ainsi que par des agents chaotropiques comme le chlorure de lithium, et le chlorure de guanidine (Pum et Sleytr, 1999 ; Sleytr et Beveridge, 1999).

Chez certaines bactéries probiotiques, les protéines de la couche S présentent un ou plusieurs domaines N-terminaux (appelés "S layer domains" ou SL), responsables de l'adhésion à d'autres constituants de la paroi, tels que les acides teichoïques/lipotéichoïques, ou les polysaccharides (Mesnage *et al.*, 2000). Il arrive qu'aucun domaine SL ne soit détecté au niveau de la protéine de la couche S, dans ce cas, des régions N- ou C- terminales de la séquence joueraient le rôle de domaine de fixation à la paroi (Ävall-Jääskeläinen et Palva, 2005).

Les protéines de la couche S sont fréquemment rencontrées chez les lactobacilles du groupe *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. amylovorus* et *Lb. gallinarum*, mais elles sont absentes chez *Lb. gasseri* et *Lb. johnsonii* (Masuda et Kawata, 1983). Les séquences des



gènes codant pour ces protéines chez les souches *Lb. brevis* (Vidgrén *et al.*, 1992), *Lb. acidophilus* (Boot *et al.*, 1993, 1995), *Lb. crispatus* (Ventura *et al.*, 2000) et *Lb. helveticus* (Callegari *et al.*, 1998 ; Ventura *et al.*, 2000) sont connues et sont déposées dans les bases de données.

#### ❖ Pili

Les pili sont des structures filiformes, composées de centaines de copies d'une sous-unité protéique structurale. Des adhésines peuvent être associées à cette sous-unité protéique majeure, ou à des composés fimbriaux mineurs, et ainsi se retrouver sur l'extrémité des pili, ou sur toute leur longueur, comme rapporté chez *Lb. rhamnosus* GG pour des adhésines du mucus humain (Kankainen *et al.*, 2009).

#### 4.2.3. Les acides téichoïques et les EPS

Ces molécules ont aussi été impliquées dans l'adhésion de certaines souches, à travers notamment la formation de biofilms. Il était souligné l'importance des gènes *dltA* et *dltD*, qui participent à la D-alanylation des acides téichoïques, dans la tolérance au stress acide de *Lb. reuteri* 100-23 et *Lb. rhamnosus* GG. En fait, les analyses phénotypiques des mutants correspondants ont également fait état d'une diminution de la formation de biofilm dans le tractus digestif murin pour *Lb. reuteri* 100-23 (Walter *et al.*, 2007), et d'une augmentation de cette formation de biofilm sur du polystyrène chez *Lb. rhamnosus* GG (Perea Vélez *et al.*, 2007). Cette pléiotropie laisse suggérer une contribution non spécifique des acides téichoïques, à la capacité d'adhésion de ces souches, notamment à travers leur caractère hydrophobe fonction de leur degré de substitution par la D-alanine (Delcour *et al.*, 1999).

Les EPS, quant à eux, semblent jouer un rôle singulier dans la formation de biofilms. En participant à des interactions intercellulaires, ils peuvent faciliter la formation de microcolonies, sachant que cette dernière dépend également d'autres facteurs intrinsèques et extrinsèques (Branda *et al.*, 2005). Chez *Lb. plantarum* WCFS1, un régulateur de réponse *lamA* associé à un SRDC contrôlant la production d'EPS, s'est révélé capital pour la formation de biofilm (Sturme *et al.*, 2005). De plus, deux analyses mutationnelles ont confirmé le lien étroit entre la capacité de la souche *Lb. rhamnosus* GG à synthétiser des EPS, et son aptitude à former ces biofilms (Lebeer, 2007; Lebeer, 2009).

Cette faculté peut représenter un avantage compétitif pour la colonisation de l'hôte. A l'inverse, les EPS qui peuvent également avoir un effet négatif sur les propriétés

d'adhésion des cellules, en masquant les andésines de surface et limitant leur activité, comme suggéré par une étude menée chez *Lb. johnsonii* NCC533 où l'inactivation d'un ensemble de gènes intervenant dans la biosynthèse d'EPS a amélioré la persistance de la souche *in vivo* (Denou et al., 2008).

# *Matériels et méthodes*

## 1. Objectif du travail

L'objectif de ce travail, est porté sur l'étude de la capacité de certaines bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* d'adhérer à la microplaque en polystyrène, et sur les cellules épithéliales.

Cette étude a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie générale (bloc09) de l'université de Bejaia, sous la direction et l'orientation du M<sup>me</sup> Benachour. K. durant la période allant du mois février au moi mai 2017.

## 2. Origine des souches

Les six souches utilisés dans cette étude font partie de collection des souches du Laboratoire de microbiologie de l'Université de Bejaia, elles ont été isolé et identifier par M<sup>me</sup> Benachour puis conservé sur bouillon MRS (pronadisa, spain) à 4°C. Les noms et l'origine de ces souches sont présentés dans le **tableau II**.

**Tableau II** : Présentation des souches testées et leurs origines

Abréviation	Souches	Origines
S1	<i>Lactobacillus</i> 12Lb	Lben (Aokas)
S2	<i>Lactobacillus</i> 8Lb <sub>1</sub>	Lben (Aokas)
S3	<i>Lactobacillus</i> 16 Lb	Lben (Bejaia)
S4	<i>Lactobacillus</i> 7Br	Beurre (Aokas)
S5	<i>Lactobacillus</i> 9B	Beurre (Aokas)
S6	<i>Lactobacillus Plantarum</i>	Beurre (Bejaia)

## 3. Revivification et vérification de la pureté des bactéries

### 3.1. Revivification des bactéries

La revivification a été réalisé par un transfère d'un ml des cultures, qui ont été conservé sur boillon MRS à 4°C, dans des tubes de 9ml du boillon MRS (pronadisa, spain) à pH 6.2 avec une incubation à 30°C pendant 24h.

Cette opération est répétée au minimum 2 fois, afin d'avoir des cultures fraiche.

### 3.2. Vérification de la pureté de souches utilisées

Après avoir effectués des repiquages successifs sur bouillon MRS, la pureté est vérifiée par ensemencement en stries sur gélose MRS (pronadisa, span), l'incubation est faite à 30°C pendant 48h, jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes.

Après l'incubation, la pureté est vérifiée par observation macroscopique et microscopique.

#### 3.2.1. Caractérisation macroscopique

Se fait par observation directe de l'aspect, la taille, la forme et même la couleur des colonies de chaque souche de *Lactobacillus* sur la gélose MRS.

#### 3.2.2. Caractérisation microscopique

L'examen microscopique a été effectué après coloration de Gram des colonies, sur une culture jeune de 48h à 30°C. Ce test permet d'observer la morphologie des cellules, leur mode de regroupement et le type de Gram.

#### 3.2.3. Réalisation du test de catalase

Une goutte d'eau oxygénée à 10% (THERALAB) a été déposée sur une colonie bien isolée, développée pendant 48h.

Le résultat est immédiat ; se manifeste par une effervescence qui indique un dégagement gazeux (O<sub>2</sub>) si la catalase est présente (Guirand, 1998 ; Prescott et al., 2003).

## 4. Préparation de l'inoculum standard des souches de *Lactobacillus*

Afin de pouvoir étudier l'adhésion de ces souches choisies, une standardisation des inocula est indispensable:

Les souches de *Lactobacillus* sont ensemencées en strie sur gélose MRS. Après une incubation de 48h à 30°C, 2 à 4 colonies bien isolées sont repiquées dans 9ml de bouillon MRS, puis incubé à 30°C pendant 24h.

Des dilutions décimales sont réalisées dans des tubes de 9ml de l'eau physiologique (10<sup>-1</sup>...10<sup>-8</sup>), et 1ml de chaque dilution, est ensemencé en masse dans une gélose MRS

Un dénombrement est effectué après incubation à 30°C pendant 48h (**Figure 2**)

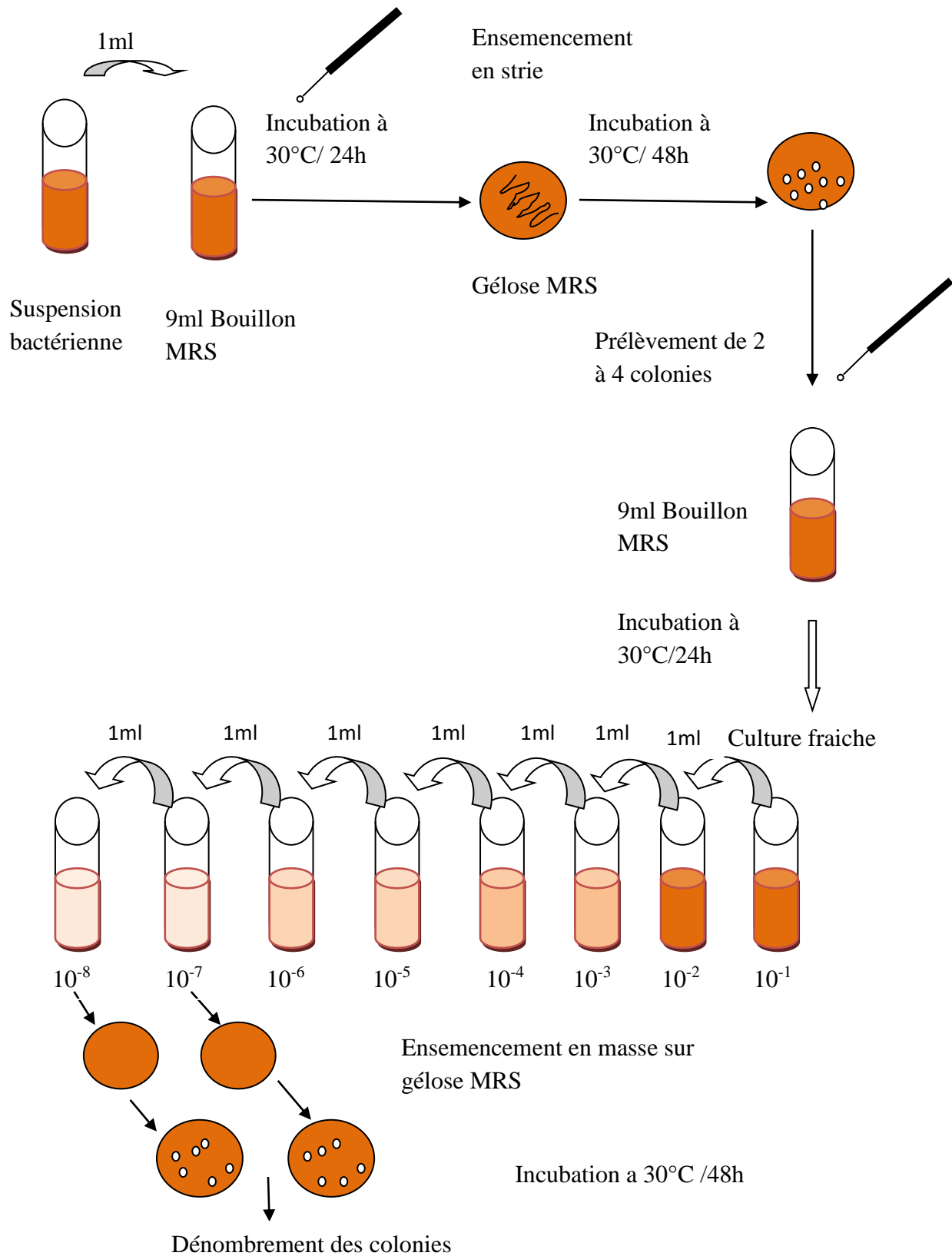
Formule de dénombrements:  $\frac{\Sigma C}{(n_1(0.1)+n_2) d}$  ufc/ml

$\Sigma C$  : Somme des colonies comptées sur les deux boites retenues

$n_1$  : Nombre des boites de la première dilution

$n_2$  : Nombre des boites de la deuxième dilution

$d$  : la première dilution



**Figure 2 :** Standardisation de l'inoculum des souches de *Lactobacillus* dans un milieu MRS

Cette opération a été effectuée pour chaque souche

## 5. Tests d'adhésion

### 5.1. Adhésion à la microplaque en polystyrène

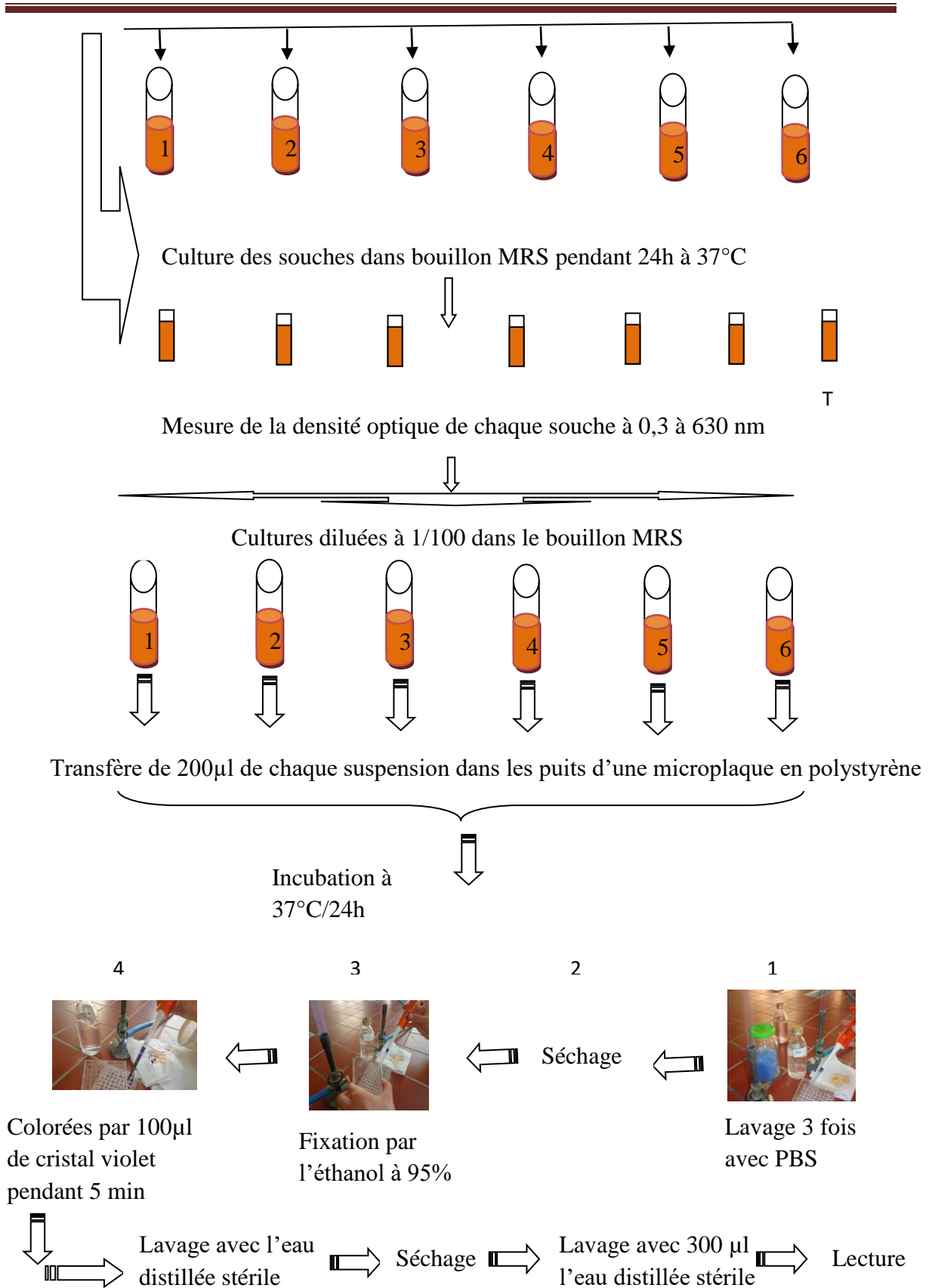
L'adhésion aux surfaces est un paramètre important permettant aux bactéries d'adhérer. La méthode utilisée est celle décrite par **Mahdhi et al. (2010 a, b)**.

Après culture des souches dans le bouillon MRS pendant 24h à 37°C, la densité optique des cultures est ajustée de 0,3 à 630 nm. Elles ont été diluées à 1/100 dans le bouillon MRS, et 200µl de chaque suspension, sont utilisés pour inoculer les puits d'une microplaque en polystyrène de 96 puits (ABGENE). Ces derniers sont incubées à 37°C pendant 24h (**figure 3**). Par la suite, la microplaque rincées trois fois par une solution de PBS stérile pour éliminer les cellules non adhérentes. Elle est ensuite séchée en position renversée, l'éthanol à 95% est additionné pour fixé les cellules adhérentes, ensuite colorées par 100µl d'une solution de cristal violet à 1% pendant 5min. Le surplus du cristal violet est rejeté, puis les puits sont lavés vigoureusement avec l'eau distillée stérile. Après séchage, les puits sont lavés avec 300µl de l'eau distillée stérile (**figure 3**).

La mesure de la densité optique des puits est réalisée par un lecteur microplaque (BioTek, ELx800) à 630nm.

Chaque souche a été testée trois fois et le bouillon MRS à servi comme témoin.





**Figure 3:** Protocole d'adhésion à la microplaque en polystyrène (Mahdhi et al., 2010).

## 5.2. Adhésion aux cellules épithéliales

Ce test consiste à étudier la capacité des souches *Lactobacillus* d'adhérer aux cellules épithéliales. La méthode utilisée est celle décrite par **Lin et al.(2007)**. Avant de mettre en œuvre le test d'adhésion, un segment du côlon d'un bovin a été ouvert et laver avec du tampon phosphate salin stérile (PBS pH 7,2) puis maintenu dans ce tampon à 4°C pendant 30min, et ensuite laver 10 fois avec du PBS stérile puis laisser au repos à 4°C pendant 3h.

Les cellules intestinales sont raclées avec une lame en verre stérile, ensuite des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à  $10^{-4}$ . Cette suspension cellulaire a été examinée par microscope pour s'assurer de l'absence d'une contamination bactérienne. Les suspensions bactériennes de 24h on été centrifugées à 6000 rpm/10min à froid (4°C), ensuite le culot de chaque souche est récupéré dans 2ml de PBS.

Le test d'adhésion est réalisé, en mélangeant 1ml de la suspension bactérienne avec 1ml de la dilution  $10^{-4}$  de la suspension des cellules épithéliales, qui était déjà préparée, ces dernières sont incubées à 37°C pendant 40min. Après incubation, un frotti est préparé et une coloration au cristal violet 0.5% est réalisé pendant 5min. puis, les lames sont observées au microscope optique au Grossissement x40.

le test est considéré positif si le nombre de bactéries adhérees est supérieur à 15 (**Lin et al., 2007**).

## 6. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité est déterminée selon la méthode décrite par **Iyer et al. (2010)**. Après culture des souches dans le bouillon MRS pendant 24h à 30°C, le culot bactérienne est récupéré par centrifugation à froid (4°C), à 6000rpm/5min, ensuite lavé deux fois avec PBS-citrate (pH 5), puis resuspendre dans 1,2ml de ce tampon de manière à ajusté approximativement la densité optique initiale de la suspension de 1,0 à 450nm ( $DO_{initiale}$ ).

Alors 0,6ml du xylène est ajouté doucement à 3ml de la suspension bactérienne, puis incubé à 37°C pendant 10min. Après incubation, ce mélange a été agité en utilisant un vortex, pendant 2min. Après 15min de repos à température ambiante, la phase aqueuse est récupérée à l'aide d'une micropipette, et on procède à la mesure de la densité optique finale ( $DO_{finale}$ ).

La différence de la densité optique est considérée comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) (Iyer et al., 2010), qui est calculé à partir de :

$$\% \text{ Hydrophobicité} = \text{DO initiale} - \text{DO finale} / \text{DO initiale} \times 100$$

## 7. Identification

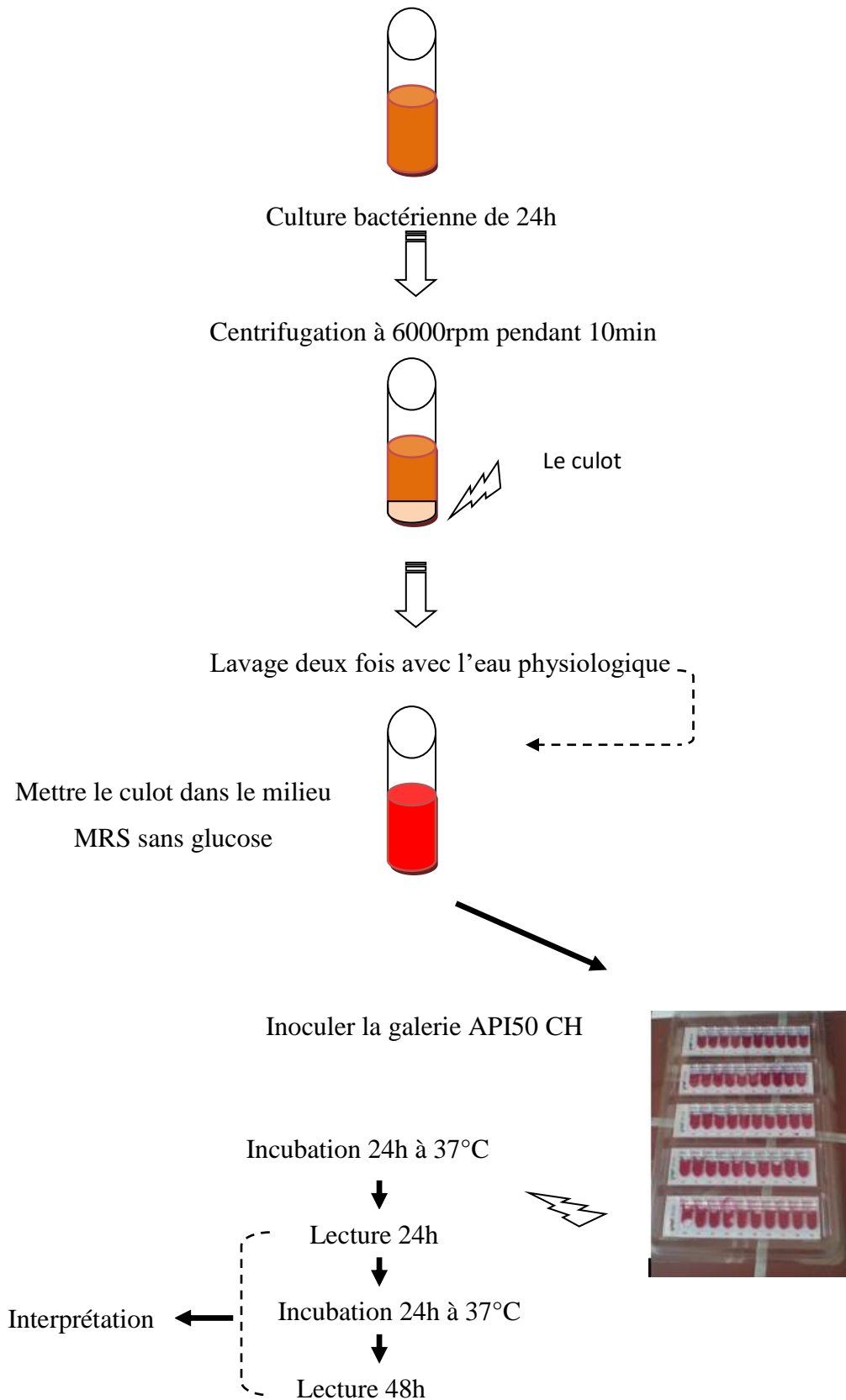
L'étude du profil fermentaire des sucres des souches des bactéries lactiques a été réalisée par galerie API 50 CH (Biomerieux, France). (McLeod et al., 2008). La galerie API 50 CHL est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'identification des lactobacilles. La galerie est constituée de 50 micro tubes permettant la fermentation des hydrates de carbones et dérivés.

Le milieu API 50 CH est inoculé par la souche *Lactobacillus* 8Lb<sub>1</sub> qui présente une forte capacité d'adhésion à la microplaque en polystyrène et même aux cellules épithéliales, avec une hydrophobicité élevée. Le culot est lavé deux fois avec l'eau physiologique, après il est récupéré dans un bouillon MRS sans glucose. Avant l'inoculation de la galerie, la préparation de cette dernière est obligatoire, elle se présente comme suite :

- ❖ Préparation une boîte d'incubation (fond et couvercle)
- ❖ Insertion le nom de la souche sur la languette latérale de la boîte
- ❖ Repartir environ 10ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide
- ❖ sortir les bandes de leur emballage, séparer les bandes et les déposer dans le fond de la boîte

La suspension bactérienne est répartie dans les 50 tubes à l'aide d'une micropipette, une couche d'huile de paraffine stérile est remplie pour chaque cupule. Les résultats sont rapportés après une incubation à 37°C pendant 24h et 48h. Ils sont exprimés en tant que négatifs (sucre non fermentescible) ou positifs (sucre fermentescible).

La **figure 4** présente le protocole d'identification par la galerie API50 CH.



**Figure 4 :** Protocole d'identification de la souche de *Lactobacillus* 8Lb<sub>1</sub> sur la galerie API50 CH (Mcleod et al., 2008).

# *Résultats et discussion*

## 1. Revivification des souches utilisées

Les résultats obtenus de la revivification des six bactéries de *Lactobacillus* dans le bouillon MRS montrent l'apparition de trouble au fond des tubes (**figure 5**).



**Figure 5:** Culture des souches *Lactobacillus* sur bouillon MRS.

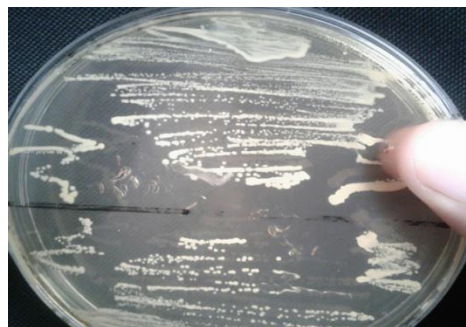
T : témoin

## 2. Vérification de la pureté des souches

### 2.1. Observation macroscopique

L'observation macroscopique des colonies des bactéries obtenues sur gélose MRS, montre un aspect rond de couleur blanchâtre, bombée (**figure 6**).

Les résultats obtenus nous ont permis de révéler les mêmes caractéristiques des colonies de *Lactobacillus* obtenues par Carr *et al.* (2002) ; Badis *et al.* (2005).



**Figure 6 :** Aspect macroscopique pour souches *Lactobacillus* sur gélose MRS.

## 2.2. Observation microscopique

L'observation microscopique a démontré que ces souches sont des bacilles (moyennes ou longues) ou bien coccobacilles en chainettes parfois isolées, avec un Gram positif pour toutes les souches (**tableau III et figure 7**).

**Tableau III** : Résultats de coloration de Gram, aspect microscopiques des souches.

Les souches	Gram	Forme	Mode d'association
S1	+	Bacille longues, forme V	Seules ou en chainette
S2	+	Petit bacille	Isolées ou petites chainette
S3	+	Petit bacille, forme V	Isolées ou petites chainette
S4	+	Coccobacille	En chainette
S5	+	longue bacille	En chainette
S6	+	longue bacille	Seule ou en chainette



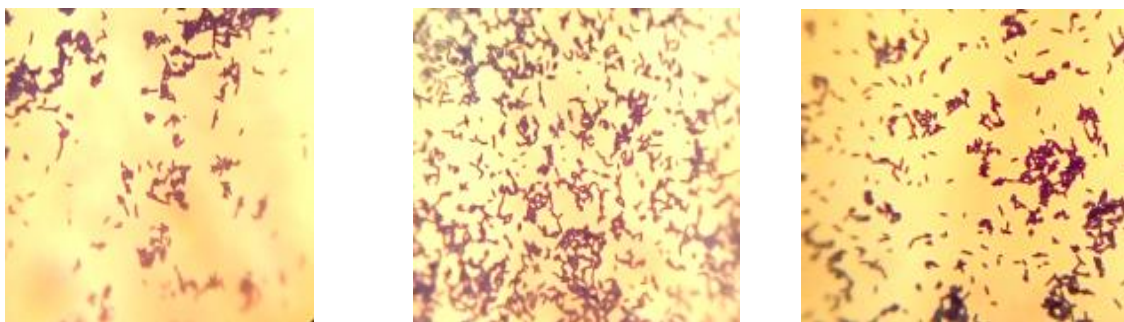
*Lactobacillus* 12Lb



*Lactobacillus* 8Lb<sub>1</sub>



*Lactobacillus* 16Lb

*Lactobacillus* 7Br*Lactobacillus* 9B*Lactobacillus* Plantarum**Figure 7:** Morphologie des souches *Lactobacillus* (G × 100).

### 2.3. Test de catalase

Ce test à révélé que, l'ensemble des bactéries étaient négatives car on n'a pas obtenus de l'effervescence, après le dépôt de l'eau oxygéné sur les colonies cibles.

### 3. Standardisation de l'inoculum

Les résultats de dénombrement des six souches de *Lactobacillus* sont rassemblés dans le **tableau IV**.

**Tableau IV :** Résultats de dénombrement des souches de *Lactobacillus*.

Souches	Nombre des colonies	Inoculum standard (UFC/ml)
S1	3	$2,5 \times 10^9$
S2	2	$1,7 \times 10^9$
S3	2	$2,5 \times 10^9$
S4	3	$19,8 \times 10^9$
S5	4	$11,9 \times 10^9$
S6	2	$8 \times 10^9$

La concentration moyenne des souches étudiés est de  $7,7 \times 10^9$ .



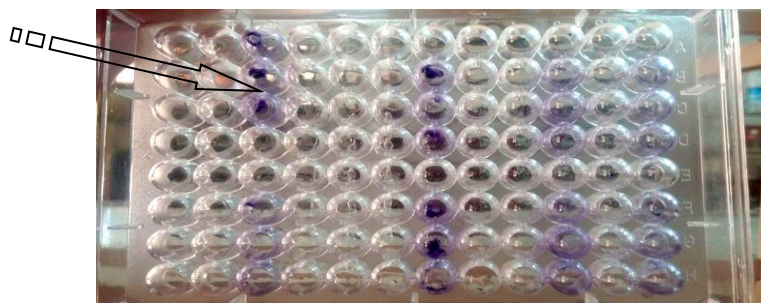
#### 4. Adhésion à la microplaque en polystyrène

L'adhésion des souches de *Lactobacillus* choisi au polystyrène a été examinée, les valeurs de l'absorbance à 630nm ( $A_{630}$ ) avant l'incubation sont présentées dans le **tableau I (annexe V)**.

Dans cette méthode, la détection de l'adhésion des souches *Lactobacillus* a été réalisée en utilisant la microplaque en polystyrène de 96 puits, et une incubation à 37°C pendant 24h. Du bouillon MRS a été utilisé en tant que témoin négatif.

La **figure 8** montre l'adhésion des bactéries après coloration au cristal violet.

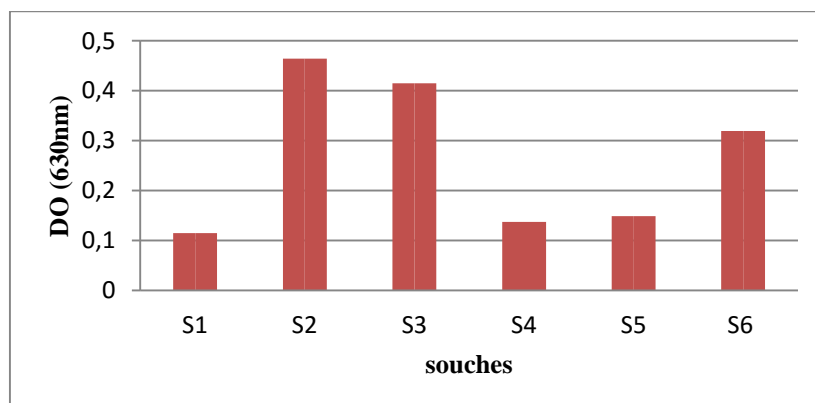
Adhésion  
après  
coloration  
au cristal  
violet



**Figure 8 :** Adhésion des six souches de *Lactobacillus* sur la microplaque en polystyrène de 96 puits.

Selon **Mathur et al. (2006)** l'adhésion des bactéries à la valeur de l' $A_{630}$  sont classées comme suite : non-adhérentes ( $A \leq 0,07$  comme négatif), faiblement adhérentes ( $0,14 \geq A > 0,07$ ), moyennement adhérentes ( $0,28 \geq A > 0,14$ ), fortement adhérentes ( $A > 0,28$ ).

La mesure de l'absorbance ( $A$ ) à 630nm des souches utilisées dans cette étude, a donné des valeurs comprises entre 0,11 et 0,46 (**figure 9**).



**Figure 9 :** Capacité d'adhésion des souches *Lactobacillus* sur la microplaque en polystyrène.

Les résultats montrent que la souche S2 (A=0,464), présente une forte capacité d'adhésion, par rapport à S3 (A=0,415) et S6 (A=0,319). Contrairement à S5 (A=0,149) qui indique une adhésion modérée. Par contre l'adhésion faible est révélée chez : S4 (A=0,137) et S1 (A=0,115).

Les résultats montrent que les souches ont une capacité d'adhésion, avec des valeurs variantes entre 0,11 et 0,46 à une densité optique de 630nm (**Figure 9**). Ceci est en accord avec les résultats obtenus par **Kubota et al. (2008)**, qui rapporte la capacité des bactéries lactiques, appartenant à *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus fructivorans*, d'adhérer sur microplaque en polystyrène.

**Bharathi et al. (2011)**, ont démontré que la plupart des bactéries lactiques de genre *Lactobacillus*, dont *Lb. plantarum* présente une forte capacité d'adhérer sur les microplaques en polystyrènes contrairement *Lb. brevis* et *Lb. salivarius* qui ont montré une adhésion modérée.

Cependant, la capacité d'adhésion des bactéries sur la surface de plastique en polystyrène est déterminé par un ensemble de propriétés physico-chimiques, tel que l'hydrophobicité et la charge externe, ainsi que les SLP fortement associées à la surface d'une bactérie Gram positif comme *Lactobacillus*, pourrait conférer une grande hydrophobicité (**Van der Mei et al., 2003**).

La composition de la surface bactérienne joue un rôle important d'adhérence. Une étude de **Harty et Knox (1991)**, sur la capacité d'adhésion de quarante souches, de 20 espèces différentes de *Lactobacillus*, dont *Lb. plantarum*, *Lb. salivarius*, *Lb. rhamnosus*, a révélé par une corrélation entre l'hydrophobicité de la surface cellulaire de ces souches et leur affinité pour le polystyrène.

Certains auteurs rapportent que les souches de *Lactobacillus* ne peuvent pas être expliquées en fonction de l'hydrophobicité de la surface cellulaire, puisque les bactéries sont adhérentes en plus grand nombre à des hydrophobes au polystyrène que le verre hydrophile (**Virginia et al., 2005**).

## 5. Adhésion aux cellules épithéliales

Dans cette étude nous avons utilisé des cellules épithéliales d'origine animale (une partie de colon du bovin). La capacité d'adhésion des souches a été déterminée par un nombre des bactéries adhérentes supérieurs à 15 (**Lin et al., 2007**).

**Tableau V :** Adhésion des souches *Lactobacillus* aux cellules épithéliales de colon d'un bovin

Les souches	Nombre des bactéries adhérentes	Test	Lecture
S1	10	–	Absence d'adhésion
S2	17	+	Adhésion
S3	16	+	Adhésion
S4	9	–	Absence d'adhésion
S5	13	–	Absence d'adhésion
S6	18	+	Adhésion

Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau V**. Il apparaît que les trois souches S6, et S2 ainsi que S3, présente une adhésion (test(+)), par contre les souches S5 et S1 et S4 ne présente aucune capacité d'adhésion.

L'adhésion aux cellules épithéliales pour les souches *Lactobacillus* a été réalisé par de nombreuses études in vitro, qui permet de confirmer ces observations (**Valeur et al., 2004**). Cependant **Pinto et al. (2006)** ont constaté que les souches de *Lactobacillus* à propriétés probiotiques, ont plusieurs mécanismes qui sont un critère important qui leur permettent d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales. Cette propriété est la résultante d'une interaction entre des protéines de surface présentes chez les *Lactobacillus* (Lectin-like proteins) et les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale (**Saito, 2004**).

Plusieurs études rapportent, que plusieurs protéines sont liées à la capacité d'adhésion élevée chez les deux souches *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus casei* respectivement (**Hamon et al., 2011**).

Les protéines, présentes en surface des bactéries à Gram positif, peuvent exercer leur capacité d'adhérer au surface biotiques (tissus de l'hôte) (**Archibald et al., 1993**). L'étude

de **Buck et al. (2005)**, a démontré que les protéines de la couche S chez *Lb. acidophilus* peuvent contribuer à l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales.

Parmi les six souches étudiés, *Lactobacillus plantarum* présente une forte capacité d'adhésion par rapport aux autres. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par **Kučan et al. (2012)**, qui ont montré que la souche S1 de *Lb. plantarum* est capable d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales de souris in vitro.

## 6. Test d'hydrophobicité

Cette méthode permet d'évaluer l'hydrophobicité d'une surface des souches pures vis-à-vis du xylène. L'hydrophobicité des cellules bactériennes est mesurée à l'issue d'une phase aqueuse.

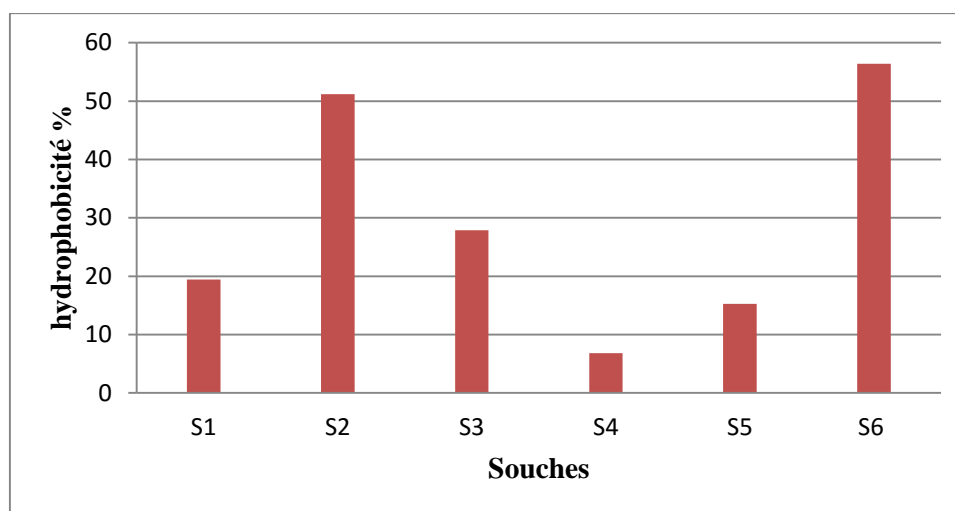
La répartition des cellules entre la phase aqueuse et le xylène, résulte de l'interaction hydrophobe entre les microorganismes et les hydrocarbures (**Anwar et al., 2013**) (**Figure 10**).



**Figure 10** : Répartition des cellules entre la phase aqueuse et le xylène avant incubation (A), après incubation à 37°C pendant 10min (B).

Les résultats obtenus de l'adhérence des souches pures de *Lactobacillus* au xylène indiquent l'hydrophobicité de leur surface. Les pourcentages de ce test sont présentés dans la **figure 11**.

Les bactéries sont hydrophobe si le pourcentage d'affinité au xylène est élevé ( $A\% > 40$ ) (**Anwar et al., 2013**).



**Figure 11** : Pourcentages d'hydrophobicité des souches du genre *Lactobacillus*

Ces résultats montrent un caractère d'hydrophobicité moyenne. La valeur la plus élevée (56,41%) est enregistrée avec la souche S6, et d'une valeur 51,17% chez S2. Par contre S3 a été moyennement hydrophobe avec 27,88%, et la plus faible sont celles du S1 (19,40%), S5 (15,27%) et S4 (6,79%).

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Guglielmotti et al. (2007)**, qui ont trouvé une hydrophobicité varie entre 5% et 63% pour des espèces de *Lactobacillus*. La surface des souches des bactéries lactiques, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *Lb. casei* et *Lb. paracasei* présente un caractère très hydrophobe (**Pelletier et al., 1997**).

D'après **Ross et Jonsson, (2002)** ; **Guglielmotti et al. (2007)**, L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes. Ainsi, elle semble être un facteur aidant à l'adhérence, mais elle ne contribue pas à une bonne adhésion.

L'hydrophobicité des bactéries présente un caractère hydrophobe qui est dû à la présence de substances protéiques à la surface cellulaire. Ainsi que, le caractère hydrophobe est lié à la présence de polysaccharides (**Pelletier et al., 1997**).

## 7. Identification

L'identification de la souche *Lactobacillus* 8Lb<sub>1</sub> se fait par la galerie API 50. La **figure 9**, présente les résultats du profil de fermentation des sucres de la souche *Lactobacillus* 8Lb<sub>1</sub>, après 24h et 48h d'incubation à 37°C.



Après 24h d'incubation

Après 48h d'incubation

**Figure 12:** Photos d'une souche *Lactobacillus* 8Lb<sub>1</sub> identifier par API50CH, après 24h et 48h d'incubation

Les résultats obtenus on se réfèrents aux tableaux associé à cette galerie ont révélé que la souche *Lactobacillus* 8Lb<sub>1</sub>, elle appartient probablement au genre *Lb. delbruckii*.

# *Conclusion*

*Lactobacillus* nous montrent à chaque étude effectuée des particularités très surprenantes les unes que les autres. Leur diversité et leur hétérogénéité nous permet d'étudier leur capacité d'adhésion à différentes surfaces biotiques et abiotiques.

D'après les résultats obtenus sur les 6 souches de *Lactobacillus* testées, ont démontré un degré d'adhésion à la microplaque en polystyrène dans la gamme de 0,11 à 0,46. Une forte d'adhésion a été observé chez les souches S2, S3 et S6. Ces derniers ont révélés une corrélation positive d'adhésion aux cellules épithéliales (intestins du bovin). L'hydrophobicité des essais varie de 06,79% à 56,41%, la valeur la plus élevée est enregistrée avec la souche S6.

Dans les résultats, on voit nettement qu'il ya une adhésion de certaines souches du *Lactobacillus* aux différentes surfaces, et leur degré d'adhésion varie d'une souche à l'autre.

La caractérisation de ces souches a permit d'améliorer nos connaissances sur l'adhésion de *Lactobacillus*. D'autres travaux *in vitro* et *in vivo*, ainsi que des études cliniques seront nécessaires pour évaluer cet impact.

Devant l'importance du rôle que jouent ces bactéries dans l'adhésion, on ne peut que recommander l'intensification des recherches pour préciser, améliorer et développer leur utilisation en tant que probiotique dans domaine alimentaire, et même dans d'autre domaine non alimentaire.



*Références  
bibliographiques*

**A**

**Adams MR, Moss MO. (2000).** Food Microbiology. Second Edition, The Royal Society of Biochemistry éd. Cambridge. UK. pp. 318-323.

**Anwar A. Thikra A. Saeed A. M. (2013).** Adhesion, auto-aggregation and hydrophobicity of six lactobacillus strains. *British microbiology research journal*. 4, 381-391.

**Archibald AR. Hancock IC. et Harwood CR. (1993).** Cell wall structure, and turnover. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive Bacteria: *Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*, (Abraham LS, James H & Richard L, ed.). *American Society for Microbiology*, Washington DC, U.S.A. 381-409.

**Arthur CO, Tarja S. Satu T. et Seppo S. (2002).** *In vitro* adhesion of propionic acid bacteria to human intestinal mucus. *Lait*. 82, 123-130.

**Ävall-Jääskeläinen S. Palva A. (2005).** *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol Rev*. 29, 511–529.

**Axelsson L. (2004).** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *In* Lactic acid bacteria, *Microbiological and Functional Aspect*. Third Edition. Marcel Dekker, 18p.

**B**

**Badis A. Laouabdia-Sellami N. Guetarni D. Kihal M. et Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sciences et technologie*. 23, 30-37.

**Barinov A. Bolotin A. Langella P. Maguin E. Van De Guchte, (2011).** Genomics of the genus *Lactobacillus*. *In* « Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research » Sonomoto and Yokota/ Caister Academic Press éd. Norfolk. United kingdom. pp. 3-32.

**Bath K. Roos S. Wall T., and Jonsson H. (2005).** The cell surface of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 highlighted by identification of 126 extracellular proteins from the genome sequence. *FEMS Microbiol Lett.* 253, 75–82.

**Bharathi P. Bhowmick P.P. Shekar M. et Karunasagar I. (2011).** biofilm formation by pure and mixed culture of *Lactobacillus* isolates on polystyrene surface in varying nutrient conditions. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering.* 1, 93-98.

**Boot H. J. Kolen C. P. van Noort J. M. et Pouwels P.H.(1993).** S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356: purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J. Bacteriol.* 175, 6089-6096.

**Boot H. J. Kolen C.P. et Powles P. H. (1995).** Identification, cloning, and nucleotide sequence of a silent S-layer protein gene of *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 which has extensive similarity with the S-layer protein gene of this species. *J. Bacteriol.* 177, 7222-7230.

**Branda S. S. A. Vik L. Friedman and R. Kolter. (2005).** Biofilms: thematrix revisited. *Trends Microbiol.* 13, 20-26.

**Buck BL. Altermann E. Svingerud T. et Klaenhammer TR. (2005).** Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8344-8351.

**Busscher H. J. et Weerkamp A. H. (1987).** Specific and non-specific interaction in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 165-173.

## C

**Callegari M. L. Riboli B. Sanders J. W. Coconcelli P. S. Kok J. Venema G. et Morelli L. (1998).** The S-layer gene of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892: cloning, sequence and heterologous expression. *Microbiol.* 144, 719-726.

**Carina Audisio M. Torres M. Sabate D. Ibarguren C. et Apell M. (2010).** Properties

of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research*. 1-13p.

**Carine D. et Tonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *BASE*. P. 13. *Rev. Microbiol.* 28, 281-370.

**Carr FJ. Hill D. Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev Microbiol.* 28(4), 281-370.

**Coconier MH. Bernet MF. Kernéis S. Chauvière G. Fourniat J. et Servin AL. (1993).** Inhibition of adhesion of entero invasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol Lett.* 110, 299-306.

**Corrieu G. Luquet FM. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. *In: « Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments »*. TEC&DOC/ Lavoisier éd. Paris. France. 19-106.

## D

**Delcour J. T. Ferain M. Deghorain E. Palumbo, et P. Hols. (1999).** The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Anton Leeuw Int J. G.*76,159-184.

**Dellaglio F. Bottazzi V. Trovatelli L. D. (1973).** Deoxyribonucleic acid homology and base composition in some thermophilic lactobacilli. *Journal of Genetic and Microbiology.* 74, 289-297.

**Dellaglio F, de Roissard H, Torriani S, Curk MC et Janssens D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In : Bactéries lactiques. Ed. Loriga uriage (paris).*1, 25-116.

**De Man, JC. Rogosa M. Sharpe, ME. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. App. Bacteriol.* 23 (1): 130-135.

**Denou E. R. D. Pridmore B. Berger J. M. Panoff F. Arignon H. Brussow. (2008).** Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the probiotic *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 190, 3161-3168.

**De Vos P. Garrity GM. Jones D. Krieg NR. Ludwig W. Rainey FA. Schleifer KH. Whitmanet WB. (2009).** Genus *Lactobacillus, Bacillus and Listeria*. In : « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Springer éd., New York. pp. 19-511.

**Dridier D. Prevost H. (2009).** Bactéries lactique Physiologie, Métabolisme, Génomique et Application industrielle. Ed, Economisa Paris. Pp 381- 427.

**Drouault S. et Cortheir G. (2001).** Effects des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research, Bio Med Central*. 32(2), 201-117.

### *E*

**Eckburg PB. Bik EM. Bernstein CN. Purdom E. Dethlefsen L. Sargent M. Gill SR. Nelson KE. Relman DA. (2005).** Diversity of the human microbial flora. *Science*. 308, 1635-1638.

### *F*

**Ferain T. Hobbs J. N. Richardson J, Bernard N. Garmyn D. Hols P. Allen N. E. and Delcour J. (1996).** Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol*. 178, 5431– 5437.

### *G*

**Giaouris E. Chapot-Chartier M. P. et Briandet R. (2009).**Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *Int J Food Microbiol*. 131(1), 2-9.

**Gueimonde Miguel, Lotta Jalonen, Fang He, Masaru Hiramatsu, Seppo Salminen, (2006).** Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enter pathogens by selected lactobacilli. *Food Research International*. Volume 39, Issue 4, 467–471.

**Guglielmotti D. M. Marco M. B. Golowezye M. Reinheimer J. A. et Quiberoni A.D.L. (2007).** Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *Int. Dairy J.* 17, 916-925.

**Guirand J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. 1<sup>e</sup> Ed. *Dunod*, Paris, 136-144.

**Guirand J.P.(2003).** Microbiologie alimentaire. Nouvelle Ed. DUNOD (Paris, France). I SBN. 696p.

## *H*

**Hammes. W. P. et Hertel. C. (2006).** The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes.* 4, 320–403.

**Hamon E. Horvatovich P. Izquiero E. Bringel F. Marchioni E. Aoudé-werner D. et Ennahar S. (2011).** Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiol.* 11, 63p.

**Harty D. W. S. ET K. W. Knox. (1991).** An *In Vitro* Study of Adhesion of Various *Lactobacillus* Species. *microbial ecology in health and disease.* 4, 19-28.

**Handwerger S. Pucci M. J. Volk K. J. Liu J. and Lee M. S. (1994).** Vancomycin resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *J. Bacteriol.* 176, 260–264.

## *I*

**Iyer R. Tomar S. K. Uma Maheswari T. Singh R. (2010).** *Streptococcus thermophilus* strains: multifunctional lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 20, 133-141.

## *K*

**Kandler O. et Weiss N. (1986).** Genus *Lactobacillus* :Bergey's Manual of systematic Bacteriology, vol 2. 9ième ed. Ed. Sneath PHA. Mair NS. Sharpe ME. Holt JG. Williams and Wilkins, Baltimore USA. 1209-1234.

**Kankainen M. L. Paulin S. Tynkkynen I. von Ossowski, J. Reunanen, P. Partanen, R. Satokari, S. Vesterlund, A. P. A. Hendrickx, S. Lebeer, S. C. J. De Keersmaecker, J. Vanderleyden, T. Hämäläinen, S. Laukkanen, N. Salovuori, J. Ritari, E. Alatalo, R. Korpela, T. Mattila-Sandholm, A. Lassig, K. Hatakka, K. T. Kinnunen, H. Karjalainen, M. Saxelin, K. Laakso, A. Surakka, A. Palva, T. Salusjärvi, P. Auvinen, and W. M. de Vos. (2009).** Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc Natl AcadSci USA*. 106, 17193-17198.

**Khalid N. M et Marth E. H. (1990).** Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73, 158-167.

**Kubota H. Shouko S. Nomura N. Tokuda H. et Hiroo U. (2008).** biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 106 (4), 381-386.

**Kučan Martina, Ivana Gobin, Ksenjia Markov, Diana jurčićmomčilović, Jadranka France. (2012).** Testing the adhesion and colonization ability of *Lactobacillus plantarum* strain S1 to the mice intestinal epithelium. *International Journal of Sanitary Engineering Research*. 6, 23-28.

**Klaenhammer, T. R. R. Barrangou, B. L. Buck, M. A. Azcarate-Peril, and E. Altermann. (2005).** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev.* 29, 393-409.

## *L*

**Larpent J.P. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Dunod (Ed.). 496p.

**Lebeer, S., T. L. A. Verhoeven, M. Perea Velez, J. Vanderleyden, and S. C. J. De Keersmaecker (2007).** Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol.* 73, 6768-6775.

**Lebeer, S., T. L. A. Verhoeven, G. Francius, G. Schoofs, I. Lambrichts, Y. Dufrene, J. Vanderleyden, and S. C. J. De Keersmaecker. (2009).** Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus*

*rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyl transferase. *Appl Environ Microbiol.* 75, 3554-3563.

**Leclerc H. Gaillard FL. et Simonet M. (1994).** Les grands groupes de bactéries. In : *Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien*. DOIN. Paris. 445.

**Leveau J. P. Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle .Ed : Techniques et Documentations. Lavoisier Paris. 2-39.

**Lin T. Y. et Chien M. F. C.(2007).** Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food .Chem.* 100, 1419-1423.

**Ludwig W. Schleifer K-H et Whitman X B. (2009).** Order: Lactobacillale. In: De vos P, Garrity G M, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K-H et Whitman W B.(2009). *Bergey's manual of Systematic bacteriology, second Edition Volume Three: The Firmicutes*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 464p.

## *M*

**Mahdhi A. Chaieb K. Kamoun F. et Bakhrouf A. (2010a).** Use of *Pseudomonas stutzeri* and *Candida utilis* in the improvement of the conditions of *Artemia* culture and protection against pathogens. *Braz J Microbiol.* 41, 107-115.

**Mahdhi A. Harbi B. Ángeles Esteban M. Chaieb K. Kamoun F. Et Bakhrouf A. (2010b).** Using mixture design to construct consortia of potential probiotic *Bacillus* strains to protect gnotobiotic *Artemia* against pathogenic *Vibrio*. *Biocontrol Sci Techn.* 20, 983-996.

**Mahdhi A, Chaieb K., Kamoun F., et Bakhrouf A. (2010 a).** Use of *Pseudomonas stutzeri* and *Candida utilis* in the improvement of the conditions of *Artemia* culture and protection against pathogens. *Braz J Microbiol.* 41, 107-115.

**Masuda K. et Kawata T. (1983).** Distribution and chemical characterization of regular arrays in the cell wall of strains of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 20, 145-150.



**McLeod A, O. L. Nyquistb, Snipen L, Naterstada K, Axelssona L. (2008).** Diversity of *Lactobacillus sakei* strains Investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and Applied Microbiology*. 31, 393-403

**Mesnager S. Fontaine T. Mignot T. Delepierre M. Mock M. and Fouet A. (2000).** Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO J*. 19, 4473-4484.

**Mathur T. Singhal S. Khan S. Upadhyay D. J. Fatma T. Rattan A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian journal of medical microbiology*. 24, 25-9.

## N

**Navarre W.W. and Schneewind O. (1999).** Surface proteins of Gram positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63, 174–229.

**Nousiainen J. Et Setälä J. (1998).** Lactic acid bacteria as animal probiotics. *In* Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. *Edited by* S. Salminen and A. Von Wright. *Marcel Dekker, Inc.*, New York. 437–473.

**Novel G. (1993).** Les bactéries lactiques *in*: Microbiologie industrielle ; les microorganismes d'intérêt industriel. *Technique et Documentation*. Lavoisier (Ed.). 614p.

## O

**Orla-Jensen. (1919).** The lactic bacteria. *Hosledson* (Ed.). Copenhagen. 74, 131-142.

**Ozgun D.Vural HC. (2011).** Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *J.M.G.G.* 3(3),46-49.

*P*

**Pelletier C. Bouley C. Cayuela A. C. Bouttier S. Lerr E. Bourlioux A. Bellon Fontaine M. N. (1997).** Cell surface characteristics of *Lb. casei* subsp *casei*, *Lb. paracasei* subsp. *Paracasei* and *Lb. rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 1725-1731.

**PereaVélez, M. T. L. A. Verhoeven C. Draing S. Von Aulock M. Pfitzenmaier A. Geyer I. Lambrichts C. Grangette B. Pot J. Vanderleydenet S. C. J. De Keersmaecker. (2007).** Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol.*73, 3595-3604.

**Pinto M. G. Franz C. M. Schillinger U. et Holzapfel W. H. (2006).** *Lactobacillus* spp. With in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 205-214.

**Pot B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. *In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F. M.) *Tec & Doc*. Lavoisier. Paris, 1-106.

**Prescott LM. Harley JP. Klein DA. (2003).** Les bactéries: les Gram positif pauvre en GC. *In : « Microbiologie ». 2<sup>ème</sup> édition Française*. Paris, 529-572.

**Prescott LM. JP. Harley et DA. Klein. (2003).** Les bacteries lactique : les Gram-positif pauvres en GC. Dans : *microbiologie, 2<sup>ème</sup> éd. Française*. Prescott, L.M., M-P-Harley, D.A. Klein (eds). De Book Université, Bruxelles, Belgique. 5-535.

**Pretzer G. Snel J. Molenaar D. Wiersma A. Bron P.A. Lambert J. de Vos W.M. van der M.R. Smits M.A. et Kleerebezem M. (2005).** Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol.* 187, 6128–6136.

**Pum D. et Sleytr U.B. (1999).**The application of bacterial S-layers in molecular nanotechnology. *Trends Biotech.* 17, 8-12.

*Q*

**Quirynen M. and Bellon C. M. (1995).** The influence of surface roughness and surface freeenergy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 22 (1), 1-14.

*R*

**Raynaud. S. (2006).** Régulation métabolique et transcriptionnelle de l. auto acidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de Doctorat, Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries Toulouse. 826 p.

**Reuter G. (2001).** The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Microflora of the Human intestine: Composition and Succession. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* 2(2), 43-53.

**Rodriguez V.V. Busscher H J., Van der Mei H C., Joop V., et Willem N. (2005).** Role of *Lactobacillus* cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surface at Low and high ionic strength. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces.*41, 33-41.

**Roissart H. Luquet FM. (1994).** Méthodes d'Identification des Bactéries Lactiques. In :« Bactéries Lactiques ; Aspects fondamentaux et technologiques ». Vol 2. Coquand éd., Grenoble. France. pp. 141-167.

**Rogers H. (1984).** Bacterial Cell Structure. Aspects of Microbiology 6. American Society for Microbiology, Washington D.C. 494p.

**Roos S. et Jonsson H. (2002).** A high-molecular mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology.* 148, 433-442.

**Rosenberg M. et Doyle R.J. (1990).** Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement, and significance. In Doyle R. J. and Rosenberg M. (Ed.). *American Society for Microbiology*, Washington, D. 1-38.

**Rosenberg M. (1981).** Bacterial adherence to polystyrene a Replica Method of Screening for Bacterial Hydrophobicity. *Applied And Environment Microbiology.* 42 (2), 375-377.

**S**

- Saito T. (2004).** Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. *Anim. Sci. J.* 75, 1-13.
- Salminen S. Wright. A. et Ouwerhand. A. (2004).** Lactic acid bacteria. Microbiological and Functional Aspect. Third Edition. Marcel Dekker. 4p.
- Savage D. C. (1992).** Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. *Appl. Environ Microbiol.* 58, 1992-1995.
- Schillinger U. Guigas C. Et Holzapfel WH. (2005).** In vitro adherence and other properties of Lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int Dairy J.* 15, 1289-1297.
- Schleifer K. H. Et Ludwig W. (1995).** Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System Appl Microbiol.* 18, 461-467.
- Sheleifer K-H. (2009).** Family I. *Lactobacillaceae*. In : De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K-H et Whitman W B. (2009). *Bergey's manual of systematic Bacteriology*, second Edition volum three: the *Firmicutes*. Springer Dordrecht Heidelberg London. 465p.
- Siegmundfeldt H. Rechinger K. B. et Jakobsen M. (2000).** Dynamic changes of intercellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2330-2335.
- Singh S. Goswami P. Singh R. et Heller K. J. (2009).** Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species. *LWT. J. Food. Tech.* 42, 448-457.
- Sleytr U. B. EBeveridge T. J. (1999).** Bacterial S-layers. *Trends. Microbiol.* 7, 253-260.
- Sleytr U. B. Messner P. Et Sára M. (1993).** Crystalline bacterial cell surface layers: general principles and application potential. *J. Appl. Bact.* 74(Suppl), 21-32.

**Stiles, M. E. Et Holzapfel, W. H. (1997).** Review article lactic acid bacteria of foods and current taxonomy, *int. J. Microbiol.* 36, 1-19.

**Streit F. (2008).** Influence des conditions de récolte et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolérance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* cfl1. Thèse de doctorat. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement ( Agro Paris Tech), France, 226p.

**Ström K. Schnurer J. et Melin P. (2005).** Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MILAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microbiology Letters.* 246, 119-124.

**Sturme, M. H. J. J. Nakayama D. Molenaar Y. Murakami R. Kunugi T. Fujii, E. E. Vaughan M. Kleerebezemet W. M. de Vos. (2005).** An agr-like two-component regulatory system in *Lactobacillus plantarum* is involved in production of a novel cyclic peptide and regulation of adherence. *J Bacteriol.*187, 5224-5235.

**Sturn A. Rilling K. Baumgart D.C. Gargas K. Abou-Ghazalé T. Raupach B. Eckert J. Schumann R. R. Enders C. Sonnenborn U. Wiedenmann B. Dignass A.U. (2005).** *Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling. *Infect. Immun.* 73, 1452-1465.

## *T*

**Tailliez P (2004).** Les lactobacilles : propriétés, habitat, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques.* 6(1), 35-41.

## *V*

**Valeur N. Engel P. Carbajal N. Connolly E. et Ladefoged K. (2004).** Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* 70, 1176–1181.

**Van der Mei H.C. Van de Belt-Gritter B. Pouwels P. H. Martinez B. Et Busscher H. J. (2003).** Celle surface hydrophobicity is conveyed by s-layer proteins /a study in recombinant lactobacilli. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 28, 127-134.

**Ventura M. Callegari M. L. et Morelli L. (2000).** S-layer gene as a molecular marker for identification of *Lactobacillus helveticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 275-279.

**Vesterlund S. Paltta J. Karp M. Ouwehand AC. (2005).** Measurement of bacteria adhesion: *in vitro* evaluation of different methods. *J. Microbiol. Meth.* 60, 225-233.

**Virginia Vadillo Rodríguez, Henk J. Busscher, Willem Norde, Joop de Vrieset Henny C. Van der Mei. (2005).** Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. *Colloids and Surfaces B: Bio interfaces*. 41, 33-41.

## W

**Walter J. (2008).** Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Appl. Environ, Microbiol.* 74, 4985-4996.

**Walter J. Loach D. M. Alqumber M. Rockel C. Hermann C. Pfitzenmaier M. et Tannock G.W. (2007).** d-Alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ, Microbiol.* 9, 1750–1760.

# *Annexes*