

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. Mira-Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Microbiologie Appliquée



Réf :

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

MASTER

Thème

Etude de l'activité antibactérienne et quelques propriétés probiotiques de trois souches de Lactobacilles d'origine alimentaire

Présenté par :
GUEMACHE Celine & OUAZIB Tassadit
Soutenu le : **02 juillet 2025**

Devant le jury composé de :

Mme BENDALI.F	Professeur	Présidente
Mme TETILI.F	MCB	Promotrice
Mme BENACHOUR.K	MAA	Examinateuse

Année universitaire : 2024/2025

Remerciements

Avant toute chose, nous adressons nos louanges et nos plus profonds remerciements à **Dieu Tout-Puissant**, source de sagesse, de force et de patience, qui nous a guidées tout au long de ce travail.

Nous exprimons ensuite notre profonde gratitude à notre encadrante madame Tetili, pour sa précieuse disponibilité, son accompagnement attentif, ses conseils judicieux et ses encouragements constants tout au long de ce modeste travail. Sa bienveillance et sa rigueur scientifique ont été pour nous d'un grand soutien.

Nos sincères remerciements vont également aux membres du jury Mme BENDALI et Mme BENACHOUR, pour avoir accepté d'évaluer notre travail et pour leurs remarques constructives.

Nous tenons à remercier chaleureusement l'équipe du laboratoire de microbiologie, pour leur accueil, leur assistance technique, et leur soutien durant notre stage pratique.

Nous adressons également une pensée pleine de reconnaissance à nos chers parents et à toute notre famille, pour leur amour inconditionnel, leur soutien moral et leurs prières tout au long de notre parcours.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À mes chers parents,

Pour leur amour inconditionnel, soutien sans faille, patience exemplaire, leurs innombrables sacrifices, leur tendresse sans limite, leur force inspirante et leurs sages conseils qui m'ont toujours guidée. Que dieu vous garde et vous protège.

À mon frère Ramy,

Pour son amour, son encouragement, sa douceur et la joie qu'il apporte chaque jour dans ma vie.

À ma sœur Darine,

Pour son affection, sa compréhension, son soutien affectueux et ses mots réconfortants dans les moments difficiles.

À ma tante Wanessa,

Dont l'amour, le soutien et les encouragements m'ont toujours portée.

À mes oncles,

Pour leur bienveillance, leur soutien, encouragements, leurs mots motivants et leurs précieux conseils.

À toute ma famille,

Vos mots, vos gestes, et vos encouragements ont bâti ce chemin que je continue de suivre avec fierté et reconnaissance.

À mes amies,

Celles qui ont su rendre ce parcours plus doux par leur présence, leur écoute et encouragements. Merci pour les fous rires, les conseils partagés, les moments de doute apaisés et les souvenirs gravés. Je vous souhaite que de la réussite dans votre vie.

À mon binôme Tassadit, Pour son soutien, sa collaboration précieuse. Ce travail a été bien plus qu'un projet académique : c'était une belle aventure partagée, faite de rigueur, de rires et de complicité.

Celine

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mes **chers parents**, pour leur amour, leur soutien, leur encouragement, leur patience et leurs aides continues le long de mon parcours d'études.

Mon frère **Zakari**, qui m'a beaucoup aidée et soutenue pendant mes études, surtout dans les moments difficiles.

A ma sœur **Manel**, ma complice de toujours, qui a été là à chaque instant.

A mes frères **Walid** et **Jugurtha**, pour leur encouragement.

A ma grande mère **Yemma Lala**, qui nous quittés mais qui reste vivante dans mon cœur.

A ma grande mère **Jedda Tata**, pour leur amour, ses prières.

A ma binôme **Celine**, pour son soutien, sa patience et le chemin parcouru ensemble.

A mes copines. Pour leur présence, leurs sourires et tous les beaux moments partagés.

Tassadit

Sommaire :

Introduction.....	1
Partie I : synthèse bibliographique	
I. Bactéries lactiques et Lactobacilles.....	3
I.1. Bactéries lactiques.....	3
I.1.1. Définition.....	3
I.1.2. Habitat.....	3
I.1.3. Intérêt des bactéries lactiques.....	3
I.2. Lactobacilles.....	4
I.2.1. Définition.....	4
I.2.2. Taxonomie.....	4
I.2.3. Classification.....	5
I.2.4. Conditions de croissance.....	5
I.2.5. Habitat.....	6
I.2.6. Caractères des lactobacilles.....	6
I.2.7. Exigences nutritionnelles des lactobacilles.....	7
I.2.8. Rôle des lactobacilles et leurs utilisations dans différents domaines.....	7
II. Activité antibactérienne.....	8
II.1. Acides organiques.....	10
II.2. Peroxyde d'hydrogène.....	10
II.3. Dioxyde de carbone.....	10
II.4. Diacétyle.....	10
II.5. Bactériocines.....	10
II.5.1. Mécanisme d'action des bactériocines.....	11
III. Probiotiques.....	12
III.1. Définitions.....	12
III.2. Différentes espèces de <i>Lactobacillus</i> en tant que probiotique.....	13
III.3. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques.....	13

Partie II : Partie pratique

Matériels et méthodes

I. Origine des souches.....	14
II. Revivification et vérification de la pureté des souches.....	14
III. Standardisation des inocula des souches.....	15
IV. Etude de quelques propriétés probiotiques des Lactobacilles.....	15
IV.1. Test de la résistance à l'acidité gastrique.....	15
IV.2. Test de la résistance aux sels biliaires.....	16
IV.3. Test d'hydrophobicité.....	16
IV.4. Test d'auto-agrégation.....	17
IV.5. Test d'activité antioxydante.....	17
IV.6. Activité acidifiante des souches lactiques.....	18
V. Etude de l'activité antibactérienne des souches de lactobacilles.....	18
V.1. Préparation des cultures fraîches.....	18
V.2. Méthode directe (test des spots).....	18
V.3. Méthode indirecte (test des puits).....	19

Résultats et discussion

I. Vérification de la pureté des souches.....	20
I.1. Aspect macroscopique.....	20
I.1.1. Souches de Lactobacilles.....	20
I.1.2. Souches pathogènes.....	20
I.2. Aspect microscopique.....	22
I.3. Test de la catalase.....	22
I.4. Production de gaz.....	23
II. Standardisation des inocula.....	23
III. Effet antibactérien des Lactobacilles.....	24
III.1. Test des spots.....	24
III.2. Test des puits.....	26
IV. Etude de quelques propriétés probiotiques.....	27

IV.1. Effet de l'acidité gastrique.....	27
IV.2. Effet des sels biliaires.....	28
IV.3. Résultats du test d'auto-agrégation des souches de lactobacilles.....	30
IV.4. Résultats du test d'hydrophobicité.....	31
IV.5. Activité antioxydante.....	33
IV.6. Activité acidifiante.....	34
Conclusion.....	35
Références bibliographique	
Annexe	
Résumé	

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Reclassification de quelques exemples d'espèces du genre <i>Lactobacillus</i> selon la nouvelle taxonomie de 2020	5
II	Habitats de <i>Lactobacillus</i>	6
III	effets bénéfiques des lactobacilles selon les domaines de la santé humaine	9
IV	Principaux critères de sélection des probiotiques	13
V	Les souches utilisées dans cette étude	14
VI	Aspect macroscopique de souches pathogènes sur les géloses ensemencées	21
VII	Résultats de la coloration de Gram et aspect microscopique des souches pathogènes.	22
VIII	Résultats de la standardisation des <i>inocula</i> lactiques et pathogènes.	23

Liste des tableaux en annexe

Annexe I : Composition des milieux de culture et solutions utilisés

N°	Titre
I	Bouillon et gélose MRS
II	Bouillon gélose nutritive
III	Mueller-Hinton
IV	Gélose EMB
V	Gélose Chapman
VI	Eau physiologique
VII	Solution PBS

Annexe II : Résultats

N°	Titre
IX	Résultats des diamètres des ZI (mm) obtenues par le test des spots à l'égard de <i>S.aureus</i> 1, <i>S.aureus</i> 2 et <i>E. coli</i>
X	Résultats des diamètres des ZI (mm) obtenues par le test des spots à l'égard de <i>K.pneumoniae</i> , <i>E.faecalis</i> , <i>P.aeruginosa</i>
XI	Moyennes de taux de survie de trois souches de lactobacilles à différents pH
XII	Moyenne de taux de survie de trois souches de lactobacilles à différentes concentrations des sels biliaires
XIII	Moyennes de % d'auto-agrégation des trois souches de lactobacilles
XIV	Moyennes de % d'hydrophobicité des trois souches de lactobacilles
XV	Résultats du test activité antioxydante
XVI	Résultats du test activité acidifiante

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Aspect morphologique de <i>Lb. plantarum</i> (A), <i>Lb. brevis</i> (B) observés au microscope électronique	4
2	Aspect macroscopique de trois souches de Lactobacilles sur bouillon et gélose MRS.	20
3	Aspect macroscopique de souches pathogènes sur BN.	20
4	Résultat du test de production du gaz des trois souches de lactobacilles.	23
5	Exemples de résultats du test des spots.	24
6	Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en millimètres) résultants du test des spots.	24
7	Taux de survie de trois souches de lactobacilles à différent pH.	27
8	Taux de survie de trois souches de lactobacilles à différentes concentrations des sels biliaires.	29
9	Evolution du taux d'auto-agréation (%) des trois souches testées.	30
10	Pourcentages d'hydrophobicité des souches lactiques étudiées.	32
11	Histogramme représentent l'activité antioxydante des trois souches étudiées (S1, S2 et S3).	34
12	Variation du pH en fonction du temps des souches (S1, S2 et S3).	35
13	Variation du l'acidité Dornic en fonction du temps des souches (S1, S2 et S3).	36

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

CRP : C- Reactive Protein

DPPH; 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

E: *Escherichia*

Ent : *Enterococcus*

FAO/OMS : Food and Agriculture Organization / Organisation Mondiale de la Santé

g : Gravité

GC% : pourcentage de la guanine et de la cytosine

GRAS: Generally Recognized as Safe

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

K: *Klebsiella*

Lb: *Lactobacillus*

MRS: de Man, Rogosa et Sharpe

NaOH: Hydroxyde de sodium

P: *Pseudomonas*

PBS: Phosphate-buffered saline

pH: potentiel hydrogène

rpm: revolutions per minute

S: *Staphylococcus*

spp : species plural

ssp : subspecies

sp : species

UFC : Unité Formant Colonie

ZI: zone d'inhibition

INTRODUCTION

Introduction

La pasteurisation, la fermentation, et la réfrigération ne constituent pas une garantie suffisante pour lutter contre la contamination microbienne. L'emploi excessif ou non contrôlé des additifs chimiques peut engendrer des risques sanitaires pour le consommateur. Récemment, les travaux scientifiques sont axés sur l'exploitation des interactions microbiennes pour réduire d'une façon considérable la présence des microorganismes indésirables. Dans cet ordre d'idée, les bactéries lactiques ont un effet protecteur des aliments dû à la production de composés organiques (**Desmazeaud et Cogan, 1996 ; Cocolin et al., 2007**).

Les infections alimentaires sont à la base de plus de 9000 morts chaque année dans le monde malgré l'évolution des moyens technologiques modernes de transformation des aliments. Les chercheurs et les industriels de l'agroalimentaire sont de plus en plus contraints à réduire l'emploi des traitements physiques (hautes pressions, rayons ionisants, pasteurisation, stérilisation, congélation, réfrigération,...), chimiques (nitrites, sulfites), en utilisant des bactéries comme un outil de prévention (**Ren et al., 2018**).

Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité à produire lors de leur croissance des composés actifs à savoir les acides organiques qui acidifient le milieu, des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H_2O_2) et des substances naturelles de nature protéique douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germe d'altération, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes (**Jack et al., 1995 ; Klaenhammer, 1998 ; Matilla-Sandholm et al., 1999**).

Parmi ces substances synthétisées, des peptides dénommés bactériocines, sont produits puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices. Ils présentent une activité bactéricide ou bactériostatique. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices (**Allouche et al., 2010**).

De plus en plus de recherches ont démontré les effets bénéfiques des lactobacilles probiotiques sur la santé humaine, ce qui a contribué à la popularité croissante de ces microorganismes au cours des dernières décennies. Les voies gastro-intestinales et urinaires abritent ces bactéries, qui jouent un rôle essentiel dans la flore microbienne de l'Homme et de l'animal. Les probiotiques *Lactobacillus*, c'est-à-dire *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus crispatus*...sont hautement reconnus pour leurs remarquables qualités probiotiques (**Shah et al., 2024**).

Les lactobacilles sont des bactéries lactiques représentatives du microbiote intestinal bénéfiques de l'Homme et par conséquent sont des microorganismes les plus en vue en tant que probiotiques (**Midassirou et al., 2012**). Les probiotiques sont définis comme « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte » (**FAO/OMS, 2001**)

L'objectif de notre travail est d'étudier :

- L'activité antibactérienne de trois souches de lactobacilles d'origine alimentaire vis-à-vis de six souches pathogènes (*E. coli*, 2 souches de *S. aureus*, *Ent. faecalis*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*) tout en analysant certaines de leurs propriétés probiotiques

Pour ce faire, le document est structuré comme suit : Une partie bibliographique relative aux bactéries lactiques et lactobacilles, leurs activités antibactériennes et certaines de leurs propriétés probiotiques. Une partie pratique où nous avons exposé la méthodologie et les résultats obtenus étayés par une discussion. En dernier lieu, nous rapportons les conclusions auxquelles nous a conduit cette étude et quelques perspectives.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Bactéries lactiques et lactobacilles

I.1. Bactéries lactiques

I.1.1. Définition

Les bactéries lactiques sont des microorganismes, de forme cocci ou bâtonnets à Gram positif. Elles sont hétérotrophes et chimioorganotrophe. Généralement immobiles, non sporulées, catalase négative et oxydase négative. Ces bactéries sont anaérobies facultatives, microaérophiles (**Tailliez, 2001**), capables de tolérer des environnements à faibles pH (**Mokoena, 2017**).

Elles forment un groupe diversifié de microorganismes qui produisent principalement de l'acide lactique comme métabolite. Ces bactéries colonisent de nombreux aliments, et sont souvent utilisées comme ferment dans les produits alimentaires fermentés. Elles génèrent également divers métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacetyl et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

I.1.2. Habitat

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature et susceptibles d'être retrouvées dans tous types d'habitat en raison de leur bonne capacité d'adaptation (**Axelsson, 2004**)

Elles se trouvent dans les matières végétales, les produits laitiers, les boissons fermentées, les céréales, les jus et dans les cavités des humains et des animaux (**Papadimitriou et al., 2016**).

I.1.3. Intérêt des bactéries lactiques

A. Dans le domaine technologique

Les bactéries lactiques ont été traditionnellement utilisées dans la conservation de nombreux aliments et jouent un rôle important dans la fabrication des fromages et de produits fermentés. Ces bactéries présentent des propriétés inhibitrices envers la flore d'altération et la flore pathogène, grâce à la production de métabolites (acides organiques, peroxyde d'hydrogène) et à la production de bactériocines ou à leur compétition écologique vis-à-vis des nutriments (**O'Sullivan et al., 2002 ; Dortu et al., 2009**).

B. Dans le domaine thérapeutique

Des études ont montré que les effets bénéfiques des bactéries lactiques pour la santé des consommateurs sont reconnus depuis longtemps. Elles possèdent un rôle important dans la prévention des maladies gastro-intestinales, les diarrhées et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Ces microorganismes possèdent des activités anti tumorales qui pourraient être dues soit à l'inactivation ou l'inhibition des composés carcinogènes dans le tractus gastro intestinal, soit à la réduction de l'activité enzymatique des bactéries intestinales (**Savadogo et Traore, 2011**).

I.2. Lactobacilles

I.2.1. Définition

Les Lactobacilles sont des bactéries de forme bacilles longs et fins aux coccobacilles en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux (figure 1), souvent groupés en chaîne, non sporulés et généralement immobiles (**Siegumfeldt et al., 2000 ; 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**).

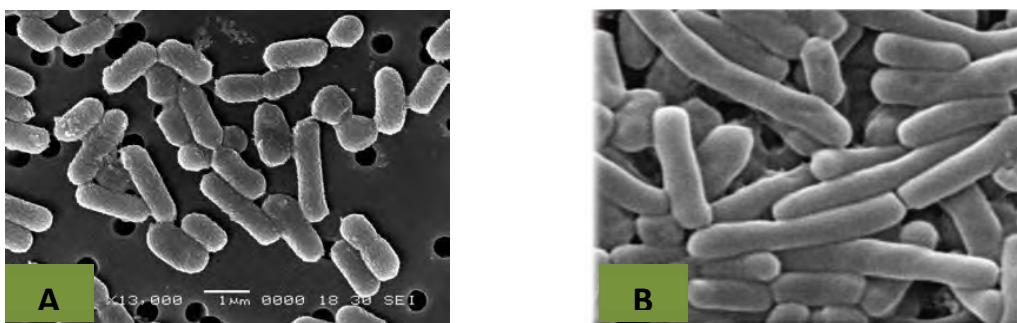


Figure1 : Aspect morphologique de *Lactobacillus plantarum*(A), *Lb. brevis*(B) observés au microscope électronique (**Arasu et al., 2015 ; Atefe Ghafurian et al., 2022**).

I.2.2. Taxonomie

Selon **Zheng et al. (2020)**, le genre *Lactobacillus* a été profondément révisé à la suite d'analyses phylogénomiques. Cette réorganisation a conduit à une redéfinition du genre *Lactobacillus* et à la création de 23 nouveaux genres. Avec la conservation du genre révisé (*Lactobacillus*) et l'inclusion du genre *Paralactobacillus*, la nouvelle classification comprend désormais 25 genres. Le genre *Lactobacillus* appartient désormais au règne *Bacteria*, au phylum *Firmicutes*, à la classe *Bacilli*, à l'ordre *Lactobacillales* et à la famille *Lactobacillaceae*, issue de la fusion avec l'ancienne famille *Leuconostocaceae*.

I.2.3. Classification

En 2020, une nouvelle classification du genre, autrefois connu sous le nom de *Lactobacillus*, a été proposée sur la base des différences biochimiques, phylogénétiques et taxonomiques entre les groupes/espèces formant le genre. Un groupe de scientifiques propose des définitions pour 23 nouveaux genres (**Zheng et al., 2020**).

En mars 2020, le genre *Lactobacillus* contenait 261 espèces différentes. Ce groupe d'espèces est extrêmement diversifié en termes de caractéristiques génotypiques, phénotypiques et écologiques, ce qui a été l'un des arguments décisifs pour la proposition de 25 nouveaux genres. La taxonomie moderne est basée sur des approches phylogénétiques, et les développements de la science biomoléculaire ont justifié la création de nouvelles organisations taxonomiques pour ces bactéries lactiques (**Zheng et al., 2020**). Le tableau I représente la reclassification de quelques exemples d'espèces du genre *Lactobacillus*.

Tableau I. Reclassification de quelques exemples d'espèces du genre *Lactobacillus* selon la nouvelle taxonomie de 2020 (**Zheng et al., 2020**).

Ancien nom	Nouveau nom
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>

I.2.4. Conditions de croissance

La température optimale pour la croissance de la plupart des Lactobacilles est de 30 à 40°C. Certaines souches de *Lactobacillus* dites « thermophiles » restent viables à 55°C (**Adams et Moss, 2000 ; Tailliez, 2004**). Ils poussent mieux dans des conditions acides, lorsque le pH est d'environ 4,5 à 6,4, mais leur croissance cesse à un pH d'environ 3,5 (**De Vos et al., 2009**). Ils sont généralement aéro-tolérants ou anaérobies facultatifs, acidophiles. Ils ont des besoins nutritionnels complexes en termes d'acides aminés, de peptides, de vitamines, de sels, d'acides gras ou d'esters d'acides (**Salvetti et al., 2012**).

I.2.5. 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, ... (**Stiles et Holzapfel, 1997**). Les lactobacilles sont ubiquistes, ce qui leur permet de se développer préférentiellement dans différents écosystèmes. Ils sont souvent associés à des aliments riches en sucres simples. Les bactéries colonisent divers environnements naturels, tels que les surfaces végétales et les muqueuses des mammifères (tableau II) (**Badis et al., 2005**).

Tableau II : Habitats de *Lactobacillus* (**Badis et al., 2005**).

Habitat /Produit	Espèces
Matériel végétal en décomposition (Cornichons, choucroute)	<i>Lb.plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. Acidophilus</i>
Laiterie (Fromage, yaourt, ...)	<i>Lb. delbrukii</i> , <i>Lb. lactis</i>
Tractus gastro-intestinal des animaux	<i>Lb. salivrus</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb .plantarum</i>
Vagin des mammifères	<i>Lb. vaginalis</i>

I.2.6. Caractères des lactobacilles

a. Caractères biochimiques

Selon la classification d'Orla-Jensen, les lactobacilles sont classés en trois catégories distinctes en fonction de leur type de fermentation (**Guiraud et Rosec, 2004**):

➤ **Groupe I « *Thermobacterium* » :** Comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à dire ceux qui produisent uniquement de l'acide lactique à partir du glucose et ne peuvent pas fermenter les pentoses ou le gluconate. Ce groupe regroupe essentiellement des espèces que l'on retrouve chez l'Homme et chez l'animal, qui contribuent à maintenir l'équilibre de la microflore de l'organisme. La majorité d'entre elles sont thermophiles dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. Helveticus* et *Lb. acidophilus* (**Guiraud et Rosec, 2004**).

Groupe II « *Streptobacterium* » : ce sont des espèces hétérofermentaires facultatives, ce qui signifie qu'elles ont la capacité d'employer la voie hétérofermentaire à partir du glucose, sous certaines circonstances comme une concentration restreinte de glucose, incluant l'espèce *Lb. casei*, qui est aussi le lactobacille prédominant présent dans le lait (**Guiraud et Rosec, 2004**).

- **Groupe III « *Betabacterium* » :** Il s'agit d'un groupe qui regroupe des espèces plutôt variées, principalement mésophiles, telles que *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*, dont certaines font partie de la flore des levains de panification (**Federighi et al., 2005; De vos et al., 2009**).

I.2.7. Exigences nutritionnelles des lactobacilles

Les lactobacilles présentent diverses exigences nutritionnelles, qui peuvent être catégorisées selon **De Man et al. (1960)** et **De Vos et al. (2009)** en:

- a) **Exigences en vitamines** : Toutes les espèces de lactobacilles ont un besoin important en vitamines telles que la niacine (B3) et la cobalamine (B12). Une carence en vitamine B12 peut affecter la synthèse de l'ADN, provoquant des modifications morphologiques, notamment un allongement des cellules. Par exemple, chez *Lb. helveticus* ssp *jugurti*, un déficit en cobalamine (B12) ou en acide folique peut entraîner ce type d'elongation cellulaire.
- b) **Exigences en cations et en bases azotés** : Les ions Mg^{2+} , Mn^{2+} et Fe^{2+} jouent un rôle indispensable dans la croissance des lactobacilles. Le magnésium et le manganèse, en particulier, participent à l'activation de nombreuses réactions enzymatiques et contribuent à la stabilité des acides nucléiques, des ribosomes ainsi que de la membrane cellulaire.

I.2.8. Rôle des lactobacilles et leurs utilisations dans différents domaines

Grace à leurs effets bénéfiques, les lactobacilles sont utilisés dans plusieurs secteurs d'activités, notamment dans le domaine de l'agriculture, le domaine alimentaire et le domaine de santé.

➤ Domaine de l'agriculture

Les lactobacilles sont employés comme agents biologiques pour conserver le fourrage grâce à une fermentation acidifiante. L'emploi de lactobacilles dans le processus d'ensilage et la protéolyse contribue à une meilleure qualité nutritionnelle du fourrage (**Khuntia et Chaudhary, 2012**).

➤ Domaine alimentaire

Plusieurs espèces de lactobacilles sont employées dans le domaine alimentaire, principalement les produits laitiers, dans lesquels elles sont utilisées comme un starter ou non (**Al-Tawaha et Meng, 2018**). Ils participent aux processus de fermentation principalement par la production d'acide lactique à partir des sources de carbone, ce qui entraîne une acidification rapide de la matière première alimentaire, un critère essentiel pour la conservation des produits. Certains Lactobacilles sont utilisés dans la production de yaourts,

de fromages, de choucroute, de cornichons, de levain, de vin et d'autres produits fermentés (**Bauer et al., 2010 ; Siragusa et al., 2013**).

De plus, l'activité protéolytique des lactobacilles provoque la dégradation des liaisons peptidiques dans les protéines, générant des peptides et des acides aminés libres qui jouent un rôle essentiel dans la détermination du goût des aliments, l'optimisation de la digestibilité des produits laitiers, ainsi que le changement de la texture et de l'humidité de certains produits comme les fromages (**García-Cano et al., 2019**). Certaines espèces de lactobacilles ont la faculté, lors de leurs processus métaboliques, de produire des exopolysaccharides (EPS) qui sont ensuite disséminés dans leur milieu de culture. Ces EPS pourraient être déterminants pour optimiser la texture, la rhéologie et le goût des produits laitiers fermentés tels que le yaourt et le fromage (**Al-tawaha et Meng, 2018**).

➤ Domaine de la santé (utilisation comme probiotiques)

Il existe plusieurs espèces de lactobacilles qui jouent le rôle de probiotiques qui sont principalement : *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* et *Lb. rhamnosus* (**Al-Tawaha et Meng, 2018**). En effet, toute souche bactérienne identifiée comme probiotique devrait résister à des conditions extrêmement diverses : l'exposition aux enzymes digestives des cavités buccales et gastriques, au pH acide de l'estomac, à la faible concentration d'O₂ dans les intestins et à une température qui n'est pas toujours optimale. Récemment, les lactobacilles jouent un rôle important dans la santé et sont considérés comme une alternative aux antibiotiques pour traiter certaines infections bactériennes causées principalement par des bactéries résistantes ou à multi-résistance (**Yan et Goldman, 2020**) (tableau III).

Tableau III : Effets bénéfiques des lactobacilles selon les domaines de la santé humaine (Aljohani et al., 2024 ; Shah et al., 2024)

Domaine de santé	Effets bénéfiques	Espèces impliquées
Santé digestive	Réduction de la douleur abdominale, diarrhée, constipation	<i>Lb. plantarum, Lb. acidophilus, Lb. rhamnosus</i>
Santé immunitaire	Renforcement de l'immunité, modulation des cytokines (IL-10, TNF-a)	<i>Lb.reuteri, Lb.paracasei, Lb.plantarum</i>
Inflammation systémique	Diminution de la CRP, inflammation chronique	<i>Lb.plantarum, Lb. paracasei</i>
Santé métabolique	Réduction du cholestérol LDL, régulation de la glycémie	<i>Lb. plantarum, Lb. paracasei</i>
Santé mentale (axe intestin-cerveau)	Diminution du stress, anxiété, amélioration de l'humeur	<i>Lb.rhamnosus, Lb.helveticus, Lb.reuteri</i>
Santé buccale et parodontale	Réduction de la profondeur des poches, amélioration de la santé gingivale	<i>Lb. plantarum</i>
Santé cutanée et urogénitale	Prévention des infections (ex. vaginose bactérienne)	<i>Lb. crispatus, Lb. gasseri</i>

II. Activité antibactérienne

Les chercheurs et les industriels de l'agroalimentaire sont de plus en plus contraints à réduire l'emploi des traitements physiques (hautes pressions, rayons ionisants, pasteurisation, stérilisation, congélation, réfrigération,), chimiques (nitrites, sulfites), en utilisant des bactéries comme un outil de prévention (Ren et al., 2018).

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis plusieurs siècles comme des agents protecteurs, qui se caractérisent par la synthèse des métabolites antimicrobiens. Grâce à ces propriétés, les bactéries lactiques ont des rôles différents dans la conservation des aliments, la prévention d'empoisonnement, l'augmentation de la valeur nutritive et l'amélioration de la qualité organoleptique des aliments et dans la santé. Certaines bactéries lactiques sont largement utilisées comme probiotiques tels que : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (Ajao et al., 2021). Par conséquent l'un des genres les plus importants et les plus étudiés des bactéries lactiques est le genre *Lactobacillus*. L'activité antimicrobienne des lactobacilles est principalement attribuée à la production d'acides lactique, acétique, formique, caproïque, propionique, butyrique et valérique (Corsetti et al., 1998). Les lactobacilles produisent également d'autres substances inhibitrices telles que H₂O₂ (Rodrígues et al., 1997 ; Ito et al., 2003), CO₂, diacétylé (Ouwehand et al., 1998 ; Ammor

et *al.*, 2006), et les bactériocines, des composés thermostables à faible poids moléculaire (Cleveland *et al.*, 2001 ; Plockova *et al.*, 2001).

II.1. Acides organiques

L'acide lactique et l'acide acétique, qui sont produits lors de la fermentation lactique, possèdent une activité contre les micro-organismes pathogènes intestinaux associés à la diarrhée (Servin, 2004). Ils manifestent leur action antibactérienne contre les germes pathogènes de deux façons:

- Un effet direct, dans lequel les acides organiques traversent passivement la membrane bactérienne sous leur état non dissocié. Ils acidifient ensuite le cytoplasme une fois dissociés et inhibent l'activité enzymatique des cellules d'agents pathogènes sensibles aux acides; cette baisse du pH peut donc influencer la viabilité des bactéries pathogènes (Aiba *et al.*, 1998 ; Alakomi *et al.*, 2000)
- Un effet secondaire dû à la résistance des lactobacilles à l'acidité dans un environnement acide rend ces bactéries plus compétitives par rapport aux autres (Servin, 2004 ; Tejero-Sarinena *et al.*, 2012).

II.2. Peroxyde d'hydrogène

L'effet antimicrobien du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut être attribué à la génération de radicaux libres tels que le radical superoxyde ($O_2\bullet$) et le radical hydroxyle ($OH\bullet$), qui ont la capacité de nuire à l'ADN bactérien. L'effet inhibiteur du peroxyde d'hydrogène pourrait s'expliquer par des réactions d'oxydation des groupes sulfhydryles, entraînant une altération de la structure des protéines et par conséquent la défaillance fonctionnelle des enzymes. En outre, cela peut provoquer la peroxydation des lipides de la membrane, ce qui augmente la perméabilité de la membrane du microorganisme visé (Šušković *et al.*, 2010 ; Nair *et al.*, 2017).

II.3. Dioxyde de carbone

Le CO_2 peut avoir une action antimicrobienne en instaurant un environnement sans oxygène, qui bloque les décarboxylations enzymatiques, et la concentration accrue de CO_2 dans l'environnement peut entraîner un déséquilibre au niveau de la perméabilité. Cependant, le dioxyde de carbone peut également favoriser la prolifération de certaines bactéries à une concentration faible (Singh, 2018).

II.4. Diacétyle

Le diacétyle ($C_4H_6O_2$), issu du métabolisme du citrate, est à l'origine de la saveur « beurre » des produits laitiers. Il empêche également la prolifération bactérienne en perturbant possiblement les processus régissant l'utilisation de l'arginine. Sa présence dans la nourriture est souvent insuffisante pour lui permettre de jouer un rôle significatif dans l'activité antimicrobienne (**Heita, 2014**).

II.5. Bactériiocines

Les bactériiocines sont des peptides ribosomiques synthétisés par certaines bactéries qui exercent un effet antimicrobien, soit en tuant les bactéries cibles, soit en inhibant leur développement. On s'intéresse particulièrement aux bactériiocines produites par les bactéries lactiques, réputées pour leur contribution à la conservation efficace des aliments (**Lagha et al., 2017**).

C'est en **1925 qu'Andre Gratia** a identifié la première bactériocine, notant que croissance de certaines souches *d'E. coli* était freinée par un composé antibactérien qu'il a nommé Colicin V. **Klaenhammer (1988)** offre l'une des définitions les plus répandues, décrivant les bactériiocines comme des protéines ou complexes protéiques dotés d'une action antibactérienne contre des espèces similaires à la souche productrice. Selon **Dortu et Thonart (2009)**, toutes les bactériiocines sécrétées par les bactéries lactiques sont efficaces contre les bactéries à Gram positif. Cependant, elles n'ont aucune action sur les bactéries à Gram négatif. Cela est dû à la barrière formée par la membrane externe de ces dernières qui entrave l'accès des bactériiocines à leur zone d'action sur la membrane interne. Les lactobacilles sont bien connus pour leur capacité à produire diverses bactériiocines, parmi lesquelles on retrouve l'acidocine B (*Lb. acidophilus* M46), la lactacine F (*Lb. johnsonii*), ainsi que les lactacines S1 et S2 (*Lb. salivarius* BGHO1). D'autres exemples incluent la gasséricine A (*Lb. gasseri* LA39), la brévicine 27 (*Lb. brevis* SB27), la plantaricine ASM1 (*Lb. plantarum* A1) et la plante 80 (*Lb. casei* B80) (**Rammelsberg et al., 1990 ; Todorov, 2005**).

II.5.1.Mécanisme d'action des bactériiocines

Le mécanisme d'action des bactériiocines est largement étudié. Il est admis qu'il se décompose en trois étapes :

- Fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. C'est durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité.

- L'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique : plusieurs peptides antibactériens sont recrutés pour former un pore.
- La formation du pore: ce dernier conduit à des fuites de composés intracellulaires vitaux. Leur perte entraîne donc des effets néfastes pour la cellule, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire (**Champak, 2005**).

III. Probiotiques

III.1. Définitions

Le terme « probiotique » a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. Probiotique est une expression de l'ère moderne, qui désigne « pour la vie » et sert à désigner l'association bactérienne avec des effets bénéfiques sur la santé humaine et animale (**Kerry et al., 2018**). Ce sont des micro-organismes vivants non pathogènes qui présentent divers avantages pour la santé de l'hôte (**Singh et Rao, 2021**). Cependant, la définition la plus largement acceptée du terme est celle de la consultation mixte d'experts (**FAO/OMS, 2001**) qui redéfinit les probiotiques comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates (dans le cadre de l'alimentation), confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte ».

III.2. Différentes espèces de *Lactobacillus* en tant que probiotique

Au cours des dernières décennies, les probiotiques ont suscité un intérêt considérable dans la prévention et la gestion de différents problèmes de santé, et un nombre croissant de données a mis en évidence de manière significative les mécanismes et les effets dans ces conditions pathologiques. **Kerry et al., 2018** ont indiqué que les probiotiques *Lactobacillus* actuels sont *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lb. acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lb. crispatus*, *Ligilactobacillus gasseri*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* (**Shah et al., 2024**).

III.3. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques

Une souche au potentiel probiotique devrait avoir plusieurs propriétés souhaitables pour exercer ses effets bénéfiques. Il a été rapporté que les critères de base pour les souches de microorganismes à utiliser comme probiotiques sont les suivants :

Tableau IV : Principaux critères de sélection des probiotiques (**Pineiro et Stanton, 2007 ; Harzallah et Belhadj, 2010**).

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Souche d'origine humaine ou animale. ❖ Non pathogénicité et non toxicité de la souche. ❖ Reconnaissance (GRAS). ❖ Absence de gènes de virulence. ❖ Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques.
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Résistance à l'acidité gastrique et aux sels biliaires. ❖ Capacité d'adhésion à l'épithélium intestinal. ❖ Production de substances antimicrobienne. ❖ Antagonisme vis-à-vis des pathogènes. ❖ Stimulation du système immunitaire. ❖ Production de vitamines, d'enzymes ou de métabolites bénéfiques.
Critères technologique	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Souches génétiquement stables. ❖ Bonnes propriétés sensorielles. ❖ Résistances aux phages. ❖ Production à grande échelle. ❖ Viabilité souhaitée pendant le traitement et le stockage.

MATERIEL ET METHODES

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie 1 (bloc 9) de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, durant la période allant du 14 avril 2025 au 24 juin 2025.

I. Origine des souches

Dans ce travail, trois souches de Lactobacilles (S1, S2 et S3), isolées à partir de produits laitiers locaux sont utilisées. Ces souches appartiennent à la collection du Laboratoire de recherche de Microbiologie Appliquée (LMA, Université de Bejaia). Ces souches ont fait l'objet d'une étude de quelques propriétés probiotiques ainsi que leur activité antibactérienne à l'égard de bactéries pathogènes. Le tableau V présente les souches utilisées.

Tableau V : Les souches utilisées dans cette étude.

Souche	Code	Milieu de repiquage	Origine
<i>Lactobacillus sp</i>	S1	MRS	Produits laitiers
<i>Lactobacillus sp</i>	S2	MRS	Produits laitiers
<i>Lactobacillus sp</i>	S3	MRS	Produits laitiers
<i>Staphylococcus aureus 1 ATCC25923</i>	S.a1	BN, Chapman	/
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	S.a2	BN, Chapman	Prélèvement pathologique
<i>Escherichia coli ATCC25922</i>	E.c	BN, EMB	Prélèvement pathologique
<i>Klebsiella pneumoniae ATCC700603</i>	K.p	BN, EMB	/
<i>Enterococcus faecalis</i>	E.f	BN, BEA	
<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC27853</i>	P.a	BN, GN	/

II. Revivification et vérification de la pureté des souches

Les souches lactiques S1, S2 et S3 ont été conservées dans du boillon MRS à 4°C. Leur revivification consiste à les repiquer dans 9 ml de bouillon MRS puis les incuber à 37°C/24h.

Après incubation, un ensemencement a été réalisé en strie sur la gélose MRS. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C/48h.

Les souches pathogènes ont été revivifiées dans du bouillon nutritif (BN) puis repiquées sur la gélose nutritive (GN) et incubées à 37°C/24h. Après croissance, des tests sont réalisés pour vérifier la pureté de toutes les souches. Il s'agit des tests suivants :

- Observation macroscopique de l'aspect des colonies.
- Examen microscopique par coloration de Gram.
- Test de la catalase.

III. Standardisation des inocula des souches

Après la revivification des souches, deux colonies de chaque souche S1, S2 et S3 ont été prélevées à partir des boîtes et ensuite ensemencées dans des tubes contenant 9ml de bouillon MRS. Ces tubes ont ensuite été incubés à 37°C/18h. Après cette durée d'incubation, une turbidité a été observée dans les tubes, indiquant une croissance bactérienne. Les tubes ont été homogénéisés par vortex, puis des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10^{-8} . A partir des dilutions 10^{-7} et 10^{-8} , un volume de 1ml de chaque dilution a été ensemencé en masse dans la gélose MRS. Les boites sont incubées à 37°C/48h.

Concernant les souches pathogènes, une colonie a été prélevée (à partir d'une boite de Petri contenant la gélose correspondante) et mise dans 9 ml de BN puis incube à 37°C/18h. Au terme de l'incubation, 1 ml de la culture bactérienne a subi une série de dilution décimale, puis ensemencé en masse dans les géloses correspondantes. Les boites sont incubées à 37°C/24-48h.

IV. Etude de quelques propriétés probiotiques des Lactobacilles

IV.1. Test de la résistance à l'acidité gastrique

Trois souches de Lactobacilles (S1, S2 et S3) ont été cultivées dans le bouillon MRS et incubées à 37°C/18h. Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 3000 rpm pendant 15 minutes. Les culots bactériens ont été récupérés et remis en suspension dans 9ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir des suspensions bactériennes homogènes.

1ml de chaque suspension bactérienne obtenues ont été immédiatement utilisés pour effectuer des dilutions décimales successives allant jusqu'à 10^{-8} . Le dénombrement a été réalisé à partir des dilutions 10^{-7} et 10^{-8} de chaque souche (S1, S2 et S3) par ensemencement en masse sur gélose MRS. Les boites sont ensuite incubées à 37°C/48h.

En parallèle, 1ml de chaque suspension S1, S2 et S3 a été inoculé dans des tubes contenant du bouillon MRS acidifié aux pH suivants : 2,5 ,3 et 3,5. Ces tubes ont été incubés à 37°C/2h.

Après les 2 heures d'incubation, des dilutions décimales successives (jusqu'à 10^{-8}) ont été réalisées pour chaque souche aux différents pH. Les dilutions appropriées ont été ensemencées en masse dans de la gélose MRS. L'incubation a été effectuées à 37°C/48h (**Bentahar et al., 2024**) le test a été répété deux fois.

Le taux de survie a été exprimé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \frac{\log \text{UFC}_{T2h}}{\log \text{UFC}_{T0h}} \times 100$$

IV.2. Test de la résistance aux sels biliaires

Trois souches de Lactobacilles (S1, S2 et S3) ont été cultivés dans un bouillon MRS et incubés à 37°C/18h. Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 3000 rpm pendant 15 minutes. Les culots bactériens obtenus ont été ressuspensionnés dans 9ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir des suspensions bactériennes homogènes.

1ml de chaque suspension bactérienne obtenue a été immédiatement utilisé pour effectuer des dilutions décimales successives allant jusqu'à 10^{-8} . Le dénombrement a été réalisé à partir des dilutions 10^{-7} et 10^{-8} de chaque souche (S1, S2 et S3) par ensemencement en masse dans la gélose MRS. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C/48h.

En parallèle, 1ml de chaque suspension S1, S2 et S3 a été inoculé dans des tubes contenant du bouillon MRS supplémenté en sels biliaires aux différentes concentrations : 0,1%, 0,3% et 0,5%. Ces tubes ont été incubés à 37°C/3h.

Après les 3 heures d'incubation, des dilutions décimales successives (jusqu'à 10^{-8}) ont été réalisées pour chaque souche aux différentes concentrations de sels biliaires. Les dilutions appropriées ont été ensemencées en masse dans la gélose MRS. L'incubation a été effectuées à 37°C/48h.

Le dénombrement des colonies a permis de déterminer la viabilité des souches après exposition aux différentes concentrations de sels biliaires (**Bentahar et al., 2024**). Le test a été répété deux fois.

Le taux de survie a été exprimé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \frac{\log \text{UFC}_{T3h}}{\log \text{UFC}_{T0h}} \times 100$$

IV.3. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité est déterminée selon la méthode décrite par **Martiz et al. (2023)**. Les trois souches lactiques (S1, S2 et S3) sont cultivées dans le bouillon MRS puis incubées à 37°C/18h. Après incubation, le culot des cultures sont récupérés par centrifugation à 4000 rpm/15 min suivi de deux lavages successifs avec du tampon PBS stérile. La densité optique initiale de la suspension a été ajustée à 0,6 à 600 nm. Par la suite, 1ml du xylène a été ajouté à 1ml de la suspension bactérienne, le mélange des deux phases a été agité par vortex pendant 2 minutes. Après 1 heure d'incubation, la phase aqueuse a été récupérée à l'aide d'une seringue stérile et la mesure de la densité optique finale (DO finale) a été effectuée à 600nm, le test a été répété deux fois.

Le pourcentage d'hydrophobicité (H%) a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ hydrophobicité} = (\text{DO initiale}-\text{DO finale}/ \text{DO initiale}) \times 100$$

IV.4. Test d'auto-agrégation

L'auto-agrégation des cellules bactériennes est déterminé selon la méthode décrite par **Ramos et al. (2013)**. Trois souches (S1, S2 et S3) ont été cultivées dans du bouillon MRS pendant 18h, puis centrifugées à 4000 rpm/15min. Les culots bactériens obtenus ont été lavés deux fois avec du PBS, puis ressuspensionnés dans le même tampon pour obtenir une suspension standardisée (DO 600 nm à 0,5). 4ml de chaque suspension bactérienne ont été agités par vortex pendant 10s. Après incubation à 37°C pendant 1h, 2h et 24h, la DO du surnageant est mesurée à 600nm et le pourcentage d'auto-agrégation est exprimé selon la formule suivante. Le test a été répété deux fois.

$$\% \text{ Auto-agrégation: } (A_{0h}-A_t / A_{0h}) \times 100$$

A0 : représente l'absorbance à t=0.

At : représente l'absorbance à t=1h, 2h et 24h.,

IV.5. Test d'activité antioxydante

L'effet des souches S1, S2 et S3 sur l'activité de piégeage de DPPH est déterminé selon la méthode de **Kim et al. (2021)**. Les trois souches (S1, S2 et S3) ont été cultivées en milieu MRS à 37°C/18h, puis centrifugées à 4000 rpm /15min. Le culot bactérien obtenu a été

lavé deux fois avec du PBS, suivi d'une autre centrifugation à 4000 rpm/10 min puis le culot a été remis en suspension dans le même tampon (PBS) jusqu'à une DO 600 de 1,0.

1ml de la suspension bactérienne a été mélangé avec 1ml de la solution DPPH, le mélange a été laissé pendant 30 min à température ambiante, à l'abri de la lumière, puis centrifugé.

L'absorbance des surnageants a été mesurée à 517nm pour évaluer la capacité antioxydante des souches testées. Le test a été répété deux fois.

L'activité de piégeage de DPPH est donnée par cette formule.

$$\text{Activité de piégeage de DPPH (\%)} = \left(\frac{1 - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

IV.6. Test d'activité acidifiante

IV.6. Activité acidifiante des souches lactiques

L'activité acidifiante des souches de lactobacille a été évaluée selon la méthode décrite par **Guiraud (2003)**. Deux colonies des souches (S1, S2 et S3) ont été inoculées dans 9ml du lait écrémé stérile, puis incubés à 37°C/18h.

Après incubations, le pH a été mesuré à différents temps : T0h, T3h, T6h et T24h, à l'aide d'un pH-mètre étalonné (HANNA). En parallèle, l'acidité titrable a été déterminée à T0h, T3h, T6h et T24h selon la méthode de Dornic, qui consiste en un titrage par la soude (NaOH à 0,1N) en présence de phénolphthaleïne à 1%.

L'acidité est exprimée en degrés Dornic °D selon la formule suivante :

$$\text{Acidité (}^{\circ}\text{D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

Où 1 °D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait, le test a été répété deux fois.

V. Etude de l'activité antibactérienne des souches de lactobacilles

V.1. Préparation des cultures fraîches

Après l'obtention des colonies des souches test et cibles sur leur milieux correspondants, 2 colonies de chaque souche lactique et une colonie de chaque souche pathogène ont été transférées dans 9 ml de bouillon MRS et BN respectivement. Les tubes ont été incubés à 37°C/18h.

V.2. Méthode directe (test des spots)

Après avoir coulé les boites de Pétri avec de la gélose MRS, des volumes de 5µl des suspensions bactériennes des souches de lactobacilles (S1, S2, et S3) sont déposés en spots

sur la surface de la gélose. Les spots ont été laissés pour sécher près du bec benzène pendant 30 minutes, puis les boites sont incubées à 37°C/24h. Après incubation, la gélose MRS contenant les spots est recouverte d'une couche de 10 ml d'une gélose Mueller-Hinton (MH) en surfusion ensemencée avec 1 ml d'une culture fraîche des souches pathogènes (10^7 UFC/ml) (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *E. coli*), puis les boites sont incubées à 37°C pendant 24 h (**Alegria et al., 2010**). Le test a été répété trois fois.

V.3. Méthode indirecte (test des puits)

Le test des puits est réalisé dans le but de détecter l'activité antibactérienne de trois souches de Lactobacilles à l'égard de 5 souches pathogènes (*E. coli*, 2 souches de *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*).

Ce test consiste à mettre en contact le surnageant de culture des souches de Lactobacilles avec la souche cible. Le test est réalisé avec des cultures bactériennes de 18 h suivant la méthode de double couche décrite par **Ennahar et al. (1998)**. Pour se faire, une couche de gélose MH est coulée dans des boites de Pétri stériles. Après solidification, 10 ml de gélose Mueller Hinton en surfusion, préalablement inoculée avec la souche cible (10^7 UFC/ml) sont ajoutés. Après solidification, des puits de 6 mm de diamètre sont creusés à l'aide d'un embout stérile dans la gélose. Ces puits sont sellés puis remplis de 100 µl de surnageant de culture natif des trois souches de Lactobacilles obtenu après centrifugation à 8000 g/15 min à 4°C. Les boites ainsi préparées sont entreposées au réfrigérateur à une température de 4°C pendant 2 heures pour permettre la diffusion des substances antibactériennes présentes dans le surnageant, puis incubées à 37°C/24 h. L'activité antibactérienne se manifeste par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. Les diamètres des zones d'inhibition apparaues sont mesurés en millimètres. Le test est refait plusieurs fois pour une confirmation des résultats obtenus.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Vérification de la pureté des souches

I.1. Aspect macroscopique

I.1.1. Souches de Lactobacilles

La revivification des souches de Lactobacilles (S1, S2 et S3) a été réalisée sur le bouillon MRS. Après 24h d'incubation l'observation macroscopique a indiqué la présence d'un trouble homogène avec un dépôt cellulaire sous forme une pastille blanche au fond du tube désignant la viabilité et la croissance des souches. Cependant, sur la gélose MRS et après 48h d'incubation, la croissance apparaît sous forme de petites colonies crèmeuses à jaunâtres (**figure 2**).

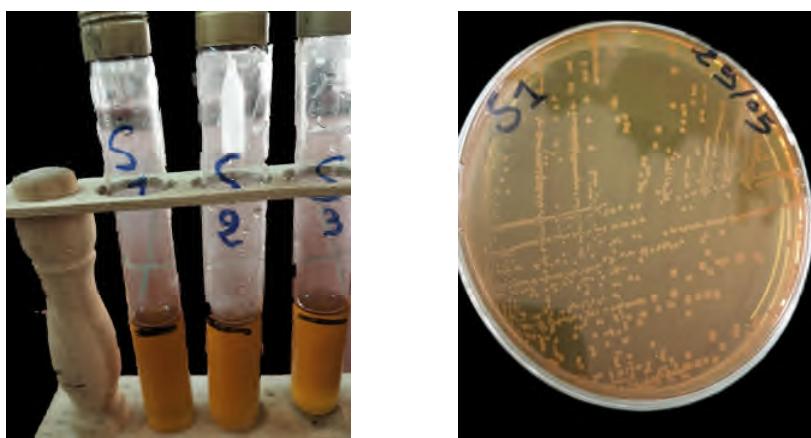


Figure 2 : Aspect macroscopique de trois souches de Lactobacilles sur bouillon et gélose MRS.

I.1.2. Souches pathogènes

La croissance des souches de *S. aureus* 1 et 2, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* et *K. pneumoniae* se manifeste par la présence de trouble dans les tubes de bouillon nutritif ensemencés, ce qui indique une croissance bactérienne. Cependant, sur milieu solide après 24h d'incubation, chaque souche a présenté une croissance sous forme de colonies distinctes, caractéristiques selon leur morphologie, couleur et aspect de surface (**figure 3, tableau VI**)

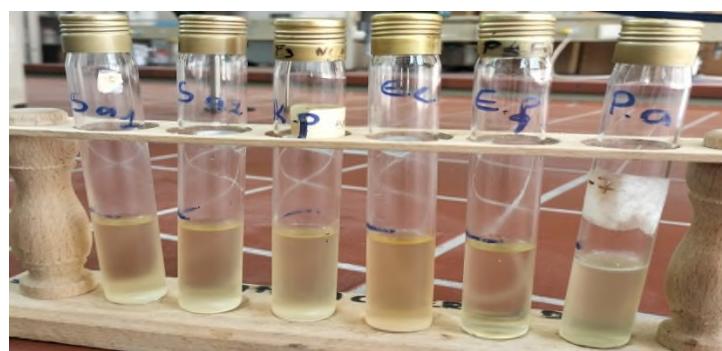


Figure 3 : Aspect macroscopique de souches pathogènes sur BN.

Tableau VI : Aspect macroscopique de souches pathogènes sur les géloses ensemencées.

Illustrations	Souches	Milieu repiqué	Aspects des colonies
	<i>S. aureus</i> 1	Gélose Chapman	Colonies rondes bombées avec une couleur jaune lisse.
	<i>S. aureus</i> 2	Gélose Chapman	Colonies rondes bombées avec une couleur jaune lisse.
	<i>Ent. faecalis</i>	Gélose BEA	Colonies petites brunes.
	<i>E. coli</i>	Gélose EMB	Colonies rondes bombées, de couleur noir au centre avec un éclat métallique vert.
	<i>P. aeruginosa</i>	GN	Colonies plates et irrégulières, incolore à verdâtre.
	<i>K. pneumoniae</i>	GN	Colonies larges mucoïdes avec une couleur rose pâle.

I.2. Aspect microscopique

Après coloration de Gram, l'observation microscopique a révélé que les souches de lactobacilles (S1, S2 et S3) sont de forme bacille Gram positif, de couleur violette, disposés en chaînettes. Les résultats de la coloration de Gram des souches pathogènes sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau VII : Résultats de la coloration de Gram et aspect microscopique des souches pathogènes.

Souche	Gram	Forme et couleur
<i>S. aureus 1</i>	Gram positif	Coques groupés en amas de couleur violette.
<i>S. aureus 2</i>	Gram positif	Coques groupés en amas de couleur violette.
<i>E. faecalis</i>	Gram positif	Coques en chaînettes de couleur violette.
<i>E. coli</i>	Gram négatif	Petits bacilles isolés, roses.
<i>P. aeruginosa</i>	Gram négatif	Bacilles droits, isolés ou en paires, rose.
<i>K. pneumoniae</i>	Gram négatif	Bacilles courts, encapsulés et isolés, de couleur rose.

I.3. Test de la catalase

La confirmation de la pureté des souches utilisées est complétée par la recherche de la catalase, qui permet de distinguer les bactéries catalase positives des catalase négatives, en observant la présence ou l'absence de bulles d'oxygène suite à l'ajout de peroxyde d'hydrogène.

Les souches de *Lactobacillus* (S1, S2 et S3) ont donné un résultat catalase négative, caractérisé par l'absence de bulles. En revanche, les souches pathogènes comme *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* ont montré une réaction catalase positive, avec apparition d'une effervescence. *E. faecalis* a présenté un résultat négatif.

I.4. Production de gaz

Un des critères d'identification des souches du genre *Lactobacillus* est l'étude du type fermentaire. Après incubation, une accumulation de gaz dans la cloche de Durham a été observée dans les trois tubes (figure4), indiquant une production de gaz.

Ces résultats révèlent que les souches S1, S2 et S3 sont hétérofermentaires, capables de produire du C0₂ en plus de l'acide lactique.



Figure 4: Résultat du test de production du gaz des trois souches de lactobacilles.

II. Standardisation de l'*inoculum*

Le but de la standardisation de l'*inoculum* bactérien, est d'obtenir le même nombre de cellules bactériennes dans 1ml de culture tout au long de l'expérience. Après dénombrement effectué pour les souches de Lactobacilles et les souches pathogènes, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau VIII : Résultats de la standardisation des *inocula* lactiques et pathogènes.

Souche	Nombre de colonies prises	Concentration cellulaire (UFC/ml)
S1	2 colonies	$5,4 \cdot 10^8$
S2	2 colonies	$5,4 \cdot 10^8$
S3	2 colonies	$5,4 \cdot 10^8$
<i>S. aureus1</i>	1 colonie	10^8
<i>S. aureus2</i>	1 colonie	10^8
<i>E. faecalis</i>	1 colonie	10^7
<i>E. coli</i>	1 colonie	10^8
<i>P. aeruginosa</i>	1 colonie	10^8
<i>K. pneumoniae</i>	1 colonie	10^8

III. Effet antibactérien des Lactobacilles

III.1. Test des spots

L'activité antibactérienne des trois souches de lactobacilles vis-à-vis de six souches pathogènes apparaît sous forme de zones claires autour de chaque spot et qui diffèrent par leur diamètre. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 5,6 et le Tableau IX, X** dans **annexe II**.

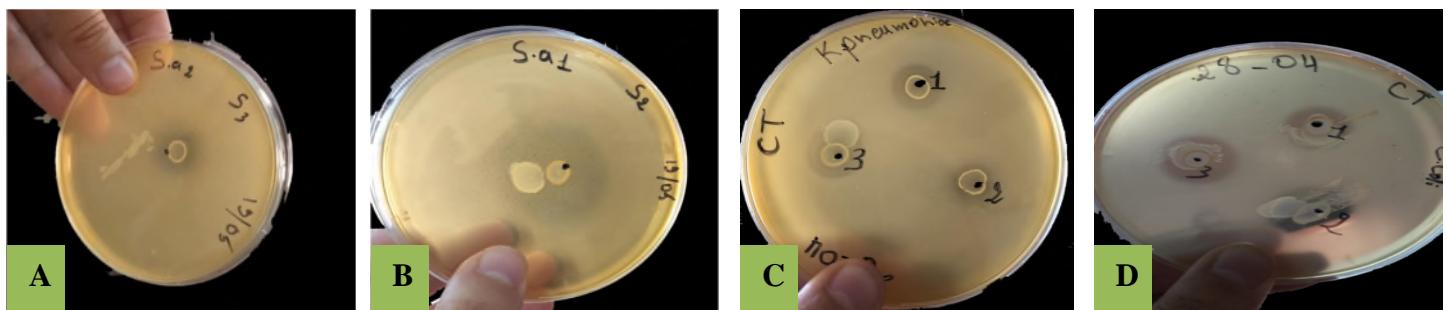


Figure 5 : Exemples de résultats du test des spots.

- A/ Effet inhibiteur de la souche (S3) sur *S. aureus* 2.
- B/ Effet inhibiteur de la souche (S2) sur *S. aureus* 1.
- C/ Effet inhibiteur de S1, S2 et S3 sur *K. pneumoniae*
- D/ Effet inhibiteur de S1, S2 et S3 sur *E. coli*.

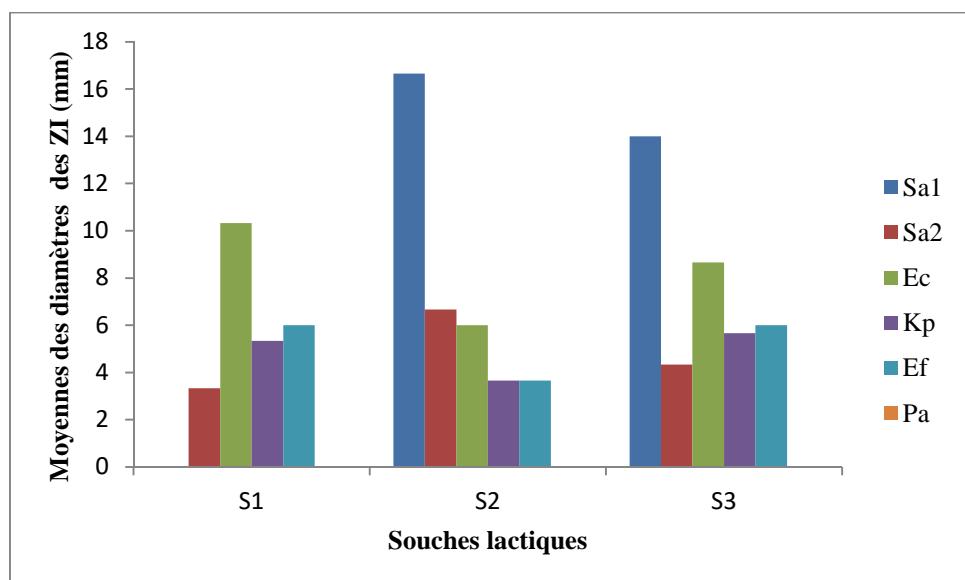


Figure 6: Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en millimètres) résultants du test des spots.

D'après les résultats obtenus, toutes les souches de lactobacilles (S1, S2 et S3) ont présenté une activité antagoniste contre les souches pathogènes, leur spectre d'activité sont très variés, dont ;

La souche S1 a présenté une activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* 2, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Ent. faecalis* par la formation de zones d'inhibition mesurables à des diamètres de 3,33 mm, 10,33 mm, 5,33 mm et 6 mm respectivement. En revanche, aucune inhibition n'a été observée contre *S. aureus* 1 et *P. aeruginosa*, indiquant une absence d'effet antagoniste de S1 sur ces deux souches pathogènes.

Les souches S2 et S3 ont montré une bonne activité antibactérienne contre cinq souches pathogènes *S. aureus* 1, *S. aureus* 2, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Ent. faecalis*. Cette activité s'est manifesté par l'apparition de zones d'inhibition autour des spots à des diamètres de 16,66 mm, 6,66 mm, 6 mm, 3,66 mm et 3,66 mm pour S2 et 14 mm, 4,33 mm, 8,66 mm, 5,66 mm et 6 mm pour S3 respectivement, ce qui traduit leur pouvoir antibactérien. Cependant, aucune inhibition n'est observée contre *P. aeruginosa*. Ce résultat indique que cette souche pathogène est résistante à l'action de S2 et S3.

Les souches présentant une zone claire d'extension latérale supérieure à 0,5 mm sont considérées comme productrices de substances antibactériennes (**Fleming et al., 1975**). L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm (**Schillinger et Lucke, 1989**).

Les résultats obtenus par **Hamed et Elattar (2013)**, ont montré des valeurs comprises entre 31 à 38 mm en étudiant l'effet antibactériens de souches de *Lb. plantarum* isolées à partir de lait de chameau vis-à-vis d'*E. coli*. Ces résultats sont supérieurs aux nôtres, où les diamètres obtenus se situent entre 6 et 10,33mm.

Nos résultats pour la *S. aureus* 1 sont supérieurs à celles rapportées par **Savadogo et al. (2004)**, qui ont obtenu des zones d'inhibition de 9 mm à 10 mm contre *S. aureus*. Cependant nos résultats pour la souche *S. aureus* 2 sont inférieurs à celle rapportées par **Savadogo et al. (2004)**.

L'inhibition des souches de *S. aureus* par les souches de *Lb. plantarum* a déjà été décrite par **Mami et al. (2008)**, qui ont rapporté que les souches de *Lb. plantarum* isolées du lait de chèvre cru inhibaient les souches de *S. aureus*.

Les résultats rapportés par **Bouadjaib (2013)** et **Madi (2010)** dans leurs travaux ont révélé que les souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers ont montré une activité antibactérienne à l'égard de *S. aureus* et *E. coli*.

Selon les travaux de **Shim et al. (2016)**, les zones d'inhibition des bactéries lactiques

vis-à-vis d'*Ent. Faecalis* varient entre 11,5 mm et 15,5 mm. Ces résultats sont supérieurs aux nôtres où les diamètres obtenus se situent entre 3,6 mm et 6 mm.

L'activité inhibitrice des lactobacilles peut avoir deux origines :

- La première est la production de l'acide lactique et/ou acétique ; en effet les lactobacilles sont connus pour avoir une grande résistance au pH acide contrairement aux autres genres de bactéries lactiques (**Wong et Chen, 1988 ; Podolak et al., 1996, Wilson et al., 2005**).
- La deuxième provient de la production de substances organiques et probablement des bactériocines (**Oyetayo et al., 2003 ; Avila et al., 2005 ; Cocolin et al., 2007**).

Généralement, les espèces du genre *Lactobacillus* sont catalase-négative et certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène (**Condon, 1987**). Le peroxyde d'hydrogène est toxique et capable d'inhiber de nombreux germes pathogènes qui ne peuvent pas le dégrader (**Otero et Nader-Macias, 2006 ; Pridmore et al., 2008**).

D'après **Federighi (2005)**, le diacétyl produit du métabolisme du citrate par plusieurs lactobacilles est capable d'inhiber des bactéries à Gram négatif.

D'après nos résultats les meilleures zones d'inhibition ont été observées pour la souche S1 à l'égard d'*E. coli* (10,33mm), pour la souche S2 à l'égard de *S. aureus* 1 (16,66 mm), et pour la souche S3 à l'égard de *S. aureus* 1 (14mm). Donc l'effet inhibiteur pour chaque souche de lactobacilles a été différent d'une souche cible à l'autre.

L'apparition de zones d'inhibition autour de certaines souches testées suggère une activité antibactérienne. Cependant, la nature exacte de cette inhibition n'a pas été déterminée dans notre étude. Elle pourrait être liée à la production de composés antimicrobiens, tels que des acides organiques (ex. acide lactique, acide acétique), ou des bactériocines ou une compétition nutritionnelle. Ainsi, plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de cette activité, et des analyses complémentaires seraient nécessaires pour en identifier précisément la cause.

III.2. Test des puits

Le test réalisé sur trois souches de lactobacilles (S1, S2 et S3) n'a pas montré de zones d'inhibition, même après trois répétitions et neutralisation du pH des surnageants (pH des surnageants natif 5,5). Cette absence d'effet inhibiteur peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Il est possible que les souches utilisées ne produisent pas de substances antimicrobiennes telles que les acides organiques, les bactériocines ou le peroxyde d'hydrogène, ou qu'elles en

produisent en quantité insuffisante pour exercer un effet visible. La neutralisation du surnageant, réalisée pour exclure l'influence du pH, pourrait également réduire, voire éliminer l'activité de certains composés antimicrobiens n'agissant qu'en conditions acides. D'autres facteurs liés aux conditions expérimentales, tels que le type de milieu utilisé, le temps d'incubation ou la concentration cellulaire, ainsi que la dilution des substances produites peuvent également influencer la détection de l'activité antibactérienne. Enfin, il est possible que les bactéries cibles utilisées pour le test soient naturellement résistantes aux composés produits par les souches testées. Ainsi, l'absence de zones d'inhibition ne signifie pas nécessairement que les souches ne sont pas intéressantes, mais qu'aucune activité antibactérienne n'a été détectée dans les conditions précises de cette expérience.

D'autres recherches ont cependant observé que certaines souches de *Lactobacillus* possédaient un potentiel antibactérien notable, avec des résultats tels que des zones d'inhibition observées contre des pathogènes comme *E. coli* et *S. aureus* tels que **Allouche et al., (2010)** et **Mami (2013)**.

IV. Etude de quelques propriétés probiotiques

IV.1. Effet de l'acidité gastrique

Les bactéries probiotiques doivent survivre au passage par l'estomac (**Marteau et Shanahan. 2003**). Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau XI annexe II et la figure 7**

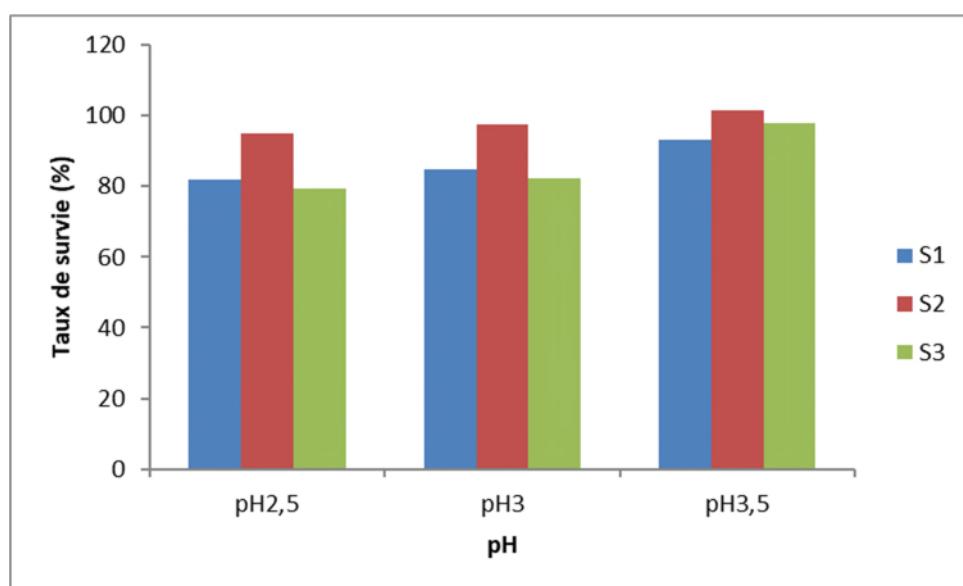


Figure7 : Taux de survie de trois souches de lactobacilles à différents pH.

L'analyse de l'histogramme montre que toutes les souches étudiées présentent une bonne résistance à l'acidité. À pH 2, qui correspond à une acidité très élevée, la viabilité reste

élevée avec 82,03 % pour S1, 95,11 % pour S2 et 79,32 % pour S3. Lorsque le pH est légèrement moins acide (pH 3), une augmentation de la viabilité est observée : 84,99 % pour S1, 97,67 % pour S2 et 82,14 % pour S3. Enfin, à pH 3,5, condition moins agressive, les souches ont montré leur meilleure tolérance avec des taux de 93,36 % pour S1, 101,64 % pour S2, et 88,06 % pour S3. La souche S2 se distingue nettement par sa forte capacité d'adaptation dans toutes les conditions acides testées, avec une viabilité supérieure à 95 % à tous les pH, ce qui témoigne de son potentiel en tant que souche probiotique. Les souches S1 et S3 conservent également une bonne tolérance, mais légèrement inférieure à celle de S2, notamment à pH 2. Ces résultats confirment que les trois souches sont capables de survivre dans des conditions acides, critère clé pour leur utilisation comme probiotiques.

Selon **Mishra et Prasad (2005)**, les bactéries probiotiques doivent rester viables au moment du passage au transit gastro-intestinal, et alors persister dans l'intestin afin de fournir des effets bénéfiques pour l'hôte. Selon ces auteurs, avant d'employer une souche probiotique il faut tester sa capacité de tolérer les conditions de l'appareil gastro-intestinal supérieur.

De même, **Millette et al. (2008)** ont aussi rapporté que les bactéries lactiques doivent survivre à l'environnement acide de l'estomac afin d'atteindre l'intestin.

IV.2. Effet des sels biliaires :

Comme les probiotiques sont généralement administrés par voie orale, leur capacité à survivre aux conditions difficiles du tractus gastro-intestinal est essentielle. Par conséquent, leur résistance à la présence de sels biliaires dans l'intestin grêle est un critère important pour la sélection des souches probiotique (**Olejnik et al., 2005**). Les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés dans le **Tableau XII annexeII et la figure 8**.

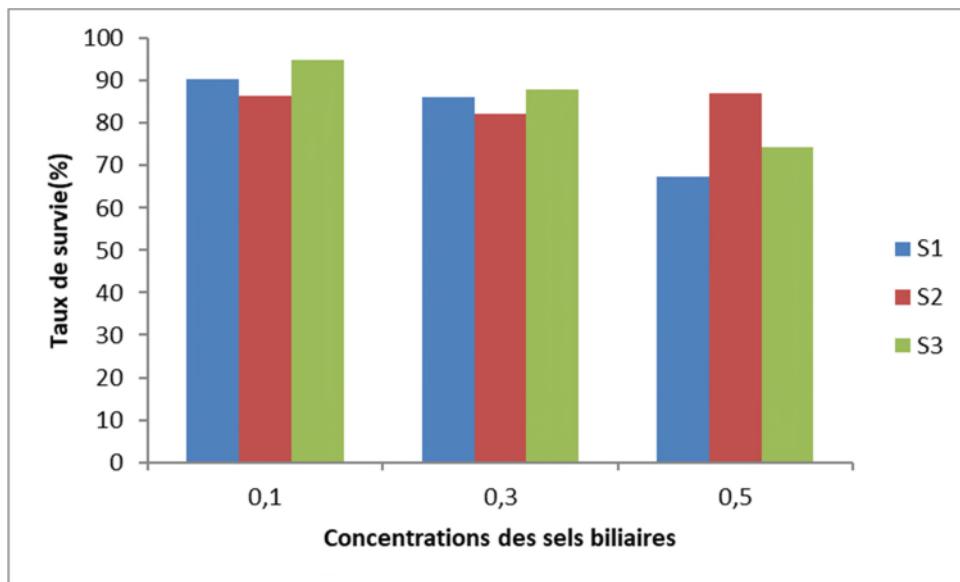


Figure 8: Taux de survie de trois souches de lactobacilles à différentes concentrations des sels biliaires.

A (0,1%), toutes les souches ont montré une forte viabilité, avec une valeur maximale de 94,94% pour la souche3.

A (0,3%), la viabilité des trois souches est maintenue, bien qu'une légère baisse soit observée, ce qui traduit une bonne résistance à une concentration modérée en sels biliaires.

A (0,5%) en sels biliaires, une différence notable entre les trois souches est observée ; la S2 maintient un taux de survie élevé de 87,06%, tandis que les souches S1 et S3 présentent une baisse plus marquée de viabilité, atteignant respectivement environ 67,34% et 74,42 %.

A la concentration de (0,1%) de sels biliaires, les trois souches étudiées ont montré une bonne tolérance, avec des taux de survie de 90,24%, 86,42% et 94,94% respectivement. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés avec **Bentahar et al. (2024)**, où les taux de survie variaient entre 89% et 97% pour différentes souches de *Lactobacillus*.

Les résultats obtenus sont similaires a ceux rapportés par **Anandharaj et al. (2015)**, où ils ont démontré que *Lb. crispatus GI9* isolé du concombre fermenté été résistante aux sels biliaires à (0,3) % avec 81,26%. Cependant les résultats rapportés par **Park et Lim (2015)**, sont légèrement supérieurs aux nôtres, avec des taux de survie allant jusqu'à 96 à 97,4% pour *Lb. plantarum*.

Song et al. (2015) et **Adour et al. (2016)** ont démontré la tolérance et la croissance de certaines souches de *Lactobacillus spp* testées sur du MRS supplémenté avec (0,3 %) de sels biliaires. Cependant, **Burns et al. (2008)** ont montré que la plupart des souches de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* et de *Lb. delbrueckii ssp. lactis* étaient sensibles aux sels biliaires.

Les résultats obtenus par **Bentahar et al. (2024)**, sont inférieurs aux nôtres, avec un taux de survie inférieur à 20% des souches de *Levilactobacillus brevis* (DC01-A), *Lactiplantibacillus plantarum* (DC04) et *Levilactobacillus brevis* (DC06).

La résistance aux sels biliaires est l'une des caractéristiques les plus importantes qui permet aux lactobacilles de maintenir leur viabilité et d'exercer leurs activités dans l'intestin grêle (**Hyronimus et al., 2000**).

La capacité des bactéries lactiques à survivre en présence de sels biliaires est considérée comme l'un des critères essentiels pour la sélection des probiotiques, car elle reflète leur aptitude à survivre et à se développer dans l'intestin grêle **Mulaw et al. (2019)**.

On peut conclure que les souches étudiées ont montré une bonne tolérance aux sels biliaires, ce qui pourrait refléter leur capacité d'adaptation.

IV.3. Résultats du test d'auto-agrégation des souches de lactobacilles

Le test d'auto-agrégation permet d'évaluer la capacité des cellules bactériennes à s'agréger entre elles au cours du temps. Cette propriété est considérée comme un critère important dans la sélection de souches probiotiques. Dans cette étude, trois souches ont été testées après 1h, 2h et 24h d'incubation. Les pourcentages d'auto-agrégation obtenus ont été représentés sous forme d'histogramme (**figure 9 et tableau XIII annexe II**). Afin de visualiser l'évolution de ce phénomène chez chaque souche.

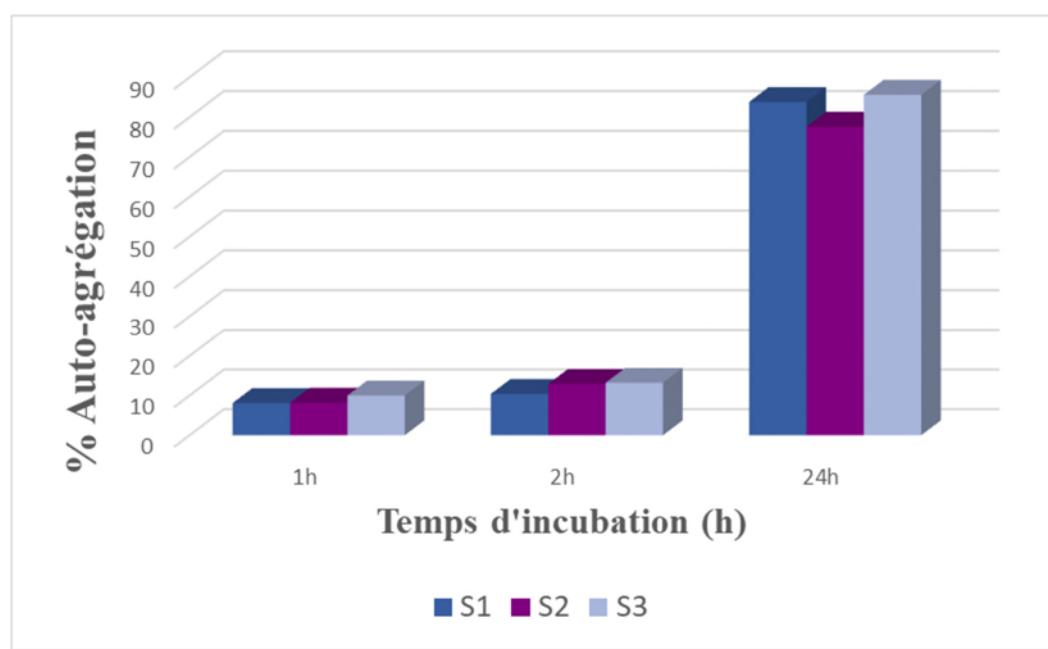


Figure 9 : Evolution du taux d'auto-agrégation (%) des trois souches testées.

Les résultats obtenus ont montré une augmentation progressive du pourcentage d'auto-agrégation au cours du temps pour l'ensemble des souches testées. La souche S1 a présenté une faible agrégation initiale à 1h (8 %), suivie d'une légère augmentation à 2h (10 %) et a atteint un taux élevé de 83 % à 24h, traduisant une bonne capacité d'agrégation après incubation prolongée. La souche S2 a montré une évolution similaire avec 8 % à 1h, 12,9 % à 2h et 77,6 % à 24h, indiquant également une bonne aptitude à s'agréger, bien que légèrement inférieure à celle des autres souches. Enfin, la souche S3 s'est distinguée par les meilleurs résultats, affichant dès 1h un taux de 10 %, qui a augmenté à 13 % à 2h et atteint 85 % à 24h.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Nivoliez et al. (2015)**, qui ont montré que le pourcentage d'auto-agrégation de *Lb. rhamnosus* Lcr35 était de (16%-31%) et (12%-21%), respectivement, après 3 et 5 h d'incubation à 37°C. Cependant, les résultats de **Liu et al. (2021)** sont supérieurs aux nôtres, atteignant 75,98% pour *Lb. brevis* et 86,12% pour *Lb. plantarum* après 6 h d'incubation à 37°C.

Selon **Khalil et al. (2018)**, la capacité d'auto-agrégation des bactéries lactiques est classée comme bonne si le pourcentage est supérieur à 40% et mauvaise s'il est inférieur à 10%. Selon les résultats de **Lin et al. (2007)**, la capacité des souches probiotiques à s'auto-agréger augmente après 20 à 24 heures d'incubation à 37 °C. Donc les souches étudiées sont classées parmi celles ayant une bonne capacité d'auto-agrégation.

Selon **Luang-In et al. (2021)**, une capacité d'agrégation élevée peut être classée comme un bon indicateur d'adhésion, qui permet la formation de liaisons entre les bactéries probiotiques, empêchant la colonisation d'agents pathogènes dans le tractus gastro-intestinal de l'hôte.

IV.4. Résultats du test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité de la surface cellulaire des bactéries a été déterminée par l'affinité de ces dernières au xylène. Les pourcentages d'hydrophobicité des souches lactiques étudiées sont présentés dans **la figure 10 et tableau XIV annexe II**

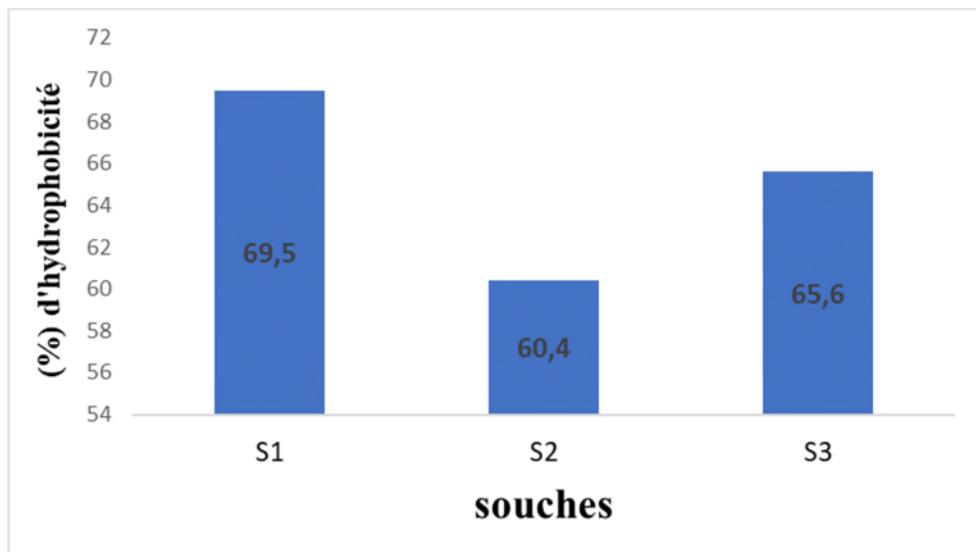


Figure 10 : Pourcentages d'hydrophobicité des souches lactiques étudiées.

Les résultats obtenus montrent des valeurs élevées d'hydrophobicité pour l'ensemble des souches testées, allant de 60,4 % à 69,5 %. La souche S1 a présenté la valeur la plus élevée, avec 69,5 %, indiquant une forte affinité pour les composés hydrophobes. La souche S3 arrive en seconde position avec 65,6 %, un résultat également très satisfaisant, montrant qu'elle possède aussi une bonne capacité d'interaction avec les cellules de l'hôte. Enfin, la souche S2 présente une hydrophobicité légèrement inférieure (60,4 %), mais qui reste dans une plage jugée intéressante sur le plan fonctionnel.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés par **Anwar et al. (2013)** à des pourcentages de 61,23% et 65,35% pour les souches *Lb. pentosus* et *Lb. rhamnosus* respectivement. D'autre part les résultats obtenus par **Handa et Sharma (2016)** et Ahmed et al. (2021) sont moins importants que les nôtres, où le pourcentage d'hydrophobicité au xylène était de 50,8% avec *Lb. plantarum* et 54% avec *Lactiplantibacillus plantarum* NPL1258 respectivement.

Les taux d'hydrophobicité au xylène observés (60,4 % à 69,5 %) sont comparables à ceux rapportés par **Bentahar et al. (2024)**, qui ont obtenu des valeurs comprises entre 61,13 % et 76,52 % pour des souches de *Levilactobacillus brevis* et *Lactiplantibacillus plantarum*. Cette proximité des résultats confirme la similarité des propriétés d'adhésion entre les différentes souches de lactobacilles étudiées.

Les bactéries sont hydrophobes si leur affinité pour le xylène est élevée ($A\% > 40$) (**Anwar et al., 2013**) et considérées comme hydrophiles si elle est faible ($A\% < 20$) (**Bellifa, 2014**). D'après (**Ekmekci et al., 2009**), l'hydrophobicité de *Lactobacillus sp* est classée en

trois groupes : hydrophobicité faible (0-35%), hydrophobicité modéré (36-70%), hydrophobicité forte (71-100%).

Selon l'étude de **Zeng et al. (2020)**, l'auto-agrégation forte présente une surface hydrophobe, tandis que l'auto-agrégation faible est due à une surface hydrophile. Les résultats obtenus permettent de conclure que les surfaces des souches S1, S2 et S3 sont hydrophobes.

L'hydrophobicité des surfaces bactériennes est une caractéristique importante pour le maintien des bactéries dans le tractus gastro-intestinal. Cette caractéristique est l'un des paramètres permettant l'adhésion des bactéries probiotiques à la muqueuse (**Çelik et Çelebioglu, 2021**). Selon **Luang-In et al. (2021)**, l'hydrophobicité de la surface cellulaire est liée à l'adhérence microbienne aux hydrocarbures.

Selon **Nakpheng et al. (2012)**, les lactobacilles possédant une surface cellulaire hydrophile, fortement chargée négativement, présentent une faible capacité d'adhésion, contrairement à ceux ayant une surface hydrophobe et une charge négative plus faible, qui montrent une forte adhérence. On en déduit que l'hydrophobicité élevée observée chez les souches (S1, S2 et S3) reflète une aptitude marquée à l'adhésion cellulaire, un critère déterminant dans l'évaluation de leur effet probiotique.

IV.5. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des souches lactobacilles isolées a été évaluée par la méthode de piégeage du radical DPPH. Le pourcentage d'inhibition reflète la capacité de la souche à neutraliser les radicaux libres. Les résultats obtenus pour les trois souches (S1, S2 et S3) sont représentés dans l'histogramme ci-dessous **Figure 11 et tableau XV annexe II**.

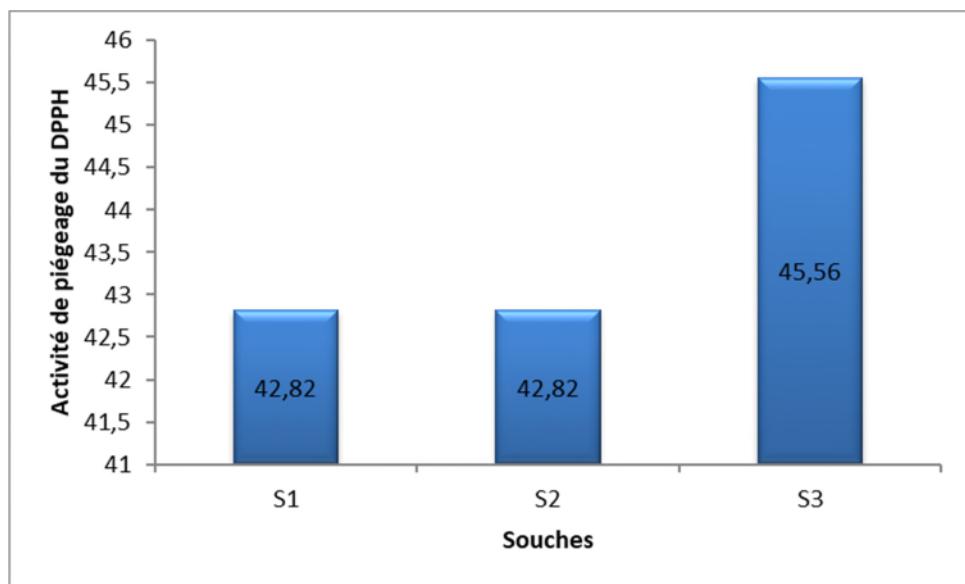


Figure 11 : Histogramme représentant l'activité antioxydante des trois souches étudiées (S1, S2 et S3).

Les résultats obtenus montrent que les trois souches testées présentent une activité antioxydante significative. Les souches S1 et S2 ont montré un pourcentage d'inhibition identique de 42,82 %, tandis que la souche S3 a affiché une valeur légèrement supérieure de 45,56 %. Cette capacité à piéger le radical DPPH indique que les souches sont capables de produire ou de libérer des substances antioxydantes dans le milieu.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par **Arasu et al. (2016)** qui ont rapporté un pourcentage de seulement 48,63 % pour la souche *Lb. brevis P68* isolée à partir de concombres marinés. Cependant, les résultats obtenus par **Bentahar et al. (2024)**, avec des valeurs allant de 56,6% à 68,56% qui sont supérieure aux nôtres.

IV.6. Activité acidifiante

L'activité acidifiante est un critère technologique important pour les souches de lactobacilles. Elle permet d'évaluer la capacité des souches à produire des acides organiques, principalement de l'acide lactique. Cette acidification progressive entraîne une diminution du pH et une augmentation de l'acidité titrable, mesurée ici par la méthode de Dornic. Cette activité a été suivie au cours du temps (T0, 3 h, 6 h et 24 h) pour trois souches lactiques (S1, S2 et S3) cultivées dans du lait écrémé. Les résultats ont été représentés sous forme d'un graphe (**figure 12 et tableau XVI annexe II**), mettant en évidence l'évolution du pH et de l'acidité Dornic pour chaque souche.

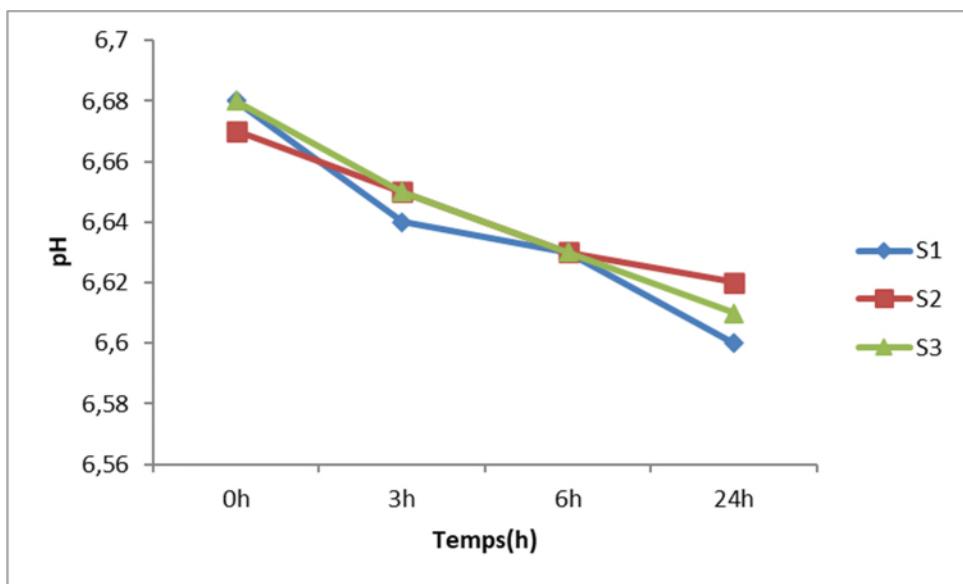


Figure 12: Variation du pH en fonction du temps des souches (S1, S2 et S3).

L'évolution du pH au cours du temps montre une légère diminution chez les trois souches lactiques. Pour la souche S1, le pH est passé de 6,68 à T0 à 6,60 après 24 heures d'incubation. La souche S2 a présenté une baisse modérée, allant de 6,67 à 6,62, tandis que pour la souche S3, le pH a diminué de 6,68 à 6,61. Ces variations restent très faibles, indiquant une activité acidifiante limitée.

Selon **Lairini et al. (2014)**, les bactéries lactiques provoquent une diminution du pH du lait de 6,5 à 4,2 après 24 heures de fermentation.

Dans notre étude, les souches testées ont montré une faible activité acidifiante, avec une diminution du pH comprise entre 6,66 et 6,60 après 24 h d'incubation dans du lait écrémé. En comparaison, l'étude de **Kološta et al. (2014)** a montré une forte acidification du lait stérile par *Lb. plantarum* 1812, avec une diminution du pH de 6,59 à 5,25 pendant la même période.

Hassaïne et al. (2008). Ont également mentionné que la diminution du pH au cours du processus de fermentation joue un rôle essentiel dans les industries alimentaires. En effet, elle favorise la coagulation du lait, conférant au produit une saveur et un arôme particuliers, tout en agissant comme un inhibiteur de la prolifération des bactéries pathogènes.

L'évolution de l'acidité Dornic est présentée sur la **figure 13, tableau XVI annexe II**.

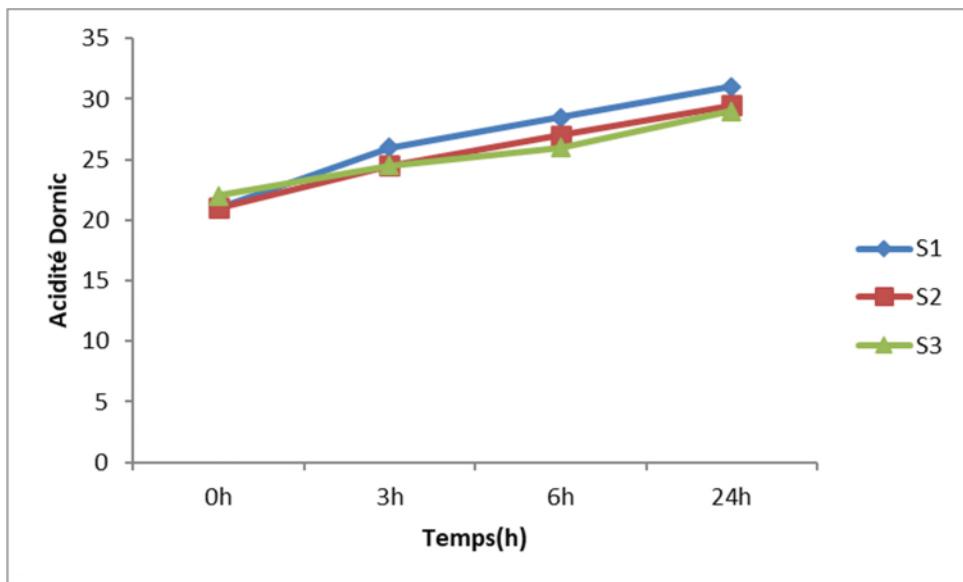


Figure 13 : Variation du l'acidité Dornic en fonction du temps des souches (S1, S2 et S3).

En ce qui concerne l'acidité titrable, exprimée en degrés Dornic, une augmentation progressive a été observée pour les trois souches au cours de l'incubation. La souche S1 est passée de 24°D à 30°D, la souche S2 de 24°D à 29,5°D, et la souche S3 de 22°D à 29°D, après 24 heures. Cette évolution traduit une certaine production d'acides organiques. Toutefois, l'augmentation reste modérée par rapport aux valeurs généralement rapportées pour des souches à fort pouvoir acidifiant. Ces résultats suggèrent que les souches étudiées possèdent une activité acidifiante relativement faible, ce qui pourrait limiter leur intérêt technologique dans les fermentations rapides, bien qu'elles puissent conserver un potentiel probiotique intéressant dans d'autres contextes.

Selon **Boulouf (2016)**, les lactobacilles possèdent un pouvoir acidifiant important avec un degré d'acidité, qui varie de 40°D à 67°D après 24h d'incubation à 37°C. Toutes les espèces du genre *Lactobacillus* testées, présentent une production progressive en acide lactique, cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

Une étude de **Maghnia (2011)**, a montré un pouvoir acidifiant important des souches de lactobacilles à 59°D et un pH de 3,99, après une incubation à 37°C pendant 24 h. D'après les études rapportées dans la littérature, nos souches ne présentent pas un pouvoir acidifiant important. L'augmentation de l'acidité titrable reste modérée, avec des valeurs allant de 21 à 30 °D selon la souche, ce qui reste inférieur aux seuils généralement observés chez les souches fortement acidifiantes.

CONCLUSION

Dans le cadre de ce travail, l'objectif a été d'évaluer l'activité antibactérienne et quelques propriétés probiotiques des souches de lactobacille (S1, S2 et S3) d'origine alimentaires.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a révélé que certaines souches présentaient un effet inhibiteur notable contre plusieurs souches pathogènes, ce qui a été mis en évidence par le test des spots. En revanche, le test des puits n'a montré aucune zone d'inhibition, malgré plusieurs répétitions, ce qui suggère que les substances antimicrobiennes potentiellement produites ne sont pas diffusibles ou stables dans les conditions de ce test.

Concernant les propriétés probiotiques, les souches ont montré une bonne tolérance à l'acidité gastrique et aux sels biliaires, ce qui est un critère fondamental pour la survie dans le tractus gastro-intestinal. De plus, elles ont affiché une capacité d'auto-agrégation satisfaisante après 24 heures, ainsi qu'un degré d'hydrophobicité élevé (entre 60 et 69 %), suggérant une aptitude à adhérer aux cellules intestinales. Cependant, l'activité antioxydante mesurée par le test DPPH s'est avérée modérée, et l'activité acidifiante de nos souches était faible, indiquant une faible production d'acide lactique au cours de la fermentation.

En conclusion, bien que nos souches présentent une activité acidifiante limitée et une activité antioxydante modérée, elles possèdent néanmoins des propriétés intéressantes en termes d'activité antibactérienne, de tolérance aux conditions gastro-intestinales et de potentiel d'adhésion. Cela justifie des recherches plus approfondies, notamment par des analyses moléculaires, afin de mieux caractériser leur potentiel probiotique et leur sécurité d'utilisation.

Les résultats de notre étude permettant d'ouvrir de nouvelles perspectives, pour compléter ce travail, nous proposons :

- Procéder à une identification moléculaire (par séquençage de l'ARN 16S) des souches lactiques utilisées, afin de déterminer avec précision leurs espèces et confirmer leur appartenance au genre *Lactobacillus*.
- Réaliser une extraction et caractérisation des substances antimicrobiennes (acides organiques, bactériocines, peroxyde d'hydrogène...) pour expliquer l'absence d'effet dans le test des puits et mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

- Étudier la possibilité d'améliorer l'activité acidifiante et antioxydante des souches par l'optimisation des conditions de culture ou en les combinant avec d'autres souches plus performantes.
- Tester l'incorporation des souches dans des matrices alimentaires (yaourts, jus fermentés, etc.) pour évaluer leur stabilité, efficacité et potentiel comme probiotiques dans l'industrie agroalimentaire.
- Évaluer l'innocuité (sécurité d'utilisation) des souches avant toute application industrielle ou thérapeutique.
- Répéter le test des puits en améliorant la méthode, par exemple en utilisant le surnageant concentré.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams MR, Moss MO. (2000)**. Food Microbiology. Second Edition, the Royal Society of Biochem.
- Aiba Y, Suzuki N, Kabir AM, Takagi A, & Koga Y. (1998)**. Lactic acid-mediated suppression of Helicobacter pylori by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a Probiotics in a gnotobiotic murine model. American Journal of Gastroenterology, 93(11), 2097-2101.
- Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, & Helander IM. (2000)**. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. Applied and Environmental Microbiology. 66(5), 2001-2005.
- Alegria A, Delgado S, Roces C, Lopez B& Mayo B.(2010)**. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. International Journal of Food Microbiology, 143, p61-66.
- Aljohani A , Rashwan N, Vasani S, Alkhwashki A , Wu TT , Lu X, Castillo D & Xiao J.(2024)**. The health benefits of probiotic *Lactiplantibacillus plantarum*: A systematic Review and Meta-Analysis. Probiotics and Antimicrobial Proteins.10, 1007/ S 12602- 0, 24-10287-3.
- Allouche FN, Hellal A, Laraba A. (2010)**. Etude de l'activité antimicrobienne des Souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. Nature et Technologie. 3, 13-20.
- Al-Tawaha R & Meng C. (2018)**. Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. Advances in Environmental Biology, 12, 16-27.
- Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. (2006)**. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control. 17,454–461.
- Anandharaj M, Sivasankari B, Santhanakaruppu R, Manimaran M, Rani R P & Sivakumar S. (2015)**. Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. Research in Microbiology, 166(5), 428–439.
- Arasu M V, Al-dhabi N A, Ilavenil S, Choi K C, Srivopalram S. (2015)**. In-vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field, Saudi Journal of Biological sciences 23(1), 6-10.

- Axelsson L. (2004).** Lactic Acid Bacteria: Clasification and physiology. In Lactic acid bacteria, Microbiological and Functional Aspect. Third Edition . Marcel Dekker, New York, 1-66.
- Badis A, Guetarni D, Kihal M, Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales « Arabia et Kabyle » Science and technologie ,23 : 30-37p.
- Belhadj H , Harzallah D , Khennouf S , Dahamna S , Bouharati S & Baghiani A. (2010).** Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from Algerian honeybee collected pollen. Acta Horticulturae, 854, 51–58.
- Bentahar M C, Benabdelmoumene Dj, Véronique R, Dahmouni S, Qadi W S M, Bengharbi Z, Langella P, Bouasria B, AL-Olayn E, Dawoud E A D , & Mediani A.(2024).** Evaluation of Probiotic Potential and Functional Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Dhan, Traditional Algerian Goat Milk Butter, 13, 3781.
- Boulouf A. (2016).** Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel « BOUHEZZA », Master, université de Constantine, 55 -71p.
- Burns P, Vinderola G, Binetti A, Quibroni A, de los Reyes-Gavilán C G & Reinheimer J A. (2008).** Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy Lactobacilli. International Dairy Journal, 18(4), 377–385.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. (2001).** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int J Food Microbiol. 71, 1–20.
- Cocolin L, Manzano M, Aggio D, Cantoni C & Comi G. (2007).** Study of the ecology of high- pressure-treated Italian cooked ham by PCR-DGGE analysis. Applied and Environmental Microbiology .73(3), 1977- 1980.
- Corsetti A, Gobetti M, Rossi J& Daminiani P (1998)** Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of mixture of organic acids by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. Appl Microbiol Biotechnol 50:253–256.
- Cotter PD, Hill C& Ross RP. (2005).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology.3 (10), 777-788.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. J. App. Bacterial. 23 (1), 130-135.
- 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 » 3, 318-323.

Références bibliographiques

- Desmazeaud M, Cogan TM. (1996).** Les bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. Paris : Lavoisier, Tec & Doc.
- Dortu C & Thonart PH. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 13(1), 349-356.
- Ennahar S, Aoude-Werner D, Assobhei O, Hasselman C. (1998).** Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by Enterococcus faecium WHE 81 isolated from cheese. Journal of Applied Microbiology. 85, 521-526.
- FAO/OMS. (2001).** Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Working Group Report. Cordoba, Argentina.
- Federighi M, Magras C, Pilet M F.** (2005). Bactériologie alimentaire: compendium d'hygiène des aliments. 2 ème édition. Paris : 220 p.
- Fleming HP, Erchells JL & Caslilow RN. (1975).** Microbiol inhibition of isolate Pediococcus from cucumber bune . Appl.Environ .Microbiol.30, 1040- 1042.
- Garcia Cano I, Rocha-Mendoza D, Ortega-Anaya J, Wang K, Kosmerl E& Jiménez-Flores R. (2019).** Applications of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria in dairy products. Foods, 8(12):522.
- Gratia A. (1925).** Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. Comptes Rendus de la Société de Biologie, 93, 1040–1042.
- Guirand JP.(2003).** Microbiologie alimentaire. Nouvelle Ed. DUNOD (Paris, France). I
- Guiraud JP, Rosec JP. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR : 241 p
- Heita LN & Cheikhyousef A. (2014).** Dominant Lactic Acid Bacteria and Their Antimicrobial Profile from Three Fermented Milk Products from Northern Namibia. Journal of Biosciences and Medicines.2, 8-13.
- Hyronimus B, Le Marrec C, Hadj Sassi A, & Deschamps A. (2000).** Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 61(2–3), 193–197.
- Ito A, Sato Y, Kudo S, Sato S, Nakajima H, Toba T .(2003).** The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychotropic food-borne pathogens. Curr Microbiol. 47,231–236

- Jack RW, Tagg JR & Ray B. (1995).** Bacteriocin of Gram positive bacteria. *Microbial Rev.* 59, 171–200.
- Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, & Das G. (2018).** Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 26(3), p927-939.
- Khalil E S, Manap M Y, Mustafa S , Amid M, Alhelli A M & Aljoubori A. (2018).** Probiotic characteristics of exopolysaccharides-producing Lactobacillus isolated from some traditional Malaysian fermented foods. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), p287-298.
- Khuntia A, Chaudhary LC. (2012).** Lactobacillus plantarum effects on silage fermentation and in vitro rumen microbial growth. *Animal Feed Science and Technology*. ; 175(1–2):85–92.
- Kim K T, Yang S J, Paik H D. (2021).** Probiotic properties of novel probiotic Levilactobacillus brevis KU15147 isolated from radish kimchi and its antioxidant and immune-enhancing activities. *Food Sci. Biotechnol.*, 30, 257–265.
- Klaenhammer TR. (1988).** Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie*.70, 337 –349.
- Lagha A, Haas B, Gottschalk M & Grenier D. (2017).** Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary Research*, 48, 22.
- Lairini S, Beqqali N, Bouslamti R, Bekhou R, Zerrouq F, (2014).** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels marocains et formulation d'un lait fermenté proche de kefir, Maroc, 272p.
- Lin W H , Yu B , Jang S. H , & Tsen H. Y. (2007).** Different probiotic properties for Lactobacillus fermentum strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, 13(3-4), p107-113.
- Liu C, Xue W J, Ding H, An C, & Ma S J. (2021).** Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from fermented vegetables in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology*, p 4168.
- Luang In V Saengha W, Karirat T, Deeseenthum S , Buranrat B , Nudmamud Thanoi S, ...& Narbad A. (2021).** Attributs probiotiques, capacité de production de GABA et effets cytotoxiques des microbes isolés des aliments fermentés thaïlandais. *International Journal of Agriculture And Biology*, 25 (2), p409-419.
- Maghnia D. (2011).** Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels algériens, Magister, Université d'Oran, 126p.
- Martiz R M, Kumari VB C, Huligere S S , Khan M S ,Alafaleq N O ,Ahmad S Akhter F, Sreepathi N P A , Ramu R.(2023).** Inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes by a potential probiotic Levilactobacillus brevis RAMULAB49 isolated from fermented Ananas comosus. *Front. Microbiol.* 14, 1190105.

- Matilla-Sandholm T, Mättö J, Saarela M. (1999)** LAB with health claim interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy.J.* 9, 25–35.
- Midassirou B, Mahdhi A, Chaieb K, Bakhrouf A. (2012)**. Recherche de bactéries lactiques et étude in vitro de leurs propriétés probiotiques. *Rev. Microbial. Ind. San et Environn.* 147-163.
- Mishra V & Prasad D N. (2005)**. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 109–115.
- Mokoena MP. (2017)**. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255
- Nair MS, Amalaradjou MA, & Venkitanarayanan K. (2017)**. Anti-virulence properties of probiotics in combating microbial pathogenesis. *Advances in applied microbiology*, 98, 1-29.
- Nivoliez A, Veissiere P, Alaterre E, Dausset C, Baptiste F, Camarès O, . . . & Bornes S. (2015)**. Influence of manufacturing processes on cell surface properties of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, p3993411.
- O'Sullivan L, Ross RP & Hill C. (2002)**. Potential Of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84, 593-604.
- Ouwehand AC. (1998)**. In: Salminen S, von Wright A (eds) *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 2nd edn. Marcel Dekker, New York.
- Papadimitriou K, Alegria A, Bron A, de Angelis M, Gobbetti M, Kleerebezem M, Lemos J A, Linares DM, Ross P, Stanton C, Turroni F, Van Sinderen D, Varmanen P, Ventura M, Zuniga M, Tsakalidou E, & Kok J. (2016)**. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 80(3), 8373890.
- Park S Y & Lim S D. (2015)**. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* FH185 isolated from human feces. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(5), 615–621.
- Pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 405-440.
- Pineiro M, & Stanton C. (2007)**. Probiotic bacteria: legislative framework—requirements to evidence basis. *Journal of Nutrition*, 137(3 Suppl 2), 850S–853S.
- Plockova M, Stiles J, Chumchalova J, Halfarova R. (2001)**. Control of mould growth by *Lactobacillus rhamnosus* VT1 and *Lactobacillus reuteri* CCM 3625 on milk agar plates. *Czech J Food Sci* 19:46–50.

- Prescott LM, Harley JP et Klein DA. (2003).** Les bactéries lactiques : les Gram –positif pauvres en GC. Dans : microbiologie, 2eme éd. Française. Prescott, L.M., M-P Harley, D.A.Klein (eds). De Book Université, Bruxelles, Belgique.5-535.
- Ramos C L, Thorsen L, Schwan R F, Jespersen L (2013).** Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol.* 36, 22–29.
- Ren D, Zhu J, Gong S, Liu, H, & Yu H. (2018).** Antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria isolated international, 2018. From homemade fermented foods. *Bio Med research.*
- Rodrigues E, Tomillo J, Nunez M, Medina M. (1997)** .Combined effect of Bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lacto peroxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated milk. *J Appl Environ Microbiol* 83,389–395.
- Salvetti E, Torriani S, & Felis GE. (2012).** the genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 4(4), 217-226.
- Savadogo A & Traore AS. (2011).** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(5), 2057-2075.
SBN. 696p.
- Servin AL.** (2004). Antagonistic activity of lactobacilli and bifidobacteria against microbial
- Shah AB, Baiseitova A, Zahoor M, Ahmad I, Ikram M, Bakhsh A, Shah MA, Ali I, Idress M, Ullah R, Nasr FA & Al-Zharani Mohammed.(2024).** Importance probiotique des souches de *Lactobacillus*: examen complet des effets sur la santé, des lacunes de la recherche et des perspectives d’avenir.16p.
- Shim Y H, Lee S J & Lee J W. (2016).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains against uropathogens. *Pediatrics International*, 58(10), 1009–1013.
- Siegmundt H, Rechinger KB & Jakobsen M. (2000).** Dynamic Changes of Intracellular pH in Individual Lactic Acid Bacterium Cells in Response to a Rapid Drop in Extracellular pH 66(6)2330–2335.
- Singh K & Rao A.(2021).**probiotics : a potential immunomodulator in COVID-19 infection management. *Nutrition research*, 87, 1_12.
- Singh S, Goswami P, Singh R & Heller K J. (2009).** Application of molecular identification tools for *Lactobacillus* with a focus on discrimination between closely related species. *LWT - Food Science and Technology*. 42, 448-457.

- Song M, Park S , Lee H , Min B, Jung S , Kim E , & Oh S. (2015).** Effect of Lactobacillus acidophilus NS1 on plasma cholesterol levels in diet-induced obese mice. Journal of Dairy Science, 98(3), 1492–1501.
- Stiles ME, Holzapfel WH. (1997).** Review article lactic acid bacteria of foods and current tax.
- Šušković J, Kos B, Beganović J, Leboš Pavunc A, Habjanič K, & Matošić S. (2010).** Antimicrobial activity—the most important property of Probiotics and starter lactic acid bacteria. Food Technology and Biotechnology, 48(3), 296-307.
- Tailliez P (2000).** Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliard d'année. Lait. 81,1-11.
- Tailliez P. (2004).** Les lactobacilles : propriétés, habitat, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. Antibiotiques. 6(1), 35-41.
- Tejero-Sarinena S, Barlow S J, Costabile A, Gibson G R, & Rowland I. (2012).** In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. Anaerobe. 18(5), 530–538.
- Wong HC & Chen YL.(1988).** Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. Appl.environ. microbial. 54:2176-2184.
- Yan F, Polk DB. (2011) .** Probiotics and immune health. Curr Opin Gastroenterol.27 (6):496–501.
- Zeng Y, Li Y, Wu Q P , Zhang J M, Xie X Q , Ding Y, & Wang J. (2020).** Evaluation of the Antibacterial Activity and Probiotic Potential of Lactobacillus plantarum Isolated from Chinese Homemade Pickles. Canadia Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, p1-11.
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG & Lebeer S. (2020).** A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 70, 2782-2858.

ANNEXES

Annexe I**Composition des milieux de culture****Tableau I : Bouillon et gélose MRS (pH 6,5)**

Composition	Quantité (g/l)
Dextrose	20
Protéine de pentose	10
Extrait de bœuf	10
Extrait de levure	5
Acétate de sodium	5
Citrate d'ammonium	2
Dipotassium phosphate	2
Tween 80	1
Sulfate de magnésium	0,1
Sulfate de manganèse	0,05
Eau distillée	1L

Tableau II : Bouillon gélose nutritive (pH7, 4) (TM MEDIA)

Composition	Quantité (g/l)
Agar	15
Peptone	5
Chlorure de sodium	5
Extrait de bœuf	1,5
Extrait le levure	1,5
Eau distillée	1L

Tableau III: Mueller-Hinton (pH 7,3) (Alliance BIO EXPERTISE)

Composition	Quantité (g/l)
Peptone	17,5
Extrait sec d'infusion de bœuf	2
Amidon	1,5
Agar	17
Eau distillée	1L

Tableau IV: Gélose EMB (7,2) (TM MEDIA)

Composition	Quantité (g/l)
Agar	13,5
Peptone	10
Lactose	5
Saccharose	5
Phosphate dipotassique	2
Éosine Y	0,4
Bleu de méthylène	0,065
Eau distillée	1L

Tableau V : Gélose Chapman (pH7,4) (TM MEDIA)

Composition	Quantité (g/l)
D-mannitol	10
Chlorure de sodium	75
Digestat peptique de tissu animal	5
Digestat pancréatique de caséine	5
Extrait de bœuf	1
Rouge de Phénol	0,025
Agar	15
Eau distillée	1L

Composition des solutions**Tableau VI : Eau physiologique**

Composition	Quantité (g/l)
Chlorure de sodium (NaCl)	9
Eau distillée	1

Tableau VII : Solution PBS (pH 7,4)

Composition	Quantité (g/l)
Chlorure de sodium	8
Chlorure de potassium (KCl)	0,20
Phosphate disodique	1,44
Phosphate	0,24
Eau distillée	1L

Annexe II : Résultats**Tableau IX : Résultats des diamètres des ZI (mm) obtenues par le test des spots à l'égard de S.aureus1, S.aureus2 et E. coli**

souches pathogènes souches lactiques	S.aureus1	S.aureus2	E. coli

Essais	1	2	3	Moyenne	1	2	3	Moyenne	1	2	3	Moyenne
S1	0	0	0	0	10	0	0	3,33	15	0	16	10,33
S2	17	0	33	16,66	20	0	0	6,66	18	0	0	6
S3	0	0	42	14	14	0	0	4,33	16	0	10	8,66

Tableau X : Résultats des diamètres des ZI (mm) obtenues par le test des spots à l'égard de *K.pneumoniae*, *E.faecalis*, *P.aeruginosa*

souches pathogènes souches lactiques	K.pneumoniae				E.faecalis				P.aeruginosa			
	1	2	3	Moyenne	1	2	3	Moyenne	1	2	3	Moyenne
Essais	1	2	3	Moyenne	1	2	3	Moyenne	1	2	3	Moyenne
S1	16	0	0	5,33	12	0	0	4	0	0	0	0
S2	0	0	11	3,66	11	0	0	3,66	0	0	0	0
S3	17	0	0	5,66	0	0	17	6	0	0	0	0

Tableau XI : Moyennes de taux de survie de trois souches de lactobacilles à différents pH

Souche s	pH2, 5			pH3			pH3, 5		
Essais	Essai 1	Essai 2	Moyenn e	Essai 1	Essai 2	Moyenn e	Essai 1	Essai 2	Moyenn e
S1	77	87,06	82,03	77	92,93	84,96	95	91	93,36
S2	91	99,23	95,11	105	90,,35	97,67	116	87	101,64
S3	64	94,64	79,32	73	91,29	82,14	99	97,12	98,06

Tableau XII : Moyenne de taux de survie de trois souches de lactobacilles à différentes concentrations des sels biliaires

Souche s	0,1%			0 ,3%			0,5%		
Essais	Essai1	Essai 2	Moyenn e	Essai 1	Essai 2	Moyenn e	Essai 1	Essai 2	Moyenn e
S1	84,72	95,77	90,24	78,81	93,33	86,07	68,96	65,72	67,34
S2	76,26	96,58	86,42	69,59	94,54	82,06	76,26	97,87	87,06
S3	101,69	88,20	94,94	79,92	96,22	88,07	49,95	98,89	74,42

Tableau XIII : Moyennes de % d'auto-agrégration des trois souches de lactobacilles

Souches	1h			2h			24h			
Essais	1	2	Moyenne	1	2	Moyenne	1	2	3	Moyenne
S1	7,71	8,49	8,1	9,39	11,59	10,4	76	86	89	83,8
S2	6,21	10,20	8,2	9,24	16,66	12,9	57	87	88	77,6
S3	11,64	8,68	10	12,17	14,23	13,2	73	92	91	85,6

Tableau XIV: Moyennes de % d'hydrophobicité des trois souches de lactobacilles

Souches		Xylène		
Essais	1	2	Moyenne	
S1	69,5	69,5	69,5	
S2	59,01	61,82	60,41	
S3	67,88	63,40	65,64	

Tableau XV : Résultats du test activité antioxydante

S1	42,82%
S2	42,82
S3	45,56

Tableau XVI : Résultats du test activité acidifiante

pH

Souch es	0h			3h			6h			24h		
	Essais	1	2	Moyen ne	1	2	Moyen ne	1	2	Moyen ne	1	2
S1	6,6 3	6,7 3	6,68	6,6 0	6,6 8	6,64	6,5 9	6,6 7	6,63	6,5 7	6,6 4	6,60
S2	6,6 4	6,7 1	6,67	6,6 2	6,6 8	6,65	6,6 0	6,6 7	6,63	6,5 8	6,6 6	6,62
S3	6,6 3	6,7 3	6,68	6,6 1	6,6 9	6,65	6,6 0	6,6 7	6,63	6,5 8	6,6 4	6,61

Acidité Dornic

Souches	0h			3h			6h			24h		
	Essais	1	2	Moyenne	1	2	Moyenne	1	2	Moyenne	1	2
S1	21	21	21	27	25	26	29	28	28,5	32	30	31
S2	21	21	21	23	26	24,5	26	28	27	28	31	29,5
S3	24	20	22	26	23	24,5	27	25	26	30	28	29

Résumé

Ce travail a porté sur l'évaluation de l'activité antibactérienne et de certaines propriétés probiotiques de souches de lactobacille d'origine alimentaire.

Les tests réalisés ont permis de mettre en évidence des capacités variables selon les souches. Le test des spots a montré une inhibition Claire vis-à-vis de certaines bactéries pathogènes, alors que le test des puits n'a révélé aucune zone d'inhibition. Les souches ont présenté une activité antioxydante modérée, ainsi qu'une résistance acceptable à l'acidité gastrique et aux sels biliaires, critères importants pour la survie dans le tractus digestif. L'activité acidifiante a été jugée faible, ce qui pourrait limiter leur utilisation technologique dans certains produits fermentés. Par ailleurs, les résultats des tests d'hydrophobicité et d'auto-agrégation suggèrent un potentiel d'adhésion cellulaire variable. Globalement, les résultats obtenus permettant de considérer certains souches comme des candidats intéressantes pour un usage probiotiques, en dépit de quelques limites observées.

Mots clés: lactobacilles, activités antibacérienne, propriétés probiotiques, souches pathogènes, résistance.

Abstract:

This study focused on evaluating the antibacterial activity and certain probiotic properties of lactobacilli of food origin.

Various tests revealed variable capabilities among the strains. The spot test showed clear inhibition against some pathogenic bacteria, while the well diffusion test showed no visible inhibition zones. The strains exhibited moderate antioxidant activity and acceptable resistance to gastric acidity and bile salts, which are essential traits for survival in the gastrointestinal tract. The acidifying activity was relatively weak, possibly limiting their technological use in fermented products. Additionally, hydrophobicity and auto-aggregation tests indicated variable adhesion potential. Overall, some strains appear to be promising probiotic candidates, despite certain limitations.

Keywords: Lactobacilli, antibacterial activity, probiotic properties, pathogenic strains, resistance.