



UNIVERSITÉ  
DE BISKRA

Référence ..... / 2021

# MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

---

Présenté et soutenu par :

**KHARCHI Manel**

**LEMCHOUNCHI Fatima Zahra**

Le: 03-07-2021

## **Contribution à l'évaluation du potentiel probiotique de Lactobacillus isolées à partir de lait de chamelle**

---

### **Jury :**

Mme. MOUHAMEDDI Kenza	MAB	Université de Biskra	Président
Pr. BENKADDOUR Bachir	MAB	Université de Biskra	Rapporteur
M. AMIARI Toufik	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020/2021

## Remerciements

Nous remercions..

Tout d'abord ALLAH, le Clément, Miséricordieux le très Miséricordieux de nos avoir guidé et pour son aide à notre vie et à revoir nos années d'étude.

Au terme de la réalisation de ce mémoire, nous tenons à remercier:

Notre encadrant Mr: BENKADDOUR Bachir

pour avoir dirigé et supervisé ce modeste travail, ainsi que pour sa patience avec nous, son aide, et sa grande gentillesse, ses conseils précieux et sa disponibilité entière toute au long de la période de travail.

## Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes parents..

qui ont été toujours à mes côtés pour me donner le courage et l'aide pour commencer et pour terminer mes études, tous au long de temps.

Merci beaucoup ma mère Chamkha Samira et mon père Djamel.

Je vous aime beaucoup et je souhaite que vous restiez toujours près de moi et qu'ALLAH vous protège et vous donne bonne santé, ALLAH ykalikoume liya.

A ma grande sœur Salima..

Je n'oublierai jamais ta gentillesse envers moi, moral et financier.

A tous ceux que je porte dans mon cœur..

A mon cher mari Mohammed, Merci beaucoup pour votre fidélité et votre motivation.

A toute mes amies Hala, Najla et Fatiha, d'être resté à mes côtés depuis notre amitié. Merci pour vos encouragements, vos soutien dans les bons comme les mauvais moments, pour nos belles aventures passées et à venir ! Je vous aime beaucoup tous le temps.

*'Manel Rihanna'*

Je dédie ce travail :

A mes parents, ma mère et mon père..

grâce à vous, j'ai atteint ce succès.

A tous mes frères et mes sœurs..

A mon directeur au travail ..

qui m'a aidé et m'a donné bonne opportunité de terminer mes études et de travailler en même temps.

Un grand merci à tous.

*'Fatima Zahra'*

# Sommaire

Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures .....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction générale.....	1

## Partie 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre 1. LES LACTOBACILLES

1.1. Rappel sur les bactéries lactiques .....	3
1.2. Présentation de Genre <i>Lactobacillus</i> .....	3
1.2.1. Habitat .....	4
1.2. 2. Caractères morphologiques .....	4
1.2. 3. Caractères biochimiques.....	4
1.2.4. Caractères culturels et exigences nutritionnelles .....	5

### Chapitre 2. LES PROBIOTIQUES

2.1. Historique et définition des probiotiques.....	6
2.2. Critères de sélection et d'efficacité des probiotiques .....	7
2.2.1. Survie au cours du transit digestif .....	7
2.2.2 Adhésion à la muqueuse intestinale .....	7
2.2.3 Activité antimicrobienne .....	8
2.3. Lactobacilles probiotiques .....	9
2.4. Propriétés probiotiques des Lactobacilles .....	10
2.4.1. Diminution des diarrhées associées à l'antibiothérapie.....	10
2.4.2. Amélioration de la digestion du lactose .....	10
2.4.3. Action sur le syndrome d'irritabilité intestinale chronique .....	10
2.4.4. Effet anticancérogène .....	10
2.4.5. Effet sur la maladie de Crohn .....	11
2.4.6. Inhibition l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> .....	11
2.4.7. Effets sur les diarrhées à rota-virus .....	11
2.4.8. Réduction du cholestérol sérique.....	11

## Partie 2 : PARTIE EXPERIMENTALE

### Chapitre 3. MATERIEL ET METHODE

3.1. Cadre d'étude.....	12
3.2. Provenance des échantillons.....	12
3.3. Isolement des souches lactiques .....	12
3.4. Tolérance des souches à pH 2, à la pepsine et à la pancréatine.....	13
3.5. Tolérance à la bile.....	14
3.6. Identification des souches.....	14
3.7. Évaluation des caractéristiques probiotiques.....	14
3.7.1. Dégradation de la mucine .....	14
3.7.2. Activité hémolytique .....	15
3.7.3. Test de coexistence.....	15
3.7.4. Sensibilité aux antibiotiques.....	15
3.7.5. Activité anti-microbienne.....	16
3.7.6. Culture cellulaire .....	18
3.7.7. Test d'adhésion .....	18
3.7.8. Analyses statistiques.....	19

#### **Chapitre 4. RESULTATS ET DISCUSSION**

4.1. Tolérance des souches à pH 2, à la pepsine et à la pancréatine.....	20
4.2. Tolérance aux sels biliaries.....	22
4.3. Identification des souches résistantes .....	25
4.4. Dégradation de la mucine et production d'hémolysine.....	26
4.5. Résistance aux antibiotiques.....	27
4.6. Coexistence et activité antagoniste.....	30
4.7. Capacité d'adhésion .....	32
<b>Conclusion.....</b>	<b>36</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>39</b>

**Annexes**

**Résumé**

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Principaux critères utilisées pour la sélection des probiotiques (Ourtirane, 2013).	8
<b>Tableau 2.</b> Les Lactobacilles utilisés comme probiotiques (Belkheziz, 2020).	9
<b>Tableau 3.</b> Détermination de viabilité de 20 souches BAL en présence de pepsine à pH 2 et pancréatine après 3h et 4 h d'exposition <i>in vitro</i> .	20
<b>Tableau 4.</b> Détermination de viabilité de 20 souches BAL en présence de 0, 0,1, 0,3, 0,5 et 1% de sels biliaires à temps 0 d'exposition <i>in vitro</i> .	22
<b>Tableau 5.</b> Détermination de viabilité de 20 souches BAL en présence de 0, 0,1, 0,3, 0,5 et 1% de sels biliaires après 3h d'exposition <i>in vitro</i> .	23
<b>Tableau 6.</b> Détermination de viabilité de 20 souches BAL en présence de 0, 0,1, 0,3, 0,5 et 1% de sels biliaires après 5h d'exposition <i>in vitro</i> .	23
<b>Tableau 7.</b> Identification des LAB sur la base de la similarité avec le séquençage partiel de gène d'ADNr 16S.	25
<b>Tableau 8.</b> Résultats de sensibilité des 20 espèces de Lactobacillus sélectionnées aux 12antibiotiques,	28
<b>Tableau 9.</b> Résultats d'activité antimicrobienne de vingt LAB identifiées contre quatre souches pathogènes.	30

## Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Image au microscope électronique à balayage de la souche <i>L.rhamnosus GG</i> (Routier, 2019). .....	4
<b>Figure 2.</b> Préparation des séries de délutions 1/10 <sup>ème</sup> des échantillons de lait de chamelle pour isolement des bactéries lactiques (Saidi, 2020).....	13
<b>Figure 3.</b> Illustration des étapes du test d'activité antimicrobienne.....	17
<b>Figure 4 .</b> Score d'adhésion des deux souches <i>L. fermentum</i> B19 et B116 (nombre de cellules bactériennes adhérant en pourcentage à la lignée cellulaire épithéliale intestinale Caco-2)....	33
<b>Figure 5.</b> Score d'adhésion des deux souches <i>L. fermentum</i> B19 et B116 (nombre de cellules bactériennes adhérant en pourcentage à la lignée cellulaire épithéliale intestinale HT29-MTX).....	33

## Liste des abréviations

% : pour cent

°C : Degrés Celsius

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARNr 16S** : Acide Ribonucléique 16 Svedberg

**BL** : Bactéries lactiques

**BSH** : Hydrolases des Sels Biliaires

**Caco-2**: Human Colorectal Adenocarcinoma cells

*E.coli*: *Escherichia coli*

**FAO** : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

**GRAS**: Generally Regarded as Safe

**H2O2**: peroxyded'hydrogène

**HT-29 MTX**: Methotrexate Human Intestinal cells 29

**HBSS** : Solution saline équilibrée de Hank

**IL-10** : Interleukine 10

**IL-12** : Interleukine 12

**h** : heure

**LAB**: Bactérie lactique

**Lb**: *Lactobacillus*

**Mg<sup>+2</sup>** : Magnésium

**Mn<sup>2+</sup>** : Manganèse

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

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

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**p / v** : poids/volume

**PCR** : Polymérase Chain réaction

**PH** : Potentiel d'Hydrogène

**PM** : poids moléculaire

**PCA** : Plate Count Agar

**spp**: Sous- espèce

**T** : Température

**t** : temps

**UFC** : Unité Formatrice des Colonies



# **Introduction**

## Introduction générale

Les bactéries lactiques (LAB) forment un groupe très vaste de bactéries bénéfiques pour l'Homme. Elles colonisent différents biotopes telles que le sol et les plantes et beaucoup plus le système digestif humaine. Le point commun qui caractérise ce groupe est la production d'acide lactique comme produit final du processus de fermentation de plusieurs substrats carbonés (Benkerrom et Tamime, 2004). De fait, les bactéries lactiques sont utilisées depuis des millénaires d'années dans la production de nombreux aliments, elles sont surtout connues dans la préparation des laitages fermentés. Indépendamment de leurs différentes propriétés technologiques, actuellement elles contribuent largement à l'amélioration de la qualité sanitaire (Hammi, 2017).

Le plus grand genre de LAB représenté par les Lactobacilles. Les Lactobacilles sont des habitants indigènes de la cavité buccale (Nissen *et al.*, 2014), du tractus gastro-intestinal (Al-Madboly et Abdullah, 2015). Elles ont des caractéristiques telles que la capacité à produire de l'acide lactique et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ainsi qu'à adhérer aux cellules hôtes qui leur permettent de persister dans un hôte et exercer des activités antimicrobiennes envers les micro-organismes pathogènes et opportunistes (Romeo *et al.*, 2011).

La plupart des espèces du genre *Lactobacillus* sont largement connues pour leur potentiel probiotique et nutritionnel, ce qui leurs a fait jouer de statut GRAS "Generally Recognized as Safe" (Salminen *et al.*, 1998). Cet effet probiotique est représenté par la stimulation du système immunitaire, la prévention et la réduction de l'intensité/durée des épisodes diarrhéiques, et la réduction de l'intolérance au lactose (Turpin, 2011).

Par conséquent, elles peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé en contribuant à la prévention du syndrome métabolique, prévention de la colonisation par des micro-organismes pathogènes tels que *Candida sp* (Romeo *et al.*, 2011), amélioration des symptômes de la maladie inflammatoire intestinale (Le et Yang, 2018), réduction du cholestérol sérique (Jones *et al.*, 2013), prévention de la diarrhée et réduction de la durée de diarrhée aiguë chez les enfants (Huang *et al.*, 2002). Ce genre a également été considéré comme une alternative thérapeutique potentielle pour lutter contre la résistance croissante aux antimicrobiens grâce à sa capacité à restaurer le microbiote normal (Ouweland *et al.*, 2016).

Les probiotiques sont définis comme des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un avantage pour la santé de l'hôte » (FAO/OMS, 2002 ; Hill *et al.*, 2014).

La possibilité d'utiliser des probiotiques pour améliorer la santé humaine a conduit à d'énormes efforts dans la découverte de nouveaux probiotiques. La plupart des souches probiotiques disponibles dans le commerce, aussi la recherche liée aux probiotiques sont basées sur des souches isolées d'aliments traditionnels (Umar *et al.*, 2020). Comme par exemple le lait de chamelle cru et fermenté sont devenus des sources importantes pour l'isolement des LAB ayant un potentiel probiotique élevé. Dont la plus grande partie est représentée par les Lactobacilles, appartenant aux espèces par ex : *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* ...ect (Mahmoudi *et al.*, 2019).

L'objectif de notre travail est d'étudier quelques caractères probiotiques de *Lactobacillus* isolé à partir du lait de chamelle.

Comme la pratique n'est pas possible actuellement, l'étude est organisée comme suit :

- Une partie bibliographique sur les Lactobacilles et leurs effets probiotiques.
- Une partie pratique consiste à analyser des articles en relation avec l'intitulé de manuscrit (partie de matériels et méthodes, résultats et discussions).

# **Partie 1**

## **Synthèse bibliographique**

# **Chapitre 1**

## **Les Lactobacilles**

### 1.1. Rappelle sur les bactéries lactiques

Les LAB ont été parmi les premières bactéries à être étudiées en raison de leur implication dans les fermentations alimentaires et dans la santé humaine (Senouci, 2018).

La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen, et plus récemment, l'approche moléculaire de la taxonomie, et plus particulièrement l'hybridation ADN-ADN et le séquençage du gène de l'ARNr 16S ont permis d'affiner cette classification (Lahtinen *et al.*, 2012).

Orla-Jensen (1919), a reconnu les LAB comme des Cocci ou des bâtonnets à Gram positif non sporulant et non mobiles et capables de cataboliser les sucres en acide lactique (Senouci, 2018), ne possédant ni catalase ni oxydase et généralement anaérobies facultatives, dépourvues de nitrate réductase (Belkheir, 2017).

Les LAB peuvent avoir un métabolisme homofermentaire (plus de 90% des produits de fermentation est de l'acide lactique), hétérofermentaire facultatif (production d'acide lactique ou d'acide lactique et d'acide acétique) ou hétérofermentaire strict (production d'acide lactique, d'acide acétique ou d'éthanol et de CO<sub>2</sub>).

Selon les dernières revues, les LAB regroupent 38 genres et plus de 400 espèces (Saidi, 2020), seuls les cinq genres: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont communément propagés dans les salles à ferments des industries laitières ou employés dans la fermentation lactique des produits laitiers (Metlef, 2008).

### 1.2. Présentation de Genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques et le plus grand genre de la famille des *Lactobacillaceae* (Belkheziz, 2020 ; Huang *et al.*, 2018).

Créé, pour la première fois, par Beijerinck en 1901, il appartient au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae* (Milliot-Stoclin, 2015), il comprend 196 espèces (Huang *et al.*, 2018). Cette diversité est due à la variation en contenu guanine/cytosine (G/C) qui varie entre 30 et 55 % selon les espèces (Belkheziz, 2020).

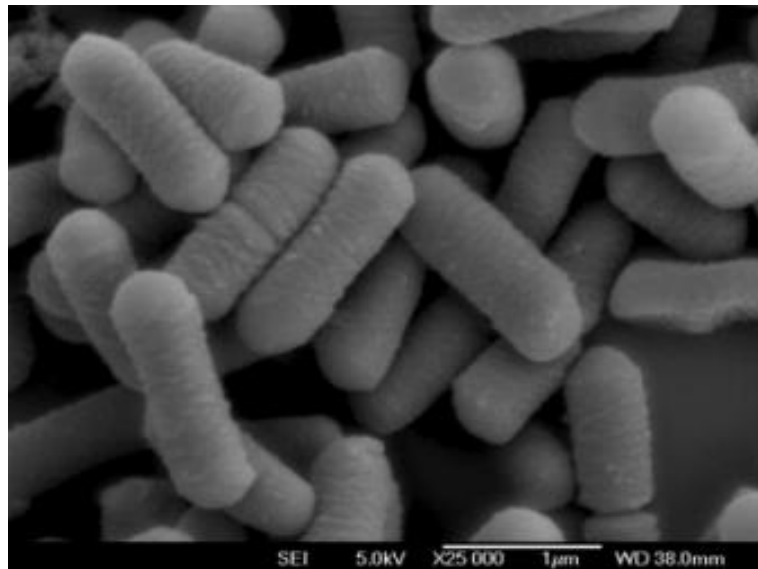
### 1.2.1. Habitat

Les Lactobacilles sont présents dans les milieux riches contenant des substrats glucidiques tels que les muqueuses intestinales, orales et vaginales des humains et des animaux, sur les plantes, les aliments d'origine végétale, les produits fermentés ou en décomposition, les eaux usées (Holzapfel et Wood, 1995).

Certaines espèces sont devenues des habitants spécifiques de quelques niches écologiques comme *L. bulgaricus* souvent trouvé dans les produits laitiers et *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* et *L. rhamnosus* colonisant principalement le tube digestif humain (Belkheir, 2017).

### 1.2. 2. Caractères morphologiques

Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Elles sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles (Mami et Kihal ,2019).



**Figure 1.**Image au microscope électronique à balayage de la souche *L.rhamnosus GG* (Routier, 2019).

### 1.2. 3. Caractères biochimiques

Les Lactobacilles sont catalase négative, nitrate réductase négative et microaérophiles ou anaérobies. Elles ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> à côté de l'acide lactique (Belkheziz, 2020).

Les Lactobacilles sont subdivisés, selon leur type fermentaire, en trois groupes selon la classification d'Orla-Jensen remaniée par Kandler et Weiss (1986):

→ Groupe I « Thermobacterium » : Il comprend les Lactobacilles homofermentaires stricts, la plupart étant thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*.

→ Groupe II « Streptobacterium » : Il regroupe les Lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *L. casei*, *L. curvatus*, *L. sake* et *L. Plantarum*.

→ Groupe III « Betabacterium » : Ce sont des Lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *L. fermentum*, *L. brevis* et *L. sanfrancisco* (Tahlaiti, 2019).

#### 1.2.4. Caractères culturels et exigences nutritionnelles

La plupart des Lactobacilles se multiplie dans un intervalle de température compris entre 15°C et 42°C. Certaines souches de Lactobacilles dites « thermophiles » résistent à 55 °C. Les Lactobacilles croissent au mieux dans des conditions acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4, mais leur développement s'arrête lorsque le pH avoisine 3,5. Le milieu le plus adapté à leur culture est celui De Man, Rogosa et Sharpe MRS.

Sur MRS gélosé, les colonies se développent en 24 à 48 heures. Elles sont généralement petites, incolores, blanchâtres ou jaunâtres, lisses ou rugueuses, arrondies ou lenticulaires (Belkheziz, 2020).

Les Lactobacilles sont caractérisés par des exigences nutritionnelles nombreuses, à savoir :

-Les exigences en vitamine telles que : la pantothenate (B5), en niacine (B3) et en cobalamine (B12). Les déficiences en vitamine B12 peuvent induire une diminution de la synthèse de l'ADN et entraîner des changements morphologiques et les cellules deviennent filamenteuses.

-Les exigences en bases azotées comme la présence d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile.

-Les exigences en cations notamment les ions  $Mg^{+2}$  et  $Mn^{2+}$  ou  $Fe^{2+}$  qui sont nécessaires pour la croissance des Lactobacilles le manganèse et le magnésium interviennent comme activateurs d'un grand nombre de réactions enzymatiques et comme stabilisateurs de la structure des acides nucléiques, de l'intégrité des ribosomes et de la membrane cellulaire des Lactobacilles (Bahri, 2014).



# **Chapitre 2**

## **Les probiotiques**

## 2.1. Historique et définition des probiotiques

La notion de probiotiques a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff en 1907 (Ebel, 2012). Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, en 1907, le biologiste d'origine ukrainienne Elie Metchnikoff s'intéresse à la consommation de produits laitiers fermentés contenant des bactéries lactiques. Il observe chez les individus les consommant une longévité de la santé et donc des effets bénéfiques. Metchnikoff, co-lauréat du prix Nobel de physiologie et de médecine en 1908, a découvert en travaillant à l'Institut Pasteur de Paris la bactérie *Lactobacillus bulgaricus*, une souche qu'il introduisit par la suite dans des produits laitiers en France et en Europe (Routier, 2019).

Parallèlement, le pédiatre français Henri Tissier observa dans les selles d'enfants souffrant de diarrhées un faible nombre de bactéries de forme bifides, appelées par la suite bifidobactéries, par rapport aux selles d'enfants en bonne santé. Il proposa donc d'en administrer à des individus souffrant de diarrhées pour rétablir la flore intestinale (Routier, 2019).

Cependant, ce n'est qu'en 1954 que le terme de probiotiques a été introduit dans la littérature par Ferdinand Vergin dans un écrit intitulé « Anti-und Probiotika ». Ce terme dérivé du grec « pro bios », qui signifie littéralement « en faveur de la vie » par opposition aux effets délétères des antibiotiques (Ezzariga, 2015).

En 1965, Lilly et Stilwell, dans la revue Science, définissaient les probiotiques comme des substances produites par des microorganismes capables de stimuler la croissance d'autres microorganismes (Ebel, 2012).

En 1989, Fuller soulignait la nature microbienne des probiotiques en redéfinissant le terme comme un « complément nutritionnel microbien vivant qui a un effet positif sur l'animal hôte en améliorant son équilibre intestinal » (Routier, 2019).

En 1992, Havenaar et Huis in't Velt affinaient un tout petit peu plus le terme en « une culture viable composée d'une ou d'un mélange de bactéries qui, lorsqu'elle est appliquée à l'animal ou à l'homme, exerce un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant les propriétés de la flore indigène. » (Ezzariga, 2015).

En 1998, Guarner et Schaafsma précisait que les probiotiques sont « des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (Ezzariga, 2015).

Aujourd'hui, Selon la définition actuellement adoptée par la FAO / OMS (2002): les probiotiques sont définis comme des « micro-organismes vivants, qui, quand ils sont administrés dans des quantités adéquates, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte » (Routier, 2019).

## **2.2. Critères de sélection et d'efficacité des probiotiques**

Pour qu'un Lactobacille (ou tout autre microorganisme) puisse être considéré comme probiotique, et afin qu'il puisse intervenir dans le bon fonctionnement du tractus digestif de l'hôte, il faut qu'il atteigne la muqueuse intestinale à l'état vif.

Dès l'administration, le microorganisme doit franchir des barrières et des entraves constitutives du mécanisme de digestion ou de défense de l'hôte. Plusieurs critères de sélections sont requis pour l'authentification d'un probiotique, ces critères englobent : l'origine humaine et la non pathogénèse ainsi que les aspects technologiques et fonctionnels (Rizk, 2009), elles sont résumées dans le ' Tableau 1'.

Les paragraphes suivants détaillent juste quelques critères fonctionnels sur lesquelles notre objectif a été basé.

### **2.2.1. Survie au cours du transit digestif**

Le critère essentiel de sélection des souches probiotiques est leurs capacités à survivre dans le tractus digestifs, et notamment aux pH acide et aux sels biliaries.

La plupart des LAB comme les Streptocoques et Lactobacilles sont naturellement bien adaptés à un pH acide, sont capables de produire des acides, et de fonctionner à PH bas. La bactérie peut réagir au stress acides soit en limitant l'entrée des acides dans son cytoplasme soit en protégeant les macromolécules contre les dérivés chargés ou en alcalinisant le milieu intracellulaire.

Nombreux microorganismes du microbiote intestinal dont les Lactobacilles sont capables de métaboliser les acides biliaries ce qui peut contribuer à leur protection contre la bile. La déconjugaison de ces acides est l'un de ces mécanismes. Elle est catalysée par les sels biliaries hydrolases (BSH) .Un autre mécanisme responsable de la résistance aux sels biliaries est l'extrusion de la bile (Turpin, 2011).

### **2.2.2 Adhésion à la muqueuse intestinale**

Un bon probiotique doit pouvoir adhérer aux cellules de la muqueuse intestinale pour permettre un échange d'informations (Rofes, 2014). En effet, ceci leur confère une compétitivité avantageuse, d'une part, pour faciliter la colonisation du tube digestif, d'autre

part, pour obtenir un effet barrière optimal contre l'invasion de la muqueuse intestinale par des bactéries pathogènes (Rahli, 2015).

### 2.2.3 Activité antimicrobienne

Les capacités d'inhibition de la croissance de souches pathogènes sont l'un des critères fréquemment utilisés pour sélectionner des souches probiotiques. Ces capacités antibactériennes sont essentiellement liées à la capacité des LAB à synthétiser différents métabolites comme l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, des bactériocines, l'acide acétique, l'acide lactique ou l'oxyde nitrique qui sont capables de réduire la croissance bactérienne (Turpin, 2011).

**Tableau 1.** Principaux critères utilisés pour la sélection des probiotiques (Ourtirane, 2013).

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

### 2.3. Lactobacilles probiotiques

La majorité des bactéries probiotiques aujourd'hui sur le marché international sont des Bifidobactéries et Lactobacilles. Plus particulièrement, les Lactobacilles probiotiques ayant des propriétés désirables, et les plus documentées sont : *Lb. johnsonii* La1, *Lb. rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lb. casei* Shirota, *Lb. acidophilus* NCFG 1478, *Lb. reuteri* (Kechaou, 2012).

**Tableau 2.** Les Lactobacilles utilisés comme probiotiques (Belkheziz, 2020).

Espèces	Souches
<i>Lb. acidophilus</i>	LA-1/LA-5 (Chr. Hansen)
<i>Lb. acidophilus</i>	NCFM (Rhodia)
	DDS-1 (Nebraska Cultures)
	SBT-2062 (Snow Brand Milk Products)
<i>Lb. johnsonii</i>	La1 (Nestlé)
<i>Lb. bulgaricus</i>	Lb12
<i>Lb. Lactis</i>	L1A (Essum AB)
<i>Lb. casei Immunitans</i>	(Danone)
<i>Lb. plantarum</i>	299v, Lp01 (Probi AB)
<i>Lb. rhamnosus</i>	GG (Valio)
	LB21 (Essum AB)
	271 (Probi AB)
<i>Lb. reuteri</i>	SD2112 (aussi connu sous MM2)
<i>Lb. casei</i>	Shirota (Yakult)
<i>Lb. paracasei</i>	CRL 431 (Chr. Hansen)
<i>Lb. fermentum</i>	RC-14 (Urexbiotech)
<i>Lb. Helveticus</i>	B02

## 2.4. Propriétés probiotiques des Lactobacilles

Plusieurs études ont démontré les multiples effets bénéfiques des probiotiques. En effet, Les Lactobacilles d'importants colonisateurs de la flore digestive de l'Homme et des animaux. Les preuves qui ont impliquées ce genre bactérien dans de nombreux rôles bénéfiques ne manquent pas, on peut citer quelques :

### 2.4.1. Diminution des diarrhées associées à l'antibiothérapie

Plusieurs souches probiotiques peuvent prévenir et restaurer les déséquilibres dus à L'antibiothérapie, comme par exemple : *Lb. acidophiles*, *Lb. rhamnus* GG, les résultats ont montrés une diminution de l'incidence des diarrhées de 0-10% (Rizk, 2009).

### 2.4.2. Amélioration de la digestion du lactose

Plusieurs personnes souffrent d'une intolérance au lactose due à un déficit congénital en enzyme  $\beta$ -galactosidase résultant à une incompétence à digérer le lactose Cette assimilation peut s'expliquer par l'hydrolyse du lactose par les Lactobacilles probiotiques durant leur métabolisme fermentaire. Quand les bactéries probiotiques sont assimilées au niveau de l'intestin, elles interagissent avec la bile qui augmente la perméabilité membranaire de ces mêmes bactéries, et de ce fait permettre au substrat d'être hydrolysé. L'ingestion de lait contenant *Lb. acidophilus* par des personnes intolérantes au lactose améliorerait la digestion chez ces derniers (Rizk, 2009).

### 2.4.3. Action sur le syndrome d'irritabilité intestinale chronique

Les LAB peuvent moduler la réponse immunitaire par différentes voies, avec parfois des effets opposés dépendant des modèles cellulaires, Par exemple des souches de *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, et *Lb. paracasei subsp. paracasei* sont capables d'induire la production de cytokines IL-10 et IL-12 sur cellules monocytaires, alors que ce sont des cytokines ayant des effets inflammatoire (Turpin, 2011).

### 2.4.4. Effet anticancérogène

Plusieurs études sur des sujets humains ont démontrés des effets non négligeables de Lactobacilles sur le contrôle du cancer du côlon , la consommation de *Lb. acidophilus* N-2 conduit à l'inhibition des activités  $\beta$ -glucuronidases, nitroréductases, et azoréductases des bactéries du tube digestif de l'Homme, ayant une connotation négative en cancérogénèse (Gilliland, 2001).

#### 2.4.5. Effet sur la maladie de Crohn

La maladie de Crohn est une maladie intestinale chronique caractérisée par des périodes d'activation et d'inactivation indéterminées. Les causes les plus probantes de cette maladie sont dues à des bactéries infectantes de la lamina-propria, une baisse de la tolérance orale et à une faiblesse de la fonction barrière de la muqueuse. La souche de *Lb. rhamnosus* GG améliore la qualité de la barrière intestinale d'enfants souffrant de la maladie de Crohn (Gupta *et al.*, 2000).

#### 2.4.6. Inhibition l'infection à *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* est une bactérie à l'origine de la grande majorité des ulcères gastroduodénaux, des gastrites chroniques. Du fait principalement de la résistance aux antibiotiques développée par le germe, mais aussi de la mauvaise tolérance digestive de l'antibiothérapie (diarrhées, ballonnements, nausées, vomissements...), c'est ce qui entraîne une mauvaise observance.

Des études ont prouvées que quelques souches de Lactobacilles peuvent survivre et croître en milieu acide dans l'estomac où elles peuvent s'opposer à la croissance d'*Helicobacter pylori* comme : *Lb. casei* DN-114 001, *Lb. acidophilus* LB (Farah, 2020).

#### 2.4.7. Effets sur les diarrhées à rota-virus

La diminution de la sévérité des diarrhées à rotavirus étaient liées à une diminution de l'entrée des rota-virus dans l'intestin est due aux modifications de la glycosylation de surface des cellules intestinales, lorsque des cellules HT-29 MTX (cellules intestinal productrices du mucus) sont traitées par des probiotiques, leur niveau d'infection par rota-virus est diminué de plus de 80% (Trugnan, 2003). Le traitement de la diarrhée à rotavirus chez les enfants par *Lb. rhamnosus* permet d'en diminuer la durée et la sévérité (Laffarghe ,2015).

#### 2.4.8. Réduction du cholestérol sérique

Une alimentation à base de lait fermenté supplée de probiotiques administrée à des personnes souffrant d'hypercholestérolémie a eue pour résultante la diminution de la concentration de 3g à 1,5g. *Lb. acidophilus* est connue pour son utilisation du cholestérol durant sa croissance rendant ce dernier inabsorbable par la matrice sanguine (Shah, 2007).

# **Partie 2**

# **Partie Expérimentale**



# **Chapitre 3**

## **Matériels et Méthodes**

### 3.1. Cadre d'étude

Ce travail a été réalisé par Mahmoudi et *al.* (2016), ses analyses ont été appuyées par le laboratoire « Food Science and Technology » (UR04AGR02, ESIAT) et Université de Lorraine (URAFPA) en France.

L'objectif de ce dernier est était d'isoler et identifier certaines souches des bactéries lactiques provenant de lait de chamelle cru tunisien et d'étudier une partie de leurs propriétés fonctionnelles probiotiques : tolérance à un pH faible, à la pepsine, à la pancréatine et aux sels biliaire, les capacités antimicrobiennes contre les agents pathogènes et leurs capacité à résister aux antibiotiques et les propriétés d'adhérence cellulaires.

Cette mesure a été prise qu'il se proportionne avec notre but d'établir et d'évaluer le potentiel probiotique prospectif des isolats lactiques appartenant au genre « *Lactobacillus* » à partir de lait camelin.

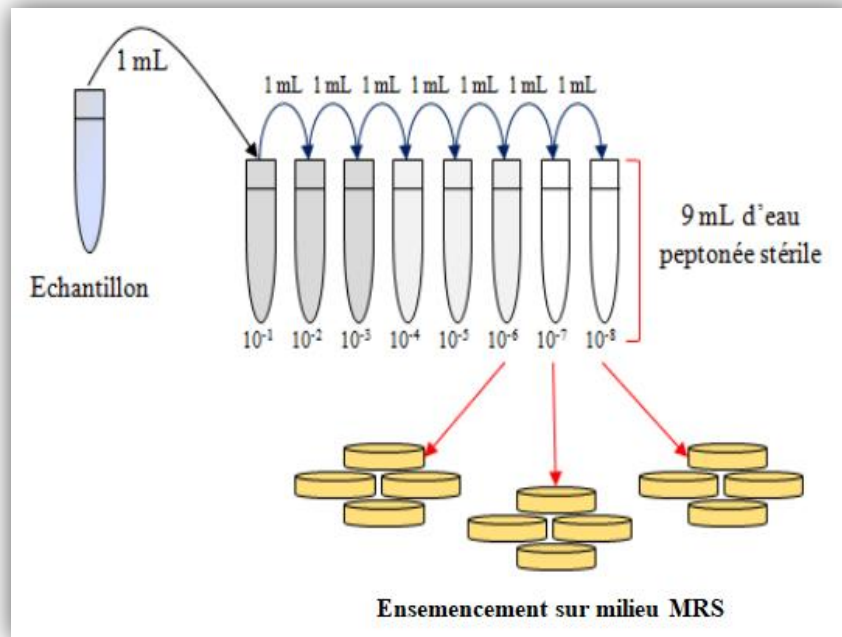
### 3.2. Provenance des échantillons

Au total, quatre-vingts échantillons de lait de chamelle ont été collectés à partir plusieurs régions du Nord, du Centre, d'Est et du Sud Tunisien.

### 3.3. Isolement des souches lactiques

Un certain nombre de souches de bactéries ont été isolées sur milieu Man Rogosa Sharpe MRS en utilisant la méthode d'encensement en profondeur.

La méthode consiste à réaliser des dilutions décimales de l'échantillon, puis des volumes de 1 ml ou 0,1 ml sont prélevés et déposés dans des boîte de pétrie stérile, les volumes sont ensuite recouvert par la gélose appropriée en surfusion pour l'isolement de la bactérie cible. Après homogénéisation et solidification du milieu, les boîtes sont incubés à 37 °C pour 48 h en conditions anaérobies (conditions optimale pour la croissance de la bactérie cible). La technique est schématisée dans la figure 2.



**Figure 2.** Préparation des séries de dilutions  $1/10^{\text{ème}}$  des échantillons de lait de chamelle pour isolement des bactéries lactiques (Saidi, 2020).

### 3.4. Tolérance des souches à pH 2, à la pepsine et à la pancréatine

Les isolats ont été testés selon la méthode décrite par Pennacchia *et al.* (2004) avec des mineures modifications.

Cent soixante-dix-sept cellules bactériennes cultivées une nuit dans du bouillon MRS sont récoltées par centrifugation (10000 rpm, 5 min, 4 ° C) et lavées deux fois avec du tampon PBS ajusté à pH 7.

La tolérance à la pepsine a été testée dans la solution tampon phosphate saline (PBS) ajusté à pH 2, contenant de la pepsine (3g/L), les souches démontrant une résistance à la pepsine ont été testé pour leur résistance à la pancréatine. La résistance à la pancréatine a été faite en solution PBS ajusté à pH 8, contenant de la pancréatine (3g /L).

La résistance a été évaluée en dénombrant le compte viable après contact avec la pepsine pendant 3 heures à 37 C° et puis pendant 4 heures après contact avec la pancréatine. Ces paramètres reflétant le temps passé par la nourriture dans l'estomac et l'intestin grêle, respectivement.

Les taux de survie ont été calculés selon l'équation suivante:

Taux de survie (%) =  $(N1 / N2) \times 100$  où :

N1 : représente le nombre total de souches viables au temps 3 h «Ou» 4 h.

N0 : représente le nombre total de souches viables au moment 0 h .

### 3.5. Tolérance à la bile

La tolérance des souches LAB aux sels biliaires a été testée comme décrit auparavant par Anandharaj et Sivasankari (2014). Les cultures bactériennes ont été inoculées une nuit dans un bouillon MRS supplémenté avec des sels biliaires (oxgall, Sigma) à différentes concentrations (0, 0,1, 0,3, 0,5 et 1%, p / v). Le mélange a été incubé à 37 ° C pendant 3 et 5 h et a été retiré périodiquement pour la détermination du compte viable.

Le temps t = 0 h est pris comme contrôle.

### 3.6. Identification des souches

Les souches ont été identifiées par la technique d'amplification de séquences génomiques et séquençage de l'ADN correspondant à l'ARNr 16s par PCR, la méthode a été réalisée en URAFPA (Unité de recherche animale et produits animaux Caractéristiques - Université de Lorraine - INRA - Nancy - France).

Seules les souches bactériennes Gram-positives, catalase-négatives et résistantes au stress gastrique ont été sélectionnées pour le traitement.

L'amplification des gènes d'ARNr 16s a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur, deux amorces ont été utilisées : amorce universelle SSU pour: TGCCAGCAGCCGCGGTA et SSU rev: GACGGGCGGTGT GTACAA. Les cellules bactériennes sont lysées selon le programme suivant : dénaturation à 95 °C pendant 3 min, 35 cycles de 30 s à 95 °C, puis 30 s à 55 °C puis 1 min à 72 °C et 10 min à 72 °C. Ensuite les fragments amplifiés ont été purifiés à partir de gels d'agarose en utilisant un kit de purification PCR.

La souche témoin ici *Lactobacillus spp* donc, l'analyse de l'alignement et de l'homologie de la séquence nucléotidique partielle de *Lactobacillus spp* a été réalisée par l'outil de recherche d'alignement local de base (Bioedit et BLAST NCBI).

### 3.7. Évaluation des caractéristiques probiotiques

#### 3.7.1. Dégradation de la mucine

Pour examiner la capacité mucolytique des isolats, la procédure décrite par Zhou *et al.* (2001) a été utilisée avec quelques modifications. Une concentration de 0,5% p / v de la mucine type III a été supplémentée au milieu d'agar en présence ou en absence de 3% p / v du glucose. Un volume de 20 µl de chaque culture bactérienne a été séparément inoculé sur la surface du milieu par la méthode de spot.

Après 72 h d'incubation à 37°C, la dégradation des mucines est révélée par une incubation dans l'acide acétique glacial 3,5 M avec 0,1% (p/v) d'amido black pendant 30 min. Les boîtes sont alors rincées à l'acide acétique glacial 1,2 M jusqu'à apparition d'une zone de lyse chez les témoins positifs.

La zone décolorée autour de la colonie de souche *Escherichia coli*, utilisée comme contrôle positif, est apparue. L'activité de dégradation de la mucine a été exprimée comme la taille de zone de lyse de la mucine.

### 3.7.2. Activité hémolytique

L'Activité hémolytique a été déterminée en utilisant la méthode des spots sur gélose au sang. Les souches de Lactobacilles ont été ensemencées en spots sur une gélose au sang, puis incubées pendant 48 h à 30 °C.

Les souches qui ont produit des zones verdâtres autour des colonies ( $\alpha$ -hémolyse) ou n'a produit aucune lyse sanguine ( $\gamma$ -hémolyse) ont été classées comme non hémolytiques. Les souches présentant des zones de lyse sanguine autour des colonies ont été considérées comme des souches hémolytiques ( $\beta$ -hémolyse).

### 3.7.3. Test de coexistence

La coexistence de vingt LAB sélectionnés a été testée par la méthode des stries croisées (Cross-Streak method) selon Daeschel (1992). Le but de ce test est de montrer s'il y a un antagonisme entre les bactéries sélectionnées. Les souches ont été cultivées (striées) les unes aux autres dans des boîtes de gélose MRS sous formes des stries perpendiculaires, puis incubées à 37° C pendant 48 h. La croissance des colonies bactériennes aux points de croisement des stries indique la présence de coexistence entre les souches.

### 3.7.4. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des isolats à différents antibiotiques a été déterminée en suivant la méthode de diffusion en milieu gélosé comme décrite précédemment par Charteris *et al.* (1998) avec certaines modifications. Un total de 12 antibiotiques a été utilisé à savoir : Pénicilline G (6 g), Ampicilline (10 g), Céfuroxime (30 g), Ceftriaxone (30 g), Streptomycine (10 UI), Chloramphénicol (30 g), Amikacine (30 g), Tétracycline (30 UI), Erythromycine (15 UI), Acide nalidixique (30 g), Colistine (50 g), Ciprofloxacine (5 g).

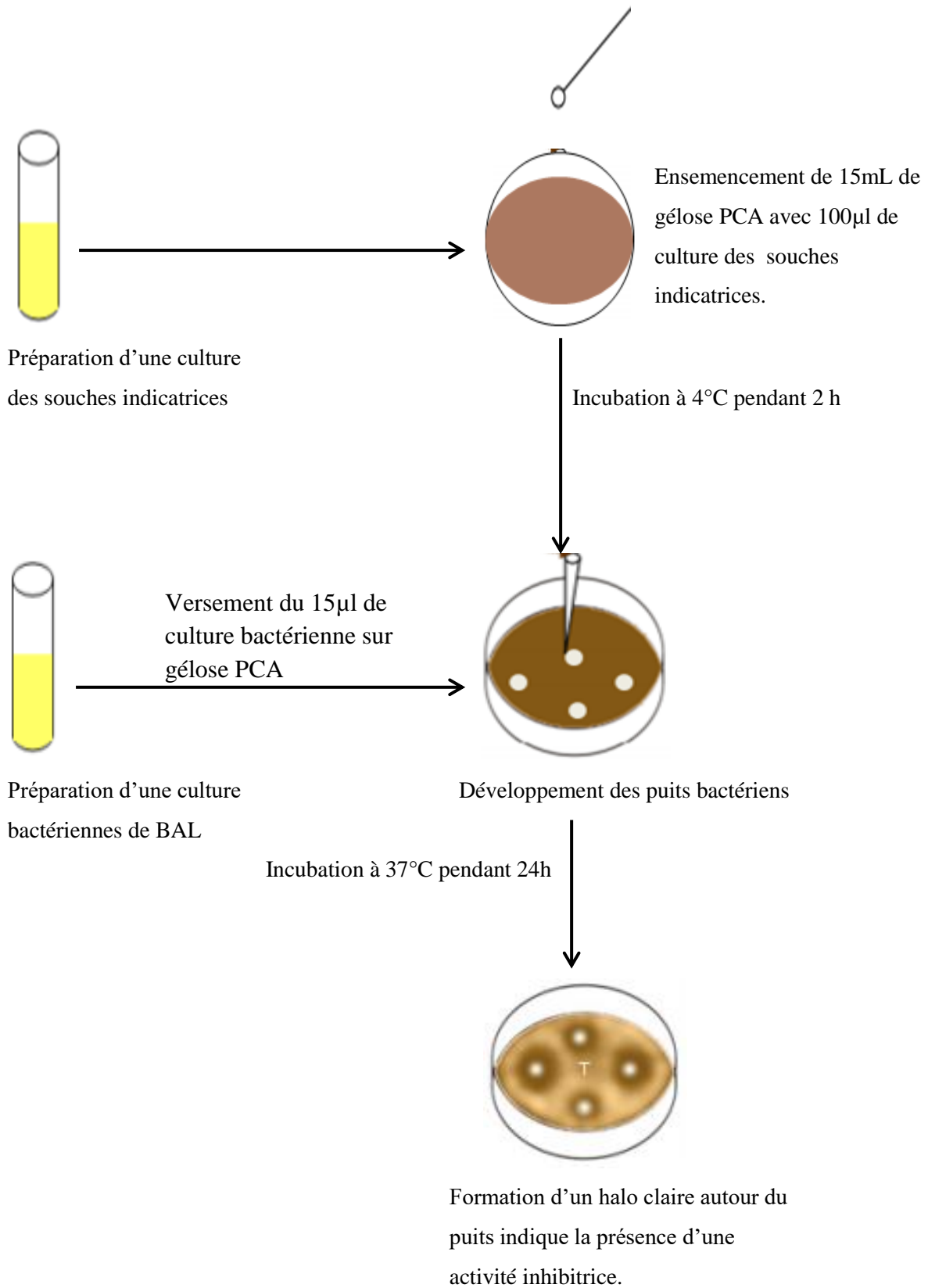
À l'aide d'écouvillons de coton stériles, les boîtes pétries d'agar MRS ont été écouvillonnées avec des suspensions de culture cultivées à 37 ° C pendant 24 h.

Après, 1 mL de chaque suspension cellulaire a été ensemencé sur gélose Mueller-Hinton et stocké à 4 ° C pendant 1 h pour solidifié le milieu. Ensuite, des disques d'antibiotiques ont été placés sur la surface d'agar inoculé et séchés à 4 ° C pendant 2 h. Les boîtes de pétri ont été incubées à 37 ° C pendant 24 h. Le diamètre a été mesuré conformément aux diamètres critiques proposés par le comité de susceptibilité de la Société française de microbiologie (2014).

### 3.7.5. Activité anti-microbienne

Les effets antagonistes des bactéries lactiques isolées vis-à-vis les agents pathogènes *Salmonella typhimurium* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 070101121) et *E. coli* (DH5 alpha) ont été décelés par le test de diffusion des puits sur agar. Elle a été réalisée en suivant les étapes décrites par Ben Moussa *et al.* (2008).

15mL de PCA (1,5%) ont été ensemencé avec 100µL d'une culture de micro-organismes indicateurs. Une fois la couche d'agar durcie, les puits de 5 mm de diamètre et 18 µl de capacité ont été formés. 15 µL d'une culture de la souche LAB ont été chargés dans des puits de gélose PCA préalablement préparés. Les boites ont été incubées à 4°C pendant 2 h suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h. Par la suite, des observations de zones claires entourant les puits ont été enregistrés. L'inhibition était considéré comme négative si aucune zone n'a été bien observée autour la gélose. Les étapes du test sont représentées dans la figure 3.



**Figure 3.** Illustration des étapes du test d'activité antimicrobienne.

### 3.7.6. Culture cellulaire

Caco-2 TC7 est une lignée cellulaire colorectale humaine, en *culture in Vitro* se différencie spontanément, formant une monocouche cellulaire épithéliale polarisée.

La lignée cellulaire humaine du côlon Caco-2 était fréquemment cultivé dans du milieu essentiel DMEM modifié de Dulbecco's Eagle's Medium, additionné de 20% (w/v) de sérum de veau foetal (FCS), 1% (w/v) d'une solution d'acides aminés non essentiels et 1% (w/v) solution antibiotique (pénicilline/streptomycine). Les cellules ont été maintenues dans des flacons en plastique pendant quatre jours à 37 °C dans une atmosphère à 10 % de CO<sub>2</sub>.

Les HT29-MTX sont des cellules colorectales humaines, dérivées des cellules HT-29. Après un long traitement au méthotrexate *in vitro*, cette lignée cellulaire a acquis la capacité de se différencier en cellules caliciformes et de produire une grande quantité de mucus. Ces lignées cellulaires ont été cultivées dans du DMEM complété avec 10 % (p/v) de FCS, 1 % (p/v) de solution d'acides aminés non essentiels et 1 % (p/v) de solution antibiotique (pénicilline/streptomycine). Les cellules ont été maintenues à 37 °C dans une atmosphère à 10 % de CO<sub>2</sub>.

### 3.7.7. Test d'adhérence

L'analyse quantitative de l'adhésion bactérienne a été réalisée selon la méthode décrite précédemment par Turpin *et al.* (2012) et Kebouchi *et al.* (2016).

Les cellules ont étéensemencées à une concentration de 5 10<sup>6</sup> cellules / puits dans des boîtes de culture à six puits pendant 21 à 25 jours avant leurs utilisation dans le test d'adhésion. Pendant 48 h avant le test d'adhésion, les cellules ont été cultivées une autrefois dans milieu DMEM supplémenté avec 20% (p / v) de FCS pour Caco-2 et 10% (p / v) de FCS pour HT29-MTX et sans antibiotique.

20ml des cellules bactériennes issues de cultures de 14 h ont été centrifugés pendant 15 min 4000 tr / min à 4 ° C et lavés avec 5 ml de solution saline équilibrée de Hank (HBSS). Les cellules ont été remises en suspension dans du DMEM approprié sans antibiotiques pour atteindre une concentration de 10<sup>9</sup> CFU / mL. Le milieu de croissance dans les monocouches de boîtes de culture à six puits a été aspiré et les cellules ont été lavées une fois avec HBSS. Une aliquote de 2 mL de suspension LAB (10<sup>9</sup> CFU / mL dans du DMEM) a été ajoutée à chaque puits de la boîte de culture (pour avoir un rapport cellule bactérienne / cellule épithéliale de 1000: 1) et incubée à 37 ° C dans une atmosphère à 10% de CO<sub>2</sub> pendant 2 h. Après, les surnageant de chaque puits ont été récupérés et les monocouches cellulaires ont été lavées quatre fois avec du HBSS pour obtenir des suspensions bactériennes non adhérentes.



La monocouche cellulaire a été grattée avec 0,1% (v / v) de Triton® X-100 et passée trois fois à travers une aiguille de 21 x g, puis incubée pendant 30 min à température ambiante. Le nombre des bactéries non adhérentes du surnageant et de la solution de lavage et les bactéries adhérentes de la monocouche cellulaire ont été déterminées par étalement des dilutions appropriées sur du milieu gélose MRS. Les colonies ont été comptées après 48 h d'incubation à 37 ° C.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage au détriment du nombre de bactéries adhérentes comptées (l'unité : nombre des colonies par cellule). Les expériences ont été réalisées indépendamment et en double pour chaque souche.

### **3.7.8. Analyses statistiques**

Les résultats obtenus des tests réalisés sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart type de trois répétitions et ont été analysés par ANOVA suivie de test de Student.

Le seuil de signification de 0.05 est retenu.

# **Chapitre 4**

## **Résultats et discussion**

#### 4.1. Tolérance des souches à pH 2, à la pepsine et à la pancréatine

La résistance à l'acidité de l'estomac constitue l'un des principaux critères de sélection des souches probiotiques. Les souches probiotiques doivent être résistantes aux conditions hostiles gastro-intestinales, afin de survivre dans l'estomac et exécuter leurs effets sur la santé en tant que cellules viables actives.

La survie des souches bactériennes ont été déterminée après 3h, C'est le temps qui correspond au transit habituel des aliments dans l'estomac. Parmi les 177 isolats, seules les souches LAB montrant un taux de survie  $\geq 80\%$  ont été retenues pour les tests de résistance à l'égard d'autres conditions du tube digestif.

D'après les résultats obtenus mentionnés dans le tableau 3, vingt souches ont été testées pour la tolérance à la pepsine à pH 2 et à la pancréatine. Il apparaît que le taux de survie de ces 20 souches à la pepsine à pH 2 étaient supérieur à 90% ce qui est considéré comme une bonne résistance aux acides et à la pepsine. En réponse au liquide pancréatique (tableau 3), le taux de survie était  $> 98\%$  pour les 20 souches testées.

Aucune différence significative n'a été observée dans la perte de viabilité des souches après 3 h et 4 h d'incubation ( $P > 0,05$ ).

**Tableau 3.** Détermination de viabilité de 20 souches BAL en présence de pepsine à pH 2 et pancréatine après 3h et 4 h d'exposition *in vitro*.

LAB strains	viable counts (log CFU/mL)			
	Pepsin at pH 2		Pancreatin	
	0	3 h	0	4 h
B2	8.46 ± 0.01	8.45 ± 0.2	8.43 ± 0.01	8.40 ± 0.1
B19	8.41 ± 0.02	8.38 ± 0.3	8.47 ± 0.02	8.47 ± 0.5
B23	8.08 ± 0.1	8.06 ± 0.1	8.32 ± 0.01	8.30 ± 0.3
B28	8.47 ± 0.03	8.44 ± 0.5	8.07 ± 0.03	8.00 ± 0.02
B79	8.16 ± 0.1	8.15 ± 0.02	8.04 ± 0.02	8.00 ± 0.1
B90	8.48 ± 0.01	8.47 ± 0.01	8.05 ± 0.01	8.04 ± 0.1
B93	8.11 ± 0.05	8.01 ± 0.05	8.35 ± 0.04	8.34 ± 0.1
B97	8.44 ± 0.02	8.42 ± 0.03	8.48 ± 0.1	8.47 ± 0.2
B103	8.47 ± 0.1	8.46 ± 0.2	8.25 ± 0.2	8.25 ± 0.5
B104	8.44 ± 0.05	8.43 ± 0.1	8.09 ± 0.06	8.08 ± 0.4
B107	8.48 ± 0.01	8.47 ± 0.02	8.08 ± 0.3	8.08 ± 0.02
B116	8.39 ± 0.03	8.37 ± 0.3	8.21 ± 0.1	8.20 ± 0.01
B142	8.45 ± 0.02	8.45 ± 0.2	8.26 ± 0.2	8.26 ± 0.2
B156	8.48 ± 0.1	8.46 ± 0.01	8.28 ± 0.04	8.27 ± 0.3
B128	8.47 ± 0.01	8.41 ± 0.1	8.22 ± 0.1	8.22 ± 0.07
B134	8.48 ± 0.02	8.46 ± 0.4	8.19 ± 0.2	8.18 ± 0.12
B143	8.41 ± 0.01	8.40 ± 0.01	8.15 ± 0.02	8.15 ± 0.23
B149	8.21 ± 0.1	8.18 ± 0.1	8.29 ± 0.03	8.29 ± 0.1
B166	8.45 ± 0.1	8.43 ± 0.1	8.19 ± 0.02	8.19 ± 0.1
B174	8.42 ± 0.03	8.40 ± 0.6	8.21 ± 0.1	8.21 ± 0.3

En effet, de nombreuses recherches ont montré que les souches de *Lactobacillus* étaient résistantes à des pH variant entre 2,5 et 4 (Du Toi *et al.*, 1998; Dunne *et al.*, 2001).

Sharma *et al.* (2021) ont isolé neuf LAB à partir lait de chamelle en inde, elles ont été criblées pour leur capacité à tolérer des conditions acides, en présence d'enzyme pepsine avec un pH ajusté à 5,0, 4,0, 3,0 et 2,0. Ils ont trouvé que la survie à pH 3,0 était favorable pour tous les LAB sélectionnés. Tous les LAB sélectionnés ont montré une survie à un pH de 3,0 tandis que *L. plantarum* parmi ces neuf souches isolées a montré une résistance (viabilité)  $8.41 \pm 0.1$  jusqu'à pH 2,0.

Des résultats similaires ont été obtenus par des travaux menés par Abbas and Mahasneh (2015), où des souches isolées du lait de chamelle appartenant au genre *Lactobacillus* étaient pour la plupart capables de survivre à un pH acide (3,9) la majorité de ces souches isolées appartenait l'espèce *L. fermentum*, *L. plantarum* et *L. paracasei subsp. paracasei*.

La tolérance aux acides des LAB est attribuée à l'activité de l'enzyme F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase, (Mahmoudi *et al.*, 2021). La F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase est enzyme présente dans la membrane interne des mitochondries eucaryotes et agit comme la centrale électrique de la cellule en synthétisant l'ATP. Il peut également fonctionner dans le sens inverse, hydrolysant l'ATP et pompant des protons dans certaines conditions (Zheng and Ramirez, 2000), qui est activé lorsque le pH extracellulaire est bas, en augmentant le pH intracellulaire (Mahmoudi *et al.*, 2021).

L'acidité provoque de nombreux dommages à la cellule tant au niveau physiologique que moléculaire (dénaturation de protéines, de l'ADN). Un stress acide altère la membrane, cette dernière devenant plus perméable aux protons. L'entrée de protons dans la cellule diminue alors le pH interne (pH<sub>i</sub>). Cette diminution du pH<sub>i</sub> affectera le métabolisme en inactivant ou en dénaturant les protéines, et l'ADN par perte de purines et de pyrimidines.

Les microorganismes emploient divers mécanismes et stratégies pour se protéger de l'hostilité qu'impose un environnement à pH bas: modification de l'architecture et de la composition de la membrane, changement de métabolisme et production de molécules alcalines, homéostasie du pH interne et production de protéines chaperonnes (Cotter et Hill, 2003).

Concernant la résistance à la pepsine, l'action de cette enzyme sur la membrane cellulaire n'est pas mortelle pour la majorité de bactéries lactiques sélectionnées. Les résultats sont en accord avec Maragkoudakis *et al.* (2006) qui ont montré que *L. rhamonosus* et *L. paracasei ssp. paracasei* présentent de meilleurs taux de survie en présence de pepsine à pH 2 pendant 3h.

## 4.2. Tolérance aux sels biliaries

Après le passage à travers l'estomac, les bactéries arrivent au duodénum où la bile est sécrétée qui réduit la viabilité des bactéries en détruisant la membrane cellulaire. La tolérance à la bile est donc l'une des caractéristiques recherchées lors de la sélection des bactéries probiotiques pour que le grand nombre possible de bactéries traversent le duodénum en direction de leur site d'action, tout en restant viable et capable de se multiplier (Bouguerra, 2012).

Dans cette étude des concentrations de 0, 0,1, 0,3, 0,5 et 1% de sels biliaries ont été utilisées. En générale les concentrations physiologiques de la bile humaine se situent entre 0,3 et 0,5 % (Shukla *et al.*, 2014). Les résultats obtenus du test sont montrés dans le tableau 4,5,6.

**Tableau 4.** Détermination de viabilité de 20 souches BAL en présence de 0, 0,1, 0,3, 0,5 et 1% de sels biliaries à temps 0 d'exposition *in vitro*.

LAB Strains	Viable counts (logCFU/mL)			
	0 h			
	%Bile salts (w/v)			
	Control*	0.3	0.5	1
B2	9.03 ± 0.03	8.91 ± 0.1	8.87 ± 0.3	8.76 ± 0.11
B19	8.78 ± 0.1	8.58 ± 0.02	8.11 ± 0.1	8.24 ± 0.1
B23	8.90 ± 0.1	8.78 ± 0.01	8.14 ± 0.1	8.02 ± 0.1
B28	8.91 ± 0.1	8.84 ± 0.1	8.77 ± 0.10	8.72 ± 0.11
B79	8.88 ± 0.1	8.80 ± 0.1	8.70 ± 0.10	8.70 ± 0.11
B90	8.950 ± 0.04	8.81 ± 0.1	8.70 ± 0.1	8.69 ± 0.21
B93	8.68 ± 0.1	8.56 ± 0.12	8.44 ± 0.17	8.21 ± 0.04
B97	8.52 ± 0.05	8.40 ± 0.53	8.32 ± 0.2	8.16 ± 0.28
B103	8.91 ± 0.22	8.76 ± 0.29	8.70 ± 0.11	8.45 ± 0.09
B104	8.53 ± 0.02	8.50 ± 0.1	8.45 ± 0.1	8.41 ± 0.1
B107	8.54 ± 0.03	8.50 ± 0.1	8.430 ± 0.03	8.16 ± 0.01
B116	9.05 ± 0.29	9.00 ± 0.1	8.76 ± 0.02	8.07 ± 0.02
B142	8.9 ± 0.22	8.78 ± 0.2	8.71 ± 0.1	8.67 ± 0.1
B156	8.94 ± 0.14	8.89 ± 0.1	8.87 ± 0.1	8.72 ± 0.1
B128	8.68 ± 0.1	8.6 ± 0.12	8.46 ± 0.11	8.21 ± 0.1
B134	8.72 ± 0.1	8.66 ± 0.1	8.52 ± 0.12	8.36 ± 0.1
B143	8.73 ± 0.24	8.71 ± 0.1	8.70 ± 0.1	8.59 ± 0.01
B149	8.68 ± 0.1	8.61 ± 0.1	8.56 ± 0.1	8.21 ± 0.14
B166	8.92 ± 0.05	8.86 ± 0.1	8.72 ± 0.12	8.66 ± 0.18
B174	8.85 ± 0.2	8.82 ± 0.02	8.76 ± 0.1	8.65 ± 0.19

**Tableau 5.** Détermination de viabilité de 20 souches BAL en présence de 0, 0,1, 0,3, 0,5 et 1% de sels biliaires après 3h d'exposition *in vitro*.

LAB Strains	Viable counts (Log CFU/mL)			
	5 h			
	% Bile salts (W /V)			
	Control	0.3	0.5	1
B2	11.35 ± 0.05	8.012 ± 0.01	7.61 ± 0.4	4.02 ± 0.02
B19	11.22 ± 0.2	7.84 ± 0.07	7.5 ± 0.02	5.19 ± 0.02
B23	11.06 ± 0.1	8.36 ± 0.02	7.83 ± 0.01	4.00 ± 0.08
B28	11.12 ± 0.02	7.50 ± 0.02	7.43 ± 0.01	4.02 ± 0.02
B79	11.92 ± 0.02	7.40 ± 0.02	7.33 ± 0.01	5.02 ± 0.02
B90	10.88 ± 0.1	8.02 ± 0.1	7.12 ± 0.1	4.07 ± 0.1
B93	10.78 ± 0.07	8.00 ± 0.41	7.12 ± 0.11	4.04 ± 0.11
B97	11.6 ± 0.1	8.02 ± 0.2	7.3 ± 0.19	3.27 ± 0.02
B103	11.82 ± 0.01	7.86 ± 0.03	7.05 ± 0.1	3.81 ± 0.1
B104	11.82 ± 0.01	7.04 ± 0.01	6.06 ± 0.3	4.63 ± 0.01
B107	11.85 ± 0.05	7.012 ± 0.01	7.01 ± 0.4	4.82 ± 0.02
B116	11.30 ± 0.01	8.7 ± 0.01	7.19 ± 0.1	5.22 ± 0.4
B142	11.02 ± 0.2	8.14 ± 0.02	7.5 ± 0.02	5.01 ± 0.02
B156	11.92 ± 0.01	8.01 ± 0.07	7.00 ± 0.01	5.01 ± 0.01
B128	10.48 ± 0.11	7.30 ± 0.1	7.12 ± 0.11	4.14 ± 0.1
B134	10.63 ± 0.12	8.02 ± 0.12	7.35 ± 0.1	3.22 ± 0.02
B143	10.88 ± 0.1	8.024 ± 0.1	7.55 ± 0.1	3.99 ± 0.1
B149	10.48 ± 0.11	8.00 ± 0.1	7.12 ± 0.11	4.4 ± 0.1
B166	11.63 ± 0.12	8.02 ± 0.12	7.35 ± 0.1	5.012 ± 0.02
B174	10.82 ± 0.04	8.5 ± 0.03	7.14 ± 0.1	5.01 ± 0.1

**Tableau 6.** Détermination de viabilité de 20 souches BAL en présence de 0, 0,1, 0,3, 0,5 et 1% de sels biliaires après 5h d'exposition *in vitro*.

LAB Strains	Viable counts (Log CFU/mL)			
	5 h			
	% Bile salts (W /V)			
	Control	0.3	0.5	1
B2	11.35 ± 0.05	8.012 ± 0.01	7.61 ± 0.4	4.02 ± 0.02
B19	11.22 ± 0.2	7.84 ± 0.07	7.5 ± 0.02	5.19 ± 0.02
B23	11.06 ± 0.1	8.36 ± 0.02	7.83 ± 0.01	4.00 ± 0.08
B28	11.12 ± 0.02	7.50 ± 0.02	7.43 ± 0.01	4.02 ± 0.02
B79	11.92 ± 0.02	7.40 ± 0.02	7.33 ± 0.01	5.02 ± 0.02
B90	10.88 ± 0.1	8.02 ± 0.1	7.12 ± 0.1	4.07 ± 0.1
B93	10.78 ± 0.07	8.00 ± 0.41	7.12 ± 0.11	4.04 ± 0.11
B97	11.6 ± 0.1	8.02 ± 0.2	7.3 ± 0.19	3.27 ± 0.02
B103	11.82 ± 0.01	7.86 ± 0.03	7.05 ± 0.1	3.81 ± 0.1
B104	11.82 ± 0.01	7.04 ± 0.01	6.06 ± 0.3	4.63 ± 0.01
B107	11.85 ± 0.05	7.012 ± 0.01	7.01 ± 0.4	4.82 ± 0.02
B116	11.30 ± 0.01	8.7 ± 0.01	7.19 ± 0.1	5.22 ± 0.4
B142	11.02 ± 0.2	8.14 ± 0.02	7.5 ± 0.02	5.01 ± 0.02
B156	11.92 ± 0.01	8.01 ± 0.07	7.00 ± 0.01	5.01 ± 0.01
B128	10.48 ± 0.11	7.30 ± 0.1	7.12 ± 0.11	4.14 ± 0.1
B134	10.63 ± 0.12	8.02 ± 0.12	7.35 ± 0.1	3.22 ± 0.02
B143	10.88 ± 0.1	8.024 ± 0.1	7.55 ± 0.1	3.99 ± 0.1
B149	10.48 ± 0.11	8.00 ± 0.1	7.12 ± 0.11	4.4 ± 0.1
B166	11.63 ± 0.12	8.02 ± 0.12	7.35 ± 0.1	5.012 ± 0.02
B174	10.82 ± 0.04	8.5 ± 0.03	7.14 ± 0.1	5.01 ± 0.1

D'après les tableaux 4, 5,6, Il s'avère que toutes les 20 souches de LAB présentait une excellente tolérance à la bile, n'en gardant aucune différence ( $p > 0,05$ ) dans la perte de viabilité après 5 h, jusqu'à ce que la concentration achève 0,5%.

Des réductions de viabilité ( $p < 0,05$ ) ont été observées à 1% de sels biliaries après 5 h d'incubation pour tous les isolés testés (Tableau 6), ceci est essentiellement dû à l'élimination d'une partie de la population bactérienne initiale (Izquierdo Alegre, 2009).

Néanmoins, Toutes les souches ont survécu à 0,3 % et 0.5 avec comptes viables étaient toujours inférieurs à 7,4 log de CFU/ml.

La plupart de souches ont montré une amélioration du taux de survie dans toutes les concentrations de sels biliaries après 5 h d'incubation malgré la diminution brusque du nombre des bactéries initial (Tableau 6). Cette résistance peut être attribuée à sa capacité de production de la bile hydrolase, enzyme permettant la déconjugaison des sels biliaries, ce qui réduit leurs effets toxiques (Bakari *et al.*, 2011).

Les vingt LAB ont pu donc tolérer les concentrations biliaries élevées à : 0,3 et 0,5 et 1 % après 3 et 5 h d'incubation. La concentration de 0,3 de sels biliare est considérée comme critique pour la détection des souches résistantes. Les propriétés spécifiques de la souche et les conditions de culture peuvent être des facteurs influençant leur résistance aux sels biliaries.

L'effet de la bile sur des lactobacilles a été étudié par plusieurs auteurs. Sharma *et al.* (2021) ont trouvé que *L. plantarum* isolée de lait camelin (Inde) à résister aux sels biliaries même en présence de taux élevé (0,3 %) de la bile. Ces auteurs ont rapporté que cette résistance est due à l'action de l'enzyme hydrolysant les sels biliaries.

Des études antérieures sur les lactobacilles ont également ont suggéré une tolérance élevée aux probiotiques *L. fermentum*, *L. plantarum* et *L. paracasei* aux sels biliaries (Zoumpopoulou *et al.*, 2008). Cette résistance est considérée comme une caractéristique importante pour la sélection de souches probiotiques, comme avec cette propriété intégrale des LAB, ils pourraient supporter l'environnement toxique présent dans l'intestin en raison des sels biliaries conjugués.

D'autres études menées par Abbas et Mahasneh (2015) sont corcondence avec nos résultats, où la plupart des souches de *lactobacillus* isolés à partir lait de la chamelle en Jourdan pourraient démontrer un score élevé de survie en présence de sels biliare jusqu'à 1%, comme *L. fermentum* a présenté la croissance la plus élevée taux à 0,3 % de concentration

biliaire et *L. plantarum* a montré une excellente survie à 0,5% de bile, même à 1 % de bile les deux ont montré une bonne croissance de taux de survivre.

#### 4.3. Identification des souches résistantes

Les vingt isolats qui ont montré une bonne résistance à l'égard (à l'encontre) des conditions gastro-intestinales (PH acide, présence des sels biliaires) ont été identifiés par séquençage partiel de l'ADNr 16S.

Selon (FAO/OMS, 2002) l'identification de bactéries probiotiques via le séquençage de gène qui code l'ARNr 16S est une technique adaptée et accessible.

14 isolats ont été identifiés comme *Lactobacillus fermentum* et 6 isolats ont été identifiés comme *Lactobacillus plantarum*. L'analyse des séquences a montré que les deux espèces obtenue ont été identifiés sur la base des résultats du séquençage après avoir utilisé l'outil de recherche d'alignement local de base sur le site NCBI. Les souches isolées ont été identifiées avec 100% d'homologie (Tableau 7).

**Tableau 7.** Identification des LAB sur la base de la similarité avec le séquençage partiel de gène d'ADNr 16S.

Souches LAB	Identification	Homologie (%)
B9 B19 B23 B28 B79 B90 B93 B97 B103 B104 B107 B116 B142 B156	<i>Lactobacillus fermentum</i>	100%
B128 B134 B143 B149 B166 B174	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%



Ces résultats sont en accord avec l'étude d'Abbas et Mahasneh (2015) montrant que la majorité des espèces de *Lactobacillus* présentées dans le lait de chamelle appartenait à *L.fermentum*, *L. plantarum*.

Cependant, d'autres résultats similaires trouvés par Abushelaibi *et al.* (2017). Six bactéries probiotiques isolées du lait de chamelle cru ont été identifiées par la méthode de séquençage du gène d'ARNr 16S. L'analyse de séquençage a montré que 50% de séquençage de l'ADNr 16S correspondant les souches des lactobacilles, l'espèce prédominant parmi eux était *L. plantarum*.

Dans une autre étude menée par Amara *et al.*(2019), Quatre-vingt-huit lactobacilles ont été isolés à partir différents laits de chammelles algériennes. L'identification génomique par le séquençage du gène ARNr 16S de trois souches les plus résistants à l'acidité, à sels biliaries et présentant une bonne activité de lipolyse a montré une appartenance de 99 % à la souche *Lb. plantarum*.

#### 4.4. Dégradation de la mucine et production d'hémolysine

Le caractère GRAS (Generally Recognized As Safe) (FAO/OMS, 2002) a été vérifié dans cette recherche.

Les souches n'ont montrées aucun signe de dégradation de mucine soit en présence ou en absence du glucose. Cependant, la souche entérique *E-coli* a montré cette activité.

Contrairement la souche entérique *E-coli*, aucune de souche n'a été capable de produire une zone de lyse claire sur la gélose au sang autour des colonies de LAB testées. De plus, aucune de ces souches de LAB n'était hémolytique. Ils étaient  $\gamma$  hémolytiques.

Ces observations sont en concordance avec Meira *et al.* (2012) et Monteagudo-Mera *et al.* (2012).

D'autre part, une étude a été menée en 2017 par Palaniyandi *et al*, en évaluant les propriétés probiotiques de trois souches de *Lactobacillus plantarum*, ces dernières n'ont pas montré aucune dégradation de mucine et aucune activité hémolytique n'a été observée. L'absence de ces caractères de pathogénicité a permis de conclure qu'elles pouvaient être utilisées comme probiotiques.

Selon les recommandations de FAO/OMS (2002), l'activité non hémolytique est la première propriété de sélection d'une souche probiotique, car elle indique que les bactéries ne sont pas pathogènes.

De plus, La couche de mucus (mucine) recouvrant la surface du tractus gastro-intestinal (GIT) joue un rôle important dans le système de barrière de la muqueuse. Tout dommage ou

perturbation de cette couche de mucine compromettra la fonction de défense de muqueuse de l'hôte. Donc le phénomène de dégradation de mucine pourrait favoriser l'altération de la barrière de la muqueuse intestinale (Zhou *et al.*, 2001).

Il est noté que la culture d'*E. coli* présentait une activité très étendue pour dégrader la mucine dans un milieu où la mucine était la seule source d'énergie (sans glucose). Un organisme capable de dégrader la mucine a non seulement le potentiel d'attaquer l'hôte, mais peut également favoriser la pénétration d'autres agents pathogènes et toxiques. C'est pour ça elle est considéré comme un agent pathogène du tractus gastro intestinal.

#### **4.5. Résistance aux antibiotiques**

Dans cette étude les bactéries lactiques à potentielles probiotiques provenant du lait de chamelle cru ont été analysées pour leurs sensibilité aux différents antibiotiques, en utilisant la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur boites de gélose.

La sensibilité aux antibiotiques a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie (2014), et les données obtenues sont présentées dans le tableau 8.

**Tableau 8.** Résultats de sensibilité des 20 espèces de *Lactobacillus* sélectionnées aux 12 antibiotiques, évaluées par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie (2014).

LAB strains	Antibiotics											
	P	AM	CXM	CRO	S	C	AN	TE	E	Co	NA	CIP
	Critical diameter						D-d (mm)					
	22-16	31-25	34-28	38-32	15-13	23-19	17-15	19-17	32-26	15-15	34-28	25-22
<i>Lactobacillus fermentum</i>												
B2	14	4	mh	mh	mh	15	mh	5	15	4	15	mh
B19	11	7	mh	mh	mh	10	mh	mh	11	mh	15	mh
B23	15	9	mh	mh	mh	15	mh	5	14	4	15	mh
B28	15	9	mh	mh	mh	13	mh	8	13	5	14	mh
B79	15	8	mh	mh	mh	13	mh	6	25	5	14	mh
B90	14	7	mh	mh	mh	13	mh	6	23	8	15	mh
B93	14	7	mh	mh	mh	13	mh	5	21	5	13	mh
B97	13	7	mh	mh	mh	14	mh	5	20	8	15	mh
B103	14	7	mh	mh	mh	12	mh	6	12	6	15	mh
B104	12	7	mh	mh	mh	12	mh	8	14	8	15	mh
B107	12	7	mh	mh	mh	12	mh	6	15	9	16	mh
B116	13	mh	mh	mh	mh	14	mh	mh	15	mh	mh	mh
B142	12	6	mh	mh	mh	12	mh	6	20	5	17	mh
B156	14	6	mh	mh	mh	12	mh	5	26	mh	15	mh
<i>Lactobacillus plantarum</i>												
B128	12	8	mh	5	5	13	mh	5	17	mh	15	mh
B134	12	9	mh	mh	5	11	mh	5	20	5	18	mh
B143	13	7	mh	5	5	11	mh	6	23	5	15	mh
B149	12	8	mh	5	mh	12	mh	6	22	5	16	mh
B166	11	8	mh	6	mh	12	mh	5	14	mh	19	mh
B174	12	8	mh	7	mh	12	mh	5	18	mh	19	mh

P: penicilline G, AM: ampicilline, CXM: cefuroxime, CRO: ceftriaxone, S: streptomycine, C: chloramphenicol, AN: amikacine, TE: tetracycline, E: erythromycine, CO: colistine, NA: acide nalidixique, CIP: ciprofloxacine.  
 mh: missing halo(halo disparues), — : Sensible , — : Resistante.

Il apparaît que les souches de Lactobacilles sélectionnées et identifiées comme *L. plantarum* et *L. fermentum* ont montré une résistance similaire vis-à-vis tous les antibiotiques utilisés.

Toutes les souches ont résisté à 3 antibiotiques : cefuroxime, acide nalidixique, ciprofloxacine. De plus, toutes les souches étaient sensibles à 3 antibiotiques : pénicilline G, chloramphénicol, érythromycine.

Il a également été observé que les 2 souches B116 et B19 appartenant à *L. fermentum* ont montré une résistance presque similaire sauf B19 était sensible à ampicilline, et acide nalidixique.

L'utilisation excessive d'antibiotiques conduit à la propagation de gènes de résistance, ces gènes peuvent être transférés à d'autres micro-organismes. Donc, la sensibilité des probiotiques aux antibiotiques conventionnels est un enjeu de santé fondamental. Pour cette raison dans cette recherche, les différentes souches étaient résistantes aux antibiotiques appartenant à différentes classes, cette résistance est liée aux différents modes d'action.

Une étude similaire étudiant la résistance de 62 souches de lactobacilles, sept souches ont enregistré la présence de gènes de résistance au chloramphénicol, l'érythromycine/clindamycine, à la tétracycline et à l'oxacilline (Danielsen et Wind, 2003)

La résistance aux antibiotiques devrait être une règle de précaution chez les probiotiques. Il est nécessaire avant d'utiliser un produit de probiotiques de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne contiennent pas de gènes de résistance aux antibiotiques (Ammor et Mayo, 2006).

De plus, les souches de *L. fermentum* de cette étude étaient résistantes à dix antibiotiques testés selon la Société Française de Microbiologie (2014), ces résultats étaient en désaccord avec Zeng *et al.* (2010) qui ont démontré que *L. fermentum* est sensible à certains antibiotiques courants tels que la pénicilline, l'ampicilline, l'érythromycine, l'amikacine et le chloramphénicol.

#### 4.6. Coexistence et activité antagoniste

Le test de coexistence des souches identifiées par la méthode des stries croisées a démontré que les bactéries sélectionnées étaient compatibles *in vitro*. Ils n'ont pas montré d'antagonisme l'un contre l'autre, cela confirme qu'elles sont considérées comme des souches symbiotiques non pathogènes pour l'épithélium intestinal.

Cependant, le test d'activité antagoniste permet de mettre en évidence les caractéristiques que possédant certaines souches probiotiques à inhiber d'autres souches pathogènes. Dans cette étude, le potentiel inhibiteur des isolats sélectionnés contre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphimirium* et *Escherchia coli* sont présentés dans le tableau 9.

**Tableau 9.** Résultats d'activité antimicrobienne de vingt LAB identifiées contre quatre souches pathogènes.

Souches LAB	Souches pathogènes				
	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.thyphimirium</i>	<i>E.coli</i>	Addition
<i>L. fermentum</i>					
<b>B9</b>	++	++	+	++	7+
<b>B19</b>	++	++	+	+++	8+
<b>B23</b>	++	++	+	++	7+
<b>B28</b>	++	++	+	++	7+
<b>B79</b>	++	++	+	++	7+
<b>B90</b>	++	++	+	++	7+
<b>B93</b>	++	++	+	++	7+
<b>B97</b>	++	++	+	++	7+
<b>B103</b>	++	++	+	++	7+
<b>B104</b>	++	++	+	++	7+
<b>B107</b>	++	++	+	++	7+
<b>B116</b>	++	+++	++	+++	10+
<b>B142</b>	++	++	+	++	7+
<b>B156</b>	++	++	+	++	7+
<i>L. plantarum</i>					
<b>B128</b>	++	++	–	++	7+
<b>B134</b>	+	++	–	++	5+
<b>B143</b>	+	+	–	++	5+
<b>B149</b>	+	+	–	++	5+
<b>B166</b>	+	+	–	++	5+
<b>B174</b>	+	+	–	++	5+

+ : présence d'une zone claire d'inhibition de la croissance autour des taches  $\leq 2$  mm,

++ : présence d'une zone d'inhibition bien définie entre 2 et 8 mm, +++ : présence d'une zone d'inhibition bien définie entre 8 et 12 mm et – : pas d'inhibition.

Il est observé que les 20 souches identifiées ont présenté une activité antimicrobienne contre *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *E. coli*. La croissance de ces bactéries pathogènes est inhibée par tous les souches.

En revanche, *S. thyphimirium* n'a été inhibé que par 18 souches ayant une activité antibactérienne modérée. Les 6 souches de *Lactobacillus plantarum* n'ont montrées aucune inhibition contre *S. thyphimirium* par rapport aux trois autres pathogènes.

Cette observation est en accord avec Al-Tawaha et Meng (2018) qui ont montrées que les souches de *Lactobacillus plantarum* d'origine de lait fermenté certains d'entre eux ont une activité antibactérienne contre les principaux agents pathogènes d'origine alimentaire, les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, par exemple *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*, qui pourraient contaminer les produits laitiers.

La souche *L. fermentum* B116 présentait une activité antagoniste supérieure contre *S. aureus* ( $d = 11 \pm 0,68$  mm) et les deux *L.fermentum* B116 et B19 ont montré les capacités d'inhibition les plus élevées contre *E. coli* ( $d = 10 \pm 0,47$  mm et  $9 \pm 0,39$  mm) respectivement (Mahmoudi *et al.*, 2016).

Ces résultats étaient en accord avec Savadogo *et al.* (2004) qui ont rapporté que l'activité antimicrobienne de *L. fermentum* a produit la zone d'inhibition maximale (12 mm) contre *Enterococcus faecalis*.

L'activité antibactérienne des LAB à l'encontre des bactéries pathogènes peut être associée à de nombreux éléments. Elle résulte de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques comme les acides, bactériocines ou autres métabolites (Abushelaibi *et al.*, 2017).

En effet, les LAB diminuent le pH du milieu de culture suite à une production des acides organiques qui peuvent être soit de l'acide lactique seul chez les homofermentaires, le cas des isolats appartenant aux genres *Lactobacillus*, ou accompagné d'autres produits comme l'acide acétique chez les hétérofermentaires (*Leuconostoc spp.*), ce qui conduit à l'inhibition de développement des bactéries pathogènes. Cette inhibition est améliorée par la haute tolérance des LAB aux pH bas extracellulaires et intracellulaires. Cela peut expliquer la meilleure activité antibactérienne obtenue par *Lactobacillus* qui est le genre le plus adapté aux pH acides (Salminen *et al.*, 2004; Cotter et Hill, 2003; Dworkin *et al.*, 2006).

Autre hypothèse suppose que les acides organiques agissent sur la membrane plasmique en neutralisant son potentiel électrochimique et en augmentant sa perméabilité, conduisant à une bactériostase et éventuellement à la mort des organismes sensibles (Dalié *et al.*, 2010).

Todorov *et al.* (2009) a supposé que le flux d'ions transmembranaires induit par la bactériocine entraîne des effets cytotoxiques provoquant une baisse du pH intracellulaire et inhibant les processus enzymatiques.

Autre que les acides organiques, de nombreux auteurs ont indiqué la production de bactériocines par les souches LAB. Les bactériocines sont définies comme des protéines ou complexes de protéines qui ont une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Le mécanisme d'action antimicrobienne des bactériocines pourrait être lié aux étapes d'adsorption de la bactériocine sur la paroi cellulaire, sa transmission à travers la membrane et, enfin, son activité dans le cytoplasme (Garcha et Sharma, 2013).

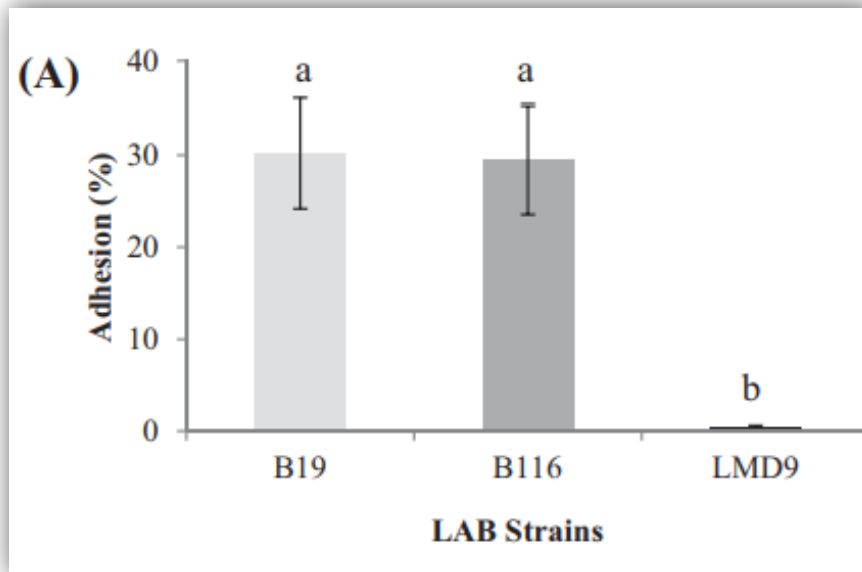
Florez et Mayo en 2018 montrent que *Lactobacillus plantarum* produit une bactériocine nommée la plantaricine C, qui provoque une dissipation de la force motrice des protons et engendre la libération immédiate des solutés pré-accumulés dans le cytoplasme chez les bactéries sensibles. Cette dernière inhibe la biosynthèse de la paroi cellulaire en formant un complexe avec le lipide II, précurseur du peptidoglycane ce qui induit la lyse cellulaire.

La production de métabolites antimicrobiens par des bactéries probiotiques peut être bénéfique pour la conservation des aliments. Au-delà de leurs effets antimicrobiens, les bactéries de cette recherche devaient bénéficier aux hôtes sans interférence *in vivo*.

#### **4.7. Capacité d'adhésion**

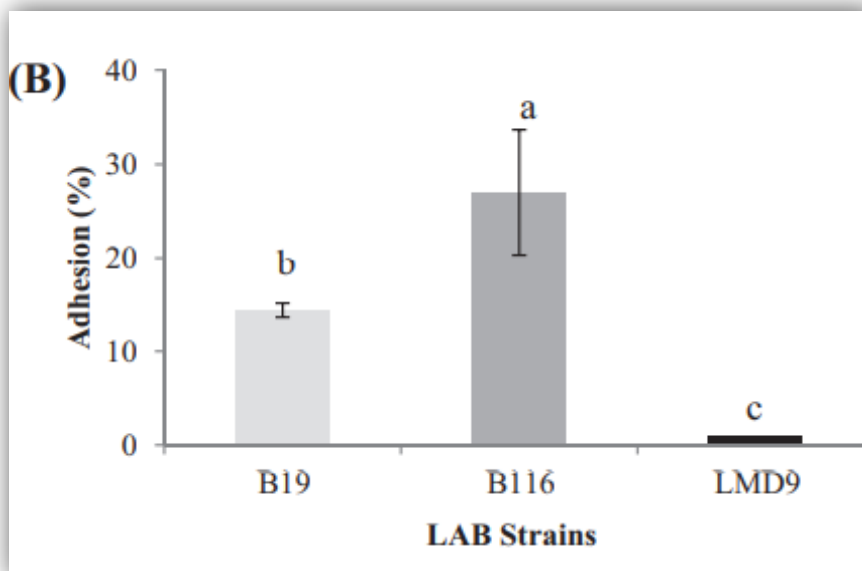
Les deux souches *L. fermentum* B19 et B116 ont montré des résultats remarquables à propriétés probiotiques telles que la résistance aux sels biliaires à la concentration la plus élevée (1%) et des activités antagonistes importantes, ils ont donc été sélectionnés pour leurs caractéristiques d'adhésion continues.

Les résultats du test d'adhésion au Caco-2 TC7 pour les deux souches sélectionnées sont représentés sur la figure 4.



**Figure 4.** Score d'adhésion des deux souches *L. fermentum* B19 et B116 (nombre de cellules bactériennes adhérant en pourcentage à la lignée cellulaire épithéliale intestinale Caco-2).

Les pourcentages d'adhésion étaient de  $30,09 \pm 5,89$  % pour B19 et  $29,43 \pm 5,91$  % pour B116. Les niveaux d'adhésion des deux souches étaient significativement supérieurs à la souche témoin LMD-9 ( $0,41 \pm 0,2$  %).



**Figure 5.** Score d'adhésion des deux souches *L. fermentum* B19 et B116 (nombre de cellules bactériennes adhérant en pourcentage à la lignée cellulaire épithéliale intestinale HT29-MTX).



La capacité d'adhésion au modèle cellulaire HT29-MTX a été évaluée de manière similaire pour les 2 LAB sélectionnés et les résultats sont présentés dans la figure 5.

Les 2 isolats ont montré un faible pourcentage de capacité d'adhésion à cette lignée cellulaire. Cependant, l'isolat *L. fermentum* B116 a montré le pourcentage le plus élevé ( $27 \pm 6,68\%$ ) d'adhésion par rapport à B19 ( $14,93 \pm 0,75\%$ ) et la souche témoin LMD9 ( $0,9 \pm 0,1\%$ ).

La capacité des souches bactériennes à adhérer aux cellules épithéliales et aux surfaces de muqueuses est une autre propriété importante pour la sélection de souches probiotiques (Vijayakumar *et al.*, 2015).

Plusieurs modèles *in vitro* ont été développés pour évaluer cette propriété en se basant sur des lignes cellulaires isolés d'adénocarcinomes du colon humain principalement les HT-29 et les Caco-2 (Bengoa *et al.*, 2018).

Les lignées cellulaires intestinales humaines Caco-2 et HT-29-MTX sont les plus largement utilisées pour étudier l'adhésion bactérienne *in vitro* (Gagnon *et al.*, 2013).

Les deux souches *L. fermentum* ont montré un haut niveau d'adhésion aux lignées cellulaires Caco-2 TC7. Il a été enregistré que certaines espèces de LAB comme *Lactococcus lactis subsp* d'origine de fromage et lait fermenté ont une forte capacité d'adhésion aux lignées cellulaires Caco-2 (Kimoto Nira *et al.*, 2007).

Si l'on compare l'étude menée par Tuomola et Salminen (1998) qui ont été isolés *Lactobacillus rhamnosus* GG à partir des produits laitiers, cette bactérie probiotique a été utilisée comme contrôle positif pour l'adhésion aux lignée cellulaire Caco-2, elle s'est avéré à adhérer à un niveau modéré ( $9,7 \pm 3,3$ ) contrairement à nos souches B116 et B19 ont montés une grande adhésion aux Caco-2 par rapport à cette souche de référence ( $30,09 \pm 5,89\%$  pour B19 et  $29,43 \pm 5,91\%$  pour B116).

Concernant l'adhésion au HT29-MTX, la souche *L. fermentum* B116 a montré une adhésion significativement plus élevée que B19 et LMD9. En revanche, les différents pourcentages d'adhésion obtenus entre les deux *L. fermentum* indiquent que la capacité d'adhésion des bactéries d'une même espèce peut dépendre de la souche (Lim et Im, 2008).

Les mécanismes d'adhésion des souches probiotiques impliquent plusieurs protéines de leurs structures de surfaces pouvant agir en tant qu'adhésines telles que les polysaccharides, les lipotechoïques et les glycoprotéines de la couche S (S layer). Plusieurs études ont montré que la perte de protéines de la couche S de surface bactérienne causé par un traitement chimique diminue l'adhésion à différentes cellules cibles (Wang *et al.*, 2017).

D'autres protéines de surface ont été décrites impliquant dans l'adhésion des *Lactobacillus* au mucus intestinal qui sont des glycoprotéines appelées « la mucine » (Bengoa *et al.*, 2018). L'exemple le plus étudié des adhésines bactériennes ciblant le mucus est une protéine produite par *L. reuteri* (mucus-binding protein) (Bove *et al.*, 2013).

Guo *et al.* (2012) ont noté que les niveaux d'adhésion aux cellules HT29-MTX des 9 candidats probiotiques variaient de 66 à 182 bactéries pour 100 cellules. *L. casei* F0822a montré une forte capacité d'adhésion aux cellules HT-29(166±25%) par rapport notre bactéries, Celles-ci les résultats suggèrent que *L. casei* F0822 peut être considéré comme une autre souche de référence pour étudier la propriété d'adhésion aux ce modèle de cellules épithéliales. De plus, ce modèle cellulaires HT29-MTX sécrétant de la mucine et expriment un profil protéique donnant une bonne propriété d'adhésion des bactéries à l'épithélium intestinale et certains avantages pour lui étudier *in vitro*.

Autre que de la mucine, La glycoprotéine Fibronectine joue également un rôle clé dans l'adhésion de nombreux Lactobacilles. Les bactéries probiotiques sont la capacité à se fixer sur les mêmes sites récepteurs que les pathogènes, peuvent diminuer l'adhésion de ces derniers sur les cellules épithéliales intestinales et de ce fait, leur colonisation. Cette diminution semble apparait dans la compétition pour l'utilisation des nutriments ou l'interactions stériques (Xu *et al.*, 2009) ou blocage de récepteurs cellulaires spécifiques d'attachement (Otero *et al.*, 2004).

# **Conclusion**

## Conclusion

Les LAB regroupent une large variété de bactéries à Gram positif telles que les Lactobacilles, qui font partie intégrante du microbiote humain, mais aussi de nouveaux produits probiotiques. De par sa définition, une Lactobacille probiotique est une bactérie vivante apportée par l'alimentation des consommateurs et qui doit exercer un effet positif sur la santé. Pour cela, nous avons essayé de souligner cette dernière fonctionnalité.

Dans cette étude, une recherche des bactéries lactiques à partir de lait de chamelle cru a été effectuée, dans le but de sélectionner des souches à potentielle probiotique. Elle se spécialise sur le criblage fonctionnel *in vitro* de souches de *Lactobacillus* en vue de leurs résistances aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal, de l'absence de propriétés indésirables, de la résistance aux antibiotiques, de l'activité antimicrobienne et de la capacité d'adhésion aux lignées cellulaires épithéliales humaines Caco-2 et HT29-MTX.

Plusieurs études ont contribué à évaluer ces caractères *in vitro* (susmentionnées dans la partie de résultats et discussions et référencées dans les annexes). Les rapports étaient souvent en d'accord avec nos résultats et qui a confirmé notre analyse déductive finale suivante :

Une fois ingéré, Les Lactobacilles probiotiques font face aux différents facteurs de résistance de l'organisme et arriver vivants au niveau du site d'action. La capacité de survie dépend de la résistance de la souche, de la dose de *lactobacillus* ingérée, des facteurs liés à l'hôte mais aussi du vecteur alimentaire ou galénique avec lequel ils sont ingérés.

Dans l'estomac, l'acidité gastrique est le premier facteur de défense auquel les Lactobacilles sont confrontés. Par conséquent, une tolérance élevée à l'acidité stomacale est requise pour tout probiotique, cette tolérance est due principalement aux mécanismes d'alcalinisation de l'environnement extracellulaire.

Le prochain obstacle se trouve au niveau du duodénum où les acides biliaires sécrétés exercent une activité antiseptique et donc détergente pour les Lactobacilles. Là encore, le pourcentage de survie des Lactobacilles peut diminuer alors elles déconjugent les sels biliaires ce qui réduit leurs effets toxiques.

Dans l'intestin, les Lactobacilles résistent au mucus, qui contient des substances antimicrobiennes, ainsi qu'au péristaltisme qui limite toute colonisation bactérienne par son important effet propulsif, elles fabriquent des substances antimicrobiennes : les acides organiques et les bactériocines. Les Lactobacilles produisent des acides organiques, ces

derniers, en acidifiant le milieu, inhibent l'activité enzymatique et la croissance de certaines bactéries notamment à Gram négatif en revanche les bactériocines agissent sur les bactéries Gram positif en se fixant sur certains récepteurs membranaires des bactéries, formant des pores qui rendent la membrane cytoplasmique perméable et qui entraînent la libération du contenu intracellulaire et donc la mort de la bactérie pathogène.

Alors, les Lactobacilles ingérées adhèrent maintenant à la paroi intestinale afin d'augmenter leurs survie et leurs efficacité. Les Lactobacilles adhèrent bien aux deux principaux types de cellules trouvés dans l'épithélium intestinal humain Caco-2 et HT29-MTX. La mucine intestinale implique comme récepteur d'adhésion et plusieurs protéines de structures de surfaces des Lactobacilles pouvant agir en tant qu'adhésines telles que les polysaccharides, les lipotechoïques et les glycoprotéines (Fibronectine).

Ces conclusions révèlent que ces souches de genre *Lactobacillus* peuvent présenter de bon candidats pour les utilisées autant que des probiotiques. Par conséquent, ils pourraient être utilisés comme additifs de cultures pour contribuer à la qualité des produits laitiers fonctionnels.

Il faut noter que la prendre excessive d'antibiotiques il peut rendre les Lactobacilles sensibles et n'aura donc pas d'effet positive notable. Il est donc indispensable d'apporter des antibiotiques de manière régulière pour que les probiotiques avoir un effet bénéfique persistant.

# **Bibliographie**

## Références bibliographiques

Abbas H. H., Abudulhadi S., Mohammed A., Shawkat D. S., et Baker Y. M. 2016. Effect of *Lactobacillus* sp. crude bacteriocin (CB) and cell-free supernatant (CFS) 570 against *E. coli* growth and adherence on vaginal epithelial cell surface. *International Journal of Advanced Research* 4(1): 614–620.

Al-Madboly L.A., and Abdullah A.K. 2015. Potent antagonistic activity of Egyptian *Lactobacillus plantarum* against multiresistant and virulent food-associated pathogens. *Frontiers in microbiology* 6:347-358.

Bahri F. 2014. Isolement et caractérisation des souches de Lactobacilles à caractères probiotiques à partir de selles d'enfants : *Microbiologie Appliquée*. Thèse de doctorat en science, Université Constantine I, Algérie, p5.

Belkheir Kh .2017.Caractérisation de nouvelles souches de bactéries lactiques isolées du lait de chamelle d'Algérie, Réalisation de ferments lactiques : Génie microbiologique. Thèse de doctorat, Université Oran1 Ahmed Ben Bella, Algérie, pp .20-30.

Belkheziz L.2020. Les Lactobacilles : Rôle physiologique et intérêt en santé humaine : Pharmacie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Mohammed V de Rabat, Maroc, pp.13-14.

Benkerroum N, and Tamime A.Y. 2004. Technology transfer of some Moroccan: a review. *Food Microbiol*: 399–413.

Ebel B. 2012. Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz : *Microbiologie*. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne, France, p 9.

Ezzariga N. 2015. Probiotiques : Application thérapeutiques et effets secondaire : Pharmacie .Thèse de doctorat, Université Mohamed V de Rabat, Maroc, p 3.

Farah A. 2020. Les probiotiques et leur place dans la pratique officinale : Enquête auprès des pharmaciens officinaux : Pharmacie. Thèse de doctorat, Université Mohamed V de Rabat, Maroc, p 62.

Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. 2002. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agricultural Organization of the United Nations [online].

Gilliland S. E. 2001: Probiotics and probiotics. Appl. Dairy Microbiology. 2nd ed. Dekker 10:327-343.

Gupta P., Andrew H., Kirschner B. S., and Guandalini S. 2000. Is *Lactobacillus GG* Helpful in Children with Crohn's Disease? Results of a Preliminary, Open-Label Study. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 31(4): 453–457.

Hammi I. 2016. Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français : Chimie analytique. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France, p 2.

Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G. R., Merenstein D. J., Pot B., Morelli L., Canani R. B., Flint H. J., Salminen S., Calder P. C., and Sanders M. E. 2014. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology 11:506–514.

Holzappel W. H and Wood B. J. 1995 .The Genera of Lactic Acid Bacteria, Springer-Verlag, 1st ed, 398 p.

Huang C.-H., Li S.-W., Huang L., and Watanabe K. 2018. Identification and Classification for the *Lactobacillus casei* Group. Frontiers in Microbiology 9.

Huang J. S., Bousvaros A., Lee J. W., Diaz A., and Davidson E. J. 2002. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children. Digestive Diseases and Sciences 47: 2625–2634.



Jones M. L., Tomaro-Duchesnea C., Martoni C. J., et Prakash S. 2013. Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence and future direction for heart health applications. *Expert Opinion on Biological Therapy* 13(5) : 631–642.

Kechaou N, 2012. Identification de nouvelles souches probiotiques à propriétés immuno-modulatrices et anti-oxydantes : Microbiologie. Thèse de doctorat, Université Paris Sud, France, p 37.

Laffarghe C. 2015. Intérêt des probiotiques dans la prévention de pathologies et conseils en officine : Pharmacie. Thèse de doctorat, Université Toulouse III Paul Sabatier, France, p 66.

Lahtinen S., Salminen S., von Wright A., and Ouwehand A.C. 2012. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Fourth Edition (4th ed.). CRC Press.

Le B., et Yang S. H. 2018. Efficacy of *Lactobacillus plantarum* in prevention of inflammatory bowel disease. *Toxicology Reports* 5:314-317.

Mahmoudi M., Khomeiri M., Saeidi M., Kashaninejad M., and Davoodi H. 2019. Study of Potential Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw and Traditional Fermented Camel Milk. *Journal of Agricultural Science and Technology* 21(5) :1161-1172.

Mami A et Kihal M. 2019. Activité anti-bactérienne de *lactobacillus plantarum*: Le bio-contrôle des bactéries d'altération alimentaire par les bactéries lactiques du genre *lactobacillus*. Vol .96, Biologie. Éditions universitaires européennes, pp .12-13.

Metlef S.2008.Effet antagoniste de *Lactococcuslactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente : Sciences Alimentaires. Mémoire de magister, Université Hassiba Ben Bouali Chlef, Algérie, p 3.

Milliot-Stoclin R. 2015 .Les probiotiques : VeniVidi Vici : Pharmacie. Thèse de doctorat, Université de Lille 2, France, p37.

Nissen L., Sgorbati B., Biavati B., and Belibasakis G. N. 2014. *Lactobacillus salivarius* and *L. gasseri* down-regulate *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* exotoxins expression. *Annals of Microbiology* 64: 611-617.

Ourtirane R. 2013. Etude de quelques Aptitudes probiotiques de *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* BMK 2005 : Microbiologie Alimentaire et Santé. Mémoire de magister, Université Abderrahmane Mira Bejaia, Algérie, p 11.

Ouwehand A. C., Forssten S., Hibberd A. A., Lyra A., et Stahl B. 2016. Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Annals of Medicine* 48: 246–255.

Rahli F. 2015. Valorisation du lait de chamelle par l'exploitation des potentialités technologiques des bactéries lactiques isolées localement : Contrôle microbiologique et hygiène alimentaire. Thèse de doctorat (LMD), Université D'Oran -1, Algérie, p. 35-38.

Rizk H-A. 2009. Etude du potentiel probiotique et technologique des lactobacilles isolés du lait cru de chamelle : Microbiologie appliqué .Mémoire de magister, Université d'Oran, Algérie, p 30-33.

Rofes, C.2014. Intérêts du microbiote intestinal et probiotiques : Pharmacie. Thèse de doctorat, Université Toulouse III-Paul Sabatier, France, p 44.

Romeo M. G., Romeo D. M., Trovato L., Oliveri S., Palermo F., Cota F., and Betta P. 2011. Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in preterm newborns: Incidence of late-onset sepsis and neurological outcome. *Journal of Perinatology* 31 :63–69.

Routier A. 2019. Mécanismes d'action des probiotiques dans des modèles parodontaux in vitro : revue de littérature : Chirurgie dentaire. Thèse de doctorat, université de Lille, France, pp. 37-51.

Saidi Y. 2020. Biodiversité de la microflore lactique du lait cru de dromadaire et évaluation de ses caractères technologiques : Microbiologie appliquée, Contrôle microbiologique et hygiène alimentaire. Thèse de doctorat, Université Oran1 Ahmed Ben Bella, Algérie, p 22.

Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos W. M., Fordén R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S., et Mattila-Sandholm T. 1998. Demonstration of safety of probiotics- A review. *International Journal of Food Microbiology*, volume 44, 93–106.

Senouci D.E. 2018. Biodiversité des bactéries lactiques dans les produits laitiers et leurs propriétés technologiques (cas du lait de dromadaire) : Microbiologie Appliquée, Contrôle microbiologique et hygiène alimentaire. Thèse de doctorat 3eme cycle, Université Oran1 Ahmed Ben Bella, Algérie, pp.19-27.

Shah N.P. 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11), 1262–1277.

Tahlaiti H. 2019. Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté : Microbiologie. Thèse de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie, pp.16-17.

Trugnan G. 2003. Mécanisme d'action des probiotiques dans les défenses anti-rotavirus. *Intes. Homeo* : 1-5

Turpin W. 2011. Vers une évaluation des potentialités probiotique et nutritionnelle des bactéries lactiques constitutives du microbiote d'un aliment fermenté traditionnel à base de mil par une approche moléculaire : Biotechnologie, microbiologie. Thèse de doctorat, Université de Montpellier 2, France, pp .2-42-48.

Umar Meleh H., Choo S., MohdDesa M. N., Chew S. Y., Rangasamy P., Hassan H., et Than L.T.L. 2020 . Isolation and safety characterisation of lactobacilli strains with antimicrobial Properties as potential probiotics for human use. *LWT* :109796.

# **Annexes**

## Annexes

### ➤ Références des articles inclus dans la partie expérimentale

Abbas M and Mahasneh A. 2015. Functional Characteristics of *Lactobacillus* Strains Isolated from Camel's Milk. *British Journal of Medicine and Medical Research* 7(1):25–39.

Abushelaibi A., Al-Mahadin S., El-Tarabily K., Shah N. P., and Ayyash M. 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT - Food Science and Technology* 79:316–325.

Al-Tawaha R., and Meng C. 2018. Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: a review. *Advances in Environmental Biology* 12(1):16-27.

Amara S., Zadi-Karam H., and Karam N. E. 2019. Selection of *Lactobacillus* strains newly isolated from Algerian camel and mare fermented milk for their in vitro probiotic and lipolytic potentials. *African Journal of Biotechnology* 18(30):882-894.

Ammor M. S., and Mayo B. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science* 76(1):138–146.

Bakari D., Tatsadjieu N. L., Mbawala A., Mbofung C. M. 2011. Assessment of physiological properties of some lactic acid bacteria isolated from the intestine of chickens use as probiotics and antimicrobial agents against enteropathogenic bacteria. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 8: 33-40.

Bengoa A. A., Zavala L., Carasi P., Trejo S. A., Bronsoms S., de los Ángeles Serradell M., and Abraham A. G. 2018. Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Research International* 103 :462-467.

Bouguerra A .2012.Caractérisation des bactéries lactiques du lait de chamelle : Microbiologie, Thèse de magister, Université FERHATE Abbas –Setif, Algérie, p 70.

Bove P., Russo P., Capozzi V., Gallone A., Spano G., and Fiocco D. 2013. *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: carrier matrix effect and

transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiological Research* 168(6):351-359.

Cotter P. D., and Hill C. 2003. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(3): 429–453.

Cotter P.D., Hill C. 2003. Surviving the acid test: response of Gram-Positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 429-453.

Dalié D. K. D., Deschamps A. M. and Richard-Forget, F. 2010. LAB – Potential for Control of Mould Growth and Mycotoxins: A Review. *Food Control* 21: 370-380.

Danielsen M., and Wind A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus spp.* to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* 82(1):1–11.

Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. 2006. The prokaryotes “third edition”: A handbook on the Biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Springer, Singapore.

Florez A. B., and Mayo B. 2018. Genome analysis of *Lactobacillus plantarum* LL441 and genetic characterisation of the locus for the lantibiotic plantaricin C. *Frontiers in microbiology*, 9(1), 1-11.

Gagnon M., Zihler Berner A., Chervet N., Chassard C., and Lacroix C. 2013. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. *Journal of Microbiological Methods* 94(3): 274–279.

Garcha S. and Sharma N. 2013. Use of Combination of Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 and *Bacillus coagulans* MTCC 492. *Afr. J. Microbiol. Res* 47: 5338-5342.

Guo C.F., Zhang L.W., Han X., Yi H.X., Li J.Y., Tuo Y.F., Zhang Y.C., Du M., Shan Y.J., Yang L. 2012. Screening for cholesterol-lowering probiotic based on deoxycholic acid removal pathway and studying its functional mechanisms in vitro. *Anaerobe* 18 :516–522.

Izquierdo A, E. 2009. Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique : Chimie analytique. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France.

- Kimoto-Nira H., Mizumachi K., Nomura M., Kobayashi M., Suzuki I., Tsuji N.M., Kurisaki J.I., Ohmomo S. 2007. *Lactococcus spp.* as potential probiotic lactic acid bacteria. Jap. Agricult. Res. Quart 41: 181–189.
- Leite A.M.O., Miguel M.A.L., Peixoto R.S., Ruas-Madiedo P., Paschoalin V.M.F., Delgado S. 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. J. Dairy Sci 98:3622–3632.
- Lim S.M., Im D.S. 2008. Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. J. Microbiol. Biotechnol 19:178–186.
- Mahmoudi I., Moussa O. B., Khaldi T. E. M., Kebouchi M., Soligot C., Le Roux Y., and Hassouna M. 2016. Functional in vitro screening of *Lactobacillus* strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic. Small Ruminant Research, 137, 91–98.
- Maragkoudakis P.A., Zoumpopoulou G., Miaris C., Kalantzopoulos G., Pot B., Tsakalidou E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Inter. Dairy J 16:189–199.
- Meira S.M.M., Helfer V.E., Velho R.V., Lopes F.C., Brandelli A. 2012. Probiotic potential of *Lactobacillus spp.* isolated from Brazilian regional ovine cheese. J. Dairy Res 79:119–127.
- Monteagudo-Mera A., Rodriguez-Aparicio L., Rua J., Martinez-Blanco H., Navasa Nicolas Garcia-Armestob M.R., Ferrero M.A . 2012. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. J. Funct. Foods 4:531–541.
- Otero M.C., Ocana V.S., Macias E.N.M. 2004. Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. Meth. Molec. Biol 268:435–440.
- Palaniyandi S. A., Damodharan K., Suh J. W., and Yang S. H. 2017. In vitro characterization of *Lactobacillus plantarum* strains with inhibitory activity on enteropathogens for use as potential animal probiotics. Indian journal of microbiology 57(2): 201-210.
- Salminen S., Wright A. V., Ouwehand A. 2004. Lactic acid bacteria microbiological and functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., U.S.A.

- Savadogo A., Ouattara C.A.T., Savadogo P.W., Ouattara A.S., Barro N., Traore A.S. 2004. Microorganisms involved in Fulani traditional fermented milk in Burkina Faso. *Pak. J. Nutr* 3:134–139.
- Sharma A., Lavania M., Singh R., and Lal B. 2021. Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28(3):1622-1632.
- Shukla R., Iliiev I., Goyal A. 2014. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 as probiotic and its dextran with anticancer properties. *Journal of BioScience and Biotechnology* 3(1):79-87.
- Todorov S.D., Botes M., Guigas C., Schillinger U., Wiid I., Wachsmann M.B., Holzapfel W.H., Dicks L.M. 2008. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol* 104: 465–477.
- Tuomola E.M., Salminen S.J. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Inter. J. Food Microbiol* 41: 45–51.
- Vijayakumar, M., Ilavenil, S., Kim, D. H., Arasu, M. V., Priya, K., Choi, K. C. 2015. In Vitro Assessment of the Probiotic Potential of *Lactobacillus plantarum* KCC-24 Isolated from Italian Rye-Grass (*Lolium multiflorum*) Forage. *Anaerobe* 32: 90-97.
- Wang Y., Wu Y., Wang Y., Xu H., Mei X., Yu D., and Li W. 2017. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients* 9(5):521- 525.
- Xu J., Bae E., Zhang Q., Annis D.S., Erickson H.P., Mosher D.F. 2009. Display of cell surface sites for fibronectin assembly is modulated by cell adherence to (1) F3 and C-terminal modules of fibronectin. *PLoS One* 4: 4113.
- Zeng X.Q., Pan D.D., Zhou P.D. 2010. Functional characteristics of *Lactobacillus fermentum* F1. *Cur. Microbiol* 62:27–31.
- Zheng J and Ramirez V. D. 2000. Inhibition of mitochondrial proton F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *British Journal of Pharmacology* 130(5):1115–1123.
- Zhou J.S., Gopal P.K., Hill H.S. 2001. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin *in vitro*. *Inter. J. Food Microbiol* 63:81–90.



Zoumpopoulou G., Foligne B., Christodoulou K., Granette C., Pot B., Tsakalido E. 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models. *Int. J. Food Microbiol* 121:18–26.

## ملخص

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم الخصائص الحيوية لسلاسل *Lactobacillus* المعزولة من لبن الإبل الخام ، حيث تم عزل 177 سلالة. من بين هؤلاء ، تم تحديد 20 سلالة فقط عن طريق تسلسل الجين المشفر 16S ARNr على أنها *Lactobacillus spp*. أربعة عشر عزلة تنتمي إلى نوع *Lactobacillus fermentum* وستة عزلات من *Lactobacillus plantarum*. تم اختيارهم مسبقًا لمقاومتهم للحموضة عند درجة الحموضة 2 ، البيبسين ، البنكرياتين والأملاح الصفراوية كمعلمات نموذجية لاختيار البروبيوتيك. أظهرت جميع السلالات تحملاً مشابهاً لظروف المعدة هذه. من ناحية أخرى ، أظهرت السلالات جانب أمان جيد بسبب عدم وجود نشاط انحلالي وغياب تحلل الميوسين. تم العثور على جميعها تقريبًا مقاومة لمجموعة المضادات الحيوية المعروفة سريريًا ولديها نشاط مضاد للميكروبات ضد مسببات الأمراض الشائعة. يبدو أن سلالات *L. fermentum* تلتصق بشكل أفضل بالخلايا الظهارية البشرية Caco-2 و HT29-MTX مقارنة بالسلالة المرجعية *Lactobacillus rhamnosus GG*. في ضوء هذه النتائج يمكن استنتاج أن حليب الإبل يمكن أن يكون مصدرًا ممتازًا لـ LAB مع إمكانات عالية من البروبيوتيك.

**الكلمات المفتاحية:** بكتيريا حمض اللاكتيك ، لاكتوباسيلوس ، قدرة البروبيوتيك ، التعايش ، المقاومة.

## Résumé

L'objectif de cette étude était d'évaluer les propriétés probiotiques des souches de *Lactobacillus* isolées du lait de chamelle cru .Au total, 177 souches ont été isolées. Parmi ceux-ci, seulement 20 souches ont été identifiées par séquençage du gène codant l'ARNr 16S comme *Lactobacillus spp*. Quatorze isolats appartenaient à l'espèce *Lactobacillus fermentum* et six à *Lactobacillus plantarum*. Elles ont été présélectionnées pour leurs résistances à l'acidité à pH 2, à la pepsine, à la pancréatine et aux sels biliaires comme des paramètres typiques de sélection des probiotiques. Toutes les souches ont montré une tolérance similaire à ces conditions gastriques. D' autre part, les souches ont présentées un bon aspect sécuritaire par l'absence de l'activité hémolytique et l'absence de dégradation de la mucine. Il s'avère presque toutes étaient résisté aux groupe d'antibiotiques bien connu cliniquement et ont une activité antimicrobienne contre les agents pathogènes usuelles. Les souches de *L. fermentum* semblent adhérer mieux aux cellules épithéliales humaines Caco-2 et HT29-MTX par rapport à la souche référence *Lactobacillus rhamnosus GG*. En lumière de ces résultats on peut conclure que le lait de chamelle pourrait être une excellente source de LAB à haut potentiel probiotique.

**Mots clés:** Bactéries lactiques LAB, *Lactobacillus*, Potentiel probiotique, Survie, Résistance.

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from raw camel milk. A total of 177 strains were isolated. Among these, only 20 strains were identified by sequencing the gene encoding 16S rRNA as *Lactobacillus spp*. Fourteen isolates belonged to the species *Lactobacillus fermentum* and six to *Lactobacillus plantarum*. They were preselected for their resistance to acidity at pH 2, pepsin, pancreatin and bile salts as typical parameters for selection of probiotics. All strains showed similar tolerance to these gastric conditions. On the other hand, the strains exhibited a good safety aspect due to the absence of hemolytic activity and the absence of degradation of mucin. Almost all were found to be resistant to the clinically well-known group of antibiotics and have antimicrobial activity against common pathogens. The strains of *L. fermentum* appear to adhere better to human epithelial cells Caco-2 and HT29-MTX compared to the reference strain *Lactobacillus rhamnosus GG*. In light of these results it can be concluded that camel milk could be an excellent source of LAB with high probiotic potential.

**Key words:** LAB lactic bacteria, *Lactobacillus*, Probiotic potential, Survival, Resistance.