

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun –Tiaret–

Faculté Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Infectiologie

Présenté par :

Melle Bouchta Ibtissem

Melle Benhenni Imene Amina

Thème

Contribution à l'étude des propriétés fonctionnelles de certaines bactéries lactiques d'intérêt thérapeutique

Soutenu publiquement le 03 juillet 2024

Jury:

Grade

- | | |
|---|------------|
| ➤ Président: M. BENSaid M. O. | MCA |
| ➤ Encadrante: M ^{me} . BENGUIAR R. | MCA |
| ➤ Co-encadrante: M ^{me} . BENARABA R. | Pr |
| ➤ Examinatrice: M ^{me} . MOULAY M. | MCA |

Année universitaire 2023-2024

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciement

Avant tout nous remercions "**ALLAH**" le tout puissant qui nous donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre profond remerciement à

M^{me} **BENGUIAR R**, promotrice de ce mémoire, pour son aide précieuse, pour ses conseils, sa disponibilité, sa contribution efficace et ses encouragements et surtout sa patience et son soutien qui ont grandement contribué à mener à terme ce mémoire.

Nous remercions M^{me} **BENARABA R**. pour nous avoir fait l'honneur d'être notre Co-promotrice ainsi pour ses précieux conseils, ses orientations, pour tous son aide

Nous tenons à remercier profondément M **BENSAID M. O**. Pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance. Aussi, nous tenons à remercier profondément M^{me} **MOULAY M**. d'avoir accepté d'examiner notre travail

Nous remercions M^{me} **Ismail L**. Ingénieur du laboratoire de microbiologie de la faculté S.N.V qui nous a beaucoup aidées à réaliser ce travail dans des bonnes conditions.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Avant tout, je m'incline devant Dieu Tout - Puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir.

Je dédie ce modeste travail: Je tiens à commencer par la très chère dans le monde, qui remplit mon cœur de clarté, à l'idole immortelle, mes parents

*A ma chère Mère : **Fatiha***

Qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude, ce travail est le fruit de tes nombreux sacrifices et encouragements. Que DIEU vous protège et vous donne la pleine santé et le plein bonheur du monde.

*A mon cher Père : **Djilali***

Ce qui a été toujours mon support dans cette vie et la source de mes efforts, celui qui me donne le courage éclatant pour continuer à chaque fois que j'ai l'impression de reculer papa que DIEU vous protège. Que DIEU vous protège et vous donne la pleine santé et le plein bonheur du monde.

*A mon adorable petite soeur **Bouchra Ranim** qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.*

*A mes chers frères: **Ahmed, Abd el ellah, Ayoub** pour l'amour qu'il me réserve.*

A tous les membres de ma grande famille.

*Sans oublier mon binôme **Amina** pour son soutien moral sa patience et sa compréhension tout au long de ce mémoire.*



IBTISSEM

Dédicace

*Avant tout je remercie tout d'abord **ALLAH** de m'avoir donné le courage, la force, la santé, et la patience pour pouvoir accomplir ce travail*

A ceux qui ont donné sans relâche et sans cesse, à ceux qui ont été tendres et chaleureusement à l'écoute, à ceux qui auraient aimé me voir atteindre ce succès, je dédie ce travail

*A ma mère, **yamina***

*A mon père **khaled** je tiens à te remercier du plus profond de mon cœur pour tous tes encouragements afin de me dépasser et d'aller toujours plus loin .tu est le meilleur !*

*A ma mère **khaldia**, a cella qui m'a mis au monde et qui a toujours éclairé mon chemin par son amour, sa grande générosité, sa bonté que j'aime beaucoup*

*A mon cher frère **Moustapha** ; a mes chères sœurs **Soumia, Fatima, Aya, Nesrine***

*J'adresse aussi mes dédicaces À ma grande famille et mon binome **Ibtissem***



AMINA

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH :	Hydrolyse de l'arginine
ATCC :	American Type Culture Collection
C° :	Degré Celsius
DO :	Densité optique
LB1 :	Isolat 1 de blé fermenté
LB2 :	Isolat 2de blé fermenté
LB3 :	Isolat 3de blé fermenté
LB4 :	Isolat 4de blé fermenté
MRS:	Man- Rogosa Sharpe
NaCl:	Chlorure de sodium
PBS :	Tamponne phosphate salin
UFC :	Unité formant colonie
VP I et VP II :	Vogues- Proskaeur (I et II)
Sp :	Species

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Organigramme de la procedure experimentale	6
Figure 2 :	Pourcentage d'auto-agrégation des bactéries lactiques étudiées	16
Figure 3 :	Taux de co-agrégation des souches lactiques testées avec <i>E.coli</i>	18
Figure 4 :	Pourcentages de co-agrégation des souches lactiques testées avec <i>S.aureus</i>	19

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux 1 :	Materiel, produits chimiques et milieux de culture utilises dans cette etude	5
Tableaux 2 :	Aspects macroscopiques et microscopiques des bactéries lactiques étudiées	13
Tableaux 3 :	Caractères biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques étudiées	14
Tableaux4 :	Activité protéolytiques des isolats lactiques.	21

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 :** Composition des milieux de cultures utilisés
- Annexe 2 :** Préparation de tampon phosphate (pH 7,2)
- Annexe 3 :** Technique de coloration de Gram
- Annexe 4 :** Résultats de la production d'acétoïne des isolats lactiques
- Annexe 5 :** Résultats de l'activité hémolytique des isolats lactiques (LB1, LB4)
- Annexe 6 :** Résultats de l'activité protéolytique des isolats lactiques

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux.....	iii
Liste des annexes.....	iv

SOMMAIRE

Introduction	1
---------------------------	----------

Partie expérimentale

Chapitre I. Matériel et Méthodes

I.1.Objectifs de l'étude	4
I.2.Lieu et période de travail	4
I.3.Matériel	4
I.3.1.Matériel biologique	4
I.3.1.1.Souches bénéfiques	4
I.3.1.2.Souche lactique de référence	4
I.3.1.3.Souches pathogènes	5
I.3.2.Matériel de laboratoire et produits chimiques.....	5
I.4.Méthodes	6
I.4.1.Procédure expérimentale.....	6
I.4.2.Revivification des isolats lactiques	7
I.4.3.Purification.....	7
I.4.4.Pré-identification des bactéries lactiques isolées	7
I.4.4.1.Caractères morphologiques.....	7
I.4.4.2.Caractères biochimiques	8
I.4.4.3.Caractères physiologiques.....	8
I.4.4.4.Évaluation des propriétés probiotiques	9

I.4.4.4.1. Innocuité des souches.....	9
I.4.4.4.1.1.Activité hémolytique.....	9
I.4.4.4.2.Propriétés adhésives.....	10
I.4.4.4.2.1.Auto-agrégation	10
I.4.4.4.2.1.Co-agrégation.....	10
I.4.4.4.3.Propriétés technologiques	11
I.4.4.4.3.1.Activité protéolytique	11
I.4.4.4.4.Conservation des souches à long terme	11

Chapitre II. Résultats et Discussion

II.1.Identification phénotypique des isolats lactiques issus du blé fermenté	13
II.1.1.Caractères morphologiques	13
II.1.2.Caractères biochimiques et physiologiques.....	14
II.2.Évaluation des propriétés probiotiques	16
II.2.1.Innocuité des souches.....	16
II.2.1.1.Activité hémolytique	16
II.2.2.Propriétés adhésives	17
II.2.2.1.Auto-agrégation.....	17
II.2.2.2.Co-agrégation	18
II.3.Propriétés technologiques.....	21
II.2.3.1.Activité protéolytique	21
Conclusion et Perspective.....	24

Références Bibliographiques

Annexes

Résumé

ملخص

Introduction

Introduction

Actuellement, la nécessité croissante d'aliments sains a incité l'industrie alimentaire à développer de nouveaux produits fonctionnels. Ces aliments fonctionnels englobent ceux qui, en plus de leur valeur nutritionnelle fondamentale, offrent des avantages pour la santé des consommateurs **(Ghazanfar et al., 2022)**. Parmi ces aliments fonctionnels, les probiotiques ont émergé comme des acteurs clés, suscitant un intérêt considérable en raison de leurs implications potentielles pour la santé intestinale et globale. Les probiotiques sont des micro-organismes vivants lorsqu'ils sont administrés en quantités appropriées peuvent contribuer à améliorer la santé et le bien-être de l'hôte **(Ashaolu, 2020)**. Ces derniers sont souvent vantés pour leurs effets bénéfiques sur la santé, ainsi que leur capacité à influencer des maladies telles que le cancer et l'obésité, qui sont associées à des déséquilibres de la flore intestinale **(Srinivash et al., 2023)**. Leur efficacité dépend en grande partie du choix de l'espèce et même de la souche bactérienne spécifique sélectionnée. Parmi les souches bactériennes vivantes choisies pour leur contribution essentielle au maintien de l'équilibre intestinal, les bactéries lactiques se distinguent **(Yadav et Shukla, 2017)**.

Les bactéries lactiques présentent comme des candidats probiotiques prometteurs en raison de leurs multiples bienfaits pour la santé. Cependant, il est important de noter que toutes les bactéries ne peuvent pas être qualifiées de probiotiques, et il est crucial d'évaluer leurs caractéristiques probiotiques ainsi que leur innocuité. Ces microorganismes doivent présenter une forte résistance à l'acidité pour survivre dans les conditions très acides de l'estomac **(Brodkorb et al., 2019)**. En outre, leur capacité à adhérer dans le tractus gastro-intestinal (muqueuse intestinale et cellules épithéliales), empêche leur élimination par la motilité intestinale. Grâce à cette adhésion, ils peuvent se reproduire, coloniser et influencer le système immunitaire, tout en éliminant de manière compétitive les agents pathogènes **(Ashaolu, 2020)**. Cette capacité démontre leur aptitude à la bioconservation des aliments et peut être utilisée comme culture starter dans le processus de fermentation sous des conditions contrôlées. Par conséquent, l'isolement et la caractérisation des bactéries lactiques à partir de différents aliments et produits fermentés traditionnels ont suscité un intérêt de recherche ces dernières années **(Alonso et al., 2019)**. Parmi les substrats alimentaires favorisant leur croissance, le blé fermenté émerge comme une source prometteuse, offrant une plateforme naturelle pour l'isolement et l'étude des bactéries lactiques.

Le Hamoum, un type de blé traditionnellement fermenté en Algérie, est fabriqué par fermentation naturelle dans un silo souterrain appelé Matmora **(Benmehel et al., 2019)**. Au-delà de ses qualités sensorielles et gustatives, la fermentation confère au blé des

Introduction

caractéristiques nutritionnelles enrichies et favorise la prolifération de microorganismes bénéfiques. Il est réputé pour ses propriétés préventives contre les troubles physiopathologiques intestinaux (**Nithya et al., 2023**). Les bactéries lactiques isolées du blé fermenté peuvent offrir une solution prometteuse largement utilisée dans les domaines médical et alimentaire. Toutefois, peu d'études ont étudié de manière approfondie les propriétés probiotiques des bactéries lactiques isolées à partir du blé fermenté traditionnel, que ce soit in vitro ou in vivo.

Dans cette optique, l'objectif de cette étude consiste à poursuivre l'identification phénotypique de quatre bactéries lactiques isolées à partir du blé fermenté d'une part, et d'autre part, évaluer in vitro, leurs propriétés fonctionnelles et technologiques, en mettant l'accent sur leur potentiel thérapeutique. Et ce afin de sélectionner parmi ces dernières la souche présentant le plus grand potentiel probiotique et pouvant être utilisée dans le domaine biotechnologique ou dans des stratégies nutritionnelles préventives contre certaines pathologies.

Chapitre I

Matériel et Méthodes

I.1.Objectifs de l'étude

Cette présente étude vise à poursuivre l'identification phénotypique de quatre bactéries lactiques codées LB1, LB2, LB3 et LB4 isolées à partir du blé fermenté traditionnel (HAMOUM). Elle s'intéresse également à l'évaluation de leurs propriétés probiotiques fonctionnelles et technologiques.

Les propriétés probiotiques de ces quatre isolats ont été comparées à celle d'une souche lactique probiotique du genre *Lactobacillus* sp. choisie comme référence.

I.2.Lieu et période de travail

La partie expérimentale relative à cette étude a été effectuée aux laboratoires de Microbiologie et de Biochimie au niveau de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Ibn Khaldoun de Tiaret durant la période allant du 21/02/2024 jusqu'au 14/03/2024.

I.3.Matériel

I.3.1.Matériel biologique

I.3.1.1.Souches bénéfiques

- **Isolats des bactéries lactiques issus du blé fermenté**

Les bactéries utilisées au cours de cette étude pour l'évaluation des propriétés probiotiques sont des isolats lactiques codés LB1, LB2, LB3 et LB4 isolés à partir de blé fermenté traditionnel de type Hamoum durant l'année 2022 au niveau du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Ibn Khaldoun, Tiaret. Ces isolats ont été conservés à long terme en présence de 70 % de lait écrémé et 30 % de glycérol et stockés à -20 °C.

I.3.1.2.Souche lactique de référence

Une souche lactique probiotique du genre *Lactobacillus* sp. isolée d'un complément alimentaire commercialisé sous le nom de Lactibiane®.

I.3.1.3.Souches pathogènes

Les souches pathogènes utilisées dans cette étude sont *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) ATCC6528 et *Escherichia coli* (*E.coli*) ATCC25929, ces souches nous ont été fournies par le laboratoire Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Ibn Khaldoun de Tiaret.

I.3.2.Matériel de laboratoire et produits chimiques

Le matériel, les produits chimiques et les milieux de culture nécessaires à la réalisation de ce travail sont présentés dans le tableau 1:

Tableau1.Matériel, produits chimiques et milieux de culture utilisés dans cette étude.

Appareillages	Milieux de cultures	Produits chimiques et réactifs	Verreries et Autres
Autoclave	Man, Rogosa et Sharpe(MRS) liquide et solide	Violet de gentiane	Embouts jaune et bleu
Vortex (Velp)		Fuchsine	Boites de Pétri
Etuve (Memmert)	Bouillon nutritif	Lugol	Pipette Pasteur
Microscope optique (Optica)	Gélose au sang	Alcool	Tubes à essai
Centrifugeuse (Sigma)		Huile à immersion	Béchers
Bain marie(GFL)		Chlorure de sodium (NaCl)	Anse de platine
Spectrophotomètre (Jenway 7205)		Vogues- Proskaeur (I et II)	Becbunsen
Balance analytique (Ohaus)		Tampon Phosphate (pH=7,2)	

I.4.Méthodes

I.4.1.Procédure expérimentale

La démarche expérimentale concernant cette étude est illustrée par l'organigramme suivant :

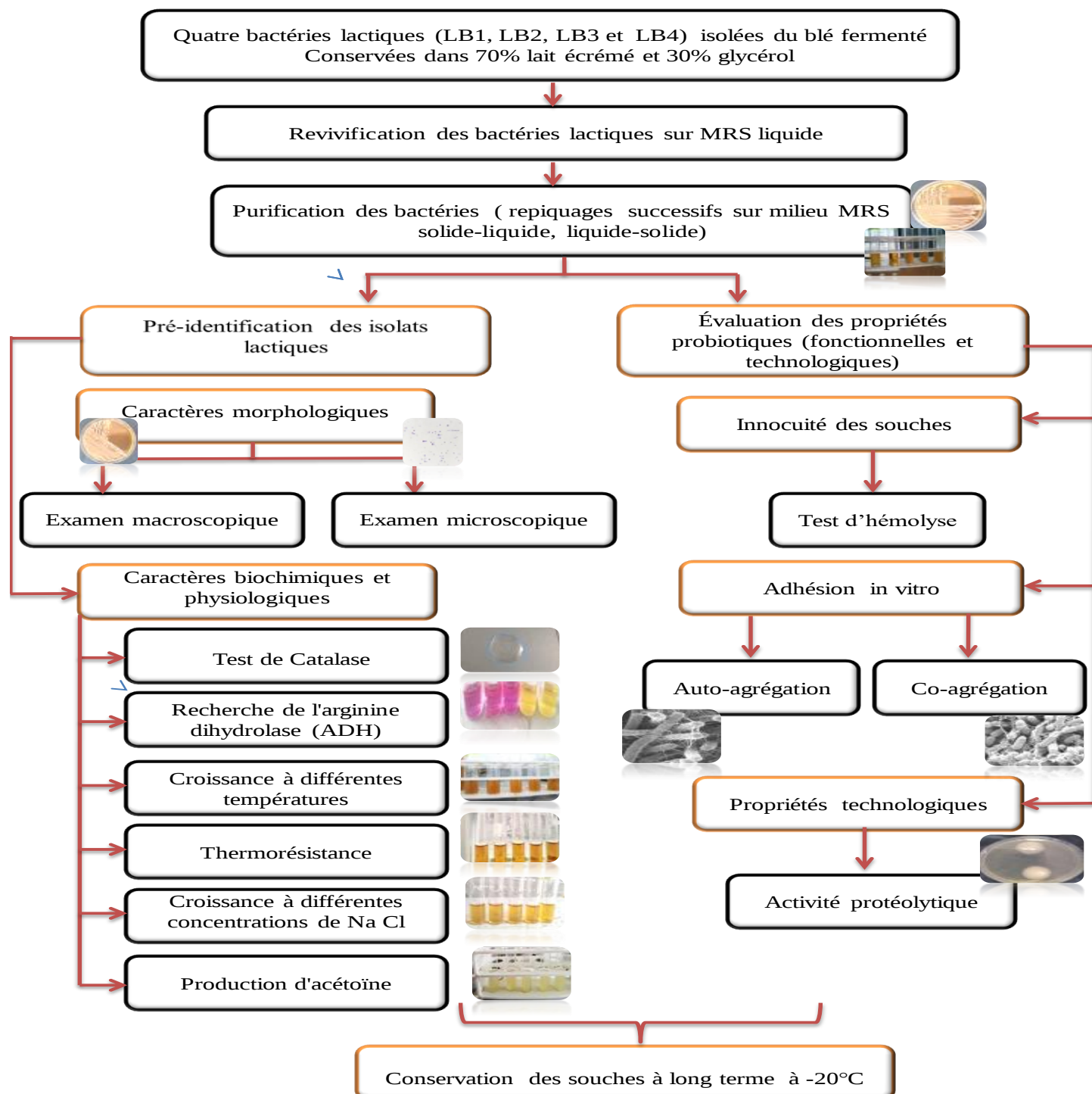


Figure 1. Organigramme récapitulatif de la démarche expérimentale

I.4.2.Revivification des isolats lactiques

Des prélèvements d'isolats de cultures pures préalablement conservés à long terme à -20 °C ont été inoculés dans un bouillon MRS. Ces inoculations ont été suivies d'une incubation à 37 °C pendant 24 h dans des conditions aérobies (LB1, LB2, LB3) ou anaérobies (LB4 et *Lactobacillus* sp.).

I.4.3.Purification

La purification de ces isolats a été effectuée par des repiquages successifs sur milieu MRS liquide puis un isolement en stries sur gélose MRS. La pureté des bactéries a été confirmée par des observations macroscopiques et microscopiques.

I.4.4.Pré-identification des bactéries lactiques isolées

Après la purification, les isolats obtenus ont subi une pré-identification en se basant sur les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques (Labioui et al., 2005).

I.4.4.1Caractères morphologiques

❖ Examen macroscopique

Cet examen implique une observation visuelle des colonies obtenues sur la gélose MRS après incubation à 37 °C, où l'on décrit leur couleur, taille, contour et aspect, entre autres caractéristiques (Delarras, 2007).

❖ Examen microscopique

Cet examen a été effectué sur un échantillon bactérien prélevé à partir des colonies en culture pure, puis préparé sous forme de frottis et soumis à la méthode de coloration de Gram (voir annexe 3). Cette méthode permet de déterminer la morphologie des cellules bactériennes, y compris leur taille, leur forme et leur mode d'association (Carr et al., 2002).

I.4.4.2.Caractères biochimiques

❖ Test de la catalase

➤ Principe

La catalase est une enzyme respiratoire qui libère l'eau et l'oxygène du peroxyde d'hydrogène (Delarras, 2007).



➤ Technique

Cette méthode consiste à prendre une colonie et à la déposer dans une goutte de peroxyde d'oxygène. La formation de bulles est un signe de réaction positive (Delarras, 2007).

❖ Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

Ce test permet de déterminer la capacité des bactéries à dégrader un acide aminé qui est l'arginine. La culture dans le milieu de base se manifeste par un virage au jaune du milieu dû au métabolisme de glucose. Si la souche dégrade l'arginine, elle produit l'ammoniac qui va augmenter le pH du milieu et on observe un virage de couleur au violet (Hariri et al., 2009).

➤ Technique

Un milieu Moeller additionné d'arginine a étéensemencé par une suspension bactérienne, puis incubé à 37°C pendant une durée comprise entre 24 h à 48 h (Hariri et al., 2009).

I.4.4.3.Caractères physiologiques

❖ Croissance à différentes températures

Des cultures jeunes de chaque isolat lactique ont été inoculées séparément dans des tubes contenant le bouillon MRS. Ces tubes ont ensuite été incubés à des températures différentes, 30°C, 37°C et 45°C pendant une période allant de 24h à 72h. La croissance bactérienne se traduit par l'apparition de trouble dans le milieu, comparativement au tube témoin non ensemencé (Badis et al., 2005 ; Hariri et al., 2009)

❖ Test de la thermorésistance

Des tubes à essai contenant 5 mL de bouillon MRS sont inoculés par chacune des cultures jeunes des bactéries lactiques et placés dans un bain-marie à une température de 63,5 °C pendant 30 min. Ensuite, ces derniers ont été incubés à 30 °C, l'apparition d'un trouble indique que la bactérie est thermorésistante (**Badis et al., 2005**).

❖ Croissance à différentes concentrations de NaCl

Des cultures bactériennes jeunes ont été inoculées dans des tubes contenant 5mL de bouillon MRS additionné séparément de 6,5% et 9,5% de NaCl. Ensuite, ces tubes ont été incubés à 37°C pendant 48h. La croissance est appréciée par l'apparition des troubles en comparaison avec un témoin non ensemencé (**Idoui et al., 2009**).

❖ Production d'acétone

Pour réaliser ce test, du lait écrémé stérile a été réparti dans des tubes. Chaque tube a été inoculé avec une culture jeune de bactérie lactique. Après une incubation à 37 °C pendant 24 h et vérification de la coagulation, cinq gouttes des réactifs VPI et VPII ont été ajoutées à chaque tube montrant une réaction positive, suivie d'une agitation vigoureuse. Après un délai de 10 min, une coloration rouge a indiqué la présence de l'arôme (**N'tcha et al., 2016**).

I.4.4.4.Évaluation des propriétés probiotiques

I.4.4.4.1.Innocuité des souches

I.4.4.4.1.1.Activité hémolytique

Des cultures bactériennes jeunes ont été ensemencées en stries sur une gélose au sang frais, contenant 5% (v/v) de sang de cheval, et ensuite incubées pendant 48 h à 37 °C. Après incubation, les souches bioactives ont été évaluées pour leur capacité à dégrader le sang, se manifestant par la présence d'un halo clair autour des colonies démontrant une β -hémolyse et d'une zone verdâtre autour des colonies exhibant une α -hémolyse (**Lee et al., 2011**).

I.4.4.4.2. Propriétés adhesives

I.4.4.4.2.1. Auto-agrégation

L'auto-agrégation de surface cellulaire a été réalisée selon la méthode décrite par **Abdulla et al. (2014)** avec des modifications. Les cultures bactériennes de chaque isolat lactique incubées à 37°C pendant 18 h ont été centrifugées à 4500 g pendant 15 min et à 4°C. Après centrifugation, les cellules récoltées ont été lavées deux à trois fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS ; pH 7,2). Ces derniers ont été remis en suspension dans 4ml du tampon cité précédemment. Les suspensions cellulaires ainsi obtenues ont été ajustées à un inoculum initial 10^8 UFC/ml (A_0). Ensuite 4ml de chaque suspension bactérienne ont été vortexés pendant 10 s et incubées à 37 °C pendant 3h. Après 3h d'incubation, la suspension supérieure a été récupérée et l'absorbance finale a été lue à 625nm (A_1). Le pourcentage de l'auto-agrégation des cellules bactériennes a été calculé par la formule suivante:

A_0 : DO à 0h

$$A \% = 1 - (A_1/A_0) \times 100$$

A_1 : DO à 3 h

I.4.4.4.2.1. Co-agrégation

Les taux de co-agrégation entre les souches lactiques et deux souches pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC6528 et *Escherichia coli* ATCC25929) ont été évalués en utilisant la méthode décrite par **Abushelaibi et al. (2014)**, qui repose sur la mesure des densités optiques des souches lactiques en l'absence et en présence du pathogène.

Les suspensions cellulaires ont été préparées selon la méthode décrite pour l'auto-agrégation. Des volumes de 2 mL de suspensions de la souche lactique testée et de la souche pathogène ont été mélangés, puis vortexés pendant 10 secondes, avant d'être incubés pendant 3 h à 37°C. Ces suspensions cellulaires de chaque souche individuelle ont été utilisées comme témoins. Après incubation, l'absorbance des souches lactiques testées (A_x), des souches pathogènes (A_y) et du mélange [$A_{(x+y)}$] a été mesurée à 620 nm. Le pourcentage de co-agrégation a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Co-agrégation \%} = \{(A_{X0} + A_{Y0})/2 - A_{(x+y)} / (A_{X0} + A_{Y0})/2\} \times 100$$

A_{X0} : DO en présence de la bactérie lactique à 0h

A_{Y0} : DO en présence de la bactérie pathogènes à 0h

$A_{(x+y)}$: DO du mélange après 3 h d'incubation

I.4.4.4.3. Propriétés technologiques

I.4.4.4.3.1. Activité protéolytique

L'étude de l'activité protéolytique des isolats lactiques a été réalisée par la méthode du disque sur gélose MRS additionnée de 10% de lait écrémé. Des disques imprégnés de 10 μ L de chaque suspension bactérienne ont été déposés à la surface de la gélose. Ensuite, les boîtes de Pétri ont été incubées à 30 °C et à 37 °C pendant 24 h. La lecture des résultats s'effectue en mesurant les diamètres des zones d'hydrolyse autour des disques. L'activité protéolytique a été classée en fonction des diamètres des halos : très élevée pour un halo supérieur à 10 mm, moyenne pour un halo de 3 à 10 mm, et faible pour un halo inférieur à 3 mm (**Alapont et al., 2015**). Tous les tests ont été réalisés en trois répétitions

I.4.4.4.4. Conservation des souches à long terme à -20°C

La conservation à long terme des isolats purifiés est réalisée dans un milieu contenant 70% de lait écrémé et 30% de glycérol et conservés à une température de -20 °C au congélateur (**Badis et al., 2005**).

Chapitre II

Résultats et discussion

II.1. Identification phénotypique des isolats lactiques issus du blé fermenté

Les résultats des caractères morphologiques sont présentés dans le tableau 2.

II.1.1. Caractères morphologiques

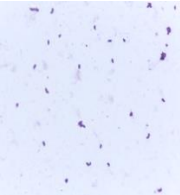
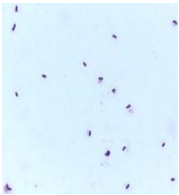
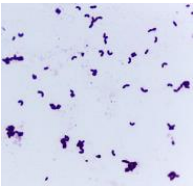
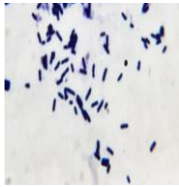
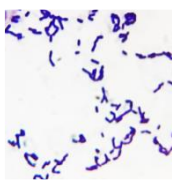
- **Examen macroscopique**

Les différentes bactéries lactiques étudiées présentent des aspects macroscopiques variés, mettant ainsi en évidence la diversité des colonies observées. Les colonies des isolats LB1, LB2 et LB3 se caractérisent par leurs petites tailles, leurs formes arrondies, bombées et leurs surfaces lisse de couleur blanche. Par ailleurs, les colonies des isolats LB4 et la souche de référence *Lactobacillus* sp. sont de taille moyenne, avec une forme bombée et une surface lisse de couleur blanchâtre, et présentant des contours réguliers.

- **Examen microscopique**

L'examen microscopique a révélé que les quatre souches lactiques étudiées sont de Gram positive ayant des formes différentes. Les cellules de trois bactéries LB1 LB2 et LB3 se présentent sous forme coccobacilles à ovoïdes isolées, ou regroupées en paires par ailleurs, les bactéries LB4 et *Lactobacillus* sp. présentent des cellules de forme bacillaire, isolées ou disposées en amas.

Tableau 2.Aspects macroscopiques et microscopiques des bactéries lactiques étudiées

Bactéries Lactiques	LB1	LB2	LB3	LB4	<i>Lactobacillus</i> sp.
Aspect macroscopique					
Aspect microscopique (Objectifx100)					

II.1.2.Caractères biochimiques et physiologiques

Les résultats des caractères biochimiques et physiologiques sont indiqués dans le tableau est au dessous.

Tableau 3. Caractères biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques étudiées.

Souches	LB1	LB2	LB3	LB4	<i>Lactobacillus</i> sp.
Catalase	-	-	-	-	-
ADH	+	+	+	-	-
Croissance à différentes T°C					
30°C	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+
45°C	+	-	+	+	+
Thermorésistance					
63,5°C/30min	-	-	-	-	-
Croissance à 6,5% Na Cl	-	-	-	-	-
Croissance à 9,5% Na Cl	-	-	-	-	-
Production d'acétoïne	-	-	-	-	-

- : Résultat négatif

+ :Résultat positif

Les résultats obtenus dévoilent que les cinq bactéries étudiées ne produisent pas de catalase. Parallèlement, les souches codées LB1, LB2 et LB3 sont capable d'hydrolyser l'arginine, elles sont donc ADH +. Cependant, les bactéries LB4 et la souche probiotique de *Lactobacillus* sp. n'hydrolysent pas l'arginine. Ce qui est en accord avec **Boukhemis et al. (2009)**, ces auteurs confirment dans leurs travaux la non capacité d'hydrolyser l'arginine de certaines souches du genre *Lactobacillus* à l'instar *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subs. *bulgaricus* et *Lb. plantarum* isolées à partir de différents biotopes. Par ailleurs, l'hydrolyse de l'arginine par les souches LB1, LB2 et LB3 corroborent ceux dévoilé par **Saidane et al. (2022)**, ces derniers ont montré que la souche *Leuconostoc* isolée à partir d'un fromage artisanal algérien est capable d'hydrolyser l'arginine en ammoniac.

L'identification physiologique a démontré que toutes les souches testées se développent à des températures de 30°C, 37°C et 45°C, à l'exception de la souche LB2 qui est incapable de croître à une température de 45°C. De plus, aucune des souches étudiées n'est capable de se multiplier à une température de 63,5°C.

De même, toutes les souches étudiées se sont révélées incapables de se multiplier dans un milieu hypersalé contenant entre 6,5% et 9,5% de NaCl.

Les résultats concernant la production d'acétoïne révèlent que toutes les souches étudiées ne produisent pas l'acétoïne.

Les résultats des caractères biochimiques et physiologiques des isolats de coccobacilles, LB1, LB2 et LB3, notamment l'hydrolyse de l'arginine, l'intolérance à un milieu hypersalé et l'absence de production d'acétoïne, ainsi que les résultats de l'année précédente, confirment que ces isolats appartiennent au genre *Leuconostoc*, ceci sont identiques aux caractéristiques de l'identification phénotypique de ce genre décrites par **Zarour et al.,(2013)**; **Terpou et al., (2019)** et **Saidane et al., (2022)**.

D'autre part, les résultats de l'identification de l'isolat lactique LB4 ont confirmé que cette bactérie appartient au genre *Lactobacillus*.

Les genres que nous avons identifiés dans nos échantillons sont cohérents avec les travaux de **Merabti et al. (2014)** ; **Tahlaïti et al. (2017)**, et **Chadli et al. (2024)** qui ont étudié l'identification phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté algérien. Ces auteurs ont observé que la majorité des isolats appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus*.

Les résultats des caractéristiques phénotypiques obtenus nécessitent des tests complémentaires moléculaires afin de confirmer les espèces et les sous espèces.

II.2. Évaluation des propriétés probiotiques

II.2.1. Innocuité des souches

II.2.1.1. Activité hémolytique

Les résultats de l'activité hémolytique (annexe5) indiquent qu'aucune activité hémolytique n'a été détectée. Aucune zone d'hémolyse n'a été observée autour des colonies, ce qui indique que tous les isolats sont caractérisés par un type d'hémolyse γ . En effet, l'absence d'activité hémolytique est considérée comme une exigence de sécurité pour la sélection d'une souche probiotique. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Abbad et al. (2024)** selon lesquels les souches de *Lactobacillus* sp. isolées à partir du blé fermenté algérien ont démontré l'absence d'activité hémolytique.

Dans une autre étude menée par **Guertarni et al. (2024)** portant sur l'évaluation des propriétés probiotiques des bactéries lactiques isolées du blé dur et tendre, l'activité hémolytique est absente. Aussi, **Diana et ses collègues (2015)** ont mis en évidence l'absence d'activité hémolytique chez *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, isolé à partir de la sève d'Agave salmiana du Mexique.

II.2.2. Propriétés adhésives

II.2.2.1. Auto-agrégation

Les résultats de l'auto-agrégation des isolats lactiques testés après une durée d'incubation de 3 h à 37°C sont présentés dans la figure 2.

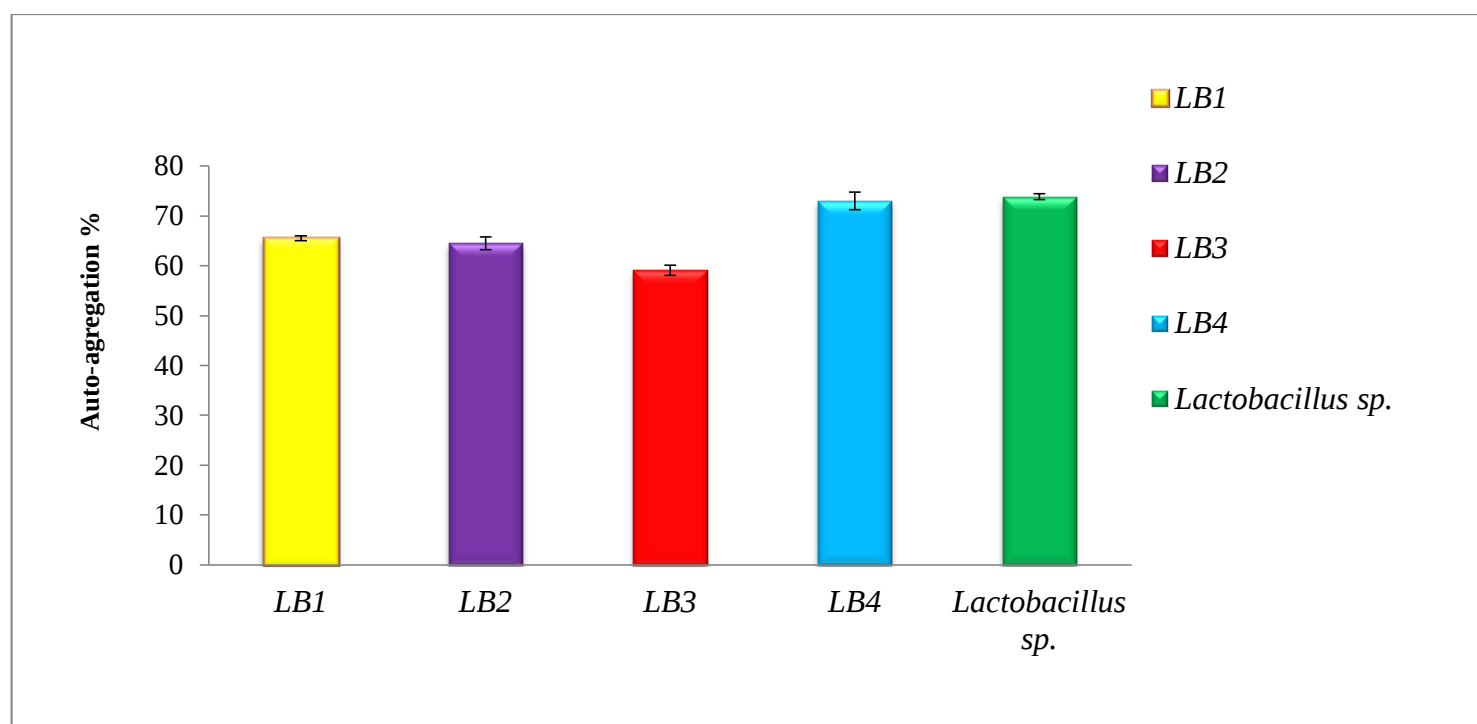


Figure 2. Pourcentage d'auto-agrégation des bactéries lactiques étudiées

Les valeurs représentées correspondent à la moyenne $\pm$ EC de trois essais indépendants

De ces résultats, il ressort que les quatre souches bactériennes (LB1, LB2, LB3 et LB4) ainsi que la souche probiotique de référence présentent une capacité d'auto-agrégation importante. Ce taux d'auto-agrégation varie considérablement entre les cinq souches testées, les valeurs sont situées entre $59,1 \pm 1,04\%$ et $73 \pm 1,80\%$. On constate que la souche LB4, présumée *Lactobacillus*, présente le pourcentage d'auto-agrégation le plus élevé, similaire à celui du *Lactobacillus* probiotique de référence, avec un pourcentage de $73 \pm 1,80\%$. En comparaison, les trois autres souches lactiques codées LB1, LB2 et LB3

présentent des pourcentages d'auto-agrégation de l'ordre de $65,5 \pm 0,5\%$; $64,5 \pm 1,32\%$ et $59,16 \pm 1,04\%$, respectivement. Ceci laisse suggérer que l'auto-agrégation élevée des bactéries lactiques peut résulter de divers facteurs, tels que la production de substances polysaccharidiques extracellulaires, les interactions électrostatiques entre les charges de surface des bactéries, ainsi que les forces de Van der Waals et les liaisons hydrophobes. Ces mécanismes peuvent varier en fonction des espèces et des souches de bactéries lactiques (**Nikolic et al., 2010**). De plus, une étude menée par **Gomaa (2013)** montre que plusieurs souches potentiellement probiotiques telles que *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* et *Lb. acidophilus* présentent des niveaux d'auto-agrégation compris entre 51,12% et 78,17%.

Des résultats similaires ont été observés dans des recherches antérieures qui rapportent que le pourcentage d'auto-agrégation des *Lb. delbrueckii* et *Lb. hirsilactis* est de l'ordre de 75% et 74%, respectivement (**Srinivash et al., 2023**; **Chadli et al., 2024**).

D'autre étude réalisée par **Gunyakti et Asan Ozusaglam. (2019)**, démontre que la souche *Lb. Gasseri* a une capacité d'auto-agrégation élevée, estimée à 95 %. Aussi, **Kassaa et al. (2014)** confirment que le taux d'auto-agrégation varie de 30 à 76 % pour différentes souches de *Lactobacillus*.

L'auto-agrégation dépend des propriétés de la surface cellulaire des bactéries lactiques et est en corrélation avec l'adhérence à la muqueuse de la cavité buccale et du tractus gastro-intestinal (**Rajoka et al., 2017**). Ces caractéristiques aident également à la liaison concurrentielle des souches de probiotiques qui empêchent la fixation des agents pathogènes (**Sagvekar et Gore, 2023**).

II.2.2.2.Co-agrégation

Les résultats concernant le potentiel de co-agrégation des souches lactiques testées avec *E.coli* sont représentés dans la figure 3.

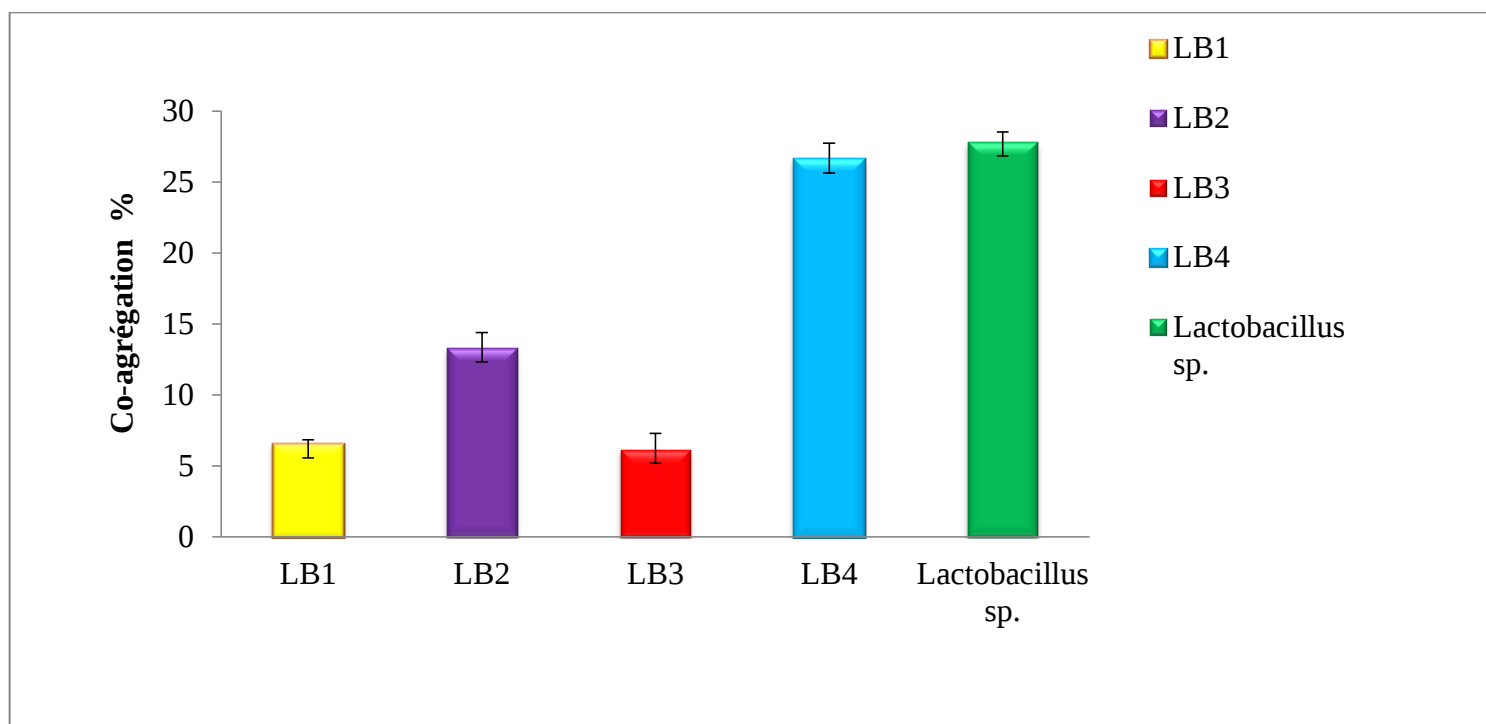


Figure3. Taux de co-agrégation des souches lactiques testées avec *E. coli*

Les valeurs représentées correspondent à la moyenne $\pm$ EC de trois essais indépendants

L'ensemble des résultats mentionnés dans la figure 3, indiquent que la souche LB4 présente un potentiel de co-agrégation très important avec un pourcentage évalué à $26,66 \pm 1,09\%$. Ce taux est quasi identique à celui de la souche probiotique de référence. Néanmoins, les souches LB1, LB2 et LB3 montrent des faibles capacités d'co-agrégation avec la souche d'*E. coli* en comparaison avec la souche de référence et la souche LB4. Leurs pourcentages sont évalués à $6,56 \pm 0,29\%$; $13,33 \pm 1,09\%$ et $6,19 \pm 1,09\%$ respectivement. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par **Zhanget al., (2013)**. Ils ont démontré que la souche *Ln. Lactis* présente un taux de co-agrégation faible avec *E. coli*, le taux obtenu est estimé à 10,74%.

Aussi, **Ahmed et al. (2021)** ont démontré que le taux de co-agrégation entre *Lb. fermentum* et *E. coli* est de l'ordre de $20,29 \pm 5,34\%$ à $35,85 \pm 0,77\%$.

La capacité de co-agrégation des bactéries probiotiques est généralement liée à une grande diversité des propriétés, notamment les protéines d'adhésion à la surface cellulaire (**Del Re et al., 2000**). **Kos et al. (2003)** ont démontré que les différences dans l'hydrophobie et l'hydrophilie de la surface cellulaire structurale de *Lb. acidophilus* M9, *Lb. plantarum* L4 et *E. faecium* L3 peuvent être responsables de la capacité de la souche à se co-agréger.

Le phénomène de co-agrégation pourrait être dû à une activité secondaire des composants de la surface cellulaire impliquant des interactions aléatoires avec d'autres composants de la surface. **Schachtsiek et al.(2004)** ont décrit le rôle d'une protéine de surface chez *Lb coryniformis* DSM 20001 codée par un gène *cpf* (facteur favorisant la co-agrégation) dans la capacité de la souche lactique à co-agréger avec *E. coli* K-88, *C. coli* et *C. jejuni*. Il a été démontré que la capacité d'auto- et de co-agrégation de *Lb. acidophilus* M92 est médiée par les composants de la couche superficielle protéique (couche S), d'une taille approximative de 45 kDa (**Kos et al., 2003**).

Ce phénomène implique également l'adhésion des cellules probiotiques aux fimbriae exprimées à la surface cellulaire des agents pathogènes (**Reid et al., 1988**). Cela s'explique par le fait que plusieurs études ont démontré que les bactéries lactiques probiotiques peuvent entraver l'attachement des agents entéropathogènes aux cellules épithéliales intestinales en se liant aux mêmes sites récepteurs de glucides que les pathogènes (**Nesser et al., 2000 ; Mathipa et al., 2017**).

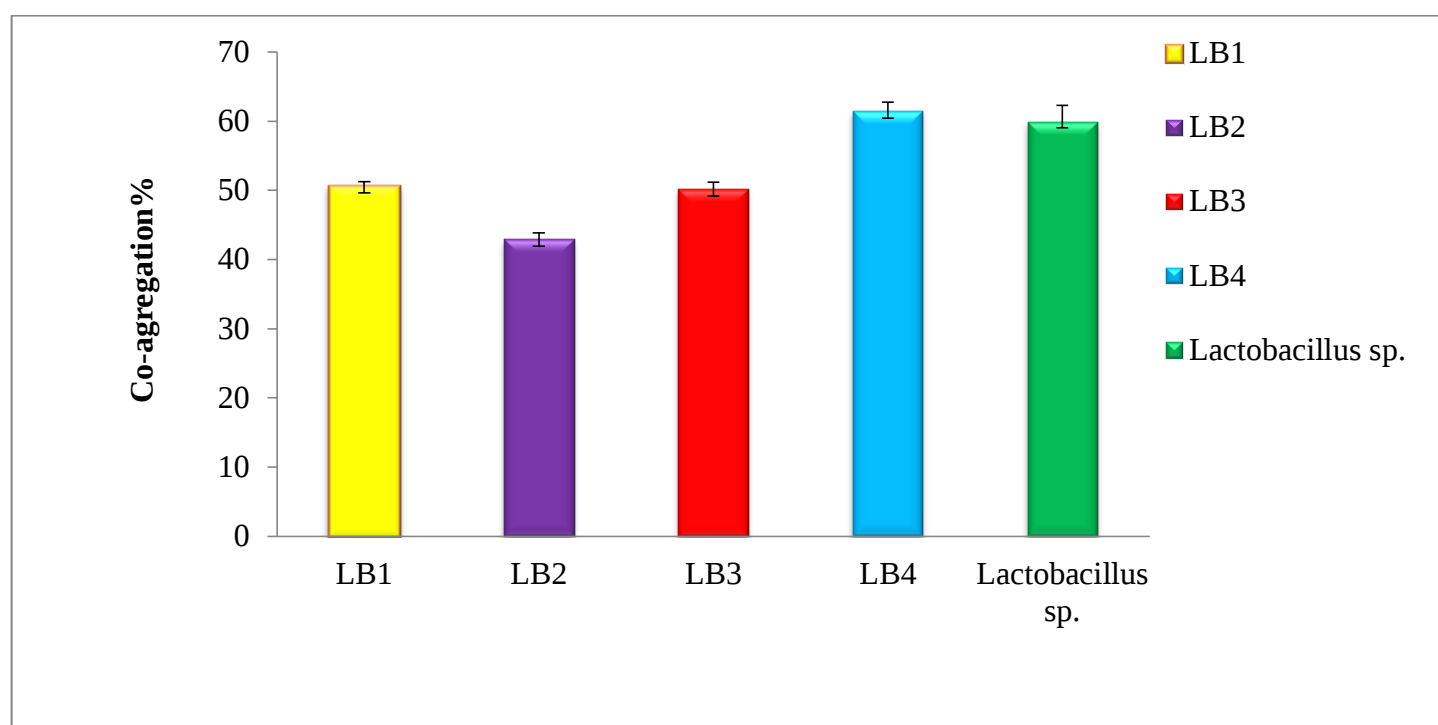


Figure4. Pourcentages de co-agrégation des souches lactiques testées avec *S. aureus*

Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± EC de trois essais indépendants

Les résultats des taux de co-agrégation (figure 4) des quatre souches lactiques testées, ainsi que de la souche de référence, avec la souche de *S. aureus* évoquent que tous les souches LB1, LB2, LB3 et LB4 présentent une capacité de co-agrégation variée et importante. Le potentiel de co-agrégation le plus

puissant a été observé chez la souche LB4 avec un taux de $61,45 \pm 1,30\%$ suivie par LB1, LB3 et LB2 avec des taux de l'ordre de $50,62 \pm 0,62\%$; $50,2 \pm 0,95\%$ et $42,9 \pm 0,95\%$ respectivement.

Ces résultats sont différents de ceux obtenus par **Zhang et al. (2013)**. Ces derniers indiquent un taux de co-agrégation de l'ordre de 24,41% pour la souche *Ln. lactis* avec *S. aureus*. Il va de même pour l'étude de **Choi et al. (2018)**, leurs résultats montrent que le taux de co-agrégation de la souche *Ln. mesenteroides* KCCM43060 avec *S. aureus* est évalué à 40,2%, ce qui révèle une capacité de co-agrégation inférieure à celle dans notre étude.

La forte capacité de co-agrégation observée entre les bactéries probiotiques et les bactéries pathogènes à Gram-positif repose sur la similitude morphologique de leur paroi cellulaire. Cette relation est renforcée par leur nature hydrophobe, car toutes deux possèdent une épaisse couche de peptidoglycane (**Arif et al., 2021**). L'aptitude de co-agrégation des bactéries lactiques met en évidence leur fort potentiel dans la lutte contre les micro-organismes indésirables en libérant des agents antimicrobiens à proximité des bactéries pathogènes. Pendant le processus de co-agrégation, les bactéries probiotiques maintiennent un environnement défavorable pour les agents pathogènes en produisant des composés antimicrobiens à des concentrations élevées (**Souza et al., 2019**). Ce maintien de l'environnement hostile autour des agents pathogènes agit comme un mécanisme de défense crucial de l'hôte contre les infections intestinales d'origine alimentaire (**Abdulla et al., 2014 ; Sathyapriya et Anitha, 2019 ; Bindu et al., 2021**).

II.3. Propriétés technologiques

II.2.3.1. Activité protéolytique

Les résultats de l'activité protéolytique des souches lactiques testées sont indiqués dans le tableau 4.

Souches	T30°C	T37°C
LB1	23,5 ± 2,85	20 ± 1,09
LB2	18 ± 2,12	14,3 ± 0,81
LB3	19,75 ± 1,70	20 ± 1,22
LB4	20 ± 2,94	19,3 ± 0,51
<i>Lactibacillus</i>		
sp.	19,5 ± 0,54	19,3 ± 0,51

Tableau 4. Diamètres (mm) de protéolyse obtenus par les souches lactiques

Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± EC de trois essais indépendants

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches testées présentent une activité protéolytique importante et très élevée sur la gélose MRS additionnée de 10% de lait écrémé, à deux températures d'incubation 30 et 37°C.

À une température de 30 °C, il est clairement observé que la souche LB1 présente une forte activité protéolytique par rapport aux autres souches, avec un diamètre de zone d'hydrolyse de 23,5 mm, suivie par la souche LB4 avec une zone d'hydrolyse mesurant 20 mm. Les souches LB2, LB3 et *Lactobacillus* probiotique ont montré des diamètres respectifs de 18 mm, 19,75 mm et 19,5 mm. Cela implique que les quatre isolats lactiques ainsi que la souche *Lactobacillus* probiotique de référence testés sont capables de produire et de sécréter des enzymes protéolytiques extracellulaires responsables de l'hydrolyse des molécules de caséine de couleur blanchâtre et opaque en fragments peptidiques incolores, produisant ainsi une zone claire autour de la culture.

Parallèlement, les résultats de l'activité protéolytique à température de 37°C mettent en évidence une activité importante chez les quatre souches bactériennes (LB1, LB2, LB3 et LB4), ainsi que chez la souche probiotique de référence. Cette activité varie considérablement entre les cinq souches testées, avec des valeurs allant de 14,3 ± 0,81 à 20 ± 1,22mm.

Nos résultats corroborent avec ceux obtenus par **N'tcha et al. (2016)**, qui ont démontré que les souches *Lb. fermentum*, *Lb. casei*, *Ln. mesenteroides*, *St. thermophilus* se sont révélées être protéolytiques, avec des diamètres de protéolyse variables de 24 ± 5,30 mm à 27,5 ± 10,61 mm. Il va de même pour l'étude **Alegría et al. (2013)**, leurs résultats montrent que l'espèce *Ln. mesenteroïde* possède

une forte activité protéolytique, ce qui peut être expliqué par une lyse cellulaire libérant ainsi les enzymes protéolytiques nécessaires. En effet, la majorité des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre algérien ont démontré leur capacité de produire une zone d'hydrolyse claire sur la gélose au lait écrémé. Cela impliquait que la majorité des bactéries lactiques possèdent des protéines protéolytiques extracellulaires.

Cependant, l'investigation réalisée par **Kalbaza et ses collaborateurs (2018)** indique des diamètres de protéolyse relativement faibles qui ne dépassent pas 8 mm chez la souche *Lb. brevis*.

Le système protéolytique des bactéries lactiques est complexe, il est composé de trois éléments principaux : des protéases liées à la paroi cellulaire, qui amorcent la dégradation de la caséine en oligopeptides, des transporteurs de peptides et des peptidases intracellulaires, qui hydrolysent les peptides en acides aminés (**Liu et al., 2010**). La protéolyse des bactéries lactiques est essentielle pour produire les peptides et les acides aminés nécessaires à leur croissance, ainsi qu'à la production de métabolites qui contribuent à la formation de la saveur dans les produits fermentés (**El-Jenia et al., 2015**).

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Les bactéries lactiques suscitent un grand intérêt en raison de leurs valeurs nutritionnelles et thérapeutiques dans les secteurs agroalimentaires et pharmaceutiques. Parmi ces microorganismes, les bactéries lactiques isolées à partir des aliments fermentés traditionnels présentent des propriétés probiotiques, contribuant ainsi à l'équilibre du microbiote intestinal et à la promotion de la santé digestive. Dans ce contexte, la présente étude vise à poursuivre l'identification phénotypique de quatre bactéries lactiques isolées du blé fermenté traditionnel (Hamoum), ainsi qu'à évaluer leurs propriétés fonctionnelles et technologiques.

Les résultats de l'identification phénotypique des quatre isolats lactiques du blé fermenté ont permis de mettre en évidence la sélection de deux genres : *Leuconostoc* pour les isolats LB1, LB2, LB3, et *Lactobacillus* pour l'isolat LB4. Parallèlement, les résultats d'évaluation des propriétés probiotiques de quatre souches lactiques testées ne révèlent aucune activité hémolytique, ce qui confirme leur innocuité.

Les quatre souches bactériennes LB1, LB2, LB3 et LB4 ainsi que la souche de référence présentent des taux d'auto-agrégation importants et varient entre les cinq souches testées, les valeurs se situent entre $59,1\% \pm 1,04$ et $73\% \pm 1,80$. On constate que la souche LB4 présente le pourcentage le plus élevé évalué à $73\% \pm 1,80$. Ce taux est quasi identique à celui de la souche de référence.

Le pouvoir de co-agrégation des quatre bactéries étudiées avec deux souches pathogènes, *E. coli* et *S. aureus*, varie d'une souche à une autre. La souche LB4 présente un fort potentiel de co-agrégation avec des pourcentages évalués à $26,66\% \pm 1,09$ avec *E. coli* et $61,45 \pm 1,30\%$ avec *S. aureus*. Néanmoins, les souches LB1, LB2 et LB3 montrent de faibles capacités de co-agrégation avec les souches d'*E. coli* et *S. aureus*, en comparaison avec la souche de référence et la souche LB4, avec des taux de l'ordre de $6,56\% \pm 0,29$; $13,33\% \pm 1,09$ et $6,19\% \pm 1,09$ et $50,62\% \pm 0,62$; $42,9\% \pm 0,95$ et $50,2\% \pm 0,95$, respectivement.

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches testées présentent une activité protéolytique importante et très élevée sur la gélose MRS additionnée de 10% de lait écrémé, à deux températures d'incubation, 30 et 37°C. Par conséquent, ce travail affirme que les quatre souches lactiques testées peuvent être considérées comme de bons candidats probiotiques et pourraient être proposées pour de futures applications dans le domaine de la santé et de l'alimentation, ouvrant la voie à des innovations prometteuses dans la création de produits

Conclusion

alimentaires plus sains et plus durables. Cependant, il est clair que des tests supplémentaires et des investigations in vivo sont nécessaires afin de valider et consolider ces résultats. Les perspectives de cette étude actuelle visent à :

- Identifier les isolats lactiques par le biais des galeries api 50CH et par les techniques moléculaires telles que la PCR...).
- Evaluer les autres propriétés technologiques des quatre bactéries lactiques testées
- Déterminer les propriétés probiotiques des bactéries lactiques in vivo

Références Bibliographiques

A

- Abbad, A, Dahou A.A, Tahlaiti, H, Homrani, M, Meskini, Z, Bounaama, K, Homrani A (2024).** Probiotic Abilities of *Lactobacillus* spp. Isolated from Algerian Fermented Wheat ‘Hamoum’ intended to Use in Broiler Production. *Agricultural Science Digest*.
- Abdulla, A. A., Abed, T. A., & Saeed, A. M. (2014).** Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of six *Lactobacillus* strains.
- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., & Ayyash, M. (2017).** Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT- Food Science and Technology*, 79, 316-325.
- Ahmed, A. S. I., El Moghazy, G. M., Elsayed, T. R., Goda, H. A. L., & Khalafalla, G. M. (2021).** Molecular identification and in vitro evaluation of probiotic functional properties of some Egyptian lactic acid bacteria and yeasts. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 114.
- Alapont, C., Martínez-Culebras, P. V., & López-Mendoza, M. C. (2015).** Determination of lipolytic and proteolytic activities of mycoflora isolated from dry-cured teruel ham. *Journal of food science and technology*, 52, 5250-5256.
- Alegría, Á., Delgado, S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2013).** Identification, typing, and functional characterization of *Leuconostoc* spp. strains from traditional, starter-free cheeses. *Dairy Science & Technology*, 93, 657-673.
- Al Kassaa, I., Hamze, M., Hober, D., Chihib, N. E., & Drider, D. (2014).** Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in North Lebanon. *Microbial ecology*, 67, 722-734.
- Alonso, S., Carmen Castro, M., Berdasco, M., de la Banda, I. G., Moreno-Ventas, X., & de Rojas, A. H. (2019).** Isolation and partial characterization of lactic acid bacteria from the gut microbiota of marine fishes for potential application as probiotics in aquaculture. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 569-579.
- Arif, M., Akteruzzaman, M., Islam, S. S., Das, B. C., Siddique, M. P., & Kabir, S. L. (2021).** Dietary supplementation of *Bacillus*-based probiotics on the growth performance, gut

morphology, intestinal microbiota and immune response in low biosecurity broiler chickens. *Veterinary and Animal Science*, 14, 100216.

Ashaolu, T. J. (2020). Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110625.

B

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., &Ouzrout, R. (2005).CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES A PARTIR DE LAIT CRU DE CHEVRE DEDEUX POPULATIONS CAPRINES LOCALES" ARABIA ET KABYLE". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 30-37.

Benmehel, S; Bousbahi, P. Gérard; Bousbahi.S.,2019. Impact nutritionnel d'un blé fermenté type Hamoum sur la translocation bactérienne intestinale chez le rat malnutri en phase de réalimentation.

Bindu, A., &Lakshmidevi, N. (2021). Identification and in vitro evaluation of probiotic attributes of lactic acid bacteria isolated from fermented food sources. *Archives of microbiology*, 203, 579-595.

Boukhemis, M., Djeghri-Hocine, B., Tahar, A., &Amrane, A. (2009). Phenotypic characterization of Lactobacillus strains isolated from different biotopes. *African Journal of Biotechnology*, 8(19).

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., T. Bohn, C. Bourlieu-Lacanal, R. Boutrou, F. Carri`ere, A. Clemente, M. Corredig, D. Dupont, C.,Recio,I. et al. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991-1014.

C

Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370.

Chadli, A., Benbouziane, B., &Bouderoua, K. Assessment of Potential Probiotic Properties and Biotechnological Activities of Lactobacillus Strains Isolated from Traditional Algerian Fermented Wheat ELHAMOUM.

Choi, A. R., Patra, J. K., Kim, W. J., & Kang, S. S. (2018).Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. *Frontiers in microbiology*, 9, 365192.

D

de Souza, B. M. S., Borgonovi, T. F., Casarotti, S. N., Todorov, S. D., &Penna, A. L. B. (2019). Lactobacillus casei and Lactobacillus fermentum strains isolated from mozzarella cheese: probiotic potential, safety, acidifying kinetic parameters and viability under gastrointestinal tract conditions. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 382-396.

Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. *Éditions Médicales Internationales, Lavoisier*.

Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D.Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Appl Microbiol.*2000;31(6):438–442. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x.

Diana, C. R., Humberto, H. S., & Jorge, Y. F. (2015). Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 7, 107-117.

E

El-Jenia R, El Boura M, Calo-Mata P, Bohme K et Fernandez-No IC. (2015). In-vitro probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Canadian Journal of Microbiology*.1-33.

G

Ghazanfar, S., Ali, G. M., Abid, R., Farid, A., Akhtar, N., Batool, N. A., ...&Hameed, Y. (2022). *An overview of functional food*.IntechOpen.

Gomaa, E. Z. (2013). Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *The journal of general and applied microbiology*, 59(6), 425-436.

Guetarni, H. (2024). Biochemical, Physiological and Technological Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated and Characterized from Hard and Soft Wheat: LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED AND CHARACTERIZED FROM WHEAT. *Annals of Arid Zone*, 63(1), 9-21.

Gunyakti, A., &Asan-Ozusaglam, M. (2019).Lactobacillus gasseri from human milk with probiotic potential and some technological properties. *LWT*, 109, 261-269.

H

Hariri, A., Ouis, N., Sahnouni, F., &Bouhadi, D. (2009). Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube. *Rev. microbiol. ind. san et environn*, 37-55.

I

Idoui, T., Boudjerda, J., Leghouchi, E., &Karam, N. E. (2009).Lactic acid bacteria from" Sheep's Dhan", a traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas y aceites*, 60(2), 177-183.

K

KALBAZA, K., Halima, Z. K., & KARAM, N. E. (2018).Identification and major technological characteristics of Lactococcus and Lactobacillus strains isolated from hamoum, an Algerian fermented wheat. *African Journal of Biotechnology*, 17(5), 108-117.

Kos B, Susković J, Vukovićm S, Simpraga M, Frece J, Matosić S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J ApplMicrobiol.* 2003;94(6):981–987. doi: 10.1046

L

LABIOUI, H., ELMOUALDI, L., El Yachoui, M., & Ouhssine, M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 144(3-4), 237-250.

Lee, J., Yun, H. S., Cho, K. W., Oh, S., Kim, S. H., Chun, T., ...&Whang, K. Y. (2011). Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated Lactobacillus spp.: immune modulation and longevity. *International journal of food microbiology*, 148(2), 80-86.

Liu, C. F., & Pan, T. M. (2010). In vitro effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity. *Journal of Food and Drug Analysis*, 18(2), 8.

M

Mathipa MG, Thantsha MS. Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut Pathog.* 2017;9(1):28. doi: 10.1186/s13099-017-0178-9.

Merabti R (2014). Blé dur fermenté lemzeit : étude du nouveau procédé de fermentation à l'extérieur du matmora et caractérisation de l'écosystème (interactions du microbiote avec la matrice). Université des Frères Mentouri-Constantine 1, thèse

N

N'tcha, C., Haziz, S., Agbobatinkpo, P., Vieira-Dalodé, G., Boya, B., Codjia, J. C., ...&Baba-Moussa, L. (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from a beninese traditional beer's ferment. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 7(2), 314-330.

Nesser JR, Granato D, Rouvet M, ServinA, Teneberg S, Karlsson KA. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiol.* 2000;10(11):1193–1199. doi: 10.1093/glycob/10.11.1193

Nikolic, M., Jovicic, B., Kojic, M., &Topisirovic, L. (2010).Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *European Food Research and Technology*, 231, 925-931.

Nithya, A., Misra, S., Panigrahi, C., Dalbhagat, C. G., & Mishra, H. N. (2023). Probiotic potential of fermented foods and their role in non-communicable diseases management: An understanding through recent clinical evidences. *Food Chemistry Advances*, 3, 100381.

R

Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Siddiq, M., Haobin, Z., Zhu, J., Yan, L. ... & Shi, J. (2017). Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. *LWT*, 84, 271-280.

Reid G, McGroarty JA, Angotti R, Cook RL. Lactobacillus inhibitor production against Escherichia coli and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian J Microbiol.* 1988;34(3):344–351

S

Saidane, Z., Dahou, A. A., & Homrani, A. (2022). Technological potential of indigenous lactic isolates of an Algerian artisanal cheese: J'benElgafs. *ActaManilana*, 70, 57-67.

Sagvekar, A. M., & Gore, M. (2023). ASSESSMENT OF SAFETY CRITERIA, PROBIOTIC POTENTIAL AND OTHER HEALTH ATTRIBUTES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM KANJI. *Journal of Applied Biological Sciences*, 17(2), 276-297.

Sathyapriya, A., & Anitha, A. (2019). Assessment of Probiotic Potential Leuconostocmesenteroides from Natural Microbiota. *Int. J. Res. Biol. Sci*, 5, 26-33.

Schachtsiek, M., Hammes, W. P., & Hertel, C. (2004). Characterization of Lactobacillus coryniformis DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Applied and environmental microbiology*, 70(12), 7078-7085.

Srinivash, M., Krishnamoorthi, R., Mahalingam, P. U., Malaikozhundan, B., & Keerthivasan, M. (2023). Probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from homemade fermented food products. *Journal of Agriculture and Food Research*, 11, 100517.

T

Tahlaïti.H ;Dalache. F ;Homrani.A et Nemmiche. S.,2017. Characterization and screening for probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented wheat" Hamoum". *South Asian Journal of Experimental Biology*, 7(4), 181-190.

Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N. (2019). Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*, 11(7), 1591.

Y

Yadav, R., &Shukla, P. (2017). Probiotics for human health: current progress and applications. Recent advances in applied microbiology, 133-147.

Z

Zarour, K., Benmechernene, Z., Hadadji, M., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, J. E., &Kihal, M. (2013).Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostocmesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nature & Technology*, (8), 39A.

Zhang, W., Liu, M., & Dai, X. (2013). Biological characteristics and probiotic effect of *Leuconostoc lactis* strain isolated from the intestine of black porgy fish. *Brazilian journal of microbiology*, 44, 685-691.

Annexes

Annexe 1.

Composition des milieux de cultures utilisés

Milieu MRS (de De Man Rogosa et Sharpe)

Peptone bactériologique.....	10g
Extrait de viande.....	8,0g
Extrait autolytique de levure.....	4,0g
Glucose.....	20g
Tween.....	80g
Phosphate dipotassium.....	2,0g
Acétate de sodium.....	5,0g
Citrate d'ammonium.....	2,0g
Sulfate de magnésium.....	2,0g
Sulfate de manganèse	0.05g
Stérilisation A 121°C Pendant 15min pH 6.2	

- **Gélose nutritive :**

Pour 1 litre de milieu :

Tryptone.....	5,0g
Extrait de viande.....	1,0g
Extrait de levure.....	2,0g
Chlorure de sodium.....	5,0g
Agar agar.....	12,0g

(Delarras, 2007).

Annexe 2.

Préparation de tampon phosphate (pH 7,2)

Na ₂ HPO ₄	2
7g NaH ₂ PO ₄	0.44g
NaCl.....	8g
Eau distillée	1L

Annexe 3.

Technique de coloration de Gram selon Hans Christian Joachim (1884).

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 1min
- Laver l'excès du colorant avec de l'eau
- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- Laver à l'eaudistillée
- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool
- Acétone pendant 10 secondes
- Rincerimmédiatement à l'eau;
- Couvrir avec la fushine et laisser agir de 30 secondes à 1 minute
- Laver abondamment à l'eau
- Sécher délicatement avec du papier buvarde (la lame doit être totalement sèche)
- Observer à l'immersion en pleine lumière: mettre une goutte d'huile à immersion sur la lame. Observer à l'objectif $\times 100$.

Annexe 4.

Résultats d'identification biochimique

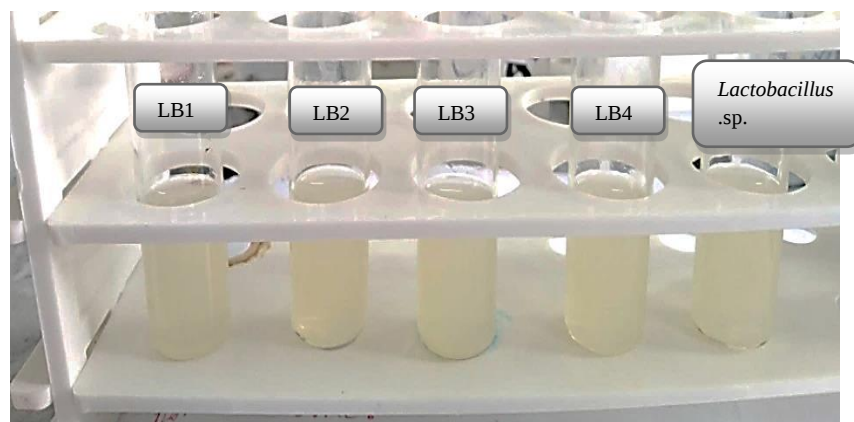


Figure1. Résultats de la production d'acétoïne des isolats lactiques.

(Photo prise lors de l'expérimentation)

Annexe 5.

Résultats de l'innocuité des souches

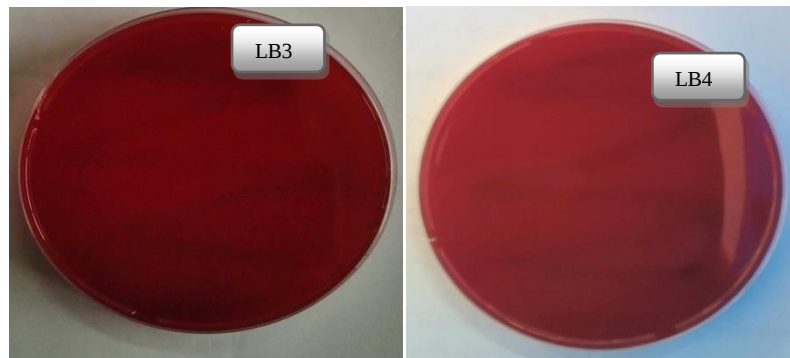


Figure 2. Résultats de l'activité hémolytiques des isolats lactiques (LB1, LB4).

(Photo prise lors de l'expérimentation)

Annexe 6.

Résultats des propriétés technologiques

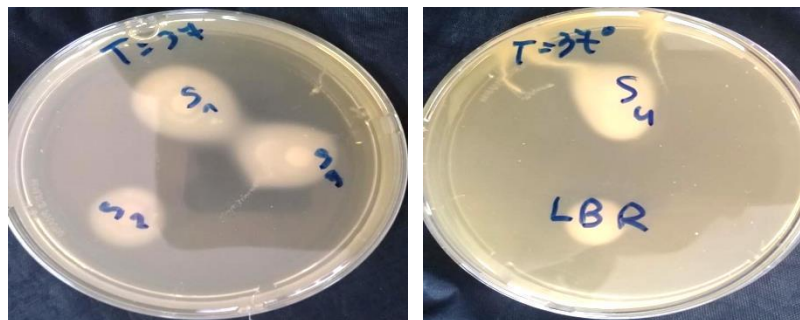


Figure 3. Résultats de l'activité protéolytiques des isolats lactiques.

(Photo prise lors de l'expérimentation)

Résumé

Les aliments fermentés traditionnels sont une source ancestrale de nutrition et de bienfaits pour la santé, regorgeant de bactéries lactiques probiotiques. Ces microorganismes jouent un rôle essentiel dans la fermentation de ces aliments, contribuant ainsi à l'équilibre de la flore intestinale et à la santé digestive. Dans cette optique, la présente étude vise à poursuivre l'identification phénotypique de quatre isolats lactiques issus du blé fermenté traditionnel (Hamoum), ainsi qu'à évaluer leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. La pré-identification des quatre isolats lactiques a été effectuée par les tests morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les propriétés probiotiques ont été évaluées à l'aide des tests suivants: activité hémolytique, capacité d'auto-agrégation et de co-agrégation, ainsi que l'activité protéolytique. Les résultats de l'identification phénotypique des quatre bactéries lactiques testées ont confirmé la présence des genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. De plus, l'évaluation des propriétés probiotiques des quatre souches lactiques a révélé l'absence d'activité hémolytique. Les quatre souches ont montré une bonne capacité d'auto-agrégation, variant de $59,1\% \pm 1,04$ à $73\% \pm 1,80$. Leur pouvoir de co-agrégation avec *E.coli* était compris entre $6,19\% \pm 1,09$ et $26,66\% \pm 1,09$. En outre, leur capacité de co-agrégation avec *S.aureus* a présenté un pourcentage élevé, supérieur à $61,45\% \pm 1,30$. Une activité protéolytique importante a été observée chez toutes les souches lactiques testées. Ces résultats suggèrent que les quatre bactéries lactiques sélectionnées démontrent un potentiel probiotique prometteur.

Mots clés : bactéries lactiques, blé fermenté traditionnel (Hamoum), probiotique, propriétés fonctionnelles et technologiques.

المخلص

الأطعمة المخمرة التقليدية هي مصدر قديم للتغذية والفوائد الصحية ، مليئة ببكتيريا اللبن بروبيوتيك. تلعب هذه الكائنات الحية الدقيقة دورا حيويا في تخمير هذه الأطعمة ، مما يساهم في توازن مجهريات البقعة المعوية وصحة الجهاز الهضمي. من هذا المنظور، تهدف هذه الدراسة إلى مواصلة التعرف على النمط الظاهري لأربع عزلات لاكتيك من القمح المخمر التقليدي (حموم)، وكذلك تقييم خصائصها الوظيفية والتكنولوجية. تم تحديد العزلات اللبنة الأربع عن طريق الاختبارات الشكلية والكيميائية الحيوية والفيولوجية. تم تقييم خصائص البروبيوتيك باستخدام الاختبارات التالية: نشاط انحلال الدم، والقدرة على التجميع الذاتي والمشارك. أكدت نتائج التعرف على النمط الظاهري لبكتيريا حمض اللاكتيك الأربعة التي تم اختبارها وجود جنس *Leuconostoc* و *Lactobacillus*. بالإضافة إلى ذلك، كشف تقييم خصائص البروبيوتيك للسلاسل اللبنة الأربع التي تم اختبارها عن عدم وجود نشاط انحلال الدم. أظهرت جميع السلالات الأربع قدرة تجميع ذاتية جيدة، تتراوح من $59,1\% \pm 1,04$ إلى $73\% \pm 1,80$. تراوحت قوتها في التجميع المشترك مع *E.coli* من $6,19\% \pm 1,09$ إلى $26,66\% \pm 1,09$. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت قدرتهم على المشاركة مع *S.aureus* نسبة عالية، أعلى من $61,45\% \pm 1,30$. لوحظ نشاط تحلل البروتين في جميع السلالات اللبنة التي تم اختبارها. تشير هذه النتائج إلى أن بكتيريا حمض اللاكتيك الأربع المختارة تظهر إمكانات بروبيوتيك واعدة.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك، القمح المخمر التقليدي (حموم)، البروبيوتيك، الخصائص الوظيفية والتكنولوجية.