

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



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

MASTER

Thème

**Sélection de souches de bactéries lactiques
isolées de l'ben traditionnel à propriétés
probiotiques**

Présenté par :

BENMEZIANE Assia & BENNAI Lamia

Soutenu le : **15 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

Mme. BENACHOUR.K

MAA

Président

Mme. FARADJIS

MCB

Encadreur

Mme. SAIDANI.K

MAA

Examineur

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Avant tous nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné la santé, le courage, la volonté et la patience de réaliser ce travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre enseignante et promotrice Madame Faradji .S d'avoir accepté de nous encadrer, pour l'aide compétente qu'elle nous a apportée, pour sa confiance, son encouragement et son œil critique qui nous a été très précieux pour améliorer la qualité de notre mémoire. L'apport de ses sincères soutiens ne s'est pas limité au cadre formel du travail, mais a été une grande source de motivation pour continuer et accomplir ce travail. Veuillez trouver ici madame l'expression de nos sincères reconnaissances.

Nos remerciements les plus vifs vont à notre enseignante Madame Benachour.K d'avoir consacré son précieux temps à juger ce manuscrit en présidant le jury.

Nous tenons à présenter toute notre gratitude envers Madame Saidani.K pour son dévouement afin d'estimer ce travail, elle a tout notre respect pour cela.

Nos remerciements s'adressent également à monsieur Bendjeddou.K pour son aide, ces conseils, et ces orientations.

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

Dédicaces

*Au nom de Dieu le tous puissant, celui qui ma donné vie et qui m'a permis d'apprendre et
d'acquérir ce savoir, je dédie ce modeste travail à :*

La mémoire de mes très chers grands parents qui auraient été fière de ma réussite.

Allah yerhamhoume Inchallah

Mes chères grandes mères, yema et yema Bouha que j'aime beaucoup

Que dieu les offrent santé, bonheur et une longue vie Inchallah,

Mes chers adorables parents qui ont été toujours à mes cotés et qui m'ont servi d'exemple

J'espère que je serais à la hauteur de vos espérances

Que dieu vous protège et vous garde pour moi Inchallah

*Mon cher mari Farid pour sa compréhension et son aide précieuse surtout dans les moments
difficiles*

Merci de m'avoir encouragé, entouré et motivé

Que dieu nous garde ensemble Inchallah

Mes oncles et tantes.

Mes cousins et cousines.

Toute la famille Benmeziane, Behria et ma belle famille Guebrilli

*Tous mes amis(es) et copines de chambres sans exception (Karima Zahwa Zakia et Zozo) à
qui je souhaite une vie pleine de joie, bonheur et santé*

Ma binôme et chère amie lamia

Tous mes collègues d'études

A toutes les personnes qui ont de près ou de loin m'ont apporté leur aide.

ASSIA BENMEZIANE

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes très chers parents. Que dieu les garde pour moi.

A mes deux sœurs Hassina et Samira, mes frères Nourdine, Yazid, Abdelgani et Khalef.

A mes neveux et nièces.

A mes cousines et cousins

Sans oublier ma chère binôme : Assia

A mes amis(es)

A tous les étudiants de la promotion Microbiologie Alimentaire Santé 2015/2016.

Et à tous ceux qui me sont chers.

Lamia BENNAI

Sommaire

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Partie I : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les bactéries lactiques3

2. Historique de la définition des probiotiques.....4

3. Principales espèces de bactéries lactiques à potentiel probiotique.....4

4. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques.....7

4.1. Critère de sécurité8

4.1.1. Sensibilité aux antibiotiques.....8

4.2. Critères fonctionnels.....8

4.2.1. Production des substances antimicrobiennes.....8

4.2.2. Résistance à l'acidité gastrique.....11

4.2.3. Résistance aux sels biliaires11

4.2.4. Adhésion aux cellules épithéliales.....11

5. effets bénéfiques des probiotiques sur la santé12

Partie II : Partie pratique

Chapitre1: Matériel et méthode

1. Souches utilisées.....13

1.1. Bactéries lactiques13

1.2. Bactéries pathogènes.....13

2. Revivification et vérification de la pureté des souches de bactéries lactiques
et pathogènes.....14

2. 1.Revivification des souches.....14

2.2. Vérification de la pureté des souches15

3. Standardisation de l'inoculum15

4. Etude de quelques critères probiotiques de la flore lactique de l'ben.....	15
4.1. Sélection de souches de bactéries lactiques douées d'activité antibactérienne.....	15
4.1.1. Test de spots	16
4.1.2. Test de puits.....	16
4.1.2.1. Traitement des surnageants natifs avec des protéases.....	17
4.2. Étude de la résistance aux antibiotiques	17
4.3. Etude du pouvoir hémolytique.....	18
4.4. Evaluation de la croissance bactérienne dans les conditions simulées de tractus- gastro- intestinal	18
4.4.1. Effet du pH sur la croissance bactérienne.....	18
4.4.2. Effet de la pepsine sur la croissance bactérienne	19
4.4.3. Effet de la bile sur la croissance bactérienne.....	20
4.5. Adhésion <i>in vitro</i> aux cellules épithéliales.....	20

Chapitre 2 : Résultats et discussion

1. Revivification et purification des souches	22
1.1. Bactéries lactiques.....	22
1.2. Bactéries pathogènes.....	23
2. Standardisation de l'inoculum	24
3. Etude de quelques critères probiotiques de la flore lactique de l'ben.....	24
3.1. Sélection de souches de bactéries lactiques douées d'activité antibactérienne.....	24
3.1. Test de spots.....	24
3.1.1.1. Test de puits.....	27
3.1.2. 1. Effets du surnageant natif.....	27
3.1.2.2. Effets du surnageant ajusté.....	28
3.1.2.3. Effets des surnageants traités avec des protéases.....	30
3.2. Etude de la résistance aux antibiotiques.....	31
3.3. Etude du pouvoir hémolytique.....	32
3.4. Evaluation de la croissance bactérienne dans les conditions simulées de tractus gastro-intestina.....	32
3.4.1. Effet du pH sur la croissance bactérienne.....	32
3.4.2. Effet de la pepsine sur la croissance bactérienne.....	34

3.4.3. Effet de la bile sur la croissance bactérienne.....	35
3.5. Adhésion <i>in vitro</i> aux cellules épithéliales.....	37
Conclusion.....	39
Références bibliographiques	
Annexes	

*Liste des
tableaux*

Liste des tableaux

Tableau n°	Titre	Page
I	principales espèces de bactéries lactiques à potentiel probiotique.	4
II	Principaux critères de sélection des souches probiotiques.	7
III	Origines des souches de bactéries cibles.	14
IV	Revivification et purification des souches de bactéries lactiques.	22
V	Revivification et purification des souches de bactéries pathogènes.	23
VI	Adhésion des souches lactiques aux cellules épithéliales du colon.	38

Liste des tableaux figurant en annexes

Tableau n°	Titre	Annexe
I	Bactériocines produites par quelques bactéries lactiques.	I
I	Codes et origines des souches de bactéries lactiques.	III
II	Résultats de la standardisation des souches de bactéries lactiques.	III
III	Résultats de la standardisation des souches de bactéries cibles.	III
IV	Diamètres de zones d'inhibitions des cinquante huit (58) souches de bactéries lactiques vis-à-vis <i>E. coli</i> ATCC25922 et SARM1 (test de spots)	III
V	Diamètres de zones d'inhibitions des trente (30) souches de bactéries lactiques sélectionnées vis-à-vis <i>S. aureus</i> 1, <i>S. aureus</i> 2, SARM 2, <i>Salmonella typhi</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Pseudomonas</i> et <i>Enterococcus</i> (test de spots)	III
VI	Diamètres de zones d'inhibitions des surnageants natifs des trente (30) souches de bactéries lactiques vis-à-vis <i>S. typhi</i> , SARM 1, <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i> (tests des puits).	III

Liste des tableaux

VII	Résultats des diamètres de zones d'inhibitions des surnageants ajustés des trente (30) souches bactéries lactiques vis-à-vis <i>S. typhi</i> , SARM 1, <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i> (test de puits).	III
VII	Diamètres de zones d'inhibitions des surnageants de cinq (5) souches de bactéries lactiques traités avec les protéases (Papine et trypsine) vis-à-vis SARM 1 et <i>E. coli</i> ATCC25922.	III
IX	Résultats de l'antibiogramme des bactéries lactiques testées.	III
X	Dénombrement des cinq (5) souches de bactéries lactiques sélectionnées à pH 1, 2, 3 et 6,5.	III
XI	Dénombrement des cinq (5) souches de bactéries lactiques sélectionnées en présence de la pepsine.	III
XII	Dénombrement des cinq (5) souches de bactéries lactiques en présence des sels biliaires.	III

Liste des figures

Liste des figures

Figure n°	Titre	Page
1	Principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.	12
2	Répartition du nombre de souches de bactéries lactiques selon le genre.	13
3	Préparation des cellules de colon : a -Segment du colon d'un poulet b - Récupération des cellules de colon.	21
4	Exemple de résultats d'activité inhibitrice de quelques souches de bactéries lactiques à l'égard d' <i>E. coli</i> ATCC25922(A): SARM1(B).	24
5	Exemple de résultats d'activité inhibitrice de quelques souches de bactéries lactiques à l'égard <i>V. cholerae</i> (a) : <i>S. typhi</i> (b) : <i>S. aureus</i> 1 (c) et <i>S. aureus</i> 2 (d).	25
6	Exemple de résultats d'activité inhibitrice de quelques surnageants natifs de souches de BL à l'égard de (A) SARM1 (B), <i>L. innocua</i> et (C) <i>S. typhi</i> .	28
7	Exemple de résultats d'activité inhibitrice de quelques surnageants ajustés de souches de BL à l'égard de (A) SARM1, (B) <i>L.innocua</i> et <i>S.typhi</i> (C).	29
8	Résultats d'activité inhibitrice des surnageants de souches de BL traités par des protéases.	30
9	Résultats de l'étude de la cytotoxicité des souches de BL vis-à-vis des cellules sanguines humaines.	32
10	Effet de l'acidité sur la croissance des souches de Ln ₁ , Lc' ₃ , P ₁₀ , Lb' ₈ et St ₁ .	33
11	Effet de la pepsine sur la croissance des souches de Ln ₁ , Lc' ₃ , P ₁₀ , Lb' ₈ et St ₁ .	34
12	Effet de la bile sur la croissance des souches de Ln ₁ , Lc' ₃ , P ₁₀ , Lb' ₈ et St ₁ .	36

Liste des figures en annexe II

Figure n°	Titre
1	Revivification et vérification de la pureté des souches de bactéries lactiques et pathogènes.
2	Standardisation de l'inoculum de bactéries lactiques et pathogènes.
3	Test de spots.
4	Protocole de récupération de surnageant de culture de bactéries lactiques (Data et al., 1994) (modifié).
5	Test de puits.
6	Protocole d'étude de la tolérance de souche de bactéries lactiques à l'acidité gastrique.
7	Protocole de l'étude de la tolérance de bactéries lactiques à la pepsine.
8	Protocole de l'étude de la tolérance des souches de BL à la bile.

*Liste des
abréviations*

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

ATB : Antibiotique.

Bf : *Bifidobacterium*.

BL : Bactéries lactiques.

BN : Bouillon nutritif.

C° : Degré Celsius.

CN : Cefalexin.

E. coli : *Escherichia coli*.

En : *Enterococcus*.

FAO: Food and Agriculture Organization

G : Grossissement

g : Gravité.

GC%: Pourcentage en guanine et cytosine.

GN: Gélose nutritive.

GRAS: Generally Recognized As Safe.

IPM : Imipenem.

L: *Listeria*.

Lb: *Lactobacillus*.

Lc: *Lactococcus*.

Ln: *Leuconostoc*.

MH : Mueller-Hinton.

MRS: Man, Rogosa et Sharpe.

OFX : Ofloxacin.

Liste des abréviations

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

P: *Pediococcus*.

PBS: Tampon phosphate salin.

PG : Pénicilline G.

PPM : Partie par Million.

S: *Salmonella*.

S: *Staphylococcus*.

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Methicilline.

sp : Espèce non précisée.

ssp : Subspecies.

St: *Streptococcus*.

UFC: Unité formant colonies.

USA: United States America.

V: *Vibrio*.

VA: Vancomycine.

Introduction

Introduction

L'Algérie a une tradition des produits laitiers bien établie, transmise d'une génération à une autre. Le lait est un produit difficile à conserver et facilement périssable pour cela il a été toujours transformé. Cette transformation se fait par l'intermédiaire des bactéries lactiques (**Claps et Morone, 2011**). Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées (**Mozzi et al., 2010**).

L'utilisation historique de ces bactéries en nutrition humaine et animale fait que ces bactéries sont généralement considérées comme sans risque. Plusieurs espèces bénéficient ainsi du statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (**Law et Haandrikman, 1997 ; Nguyen et al., 2010**), et jouent un rôle majeur de probiotiques (**Heyman et Heuvelin, 2006**).

Les bactéries lactiques sont généralement sélectionnées pour leurs propriétés technologiques (**Drouault et Corthier, 2001**), mais depuis les théories de Metchnikoff (1907) sur leurs effets bénéfiques sur la santé, l'attention s'est portée sur ces micro-organismes (**Bouhnik, 1998**), et d'autres propriétés sont prises en compte, telles que la survie et la persistance dans l'environnement dans lequel ils doivent agir. C'est pourquoi de nombreuses études visent à sélectionner des souches capables de tolérer l'acide gastrique et les sels biliaires, de s'adhérer aux cellules épithéliales et de produire plusieurs substances antimicrobiennes (**Drouault et Corthier, 2001**).

Grâce à ces capacités, l'utilisation de ces bactéries permet de satisfaire les besoins de point de vue sanitaire en industrie alimentaire, et permet d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes (**Ross et Jonsson, 2002**), tels que *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus* et *Yersinia* (**Dunne et al., 2001**), et ainsi d'assurer une bonne conservation des aliments (**Paul Ross et al., 2002**).

Dans la majorité des cas, les produits laitiers tels que les yaourts, laits fermentés, fromages, laits en poudre et crèmes glacées ont été choisis comme véhicules privilégiés des cultures probiotiques (**Doleyres et al., 2002**), et Parmi les bactéries lactiques, les

lactobacilles et les bifidobactéries sont les probiotiques les plus étudiés et les plus répandus dans l'alimentation humaine (Ouwehand et al., 2002).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui porte sur la sélection de souches de bactéries lactiques (isolées de l'ben traditionnel) à propriétés probiotiques.

Les objectifs fixés étaient d'étudier *in vitro* quelques critères probiotiques. Pour cela, nous nous sommes intéresser à l'étude de leurs:

- Capacité à produire des substances antibactériennes,
- Résistance envers quelques antibiotiques,
- Pouvoir cytotoxique sur des cellules sanguines,
- Capacité de survie aux conditions simulées de tractus gastro-intestinales,
- Aptitudes à s'adhérer aux cellules épithéliales,

Afin de répondre à cet objectif, une synthèse bibliographique à cette thématique est réalisée et structurée en deux parties comme suit : La première partie porte sur des généralités sur les bactéries lactiques et la deuxième partie détaille les propriétés probiotiques des bactéries lactiques.

On se basant sur ce fond bibliographiques, une seconde partie présente le matériel et les méthodes mise en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail, ou sont détaillés les procédés de sélection des souches de bactéries lactiques a effet probiotiques, ainsi que les résultats obtenus en réalisant ces méthodes.

*Synthèse
bibliographique*

1. Généralités sur les bactéries lactiques :

Le groupe de bactéries lactiques a été défini pour la première fois par Orla-Jensen en 1919 (Novel, 1993). Elles forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (Aguirre et Collins, 1993 ; Badis et al., 2005).

Elles partagent en outre un certain nombre de caractéristiques communes, qui forment la base de leur classification. Ce sont des bactéries à Gram positif, asporulées, non capsulées, anaérobies, catalase et oxydase négative, le contenu en GC de leur ADN varie de 33 à 54%, ce qui les classe dans les bactéries à faible pourcentage de GC (Muto et Osawa, 1987).

Les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles fastidieuses en ce qui concerne les carbohydrates, les acides aminés, les peptides, les acides nucléiques et les vitamines (Aguirre et Collins, 1993), et produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes (Dortu et Thonart, 2009). Elles sont ubiquistes on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif (Aguirre et Collins, 1993 ; Adams et Marteau, 1995 ; Drouault et Corthier, 2001).

Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, ces bactéries sont dites : Homofermentaires si l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose et hétérofermentaires si la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO₂ et autres acides organiques (Sutra et al., 1998 ; Jameta et al., 2001 ; Priyanka et Prakash, 2009).

Les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (Holzapfel et al., 2001). D'autres méthodes ont été utilisées pour caractériser les bactéries lactiques telles que l'estimation du contenu en GC%, hybridation ADN/ADN, et le séquençage de l'ARN 16S (Ukeyima, 2010).

Selon Bergey's manuel de la taxonomie (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'Ordre des Lactobacillales renfermant trente cinq genres (DeVos et al., 2009).

2. Historique de la définition des probiotiques

La notion de "probiotiques" a été développée grâce aux travaux de **Metchnikoff, (1907)** qui avait constaté que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé. Ainsi, Metchnikoff avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie (**Gournier-Château et al., 1994**).

Le terme probiotique dérive de deux mots grecs "pros" et "bios" qui signifient "pour la vie". Il a été introduit pour la première fois par **Lilly et Stillwell, (1965)** pour décrire des substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes. Depuis, plusieurs définitions ont été données aux probiotiques dépendamment de leurs effets sur la santé. **Selon Parker, (1974)**, « probiotique » désigne les microorganismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale. Selon la définition récente de **FAO/OMS, (2001)** les probiotiques sont « des microorganismes vivants administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » (**Anukam et Reid, 2007**).

3. Principales espèces de bactéries lactiques à potentiel probiotique

Les principales espèces de bactéries lactiques reconnues en tant que probiotiques sont des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, mais d'autres espèces qui appartiennent aux autres genres peuvent présenter également des fonctions probiotiques (**Rokka et Rantamaki, 2010 ; Gbassi et al., 2011**) (**Tableau I**).

Tableau I: Principales espèces de bactéries lactiques à potentiel probiotique (**Shah, 2007 ; Soccol et al., 2010**).

Espèces de <i>Lactobacillus</i>	Espèces de <i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques
➤ <i>Lb. Acidophilus</i>	➤ <i>Bf. longum</i>	➤ <i>Lc. lactis</i>
➤ <i>Lb. casei</i>	➤ <i>Bf. adolescentis</i>	➤ <i>St. thermophilus</i>
➤ <i>Lb. paracasei</i>	➤ <i>Bf. breve</i>	➤ <i>St. diacetylactis</i>
➤ <i>Lb. rhamnosus</i>	➤ <i>Bf. animalis</i>	➤ <i>St. intermedius</i>
➤ <i>Lb.lactis</i>	➤ <i>Bf. bifidum</i>	➤ <i>En. faecalis</i>
➤ <i>Lb.bulgaricus</i>	➤ <i>Bf. infantis</i>	➤ <i>En. faecium</i>
➤ <i>Lb.reteri</i>	➤ <i>Bf. lactis</i>	➤ <i>P. acidolactici</i>
➤ <i>Lb.fermentum</i>		➤ <i>Ln. mesenteroides</i>
➤ <i>Lb.helveticus</i>		
➤ <i>Lb. plantarum</i>		

❖ *Lactobacillus*

Les lactobacilles sont des bactéries majoritairement utilisées comme probiotiques, en particulier *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus rhamnosus*, car ces trois espèces offrent une bonne résistance à l'acidité gastrique et présentent une forte capacité d'adhérence aux cellules intestinales (Ezzariga, 2015). Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, se développent à un optimum de température situé entre 30°C et 40°C. Les souches sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5,5 à 6,2. Le genre *Lactobacillus* peut être divisé en trois groupes : homofermentaires stricts, hétérofermentaires facultatifs et hétérofermentaires stricts (DeVos et al., 2009).

❖ *Lactococcus*

Après leur mise en évidence dans le lait fermenté, un effet bénéfique sur la longévité des personnes consommant ce produit de façon régulière avait été suggéré. Nombre de ces bactéries sont considérées comme des probiotiques et leur usage est très répandu dans l'industrie alimentaire. Ainsi considérées comme « inoffensives », certaines souches ont été envisagées pour le traitement des maladies humaines. (Mofredj et al., 2007).

Les lactocoques se présentent en diplocoques ou en chaînettes, anaérobies mais aérotoles. Habituellement, ces bactéries croissent dans 4% de NaCl, à une température optimale comprise entre 20°C et 30°C et à un pH proche de la neutralité. Leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5 (DeVos et al., 2009).

❖ *Streptococcus*

Certaines espèces sont pathogènes et ne sont pas donc utilisées comme probiotiques, mais d'autres sont saprophytes de la cavité orale ou de l'intestin de l'Homme. L'espèce *Streptococcus thermophilus*, largement, présente dans le lait et les produits laitiers comme agent d'acidification, possède le statut GRAS et utilisée dans certains produits probiotiques (Ezzariga, 2015). Les cellules de ce genre sont, sphériques ou ovoïdes avec une disposition en paires ou en chaînes longues. Leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH 9,6 (DeVos et al., 2009).

❖ *Enterococcus*

Parmi les espèces d'*Enterococcus*, l'espèce *Enterococcus faecium* est la plus utilisée comme probiotique. La présence d'*Enterococcus faecium* est importante dans la prévention de l'infection par *Salmonella enterica ssp. enterica typhimurium* (Soccol et al., 2010).

Ce genre comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles. Elles sont catalase négative et d'autres possèdent une pseudocatalase. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6,5% de NaCl, au pH 9,6 et par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C. Ce sont des commensaux de l'intestin et de plante (DeVos et al., 2009).

❖ *Leuconostoc*

Les études réalisées *in vitro* ont montré que les souches de *Ln. mesenteroides* possèdent des propriétés probiotiques importantes telles que : la survie à bas pH (2, 3 et 4), en présence des sels biliaries et en présence de la pepsine (Benmechernene et al., 2013). Les cellules de ce genre sont ellipsoïdales à sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH optimum de croissance égal à 6,5. Certains leuconostoques peuvent croître même à un pH de 4,5. La température optimale de croissance est comprise entre 20°C et 30°C mais la croissance peut avoir lieu à 5°C. Les leuconostoques sont des hétérofermentaires obligatoires (DeVos et al., 2009).

❖ *Pediococcus*

L'espèce *Pediococcus acidolactici* est utilisée comme probiotique, celle-là pourrait réduire l'utilisation des antibiotiques et contrer les infections entériques causées par *E. coli* chez le porcelet (Gagnon et al., 2007). Les espèces de ce genre ayant un métabolisme homofermentaire, de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent dans deux directions perpendiculaires formant ainsi des tétrades mais jamais des chaînes. Certaines espèces produisent une catalase ou une pseudocatalase. Les cellules sont acidophiles mais non halophiles et croissent à pH 5 mais pas à pH 9. La température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C (DeVos et al., 2009).

4. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes pour la plupart issus de la microflore intestinale humaine, et qui doivent remplir de nombreuses conditions, expliquant que seules quelques dizaines de souches sont utilisées comme probiotiques (Heyman et Heuvelin, 2006). Ces microorganismes sont sélectionnés selon des critères particuliers pour garantir qu'ils parviennent dans le tractus intestinal sous une forme viable, qu'ils puissent y développer leur activité métabolique et, si possible, qu'ils possèdent également une certaine capacité d'adhésion (Saad, 2010).

Les critères les plus utilisés *in vitro* pour la sélection des souches probiotiques sont rapportés dans le **tableau II** (Pineiro et Stanton, 2007; Harzallah et Belhadj, 2013). Ces propriétés sont propres à chaque souche et ne peuvent pas être extrapolées d'une souche à l'autre même au sein d'une seule espèce (Dunne et al., 2001).

Tableau II : Principaux critères de sélection des souches probiotiques (Pineiro et Stanton, 2007 ; Harzallah et Belhadj, 2013).

<p>Critères de sécurité</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Historique de non pathogénicité (GRAS) • Souche d'origine humaine ou animale • Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques • Souche déposée dans une collection de cultures internationales • Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques
<p>Critères fonctionnels</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes • Tolérance à l'acidité gastrique • Tolérance à la bile • Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus • Stimulation du système immunitaire
<p>Critères technologiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini • Conservation des propriétés probiotiques après production

4.1. Critère de sécurité

Un microorganisme probiotique ne doit pas être nocif pour l'organisme et ne doit pas présenter un risque pour la santé. Ce critère semble évident, mais il est très important de le vérifier surtout si le choix de bactéries à administrer n'appartient pas à la microflore normale de l'hôte. Les bactéries lactiques (*Bifidobacterium* et *Lactobacillus*) sont utilisées depuis des temps immémoriaux pour la conservation des aliments et c'est la meilleure preuve de leur parfaite innocuité (Naidu et al., 1999).

4.1.1. Sensibilité aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques. Les travaux de Temmerman et al. (2003), ont montré que 68,4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Dans la plus part des cas, la résistance n'est pas transmissible. Cependant, il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autres espèces et genres. C'est une raison significative pour choisir des souches à faible potentiel de transfert de résistance (Denohue, 2004).

4.2. Critères fonctionnels

4.2.1. Production des substances antimicrobiennes

L'inhibition des bactéries indésirables ou pathogènes par les probiotiques peut se faire de différentes façons (Robin et Rouchy, 2001) : production de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et les bactériocines par les bactéries lactiques (Dortu et Thonart, 2009). Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Labioui et al., 2005).

- **Acides organiques**

Le taux et le type d'acide organique produit lors du processus de fermentation dépend des espèces de bactéries lactiques. L'effet antimicrobien des acides organiques réside dans la réduction du pH, ainsi que de la forme non dissociée des molécules (Ammor et al., 2006).

La forme non dissociée et plus hydrophobe de l'acide se répand au-dessus de la membrane des cellules et se dissocie à l'intérieur de la cellule, libérant les ions H⁺ qui acidifient le cytoplasme (Piard et Desmazeand, 1991). En plus de l'effet du pH, l'acide non dissocié peut modifier la perméabilité membranaire de la cellule par perturbation du système de transport du substrat (Ammor et al., 2006). Les lactobacilles sont les microorganismes les

plus fréquemment utilisés pour la production d'acide lactique (Djidel, 2007). Selon Annuk et al. (2003), *Lb. paracasei* produit une quantité importante d'acide lactique et acétique.

La production d'acides organiques empêchent le développement des *Escherichia coli* et des *Salmonella* (Robin et Rouchy, 2001).

- **Acides gras**

Quelques lactobacilles et lactocoques possèdent des activités lipolytiques et peuvent produire des quantités significatives d'acides gras, par exemple dans la fermentation du lait (Rao et al., 1984). Les acides gras insaturés présentent une activité vis-à-vis les bactéries à Gram⁺. Cependant, l'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration, et du pH du milieu (Gould, 1991).

- **Peroxyde d'hydrogène**

En général, les bactéries lactiques sont capables de transformer l'oxygène moléculaire (O₂) en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou en eau (H₂O) (Condon, 1987). La production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) semble être une caractéristique de grande importance des lactobacilles (Rousseau, 2004). Cependant, les souches de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* produisent le peroxyde d'hydrogène (Condon, 1987). Le H₂O₂ est reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle de lactobacilles. L'effet inhibiteur du H₂O₂ peut s'exercer même sur des bactéries à catalase positive comme *Pseudomonas aerogenosae* et *S. aureus* (Ammor, 2004). Selon Otero et Nader-Macias (2006), le peroxyde d'hydrogène, à une concentration comprise entre 1,65 et 3,3 Mm, a un effet bactériostatique sur *S. aureus*.

- **Dioxyde de carbone (CO₂)**

Celui-ci est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire. Le degré d'inhibition par le CO₂ varie selon les espèces. Un taux de CO₂ de 10% pourrait diminuer la population bactérienne de 50%, il a une forte activité antifongique (Ammor et al., 2006).

- **Diacétyle**

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Le diacétyl est l'un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif non lactique, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El Ziney et al., 1998). Il inhibe la croissance des bactéries à Gram négatif par réaction avec l'utilisation de l'arginine (Ammor et al., 2006). Cependant, une étude menée par Vinderola et al. (2002), a démontré que le diacétyle à une concentration de 50 PPM peut inhiber la croissance d'*E. coli*.

- **Acétaldéhyde**

Il est produit par les bactéries lactiques hétérofermentaires lors du métabolisme des glucides, il est estimé que la présence d'une faible concentration d'acétaldéhyde est suffisante pour inhiber certains agents pathogènes (Suskovic et al., 2010). L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 PPM empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium* et d'*E. coli* dans les produits laitiers (Piard et Desmazeaud, 1991 ; Dacosta, 2000).

- **Reutérine**

La reutérine est produite par *Lactobacillus reuteri*, une espèce hétérofermentaire dont la niche écologique est l'appareil gastro-intestinal des humains et des animaux. La reutérine montre un large spectre d'activité antimicrobienne contre certaines bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻. Les microorganismes de détérioration sensibles à la reutérine comprennent *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida*, et *Trypanosoma* (Axelsson et al., 1989).

- **Bactériocines**

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produits par certaines souches de bactéries lactiques, incluant les lactocoques, les lactobacilles, les pedioques et les leuconostocs (Bendali, 2003). Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Ces molécules sont incorporées dans les aliments soit directement sous forme purifiée ou semi-purifiée (nisine) ou sous forme de concentré

(pédiocine) soit indirectement en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire (Dortu et Thonart, 2009). La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (Kumari et al., 2009) (Tableau I, annexe I).

4.2.2. Résistance à l'acidité gastrique

Les bactéries probiotiques doivent survivre lors du passage par l'estomac. Elles y sont confrontées à la forte acidité des sucs gastriques, composés essentiellement d'acide chlorhydrique et la pepsine. (Hammon, 2011). La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les bas pH. Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime. Par conséquent, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2,5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (Ammor et Mayo, 2007).

4.2.3. Résistance aux sels biliaires

Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (Ammor et Mayo, 2007 ; Gu et al., 2008). Ces hydrolases ont été décrites chez certains lactobacilles de la flore, intestinale tels que *Lb.acidophilus*, *Lb.casei* et *Lb.plantarum* (Ammor et Mayo, 2007).

4.2.4. Adhésion aux cellules épithéliales

Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif et peuvent le coloniser de manière prolongée. Cette propriété pourrait constituer un avantage écologique favorisant leur implantation au niveau des parois intestinales et par conséquent, l'inhibition de la fixation des germes pathogènes. Ainsi, les probiotiques jouent un rôle de barrière physique contre les microorganismes pathogènes. Ce phénomène a été observé chez certains lactobacilles qui adhèrent aux villosités intestinales et inhibent la fixation d'*Escherichia coli* entéropathogènes (Roselli et al., 2006; Collado et al., 2007).

5. Effets bénéfiques des Probiotiques sur la santé

Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé peuvent être due à divers facteurs tels que la production des bactériocines, la compétition pour les éléments nutritifs avec les agents pathogènes et l'amélioration du système immunitaire (Isolauri 2001; Peighambardoust et al., 2011). La Figure 1 illustre la diversité des effets bénéfiques des probiotiques sur la santé.

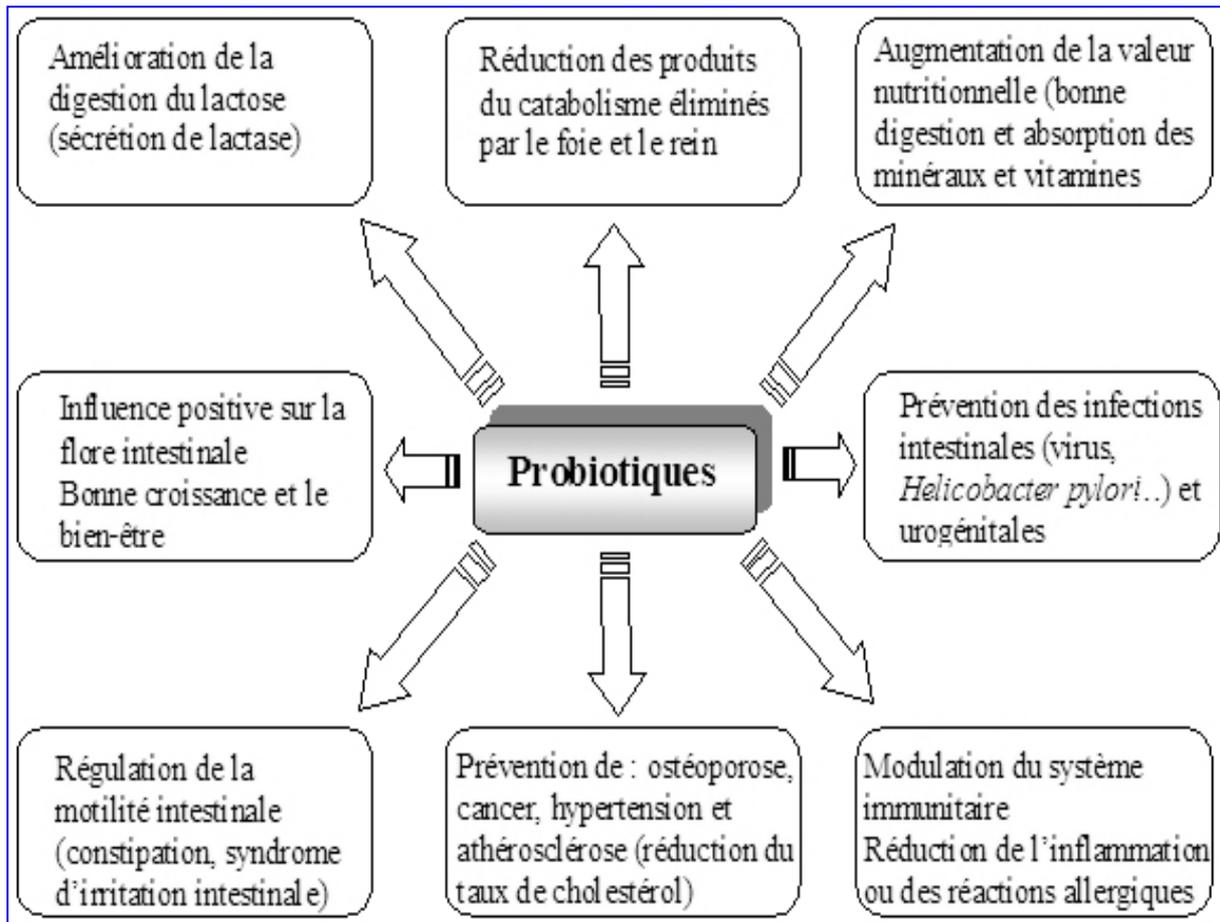


Figure 1 : Principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Mercenier et al., 2002).

*Matériel et
méthodes*

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie générale (**bloc 9**) de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia (UAMB) durant une période de 3 mois allant de 31 Janvier jusqu'au 30 Avril. Dont le but d'étudier *in vitro* de :

- l'effet antagoniste des souches lactiques vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes.
- la résistance des souches lactiques vis-à-vis de quelques antibiotiques.
- Pouvoir hémolytiques des BL.
- La viabilité des BL dans les conditions simulées de pH gastrique, en présence de pepsine et de la bile.
- la possibilité des souches de BL à s'adhérer aux cellules intestinales.

1. Souches utilisées

1.1. Bactéries lactiques :

Cette étude est réalisée sur des souches de bactéries lactiques isolées à partir des échantillons de l'ben traditionnel Algérien (**Figure 2**). Ces souches ont été conservées à une température de -20°C dans des tubes falquons contenant le bouillon MRS ou M17 selon la souche après l'ajout de glycérol à 20%. (**Tableau I, annexe III**).

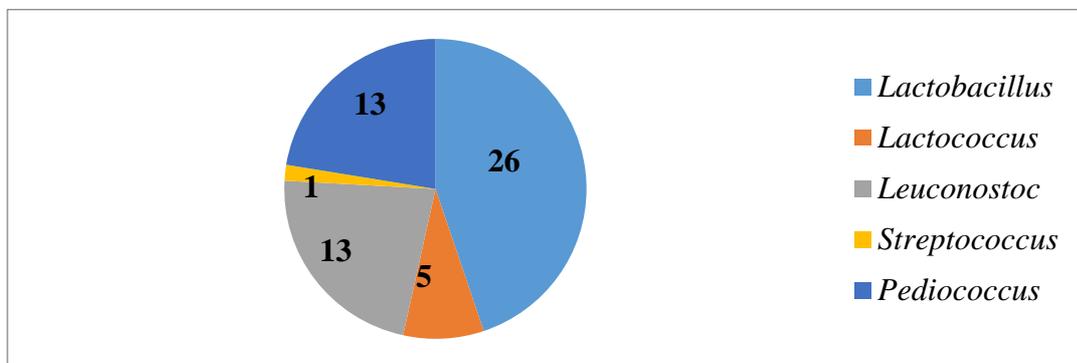


Figure 2: Répartition du nombre de souches de bactéries lactiques testées selon le genre.

1.2. Bactéries pathogènes :

Pour les tests de criblage de l'activité antibactérienne dix (10) souches ont été utilisées comme bactéries cibles. Parmi ces souches il y'a six (6) qui sont des souches de référence et appartiennent à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (**LMA**) (**Tableau III**). Ces souches ont été conservées à - 4°C dans le bouillon nutritif

Tableau III : Origines des souches de bactéries cibles.

Souches bactériennes	origine	Température et milieu de conservation
<i>S.aureus</i> 1 Résistant à la Méthicilline	Institut Pasteur (souches de références)	-4°C dans le bouillon nutritif
<i>E. coli</i> ATCC25922		
<i>Listeria innocua</i>		
<i>Salmonella typhi</i>		
<i>Vibrio cholerae</i>		
<i>S. aureus</i> 2 Résistant à la Méthicilline		
<i>S. aureus</i> 1	l'ben	
<i>S. aureus</i> 2	Smen	
<i>Enterococcus</i>	Lait	
<i>Pseudomonas</i>	Lait	

2. Revivification et vérification de la pureté des souches de bactéries lactiques et pathogènes

2.1. Revivification des souches

La revivification des souches consiste à transférer 1ml de chaque souche dans des tubes contenant 9 ml de bouillon (MRS pour les BL, nutritif pour les bactéries pathogènes). Ces bouillons sont incubés à 30°C et à 37°C (selon les souches) pendant 18h pour les BL et à 37°C pendant 18h pour les bactéries pathogènes. Cette opération est répétée trois fois à fin d'obtenir des cultures fraîches.

2.2. Vérification de la pureté des souches

Avant toute utilisation d'une souche une vérification de leur pureté est indispensable. Après trois repiquages successifs la pureté des souches est vérifiée en réalisant les tests suivants :

a. Examen macroscopique : Consiste à étudier la forme, l'aspect, le contour, la surface, la couleur des colonies sur les milieux gélosés (MRS et GN) pour les BL et pathogènes respectivement.

b. Etude microscopique : L'étude microscopique des souches lactiques est réalisée après une coloration de Gram, afin de déterminer leur morphologie et leur type de Gram + ou –

d. Test de catalase : Pour mettre en évidence cette enzyme, une colonie est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase. (**Figure 1, annexe II**).

3. Standardisation de l'inoculum

Après revification des souches un isolement par stries de chaque souche de BL sur la gélose MRS est effectué. Après incubation à 30°C et à 37°C selon la souche durant une période de 48h, six colonies identiques et bien isolées de chaque souche sont repiquées dans 9ml de bouillon MRS. Ces derniers sont incubés à 30°C et à 37°C selon la souche durant 18h. La même procédure est répétée avec les souches pathogènes en repiquant une colonie de chaque souche dans le bouillon nutritif et en l'incubant à 37°C pendant 18h après isolement sur gélose nutritive et incubation à 37°C durant 24h. Ensuite des dilutions décimales jusqu'à 10^{-10} sont réalisées dans l'eau physiologique. Puis un dénombrement des colonies a été réalisé (**Figure 2, annexe II**).

4. Etude de quelques critères probiotiques de la flore lactique de l'ben

4.1. Sélection de souches lactiques douées d'activité antibactérienne

Pour les tests de criblage de l'activité antibactérienne, au départ les cinquante huit souches de BL ont été testées à l'égard de deux souches pathogènes (***S.aureus* 1 Résistant à la Méthicilline (SARM1)** et ***E.coli* ATCC25922**). Pour cette étude deux tests sont utilisés : test de spots et test de puits.

4.1.1. Test de spots

Les souches de bactéries lactiques sont sélectionnées pour leurs aptitudes à inhiber les souches pathogènes en utilisant la méthode décrite par [Fleming et al. \(1975\)](#) : 5 µl d'une culture de 18h de souches lactiques, en bouillon MRS, sont déposées en spots sur des boîtes de pétri préalablement coulées et solidifiées avec la gélose MRS. Les boîtes sont laissées à sécher autour de bec Bunsen pendant 20 min, puis sont incubées à leur température optimale de croissance 30°C et à 37°C pendant 18h. Après incubation les spots sont recouverts avec 9 ml de la gélose Muller Hinton (MH) en surfusion inoculés avec 1ml d'une culture fraîche de 18h de la souche cible (concentration finale est de 10⁶UFC/ml). L'activité antibactérienne est déterminée par mesure des diamètres des zones d'inhibitions après 18h d'incubation à 37°C (**Figure 3, annexe II**).

Au terme de cette étude trente (30) souches étaient plus actives vis-à-vis les souches cibles ont été sélectionnées pour la suite de l'étude. Il s'agit de : quinze (15) souches du genre *Lactobacillus*, quatre (4) souches du genre *Lactococcus*, cinq (5) souches du genre *Leuconostoc* et le même nombre de souches pour le genre *Pediococcus*, et une (1) souche de genre *Streptococcus*. L'étude de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées est réalisée en utilisant le test de spots comme précédemment à l'égard d'une autre gamme de souches cibles (*Listeria innocua*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, SARM 2, *S. aureus*1, *S. aureus*2, *Enterococcus* et *Pseudomonas*)

4.1.2. Test de puits

Afin de déterminer l'origine de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées testées, un test de puits est réalisé selon la technique des puits décrite par [Elegado et al. \(1997\)](#). Dans ce test 10 ml de la gélose MH inoculée avec 1 ml d'une culture de bactérie cible (10⁶ UFC/ml) à la surface d'une gélose nutritive. Des puits de 6 mm de diamètre et 4 mm de profondeur sont creusés dans la gélose et scellés au fond avec une goutte de la même gélose nutritive, puis 100 µl du surnageant de chaque souche sélectionnée au par avant sont introduit dans chaque puit après une centrifugation à 6000g/15 min (2 fois). Les surnageants sont testés soit à pH natif ou après ajustement à pH 7 à l'égard de deux bactéries cibles à Gram⁺ (SARM 1 et *Listeria innocua*) et à deux à Gram⁻ (*E.coli* ATCC25922 et *Salmonella typhi*). Avant incubation à 37°C pendant 18h les boîtes sont mise à - 4°C durant 2h à fin de permettre la diffusion des surnageants.

Un témoin constitué de bouillon MRS est également réalisé (Fook et Gibson, 2002). Ce test mettra en évidence la production des acides organiques dans l'expression de l'activité antibactérienne du surnageant de la culture de bactérie lactique.

4.1.2.1. Traitement des surnageants natifs avec des protéases

Les bactériocines sont des substances de nature protéique inactivées par une protéase (De Vuyst et Vandamme, 1994). L'existence d'une bactériocine peut être supposée par la disparition ou la réduction des zones d'inhibition après traitement par des protéases.

Les enzymes utilisées sont présentées sous forme d'une poudre lyophilisée ; Papaine (18U/mg Merck) et trypsine (0,24U/g Merck). Des échantillons de 2 ml du surnageant sont additionnés de préparation enzymatique à des concentrations final de 1 mg/ml (Askild et al., 1994). Les enzymes sont dissoutes dans la solution de tampon phosphate pH 7 (phosphate mono potassique (1/16U), phosphate disodique 16U (pH 7 c'est le pH d'activation de ces deux enzymes) (Contreras et al., 1997) (Tableau V ,annexe IV).

Les échantillons sont filtrés stérilement avec des membranes stériles de (0,45µm, Millipore Corp., Bedford, Mass., USA), et sont incubés à 37°C pendant 2h. Au terme d'incubation, les échantillons sont testés pour leur activité antibactérienne avec la souche cible par la méthode des puits après ajustement du pH à 7 (Figure 4 et 5, annexe II).

4.2. Etude de la résistance aux antibiotiques

Les bactéries probiotiques doivent être dépourvues de propriétés de résistance acquise aux antibiotiques, pour cela la méthode de l'antibiogramme en milieu solide décrite par Leroy et De Vuyst, (2007) est effectuée.

A partir des boites de pétri contenant des BL (30 souches déjà citées) six colonies de chaque souche sont introduites à chaque fois dans 9 ml de bouillon MRS. Les tubes sont incubés à 30°C et 37°C pendant 18h.

Un ensemencement par écouvillon à raison de 10^8 UFC/ml sur gélose MRS est réalisé pour chaque souche. Des disques d'antibiotiques sont déposés stérilement devant le bec Bunsen. Nous avons testé cinq types d'antibiotiques à savoir: Pénicilline G (PG : 10 µg), Vancomycine (VA : 0,05g), Cefalexin (CN : 30µg), Imipenem (IPM : 10mg) et Ofloxacin (OFX : 5mg).

- Les trois premiers (PG -VA-CN) sont testés vis-à-vis les trente souches sélectionnées au par avant.
- Le quatrième (IMP) est testé vis-à-vis seulement dix-huit (18) souches (Lb₁, Lb'₂, Lb'₈, Lb'₁₇, Lb'₂₂, Lb'₂₃, Lb'₂₄, Lb'₂₅, P'₃, P'₈, P₁₀, P'₁₁, Lc'₁, Lc'₃, Ln₁, Ln'₄, Ln'₇, St₁).
- Deux (2) souches seulement (Lb'₈, Lc₃) ont été testées vis-à-vis OFX.

Après diffusion et au terme de l'incubation à 30°C et 37°C (selon la souche) pendant 18h, les diamètres de zones d'inhibition sont mesurés.

NB : le nombre de souches lactiques testées vis-à-vis les antibiotiques est déterminé selon la disponibilité de ces derniers.

4.3. Etude du pouvoir hémolytique

Le caractère hémolytique des trente souches de BL sélectionnées au par avant est recherché par ensemencement en stries large sur la gélose au sang (**Tableau IV, annexe IV**) à partir des cultures fraîches de 18h. Après incubation pendant une période de 48h à 30°C et à 37°C (selon la souche), le caractère hémolytique est examiné. Dans le cas où les cellules sont hémolytiques un éclaircissement autour des colonies sera observé (**Hadef, 2012**)

NB : Après la réalisation de ces tests nous avons sélectionné cinq (5) souches (chacune pour chaque genre) qui ont présenté une importante activité antibactérienne après réalisations du test de spots, pour la suite de l'étude : Résistance aux conditions simulées de tractus gastro-intestinal (HCl, la pepsine et aux sels biliaries) et leur capacité à s'adhérer aux cellules intestinales.

4.4. Evaluation de la croissance bactérienne dans les conditions simulées de tractus-gastro-intestinal

Le critère essentiel de sélection d'une souche probiotique est leur capacité à survivre dans le tractus digestif, et notamment au pH acide et en présence des sels biliaries. Les bactéries probiotiques possèdent des niveaux de tolérance très variables qui sont liés à la souche.

4.4.1. Effet du pH sur la croissance bactérienne

L'aptitude des bactéries lactiques à résister à l'acidité gastrique (HCl), est déterminée selon la technique décrite par **Hyronimus et al. (2000)** avec modification.

Des solutions de bouillon MRS sont ajustées aux différents pH (pH1, pH2 et pH3) avec de l'acide chlorhydrique (1N) (**Tableau X, annexe IV**). Le bouillon MRS à pH = 6,5 est utilisé comme témoin. Ces différents pH sont servis pour suivre la survie de ces souches dans les conditions simulées d'acidité de l'estomac (suc gastrique humain). 9 ml de bouillons MRS à pH= 6,5 (témoin) et à pH acides (pH1, pH2 et pH3) sont répartis dans des tubes stériles. Par la suite, 1 ml (à raison de 10^8 UFC/ml) d'une culture fraîche (18h) de chaque souche test est transféré dans les tubes remplis préalablement avec le bouillon MRS à pH= 6,5 (témoin) et ajusté aux différents pH (pH1, pH2 et pH3). Les tubes sont incubés à 30°C et 37°C pendant 1h, 2h et 3h. Le dénombrement est effectué avant l'incubation (0h) et chaque heure (1h, 2h, 3h) pendant 3h après l'incubation. Ce dénombrement est réalisé après une série de dilutions allant de (10^{-1} 10^{-10}) dans de l'eau physiologique et ensemencement en masse des dilutions (10^{-9} , 10^{-10}) (**Figure 6, annexe II**).

Remarque : Après ensemencement en masse des souches lactiques inoculées dans le bouillon MRS ajusté à pH 3, les tubes sont incubés à 30°C et 37°C pendant 24h à fin d'estimer la croissance qui est évaluée à l'œil nu.

4.4.2. Effet de la pepsine sur la croissance bactérienne

Le taux de viabilité des bactéries lactiques en présence de la pepsine est déterminé par la méthode de **Tokath et al. (2015)**, une solution enzymatique de concentration de 3 mg/ml est préparée en mettant en suspension 3g/l de la pepsine (Sigma Aldrich) avec 8,5g/l de NaCl dans un tampon HCl glycine ajusté à **pH 3** qui est le pH d'activation de la pepsine **Farias et al.(1994)** (**Tableau VIII, annexe IV**).

La suspension enzymatique est stérilisée par une membrane de filtration (0,45µm, Millipore Cop., Bedford, Mass., USA) et laissée à l'étuve à 37°C pendant 2h pour activer l'enzyme, puis 9 ml de cette solution est inoculée avec 1ml de chaque culture bactérienne fraîche (18h) à raison de 10^8 UFC/ml et incubé à 30°C et à 37°C (selon la souche) pendant 1h, 2h et 3h. Le taux de viabilité des cellules bactériennes est déterminé après culture dans la gélose MRS (à 0h et après 1h 2h et 3h d'incubation). En parallèle, des témoins constitués de bouillon MRS seul sans pepsine à pH 6,5 sont réalisés. Un dénombrement est effectué après une série de dilutions allant de (10^{-1} 10^{-10}) dans de l'eau physiologique et ensemencement en masse les dilutions (10^{-8} , 10^{-9} et 10^{-10}) (**Figure 7, annexe II**).

4.4.3. Effet de la bile sur la croissance bactérienne

Pour déterminer l'aptitude des souches lactiques à résister à la bile une méthode de [Khalil et al. \(2007\)](#), est employée. Une concentration de 0,3% de sels biliaries est préparée dans le bouillon MRS. Le choix de la concentration de bile pour (0,3%) était basé sur la concentration physiologique dans le duodénum. Le bouillon MRS sans sels biliaries a été utilisé comme témoin. 9 ml de bouillon MRS avec et sans sels biliaries sont répartis dans des tubes stériles. Par la suite, 1 ml (à raison de 10^8 UFC/ml) d'une culture bactérienne fraîche (18h) de chaque souche test est transféré dans des tubes contenant les bouillons déjà citées. Les tubes sont incubés à 30°C et 37°C pendant 1h, 2h, 3h et 4h. Le dénombrement est effectué avant l'incubation (0h) et après chaque heure d'incubation (1h, 2h, 3h, 4h). Ce dénombrement est effectué après réalisation d'une série de dilutions allant de (10^{-1} 10^{-10}) dans de l'eau physiologique et ensemencement en masse les trois dernières dilutions (**Figure 8, annexe II**).

Remarque : en parallèle une série de tubes de bouillon MRS à 0,3% de sels biliaries est ensemencée avec 1 ml à raison de (10^8 UFC/ml) de chaque souche puis cultivée pendant 24h afin de vérifier la présence d'une croissance.

4.5. Adhésion *in vitro* aux cellules épithéliales

Ce test consiste à étudier la capacité de souches de BL à s'adhérer aux cellules épithéliales. Pour se faire, la méthode décrite par [Lin et chien \(2007\)](#), est suivie:

- **Préparation des cellules épithéliales**

Avant de mettre en œuvre le test d'adhésion, un segment du colon d'un poulet a été ouvert et laver avec du tampon phosphate salin stérile (PBS à pH 7,2) (**Tableau V, annexe IV**) puis tenu dans le PBS à - 4°C pendant 30min pour être laver par la suite. Les tissus sont repris, laver 10 fois (**Figure a**) avec du PBS stérile puis laisser au repos à - 4°C pendant 3h. Les cellules sont récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin (côlon) par une lame stérile (**Figure b**). Des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à 10^{-4} .



Figure 3 : Préparation des cellules de colon : **a** - Segment du colon d'un poulet
b - Récupération des cellules de colon.

- **Préparation des cultures bactériennes jeunes**

Des cultures bactériennes jeunes (18h) sont centrifugées à 6000g/10min et le culot (10^8 cellules/ml) de chaque souche est récupéré dans 2 ml du PBS.

- **Réalisation du test**

1ml de chaque culture est mélangé avec 1ml de la dilution 10^{-4} de la suspension des cellules épithéliales déjà préparée. Après incubation à 37°C pendant 40 minutes, une préparation de frottis et une coloration à base de violet de gentiane à 0,5% pendant 5 min sont réalisées.

Le suivi de l'adhésion des BL est réalisée par une observation au microscope optique à l'objectif (G×100). Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérentes est supérieur à 15 (Hadeef, 2012).

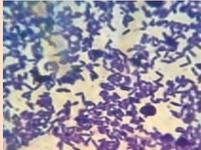
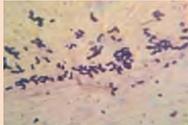
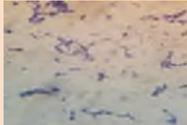
*Résultats et
discussion*

1. Revivification et purification des souches

1.1. Bactéries lactiques

Les résultats de la revivification et purification des souches de BL sont illustrés dans le tableau IV.

Tableau IV : Revivification et purification des souches de bactéries lactiques.

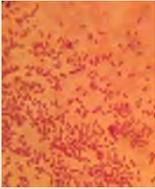
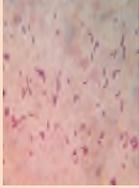
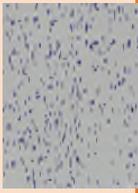
Souches tests	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
Aspect des colonies sur gélose MRS	<p>Sur gélose, les colonies sont apparues de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, à pourtour régulier et de couleur blanchâtre</p> 				
Repiquage sur bouillon MRS	<p>En milieu liquide formation d'un trouble visible et dense après 18h d'incubation à 30°C et 37°C (selon la souche)</p> 				
Observation microscopique	<p>Des bacilles Gram⁺ groupées en paires ou en chaînes</p> 	<p>Des coques Gram⁺ qui s'arrangent en paires ou en chaînes</p> 	<p>Diplocoques ou chaînettes Gram⁺</p> 	<p>Des coques Gram⁺ groupés en paires ou en chaînes</p> 	<p>Des coques Gram⁺ isolées ou en paires formant des tétrades</p> 
Test de catalase	 <p>Catalase négative (absence d'effervescence)</p>				

Les cinquante huit (58) souches de BL étudiées se sont révélées toutes pures (Gram⁺ et catalase⁻). Ces dernières sont retenues pour la suite de l'étude qui correspond à la sélection de souches douées d'activité antibactérienne.

1.2. Bactéries pathogènes

Les résultats de la revivification et purification des souches de bactéries pathogènes sont illustrés dans le **tableau V**.

Tableau V : Revivification et purification des souches de bactéries pathogènes.

Souches cibles	SARM1, <i>S.aureus</i> 1 <i>S.aureus</i> 2 SARM2		<i>E.coli</i> ATCC25922	<i>Salmonella</i> <i>typhi</i>	<i>Listeria</i> <i>innocua</i>	<i>Vibrio</i> <i>cholerae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>	
Aspect des colonies sur GN	Petites colonies rondes opaques bombés crémeuses lisses et brillantes		Colonies large régulières et lisses	Colonies larges régulières et lisses	Colonies convexes régulières et translucides	Colonies de taille moyenne rondes régulières et lisses	Petites colonies translucides de	Colonies large et irrégulières	
Repiquage dans BN	En milieu liquide, les pathogènes forment un trouble uniforme								
Observation Microscopique	Cocci en grappe de raisin Gram ⁺ 	Coccobacille isolé ou groupé Gram ⁻ 	Petit bacille Gram ⁻ 	Petit bacille Gram ⁺ 	Bacille incurvé Gram ⁻ 	Cocci Gram ⁺ 	Bacille Gram ⁻ 		
Test de catalase	 Catalase positive (présence d'effervescence)								

2. Standardisation de l'inoculum

Le but de la standardisation de l'inoculum bactérien, est d'avoir le même nombre de cellules bactériennes dans 1 ml de culture durant toute l'expérimentation.

Après le dénombrement effectué pour les bactéries lactiques et pathogènes, le nombre de cellules viables obtenu après ensemencement de six (6) colonies de BL dans 9 ml de bouillon MRS est de 10^9 UFC/ ml. Cependant, les pathogènes donnent un nombre qui se situe entre 10^7 et 10^9 UFC/ml à partir d'une (1) colonie ensemencée dans le BN (Tableau II et III, annexe III).

3. Etude de quelques critères probiotiques de la flore lactique de l'ben

3.1. Sélection de souches de bactéries lactiques douées d'activité

antibactérienne.

3.1.1. Test de spots

Parmi les cinquante huit (58) souches de BL testées pour leur activité antagoniste, cinquante sept (57) souches ont présenté un spectre d'activité à l'égard de **SARM 1** et d'***E. coli* ATCC25922**. Seule la souche **Ln'10** du genre ***Leuconostoc*** qui n'a montré aucun effet inhibiteur.

Selon les résultats mentionnés dans le (tableau IV, annexe III) et la figure 4, d'une manière générale, les souches testées ont montré des diamètres de zones d'inhibitions qui varient entre **4 mm et 39mm** à l'égard d'*E. coli* et de SARM 1.

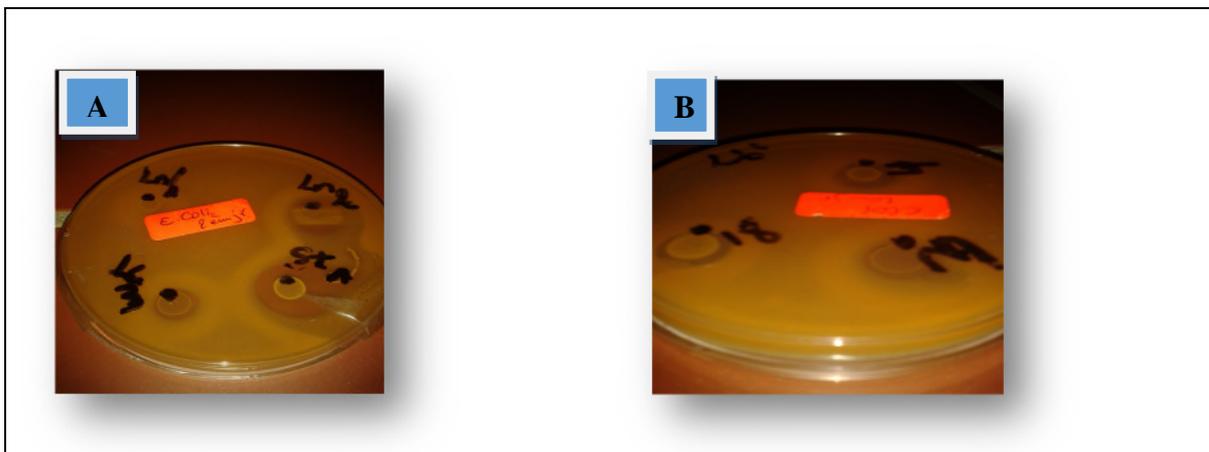


Figure 4 : Exemple de résultats d'activité inhibitrice de quelques souches de bactéries lactiques à l'égard d'*E. coli* ATCC25922(A) et de SARM 1(B).

Les diamètres les plus faibles (**4 à 10mm**) sont notés par onze souches qui sont représentés par quatre souches du genre *Lactobacillus*, trois souches du genre *Pediococcus*, deux souches du genre *Lactococcus*, et par le même nombre de souches pour le genre *Leuconostoc*. Tandis que les diamètres moyens (**12mm et 25mm**) sont notés par trente-six qui sont représentés par dix-neuf souches de genre *Lactobacillus*, onze souches de genre *Pediococcus*, quatre souches de genre *Lactococcus*, six souches de genre *Leuconostoc* et par une souche de genre *Streptococcus*. Enfin les diamètres les plus importants (**29 mm et 39 mm**) sont notés par dix-huit souches qui sont représentés par huit souches du genre *Lactobacillus*, trois souches de genre *Pediococcus*, deux souches du genre *Lactococcus*, et enfin par cinq souches du genre *Leuconostoc*.

Après l'obtention des résultats de ce test, trente (30) souches qui ont présenté des diamètres qui varient entre (**8 à 39 mm**). Il s'agit de quinze (15) souches du genre *Lactobacillus*, quatre (4) souches du genre *Lactococcus*, cinq (5) souches du genre *Leuconostoc* et le même nombre de souches pour le genre *Pediococcus*, et une souche du genre *Streptococcus* ont été sélectionnées pour tester leur activité antibactérienne à l'égard d'un plus grand nombre de souches pathogènes (*S. aureus 1*, *S. aureus 2*, **SARM 2**, *S. typhi*, *V. cholerae*, *L. innocua*, *Pseudomonas* et *Enterococcus*). Les diamètres de zones d'inhibition de cette étude sont indiqués dans le (tableau V, annexe III) et figure5.

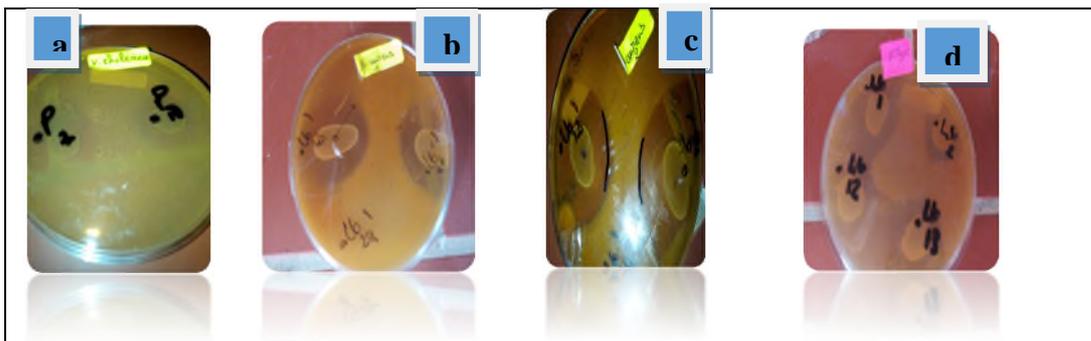


Figure 5 : Exemples de résultats d'activité inhibitrice de quelques souches de bactéries lactiques à l'égard *V. cholerae* (a): *S. typhi* (b): *S. aureus 1* (c) et *S. aureus 2* (d)

Ces résultats montrent que toutes les trente souches testées ont présenté une activité antibactérienne à l'égard de *Pseudomonas*, *Enterococcus* et *V. cholerae*. Cependant vingt-neuf (29) souches se sont avérées actives à l'égard de *S. aureus 1*, *S. aureus 2*,

SARM 2 et *L. innocua* et seules les souches de **Ln'7, Lb₁₃ et Lb'1** qui n'ont montré aucune activité vis-à-vis de ces dernières d'une manière respective.

Enfin la totalité des souches à l'exception celles de **P'3 et Ln'3** ont montré une activité antibactérienne à l'égard de *S. typhi*.

Les travaux de **Savadogo et al. (2004)**, ont rapporté que les diamètres de zones d'inhibition de bactéries lactiques isolées d'un lait fermenté sont de l'ordre de 9 à 10 mm vis-à-vis de *S. aureus* et de 8 à 9 mm vis-à-vis d'*E. coli*. Cela montre que nos souches lactiques sont plus actives à l'égard de *S. aureus* (4 à 40 mm) et d'*E. coli* (4 à 39 mm). Néanmoins, ces résultats se coïncident (pour certaines souches) avec ceux obtenus par **Belyagoubi et Abdelouahid (2013)**, où les diamètres de zones d'inhibitions de bactéries lactiques isolées à partir des produits laitiers traditionnels d'Algérie sont compris entre 4 et 34 mm vis-à-vis d'*E. coli*.

Hamed et Elattar (2013), ont trouvé des valeurs comprises entre 10 à 20mm en étudiant l'effet antibactériens de souches de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* isolées a partir de lait de chamelle vis-à-vis de *V. fluvialis*, de 23 à 33 mm vis-à-vis *Salmonella typhi* et de 31 à 38mm vis-à-vis d'*E. coli*. Ces résultats se rapprochent aux notre, où les diamètres que nous avons obtenu se varient entre 6 et 32mm vis-à-vis *V. cholerae*, 14 et 30mm vis-à-vis *Salmonella typhi* et enfin entre 7 et 39mm vis-à-vis *E. coli*.

Metlef et Bouras (2009), ont trouvé que les diamètres de zones d'inhibitions des souches de *Lc. lactis* à l'égard d'*Enterococcus sp* se varient entre 25 à 37 mm. Ces résultats sont plus importants que ceux enregistrés dans notre étude 14 et 30 mm. D'après **Elmoualdi et al. (2008)** l'activité antibactérienne des **lactocoques** est due à une substance extracellulaire, de nature peptidique et thermostable ce qui répond aux caractéristiques des bactériocines.

Belyagoubi et Abdelouahid (2013), ont enregistré des diamètres qui se situent entre 4 et 34 mm par des bactéries lactiques isolées à partir des produits laitiers traditionnels d'Algérie à l'égard d'*E. coli* et *Pseudomonas aerogenosae*. Ces valeurs sont proches à celles que nous avons obtenu à l'égard des bactéries pathogènes appartenant aux mêmes genres 4 et 39mm.

Hamed et Elattar (2013), confirment que l'action inhibitrice des BL est due principalement à l'accumulation de principaux métabolites primaires tels que l'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol et le dioxyde de carbone. De plus, les BL sont

également capable de produire des composés antimicrobiens tels que l'acide formique et l'acide benzoïque, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, l'acétoïne et les bactériocines. Les niveaux de production et les proportions entre les composés dépendent de la souche, des composés de milieu et des paramètres physiques.

3.1.2. Test de puits

3.1.2. 1. Effet du surnageant natif

Les résultats de l'étude de l'effet du surnageant natif des trente (30) souches de BL sélectionnées au par avant vis-à-vis des souches de bactéries cibles (*E. coli* ATCC25922, SARM 1, *L. innocua* et *S. typhi*) sont illustrés dans le (tableau VI, annexe III).

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'activité antibactérienne des surnageants natifs de souches de BL testées n'était pas semblable envers les souches d'*E. coli* ATCC25922, SARM 1 et *L. innocua*. D'une manière générale, les diamètres de zones d'inhibitions trouvés dans cette étude varient entre 4 et 34mm. Cependant l'étude réalisée par Hadeff (2012), sur l'activité antibactérienne des BL à l'égard d'*E. coli*, *L. monocytogenes* et *S. aureus* a aboutit à des résultats proches 9 à 30 mm à ceux que nous avons obtenu dans notre étude.

Les surnageants natifs des souches de Lb'5, Lc'1 et St₁ n'ont montré aucune zone d'inhibition vis-à-vis d'*E. coli* ATCC25922. Néanmoins, les vingt sept (27) surnageants natifs restants ont présenté des zones d'inhibitions avec des diamètres qui se situent entre 4 et 18 mm. Ces résultats ne correspondent pas à ceux de Labioui et al.(2005), qui ont trouvé des valeurs comprises entre 22,5 et 31,5 mm.

Il apparaît que les surnageants de dix (10) souches de Lb₁, Lb'5, Lb₁₃, Lb'14, Lb'17, Lb'22, Lb'25, Lb'2,6 Lc'3 et Ln'4 testées n'arrivent pas à inhiber la croissance de SARM 1 et *L. innocua* alors qu'ils ont présenté une bonne activité antibactérienne à l'égard d'*E. coli* ATCC25922 et de *S. typhi* où les diamètres mesurés ont été compris entre 8 et 16mm. Néanmoins, aucun effet inhibiteur n'a été noté par les souches Lb'2, Lb'12, Lb'24, P'3, P'8, Ln'3 et Ln'7 vis-à-vis de *L. innocua*. Tandis que ces souches ont marqué une bonne activité antibactérienne à l'égard des autres souches testées 4 et 30mm. En effet, les diamètres de zones d'inhibition de souches de BL à l'égard de SARM1 et *L. innocua* sont compris entre 14 et 32 mm. Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Labioui et al. (2005), qui ont noté des diamètres de zones d'inhibitions qui se varient entre 23,3 et 32,5 mm à l'égard de *S. aureus*.

D'autre part tous les trente (30) surnageants des souches testées dans cette étude ont présenté un pouvoir antibactérien vis-à-vis *S. typhi* où les diamètres de zones d'inhibition obtenus varient entre **4 et 32mm**. Ces résultats se diffèrent avec ceux obtenus par **Labioui et al. (2005)**, qui ont noté des valeurs comprises entre **20,3 et 28,2 mm** à l'égard des souches pathogènes appartenant aux mêmes genres.

L'apparition d'une activité inhibitrice en utilisant le surnageant natif confirme la production d'agent antibactérien par les souches lactiques dans le milieu. Plusieurs études ont montré que la fraction extracellulaire contient des substances responsables de cette inhibition (**Metlef et Bouras, 2009**) (**Figure 6**).

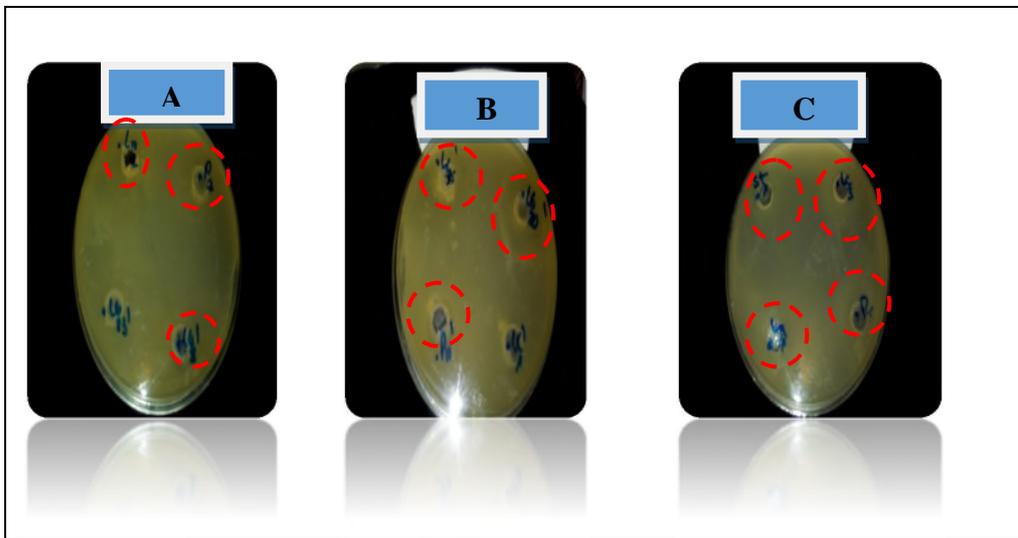


Figure 6 : Exemples de résultats d'activité inhibitrice de quelques surnageants natifs de souches de BL à l'égard de **SARM1(A)**, ***L. innocua* (B)** et ***S. typhi* (C)**.

3.1.2.2. Effet du surnageant ajusté

Afin de situer l'origine de l'activité inhibitrice obtenue par les surnageants natifs une élimination de l'effet de pH (acides organiques) par neutralisation avec de NaOH est effectuée.

Les surnageants neutres ont été testés pour leur activité inhibitrice vis-à-vis les mêmes germes cibles (*E. coli* ATCC25922, **SARM1**, *L. innocua* et *S. typhi*) utilisés précédemment. Les résultats sont résumés dans le (**tableau VII, annexe III**).

D'une manière générale, les résultats obtenus montrent une diminution de l'activité inhibitrice des surnageants neutralisés vis-à-vis des souches pathogènes testées par rapport à ceux obtenus par les surnageants natifs (**Figure 7**), et **sept** (7) souches ont perdu totalement leur activité, il s'agit de **Lb₂**, **P'₁₁** et **Lc'₁** vis-à-vis de *L. innocua*, **Lb₁₂** et **Lb'₂₅** vis-à-vis d'*E. coli*, **Lb'₂₀** vis-à-vis de **SARM 1** et la souche **Lc'₃** vis-à-vis de *S. typhi*. Cela suggère que les inhibiteurs majeurs sont les acides organiques produits par les souches lactiques testées.

Les témoins avec MRS seul n'ont montré aucunes zones d'inhibition, ce qui suggère que cette inhibition n'est pas due au composant du milieu MRS.

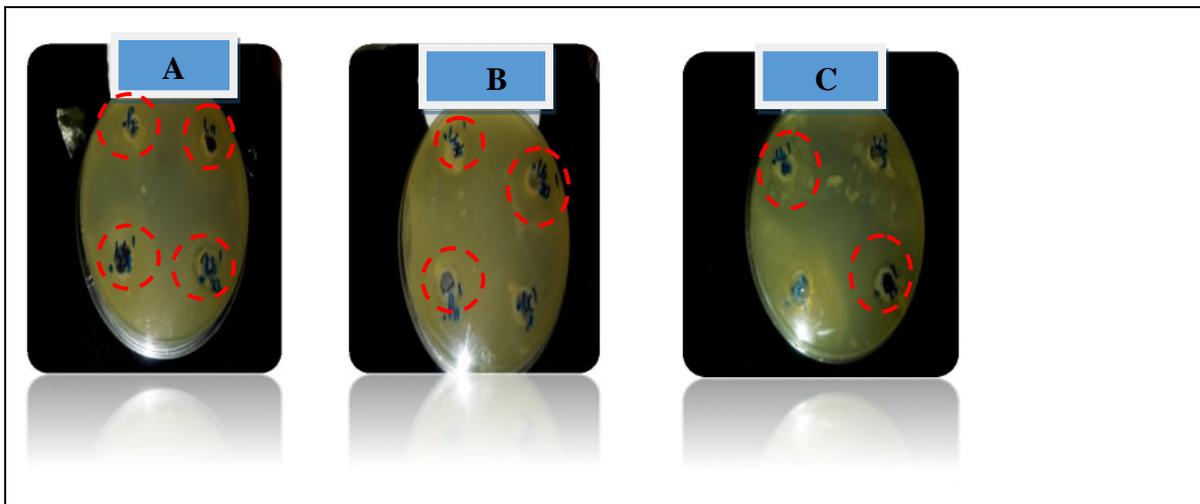


Figure 7: Exemples de résultats d'activité inhibitrice de quelques surnageants ajustés de souches de BL à l'égard de **SARM1** (A), *L. innocua* (B) et *S. typhi* (C).

Les travaux de **Charlier et al. (2009)**, ont montré que les **lactocoques** et les **leuconosques** présentent une inhibition à spectre élargie vis-à-vis *S. aureus* qui est induite par l'effet des acides organiques et des bactériocines.

Néanmoins, il faut noter que l'effet inhibiteur de treize surnageants des souches testées est maintenu stable après la neutralisation de ces derniers, il s'agit de souches de (**Lb'₂₃** **Lb'₂₄** **P'₈**); (**P₁₀** **Lc'₅** **St₁**), (**Lb₁₃** **Lb'₂₃** **P'₈** **P'₁₁** **Lc₃** **Ln'₄**); (**Lb₁** **Lb'₁₇** **Lb'₂₃** **Lb'₂₅** **P₁₀** **Ln'₃**) à l'égard de **SARM1**, *L. innocua*, *E. coli* et de *S. typhi* respectivement.

Cependant, les surnageants des souches de **Lb'₅** **Lc'₁** **St₁** ont entraîné à l'apparition de zones d'inhibition à l'égard d'*E. coli* après avoir enregistré aucune zone d'inhibition avec les surnageants natifs. **Labioui et al. (2005)**, suggèrent que l'élimination de l'effet de l'acide lactique favoriserait plutôt l'activité des substances antibactériennes.

Le maintien de l'activité antagonistique, après élimination de l'effet de l'acide lactique (effet du pH), confirme l'existence d'autres substances antibactériennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines.

Les mêmes observations ont été rapportées par [Doost-Chakoosari et al. \(2014\)](#), qui ont montré que les surnageants natifs et neutralisés des souches de *Lactobacillus* peuvent inhiber la croissance de six germes cibles dont *S. aureus*, *E. coli* et *S. enterica*.

3.1.2.3. Effets des surnageants traités avec des protéases

A fin de s'assurer que les substances inhibitrices produites sont de nature protéique nous avons traité les surnageants de culture de cinq (5) souches qui ont présenté des zones d'inhibition après neutralisation des surnageants (**Lc'5**, **St1**, **Ln2**, **Lb'23**, et **P10**) par deux enzymes protéolytiques (Papine et trypsine) (**Tableau VIII, annexe III**).

Nous avons constaté l'absence de zones d'inhibition pour la totalité des surnageants (**Figure 8**). Ce qui fait suggérer que les souches étudiées produisent probablement une substance de nature protéique qui permet l'inhibition des bactéries indicatrices. La sensibilité aux enzymes protéolytiques est le critère principal dans leur caractérisation ([Çon et Gökalp, 2000](#)).

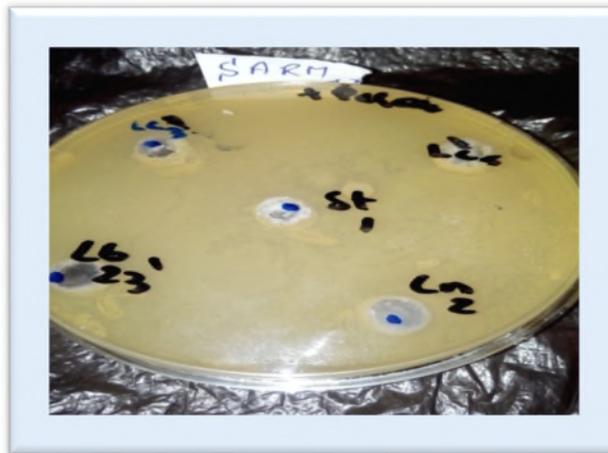


Figure 8 : Résultats d'activité inhibitrice des surnageants de souches de BL traités par des protéases.

Ces valeurs concordent avec celles trouvées par [Liu et al. \(2011\)](#), où les souches de T₁, S₂, S₉, T₁₁ et T₁₄ isolées d'un lait fermenté traditionnel ont présenté après traitement des surnageants avec des protéases, des diamètres d'inhibition de 0 mm vis-à-vis les bactéries pathogènes utilisées.

Des résultats semblables ont été rapportés dans la bibliographie réalisée par **Samot et Badet (2011)**, sur les bactéries lactiques.

3.2. Etude de la résistance aux antibiotiques

Les résultats de l'étude de la résistance des souches de BL aux antibiotiques sont groupés dans **le tableau IX, annexe III**.

Selon **Hadef (2012)**, les souches présentant un diamètre de zone d'inhibition supérieur à 15mm sont considérées comme sensibles. Toutes les souches testées vis-à-vis l'Imipenem (IPM) ont été trouvées sensibles à l'exception de la souche **St₁**, concernant la pénicilline G (PG) quatre souches seulement **Lb'₁₄, P'₃, P₁₀, Ln'₇** parmi les trente qui ont été trouvés sensibles. Cependant, toutes les autres souches testées à l'égard des autres ATB : Vancomycine (VA), Cefalexin (CN) et Ofloxacin (OFX) ont été trouvées résistantes.

Selon **Soussy et al. (2003)** les diamètres critiques considérés comme sensibles à la pénicilline sont inclus entre 4 et 16 mm, dans ce cas toutes les souches de BL testées sont considérées comme sensibles à l'exception de la souche Lb'₂.

Il faut signaler que cette résistance et sensibilité trouvées dans notre étude, peuvent être liées à la concentration de chaque antibiotique testé d'où la nécessité de tester plusieurs concentrations pour confirmer les résultats obtenus.

D'autre part, plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (**Botes et al., 2008**). Les travaux de **Temmerman et al. (2003)**, ont montré que 68,4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. La résistance des souches de *Leuconostoc* sp. à la Vancomycine, Gentamicine et la Chloramphénicol a été bien élucidée (**Ogier et al., 2008**). De même que pour des espèces de *Lc. lactis* qui ont présenté une résistance à l'Ampicilline et à la Vancomycine (**Donohue, 2004**).

L'utilisation de différentes souches lactiques en tant que probiotiques doit faire l'objet des travaux extrêmement attentifs (**Marteau et Seksik, 2004**). De même, l'autorité Européenne de Sécurité Alimentaire, suggère que les probiotiques ne doivent pas avoir une résistance acquise aux antibiotiques (**Zago et al., 2011**).

3.3. Etude du pouvoir hémolytique

Les bactéries lactiques testées n'ont présenté aucune cytotoxicité sur les cellules sanguines humaines (absence d'une zone claire aux tours des colonies) (**Figure 9**). Ce qui répond au critère de choix des bactéries lactiques. En effet, l'un des plus important critères de sélection de souches probiotiques est quels soient non toxiques vis-à-vis les cellules ([Law et Haandrikman, 1997](#) ; [Nguyen et al., 2010](#)).

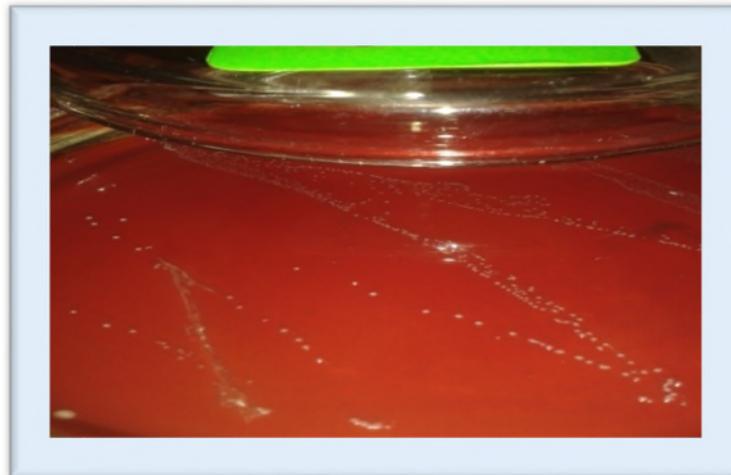


Figure 9 : Résultats de l'étude de la cytotoxicité des souches de BL vis-à-vis des cellules sanguines humaines.

3.4. Evaluation de la croissance bactérienne dans les conditions simulées de tractus gastro-intestinal.

3.4.1. Effet du pH sur la croissance bactérienne

Les bactéries probiotiques doivent survivre au passage par l'estomac ([Marteau et Shanahan, 2003](#)). Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau X, annexe III et Figure 10**.

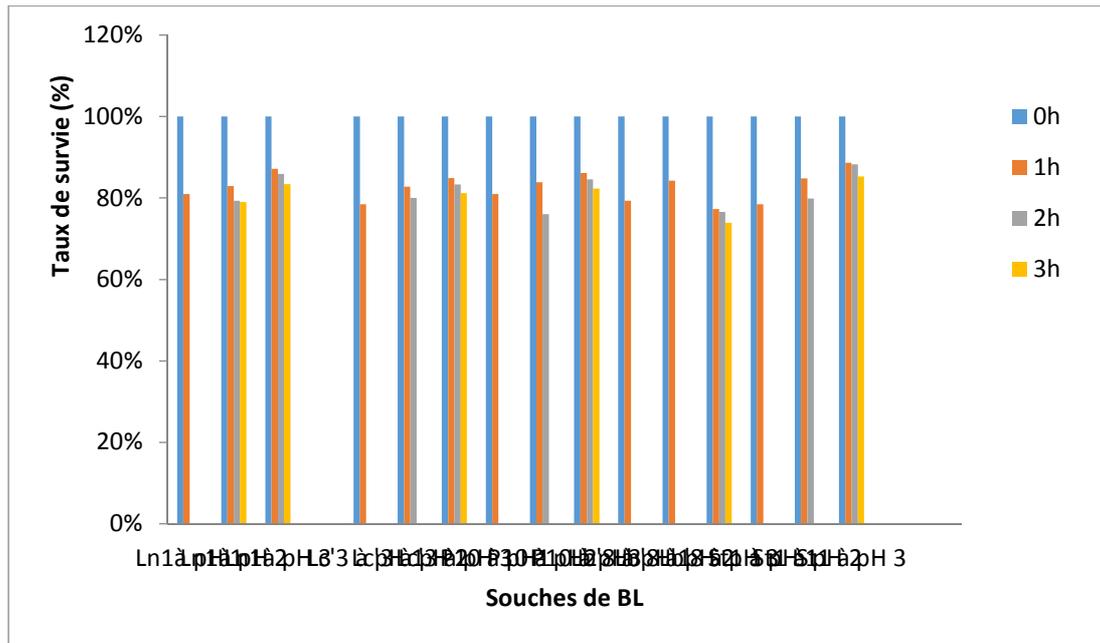


Figure 10 : Effet de l'acidité sur la croissance des souches de Ln₁, Lc'₃, P₁₀, Lb'₈ et St₁.

La concentration des cellules viables a diminué pour les trois pH acide 1, 2 et 3 avec la progression du temps de contact avec les pH acide par rapport au pH 6,5 (témoin) dont la perte de viabilité était nulle.

Lors de l'exposition à pH 1, les 5 souches de St₁, P₁₀, Ln₁, Lb'₈ et Lc'₃ ne résistent que pendant 1h avec des taux de survie proches de 80%. Au bout de 2h et 3h d'exposition à ce pH il y'a une perte totale de la viabilité cellulaires.

A pH 2, la plus grande portion de cellules ayant maintenu leur viabilité à la fin de la période d'exposition (3h) est enregistrée par la souche Ln₁ avec un taux de survie de 79% par contre les trois autres souches restantes (St₁, Lc'₃ et P₁₀) n'arrivent pas à résister plus de 2h avec des taux de survie de 79,9%, 80%, 76% respectivement. Cependant la souche Lb'₈ ne résiste qu'une heure (1h) après ce temps d'incubation avec un taux de survie de 84,3%.

A pH 3, la plus grande portion de cellules ayant maintenu leur viabilité à la fin de la période d'exposition (3h) est enregistrée par la souche St₁ (85,3%) suivie par les quatre autres souches Ln₁ P₁₀ Lc'₃ et Lb'₈, avec des taux de survie de 83,4%, 82,3%, 81,2%, 73,9% respectivement.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux décrits par [Guerra et al. \(2007\)](#), qui ont montré que pour toutes les souches testées (telles que les *Leuconostoc*,

Lactococcus et les *Pediococcus*) à pH 1 et 2 ont enregistré une importante perte de leur viabilité après leur incubation pendant 3 heures.

D'après l'étude réalisée par Tokath et al. (2015), la survie de souches de *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, et *P. ethanolidurans* à pH de 2,5 pendant 4 h était de 60%, 48,5% et 78% respectivement.

Cependant après 24 heures d'incubation à pH 3, les cinq souches testées ont montré une présence d'un trouble. Cela signifié que ces derrières ont gardé leur viabilité.

Les résultats d'une étude menée par Haller et al. (2001) ; Maurad et Meriem (2008), ont révélé un arrêt de la croissance de la souche de *Streptococcus sp* au voisinage de pH 1, d'autre part l'augmentation du pH à 2 et 3 a conduit à une augmentation progressive de taux de survie (Badis et al., 2005).

En outre, une étude faite par Mathara et al. (2008), a montré une tolérance élevée des souches de *Lactobacillus sp*. Aux pH 2,5 et pH 2 après 2h d'incubation.

3.4.2. Effet de la pepsine sur la croissance bactérienne

La pepsine est une enzyme de suc gastrique qui joue un rôle dans la digestion des protéines. Au terme de l'incubation la proportion de cellules viables de souches de Ln1 Lc'3 P10 Lb'8 et St1 dans la solution enzymatique à 3mg/ml de la pepsine a été évaluée, les résultats obtenus sont présentés dans le (Tableau XI, annexe III et Figure 11).

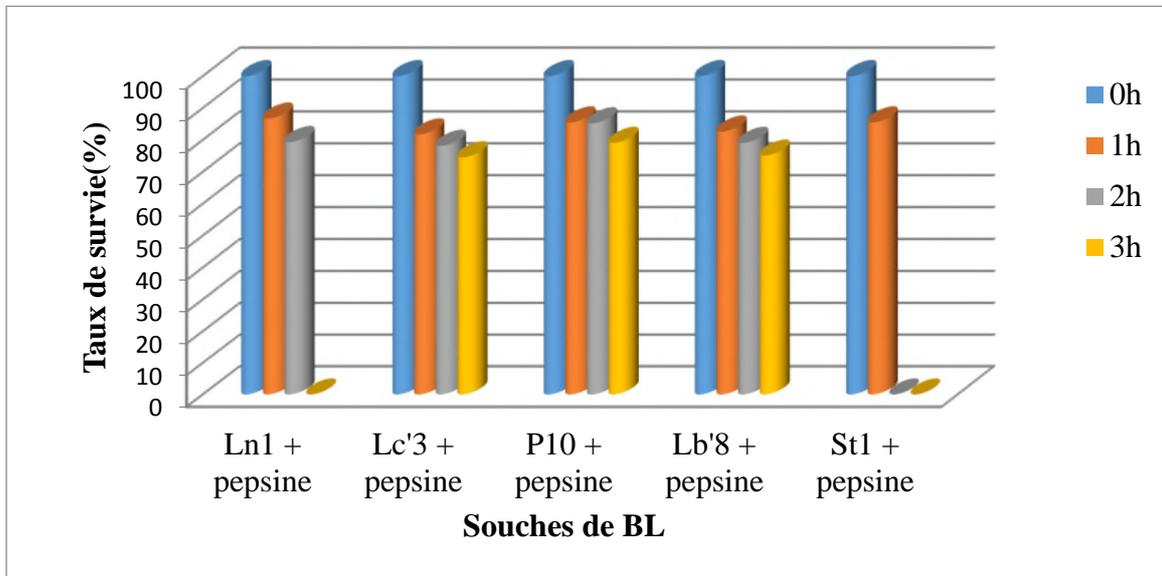


Figure 11 : Effet de la pepsine sur la croissance des souches de Ln₁, Lc'₃, P₁₀, Lb'₈ et St₁

A 0h les souches ont montré des taux de survie similaires à ceux de témoins, aucune réduction n'a été observée.

Après 1h d'incubation les souches testées ont exprimé des taux de survie qui dépassent le 80 % , des taux de 86,69% - 81,72% - 85,49% - 82,6% et 85,48% sont notés respectivement par rapport aux témoins. Ces résultats révèlent que toutes les souches sont tolérantes. Néanmoins, la souche **Lb'8** était la plus sensible à ces conditions hostiles de l'estomac.

Après 2h d'incubation, les souches testées ont exprimé des taux de survie de 79,34%, 78,15%, 85,21%, 79,08% et 0% respectivement par rapport aux témoins, ces résultats révèlent une perte totale de la viabilité de la souche **St1**.

Après 3h d'incubation les souches **Lc'3 P10** et **Lb'8** testées ont exprimé des taux de survie proches de 70%, sauf pour les deux (2) souches (**Ln1** et **St1**) qui révèlent une perte totale de leur viabilité. Cette durée reflète la moyenne du temps passé par les aliments dans l'estomac ([Argyri et al., 2013](#)).

D'après l'étude réalisée par [Rahli. \(2013\)](#), il y'a eu une résistance remarquable des souches étudiées additionnées de 3mg /ml de la pepsine à pH 3 pendant 3h. Ces résultats sont proches de ceux que nous avons obtenus. Ainsi que [Tokath et al. \(2015\)](#), ont rapporté que les taux de survie de *Lb .plantarum* et *Lb .breve* exposées aux mêmes conditions étaient importantes sauf pour la souche *Lb. breve* MF343.

3.4.3. Effet de la bile sur la croissance bactérienne

Les sels biliaires sont l'une des barrières à franchir par les bactéries probiotiques pour gagner leur site d'action, de ce fait la résistance des souches de **Ln1, Lc3, St1, Lb'8** et **P10** en présence de 0,3% des sels biliaires a été testée, ensuite la proportion de cellules viables a été évaluée (**Tableau XII, annexe III et Figure 12**).

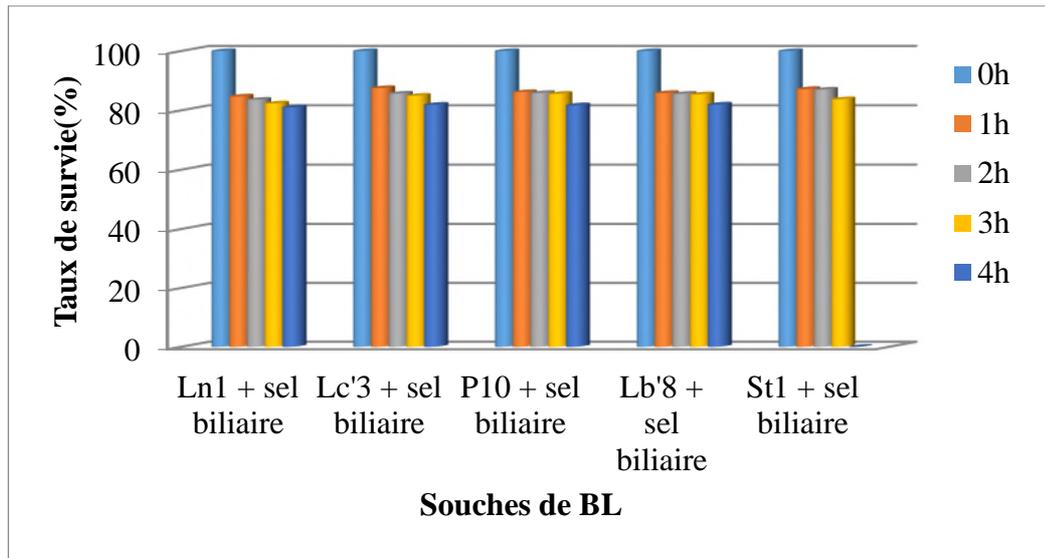


Figure 12 : Effet de la bile sur la croissance des souches de Ln₁, Lc'₃, P₁₀, Lb'₈ et St₁

Les résultats obtenus dans cette partie par les souches de BL testées (Ln₁, Lc'₃, P₁₀, Lb'₈ et St₁) ont montré une bonne tolérance aux sels biliaires.

A 0h aucune perte cellulaire n'a été observée, les taux de survie ont été similaires à ceux des témoins (bouillon MRS sans sels biliaires).

A 1h d'incubation les souches testées ont exprimé des taux de survie supérieurs à 80% par rapport aux témoins.

Après 2h d'incubation les souches testées ont maintenu des taux de survie proches de ceux obtenus après 1h. Ces taux de viabilité, révèlent une bonne tolérance aux sels biliaires après 2h d'incubation.

En effet, même après 3h d'incubation les souches testées ont exprimé toujours des taux de survie proches de ceux obtenus après 1h.

Cette tolérance est maintenue après 4h d'incubation, avec des taux de survie qui dépassent toujours les 80% pour les souches de (Ln₁, Lc'₃, P₁₀, Lb'₈). Cependant la souche St₁ n'a montré aucune viabilité après ce temps.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par [Boonklao et al. \(2006\)](#), où les souches de *Lactobacillus thermotolerans* isolées de la matière fécale de poulet tolèrent 0,3% de sels biliaires.

Des résultats trouvés par [Burns et al. \(2008\)](#), ont montré que la plus part des souches de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Lb. delbrueckii ssp. lactis* sont sensibles aux sels biliaires. Alors que nos résultats montrent le contraire.

Khali (2009) a indiqué que la souche *St. thermophilus*, peut survivre en présence de 0,4% de sels biliaires pendant 4 heures. Alors que notre souche **St₁** n'a pu résister que 3 heures à une concentration de 0,3%.

Des résultats trouvés par **Tokath et al. (2015)**, ont montré que les souches de *Lb. plantarum* et *Lb. brevis* (isolées de cornichons) ont présenté une résistance à 0,3% de sels biliaires après 4 heures d'exposition, alors aucune des souches de *Pediococcus* examinées étaient capables de résister à cette concentration après ce temps d'incubation.

En revanche, **Sukumar et Ghosh (2010)**, ont rapporté que les souches de *Pediococcus* isolées à partir des produits alimentaires fermentés d'origine indiens ont montré une tolérance significative aux sels biliaires.

Après 24 heures d'incubation à 0,3% de sels biliaires, toutes les souches testées à l'exception de la souche **St₁** ont montré un trouble uniforme. Cela signifie que les souches de **Ln₁**, **Lc₃**, **P₁₀**, **Lb₈** peuvent survivre en présence de cette concentration. **Bendali et al. (2011)**, ont trouvé des résultats semblables en testant la souche de *Lactobacillus paracasei ssp paracasei*.

En effet, **Benmechernene et al. (2013)**, ont trouvé que les souches de *Ln. mesenteroides* possèdent des propriétés probiotiques importantes tel que : la survie à bas pH 2 et 3, en présence de la pepsine et une tolérance importante aux selles biliaires, ce qui coïncide avec nos résultats.

Pour conclure, il faut noter que cette résistance ou sensibilité de ces bactéries aux sels biliaires pourrait se traduire par la capacité de celles-ci à les déconjuguer. Qui est une caractéristique la plus recherchée chez les bactéries probiotiques car celle-ci pourrait avoir un effet sur la diminution du taux de cholestérol dans le sang (**Malago et al, 2011**).

3.5. Adhésion *in vitro* aux cellules épithéliales

Comme l'étude de l'adhésion aux cellules épithéliales *in vivo* est difficile à réaliser, l'adhésion *in vitro* est le modèle le plus utilisé (**Gu et al., 2008**). Dans notre étude nous avons utilisé des cellules épithéliales d'origine animale (cellules épithéliales de poulet) Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau VI**.

Tableau VI : Adhésion des souches lactiques aux cellules épithéliales du colon.

Souche lactique	Lecture	Test
Ln ₁	Présence d'adhésion	+
Lc' ₃	Présence d'adhésion	+
St ₁	Présence d'adhésion	+
P ₁₀	Présence d'adhésion	+
Lb' ₈	Absence d'adhésion	-

Il apparaît que les souches testées ont présenté une adhésion aux cellules épithéliales du colon de poulet, à l'exception de la souche *Lactobacillus* (Lb'₈) qui n'a montré aucune capacité d'adhésion.

L'adhésion aux cellules épithéliales humaines est un test important suggéré pour l'évaluation du pouvoir probiotique des souches lactiques (Schillinger *et al.*, 2005 ; Guglielmotti *et al.*, 2007).

Cette colonisation est nécessaire pour exercer leurs effets bénéfiques par l'inhibition des bactéries indésirables. Les probiotiques pourraient agir en limitant l'implantation des germes pathogènes par compétition au niveau des sites de fixation pour la colonisation (Robin *et Rouchy*, 2001).

D'après certains auteurs, l'origine des probiotiques joue un rôle dans les capacités d'adhérence, il a été trouvé que les bactéries d'origine humaine peuvent s'adhérer mieux aux muqueuses intestinales de l'homme (Gu *et al.*, 2008).

Cependant Kimoto-Nira *et al.* (2009), ont constaté que des souches de *Lactococcus* (*Lc. lactis* ssp. *lactis* et *Lc. lactis* ssp. *cremoris*) isolées à partir de divers produits laitiers, peuvent s'adhérer aux cellules épithéliales intestinales humaines.

Wang *et al.* (2010), ont prétendu que les conclusions tirées des résultats des études *in vitro* ne puissent pas être directement appliquées aux situations *in vivo*. Il a été montré qu'il existe une relation entre la capacité d'adhérence et la colonisation provisoire de l'intestin humain.

Conclusion

Conclusion

Au cours de cette étude réalisée au niveau de Laboratoire de Microbiologie Générale durant une période de 3 mois, cinquante-huit (58) souches appartenant aux cinq genres : *Lactobacillus* (26 souches), *Lactococcus* (5 souches), *Leuconostoc* (13 souches), *Streptococcus* (1 souche) et *Pediococcus* (13 souches) ont été isolées, purifiées et identifiées à partir des échantillons du l'ben traditionnel. Les objectifs fixés étaient de sélectionner des souches de bactéries lactiques à propriétés probiotiques.

Les résultats obtenus montrent que les souches sélectionnées ont présenté des propriétés probiotiques intéressantes. Les résultats obtenus du test de spots ont montré que 57 souches parmi 58 souches testées sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne à l'égard d'*E. coli* et SARM 1 de diamètre qui varie entre **4 et 39mm**.

En se basant sur ces résultats trente (30) souches étaient plus actives vis-à-vis les souches cibles ont été sélectionnées pour la suite de l'étude.

Ces trente souches ont révélé une action inhibitrice, de diamètres qui varient entre **4 et 39mm** presque envers tous les pathogènes testés.

Les surnageants natifs et neutralisés ont montré un effet inhibiteur envers les souches cibles utilisées alors que les surnageants traités avec des protéases n'ont montré aucun effet.

Les souches étudiées ont montré une résistance vis-à-vis les antibiotiques testés. Toutes les souches testées vis-à-vis l'Imipenem (IPM) ont été trouvées sensibles à l'exception de la souche **St1**. Concernant la pénicilline G (PG) quatre souches seulement **Lb'14, P'3, P10, Ln'7** parmi les trente qui ont été trouvées sensibles. Cependant, toutes les autres souches testées à l'égard des autres ATB : Vancomycine (VA), Cefalexin (CN) et Ofloxacin (OFX) ont été trouvées résistantes. Ces dernières n'ont montré aucun pouvoir hémolytique envers les cellules sanguines humaines.

En se basant toujours sur les résultats obtenus après la réalisation de test du spot nous avons sélectionné cinq souches.

Ces souches ont montré une résistance remarquable vis-à-vis les conditions hostiles simulées de tractus gastro-intestinal. Tandis que la totalité des cellules ont perdu leur viabilité à pH 1 après 2 et 3h d'incubation.

Cependant, l'observation microscopique a montré une capacité de ces dernières à s'adhérer aux cellules intestinales.

Pour conclure les cinq souches sélectionnées pourraient être considérées comme des bactéries à potentiel probiotique. Cependant le travail effectué est insuffisant pour confirmer ces résultats.

Il faudrait alors en perspective, répéter ces tests plusieurs fois. Il faudrait aussi élargir cette étude à d'autres paramètres de sélection tels que l'utilisation d'une autre gamme de bactéries cible, l'étude de la résistance des BL envers un nombre importants des antibiotiques, l'identification génétique des souches, l'étude *in vivo* des propriétés probiotiques des souches possédant des bonnes aptitudes *in vitro* (par exemple le suivi de l'adhésion de ces souches aux cellules intestinal humaines) et enfin la fabrication d'un produit probiotique et le suivi de la viabilité des souches sélectionnées au cours des procédés de production et dans le produit fini.

*Références
bibliographiques*

A

1. Adams MR et Marteau P. (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol.* **27**, 263-264.
2. Aguirre M et Collins MD. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol.* **75**, 95-107.
3. Ammor MS et Mayo B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat Science.* **76**, 138-146.
4. Ammor S, Tauveron G, Dufour E et Chevallier I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *F Cntrol.* **17**, 454-468.
5. Anukam KC et Reid G. (2007). Probiotics, 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation, Communicating current research and educational topics and trends in *Applied Microbiology*: 466-474.
6. Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M et Mikelsaar M. (2003). Characterization of intestinal *lactobacilli* as putative probiotic candidates. *J Appl Microbiol.* **94**, 403-412.
7. Ammor MS. (2004). Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison : Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de Doctorat en Physicochimie et Qualité de Bioproduit. Université de Rennes 1, France, P21.
8. Argyri AA, Georgia Z, Kimon-Andreas G, Effie T, George-John EN, Efstathios Z, Parragou et Chrysoula CT. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro test. *Food Microbiol.* **33**, 282-291.

9. Askild LH, Lars A, Kathrin H et Lothar K. (1994). Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. FEMS Microbiology Letters. **115**, 143-149.
10. Axelsson LT, Chung TC, Dobrogosz WJ et Lindgren SE. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. Microbiol Ecol Health Dis. **2**, 131-136.

B

11. Badis A, Laouabdia-Sellami N, Guetarni D, Kihal M et Ouzrout R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales Arabia et Kabyle. Sci Technol. **23**, 30-37.
12. Belyagoubi L et Abdelouahid DE. (2013). Isolation, identification and antibacterial activity of lactic acid bacteria from traditional algerian dairy products. Advances in Food Sciences. **35** Suppl 1: 84- 85.
13. Bendali F, Durand A, Hebraud M et Sadoun DJ. (2011). *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei*: an Algeria isolate with antibacterial activity against enteric pathogens and probiotic fitness. J of Food and Nutrition Research. **50**, 139-149.
14. Bendali F. (2003). Caractérisation préliminaire et purification partielle de la substance antibactérienne produite par *Bf. Infantis*. Etude de son activité *in vivo* à l'égard d'*E. coli* entéropathogène. Memoire de Magister en Biochimie-Microbiologie. Université A. Mira, Bejaia, 128 p.
15. Benmechernene Z, Chentouf HF, Yahia B, Fatima G, Quintela-Baluja M, Calomata P, Barros- Vela'zquez J. (2013). Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. BioMed Res Int Doi. **10**, 1155-418132.

16. Boonkiao P, kongthong P et Assavaning A. (2006). Acid and bile tolerance on *Lactobacillus thermotolerans* a novel species isolated from chicken feces. Kasetsart J Naturel Science. **40**, 13-17.
17. Botes M, Van Reenen CA et Dicks LMT. (2008). Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastrointestinal model with infant milk formulations as substrate. Int J Food Microbiol. **128**, 362-370.
18. Bouhnik Y. (1998). Probiotiques, bactéries probiotiques, levains: Survie et effets chez l'homme des bactéries ingérées dans les laits fermentés. Elsevier INRA. **73**, 241-247.
19. Burns P, Vinderola G, Binetti A, Quiberoni A, Gavilan CG et Reinheime RJ. (2008). Bil-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. Int J Dairy. **18**, 377-385.

C

20. Charlier C, Cretenet M, Even S et Le Loir Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. Int J Food Microbiol. **131**, 30-39.
21. Claps S et Morone G. (2011). Produits laitiers et fromagers traditionnels de l'Algérie. In Développement de la Filière laitière et Fromagère en Algérie. CorFilac. 57-77.
22. Collado MC, Meriluoto J et Salminen S. (2007). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. Letters in Applied Microbiology **45** Supp 4: 454-460.
23. Çon AH et Gökalp HY. (2000). Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. Meat Sci. **55**, 89-96.

24. Condon S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiol. Rev. **46**, 269-280.
25. Contreras BGL, de Vuyst L, Devreese B, Busanyova K, Raymaeckers J, Bosman F, Sablon E et Vandamme EJ. (1997). Isolation, purification and amino Acid actobin A, One of Two Bactériocins Produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139 Appl. Environ. Microbiol. **63**, 13-20.

D

26. Dacosta Y. (2000). La Bio protection des aliments -L'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité et de la qualité microbiologique. Edition : Yves Dacosta. Paris. 14-29p.
27. Data H, Lcroix C, Huang J, Simard RF et Lemieux L. (1994). Simple Method of ULS. J Appl Bacteriol. **77**, 682-688.
28. De Vuyst LD, Vandamme EJ. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. Blackie Academic and Professional, London.
29. Denohue DC. (2004). Safety of novel probiotic bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects Salminen S, Wright AV et Ouwehand A. 3e (Eds.), Marcel Dekker Inc. New York, pp. 531-546.
30. DeVos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whiteman WB. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London. New York.1450p.
31. Djidel A. (2007). Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. Rhamnosus sur jus de date: Cinétique et optimization en cultures discontinues, semi-continues et continues. Thèse de Doctorat de Génie Chimique. Institut National Polytechnique de Lorraine. 217p.

32. Doleyres Y, Paquin C, Leroy M et Lacroix C. (2002). *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *App Microbiol Biotechnol.* **60**, 168-173.
33. Doost- Chakoosari MM, Ghasemi MF, Masiha A. (2014). Antimicrobial activities of Lactic Acid Bacteria. *Bull Env Pharmacol Life Sci.* **3** Suppl 2: 275-278.
34. Dortu C et Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol Agron Soc Environ.* **13**, 143-154.
35. Drouault S et Corthier G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet Res.* **32**, 101-117.
36. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G et Daly C. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of Bibliographie 178 human origin: correlation with in vivo findings. *The American J of Clinical Nutrition.* **73** Suppl 2: 386-392.

E

37. Elegado FB, Kim WJ et Kwon DY. (1997). Rapid purification partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, pediocin ACM, from *Pediococcus acidilactici*. *M Int J Food Microbiol.* **37**, 1-11.
38. Elmoualdi L, Labioui H, Boushama L, Benzakour A, Ouhssine M et Yachioui M. (2008). Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis subsp* Cremoris bull soc pharm. Bordeaux. **147**, 7-18.
39. El-Ziney MG, Uyttendaele M, Debevere J et Jakobsen M. (1998). Characterization of growth and metabolite production of *Lb.reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol Lett.* **20**, 913-916.

40. Ezzariga N. (2015). Probiotique, applications thérapeutiques et effets secondaires. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Mohammed V de Rabat, 158p.

F

41. Farias LM, Totola AH, Miranda CMS, Carvalho MAR, Damasceno CAV, Tavares CAP, Cisalpino EO et Vieira EC. (1994). Extraction partial purification and characterization of bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicillata*. Res Microbiol. **145**, 9-16.
42. Fleming HP, Herchells JL et Caslilow EN. (1975). Microbiol inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber bunc. Applied Environmental Microbiology. **30**, 1040-1042.
43. Fook LJ et Gibson GR. (2002). In vitro investigation of the effect of probiotics and probiotics on selected human intestinal pathogens. FEMS Microbiol. Ecology. **39**, 67-75.

G

44. Gagnon N, Talbot G, Ward P, Roy D, Dupuis M, Farnworth E, Tompkins TA et Lessard M. (2007). Evaluation of bacterial diversity in the gut of piglets supplemented with probiotics using ribosomal intergenic spacer analysis. Can J Anim Sci. **87**, 207-219.
45. Gbassi KG, Vandamme T, Yolou SF et Marchioni E. (2011). *In vitro* effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. Int J Dairy. **21**, 97-102.
46. Gould GW. (1991). Antimicrobial compound. In: Biotechnology and Food Ingredientseds. Goldberg I et Williams R. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 461-483.

47. Gournier-chateau N, Larpent JP, Castellanos MI et Larpent JL. (1994).
Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Edition : Lavoisier, Paris,
pp. 1-192.
48. Gu RX, Yang ZQ, Li ZH, Chen SL et Luo ZL. (2008). Probiotic properties of
lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of
Hotan, Xinjiang, Bama, Guangxi and China. *Anaerobe*. **14**, 313-317.
49. Guerra NP, Benardez PF, Mendez J, Cachaldora P et Castro LP. (2007).
Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation
as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*. **134**,
89–107.
50. Guglielmotti DM, Marco MB, Golowezye M, Reinheimer JA et Quiberoni ADL.
(2007). Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage
resistant mutants. *Int J Dairy* **17**, 916-925.
51. Guiraud JP. (2003). Microbiologie alimentaire. Edition : Dunod. Paris. 651 p.

H

52. Hadeif S. (2012). Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des
bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister de Microbiologie Appliquée.
Université Kasdi Merbah-Ouargla. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
et Sciences de la Terre et l'Univers. Département des Sciences de la Nature et de
la Vie, Corte, 88p.
53. Haller D, Colbus H, Ganzle G, Scherenbacher p, Bode C et Hammes WP. (2001).
Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro- intestinal
ecosystem a comparative *in vitro* study between bacteria of intestinal and
fermented food origin system. *Appl Microbiol*. **24**, 218-226.

54. Hamed E et Elattar A. (2013). Identification and some probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Egyptian Camels Milk. *J Life Science*. **10** Supp 1: 1952-1961.
55. Hammon E. (2011). Utilisation de l'analyse protéomique dans la caractérisation des bactéries d'intérêts probiotiques. Thèse de Doctorat en Chimie Analytique. Université de Starsbourg, Institut Pluridisciplinaire Huber Curien, 226p.
56. Harzallah D et Blhadj H. (2013). Lactic acid bacteria as probiotic: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. pp. 198-215.
57. Heyman M et Heuvelin E. (2006). Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique le paradoxe. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **20**, 85-94.
58. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J et Schillinger U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American J of Clinical Nutrition*. **73** Supp 1: 365S-73S.
59. Hyrominus B, Le Marrec P, Hadj Sassi A et Deschamps A. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. **61**, 193-197.

I

60. Isolauri E. (2001). Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr* **37** Suppl 6: S1142- S1146.

J

61. Jameta EB, Ehrlich SD, Duperrayb F et Renault P. (2001). Étude des gènes dupliqués de la glycolyse chez *Lactococcus lactis* IL1403. *J of Dairy Sciences*. 115–129.

K

62. Khali RK. (2009). Evidence for probiotic potential of a capsularproducing *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 strain. African J of Microbiol. **3** Suppl 1: 027-034.
63. Khalil R, Mahrous H, El-Halafawy K, kamaly K, Frank J et El Soda M. (2007). Evaluation of the probiotic potoncial of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. Afr J Biotechnol. **6**, 939-949.
64. Kimoto-Nira H, Kobayashi M, Nomura M, Sasaki K et Suzuki C. (2009). Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition Analysis by using different growth media. Int J Food Microbiol. **131**, 183-188.
65. Klaenhammer TR. (1994). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev. **12**, 39-85.
66. Kumari A, Makeen K, Garg AP, Maotta F, Guptal C et Divya. (2009). Effet of the bacteriocines produced by *Lactococcus lactis* subsp. lactis CCSUB202, on mode of action of *Lactococcus lactis* subsp.lactis MTCC3038. Int J Prob Preb. **4**, 1-6.

L

67. Labioui H, Elmoualdi l, Yachioui M et Ouhssine M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes Bull. Soc Pharm Bordeaux. **144**, 237-250.
68. Law J et Haandrikman A. (1997). Review article, proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. Int J of Dairy Science. **7**, 1-11.
69. Leroy F et De Vuyst L. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications. Mol Microbiol Biotechnol. **13**, 194-199.

70. Lin TY et Chien MFC. (2007). Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chem.* **100**, 1419-1423.
71. Liu CF, Tung YT, Wu CL, Lee BH, Hsu WH et Pan TM. (2011). Antihypertensive effects of *Lactobacillus*-fermented milk orally administered to spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem.* **59**, 4537-4543.

M

72. Malago J, Koninkx JFJG et Marinsek L. (2011). Probiotic bacteria and infection. Supringuer. London New Yourk. ISBN 978-94-007-0385-8.
73. Marteau P et shanahan F. (2003). Basic aspects et pharmacology of probiotics anoverview of pharmacokinetes mechanisms of acton and side-effects best practice and research. *Clinical Gastroenterology.* **17** Suppl 5 :725-740.
74. Marteau P et Seksik P. (2004). Place des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées postantibiotiques. *Re Fran Lab.* 73-76.
75. Mathara JM, Schillinger U, Guigas C, Franz C, Kutima PM, Mbugua SK, Shin HK et Holzapfel WH. (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus* spp from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int J Food Microbiol.* **126**, 57-64.
76. Maurad K et Meriem K. (2008). Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions Sahara of Algeria. *Grasas Y. Aceites.* **59**, 218-224.
77. Mercenier A, Pavan S et Pot B. (2002). Probiotics as biotherapeutic agents, present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design.* **8**, 99-110.
78. Metlef S et Dilmi-Bouras A. (2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Rev Nat Tec.* **1**, 33-44.

79. Mofredj A, Bahloul H et Chanut C. (2007). *Lactococcus lactis*: un pathogène opportuniste. Médecine et Maladies Infectieuses. **37**, 200-207.
80. Mozzi F, Raya RR et Vignolo GM. (2010). Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell publishing, Singapore, pp. 3-7.
81. Muto A et Osawa S. (1987). The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. **84**, 166-169.

N

82. Naidu AS, Bidlack WR et Clemens. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Crit Rev Food Sci Nutr **39** Supp : 13-126.
83. Nguyen HTH, Elegado FB, Librojo-Basilio NT, Mabesa RC et Dizon ET. (2010). Isolation and characterisation of selected lactic acid bacteria for improved processing of Nem chua a traditional fermented meat from Vietnam. Beneficial Microbes. **1** Supp1: 67-7.
84. Novel G. (1993). Les bacteries lactiques in microbiologie indistruelle les microorganismes d'intérêt industriel. Edition : technique et documentation. Lavoisier. 614p.

O

85. Ogier JC, Casalta E, Farrokh C et Saihi A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. Int J Food Microbiol. **126**, 286-290.
86. Otero M et Nader-Macias ME. (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂- producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. Anim Repro Sci. **96**, 35-46.

87.Ouwehand AC, Salminen S et Isolauri E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*. **82**, 279–289.

P

88. Paul Ross R, Morgan S et Hill C. (2002). Preservation and Fermentation: present and future. *Int J Food Microbiol*. **79**, 3-16.

89.Peighamardoust SH, Golshan TA et Hesari J. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures. *Food Sci Technol*. **22**, 215–224.

90. Piard JC et Desmazeand M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part Loxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. **71**, 525-541.

91.Pineiro M et Stanton C. (2007). Probiotic bacteria : legislative framework-requirements to evidence basis. *J Nutr* **137**, 850S-853S.

92.Priyanka S et Prakash A. (2009). Screening of Lactic Acid Bacteria for Antimicrobial Properties Against *Listeria monocytogenes* Isolated from Milk Products at Agra Region. *Int J of Food Safety*. **11**, 81-87.

R

93.Rahli F, Saidi N et Kihal M. (2013). Evaluation of the factors affecting the variation of the physicochemical composition of Algerian camel's raw milk during different seasons. *Adv Environ Biol*. **7** Suppl 14 : 4879-4884.

94.Rao DR, Reddy AV, Pulusani SR et Cornwell PE. (1984). biosynthesis and utilisation of folic acid and vitamin b12 by lactic cultures in skimmilk. *J dairy sci*. **67**, 1169-1174.

95.Robin JM et Rouchy A. (2001). Les probiotiques CEDN. *Nutrithérapie I nfo*.1-4.

96. Rokka S et Rantamaki P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur Food Res Technol*. **213**, 1-12.

97. Roos S et Jonsson H. (2002). A high-molecular mass cell-surface protein from

Lactobacillus reuteri 1063 adheres to mucus components. Microbiology. **148**, 433-442.

98. Roselli M, Finamore A, Britti MS et Mengheri E. (2006). Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigeni *Escherichia coli* K88. British journal of nutrition. **95** Supp 06: 1177-1184.

99. Rousseau V. (2004). Evaluation d'oligosaccharides à effet probiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. Thèse de Doctorat de Microbiologie et Biocatalyse Industrielle. Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse. 185p.

S

100. Saad N. (2010). Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bacteria probiotique *Lactobacillus plantarum* 299V avec l'hôte: approche *in vitro*. Thèse de Doctorat de l'université de Limoges, Ecole doctorale Biologie-santé, faculté des sciences et Techniques, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, France. 266p.

101. Samot JL et Badet C. (2011). Adherence capacities of oral *lactobacilli* for potential probiotic purposes. Anaerobe. **17**, 69-72.

102. Savadogo A, Ouattara1 CAT, Savadogo PW, Ouattara1 AS, Barro N et Traore AS . (2004). Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. Pakistan J Of Nutrition. **3** Supp 2: 134-139.

103. Schillinger U, Guigas C et Holzapfel WH. (2005). *In vitro* adherence and other properties of *lactobacilli* used in probiotic yoghurt-like products. Int J Dairy. **12**, 1289-1297.

104. Shah NP. (2007). Functional cultures and health benefits. Int J Dairy. **7**, 1262-1277.

105. Soccol CR, Vandenberghe LPS et Spier MR. (2010). The potential of probiotics. *Food Technol Biotechnol.* **48** Supp 4: 413-434.

106. Soussy CJ, Nyayen J, Goldstein F, Dobernat H, Andreumont A, Leclercy R, Drugeon H, Cavallo P, Chardon H, Etienne J et Rioy Mounrvalin P. (2003). Inertion antibacterial activity of maxifloxacin against hospital isolates. *Clin Microbiol Infect.* **9**, 997-1005.

107. Sukumar G et Ghosh AR. (2010). *Pediococcus* spp a potential probiotic isolated from *Khadi* (an Indian fermented food) and identified by 16S rDNA sequence analysis. *Af J of Food Science* **4** Suppl 9: 597–602.

108. Suskovic J, Kos B, Beganovic J, Lebos Pavunc A, Habjani K et Matosic S. (2010). Antimicrobial Activity- The Mots Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bactéria. *Food Technology and Biotechnology.* **48** Supp 3 : 296-307.

109. Sutra L, Federighi M et Jouve JL. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Edition : Polytechnica. Paris. **308** Supp 6 : 31-249.

T

110. Temmerman R, Pot B, Huys G et Swings J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol.* **81**, 1-10.

111. Tokath M, Gulgör G, Elmac SB, EGleyen NA et Ozçelik F. (2015). *In Vitro* Properties of Potential Probiotic Indigenous Lactic Acid Bacteria Originating from Traditional Pickles. *Int BioMed Research.* 315819,8p.

U

112. Ukeyima MT, Enujiugha VN et Sanni TA. (2010). Current applications of probiotic foods in africa. *african j of biotechnology.* **4** Suppl 9: S394-401.

V

113. Vinderola CG, Costa GA, Regenhardt S et Reinheimer JA. (2002). Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid bacteria and probiotic bacteria. *Int J Dairy.* **12**, 579-589.

W

114. Wang CY, Lin PR., Ng CC et Shyu YT. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe.* **16**, 578-585.

Z

115. Zago M, Fornasari ME, Carminati D, Burns P, Suárez V, Vinderola G, Reinheimer J et Giraffa G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* **28**, 1033-1040.

Annexes

Annexe I

Tableau I: Bactériocines produites par quelques bactéries lactiques
(Klaenhammer, 1994).

Espèces productrices	Bactériocine	Spectre d'activité
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	Nisine	Bactéries à GRAM+
<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>	Diplococcine	<i>Lactococcus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactacine B	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Leuconostoc</i>	Leucocine A-UAL187	<i>Bacteries lactiques</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Pediococcus</i>	Pédiocine A1	<i>Pediococcus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus bif fermentans</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Listeria monocytogenes</i>

Annexe II

Les protocoles expérimentaux représentés dans la partie pratique

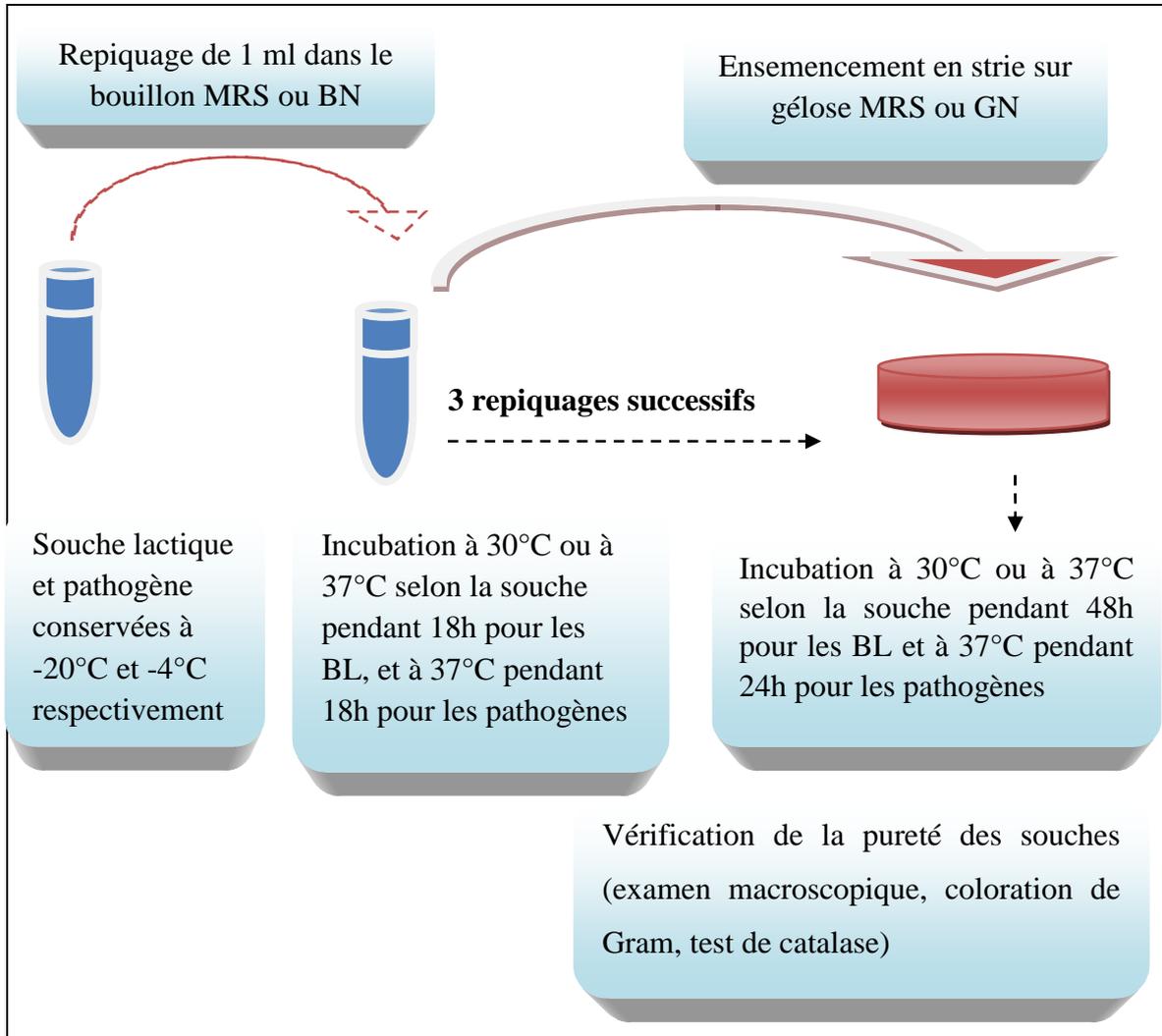


Figure 1: Revivification et vérification de la pureté des souches de bactéries lactiques et pathogènes.

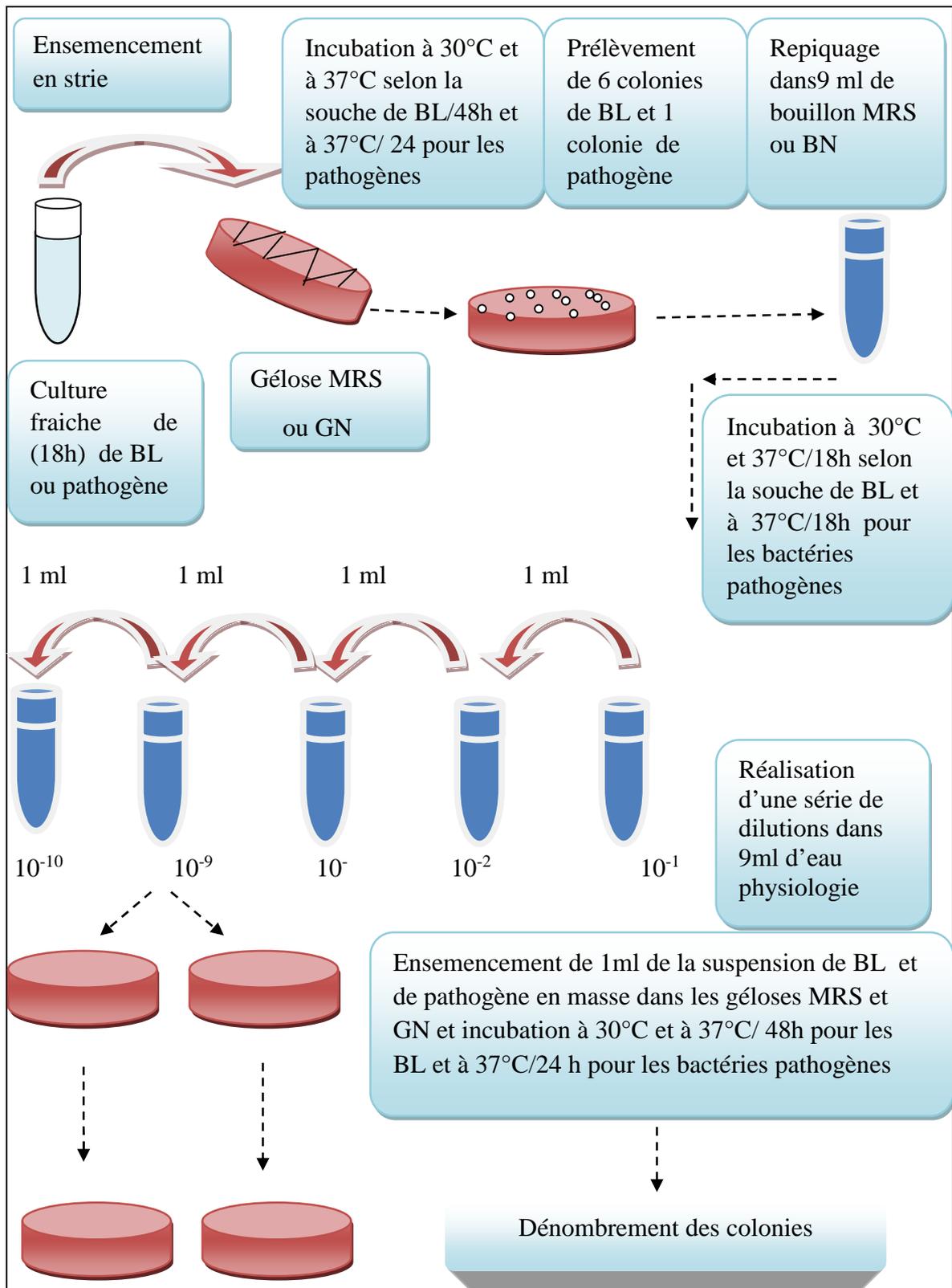


Figure 2 : Standardisation de l'inoculum de Bactéries lactiques et pathogènes.

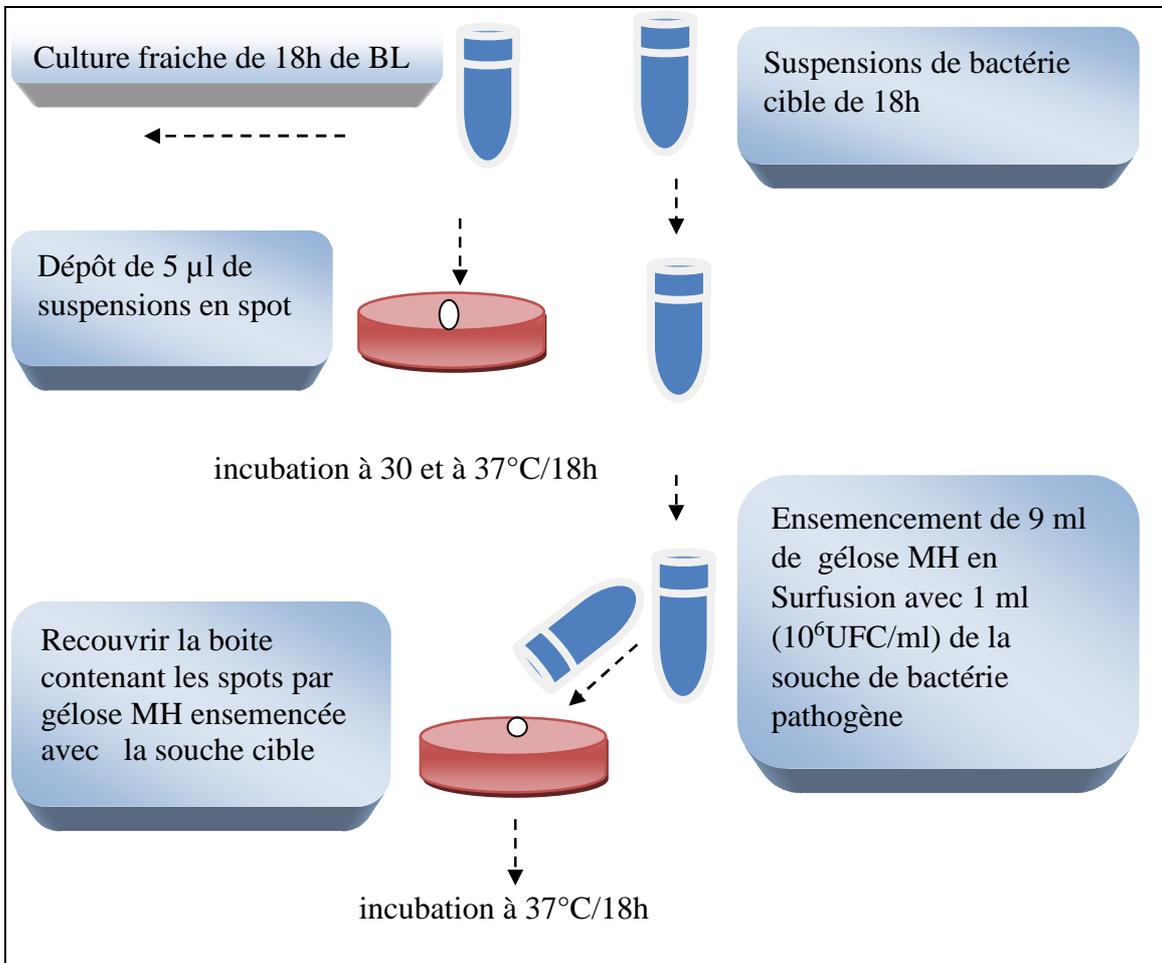


Figure 3: Test de spots

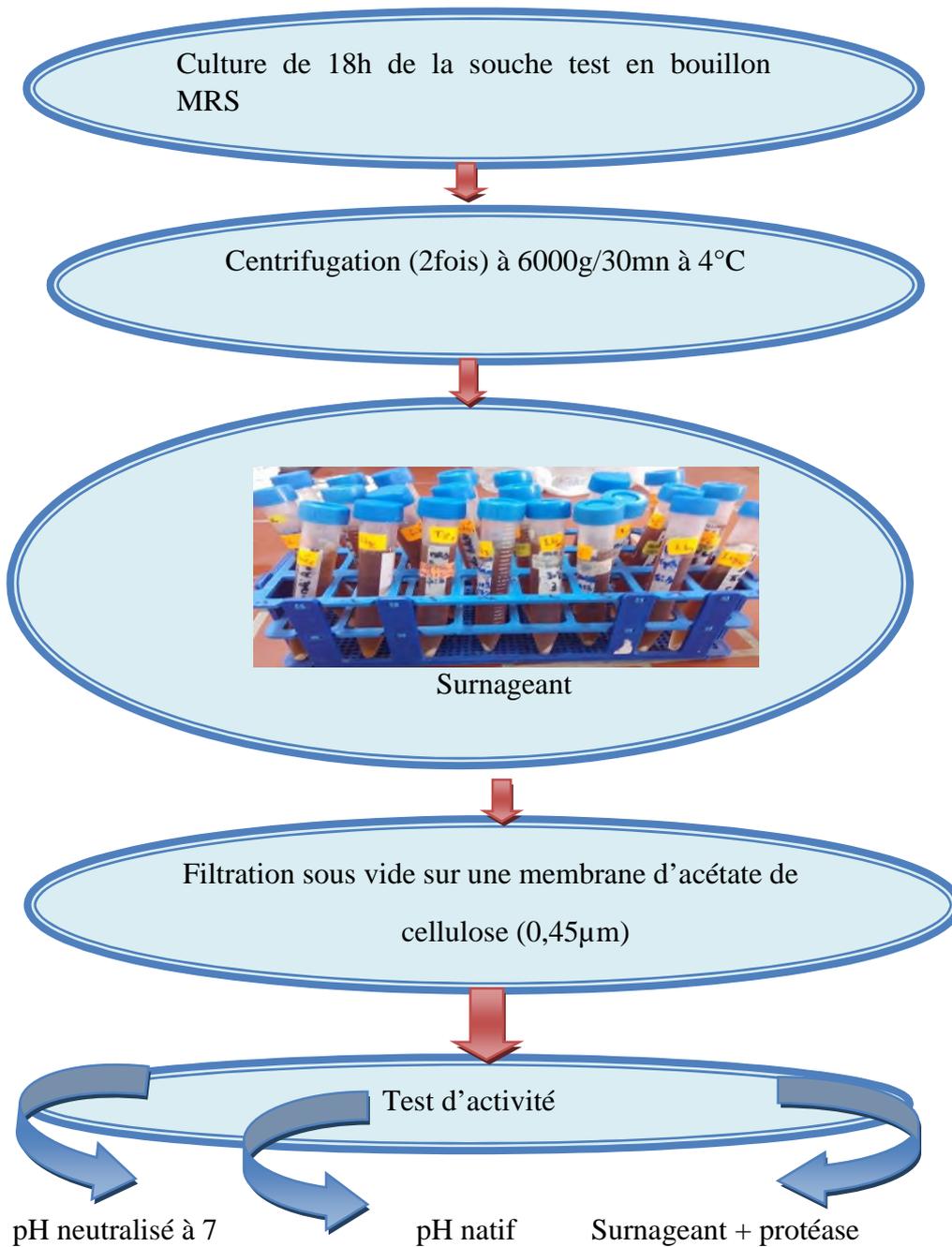


Figure 4: Protocole de récupération de surnageant de culture de bactéries lactiques
(Data et al .,1994) (modifié)

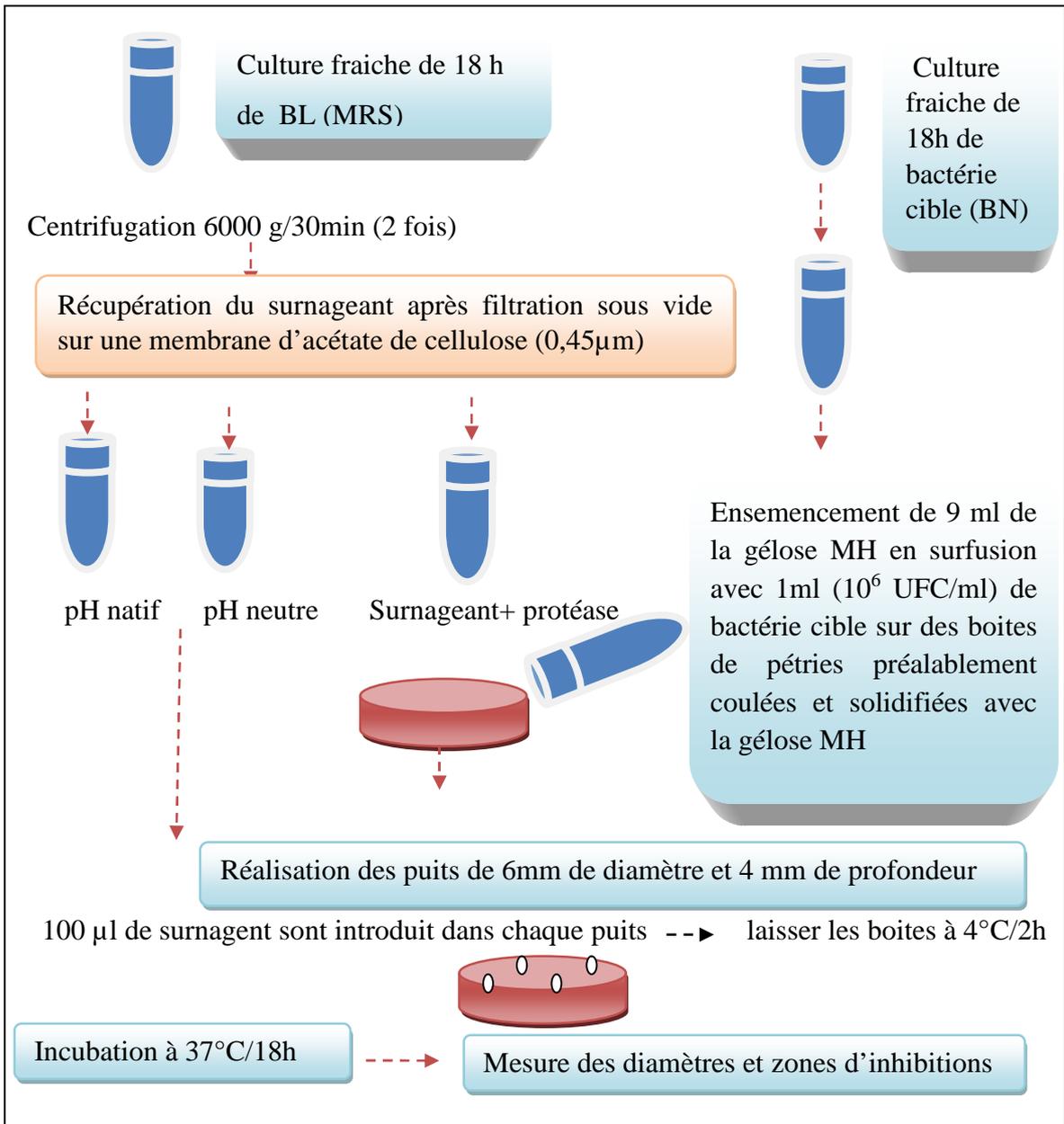


Figure 5 : Test de puits

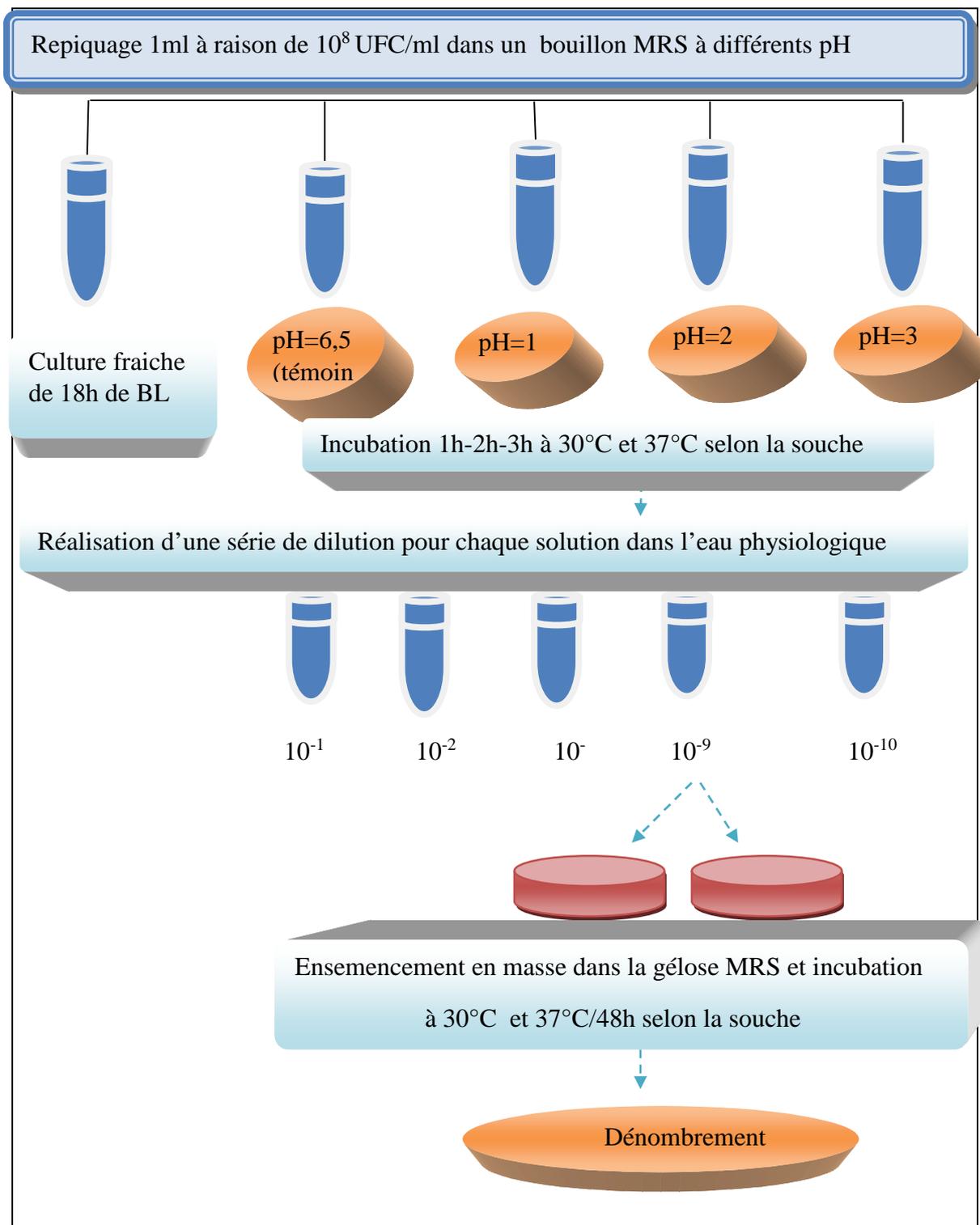


Figure 6 : Protocole d'étude de la tolérance de souche de bactéries lactiques à l'acidité gastrique.

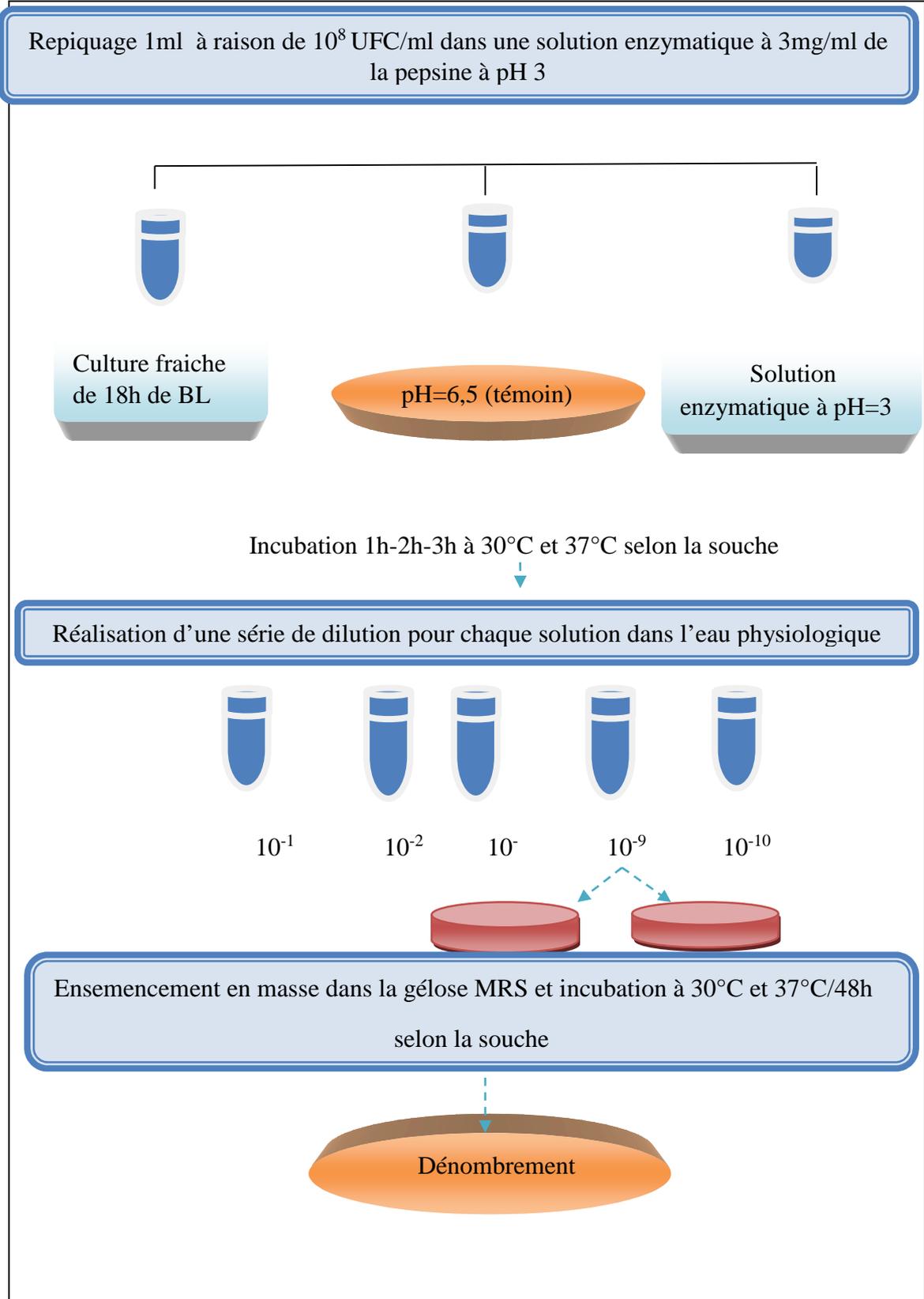


Figure 7 : Protocole de l'étude de la tolérance de bactéries lactiques à la pepsine

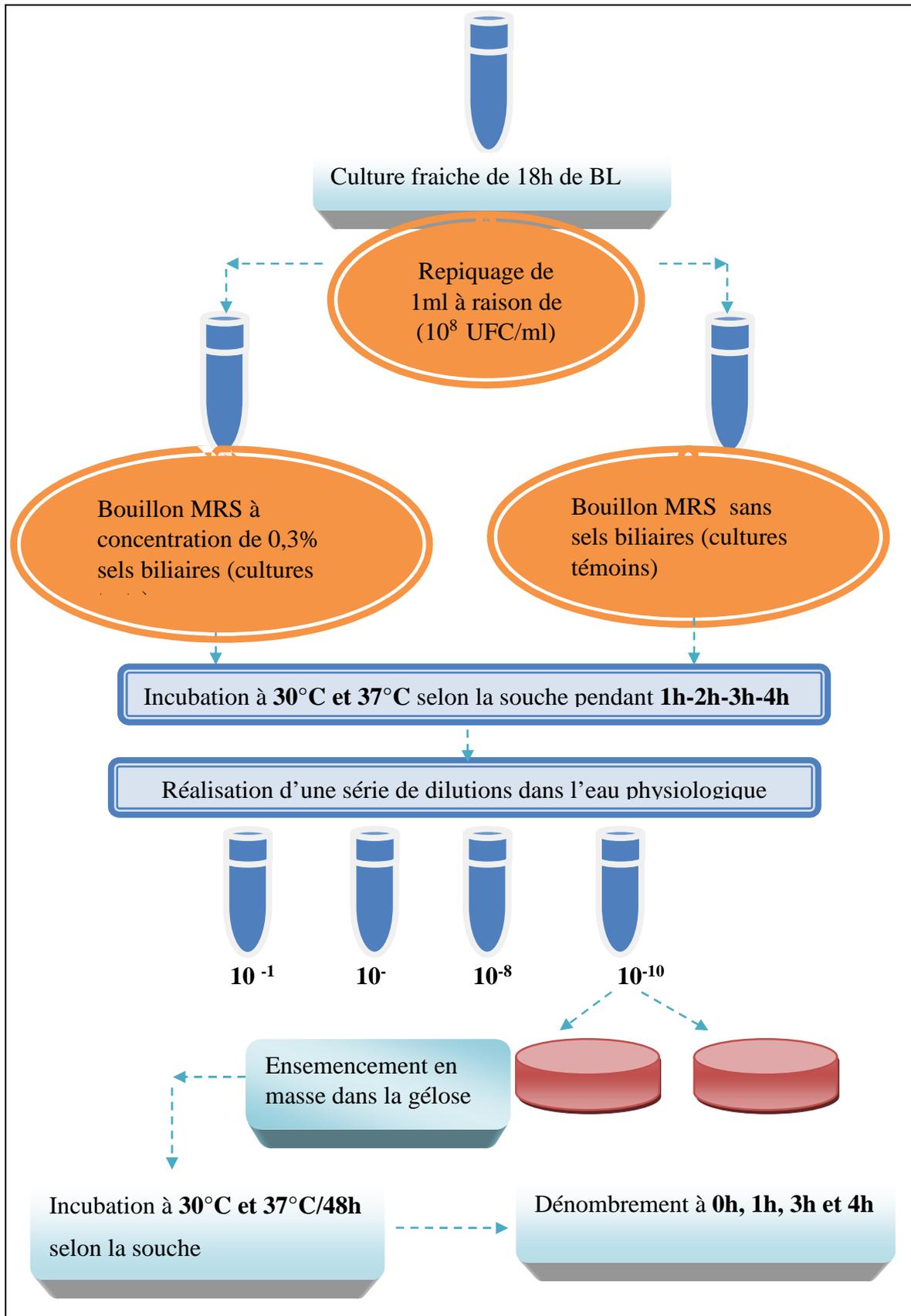


Figure 8: Protocole de l'étude de la tolérance des souches de BL à la bile.

Annexe III

Tableau I : Codes et origines des souches de bactéries lactiques.

Code et origine	Genre
1) St ₁ S : 02MRS PK7	<i>Streptococcus</i>
2) P ₁ S : 01MRS FENAIA	<i>Pediococcus</i>
3) P ₂ S : 02 MRS Fénaia	
4) P ₃ S : 03 MRS Fénaia	
5) P ₄ S : 01 MRS Timezerit	
6) P ₅ S : 05 M17 Timezerit	
7) P ₆ S : 04 MRS Amizour	
8) P ₇ S : C M 17 Adekar	
9) P ₈ S : 01 MRS Adekar	
10) P ₉ S : 07 MRS Tichy	
11) P ₁₀ S : 01 M17 PK7	
12) P ₁₁ BL S : 04 MRS	
13) P ₁₂ BL S : 03MRS	
14) P ₁₃ Timzrit S : 02 M17	
15) Lc ₁ S : 04 MRS Tizi	<i>Lactococcus</i>
16) Lc ₃ S : 03 MRS PK7	
17) Lc ₃ AMZ S : 02MRS	
18) Lc ₄ S : 02 MRS Ras Elma	
19) Lc ₅ S : 03 MRS Tizi	
20) Ln ₁ S : 05 MRS pk7	<i>Leuconostoc</i>
21) Ln ₂ S : 01 MRS Kendira	
22) Ln ₃ S : 02 Tizi MR	
23) Ln ₄ S : 02 MRS	
24) Ln ₅ S : 03 M17 LK	
25) Ln ₆ : 01 MRS Sétif	
26) Ln ₇ BL S : 01 MRS	
27) Ln ₈ S : 07MRS Setif	
28) Ln ₉ S : 02 MRS Setif	

29) Ln' ₁₀ S : A MRS Toudja	<i>Leuconostoc</i>
30) Ln' ₁₁ S : 01MRS LK	
31) Ln' ₁₂ S : 05LK	
32) Ln' ₁₃ S : 03Toudja MRS	
33) Lb ₁ S : 02 MRS Tichy	<i>Lactobacillus</i>
34) Lb' ₁ AMZ : D MRS	
35) Lb' ₂ : AMZ S:D MRS	
36) Lb ₂ S : 04 MRS pk7	
37) Lb' ₄ S : 09MRS TO	
38) Lb' ₅ S : 03Kendira MRS	
39) Lb' ₇ S : 03MRS Adekar	
40) Lb' ₈ S : 09 MRS Tichy	
41) Lb' ₉ S : 01MRS Amizour	
42) Lb' ₁₀ S :C MRS Amizour	
43) Lb ₁₁ S : A M17 Adekar	
44) Lb ₁₂ S : 03 MRS Tichy	
45) Lb ₁₃ S : 01 MRS Tichy	
46) Lb' ₁₄ S : 04 MRS Tichy	
47) Lb' ₁₅ S : 02 MRS Adekar	
48)Lb' ₁₆ S : 04 MRS Adekar	
49) Lb' ₁₇ S : 05 MRS Adekar	
50) Lb' ₁₈ S : 06 MRS Adekar	
51) Lb ₁₉ Adekar S:07 MRS	
52) Lb' ₂₀ S : B MRS	
53) Lb' ₂₂ S : 07 Adekar MRS	
54) Lb' ₂₃ S : 08 Tichy MRS	
55) Lb' ₂₄ S : 02 Tichy MRS	
56) Lb' ₂₅ S : 06 Tichy MRS	
57) Lb' ₂₆ S : 01 MRS Tichy	
58) Lb ₂₇ S : 06MRS PK7	

Tableau II : Résultats de la standardisation des souches de bactéries lactiques.

Genre	Code et origine	L'inoculum standard 10 ⁹ UFC/ml
<i>Streptococcus</i>	1) St ₁ S : 02MRS PK7	1,5
<i>Pediococcus</i>	2) P' ₁ S : 01MRS FENAI	4,2
	3) P' ₂ S : 02 MRS Fénaia	3,5
	4) P' ₃ S : 03 MRS Fénaia	1,3
	5) P' ₄ S : 01 MRS Timezerit	2,3
	6) P' ₅ S : 05 M17 Timezerit	1,5
	7) P' ₆ S : 04 MRS Amizour	2,6
	8) P' ₇ S : C M 17 Adekar	3,4
	9) P' ₈ S : 01 MRS Adekar	2,5
	10) P' ₉ S : 07 MRS Tichy	2,8
	11) P ₁₀ S : 01 M17 PK7	1,4
	12) P' ₁₁ BL S : 04 MRS	3,1
	13) P' ₁₂ BL S : 03MRS	4,1
	14) P' ₁₃ Timzrit S : 02 M17	2,7
	<i>Lactococcus</i>	15) Lc' ₁ S : 04 MRS Tizi
16) Lc ₃ S : 03 MRS PK7		2,3
17) Lc' ₃ AMZ S : 02MRS		1,8
18) Lc' ₄ S : 02 MRS Ras Elma		1,7
19) Lc' ₅ S : 03 MRS Tizi		1,3
<i>Leuconostoc</i>	20) Ln ₁ S : 05 MRS pk7	1,5
	21) Ln ₂ S : 01 MRS Kendira	6,2
	22) Ln' ₃ S : 02 Tizi MR	3,5
	23) Ln' ₄ S : 02 MRS	3
	24) Ln ₅ S : 03 M17 LK	2,8
	25) Ln ₆ : 01 MRS Sétif	2
	26) Ln' ₇ BL S : 01 MRS	3
	27) Ln' ₈ S : 07MRS Setif	1,5

<i>Leuconostoc</i>	28) Ln ₉ S : 02 MRS Setif	4,2
	29) Ln' ₁₀ S : A MRS Toudja	3,1
	30) Ln' ₁₁ S : 01MRS LK	1,6
	31) Ln' ₁₂ S : 05LK	2,5
	32) Ln' ₁₃ S : 03Toudja MRS	1,3
<i>Lactobacillus</i>	33) Lb ₁ S : 02 MRS Tichy	2
	34) Lb' ₁ AMZ : D MRS	2,6
	35) Lb' ₂ : AMZ S:D MRS	3
	36) Lb ₂ S : 04 MRS pk7	1,8
	37) Lb' ₄ S : 09MRS TO	2,3
	38) Lb' ₅ S : 03Kendira MRS	2
	39) Lb' ₇ S : 03MRS Adekar	3
	40) Lb' ₈ S : 09 MRS Tichy	3,6
	41) Lb' ₉ S : 01MRS Amizour	3,5
	42) Lb' ₁₀ S :C MRS Amizour	3,2
	43) Lb ₁₁ S : A M17 Adekar	5
	44) Lb ₁₂ S : 03 MRS Tichy	2,6
	45) Lb ₁₃ S : 01 MRS Tichy	4
	46) Lb' ₁₄ S : 04 MRS Tichy	3
	47) Lb' ₁₅ S : 02 MRS Adekar	2,3
	48) Lb' ₁₆ S : 04 MRS Adekar	2,6
	49) Lb' ₁₇ S : 05 MRS Adekar	2
	50) Lb' ₁₈ S : 06 MRS Adekar	2,1
	51) Lb ₁₉ Adekar S:07 MRS	1,3
	52) Lb' ₂₀ S : B MRS	1,5
	53) Lb' ₂₂ S : 07 Adekar MRS	1
	54) Lb' ₂₃ S : 08 Tichy MRS	1,3
	55) Lb' ₂₄ S : 02 Tichy MRS	3
	56) Lb' ₂₅ S : 06 Tichy MRS	4
	57) Lb' ₂₆ S : 01 MRS Tichy	5,1
58) Lb ₂₇ S : 06MRS PK7	1	

Tableau III : Résultats de la standardisation des souches de bactéries cibles.

Souches bactériennes	L'inoculum standard UFC/ml
<i>S.aureus</i> 1 Résistant à la Méthicilline	$2,5.10^8$
<i>E. coli</i> ATCC25922	$1,6.10^9$
<i>Listeria innocua</i>	8.10^7
<i>Salmonella typhi</i>	$1,2.10^7$
<i>Vibrio cholerae</i>	$3,4.10^8$
<i>S. aureus</i> 2 Résistant à la Méthicilline	$1,5.10^8$
<i>S.aureus</i> 1	$3,3.10^8$
<i>S. aureus</i> 2	$1,8.10^8$
<i>Enterococcus</i>	10^9
<i>Pseudomonas</i>	$4,5.10^8$

Tableau IV : Diamètres des zones d'inhibitions des cinquante huit (58) souches de bactéries lactiques vis-à-vis *E. coli* ATCC25922 et SARM1 (test de spots).

Souches BL Souches cible	<i>E. coli</i> ATCC25922	SARM 1	Souches BL Souches cibles	<i>E. coli</i> ATCC25922	SARM 1	Souches BL Souches cible	<i>E. coli</i> ATCC25922	SARM1	Souches BL Souches cibles	<i>E. coli</i> ATCC25922	SARM1
Lb ₁	19	24	Lb' ₁₆	8	10	P' ₅	22	6	Ln ₁	34	29
Lb' ₁	25	20	Lb' ₁₇	24	14	P' ₆	14	6	Ln ₂	14	24
Lb ₂	16	24	Lb' ₁₈	18	15	P' ₇	24	16	Ln' ₃	14	10
Lb' ₂	29	29	Lb' ₁₉	29	29	P' ₈	29	16	Ln' ₄	29	29
Lb' ₄	12	7	Lb' ₂₀	17	14	P' ₉	22	14	Ln' ₅	29	31
Lb' ₅	19	19	Lb' ₂₂	34	19	P' ₁₀	37	24	Ln ₆	29	29
Lb' ₇	24	6	Lb' ₂₃	39	29	P' ₁₁	29	16	Ln' ₇	29	34
Lb' ₈	24	16	Lb' ₂₄	37	36	P' ₁₂	25	22	Ln' ₈	28	34
Lb' ₉	24	9	Lb' ₂₅	29	29	P' ₁₃	22	22	Ln ₉	14	19
Lb' ₁₀	24	14	Lb' ₂₆	29	14	Lc' ₁	24	14	Ln' ₁₀	0	0
Lb ₁₁	22	14	Lb' ₂₇	29	34	Lc ₃	10	24	Ln' ₁₁	14	10
Lb ₁₂	24	16	p' ₁	17	16	Lc' ₃	34	29	Ln' ₁₂	17	18
Lb ₁₃	24	24	p' ₂	10	6	Lc' ₄	16	4	Ln' ₁₃	17	5
Lb' ₁₄	10	8	p' ₃	24	20	Lc' ₅	24	34	St ₁	20	8
Lb' ₁₅	7	19	P' ₄	16	14						

Tableau V : Diamètres de zones d'inhibitions des trente (30) souches de bactéries

lactiques sélectionnées vis-à-vis *S. aureus* 1, *S. aureus* 2, SARM 2, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas* et *Enterococcus* (test de spots).

		Diamètres des zones d'inhibitions (mm)							
Genres	Souches Cibles	<i>S. aureus</i> 1	<i>S. aureus</i> 2	SARM 2	<i>S. typhi</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>L. innocua</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterococcus</i>
	Souches BL								
<i>Lactobacillus</i>	Lb ₁	24	06	30	24	16	26	20	30
	Lb ₂	24	24	30	20	24	16	16	22
	Lb' ₂	18	18	20	24	24	24	30	20
	Lb' ₅	18	20	20	14	24	19	24	18
	Lb' ₈	16	33	30	14	24	19	22	24
	Lb ₁₂	24	30	16	16	26	20	18	22
	Lb ₁₃	30	0	0	15	29	26	18	24
	Lb' ₁₄	18	30	24	16	28	24	26	22
	Lb' ₁₇	38	32	16	30	22	0	32	24
	Lb' ₂₀	30	24	24	24	14	16	14	22
	Lb' ₂₂	20	32	18	24	25	22	26	24
	Lb' ₂₃	24	24	26	22	24	24	20	24
	Lb' ₂₄	30	28	20	28	26	19	26	28
	Lb' ₂₅	20	12	30	30	24	19	30	22
Lb' ₂₆	28	30	24	24	32	24	30	24	
<i>Pediococcus</i>	P ₃	26	24	24	0	24	16	22	24
	P ₇	30	24	16	6	21	6	16	22
	P ₈	24	22	16	16	24	30	24	18
	P ₁₀	40	40	24	4	19	14	18	24
	P' ₁₁	30	40	30	14	26	30	18	22
<i>Lactococcus</i>	Lc' ₁	20	24	30	26	24	26	26	22
	Lc ₃	20	24	40	14	6	26	26	30
	Lc' ₃	30	33	24	24	18	14	24	16
	Lc' ₅	18	24	24	14	18	19	22	14
<i>Leuconostoc</i>	Ln ₁	24	30	40	26	28	16	26	24
	Ln ₂	30	32	33	24	20	20	16	28
	Ln' ₃	30	40	24	0	24	24	18	22
	Ln' ₄	20	16	30	24	20	14	24	26
	Ln' ₇	0	26	30	14	30	16	14	24
<i>Streptococcus</i>	St ₁	30	18	30	24	16	24	24	24

Tableau VI : Diamètres de zones d'inhibitions des surnageants natifs des trente (30)

souches de bactéries lactiques vis-à-vis *S. typhi*, SARM 1, *L. innocua*,
E. coli (test de puits)

Genres	Souches Cibles Souches BL	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
		<i>S. typhi</i>	SARM 1	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>
<i>Lactobacillus</i>	Lb ₁	8	0	0	12
	Lb ₂	14	18	14	14
	Lb' ₂	20	20	0	14
	Lb' ₅	20	0	0	0
	Lb' ₈	30	32	30	10
	Lb ₁₂	18	28	0	4
	Lb ₁₃	14	0	0	12
	Lb' ₁₄	14	0	0	12
	Lb' ₁₇	14	0	0	12
	Lb' ₂₀	30	32	30	14
	Lb' ₂₂	24	0	0	16
	Lb' ₂₃	24	28	30	12
	Lb' ₂₄	30	16	0	14
	Lb' ₂₅	12	0	0	12
	Lb' ₂₆	16	0	0	14
<i>Pediococcus</i>	P' ₃	24	22	0	12
	P ₇	28	30	20	12
	P' ₈	28	14	0	6
	P ₁₀	20	24	30	12
	P' ₁₁	32	30	24	12
<i>Lactococcus</i>	Lc' ₁	30	34	26	0
	Lc ₃	30	30	32	12
	Lc' ₃	8	0	0	14
	Lc' ₅	30	34	30	18
<i>Leuconostoc</i>	Ln ₁	26	26	32	10
	Ln ₂	28	32	28	18
	Ln' ₃	10	18	0	12
	Ln' ₄	16	0	0	6
	Ln' ₇	20	24	0	18
<i>Streptococcus</i>	St ₁	32	26	24	0

Tableau VII : Résultats de diamètres des zones d'inhibitions des surnageants ajustés des trente (30) souches bactéries lactiques vis-à-vis *S. typhi*, SARM 1, *L. innocua*, *E. coli* (test de puits).

Genres	Souches cibles Souches BL	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
		<i>S. typhi</i>	SARM 1	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>
<i>Lactobacillus</i>	Lb ₁	8	0	0	10
	Lb ₂	2	6	0	12
	Lb' ₂	12	14	0	12
	Lb' ₅	12	0	0	8
	Lb' ₈	4	30	26	12
	Lb ₁₂	14	10	0	0
	Lb ₁₃	10	0	0	12
	Lb' ₁₄	8	0	0	10
	Lb' ₁₇	14	0	0	12
	Lb' ₂₀	20	0	24	22
	Lb' ₂₂	14	0	0	12
	Lb' ₂₃	24	28	14	12
	Lb' ₂₄	16	16	0	12
	Lb' ₂₅	12	0	0	0
	Lb' ₂₆	6	0	0	12
<i>Pediococcus</i>	P' ₃	12	14	0	6
	P ₇	24	18	18	10
	P' ₈	12	14	0	6
	P ₁₀	20	22	30	10
	P' ₁₁	24	0	16	12
<i>Lactococcus</i>	Lc' ₁	22	14	0	12
	Lc ₃	22	26	30	12
	Lc' ₃	0	0	0	0
	Lc' ₅	24	26	30	16
<i>Leuconostoc</i>	Ln ₁	24	12	30	8
	Ln ₂	22	30	16	10
	Ln' ₃	10	14	0	10
	Ln' ₄	10	0	0	6
	Ln' ₇	18	14	0	14
<i>Streptococcus</i>	St ₁	24	24	24	12

Tableau VIII : Diamètres de zones d'inhibitions des surnageants des cinq (5) souches de bactéries lactiques traités avec les protéases (Papine et trypsine) vis-à-vis SARM 1 et *E. coli* ATCC25922 .

Souche pathogène		SARM 1	Souche pathogène	
Surnageant de souche lactique + Papine		Diamètres des zones d'inhibitions en (mm)	Surnageant de souche lactique + trypsine	
			<i>E. coli</i> ATCC25922	
			Diamètres des zones d'inhibitions en (mm)	
Lc'5	0	Lc'5	0	0
St1	0	St1	0	0
Ln2	0	Ln2	0	0
Lb'23	0	Lb'23	0	0
P10	0	P10	0	0

Tableau IX: Résultats de l'antibiogramme des bactéries lactiques testées.

ATB Souches lactiques	Diamètres des zones d'inhibitions en (mm)				
	Peniciline G (PG)	Cefalexin (CN)	Imipenem (IPM)	Vancomycine (VA)	Ofloxacin (OFX)
Lb ₁	9	0	20	0	Non testé
Lb ₂	4	0	Non testé	6	Non testé
Lb' ₂	3	0	18	0	Non testé
Lb' ₅	8	0	Non testé	6	Non testé
Lb' ₈	10	8	30	0	4
Lb ₁₂	12	0	Non testé	4	Non testé
Lb ₁₃	14	0	Non testé	0	Non testé
Lb' ₁₄	18	0	Non testé	4	Non testé
Lb' ₁₇	14	0	24	0	Non testé
Lb' ₂₀	6	4	Non testé	6	Non testé
Lb' ₂₂	6	0	32	0	Non testé
Lb' ₂₃	8	0	20	0	Non testé
Lb' ₂₄	8	0	32	4	Non testé
Lb' ₂₅	6	0	24	4	Non testé
Lb' ₂₆	10	0	Non testé	4	Non testé
P' ₃	18	0	24	0	Non testé
P ₇	6	0	Non testé	0	Non testé
P' ₈	6	0	28	6	Non testé
P ₁₀	18	0	26	0	Non testé
P' ₁₁	12	8	30	0	Non testé
Lc' ₁	8	0	28	0	Non testé
Lc ₃	6	0	Non testé	4	2
Lc' ₃	4	0	30	2	Non testé
Lc' ₅	6	6	Non testé	0	Non testé
Ln ₁	4	0	30	0	Non testé
Ln ₂	6	0	Non testé	0	Non testé
Ln' ₃	5	0	Non testé	4	Non testé
Ln' ₄	8	6	22	4	Non testé
Ln' ₇	18	0	26	0	Non testé
St ₁	6	0	10	4	Non testé

Tableau X: Dénombrement des cinq (5) souches de bactéries lactiques sélectionnées à
pH 1, 2, 3 et 6,5.

Ph Souches lactiques (10 ⁸ UCF/ml)	pH1				pH2				pH3				6,5(témoin)			
	0h	1h	2h	3h	0h	1h	2h	3h	0h	1h	2h	3h	0h	1h	2h	3h
Ln ₁	15	0,2	0	0	15	0,4	0,2	0,2	15	1	0,8	0,5	15	15	16	17
Lc' ₃	18	0,2	0	0	18	0,5	0,3	0	18	0,8	0,6	0,4	18	20	22	23
P ₁₀	14	0,3	0	0	14	0,5	0,1	0	18	0,8	0,6	0,4	14	15	16	17
Lb' ₈	15	0,2	0	0	15	0,4	0	0	15	1,3	1,2	0,7	15	16	17	18
St ₁	15	0,2	0	0	18	0,8	0,3	0	18	1,8	1,7	1	18	20	21	23

Tableau XI : Dénombrement des cinq (5) souches de bactéries lactiques sélectionnées en présence de la pepsine.

temps souche+ milieu de culture ($\times 10^8$ UFC/ml)	0h	1h	2h	3h
Ln ₁ + pepsine	15	0,9	0,2	0
Ln ₁ (témoin)	15	15	16	17
Lc' ₃ + pepsine	18	0,4	0,2	0,1
Lc' ₃ (témoin)	18	20	22	23
P ₁₀ + pepsine	14	0,7	0,2	0,2
P ₁₀ (témoin)	14	15	16	17
Lb' ₈ + pepsine	15	0,4	0,2	0,1
Lb' ₈ (témoin)	15	16	17	18
St ₁ + pepsine	18	0,9	0	0
St ₁ (témoin)	18	20	21	23

Tableau XII : Dénombrement des cinq (5) souches de bactéries lactiques en présence des sels biliaires.

temps d'incubation souche + milieu de culture ($\times 10^8$ UFC/ml)	0h	1h	2h	3h	4h
Ln ₁ + sel biliaire	1,5	0,6	0,5	0,4	0,4
Ln ₁ (témoin)	15	15	16	17	24
Lc' ₃ + sel biliaire	1,8	1,4	1	0,9	0,5
Lc' ₃ (témoin)	18	20	22	23	25
P ₁₀ + sel biliaire	1,4	0,8	0,8	0,8	0,4
P ₁₀ (témoin)	14	15	16	17	20
Lb' ₈ + sel biliaire	1,5	0,8	0,8	0,8	0,4
Lb' ₈ (témoin)	15	16	17	18	19
St ₁ + sel biliaire	1,8	1,3	1,3	0,7	0
St ₁ (témoin)	18	20	21	23	24

Annexe IV

Composition des milieux de culture et des solutions utilisées

Tableau I : Composition de bouillon nutritif (Guirand, 2003)

Composant	Quantité
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH final	7,2
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

❖ La composition de la **gélose nutritive** : Bouillon nutritif plus 15 g d'agar.

Tableau II : Composition de gélose Mueller-Hinton (Guiraud, 2003).

Composant	Quantité
Extrait de viande de bœuf	2g
Peptone de caséine	17,5g
Amidon	1,5 g
Agar	17 g
Eau distillée	1000 ml
pH final	7,4 +/- 0,2
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

Tableau III : Composition de bouillon MRS (Guiraud, 2003)

Composant	Quantité
Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
Phosphate bipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,2 g
Sulfate de manganèse, 4H ₂ O	0,05 g
Eau distillée	1000 ml
pH final	6,5 +/- 0,1
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

❖ La composition de la **gélose MRS** : Bouillon MRS plus 15 g d'agar

Tableau IV : Composition de gélose Columbia (Guiraud, 2003)

Composant	Quantité
Peptone (mélange)	20 g
Amidon	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Gélose	10 g
pH final	7,3
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	
Sang stérile	5%

Tableau V : Tampon phosphate (Contreras, 1997).

pH	Na₂HPO₄	KH₂PO₄
5,6	10,0 ml	190,0 ml
5,8	16,5 ml	183,5 ml
6	25 ml	175 ml
6,2	36 ml	164 ml
6,4	53,5 ml	146 ml
6,8	99 ml	101,0 ml
7	122 ml	78 ml
7,2	143 ml	57 ml
7,4	161 ml	39 ml
7,6	172,5 ml	27,5 ml
7,8	182,5 ml	17,5 ml
8	189 ml	11 ml

Tableau VI : Tampon PBS (Farias, 1994).

Composant	Quantité
Na ₂ HPO ₄	0,2g
Na ₂ H ₂ PO ₄	1,5g
NaCl	8g
KCl	0,2g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,1g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,13g
Eau distillée	1000ml
pH final	7,3
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

Tableau VII : Tampon HCl glycine (Farias, 1994).

Composant	Quantité
Glycine	50 ml
Eau distillé	50 ml
HCl	0,1 M
pH final	2,2 - 3,6

Tableau VIII : Volume de HCl nécessaire pour ajusté le tampon HCl glycine à différents pH

HCl	pH
44,0 ml	2,2
32,4 ml	2,4
24,2 ml	2,6
16,8 ml	2,8
11,4 ml	3
8,2 ml	6,4
8,2 ml	3,2
6,4 ml	5
3,4 ml	3,6

Tableau IX : Eaux physiologie (Guiraud, 2003)

Composant	Quantité
NaCl	9g
Eau distillé	1000 ml
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

Tableau X : Solution HCl à 1N (Guiraud, 2003)

Composant	Quantité
Eau distillé	100 ml
HCl	2 ml

Tableau XI : Solution NaOH (Guiraud, 2003)

Composant	Quantité
Eau distillé	1000 ml
NaOH	40 g

Résumé

Notre travail a porté sur la sélection de souches de bactéries lactiques douées de propriétés probiotiques. A l'issue de ce travail, cinquante-huit (58) souches appartenant aux cinq genres : *Lactobacillus* (26 souches), *Lactococcus* (5 souches), *Leuconostoc* (13 souches), *Streptococcus* (1 souche) et *Pediococcus* (13 souches) ont été isolées, purifiées et identifiées à partir des échantillons du l'ben traditionnel.

Les résultats fournis par l'étude *in vitro* de quelques propriétés probiotiques, sont intéressants. Les résultats de test de spot ont montré que les bactéries lactiques testées sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne à l'égard d'*E.coli* et SARM 1. En se basant sur ces résultats nous avons sélectionné trente (30) souches. Ces dernières ont révélé une action inhibitrice presque envers tous les pathogènes. Les surnageants natifs et neutralisés ont montré un effet inhibiteur envers les souches cibles utilisées alors que les surnageants traités avec des protéases n'ont montré aucun effet. Ces souches n'ont montré aucun pouvoir hémolytique envers les cellules sanguines humaines. Cependant, le test d'antibiogramme a révélé une résistance modérée de quelques souches envers quelques antibiotiques. Après la réalisation de ces tests nous avons sélectionné cinq souches chacune de chaque genre. Ces souches testées ont montré une résistance remarquable vis-à-vis des conditions hostiles de tractus gastro-intestinal : acidité, pepsine, sels biliaires, comme elles ont montré une capacité d'adhésion aux cellules épithéliales. Ces cinq souches peuvent être considérées comme souches probiotiques.

Mots clé : Bactéries lactiques, l'ben traditionnel, propriétés probiotiques,

Abstract:

Our work has focused on the selection of lactic acid bacteria strains endowed with probiotics properties. At the end of this working fifty-eight (58) strains Belonging to the five genera: *Lactobacillus* (26 strains) *Lactococcus* (5 strains), *Leuconostoc* (13 strains), *Streptococcus* (1 strain) and *Pediococcus* (13 strains) have been isolated, purified and identified from samples of the traditional dairy.

The results provided by the study *in vitro* of some properties of probiotics are interesting. The results of the test of spot have shown that our lactic acid bacteria are able to synthesize the inhibitors substance having the antibacterial activity toward *E. coli* and SARM 1. Based on the results we are selected thirty (30) strains. These thirty strains have revealed the inhibitory action towards almost all Pathogens. As well as that the supernatants, native, neutralize have watch the inhibitory effect toward pathogenic bacteria so the supernatants treaties with proteases were not shown any inhibitory effect. These strains were not shown any hemolytic power towards blood human cells. However, the antibiogram test a reveled a moderate resistance to some strains towards some antibiotics. After realization of these tests we have selected five strains each of every genus. These strains have shown remarkable resistance towards the hostile simulated conditions of the gastrointestinal tract: acid, pepsin, bile salts, As they have shown a capacity to adherence to epithelial cells. These five strains can be considered as probiotics bacteria.

Keywords: Lactic acid bacteria, traditional dairy, probiotic properties.