

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Ibn Khaldoun–Tiaret  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



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 : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

M<sup>elle</sup>. ABDERREHIM Sara

M<sup>elle</sup>. ABDI Dalila

M. BELALEM Fethi

Thème

**Etude de l'interaction entre bactérie probiotique et bactéries pathogènes**

Soutenu publiquement le 09/06/2022

**Jury :**

**Président :** M. BENSALD M. O.

**Encadrante :** M<sup>me</sup>. BENGUIAR R.

**Co-encadrante :** M<sup>me</sup>. BENARABA R.

**Examinatrice :** M<sup>me</sup>. MOULAY M.

**Grade**

MCA

MCA

Professeure

MCA

Année universitaire 2021-2022



# Remerciements

*Nous tenons à remercier **ALLAH** le tout Puissant de nous avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.*

*Nous voudrions dans un premier temps à remercier notre promotrice **M<sup>me</sup> BENGUIAR R** pour la confiance qu'elle a bien voulu nous accorder en acceptant de diriger les travaux de recherches du présent mémoire. Nous la remercions pour sa grande disponibilité, sa patience, son soutien chaleureux et à ses conseils avisés. Nous tenons à lui exprimer notre profonde reconnaissance pour ses critiques constructives d'une rigueur absolue.*

*Ainsi nous tenons à remercions notre Co-promotrice **M<sup>me</sup> BENARABA R** d'avoir accepté de nous diriger ainsi pour ses précieux conseils, ses orientations, pour tous son aide.*

*Nous tenons à remercier profondément Monsieur **BENSAID M O** Pour l'honneur qu'ils nous fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance.*

*Aussi, nous tenons à remercier profondément Madame **MOULAY M** d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous remercions **M<sup>me</sup> SORJA** Ingénieur du de laboratoire de microbiologie de la faculté S.N.V qui nous a beaucoup aidées à réaliser ce travail dans des bonnes conditions.*

*Nous n'omettons pas de citer ici et de remercier Melle **BENABDALLAH F.** Ingénieur au sein du laboratoire d'amélioration et de valorisation des productions animales locales de la faculté des sciences de la matière.*

*Nos remerciements vont aussi à nos professeurs qui nous ont assistés et qui nous ont donné le meilleur d'eux-mêmes tout le long de notre cursus.*

*A nos parents qui nous ont permis d'atteindre ce niveau. Nous souhaitons que notre réussite soit à la hauteur de leur espérance.*

*Nous remercions nos amis qui ont toujours été là pour nous. Leur soutien inconditionnel et leurs encouragements ont été une grande aide.*

# *Dédicace*

*A L'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A mon père : **BENABDELKADER***

*L'épaulé solide, ; A ceux qui mon cœur depuis sa naissance, A ceux qui ont donné un sens à mon existence, en m'offrant une éducation digne de Confiance l'œil attentif compréhensif et la personne La plus digne de mon estime et de mon respect. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, Que Allah te préserve et procure santé et longue vie.*

*A celle qui était et qui restera mon soutien dans cette vie qui m'a renseigné comment aimer DIEU ; comment fait apparaitre le succès et la prospérité du sein du mal et des problèmes... à vous maman, que DIEU vous protège et vous donne la pleine santé et le plein bonheur du monde.*

*A mes frères : Mon bras droit **MOHAMED**, Pour être toujours présents à mes côtés quand j'ai besoin à vous et mon petit frère **NESREDDINE**.*

*A ma chère sœur **FATIMA**, je vous dis merci pour vos encouragements, et à **Ma grande mère**.*

*A tout ma famille : **ABDERREHIM**.*

*À mes copines **CHAIMA**, **FARIDA**, **ASMAA** et **FATIMA** que j'aime, mes collègues, et mes binôme **DALILA** et **FETHI**.*

*A Ma promotion Microbiologie appliquée.*

**SARA**

# *Dédicace*

*Mon père c'est homme de ma vie : **ABDELKADER**  
Éternel, mon soutien moral et ma joie ; Tu as su m'inculquer le sens de  
la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux  
difficultés de la vie, ta compréhension et ton encouragement sont pour  
moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je ferai  
toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir Que  
Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de  
l'esprit et te protège de tout mal. Tu es le meilleur papa dans le monde,  
vous serez toujours notre étoile la plus brillante. Merci, Vous êtes et  
vous resterez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin  
Aucune dédicace très chère maman **KHADIDJA**, ne pourrait exprimer  
la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous Vous avez guetté  
mes pas, et m'avez couvé de tendresse, ta prière et ta bénédiction m'ont  
été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Vous m'avez aidé  
et soutenu pendant de nombreuses années avec à chaque fois une  
attention renouvelée. Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé,  
de bonheur et vous procurer une longue vie*

*A mon cher frère **RAOUF** Didier pour votre assistance, vos conseils et  
vos encouragements.*

*Monsieur (**B.T**) J'aimais j'ai oublié votre chance et confiance je souhaite  
à vous tous le réussir.*

*A mes chères amis **SARA** et **FETHI** je donne tous le respect et  
remerciement pour vous soutiens et pour les efforts qu'elle a fournis  
pour réaliser ce travail.*

*Y a certains moments dans la vie où on a besoin de notre famille merci  
ma famille je suis fière que j'ai nombre de vous.*

**DALILA**

## *Dédicace*

*Avant de dédier ce travail nous remercions ALLAH le clément, le miséricordieux pour le courage, la patience et la santé qu'il m'a donnée pour venir à bout de ce travail après 5 ans d'étude*

### *Je dédie ce travail à*

*Mon père à qui je dois le grand amour et le profond respect.*

*À l'être le plus chère à mon cœur, ma mère, qui a toujours cru en moi et m'encouragée. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être, Puisse dieu le très haut*

*À mes chers frères et Mon unique sœur, qui m'ont soutenu durant les moments difficiles et à qui je souhaite beaucoup de réussite et du bonheur dans leur vie future*

*À tous les membres de ma famille BELALEM.*

*À tous les membres de la famille de ma mère.*

*À mes chères amis SARA et Dalila je donne tous le respect et remerciement pour vous soutiens*

*Je clos ces remerciements en dédiant ce travail au d'amies qui m'ont soutenue tout au long de ces années et à qui je souhaite beaucoup de bonheur, réussite et bonne santé.*

**FETHI**

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>°C :</b>	Degré Celsius
<b>ATCC :</b>	American Type Culture Collection
<b><i>B. cereus</i> :</b>	<i>Bacillus cereus</i>
<b><i>B. subtilis</i> :</b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>BMH :</b>	Bouillon de Muller de Hinton
<b>BSA :</b>	Albumine de sérum bovin
<b>CO<sub>2</sub> :</b>	Dioxyde de carbone
<b>DO :</b>	Densité optique
<b><i>E. coli</i> :</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EPS :</b>	Exopolysaccharides
<b>Hcl :</b>	Chlorure d'hydrogène
<b>Hétéro :</b>	Hétérofermentaire
<b>Homo :</b>	Homofermentaire
<b>Kcl :</b>	Chlorure de potassium
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> :</b>	Phosphate de potassium monobasique
<b><i>Lb. brevis</i> :</b>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<b><i>Lb. casei</i> :</b>	<i>Lactobacillus casei</i>
<b><i>Lb. delbrueckii</i> :</b>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<b><i>Lb. fermentum</i> :</b>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<b><i>Lb. plantarum</i> :</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<b><i>Lb. rhamnosus</i> :</b>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<b><i>Lb. acidophilus</i> :</b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> .
<b>LB1 :</b>	Isolats 1de blé fermenté
<b>LB2 :</b>	Isolats 2de blé fermenté
<b>LB3 :</b>	Isolats 3de blé fermenté
<b>LB4 :</b>	Isolats 4de blé fermenté
<b>MRS:</b>	Man-Rogosa Sharp.
<b>N:</b>	Normalité
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> :</b>	Carbonate de sodium
<b>NaCl :</b>	Clore de sodium
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PBS :</b>	Sodium phosphate dibasique
<b>pH :</b>	Potentiel Hydrogène.
<b>PMI :</b>	Pourcentage minimum d'inhibition (%)
<b>rpm :</b>	Rotation par minute.
<b>Sp :</b>	Espèce non identifiée.
<b>UFC :</b>	Unité formant colonie.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b>	Diagramme récapitulatif de la démarche expérimentale.....	08
<b>Figure 2.</b>	Aspects macroscopique (A) et microscopique (B) de la bactérie isolée à partir de lactibiane sur la gélose MRS (Objectifx100), coloration de Gram.....	15
<b>Figure 3.</b>	Pourcentage minimum d'inhibition (%) (PMI) des isolats lactiques vis à vis des souches pathogènes.....	19
<b>Figure 4.</b>	Activité anti-inflammatoire de <i>Lactobacillus</i> sp et les quatre isolat.....	21

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b>	Matériel, produits chimiques et milieux de culture utilisés.....	06
<b>Tableau 2.</b>	Aspects macroscopique et microscopique des isolats lactiques à issus du blé fermenté sur gélose MRS après coloration de Gram (Objectifx100) .....	16
<b>Tableau 3.</b>	Pré-identification biochimique des quatre isolats lactiques de blé fermenté.....	17
<b>Tableau 4.</b>	Diamètres des zones d'inhibition (mm) induits par <i>Lactobacillus</i> sp. et les quatre isolats en présence des souches pathogènes étudiées.....	18

## LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1 :</b>	Probiotique de Lactibiane tolérance.....	33
<b>Annexe 2 :</b>	Composition des milieux de cultures utilisés.....	34
<b>Annexe 3 :</b>	Technique de coloration de Gram, .....	36
<b>Annexe 4 :</b>	Préparation de tampon phosphate.....	37
<b>Annexe 5 :</b>	Identifications biochimiques.....	38
<b>Annexe 6 :</b>	Effets antagonistes des isolats lactiques issus de Lactibiane® et du blé fermenté vis-à-vis des souches pathogènes testées par la méthode de diffusion .....	40
<b>Annexe 7 :</b>	Effets antagonistes des isolats lactiques issus de Lactibiane® et du blé fermenté vis-à-vis des souches pathogènes testées par la méthode de de microdilution.....	43

<b>Liste des Abréviations</b> .....	i
<b>Liste des figures</b> .....	ii
<b>Liste des tableaux</b> .....	iii
<b>Liste des annexes</b> .....	iv
<b>Table des matières</b> .....	v

## TABLE DES MATIERES

### Introduction

### Chapitre I: Matériel et Méthodes

I.1	Objectifs de l'étude .....	5
I.2	Lieu et durée de travail.....	5
I.3	Matériel et produits chimiques.....	5
I.4	Souches bactériennes utilisées .....	7
I.4.1	Souches bénéfiques .....	7
I.4.2	Souches pathogènes .....	7
I.5	Matrice végétale.....	7
I.6	Procédure expérimentale.....	7
I.7	Isolement et identification des bactéries lactiques .....	9
I.7.1	Isolement d'une bactérie lactique appartenant au genre <i>Lactobacillus</i> issue de Lactibiane® .....	9
I.7.2	Isolement des bactéries lactiques à partir de blé fermenté.....	9
I.7.3	Purification des isolats de bactéries lactiques .....	9
I.7.4	Pré-identification des souches.....	9
I.7.4.1	Caractère morphologiques .....	9
I.7.4.1.1	Examen macroscopique .....	9
I.7.4.1.2	Examen microscopique .....	9
I.7.4.2	Caractère biochimiques .....	10
I.7.4.2.1	Test de catalase .....	10
I.7.4.2.2	Recherche du type fermentaire .....	10
I.7.4.2.3	Test Mannitol .....	
I.7.4.2.4	Test de citrate de Simmons .....	9
I.7.4.3	Concervation des souches .....	11
I.7.4.3.1	Conservation à courte durée .....	11
I.7.4.3.2	Conservation à longue durée .....	11
I.8	Evaluation de l'activité antibactérienne des isolats lactiques .....	11
I.8.1	Revivification des souches pathogènes.....	11

I.8.2	Méthode de diffusion .....	11
I.8.3	Détermination des pourcentages minimum d'inhibition (Méthode de microdilution) .....	12
I.9	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire .....	12
I.9.1	Préparation des suspensions des cellules intactes des isolats lactiques .....	12
I.9.2	Capacité d'inhibition de la dénaturation des protéines .....	13
I.10	Analyse statistique .....	13

## **Chapitre II : Résultats et discussions**

II.1	Identification des isolats lactiques .....	15
II.1.1	Caractères morphologiques.....	15
II.1.1.1	Identification de bactérie lactique isolée de lactibiane.....	15
II.1.1.2	Identification des isolats lactiques issus du blé fermenté.....	16
II.1.2	Caractères biochimiques .....	16
II.2	Activité antibactérienne des isolats lactiques à partir de lactibiane et de blé fermenté .....	18
II.2.1	Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur gélose.....	18
II.2.2	Détermination des Pourcentages minimum d'inhibitions (PMI) des surnageants issus des cultures des isolats lactiques par la méthode de microdilution .....	19
II.3	Activité anti-inflammatoire des isolats lactiques .....	21
<b>Conclusion et perspectives.....</b>		<b>24</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>		<b>27</b>
<b>Annexes.....</b>		<b>33</b>
<b>Résumé.....</b>		<b>47</b>

# *Introduction*

L'homéostasie du tractus intestinal est un équilibre entre le microbiote intestinal et le système immunitaire associé à la muqueuse. Lors de déséquilibre, une dérégulation du système immunitaire peut induire l'apparition de pathologies telles que les allergies et les maladies inflammatoires chroniques et les infections intestinales (**Delzenne et Cani, 2008**). En effet, les causes de cette dysbiose sont complexes, probablement multifactorielles, elles regroupent les facteurs environnementaux, génétiques, hormonaux ainsi que le mode de vie et le type alimentaire. A la lumière de ces données, la restauration du déséquilibre de microbiote intestinal constitue actuellement une stratégie très importante dans la prévention de plusieurs pathologies. De plus des études attribuent au microbiote des rôles bénéfiques, qu'il s'agisse du maintien de fonctions physiologiques ou de la protection contre ces pathologies (**Akbar et al.,2019**)

Cette stratégie est basée sur l'utilisation des bactéries bénéfiques tels que les probiotiques. Ces derniers sont largement vantés pour leurs effets bénéfiques sur la santé, ainsi que leur impact sur des maladies (le cancer, l'obésité...) associés à la perturbation de l'équilibre de la flore intestinale (**Sivamaruthi et al., 2020**). Leur efficacité repose en grande partie sur le choix de l'espèce et même de la souche bactérienne sélectionnée. Parmi les souches bactériennes vivantes sélectionnées en raison de leur importance contribution au maintien de l'écosystème intestinal, on distingue les bactéries lactiques (**Yadav et Shukla, 2017**).

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis plusieurs siècles comme des agents protecteurs, sont caractérisés par la synthèse des métabolites antimicrobiens ; en raison de leurs propriétés, elles jouent divers rôles tels que la conservation des aliments (**Ajao et al., 2021**), la stimulation immunitaire et la compétition pour les sites d'adhésion aux parois de l'intestin **Djadouni, ., (2013)**. Elles peuvent se retrouver à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, dans des divers produits alimentaires comme les produits laitiers fermentés et même sur la surface des végétaux (plantes, fruits et légumes, ...) (**Makhloufi, 2011 ; Gálvez et al.,2011**).

De nombreuses études ont rapporté que les bactéries lactiques produisent des bactériocines qui ont un potentiel antagoniste contre les bactéries pathogènes (**Hawaz, 2014 ; Khan et al., 2021**) ont également étudié le potentiel antimicrobien, probiotique et anti-inflammatoire de *Lactobacillus agilis* isolée de rhizosphère des plantes médicinales.

D'autre part, les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation des matières végétales et animales. Elles ont un rôle important dans la préparation et la conservation de

nombreux aliments fermentés, leur conférant le statut GRAS (**Florou-paneri et al., 2013**). Parmi les aliments fermentés les plus riches en bactéries lactiques, le blé fermenté traditionnel (hamoum). En effet, les grains de blé conservés plusieurs années en silos souterrains, Cette conservation permet la prolifération de nombreux microorganismes qui entraînent leur fermentation naturelle. Ce produit constitue un produit terroir que nos aînés utilisaient pour leur consommation.

Les bactéries lactiques isolées de blé fermenté peuvent être considérés comme une solution prometteuse, qui sont devenus très utilisés pour les applications médicales et alimentaires, de ce fait, diverses études se sont intéressées de trouver des méthodes de valorisation de ce produit fermenté, isoler et caractériser les bactéries lactiques à potentiel probiotique et à déterminer leurs vertus thérapeutiques.

Dans cette optique l'objectif de cette présente étude s'intéresse à :

- ✓ Isoler et identifier certaines bactéries lactiques à potentiel probiotique à partir d'un complément alimentaire (Lactibiane®) et du blé fermenté
- ✓ Evaluer *in vitro* leur pouvoir antagoniste et anti inflammatoire.

# *Chapitre I*

## *Matériel et Méthodes*

### **I.1 Objectifs de l'étude**

L'objectif de cette présente étude consiste dans un premier temps à isoler et à identifier certaines bactéries lactiques à potentiel probiotique à partir de mélange probiotique commercialisé sous le nom de Lactibiane et de blé fermenté. Et dans un deuxième temps à évaluer in vitro leur pouvoir antagoniste et anti-inflammatoire.

### **I.2 Lieu et durée de travail**

La démarche expérimentale relative à cette présente étude, a été réalisée sur une période qui s'étale du 30 Janvier au 31 Mars 2022. Elle a été effectuée au sein des laboratoires suivants :

- Laboratoire de Microbiologie et Biochimie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Ibn Khaldoun -Tiaret.
- Laboratoire d'Amélioration et de Valorisation des Productions Animales locales Université Ibn Khaldoun-Tiaret.

### **I.3 Matériel et produits chimiques**

Le matériel, les produits chimiques et les milieux de culture nécessaires à l'accomplissement de ce travail sont cités dans le tableau 1 :

**Tableau 1.** Matériel, produits chimiques et milieux de culture utilisés

Matériel et appareillage	Produits chimiques et réactifs	Milieux de cultures
Agitateur magnétique (IKAMAG)	Albumine de sérum bovin (BSA)	Gélose MRS
Agitateurs magnétique thermique (Stuart).	Glycérol (50%)	Bouillon MRS
Balance analytique (OHARUS)	Eau oxygénée (30 %)	Gélose et bouillon de Muller Hinton
Balance (Sartorius basic)	2,3,5 triphenyltetrazolium(sigma)	Milieu Mannitol -mobilité
Bec bunsen	Médicament (Diclofénac sodique 100mg/ml)	Gélose de King A
Centrifugeuse (Sigma)	Violet de gentiane	Gélose de Mac Conkey
Spectrophotomètre (UV-visible Spectrum)	Fuchsine	Gélose nutritive
Autoclave (Sanoclave)	Lugol	Citrate de Simmons
Bain marie (GFL)	Alcool	Lait écrémé
Centrifugeuse réfrigérée (SIGMA)	Huile à immersion	
Sonicateur (Sonorex)	Hcl (1N)	
pH mètre (OHAUS)	Phosphate de potassium dibasique ( $K_2HPO_4$ ; PM= 228,23 g/mol)	
Etuve (Memmert)	Phosphate de potassium monobasique ( $KH_2PO_4$ ; PM= 136,09 g/mol)	
Microscope optique (Optica)	Chlorure de sodium (NaCl ; PM=58,44g/mol) (0,9%)	
Micropipettes (100 $\mu$ l,1000 $\mu$ l)	Chlorure de potassium (KCl ; PM=74,55g/mol)	
Vortex (Techno kartell)	Sodium phosphate dibasique ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ; PM=358,14)	
Microplaques		

## I.4 Souches bactériennes utilisées

### I.4.1 Souches bénéfiques

Les souches bénéfiques utilisées sont Lactibiane Tolérance® (PiLeJe, Référence 14BX4 06-2016, France) est un mixte de bactéries probiotique contenant  $4 \times 10^9$  UFC/g de bactéries lactiques viables lyophilisées. Il est composé de cinq souches bactériennes : *Bifidobacterium lactis* LA 303, *Lactobacillus acidophilus* LA 201, *Lactobacillus plantarum* LA 301, *Lactobacillus salivarius* LA 302 et *Bifidobacterium lactis* LA304.

### I.4.2 Souches pathogènes

Les souches utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne sont des souches pathogènes de Collection Internationale ATCC. Il s'agit d'*Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 10536, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) ATCC 6633, *Bacillus cereus* (*B. cereus*) ATCC 10876, Ces souches ont été fournies gracieusement par l'unité de Microbiologie du groupe SAIDAL de Média et l'Hôpital Mostapha Bacha, Alger. Aussi, un isolat de *Pseudomonas aeruginosa* a été isolé à partir d'une infection chez le chien au sein du laboratoire de Microbiologie à l'Institut Vétérinaire, Université Ibn Khaldoun-Tiaret.

## I.5 Matrice végétale

Au cours de cette présente étude, l'isolement des bactéries lactiques a été réalisé à partir d'un aliment fermenté traditionnel (le blé fermenté naturellement), ce dernier a été gracieusement fourni par les agriculteurs de la région de Relizane. Le choix d'utiliser le blé fermenté pour l'isolement est justifié par le fait que cet aliment a un potentiel bénéfique sur la santé, il est historiquement et traditionnellement utilisé contre certaines complications digestives, il est considéré comme un aliment fonctionnel ayant des propriétés médicinales dans la prévention et le traitement de nombreuses complications physiopathologiques intestinales. Ses vertus sont dues à sa composition et sa grande diversité en microorganismes essentiellement les bactéries lactiques issues de la fermentation naturelle, à potentiel probiotique, caractérisées par des effets protecteurs bénéfiques sur le microbiote intestinal et des propriétés nutritionnelles diététiques sur la santé de l'intestin. L'échantillon a été conservé jusqu'à son utilisation.

## I.6 Procédure expérimentale

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

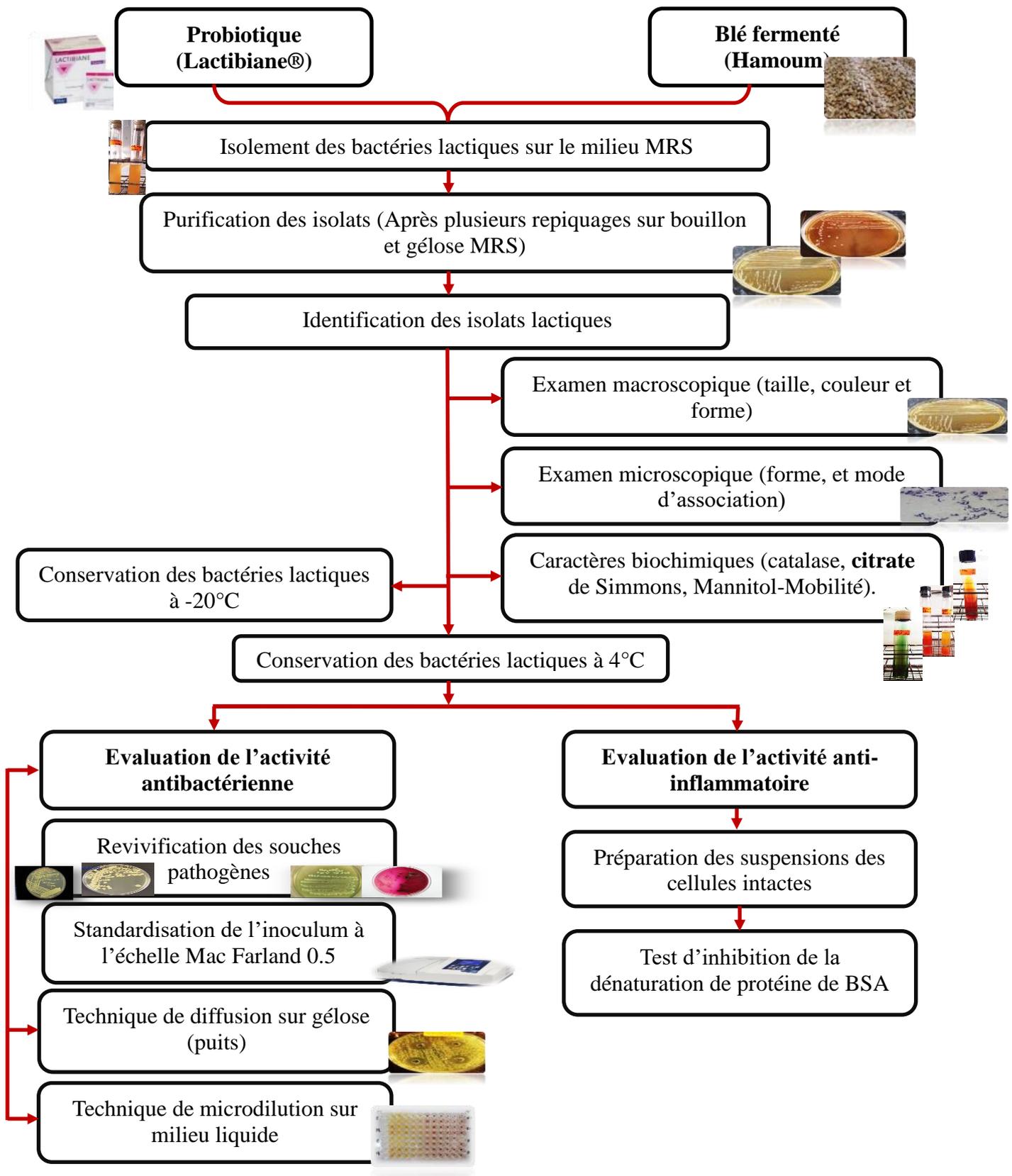


Figure 1. Diagramme récapitulatif de la démarche expérimentale

## **I.7 Isolement et identification des bactéries lactiques**

### **I.7.1 Isolement d'une bactérie lactique appartenant au genre *Lactobacillus* issue de Lactibiane®**

Une quantité de probiotique lyophilisé a été mise dans le bouillon MRS ; puis incubée à 37°C pendant 24h en anaérobiose afin d'assurer une revivification des souches lyophilisées. Ensuite ensemencée sur gélose MRS et pré-incubée en anaérobiose à 37°C pendant 24h. Après incubation des colonies bien isolées ont été prélevées puis purifiées par des repiquages successifs sur MRS. La souche obtenue est utilisée comme référence d'une bactérie probiotique.

### **I.7.2 Isolement des bactéries lactiques à partir de blé fermenté**

1g de blé fermenté a été déposé dans 9 ml de bouillon MRS, puis incubée à 37°C pendant 24h. Ensuite, 100µl ont été prélevés à partir de la solution mère et ensemencés par la méthode de stries à la surface des boîtes de Pétri contenant la gélose MRS. Les boîtes ont été incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24 h à 48h. Après incubation en aérobiose et ou en anaérobiose des colonies bien isolées ont été sélectionnées et prélevées puis ensemencés par des repiquages successifs sur MRS. Quatre isolats typiques à Gram positif et catalase négative présumés comme bactéries lactiques ont été retenus.

### **I.7.3 Purification des isolats de bactéries lactiques**

La purification des isolats a été réalisée par plusieurs repiquages successifs sur MRS (liquide-solide/solide-liquide) à partir des colonies bien isolées, à caractère catalase négative et Gram positif.

### **I.7.4 Pré-identification des souches**

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

#### **I.7.4.1 Caractères morphologiques**

##### **I.7.4.1.1 Examen macroscopique**

Cet examen est basé sur l'observation visuelle qui consiste à décrire les colonies obtenues sur la gélose MRS après incubation (couleur, taille, contour, aspect, ...).

##### **I.7.4.1.2 Examen microscopique**

Il a été effectué sur un frottis bactérien préparé à partir des colonies en culture pure puis fixé et coloré par la méthode de Gram (annexe 4) permet de déterminer la morphologie des cellules bactériennes (taille, forme, et mode d'association).

### I.7.4.2 Caractères biochimiques

#### I.7.4.2.1 Test de catalase

- **Principe**

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques entraînent la formation de peroxyde d'hydrogène. La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène (**Delarras, 2014**).

- **Technique**

Cette technique consiste à prélever une colonie et à l'émulsionner dans une goutte de Peroxyde d'oxygène. La libération de bulles indique une réaction positive carbonatée (**Delarras, 2014**).

#### I.7.4.2.2 Recherche du type fermentaire

- **Principe**

Ce test permet d'évaluer le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de CO<sub>2</sub> dans la cloche de Durham sur le bouillon MRS. Cet examen permet de distinguer les isolats homolactiques des hétérolactiques après une incubation à 37° C pendant 24 à 48h (**Bourgeois et al., 1996**).

- **Technique**

Des cultures jeunes des isolats lactiques ont été cultivées dans des tubes contenant MRS avec cloches de Durham. Ensuite ces tubes ont été incubés à 37°C pendant 24h à 48h en anaérobiose et en aérobiose selon le type d'isolat testés. La production de gaz (CO<sub>2</sub>) se traduit par l'apparition de bulles dans la cloche.

#### I.7.4.2.3 Test Mannitol

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. Cette technique consiste à ensemencer les isolats lactiques testés par piqûre centrale et les incuber à 37°C pendant 24h. La fermentation du mannitol est traduite par un virage au jaune du milieu de culture (**Denis et al., 2007**).

#### I.7.4.2.4 Test de citrate de Simmons

Ce test a été effectué par l'ensemencement de la pente de milieu par des cultures jeunes des isolats lactiques ensuite ces derniers ont été incubés à 30°C pendant 5 jours.

Le virage de la couleur du milieu du vert au bleu indique l'utilisation de citrate (**Marchal et al., 1991**).

### I.7.4.3 Conservation des souches

#### I.7.4.3.1 Conservation à courte durée

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu solide incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquages sur un nouveau milieu MRS incliné toutes les 4 semaines (Walker et Gilliland, 1993).

#### I.7.4.3.2 Conservation à longue durée

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

## I.8 Evaluation de l'activité antibactérienne des isolats lactiques

L'activité antibactérienne a été testée par la méthode de diffusion et la microdilution vis-à-vis certaines bactéries pathogènes telles que : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*.

### I.8.1 Revivification des souches pathogènes

Les souches conservées ont été cultivées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture pour chaque bactérie et incubées pendant 18 h à 37°C afin d'obtenir une culture jeune.

### I.8.2 Méthode de diffusion

Pour détecter l'activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis des souches pathogènes la méthode de diffusion par des puits sur gélose a été appliquée.

A partir d'une culture jeune des bactéries pathogènes de 18 h d'incubation, une suspension bactérienne a été réalisée dans l'eau physiologique stérile et ce pour chaque souche. La turbidité de cette suspension a été ajustée à 0,5 Mac Farland, puis diluée au 1/100. On obtient alors un inoculum estimé à  $10^6$  UFC/ml. Par la suite, cet inoculum a étéensemencé à l'aide d'un écouvillon par la technique des stries sur toute la surface des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton. Les boîtes de Pétri ainsiensemencées ont été laissées sécher à l'air libre pendant 15 min ensuite des puits ayant un diamètre de 6 mm a été créés au sein de cette gélose, ces derniers ont été remplis de 80µl de surnageant des cultures jeunes des isolats lactiques testés. Le surnageant a été obtenu après centrifugation (4000 rpm pendant 15 min) des cultures jeunes des isolats lactiques. Après 24h d'incubation, la présence autour des puits d'une zone d'inhibition circulaire dans laquelle il n'y pas de croissance de bactéries dénote la sensibilité des cellules bactériennes à ce surnageant. La sensibilité des bactéries testées aux surnageants est

proportionnelle à la zone d'inhibition. Plus la zone d'inhibition est grande, plus la bactérie est sensible (İşcan et al., 2002 ; Chi-Chung Chen et al.,2019).

### I.8.3 Détermination des pourcentages minimum d'inhibition (Méthode de microdilution)

Pour la détermination de l'effet antibactérien des isolats lactiques contre des souches pathogènes par la technique de microdilution, Le surnageant de chaque cultures jeunes des isolats lactiques dans le bouillon MRS a été récupéré après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min puis dilués dans un bouillon Mueller Hinton à des concentrations croissantes (5%,10%, 15%, 20%, 30% ,40%,50%). Ensuite 100µl de chaque concentration générée , ont été déposés dans les puits d'une microplaque à 96 puits (Klančnik et al.,2010 ) , les puits ainsi préparés ont été inoculés par  $10^6$  UFC/ml de chaque suspension bactérienne pathogène (d'*E. coli*, *B. cereus* et *B.subtilis* et *P. aeruginosa*).Sur la même microplaque les puits de la dernière ligne ont été additionnés de bouillon Muller Hinton seul afin de servir de témoin négatif, alors que les puits de la première ligne de la même microplaque ont reçu le milieu Mueller Hinton inoculé par la même concentration des bactéries citées précédemment et sans surnagent des isolats lactiques .

Les microplaques ainsi préparées ont été incubées 21 h à 37°C.A la fin de cette incubation la croissance bactérienne a été visualisée en ajoutant 20 µl d'un révélateur de croissance :2,3,5 triphenyltetrazolium. Le pourcentage minimum d'inhibition a été déduite à partir du premier puits de concentration dépourvue de croissance bactérienne (Chi-Chung Chen et al.,2019).

### I.9 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire in vitro des isolats lactiques a été réalisé en utilisant le test d'inhibition de la dénaturation des protéines (BSA) selon Kar et al, (2013) légèrement modifié.

#### I.9.1 Préparation des suspensions des cellules intactes des isolats lactiques

Des cultures jeunes de chaque isolat lactique, issus du blé fermenté et le mélange probiotique, ont été utilisées pour préparer les suspensions des cellules intactes destinées à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire. Après centrifugation (à 6000 rpm durant 10 min et à 4°C) des isolats en culture sur bouillon MRS, le surnageant a été éliminé et les culots des cellules bactériennes ont subi trois rinçages successifs avec 500µl de PBS stérile (à 20mM, pH=7,4). Ces derniers ont été remis en suspension dans 500 µl du tampon cité précédemment. Le nombre total des cellules bactériennes obtenues a été ajusté à  $10^9$  UFC/ml ( $DO \approx 1,2$ ) (Su et al., 2015). Cette concentration est largement utilisée dans les différents tests d'évaluation des propriétés probiotiques in vitro.

### I.9.2 Capacité d'inhibition de la dénaturation des protéines

Cette méthode consiste à préparer trois solutions à savoir :

- Solution d'essai : composé de 450µl de BSA (à 5 % v/v) et 50µl de suspension bactérienne.
- Solution de témoin négatif : composé de 450µl de la solution de BSA (à 5 % v/v) et 50µl d'eau bidistillée.
- Solution standard test : comprend 450 µl de la solution de BSA (à 5 % v/v) et 50µl de la solution de standard diclofénac sodique avec une concentration de 100 mg/ml.

L'ensemble des solutions (citées au-dessus) ont été ajustées à pH 6,3 par une solution d'HCl (1N), ensuite 2,5ml de la solution de PBS (pH = 6,3) ont été additionnés. Après la préparation des différentes solutions, une incubation de ces dernières à 37°C pendant 20 min a été réalisée, cette étape est suivie d'une augmentation de la température jusqu'à 75°C, celle-ci a été maintenue pendant 3 min. Après refroidissement, l'absorbance a été lue à 416 nm par spectrophotomètre UV-visible (Kar et al.,2012) modifiée, le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé selon la formule suivante :

Pourcentage d'inhibition % =  $100 \times [1 - (\text{DO solution d'essai} / \text{DO solution de témoin positif})]$ .

### I.10 Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica StatSoft, (version 6.1, Statsoft, Tulsa. OK.). L'ANOVA à un facteur a été utilisée pour effectuer la comparaison des moyennes. Cette analyse a été suivie par le test post-hoc Duncan afin de déterminer les différences significatives et comparer les moyennes. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives pour une valeur de  $p$  inférieure à 0,05 dans l'ensemble des analyses statistiques. Les constatations suivantes ont été retenues :

- Pour un  $P < 0,05$  la différence est significative (\*).
- Pour un  $p < 0,01$  la différence est très significative (\*\*).
- Pour un  $p < 0,001$  la différence est hautement significative (\*\*\*)

## *Chapitre II*

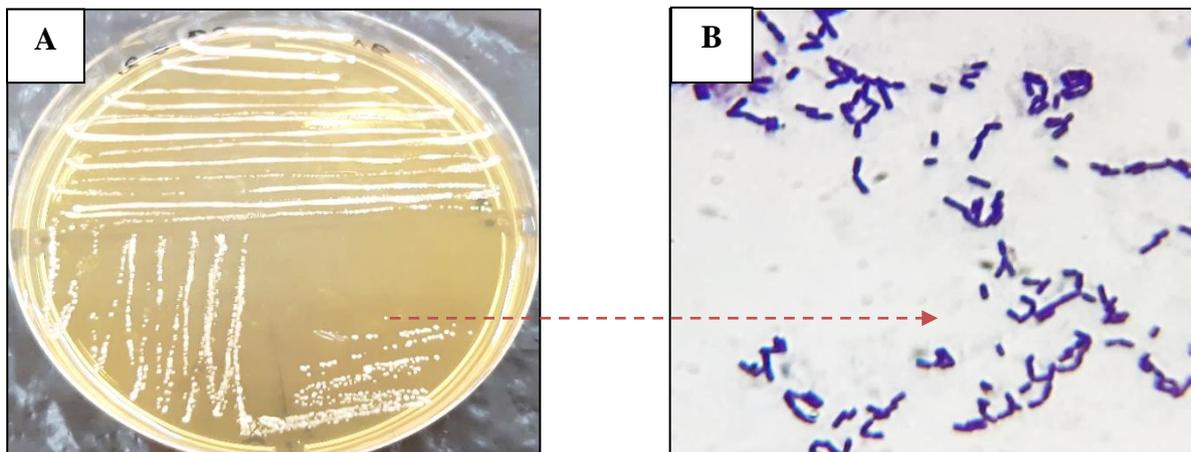
### *Résultats et Discussion*

## II.1 Identification des isolats lactiques

### II.1.1 Caractères morphologiques

#### II.1.1.1 Identification de bactérie lactique isolée de Lactibiane®

Les résultats de l'identification morphologique de la souche lactique isolée à partir de lactibiane sont présentés dans la figure 2. Les résultats concernant L'observation macroscopique montrent que la souche cultivée sur milieu MRS solide donne des petites colonies d'environ 1mm de diamètre, de forme circulaire, de couleur blanchâtre avec une surface lisse plus ou moins bombée et de contour régulier (figure2A). Parallèlement, l'examen microscopique révèle que la bactérie isolée est de Gram positive. Ces cellules bactériennes se présentent sous forme de bâtonnet court isolées, ou regroupées en paires (figure 2 B).



**Figure 2.** Aspects macroscopique (A) et microscopique (B) de la bactérie isolée à partir de Lactibiane® sur la gélose MRS (**Objectifx100**), coloration de Gram.

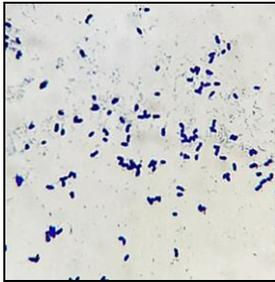
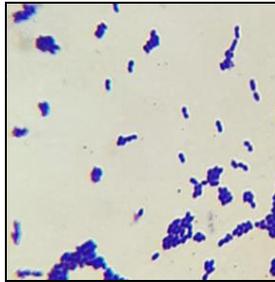
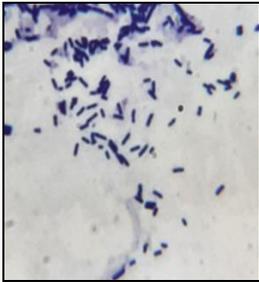
#### II.1.1.2 Identification des isolats lactiques issus de blé fermenté

L'observation macroscopique des cultures sur la gélose MRS révèle plusieurs aspects morphologiques des colonies à savoir :

- Colonies circulaires, moyennes, lisses, plus ou moins bombées de couleur blanchâtre ayant un contour régulier.
- Petites colonies lisses arrondies à contour distinct de couleur blanche.

Les résultats des caractères cultureux et morphologiques des isolats lactiques à partir de blé fermenté sont représentés dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Aspects macroscopique et microscopique des isolats lactiques à issus de blé fermenté sur gélose MRS après coloration de Gram (Objectifx100).

Isolats	<i>LB1</i>	<i>LB2</i>	<i>LB3</i>	<i>LB4</i>
Incubation	Aérobie	Aérobie	Anaérobie	Anaérobie
Aspect macroscopique				
Aspect microscopique				

Parallèlement, l'examen microscopiques montre que les bactéries lactiques isolées sont Gram positives et apparaissant sous deux formes :

- Coques disposées, en paire, groupés en amas et des fois en courtes chaînes.
- Bâtonnets courts, isolés, et paire et même en amas.

A l'issue des résultats macroscopiques et microscopiques et le test de catalase, quatre isolats ont été retenus et sont désignés par les codes *LB1*, *LB2*, *LB3* et *LB4*. Ce premier screening nous a permis de mettre en évidence la présence des lactobacilles et des coques différents.

## II.1.2 Caractères biochimiques

### II.1.2.1 Pré-identification biochimique des isolats lactiques issus de Lactibiane® et du blé fermenté

Les caractères biochimiques de l'isolat issue Lactibiane® et les quatre isolats lactiques de blé fermenté sont représentés dans le tableau 3.

**Tableau 3.** Pré-identification biochimique des isolats lactiques issus de Lactibiane® et du blé fermenté.

Tests biochimiques	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>LB1</i>	<i>LB2</i>	<i>LB3</i>	<i>LB3</i>
Catalase	-	-	-	-	-
Type fermentaire	Homo	Hétéro	Hétéro	Hétéro	Homo
Mannitol	+	-	-	-	+
Citrate de Simmons	/	-	-	/	/

- : Résultats négatif                      + : Résultats positif

Homo : Homofermentaire                  Hétéro : hétéro fermentaire

La pré-identification biochimique révèle que l'isolat lactique de Lactibiane® ne possède pas une activité de catalase, ne produit pas de gaz (CO<sub>2</sub>) lors de la fermentation de glucose (homofermentaire), par contre elle fermente le mannitol. L'ensemble des résultats obtenus concernant les caractères morphologiques, biochimiques sont identiques aux caractéristiques principales de l'identification décrites dans le manuel de Bergey de la bactériologie systématique (**Kandler et Weiss., 1986**) et Procaryotes (**Hammes et al., 1992**). Ces résultats nous a permis de confirmer que la souche probiotique isolée appartient au genre *Lactobacillus*.

Les résultats des caractères biochimiques des bactéries isolées du blé fermenté indiquent que les isolats *LB1*, *LB2* et *LB3* produisent le gaz à partir de glucose, elles sont donc considérées comme hétérofermentaire. Mais, elles n'utilisent pas le citrate comme unique source de carbone et elles ne fermentent pas le mannitol. Cependant la bactérie *LB4* fermente le mannitol et elle est homofermentaire.

Les résultats obtenus concernant les caractères biochimiques nécessitent des tests complémentaires afin d'identifier le genre de chaque isolat étudié.

## II.2 Activité antibactérienne des isolats lactiques à partir de Lactibiane® et du blé fermenté

### II.3

#### II.3.1 Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la Méthode de diffusion sur gélose

Les résultats de l'antagonisme évalués par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions (tableau 4) montrent que l'isolat lactique de Lactibiane (*Lactobacillus*) exerce un effet inhibiteur important sur la croissance de l'ensemble des souches à savoir *E. coli*, *P.aeruginosa*, *B. subtilis* et *B. cereus*. En effet, les diamètres des zones d'inhibitions sont situés entre  $17,49 \pm 0,25$  et  $15,47 \pm 0,40$  mm contre *B. subtilis* et *B. cereus* et entre  $13,6 \pm 0,45$  et  $10,77 \pm 0,09$  mm contre *P. aeruginosa* et *E. coli*, respectivement.

**Tableau 4.** Diamètres des zones d'inhibition (mm) induits par *Lactobacillus* sp et les quatre isolats en présence des souches pathogènes étudiées.

<i>Isolats lactiques</i>	<i>Souches pathogènes</i>			
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
<i>Lactobacillus</i> sp	$17,49 \pm 0,25$	$15,47 \pm 0,40$	$13,6 \pm 0,45$	$10,77 \pm 0,09$
<i>LB1</i>	-	-	$10,33 \pm 0,58$	-
<i>LB2</i>	-	-	-	-
<i>LB3</i>	-	-	-	-
<i>LB4</i>	-	-	$9,17 \pm 0,94$	-

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne  $\pm$  Écart-type des essais)

- : absence de zone d'inhibition

Cette activité est élevée contre les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif, ce qui est en accord avec les travaux de **Parada et al ., (2007) ;Zeng et al., (2011)**, ces auteurs indiquent dans leur travaux que la capacité inhibitrice de certaines souches du genre *Lactobacillus*, à l'instar de *L.plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* isolées à partir d'un produit laitier , à inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *Yesrinia enterocolotica* ,Cette capacité inhibitrice est due à la production de bactériocines (**Turfail et al .,2011**), ces molécules ont un effet plus accentuées sur les bactéries pathogènes Gram positive que les bactéries à Gram négatif. Le mécanisme impliqué dans cette inhibition se traduit par une induction d'une perforation de la membrane cytoplasmique entrainant ainsi des perturbations des fonctions cellulaires (**El Moualdi et al., 2008 ; Dortu et al., 2009**). La

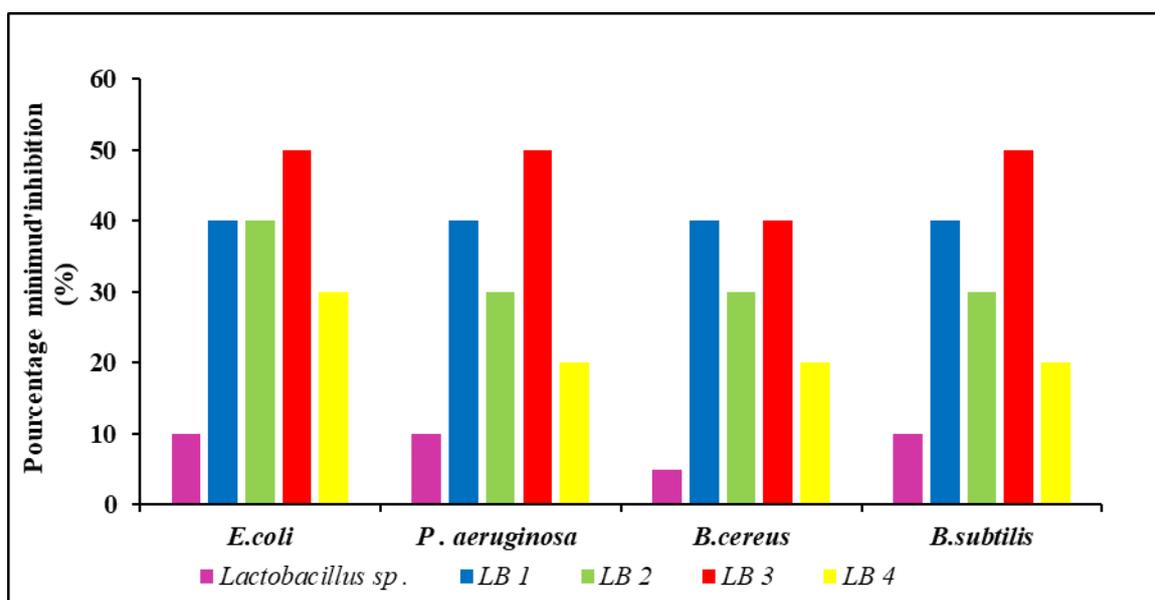
différence entre l'inhibition Gram+/Gram- est expliquée par **Savado** et ses collaborateurs (2004), ils indiquent une interaction entre la pédiocine (bactériocine synthétisée par *Pediococcus sacidilactici*) et l'acide lipothécoïque qui est présent chez les bactéries Gram positive et absent chez les Gram négative.

En revanche, les résultats de l'activité antibactérienne des isolats *LB2* et *LB3* issus du blé fermenté indiquent que ces souches n'exercent aucun effet inhibiteur (évalué par la méthode des puits) vis-à-vis des souches pathogènes testées.

A l'exception des deux isolats *LB1* et *LB4*, celles-ci entraînent une faible activité inhibitrice sur la croissance de *P. aeruginosa*, les diamètres des zones d'inhibition est de  $10,33 \pm 0,58$  pour la souche *LB1* et de  $9,17 \pm 0,94$  mm pour la souche *LB4*.

### II.3.2 Détermination des Pourcentages minimum d'inhibitions (PMI) des surnageants issus des cultures des isolats lactiques par la méthode de microdilution

Les résultats d'évaluation des PMI par la méthode de microdilution (figure 3) évoquent que tous les isolats *Lactobacillus sp.*, *LB1*, *LB2*, *LB3* et *LB4* entraînent des spectres d'activité antibactérienne différents. L'effet inhibiteur le plus puissant de surnageant de culture de *Lactobacillus sp* a été observée contre *B. cereus* avec un PMI de 5% suivie par *B. subtilis*, *E. coli* et *p. aeruginosa* avec un PMI de 10%. En revanche, les surnageants issus des cultures des isolats de blé fermenté, enregistrent des PMI entre 20 et 40%. Cependant, l'isolat *LB3* possède une très faible activité inhibitrice sur *B. cereus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*, ceci est indiqué par des PMI supérieurs à 40% en comparaison avec la souche probiotique du genre *Lactobacillus sp*.



**Figure 3.** Pourcentage minimum d'inhibition (%) (PMI) des isolats lactiques vis à vis des souches pathogènes.

Les résultats obtenus corroborent ceux dévoilé par **khan et al., (2021)**, ces derniers ont montré que la souche *Lactobacillus agilis* exerce un effet antagoniste important contre *E. coli* et *Staphylococcus aureus*. D'autres auteurs ont démontré, au cours de leurs travaux, que, la souche probiotique de *L. rhamnosus* GG est capable de produire des substances inhibitrices telles que le peroxyde d'hydrogène et le pyroglutamate qui inhibent la croissance de plusieurs bactéries à Gram positive ainsi que les Gram négatives (**Drouault et Corthier,2001**).

Cependant, certaines études confirment que les bactéries lactiques synthétisent d'autre métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline et le diacétyle et la bactériocine (**Turfail et al., 2011 ; Arena et al., 2016**).

Aussi, nos résultats sont en accord avec **Tahlaiti et al, (2017)** qui ont trouvé que les souches lactiques *L. plantarum* (M6, R27), *L. brevis* (BL8) et *Pediococcus acidilactici* (M54) de blé fermenté algérien (Hamoum), exercent une activité inhibitrice très puissante contre *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*.

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées, observée au cours de cette présente étude, pourrait être due à l'action des acides organiques, en particulier l'acide lactique et acétiques qui peuvent affecter la membrane cellulaire, et exercer ainsi un effet bioprotecteur ou inhibiteur contre d'autres microorganismes en raison de l'effet compétitif pour les nutriments. Une production d'une variété de substances antimicrobiennes entre autres, le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, l'acide formique, l'acétoïne, le diacétyle et les bactériocines est mis cause dans l'activité antibactériennes de ces souches (**Morandi et al., 2013**).

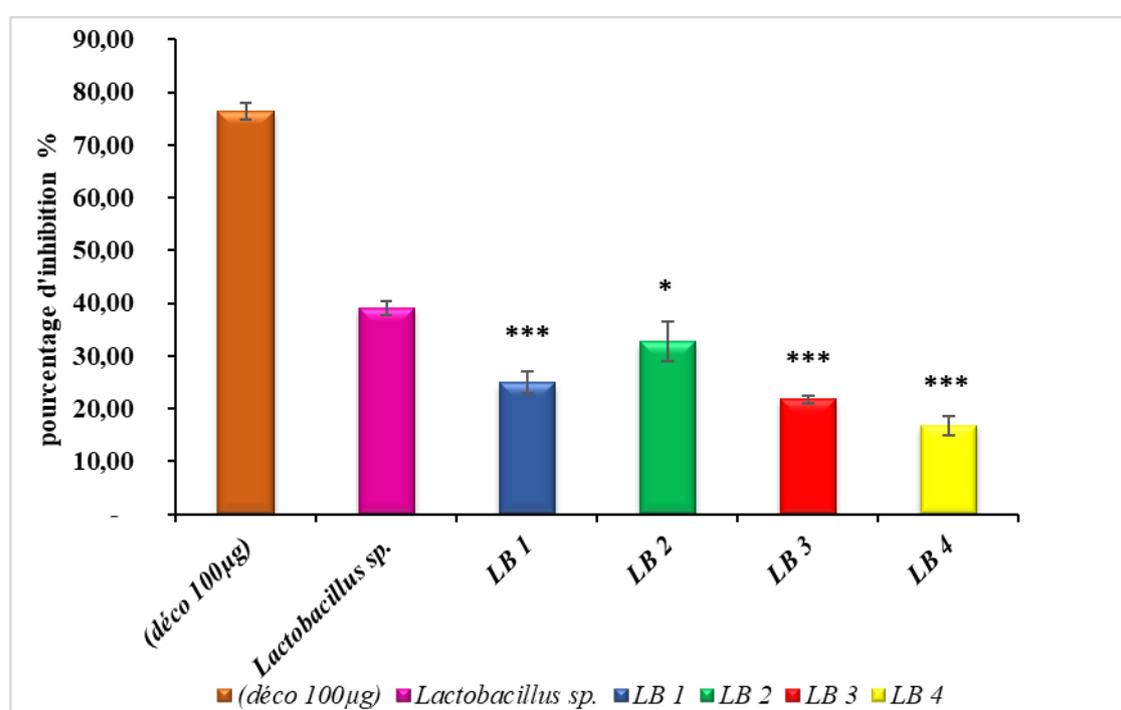
Les résultats obtenus au cours d'une étude menée par **Chentouf et Benmecherrhene, (2016)** sur l'isolement des souches *Leuconostoc.*, exhibent une capacité inhibitrice de sept souches de *Leuconostoc mesenteroides* productrices des bactériocines contre la croissance des bactéries pathogènes, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Staphylococcus aureus* et *E. coli*.

L'inhibition de certaines bactéries pathogènes peut aussi être associée à l'action des exopolysaccharides synthétisés par les souches probiotiques productrices (**Denkova et al., 2017**). Les exopolysaccharides sont capable de perturber la structure de l'enveloppe cellulaire bactérienne, en particulier la couche de peptidoglycane. Ce qui peut mener au blocage des récepteurs ou des canaux situés sur la membrane externe des bactéries Gram-négatives (**Sivasankar et al.,2018**). De même, ont rapporté que les exopolysaccharides facilitent

l'accumulation de métabolites secondaires dans le milieu de croissance, ce qui pourrait avoir un effet négatif sur les bactéries pathogènes à Gram-positifs et négatifs.

#### II.4 Activité anti-inflammatoire des isolats lactiques

L'activité anti-inflammatoire in vitro des isolats lactiques par le biais de l'inhibition de dénaturation de l'albumine de sérum bovin (BSA) a été évaluée dans les mêmes conditions que celle d'une molécule anti-inflammatoire de synthèse utilisée comme référence le diclofénac. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition. La figure 4 illustre les différents pourcentages obtenus.



**Figure 4.** Activité anti-inflammatoire in vitro de *Lactobacillus sp* et les quatre isolats.

De ces résultats, on constate, que la souche de *Lactobacillus sp.* (utilisée comme probiotique de référence) représente la bactérie la plus active avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 39,14%, alors que les bactéries : *LB1*, *LB2*, *LB3* et *LB4*, montrent une activité anti-dénaturante, vis-à-vis du BSA, inférieure à celle de *Lactobacillus sp.* avec des pourcentages d'inhibition de 24,93 ; 32,71 ; 21,72 et 16,76%, respectivement.

Toutefois, ce pouvoir reste largement inférieur à celui constaté avec le standard diclofénac (voir figure 4). Ce dernier montre une activité inhibitrice de dénaturation puissante évaluée par un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 76,41%.

La dénaturation des protéines est une des causes de l'inflammation bien évoquée dans la littérature (**Brooks, 2006 ; Medina, 2011**). En effet, d'après les résultats obtenus une différence dans la capacité protectrice des bactéries lactiques contre la dénaturation de l'albumine de sérum bovin a été constatée. Donc, il est évident qu'il existe relation entre le genre de bactérie lactique étudiée et l'activité anti-dénaturante de BSA. Cette différence dans les pourcentages d'inhibition peut être attribuée à la nature et la quantité des molécules bioactives synthétisées par ces isolats lactiques.

Dans une étude réalisée par **Khan et ses collaborateurs en 2021**, sur l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro de *Lactobacillus agilis* isolée à partir de rhizosphère des plantes médicinales, le pourcentage d'inhibition obtenu est de l'ordre de 61,6%, en utilisant la même méthode que celle utilisée au cours de cette étude : l'inhibition de dénaturation de BSA.

En outre, **Jain et Mahta (2017)**, ont montré que de *Lactobacillus casei* GM10 et *Enterococcus faecium* BM10 ont une activité anti-dénaturante importante de BSA.

L'effet anti-inflammatoire et le potentiel des souches probiotiques dans la prévention des maladies inflammatoires chroniques ont été largement démontrés. En effet ceci est confirmé par l'étude de **Amdekar et al., (2012)** menée sur l'activité anti-inflammatoire de que *L. casei* et *L. acidophilus* chez les rats. **Ganji-Arjenaki et Rafieian-Kopaei** ont également montré en 2018 que l'administration de *Lactobacillus* a réduit l'état inflammatoire de l'intestin chez le rat. Le mécanisme impliqué dans l'activité anti-inflammatoire des bactéries probiotiques passe par la réduction de la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. Aussi il a été démontré que l'activité immunomodulatrice de *Lactobacillus plantarum* N14 et *L. delbrueckii* TUA4408L interfère avec la signalisation TLR. Les EPS jouent aussi un rôle clé dans l'effet anti-inflammatoire de *Lactobacillus plantarum* N14 et *Lactobacillus delbrueckii* TUA4408L (**Laiño et al., 2016**).

## *Conclusion et Perspectives*

Actuellement, un grand intérêt s'est développé pour la manipulation de la microflore intestinale, en vue d'une communauté microbienne mieux équilibrée. Parmi les approches de modulation, la stratégie probiotique consiste en la prise de microorganismes vivants, sélectionnés en raison de leur effet bénéfique sur la santé de l'hôte, aussi elles peuvent constituer une solution alternative à la prescription des antibiotiques. Parmi ces microorganismes bénéfiques, les bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels occupent une place d'excellence et un choix à prendre en considération dans le domaine alimentaire et médicale.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude s'intéresse à étudier l'interaction entre bactéries lactiques et bactéries pathogènes via l'isolement et l'identification des bactéries lactiques à partir de blé fermenté et l'évaluation de leur propriété anti-inflammatoire.

Les résultats obtenus de l'identification des isolats lactiques du blé fermenté a permis de mettre en évidence la sélection de quatre isolats lactiques sous forme lactobacilles et coques différents (*LB1*, *LB2*, *LB3*, *LB4*).

Concernant les résultats de l'activité antibactérienne évaluée par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions révèlent que la souche de probiotique de référence *Lactobacillus* sp. exerce un effet inhibiteur important sur la croissance de l'ensemble des souches pathogènes étudiées et ce en comparaison avec les isolats lactiques issus du blé fermenté.

Parallèlement, les résultats d'évaluation des pourcentages minimum d'inhibition (PMI) par la méthode de microdilution évoquent que l'effet inhibiteur le plus puissant de surnageant de culture de *Lactobacillus* sp. a été observée contre *B. cereus* avec un PMI de 5% suivie par *B. subtilis*, *E. coli* et *P. aeruginosa* avec un PMI de 10%. En revanche, les surnageants issus des cultures des isolats du blé fermenté, enregistrent des PMI entre 20 et 40%.

Par ailleurs, les résultats d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro montrent que la souche de *Lactobacillus* sp. représente la bactérie la plus active avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 39,14%, alors que les bactéries : *LB1*, *LB2*, *LB3* et *LB4*, montrent une activité anti-dénaturante, vis-à-vis du BSA, inférieure à celle de *Lactobacillus* sp. avec des pourcentages d'inhibition de 24,93 ; 32,71 ; 21,72 et 16,76%, respectivement.

Toutefois, ce pouvoir reste largement inférieur à celui constaté avec le standard décolfinac.

L'ensemble de ces résultats nous laisse suggérer que les bactéries lactiques issus du blé fermenté peuvent être proposés comme une solution alternative aux antibiotiques dans le traitement des infections et être présentés comme un anti-inflammatoire puissant dans une optique d'un traitement préventif. Cependant il est clair que des tests supplémentaires et des investigations plus profondes sont nécessaires à entreprendre afin de valider et consolider ces résultats. Les perspectives de cette présente étude visent à

- Identifier les isolats lactiques par la galerie api 50CH et par les techniques moléculaires telles que la PCR...).
- Faire une caractérisation plus poussée et une purification des substances inhibitrices produites par les isolats lactiques.
- Evaluer l'activité antibactérienne en utilisant d'autre test.
- Evaluer l'activité anti-inflammatoire in vivo.
- Déterminer les propriétés probiotiques des isolats lactiques.

## *Références Bibliographiques*

A

**Ajao, O., Banwo, K., Ogunremi, O. et Sanni, A. (2021).** Propriétés antimicrobiennes et potentiels probiotiques des bactéries lactiques isolées du bœuf cru à Ibadan, au Nigeria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 770-773.

**Akbar, M., McLean, M., Garcia-Melchor, E., Crowe, LA, McMillan, P., Fazzi, UG, ... & Millar, NL (2019).** Activation et inflammation des fibroblastes dans l'épaule gelée. *Plos un*, 14 (4), e0215301.

**Amdekar, S., Roy, P., Singh, V., Kumar, A., Singh, R., & Sharma, P. (2012).** Anti-inflammatory activity of lactobacillus on carrageenan-induced paw edema in male wistar rats. *International journal of inflammation*, 752015.

B

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

**Bourgeois, C.M., Larpent, J.P (1996).** Microbiologie alimentaire in : aliments fermentés et fermentation alimentaire. 2<sup>ème</sup> Ed : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, P : 4.

**Brooks, PM (2006).** Le fardeau des maladies musculo-squelettiques – une perspective mondiale. *Rhumatologie Clinique*, 25 (6), 778-781.

C

**Chen, C. C., Lai, C. C., Huang, H. L., Huang, W. Y., Toh, H. S., Weng, T. C et Tang, H. J. (2019).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Frontiers in microbiology*, 10, 789.

D

**Delarras, C. (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissures Lavoisier-Tec & Doc P :476.

**Delzenne, N. M., Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., & Burcelin, R. (2008).** Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57(6), 1470-1481.

**Denkova, R., Goranov, B., Teneva, D., Denkova, Z. et Kostov, G. (2017).** Activité antimicrobienne des micro-organismes probiotiques : mécanismes d'interaction et méthodes d'examen. *Recherche antimicrobienne : nouvelles connaissances biologiques et programmes éducatifs*, 201-212.

**Djadouni, F. (2013).** Evolution de l'activité antimicrobienne des isolats des bactéries lactiques et détermination des spectres d'action de leurs biopeptides vis-à-vis des germes d'altération. Thèse de doctorat, Université d'Oran.

**Dortu, C., & Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13 (1), 143-154.

**Drouault, S., & Corthier, G. (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Recherche vétérinaire*, 32 (2), 101-117.

### E

**El Moualdi, L., Labioui, H., Boushama, L., Benzakour, A., Ouhssine, M., & Yachioui, E. M. (2008).** Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 147, 7-18.

### F

**Florou-Paneri, P., Christaki, E., & Bonos, E. (2013).** Les bactéries lactiques comme source d'ingrédients fonctionnels. Dans *Bactéries lactiques-R&D à des fins alimentaires, sanitaires et d'élevage*.

### G

**Gálvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., et Lucas, R. (2011).** Food Applications and Regulation. Dans Drider, D., et Rebuffat, S. (dirs.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications (1<sup>st</sup>Ed)*.

**Ganji-Arjenaki, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2018).** Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta-analysis and systematic review. *Journal of cellular physiology*, 233(3), 2091-2103.

### H

**Hammes, W. P., Weiss, N et Holzappel, W. (1992).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: *The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, (2nd ed.), edited by Balows, A., et al. *Springer-Verlag*, New York, 535-1573.

**Hawaz, E. (2014).** Isolement et identification de bactéries lactiques probiotiques du caillé et évaluation in vitro de ses activités d'inhibition de la croissance contre les bactéries pathogènes. *Journal africain de recherche en microbiologie*, 8 (13), 1419-1425.

### I

**İşcan G, Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Başer, H. C., & Demirci, F. (2002).** Antimicrobial screening of Menthapiperita essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(14), 3943-3946.

### K

**Kandler, O., Weiss, N. (1986).** Regular, non-sporing gram-positive rods. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1, edited by Krieg, N. et al. Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co, 1208 -1234.

**Kar, B., Kumar, R. S., Karmakar, I., Dola, N., Bala, A., Mazumder, U. K., & Hadar, P. K. (2012).** Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of *Mimusops elengi* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S976-S980.

**Kar, B., Nepal, A., Kumar, R. B., Dolai, N., Bhattacharya, S., Upal, K., et al. (2013).** Antioxidant and anti-inflammatory properties of *hymenodictyon excelsum* bark. *Orient Pharm Exp Med* 2,13(2),103-11.

**Khan, A. N., Yasmin, H., Ghazanfar, S., Hassan, M. N., Keyani, R., Khan, I., ... & Ahmad, A. (2021).** Antagonistic, Anti-oxidant, Anti-inflammatory and Anti-diabetic Probiotic Potential of *Lactobacillus agilis* Isolated from the Rhizosphere of the Medicinal Plants. *Saudi journal of biological sciences*, 28(11), 6069-6076.

**Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B et Možina, S. S. (2010).** Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*, 81(2), 121-126.

## L

**Labioui, H., El Moualdi L., El, Yachioui, M et Ouhssine, M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux* (144), 237.

**Laiño, J., Villena, J., Kanmani, P. et Kitazawa, H. (2016).** Effets immunorégulateurs déclenchés par les exopolysaccharides des bactéries lactiques : nouvelles connaissances sur les interactions moléculaires avec les cellules hôtes. *Microorganismes*, 4 (3), 27.

## M

**Makhloufi, K. M. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza .Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

**Marchal et al., (1991), Guiraud, (2003). Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, C.L. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 -ème Edition Doin éditeurs, Paris.

**Morandi, S., Cremonesi, P., Silveti, T. et Brasca, M. (2013).** Caractérisation technologique, sensibilité aux antibiotiques et activité antimicrobienne des souches sauvages de *Leuconostoc* isolées des fromages traditionnels du nord de l'Italie. *Journal de la recherche laitière*, 80 (4), 457-466.

## P

**Parada, JL, Caron, CR, Medeiros, ABP et Soccol, CR (2007).** Bactériocines issues de bactéries lactiques : purification, propriétés et utilisation comme bioconservateurs. Archives brésiliennes de biologie et technologie, 50 (3), 512-542.

**Prescott, A. R., Chen, W. M., James, E. K., Kierans, M., & Sprent, J. I. (2003).** Nodulation of Mimosa spp. by the  $\beta$ -proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 16(12), 1051-1061.

### R

**Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., et Penna, A. L. B. (2012).** Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. Food Engineering Reviews, 4(2), 124-140.

### S

**Savadogo, A., Ouattara, CA, Bassole, IH, & Traoré, AS (2004).** Activités antimicrobiennes des souches de bactéries lactiques isolées du lait fermenté du Burkina Faso. Journal pakistanais de la nutrition, 3 (3), 174-179.

**Sivamaruthi, B. S., Kesika, P., & Chaiyasut, C. (2020).** The role of probiotics in colorectal cancer management. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 12(10), 2936.

**Sivasankar, P., Seedeve, P., Poongodi, S., Sivakumar, M., Murugan, T., Sivakumar, L., et al. (2018).** Characterization, antimicrobial and antioxidant property of exopolysaccharide mediated silver nanoparticles synthesized by *Streptomyces violaceus* MM72. Carbohydr. Polym. 181 752–759. 10.1016/j.carbpol.2017.11.082.

**Su, J., Wang, T., Li, Y. Y., Li, J., Zhang, Y., Wang, Y et Li, H. (2015).** Antioxidant properties of wine lactic acid bacteria: *Oenococcus* sp. Applied microbiology and biotechnology, 99(12), 5189-5202.

### T

**Tahlaïti, H., Dalache, F., Homrani, A., & Nemmiche, S. (2017).** Caractérisation et criblage du potentiel probiotique de bactéries lactiques isolées à partir de blé " Hamoum " traditionnellement fermenté. Journal sud-asiatique de Biologie expérimentale, 7 (4), 181-190.

**Tufail, M., Hussain, S., Malik, F., Mirza, T., Parveen, G., Shafaat, S., ... & Sadiq, A. (2011).** Isolement et évaluation de l'activité antibactérienne de la bactériocine produite par *Lactobacillus bulgaricus* à partir du yaourt. Journal africain de recherche en microbiologie, 5 (22), 3842-3847.

### W

**Walker, D. E et Gilliland, S. E. (1993).** Relationship among bile tolerance, bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by *Lactobacilli acidophilus*. Journal of Dairy Sciences, (76) ,956 -961.

### Y

**Yadav, R and Shukla, P. (2017).** Chapter 6: Probiotics for human health: current progress and applications. *Recent advances in applied microbiology*, 133-147

**Yang et al. (2012).** antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, (2),48.

**Z**

**Zeng, XQ, Pan, DD et Zhou, PD (2011).** Caractéristiques fonctionnelles de *Lactobacillus fermentum* F1. *Microbiologie actuelle*, 62 (1), 2.

## *Annexes*

## Annexe 1

### Probiotique de Lactibiane tolérance

Lactibiane Tolérance est un complément alimentaire de micro-nutrition composé de 5 souches Bactérien concentrées à  $10^{10}$  par sachet :

- *Bifidobacterium lactis* LA 303
- *Lactobacillus acidophilus* LA 201
- *Lactobacillus plantarum* LA 301
- *Lactobacillus salivarius* LA 302
- *Bifidobacterium lactis* LA 304



L'ensemble des 5 souches sélectionnées pour Lactibiane Tolérance® répond à tous nos critères de qualité :

- Absence de pathogénicité pour l'homme.
- Viabilité des souches et survie dans le tube digestif.
- Adhésion aux cellules épithéliales intestinales.
- Modulation des réponses immunitaires.
- Effets souche et dose dépendants.

## Annexe 2

### Composition des milieux de cultures utilisés

- **Milieu Mrs Liquide (de De Man Rogosa et Sharpe ,1960)**

Peptone bactériologique.....	10g
Extrait de viande.....	8,0g
Extrait autolytique de levure.....	4,0g
Glucose.....	20g
Tween.....	80g
Phosphate dipotacium.....	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).

- **Gélose de Mueller-Hinton :**

Pour 1 litre de milieu :

Infusion de viande de bœuf.....	300g
Hydrolysate de caséine .....	17g

Amidon.....1,5g

Gélose.....17g

Stérilisation A 121°C Pendant 15min

**(Delarras, 2007).**

## ***Annexe 3***

### **Technique de coloration de Gram, selon (Prescott et al. 2003)**

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

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par Passage rapide sur la flamme d'un bec benzène ; Couvrir le frottis par du violet de Gentiane pendant 60 secondes ;
- Ajouté du Lugol pendant 30 secondes ;
- Décoloré avec l'alcool 95% ;
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes ;
- Ajouter la fuchine et laisser pendant 15 à 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;

Après séchage déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope au grossissement ( $\times 100$ ).

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

## Annexe 4

### Préparation de tampon phosphate

- **PBS pH=6,3**

- 0.24g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1.44g de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$
- 0.2g de kcl
- 08g de Nacl

Mélanger tout dans 600 ml de l'eau bi distille, la solution est ajustée à pH 6,3 après complété le volume à 1L.

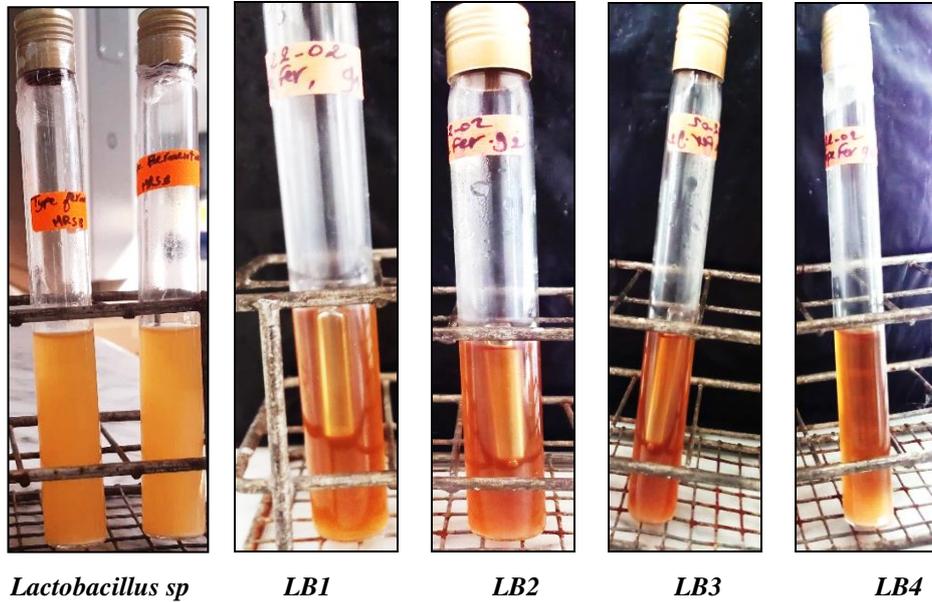
- **PBS PH= 7,4**

- 0,68g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  .....250ml eau distillée
- 1,14g de  $\text{K}_2\text{HO}_4$  .....250ml eau distillée

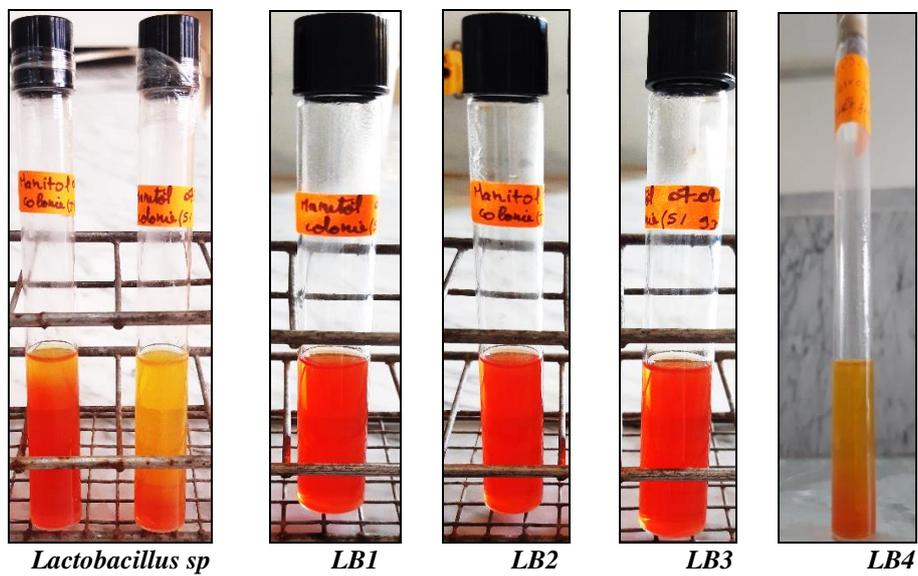
Mélanger 250ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 250 ml de  $\text{K}_2\text{HO}_4$ , la solution est ajustée à pH 7,4, Conserver les deux solutions à 4 C° pendant 03 mois.

## Annexe 5

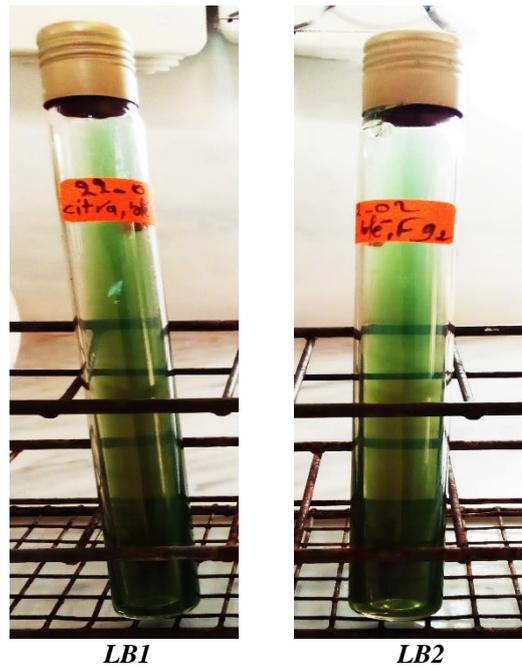
- Identifications biochimiques



**Figure 2.** Résultats du type fermentaires des isolats lactiques.



**Figure 3.** Résultats du test mannitol -mobilité des isolats lactiques.



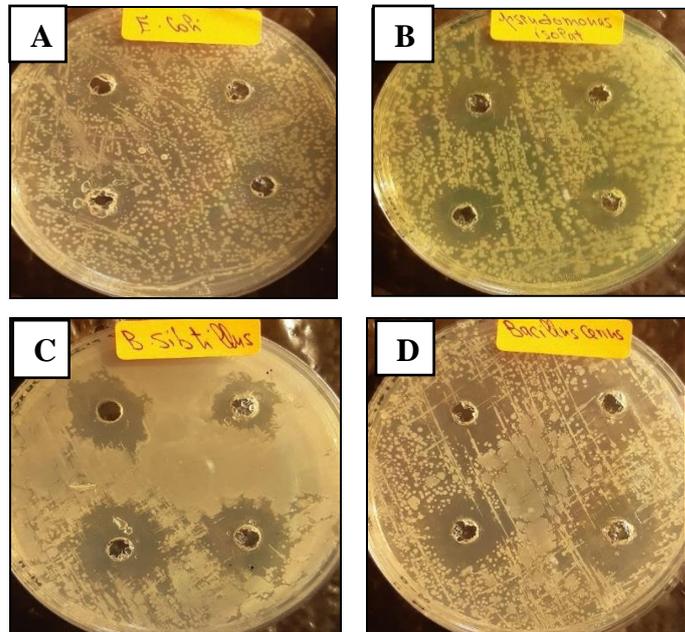
**Figure 4.** Résultats du test Citrate de Simmons des isolats lactiques.

- **Standardisation de l'inoculum à l'échelle 0,5Mc Farland**

Choisir des colonies bien isolées avec l'anse de platine et les transférer dans un tube de solution salée stérile. Émulsionner une quantité suffisante de culture bactérienne dans la solution salée la densité optique correspondante de cette solution doit être comprise entre {0,08-0,13}, dont la longueur d'onde est 625 nm elle est vérifiée à l'aide d'un spectrophotomètre après agitation avec vortex.

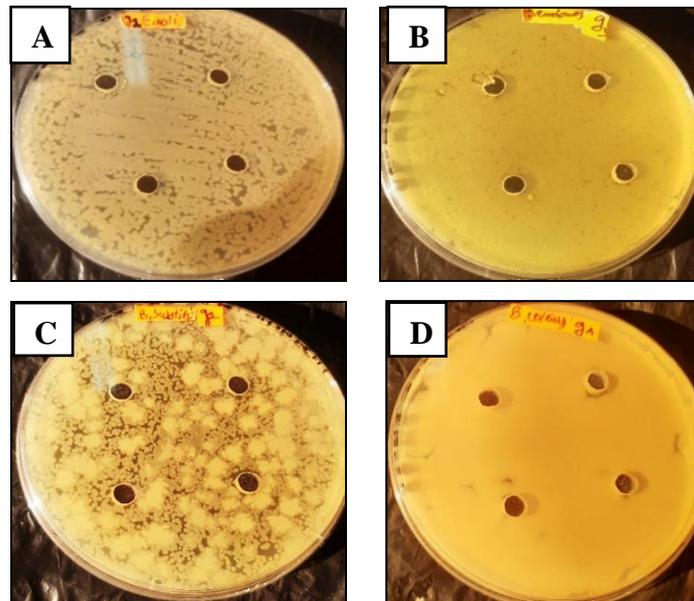
## Annexe 6

Effets antagonistes des isolats lactiques issus de lactibiane et du blé fermenté vis-à-vis des souches pathogènes testées par la méthode de diffusion.



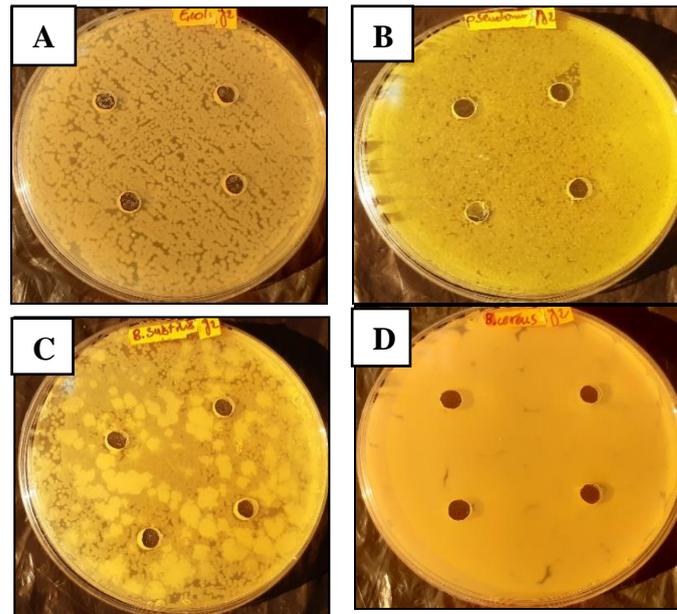
**Figure 5.** Effets antibactériens de *Lactobacillus* sp vis-à-vis des souches pathogènes

A) – *Lactobacillus* vis-à-vis *E. coli*      B) – *Lactobacillus* vis-à-vis *P. aeruginosa*  
 C) – *Lactobacillus* vis-à-vis *B. subtilis*      D) – *Lactobacillus* vis-à-vis *B. cereus*



**Figure 6.** Effets antibactériens de LB1 vis-à-vis des souches pathogènes

A) – LB1 vis-à-vis *E. coli*      B) – LB1 vis-à-vis *P. aeruginosa*  
 C) – LB1 vis-à-vis *B. subtilis*      D) – LB1 vis-à-vis *B. cereus*



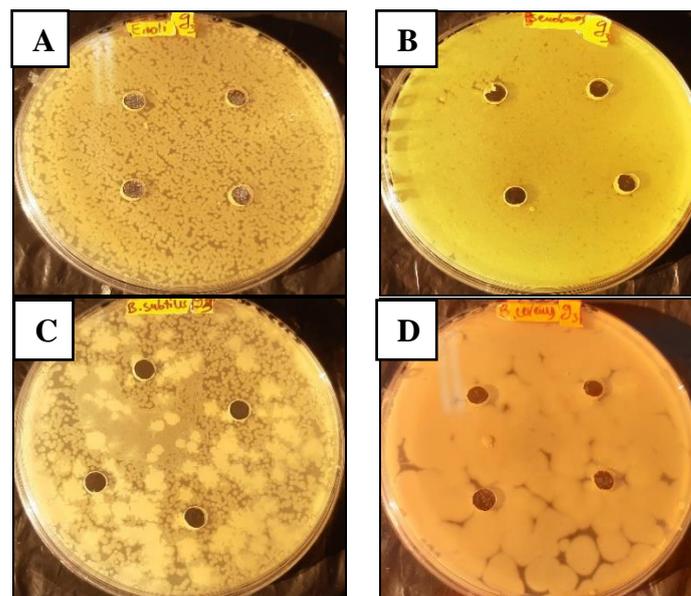
**Figure 7.** Effets antibactériens de LB2 vis-à-vis des souches pathogènes

A) – LB2 vis-à-vis *E. coli*

B) – LB2 vis-à-vis *P. aeruginosa*

C) – LB2 vis-à-vis *B. subtilis*

D) – LB2 vis-à-vis *B. cereus*



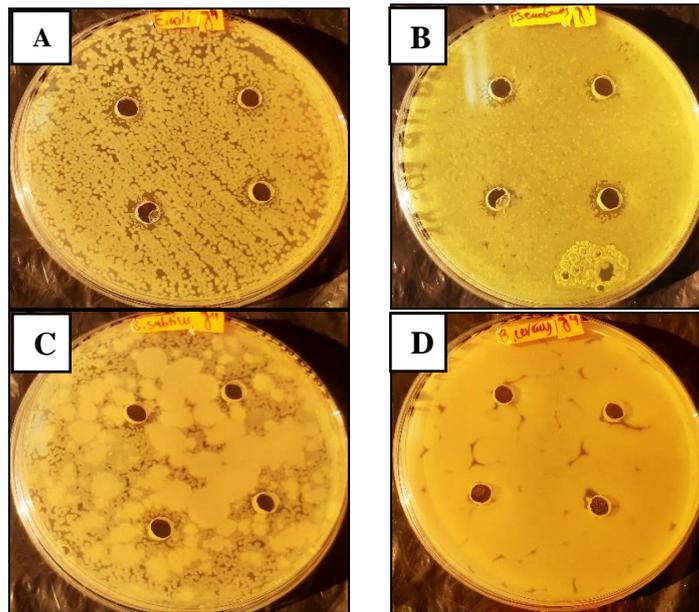
**Figure 8.** Effets antibactériens de LB3 vis-à-vis des souches pathogènes

A) – LB3 vis-à-vis *E. coli*

B) – LB3 vis-à-vis *P. aeruginosa*

C) – LB3 vis-à-vis *B. subtilis*

D) – LB3 vis-à-vis *B. cereus*



**Figure 9.** Effets antibactériens de LB4 vis-à-vis des souches pathogènes

A) – LB4 vis-à-vis *E. coli*

B) – LB4 vis-à-vis *P. aeruginosa*

C) – LB4 vis-à-vis *B. subtilis*

D) – LB4 vis-à-vis *B. cereus*

## Annexe 7

Effets antagonistes des isolats lactiques issus de lactibiane et du blé fermenté vis-à-vis des souches pathogènes testées par méthode de microdilution

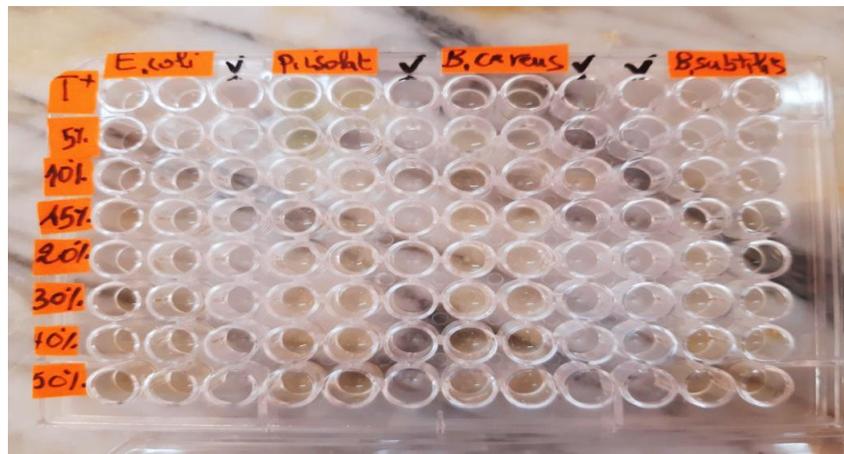


Figure 10. Activité antibactérienne des lactobacillus vis-à-vis des souches pathogènes avant l'incubation

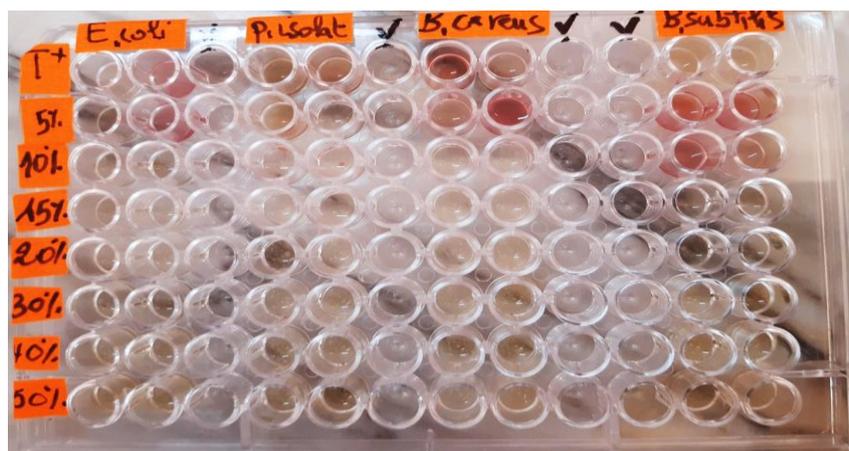
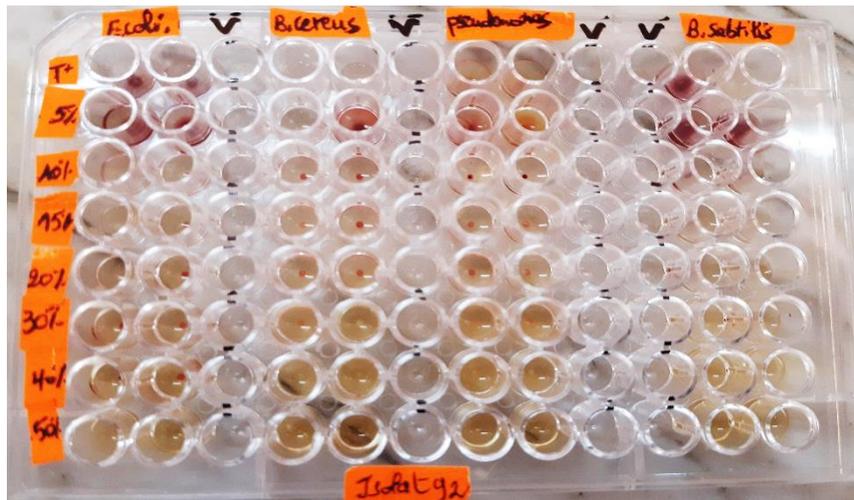


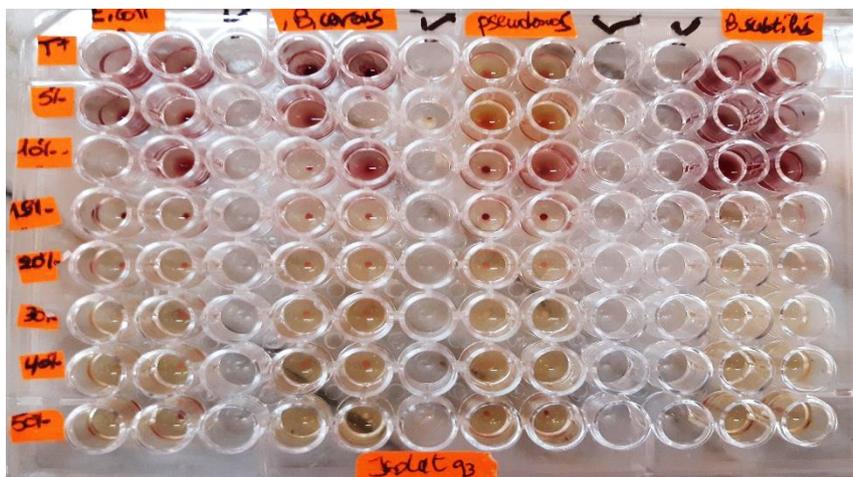
Figure 11. Activité antibactérienne des lactobacillus vis-à-vis des souches pathogènes après l'incubation



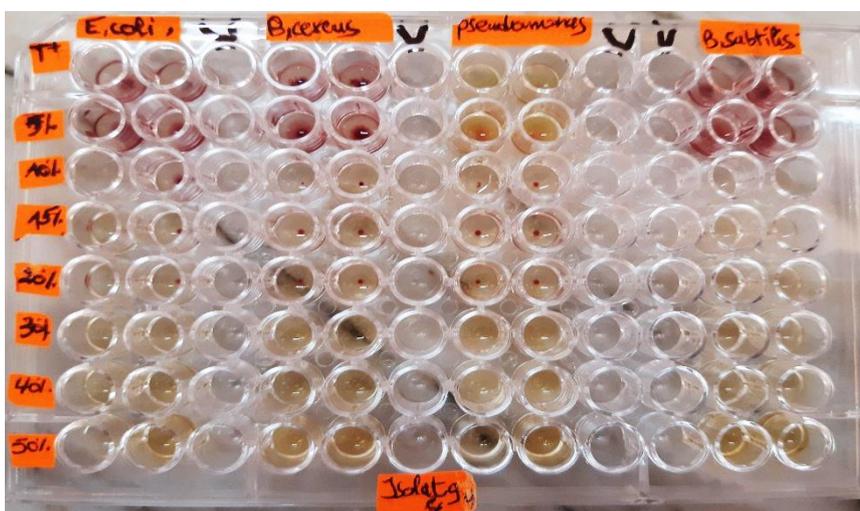
Figure 12. Activité antibactérienne des LB1 vis-à-vis des souches pathogènes après l'incubation



**Figure 13.** Activité antibactérienne des LB2 vis-à-vis des souches pathogènes après l'incubation



**Figure 14.** Activité antibactérienne des LB3 vis-à-vis des souches pathogènes après l'incubation



**Figure 15.** Activité antibactérienne des LB4 vis-à-vis des souches pathogènes après l'incubation

## *Résumé*

## Résumé

Les bactéries probiotiques peuvent être utilisées comme des agents biothérapeutiques et alternatives durables aux antibiotiques, aussi comme des agents anti-inflammatoires. Dans cette optique l'objectif de cette présente étude consiste dans un premier temps à isoler et à identifier certaines bactéries lactiques à potentiel probiotique à partir de mélange probiotique de Lactibiane® et de blé fermenté. Et dans un deuxième temps à évaluer in vitro leur pouvoir antagoniste et anti-inflammatoire. La pré-identification des quatre isolats lactiques retenus a été effectuée par les tests morphologiques et biochimiques. Alors que l'activité antibactérienne a été testée sur des bactéries Gram positives et négatives, en utilisant les méthodes de diffusion sur gélose et la microdilution. En parallèle, l'activité anti-inflammatoire in vitro a été évaluée par la technique d'inhibition de dénaturation des protéines (BSA).

Les résultats de l'activité antibactérienne obtenus montrent que la souche de probiotique de référence *Lactobacillus* sp. exerce un effet inhibiteur important vis-à-vis des souches pathogènes testées et ce en comparaison avec les isolats lactiques issus du blé fermenté. Par ailleurs, les résultats d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro montrent que la souche de *Lactobacillus* sp. représente la bactérie la plus active avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 39,14%, alors que les bactéries : LB1, LB2, LB3 et LB4, montrent une activité anti-dénaturante, vis-à-vis du BSA, inférieure à celle de *Lactobacillus* sp. avec des pourcentages d'inhibition de 24,93 ; 32,71 ; 21,72 et 16,76%, respectivement. Ces résultats laissent à suggérer que les isolats lactiques issus du blé fermenté agissent comme des agents antibactériens et anti-inflammatoires naturels efficaces et présentent de bons candidats probiotiques.

**Mots clés :** Bactéries lactiques, Activité antibactérienne, Activité anti-inflammatoire, Probiotique, aliment fermenté.

### المخلص

Probiotique يمكن استخدامها كعلاج حيوي متين وعوامل بديلة ، وأيضاً كعوامل مضادة للالتهابات. في هذا المنظور، يتكون الهدف من هذه الدراسة الحالية في المرة الأولى لعزل وتحديد بعض البكتيريا اللبنية probiotique مع احتمال من خليط probiotique من Lactibiane والقمح المخمر. وفي خطوة ثانية لتقييم قوتها المضادة ومضادة للالتهابات في المختبر. تم إجراء التحديد المسبق لعزلات اللبنة الأربعة المحتجزة بواسطة الاختبارات التشكيلية والكيميائية الحيوية. بينما تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا على بكتيريا الجرام الإيجابية والسلبية. باستخدام طرق الانتشار في الجهاز المضاد للالتهابات في المختبر تم تقييمها من خلال تقنية تثبيط تمسخ البروتين (BSA).

تظهر نتائج النشاط المضاد للبكتيريا التي تم الحصول عليها أن سلالة *Lactobacillus* sp probiotique. يمارس تأثير مثبت مهم تجاه السلالات المسببة للأمراض التي تم اختبارها وهذا بالمقارنة مع العزلات اللبنية من القمح المخمر. بالإضافة إلى ذلك، تظهر نتائج تقييم النشاط المضاد للالتهابات في المختبر أن سلالة *Lactobacillus* sp. يمثل البكتيريا الأكثر نشاطاً مع نسبة مئوية من تثبيط ترتب 39,14 ٪، في حين أن البكتيريا: LB1، LB2، LB3 و LB4، تظهر 24,93، 32,71، 21,72، 16,76 ٪ على التوالي. هذه النتائج تشير إلى أن العزلات اللبنية من القمح المخمر تعمل كعوامل فعالة مضادة للبكتيريا ومضادة للالتهابات ولديها مفعول probiotique جيدة.

**الكلمات الدالة:** البكتيريا اللبنية، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للالتهابات، probiotique، الطعام المخمر.