

N° d'Ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V)

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé du thème :

Étude de l'effet du stress sur les microorganismes d'intérêt technologiques

Présenté par : M^{elle} REGUIEG Meriem

M^{elle} ELKRERARFI Zahia

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Présidente de jury : Dr Mme. BOUSMAHA-MARROKI Leila (M.C.A) / UDL/SBA)

Examinatrice : Dr Mme. GHALEM Mimouna (M.C.B) / UDL/SBA)

Promoteur : Dr Mr. MARROKI Ahmed (M.C.A) / UDL/SBA)

Année universitaire 2020 – 2021
Session : « Juin »

Remerciement :

Avant tout, Nous remercions ALLAH, le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail.

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

*Notre encadreur Dr MARROKI A, pour avoir encadré ce travail,
pour son aide, ses conseils pour clarifier les premières étapes de la
recherche et sa patience ;*

*Dr Mme. BOUSMAHA-MARROKI Leila, pour avoir
aimablement accepté de présider le jury de soutenance;*

*Dr Mme. GHALEM Mimouna, d'avoir accepté d'examiner et de
juger le présent mémoire.*

*Nous remercions sincèrement tous ceux qui nous ont aidées et
ainsi toute personne ayant participé de près ou de loin à
l'élaboration de ce mémoire.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à tous nos enseignants qui ont
contribué à notre formation tout au long de ces Cinq ans.*

Merci à tous

Dédicace

Je remercie en premier lieu mon **DIEU** de m'avoir permis d'arriver jusqu' ici et de m'avoir donné l'aptitude d'achever ce modeste travail.

Du profond de mon cœur , je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers :

A mon cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect , mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction e mon bien être .

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours . Qu'ALLAH le tout puissant , vous accorderait santé , bonheur et longue vie .

A La mémoire de ma mère

Ton image et ton amour ont été toujours pour moi une source de courage et de confiance dans ma vie . Mère **KENZA** ; tu nous a quittée mais tu es toujours présente avec moi .

A la mémoire de ma **grand-mère** paternelle qui nous à quitter cette année malheureusement

A Mes chers frères

Abderrahmane , Abdellah et Walid

A mes aimables Sœurs : Romeissa , Amel et Wafaa

A ma belle-mère : Rahma

A mon cher fiancé

Abderrahmane

A ma grand-mère maternelle : Aicha, que dieu lui donne une longue vie

A l'épouse de mon frère Fatima et mon neveu Adam

A tous ma famille loin et proche surtout mes oncles paternels: Abbés et Nowari

Au binôme

Zahia , que je remercie pour tous les beaux moments qu'on a vécu ensemble .

Meriem

Dédicace

Je remercie en premier lieu mon **DIEU** de m'avoir permis d'arriver jusqu' ici et de m'avoir donné l'aptitude d'achever ce modeste travail.

A La mémoire de ma mère :

Ton image et ton amour ont été toujours pour moi une source de courage et de confiance dans ma vie . Mère **khadidja** ; tu nous a quittée mais tu es toujours présente avec moi .

A mon cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect , mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction e mon bien être .

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours . Qu'ALLAH le tout puissant , vous accorderait santé , bonheur et longue vie .

Je remercie ma deuxième mère Aicha qui a été toujours avec moi

A mes chers frères:

Attou et Zahri

A mes adorables sœurs

Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et succès, et que dieu le tout puissant ,vous protège et vous garde

Au binôme

Meriem , que je remercie pour tous les beaux moments qu'on a vécu ensemble

Je dédie aussi ce travail à monsieur Houssein Eddine qui a été toujours là pour moi .

Zahia

Résumé

Cette étude a été réalisée sur 10 souches de *Lactobacillus* d'origine humaine. Ces souches ont été sélectionnées pour leurs potentiels et importance technologique et probiotique. L'objectif tracé durant cette d'étude sur dix souches de *Lactobacillus* est pour évaluer l'effet de stress acide, osmotique et biliaire comme propriété technologique et probiotiques des souches utilisées comme starter ou culture secondaire dans l'industrie agro-alimentaire en particulier l'industrie fromagère. Le résultat obtenus par l'étude et l'examen macro et microscopique, et physiologiques à savoir l'étude de type fermentaire par l'utilisation de la galerie API 50CHL, et le test de catalase, nous a permis de classer les dix souches comme des espèces appartenant au genre *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus plantarum*. L'étude de pouvoir acidifiant nous a permis de sélectionner les souches : **SL4**, qui est plus résistante à l'acidité, suite par les souches **SL1, SL5 et SL6**. L'étude de la tolérance au stress osmotique, montre que les souches **SL4, SL1, SL5, SL3, SL8 et SL10** peuvent être considérée comme souches plus adaptatives aux stress osmotique à 4% et 6,5% par rapport aux autres souches testées. L'étude de la tolérance des souches testées à la bile a révélé que toutes les souches ont une résistance vis-à-vis de la bile. D'après ces résultats la souche **SL1, SL4 et SL5** peuvent être sélectionnées comme souches performantes et ayant un intérêt technologique et probiotique important.

Mots clés : *Lactobacillus* ; Stress acide ; Stress osmotique ; Tolérance à la bile ; Propriétés technologique et probiotique, Identification

Abstract

This study was carried out on 10 *Lactobacillus* strains of human origin. These strains were selected for their technological and probiotic potential and importance. The objective of this study on ten strains of *Lactobacillus* is to evaluate the effect of acid, osmotic and biliary stress as a technological and probiotic property of the strains used as starter or secondary culture in the food industry, especially the cheese industry. The results obtained by the macro and microscopic study and examination, and physiological namely the study of fermentative type by using the API 50CHL gallery, and the catalase test, allowed us to classify the ten strains as species belonging to the genus *Lactobacillus* *acidophilus* and *Lactobacillus plantarum*. The study of acidifying power allowed us to select the strains: **SL4**, which is more resistant to acidity, followed by the strains **SL1**, **SL5** and **SL6**. The study of the tolerance to osmotic stress, shows that the strains **SL4**, **SL1**, **SL5**, **SL3**, **SL8** and **SL10** can be considered as more adaptive strains to osmotic stress at 4% and 6.5% compared to the other tested strains. The study of the tolerance of the tested strains to bile has revealed that all the strains have a resistance towards bile. According to these results, the **SL1**, **SL4** and **SL5** strains can be selected as efficient strains with an important technological and probiotic interest.

Key words : *Lactobacillus*; Acid stress; Osmotic stress; Bile tolerance; Technological and probiotic properties, Identification

ملخص

أجريت هذه الدراسة على 10 سلالة من اللاكتوباسيلوس من اصل بشري. وقد أختيرت هذه السلالات لما لها من إمكانيات وأهمية تكنولوجية وإبداعية. والهدف من هذه الدراسة المتعلقة بعشر سلالات من اللاكتوباسيلوس هو تقييم أثر

الإجهاد الحمضي والسموزي والبيري كخاصية تكنولوجية وبيولوجية للسلالات المستخدمة كبداية أو ثقافة ثانوية في صناعة الأغذية، ولا سيما صناعة الجبن. النتائج التي تم الحصول عليها من خلال دراسة وفحص الماكرو والميكروسكوبات، والفيولوجية تحديدا دراسة النوع التخيري باستخدام معرض API 50CHL ، واختبار كاتالاز، سمحت لنا بتصنيف السلالات العشر كأنواع تنتمي إلى جنس اللاكتوباسيلوس أسيدوفيلوس و اللاكتوباسيلوس النبات . دراسة القوة المحمضية سمحت لنا باختيار السلالات SL4 :، التي هي أكثر مقاومة للحموضة، تليها السلالات

و SL5 و SL6 وتظهر دراسة القدرة على تحمل الإجهاد الأسموزي أن السلالات SL4 و SL1 و SL3 و SL5 و SL8 و SL10 يمكن اعتبارها سلالات أكثر تكيفا للإجهاد الأسموزي بنسبة 4 ٪ و 6.5 ٪ مقارنة بالسلالات الأخرى

التي تم إختبارها. وقد كشفت دراسة تسامح السلالات المختبرة التي يمكن ان تنحل عن ان كل السلالات لها مقاومة تجاه الصقيع. ووفقا لهذه النتائج، يمكن إختيار سلالات SL1 و SL4 و SL5 كسلالات فعالة ذات أهمية تكنولوجية وترويجية.

الكلمات الرئيسية : اللاكتوباسيلوس؛ الإجهاد الحمضي؛ الإجهاد الأسموزي؛ التسامح الصفراوي؛ الخواص التكنولوجية والخواص التخصصية، التعريف.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

DO: Degré D'oxydation

Lb : Lactobacillus

M17 : Milieu de Terzaghi

MRS: de Man Rogosa et Sharpe

NaCl: Chlorure de sodium

pH: potentiel d'Hydrogène

LAB : Lactic Acid Bacteria

sp : espèce indéterminée

API : Appareils et Procédés d'Identification

UFC : Unité Formant Colonie

PCR : de l'anglais « Polymerase Chain Reaction »

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents genres des bactéries lactiques	06
Tableau 2 : Utilisations des bactéries lactiques dans la production alimentaire	07
Tableau 3 : Habitat des Lactobacillus	08
Tableau 4 : Principales espèces et sous espèces de lactobacilles utilisées en industrie laitière.....	09
Tableau 5 : Aspects microscopiques des souches étudiées après coloration de Gram	23

Liste des figures

Figure 1 : Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARN.....	05
Figure 2 : Morphologie en microscopie électronique de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	08
Figure 3 : La structure des osmoprotecteurs	13
Figure 4 : Aspect des colonies de la souche SL3 sur milieu MRS agar acidifié.....	22
Figure 5 : Résultats de test biochimique de la galerie API 50 CHL	24
Figure 6 : Croissance des souches à différents pH après 24h d'incubation	26,27,28
Figure 7 : Croissance des souches à différentes concentrations de NaCl et d'ox-gall.....	30,31,32

Liste des annexes

Annexe 01 : Composition des milieux de culture (MRS et M17)	44
Annexe 02 : Tableaux 6 : Résultats de la croissance des différentes souches en présence de NaCl et ox-gall par la mesure de la DO	46
Annexe 03 : Tableaux 7 : Résultats de la croissance des souches à différentes pH par la mesure de la DO	50

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des tableaux en annexes	
Introduction	1

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur Les bactéries lactiques.....	3
1.1. Définition	3
1.2. Caractères des bactéries lactiques	3
1.3. Habitat des BL	4
1.4. Classification et taxonomie	4
1.5. Utilisation des bactéries lactiques dans l'industrie agro-alimentaire	6
2. Le genre lactobacillus.....	7
2.1. Les intérêts technologiques et probiotiques des <i>Lactobacillus</i>	9
2.1.1. Propriétés technologiques.....	9
2.1.2. Intérêts probiotique.....	10
3.Stress et <i>Lactobacillus</i>	10
3.1. Comment étudier un stress ?.....	10
3.2. Définition du stress	10
3.3. Le stress acide	11
3.3.1. Effet d'acide lactique sur les bactéries	11
3.3.2. Mécanisme de résistance des bactéries lactiques au stress acide	11
3.4. Stress osmotique.....	12
3.4.1. Définition de l'osmose	12
3.4.2. Effet du stress osmotique sur les bactéries.....	12
3.4.3. La réponse au stress osmotique.....	12
3.5. Le stress biliaire	13
3.6. D'autre effet de stress.....	14
4. Les méthodes d'identification des BL	15

Sommaire

4.1. Méthodes classiques	15
4.2. Méthodes moléculaires	15

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique : Souches bactériennes	17
2. Revivification des souches	17
3. Purification des souches	17
4. Identification et caractérisation des souches de <i>Lactobacillus</i> purifiées.....	17
4.1. Examen macroscopique	17
4.2. Examen microscopique (Coloration de Gram)	18
5. Les principales étapes de la coloration de Gram	18
6. Test de catalase	18
6.1. Technique et lecture des résultats	19
7. Étude des caractères biochimiques : utilisation de microméthodes	19
7.1. Identification par la galerie API 50CHL	19
8. Étude de l'effet du stress sur la survie de la souche de lactobacilles	19
8.1. Préparation de l'inoculum	20
9. Survie et croissance de souches de <i>Lactobacillus</i> à 4% et 6,5% NaCl	20
10. Survie et croissance de souches de <i>Lactobacillus</i> à pH = 3,5 ; 4,5 et 5%	20
11. Tolérance à la bile	21

Résultats et discussions

1. Examen de l'aspect macroscopique	22
2. Examen de l'aspect microscopique	22
3. Test de catalase	24
4. Résultat du test biochimique	24
4.1 Identification de souches représentative par l'utilisation de la galerie API 50CHL	24
5. Résultat de l'effet de Stress	24
5.1 La tolérance au stress acide (pH 3,5 , 4,5 et 5)	24
5.2 La tolérance au stress osmotique (NaCl 4%, 6,5%)	29
5.3 Effet de la tolérance au stress biliaire.....	33
Conclusion	34
Références bibliographique	36
Annexes	42

Introduction

La microflore microbienne du lait cru est composé de plusieurs microorganismes tels que les bactéries d'altération et les bactéries lactiques (**Licitra, 2010**). Le secteur des industries agroalimentaires utilise un certain nombre d'auxiliaires technologiques, parmi lesquels les bactéries lactiques, pour élaborer des aliments fermentés.

Pour les microorganismes, auxquels nous nous intéressons dans cette étude, la notion de stress intervient dès que les conditions optimales de croissance d'un microorganisme ne sont pas réunies. Par conséquent, quelle que soit sa nature, toute modification environnementale conduisant à des conditions de croissance non favorables va perturber la physiologie cellulaire et sera donc perçue comme un stress. La capacité d'adaptation des microorganismes aux différentes conditions de vie qu'ils rencontrent va être déterminante pour leur survie et leur développement.

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène de microorganismes d'importance commerciale largement utilisées dans une grande variété d'industries alimentaires (**Lyu et al, 2016**), elles produisent de l'acide lactique en tant que produit final de métabolisation des glucides (**Holzappel et al, 2001**). L'intérêt des bactéries lactiques dans l'industrie agroalimentaire réside principalement dans leur capacité à transformer certains sucres en lactate et ainsi à acidifier le milieu environnant.

Un des enjeux majeur de la recherche actuelle consiste à sélectionner des nouvelles souches appartenant au groupe des bactéries lactiques, notamment des *Lactobacillus* avec des propriétés technologiques et probiotiques importantes. Dans ce contexte, l'objectif de notre travail consiste à l'étude de l'effet de stress sur la croissance de certaines souches de lactobacilles afin de sélectionner des souches utilisées comme auxiliaire technologique ou probiotique dans l'industrie agroalimentaire.

A ce titre notre manuscrit est organisé en trois parties principales . La première partie est une synthèse bibliographique, faisant le point sur les bactéries lactiques et la taxonomie du genre *Lactobacillus* , Les intérêts technologiques et probiotiques des *Lactobacillus* , utilisation des bactéries lactiques dans l'industrie agro-alimentaire , l'effet du stress biliaire, osmotique et acide sur la croissance des lactobacilles ont été également détaillés . La deuxième partie, porte sur la présentation de la méthodologie adoptée au cours de cette étude pour la réalisation des objectifs tracés dans ce manuscrit à savoir l'étude de la

Introduction

croissance à différentes concentrations du NaCl, pH et la résistance à la bile été également testée. Dans la troisième partie nous présenterons les résultats obtenus par cette étude et leur discussion. Enfin, la conclusion récapitule les principaux résultats de ce travail .

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur Les bactéries lactiques

1.1. Définition

Les bactéries lactiques (BL) sont un groupe hétérogène de micro-organismes, caractérisés par leur production d'acide lactique comme un produit principal du métabolisme (**Dortu et Thonart, 2008**). D'après leurs bénéfices technologiques, certaines souches probiotiques sont impliquées dans nombreux fermentations de produits alimentaires notamment les produits laitiers où elles sont utilisées en tant que starter dans la production alimentaire et permettent le développement de certaines caractères organoleptiques (**Dortu et Thonart, 2008**) et apportent des bénéfices pour la santé de l'hôte (**Young Ng et al. 2015**).

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes assez hétérogènes sur le plan morphologique et physiologique. Selon **Deroissart (1986)**, les bactéries lactiques ont besoin de sources de carbone complexes pour élaborer leurs biomolécules, et requièrent comme source d'énergie et ne se développent qu'en présence de substances hydrocarbonées.

1.2. Caractères des bactéries lactiques

Décrites par Orla-jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène du point de vue taxonomique. (**Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005**).

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, chimio-organotrophes.

Elles sont Gram positives, immobiles, non sporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les glucides fermentescibles et d'autres composés (**Dellaglio et al., 1994**).

Elles sont des coques ou des bâtonnets, catalase négative, aéro-anaérobies facultatives ou micro-aérophiles. Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides (**Larpent, 1989**) par voie homo ou hétérofermentaire (**Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005**).

La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul

produit formé et hétéro lactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂...etc.) (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet *et al.*, 2005).

1.3. Habitat des BL

Les BL sont généralement ubiquistes, elles ont pour habitat de nombreux milieux naturels comme le lait, les végétaux, la viande, les muqueuses humaines et animales et le tractus digestif (Mechai, 2009). Ces microorganismes sont isolées à partir de nombreux milieux naturels : végétaux (plantes et fruits, etc), animaux et humains (cavité buccale et vaginale, fèces), lait fermentés (fromage, beurre...), (London, 1976 cité par Deroissart, 1986).

1.4. Classification et taxonomie

Selon Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes à faible teneur en bases G+C (50 %) à l'exception de genre *Bifidobacterium* appartient au phylum des **Actinobacteria** à haut pourcentage G+C (Tableau01) (Klein *et al.*, 1998), la Classe des Bacilli et l'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente cinq genres répartis sur six familles.

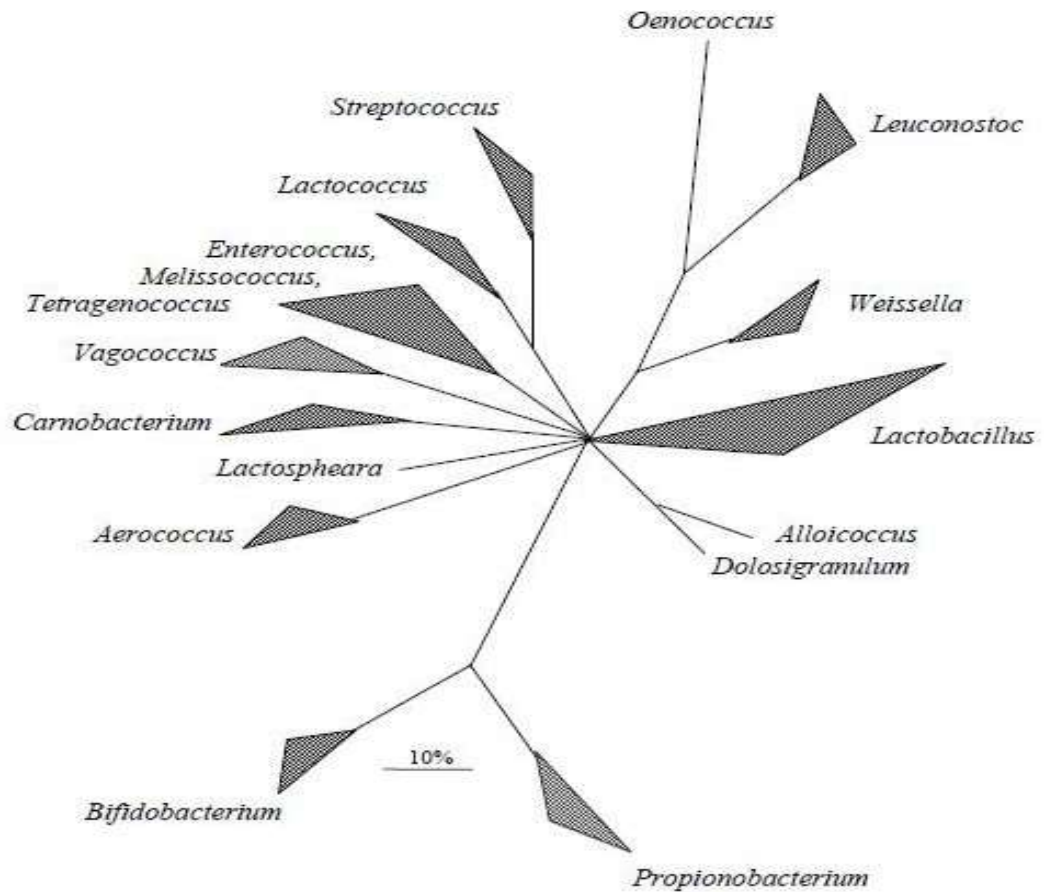


Figure 1. Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARNr, (Holzapfel et al, 2001).

La taxonomie actuelle des BL repose sur l'étude des espèces et des souches par des méthodes phénotypiques qui sont basées sur l'étude des caractéristiques biochimiques et physiologiques des micro-organismes, et génotypiques.

Les BL regroupent 13 genres bactériens dont les plus étudiés sont : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*.

Tableau 01. Les différents genres des bactéries lactiques (**Leveau et Bouix, 1993**).

	Cellules		Fermentation	ADN : GC%
	Forme	arrangement		
<i>Streptococcus</i>	Coque	chaines	Homolactique	34-46
<i>Leuconostoc</i>	Coque	chaines	Hétérolactique	36-43
<i>Pediococcus</i>	Coque	tétrades	Homolactique	34-42
<i>Lactobacillus</i>	Bacille	chaines	Homolactique Hétérolactique	32-53
<i>Bifidobacterium</i>	Variée	variée	Acétique et lactique	55-67

GC% : pourcentage molaire de l'ADN en bases G et C.

1.5. Utilisation des bactéries lactiques dans l'industrie agro-alimentaire

Dans l'industrie agro-alimentaire, les BL sont impliquées dans la fermentation et la conservation de nombreux aliments par la production de plusieurs substances antimicrobiennes comme les acides organiques ainsi que pour l'amélioration de la qualité nutritionnelle et organoleptiques des aliments et jouent un rôle essentielle dans l'amélioration de l'arôme (**Serrazanetti *et al* ; 2013, Yao *et al* ; 2009**).

Dans l'industrie fromagerie, divers espèces de lactobacilles interviennent pendant l'affinage des fromages *L.casei*, *L .plantarum*, *L. helveticus*, et *L. bulgaricus*. Dans la production de pains, les lactobacilles homo ou hétérofermentaires interviennent avec des levures (**Guiraud, et Rosec, 2004**).

Synthèse bibliographique

Tableau 2: Utilisations des bactéries lactiques dans la production alimentaire (d'après McKay et Baldwin, 1990)

Applications	Espèces utilisées
Fermentations de végétaux	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
Fermentations de viandes et poissons	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus Acidilactici</i>
Boissons alcoolisées	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Café et cacao	Bactéries lactiques variées
Sauce de soja	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Pediococcus soyae</i>
Aliments fermentés indigènes	Bactéries lactiques variées
Ensilage	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Probiotiques	<i>Lactococcus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
Pain au levain	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Biscuits	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Leichmannii</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
Produits laitiers fermentés	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. Lactis biovar diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. Cremoris</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> .

2. Le genre *Lactobacillus*

Les lactobacilles forment un groupe hétérogène de bactéries Gram positif, non sporulées, généralement immobiles, ils se présentent sous forme de bâtonnets longs et fins, ou très courts (**Figure 2**), parfois groupés paires ou en chaînes.

Généralement, les lactobacilles sont catalase négative, microaérophiles ou anaérobies (**Guiraud et Rosec, 2004**) et la plupart se développent entre 15°C et 42°C et certaines souches sont capables de se croître à 50°C (**Tailliez, 2004**). Ce genre est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques qui ont un rôle essentiel dans l'alimentation humaine où certains nombres de ces bactéries contribuent

dans nombreuses préparation alimentaires (production de fromages, yaourts et autre aliments dérivés du lait...) (Tailliez, 2004).



Figure 2. Morphologie en microscopie électronique de *Lactobacillus acidophilus* (Antoine, 2011).

Les lactobacilles sont répartis dans diverses niches écologiques (tractus gastro-intestinal et génitale de l'homme et des animaux) (Charteris *et al*, 1996),(tableau 3), surtout dans les produits laitiers tels que les fromages , les yaourts et laits fermentés , les produits végétaux , viande et saucisson (Klein *et al* .,1998) .

Tableau 3 : Habitat des Lactobacillus (Perry *et al.*, 2004).

Habitat	Espèces rencontrés	Activité ou produit
Matériel végétal en décomposition laiterie	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrukii</i> , <i>Lb. Lactis</i>	Cornichons et choucroute Fromage, yayourts, etc .
Tractus gastro-intestinal des animaux -(Oral) -(Intestinal)	<i>Lb. salivarius</i> <i>L. gasseri</i> , <i>L. rhamnosus</i> <i>Lb. casei</i> , <i>Lb plantarum</i> , <i>Lb. gasseri</i>	Formation de Carie dentaire Flore normale
Vagin des mammifères	<i>Lb. vaginalis</i> <i>Lactobacillus</i> spp.	Flore normale

2.1. Les intérêts technologiques et probiotiques des *Lactobacillus*

2.1.1. Propriétés technologiques

Intérêt technologique des lactobacilles est considérable pour plusieurs raisons de leur métabolisme qui se traduit par la production d'acide lactique, ce dernier est supérieure à celles formée par les autres genres utilisés industriellement (**Luquet et Roissant, 1994**). Aussi, L'activité protéolytique des lactobacilles participent à l'accélération de l'affinage des fromages et le développement des saveurs (**Bartels *et al.*, 1987**). D'autre caractéristique a une importance dans l'industrie alimentaire l'aptitude à production des polysaccharides (**Schmidt J.L. *et al.*, 1994**).

Tableau 4 : Principales espèces et sous espèces de lactobacilles utilisées en industrie laitière. *Lb.* : *Lactobacillus*. (**Kandler *et al.*, 1986**)

Espèces	Fermentation du lactose	Croissance		
		A 15°C	A 45°C	
<i>Lb. helveticus</i>	Homofermentaire	-	+	Thermophile
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>		-	+	
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i>		-	+	
<i>Lb. acidophilus</i>		-	+	
<i>Lb. casei</i>		+	-	Mésophile
<i>Lb. plantarum</i>		+	-	
<i>Lb. kefir</i>	Hétérofermentaire	+	-	
<i>Lb. brevis</i>		+	-	
<i>Lb. fermentum</i>		-	+	Thermophile

D'autre propriété liée au système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire. L'activité protéolytique est une caractéristique technologique importante chez les bactéries lactiques puisqu'elle leur confère la capacité de croître efficacement dans le lait. L'hydrolyse des caséines du lait modifie la texture et les acides aminés et les peptides libérés sont des précurseurs des composés responsables de l'arôme des produits fermentés. Le pouvoir lipolytique est d'une grande importance dans le développement du flaveur et la libération des acides gras (**Fox *et al.*, 2004 ; De Roissart et Luquet, 1994**).

2.1.2. Intérêts probiotiques

Les lactobacilles sont des importants colonisateurs de la flore digestive de l'homme et des animaux. Ces microorganismes ont de nombreux rôles bénéfiques, on peut en citer la stimulation immunitaire et la production de peptides et d'enzymes actives (**Klaenhammer, 1995**). Entre autres plusieurs études suggèrent que l'adhésion des lactobacilles à la muqueuse intestinale prévient l'attachement des pathogènes et stimule leur élimination du tractus intestinal en cas d'infection (**Fernandez *et al.*, 2002**).

3. Stress et *Lactobacillus*

3.1. Comment étudier un stress ?

La notion de stress intervient à partir de ce que les conditions optimales de croissance d'un microorganisme ne sont pas réunies. Par conséquent, quelle que soit sa nature, toute modification environnementale conduisant à des conditions de croissance non favorables va perturber la physiologie cellulaire et sera donc perçue comme un stress. La capacité d'adaptation des microorganismes aux différentes conditions de vie qu'ils rencontrent va être déterminante pour leur survie et leur développement (**Alexander *et al.*, 2008**).

3.2. Définition du stress

Le stress correspond à toute modification dans le génome, le protéome ou l'environnement qui entraîne une diminution du taux de croissance ou de la survie d'un micro-organisme, il peut être de nature physique, chimique, biologique ou environnementale (pH, osmotique, biliaire, température, oxygène, pression) (**Doyle, 2011**).

3.3. Le stress acide

Le stress acide est défini comme «effet biologique combiné du faible pH et des acides faibles (organiques) présents dans l'environnement » ou «l'exposition à des valeurs de pH inférieures à la plage de croissance » (**Hosseini Nezhad *et al*, 2015**). Ce phénomène est plus important pour les bactéries lactiques pendant la fermentation des aliments et des boissons (**De Angelis et Gobbetti, 2004**).

Les acides peuvent diffuser dans la cellule, après ils se dissocient à l'intérieur du cytoplasme en protons et ions. L'accumulation des protons à l'intérieur de la cellule entraîne une diminution du pH intracellulaire ce qui affecte la force proton motrice nécessaire à de nombreux systèmes de transport membranaires. L'acidification entraîne des effets néfastes sur l'activité enzymatique et peut endommager les protéines et l'ADN de la cellule bactérienne (**Drider et Prévost, 2009**).

3.3.1. Effet d'acide lactique sur les bactéries

Les bactéries lactiques produisent au cours de la fermentation des aliments de l'acide lactique, en créant un environnement trop acide défavorable à la survie et à la croissance des contaminants (**Drider et Prévost, 2009**). La membrane des bactéries est perméable à l'acide lactique qui peut se diffuser à travers la membrane cytoplasmique, et s'accumule dans la cellule. L'accumulation des protons dans le cytoplasme provoque des altérations au niveau énergétique, enzymatique et structural (**Corrieu et Luquet, 2008**).

3.3.2. Mécanisme de résistance des bactéries lactiques au stress acide

L'exposition des BL à un stress acide améliore fortement leur résistance vis-à-vis d'une contrainte acide. Cette réponse est appelée « Acide Tolerance Response » (ATR) qui entraîne des changements physiologiques qui augmentent la survie cellulaire pendant l'exposition à un pH létale (**Broadbent *et al*, 2010**). Cette ATR a été décrite chez de nombreuses bactéries lactiques comme *Lb. Acidophilus* (**Lorca et Font de Valdez, 2000**), *Lb. casei* (**Broadbent *et al*, 2010**), *Lb. plantarum* (**Serrazanetti *et al*, 2013**). Des systèmes de transport enzymatiques sont induit et joue un rôle dans le contrôle du pH intracellulaire.

3.4. Stress osmotique

Le stress osmotique correspond à une diminution ou une augmentation de l'osmolarité de l'environnement de la bactérie (Csonka, 1989) qui, en modifiant la disponibilité de l'eau de la cellule, affecte sa survie et/ou sa croissance (Potts, 1994). L'activité de l'eau extérieure provoque un stress osmotique chez la flore microbienne, qui se matérialise par une diminution de la pression de turgescence pouvant conduire à une dénaturation des macromolécules causée par l'augmentation de la force ionique.

3.4.1. Définition de l'osmose

Le phénomène d'osmose correspond à la diffusion d'un composé chimique à travers une membrane semi-perméable. La différence engendre d'un excès de pression, appelé pression osmotique. Le corps dissous dans l'eau franchit la membrane vers la solution la moins concentrée sous l'effet de la pression osmotique.

Ce transfert spontané ne nécessite aucune dépense d'énergie et joue un rôle essentiel dans l'activité des cellules.

3.4.2. Effet du stress osmotique sur les bactéries

Une diminution de l'osmolarité externe du milieu provoque un écoulement rapide de l'eau dans la cellule à travers une membrane cytoplasmique semi-perméable (krämer, 2010). Cet écoulement d'eau augmente la pression de turgescence de la cellule bactérienne (Doyle, 2011) et induit des changements dans la structure et la concentration des composants cellulaires (krämer, 2010). Un choc hypo-osmotique entraîne généralement des changements mineurs dans le volume cellulaire (Beales, 2004). Toutefois, une augmentation de l'osmolarité du milieu externe entraîne un flux rapide de l'eau vers l'extérieure de la cellule et par conséquent, une diminution de la pression de turgescence des cellules et modification de la concentration du soluté intracellulaire et le volume cellulaire (De Angelis et Gobbetti, 2004).

3.4.3. La réponse au stress osmotique

Les bactéries lactiques sont soumises à des changements dans l'activité de l'eau environnante pendant le processus de fermentation industrielle (Romeo *et al.* 2001). Dans ces conditions les bactéries lactiques sont capables de vivre, en développant des

mécanismes de protection efficace qui reposent essentiellement sur l'accumulation des solutés compatibles dans le cytoplasme ou leur rejet selon le type du stress osmotique (Piuri *et al*, 2003).

Les solutés produit par la cellule afin d'équilibrer la différence entre l'osmolarité intracellulaire et extracellulaire (Figure 4) (Romeo *et al*, 2001 ; Papadimitriou *et al*, 2016).

Les changements osmotiques activent les systèmes osmorégulateurs de la cellule en induisant des gènes osmorégulateurs impliqués dans la biosynthèse de certains substrat (Papadimitriou, 2016).

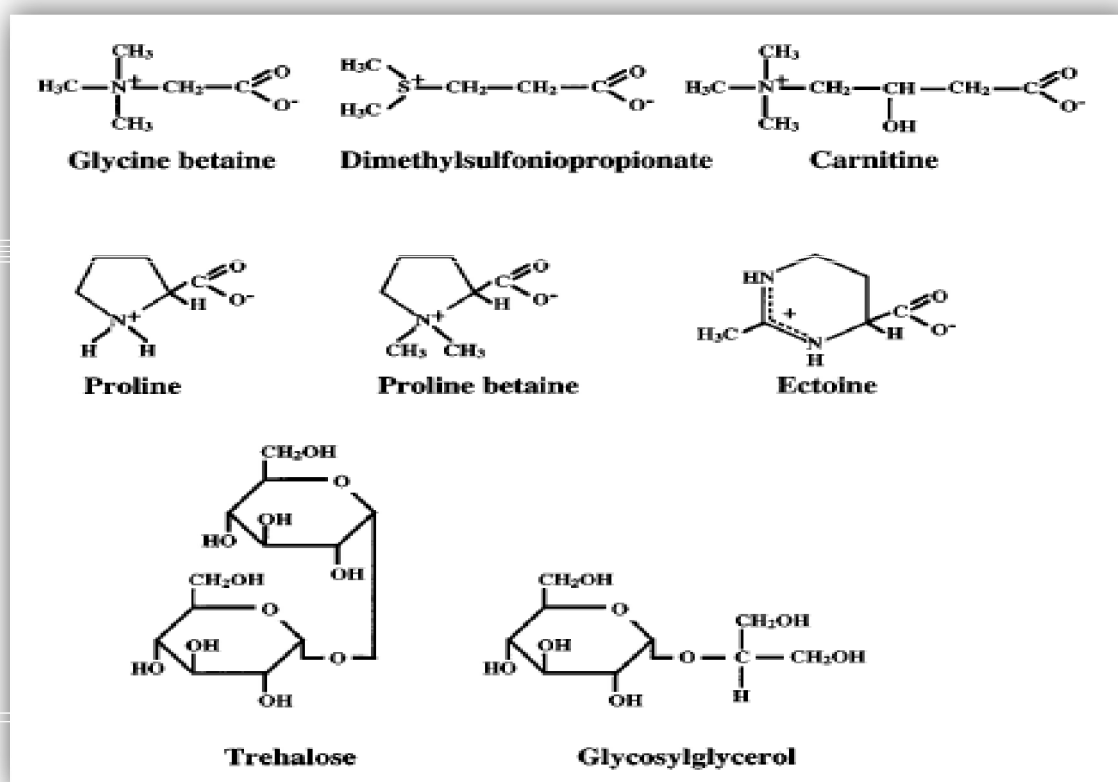


Figure 3. La structure des osmoprotecteurs (Kempf et Bremer, 1998).

3.5. Le stress biliaire

La bile est une sécrétion digestive complexe qui joue un rôle dans la dispersion et l'absorption des graisses. Les sels biliaires, les constituants majeurs de la bile, sont des dérivés de l'acide cholique (CA) qui est lui même synthétisé à partir du cholestérol.

Plusieurs micro-organismes de la flore intestinale y compris quelques bactéries d'acide lactique peuvent métaboliser les sels biliaires. Ceci a été pris en considération afin de contribuer à la protection contre de tel stress rencontré par les bactéries au cours de leur passage dans le tractus digestif. Par exemple, chez les lactobacilles, les acides biliaires sont métabolisés par les hydrolases de sels biliaires (BSH) en glycine ou en taurine. Cette hydrolyse a pour conséquence d'altérer les 21 propriétés de la bile, et notamment diminue sa solubilité à bas pH ainsi que son activité comme détergents (**Charteris *et al.*, 1998**). La plupart du temps, la résistance au stress biliaire a été étudiée pour deux catégories de bactéries : les bactéries pathogènes entériques qui survivent dans le tube digestif et les bactéries lactiques ou les bifidobactéries, en tant que probiotiques potentiels et qui sont souvent sélectionnées pour leur résistance au tractus digestif (**Drouault *et al.*, 1999**).

Par conséquent, les bactéries Gram-positif et Gram-négatif ont développé des mécanismes spécifiques pour résister à l'action toxique de la bile et pour pouvoir survivre dans un environnement riche en bile tel que le tractus digestif (**Rolfe, 2000**).

3.6. D'autre effet de stress

Depuis longtemps, les bactéries lactiques sont utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires où elles peuvent être soumises à des étapes de chauffage plus ou moins importantes. Cette température peut alors être supérieure à la température optimale de croissance (**Drider et Prévost, 2009**). Chez les cellules bactériennes, l'augmentation de la température induit des problèmes au niveau cellulaire (**Serrazanetti *et al.*, 2013**). Après l'exposition à un stress, la réponse des cellules se caractérise par des changements de l'expression génétique et des activités protéiques (**Capozzi *et al.*, 2009 ; Doyle, 2011**).

Par ailleurs, l'exposition à des basses températures, les microorganismes subissent des perturbations physiologiques sévères telles que la réduction de la fluidité membranaire, des changements dans au niveau de l'ADN et l'ARN qui altèrent la réplication, la transcription et la synthèse protéique (**De Angelis et Gobbetti, 2004 ; Drider et Prévost, 2009**). Les micro-organismes sont capables de développer une réponse adaptative pendant laquelle un certain nombre de protéines sont synthétisés (**Serrazanetti *et al.*, 2013**). Chez les lactobacilles *L. acidophilus* et *L. delbrueckii* par exemple, ces protéines sont synthétisées afin de maintenir la fluidité de la membrane cytoplasmique en augmentant la proportion d'acide gras courts et/ou insaturés dans les lipides membranaire (**Doyle, 2011**).

En ce qui concerne le stress oxydatif, il est considéré comme une contrainte importante car, provoquée par un déséquilibre entre la concentration intracellulaire des oxydants (ROS) et la protection antioxydants (Capozzi *et al*, 2009) .

4. Les méthodes d'identification des BL

Les bactéries lactiques ont de nombreuses propriétés métaboliques dont les industriels. Ces propriétés (technologiques, sensorielles antimicrobiennes ou probiotiques) sont spécifiques de l'espèce, ce qui implique qu'on puisse les mettre en évidence par des techniques d'identification et de différenciation.

4.1. Méthodes classiques

Les caractéristiques phénotypiques ont généralement servi de point de départ pour plusieurs tests sophistiqués et constituent la base de différenciation et d'identification des bactéries lactiques. Différents tests clefs sont largement adoptés. La morphologie ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques/biochimiques et chimiotaxonomiques sont les plus utilisées.

Les méthodes physiologiques incluent principalement, la croissance à certaines températures, à certaines concentrations de NaCl, à différents pH. Les méthodes métaboliques/biochimiques incluent principalement, la production de CO₂ en milieu glucosé le profil de fermentation de nombreux sucres (la galerie API 50 CHL), l'hydrolyse de l'arginine, de l'esculine et la détermination de l'isomère optique de l'acide lactique. Les méthodes chimiotaxonomiques incluent principalement, la détection de l'acide meso-diaminopimelique (*mDAP*) dans le peptidoglycane.

Plus les méthodes mentionnés en dessus, il ya aussi la technique sérologique. pour les bactéries lactiques, l'analyse sérologique de fait principalement suivant la méthode de Lancefield (1933), basée sur l'utilisation de polysaccharides de l'enveloppe cellulaire en tant qu'antigènes (Curk *et al.*, 1994).

4.2. Méthodes moléculaires

Les méthodes modernes d'identification des bactéries lactique font appel à l'étude des constituants des cellules.

Le séquençage de l'ARN 16S reste une des méthodes les plus appliquées pour

obtenir une identification précise en complément des méthodes classiques. Cependant plusieurs méthodes d'identification par PCR, plus abordables en routine se sont développées pour l'identification des bactéries lactiques.

Pour la différenciation intraspécifique, les différentes méthodes moléculaires, comme composition en base de l'ADN : G+C%, l'hybridation ADN/ADN et ADN/ARN, l'analyse des fragments de restriction de l'ADN par l'électrophorèse en champ pulsé (R-ECP), les profils protéiques par SDS-PAGE, sont généralement couplées et permettent l'analyse de la biodiversité des isolats dans un écosystème donné.

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique : Souches bactériennes

Les souches bactériennes appartenant au genre de *Lactobacillus* sp., utilisées pour la réalisation de notre projet de fin d'étude ont été fournies par Dr Marroki A (Université de Sidi Bel Abbès). La sélection de ce groupe de souches a été basée sur les résultats des travaux ultérieurs des souches de leur potentiel technologiques et probiotiques.

2. Revivification des souches

Les souches de *Lactobacillus* sp., sont revivifiées dans le milieu MRS acidifié. 10µL de chaque souche a été inoculé sur milieu MRS (pH 5,5), les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48h. Après cette période d'incubation, les souches sont ensemencées sur milieu MRS agar par la méthode de stries. Ensuite, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 48h, afin de sélectionner les colonies caractéristiques des lactobacilles. La pureté des souches est confirmée par des tests macroscopiques, microscopiques et biochimiques.

3. Purification des souches

Afin de purifier les souches, plusieurs repiquages successifs ont été réalisés par subculture dans le bouillon MRS incubé à 37°C pendant 24 à 48h, puis ensemencées à nouveau sur milieu MRS agar et incubé dans les mêmes conditions citées précédemment. La pureté des souches est caractérisée par l'étude et la description des colonies de chaque souche ensemencée sur milieu MRS agar. L'aspect des colonies des souches obtenues sur le milieu MRS ont un aspect typique au genre de lactobacilles. Ces souches retenues pour des tests ultérieurs et purifiées ont été conservées à + 4°C et -20°C sur le même milieu utilisé pour l'isolement et la purification.

4. Identification et caractérisation des souches de *Lactobacillus* purifiées

Pour l'identification des souches de *Lactobacillus* sp, des tests phénotypiques ont été effectués à savoir : l'étude de l'aspect macroscopique et microscopique, test physiologique et biochimiques et tests phénotypiques.

4.1. Examen macroscopique

L'examen microscopique des souches est basé sur l'étude de l'aspect

macroscopique des colonies obtenues sur milieu d'isolement. Les paramètres retenus pour la description des colonies à savoir la taille et diamètre, la couleur, le contour et la forme, le relief de colonies des souches sont basées sur les critères recommandés par **Bergey's manual et Axelsson (2004)**.

4.2. Examen microscopique (Coloration de Gram)

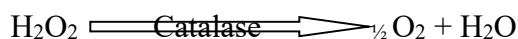
L'aspect microscopique des cellules bactériennes se base sur la coloration différentielle de Gram. Cette technique de coloration permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, le mode de regroupement et la forme cellulaire (coques ou bâtonnets).

5. Les principales étapes de la coloration de Gram

- ✚ Préparer un frottis sur une lame propre,
- ✚ Inonder le frottis séché et fixé à la chaleur pendant 30s à 1 minute avec le cristal violet.
- ✚ Laver la lame avec de l'eau distillée pendant 2 secondes.
- ✚ Inondation avec le mordant : lugol pendant 1 min.
- ✚ Laver à nouveau la lame avec de l'eau distillée pendant quelques secondes.
- ✚ Inonder la lame avec contre-colorant, 'safranine ou la fuschine' pendant 30s à 1 min.
- ✚ Laver la lame avec de l'eau jusqu'à ce qu'aucune couleur n'apparaisse, puis sécher avec du papier ou à l'air libre.
- ✚ Observez les résultats de la procédure de coloration sous immersion dans l'huile.
- ✚ Examiner au microscope, objectif x100.

6. Test de catalase

Le test de catalase est considéré un critère taxonomique important pour les bactéries à Gram positif et particulièrement pour les espèces appartenant aux bactéries lactiques comme les lactobacilles, les lactocoques, les enterocoques, etc. Donc, l'objectif de ce test est de distinguer les bactéries lactiques de non-lactiques. La catalase est un enzyme qui catalyse la dégradation de la peroxydase d'hydrogène (H_2O_2) selon la réaction suivante :



6.1. Technique et lecture des résultats

Cette technique a été effectuée selon le protocole décrit par Prescott et al., (2003). Déposer sur une lame propre une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂), à l'aide d'une micropipette ou pipette stérile. A partir d'un milieu gélosé (MRS), prélever une colonie à l'aide d'une anse stérile et le mettre dans l'eau oxygénée, bien homogénéisé. Le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y a production de l'enzyme catalase par la souche testée et le test est considéré comme positif.

7. Étude des caractères biochimiques : utilisation de microméthodes

7.1. Identification par la galerie API 50CHL

La galerie API 50 CHL est constituée de 50 microtubes contenant des substrats déshydratés pour mettre en évidence de l'activité enzymatique et la fermentation des sucres par la souche bactérienne étudiée. Durant notre étude deux souches représentatives de *Lactobacillus* ont été choisies pour étudier leur profil fermentaire des sucres. La galerie API 50CHL a été inoculée avec une concentration équivalant de 0,5 McFarland (~ 10⁵ ufc/mL) avec une pipette stérile. Ensuite, des couches d'huile de paraffine stérile a été ajoutée sur les cupules de la galerie (selon les instructions de fournisseur). Après avoir inoculé tous les cupules la galerie a été incubée à 37°C, et la lecture de résultat se fait après 24 h puis après 48h d'incubation. Après cette période d'incubation, la fermentation des sucres par les souches testées se traduit par un changement de couleur dans les capsules dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Pour l'identification les souches étudiées, les résultats obtenus ont été comparés avec la base de données via le site *web* : <http://apiweb.biomerieux.com>.

8. Étude de l'effet du stress sur la survie de la souche de lactobacilles

Afin de sélectionner des souches de lactobacilles satisfaits sur le plan technologiques et probiotiques, des tests de survie des souches à certaines conditions extrêmes comme le stress d'acide, d'osmotique et biliaire est nécessaire. Ces derniers est suivi de la survie à des concentrations variable et pendant un temps d'incubation à une température constante. En effet, généralement les bactéries dispose différents systèmes protégeant la cellules contre les variations des paramètres environnementaux comme la température, l'acidité et la pression osmotique. Des méthodes ont été actuellement développer pour mettre en évidence ces mécanismes sur le plan phénotypique que génotypiques, c'est-à-dire de déterminer les gènes responsables et le mécanisme d'adaptation des souches notamment pour les bactéries

d'intérêt technologique et probiotique.

8.1. Préparation de l'inoculum

Des cultures jeunes des souches de *Lactobacillus* sont préparées dans le milieu MRS avant chaque expérience. Des prélèvements de colonies pures ont été effectués et incorporés par la suite dans 10 ml de bouillon MRS de façon à obtenir une DO_{600nm} initial à 0,2 pour l'ensemble des tests réalisés (Biliarda *et al*, 2003). Ces milieux sont incubés à 37°C pendant 24 h et utilisés par la suite pour réaliser les différents tests.

9. Survie et croissance de souches de *Lactobacillus* à 4% et 6,5% NaCl

L'étude de la survie a été réalisée de la manière suivante :

✓ Les milieux MRS liquide utilisés sont fraîchement préparés et divisés en deux types : Le 1^{er} tube à 4% NaCl : ensemencé avec 5 μ L de la souche testée (DO_{600nm} initial à $0,2 \sim 10^5$ ufc/mL), incubé à 37°C pendant 24h.

✓ Le 2^{ème} tube à 6,5% NaCl : ensemencé avec 5 μ L de la souche testée (DO_{600nm} initial à $0,2 \sim 10^5$ ufc/mL), incubé à 37°C pendant 24h.

Les résultats de la densité optique (croissance/survie) ont été enregistrés chaque heure d'incubation à 37°C et la croissance bactérienne était estimée par mesure spectrophotométrique à 600nm. Une culture témoin était réalisée dans du milieu MRS liquide sans NaCl et ensemencé avec la même concentration cellulaire (DO_{600nm} initial à $0,2 \sim 10^5$ ufc/mL).

10. Survie et croissance de souches de *Lactobacillus* à pH = 3,5 ; 4,5 et 5%

L'étude de la survie a été réalisée de la manière suivante :

✓ Les milieux MRS liquide utilisés sont fraîchement préparés et divisés en deux types : Le 1^{er} tube à pH = « 3,5 représente le pH de l'estomac » : ensemencé avec 5 μ L de la souche testée (DO_{600nm} initial à $0,2 \sim 10^5$ ufc/mL), incubé à 37°C pendant 24h.

✓ Le 2^{ème} tube à pH = « 4,5 » : ensemencé avec 5 μ L de la souche testée (DO_{600nm} initial à $0,2 \sim 10^5$ ufc/mL), incubé à 37°C pendant 24h.

✓ Le 3^{ème} tube à pH = « 5% représente le pH proche de l'intestin » : ensemencé avec 5 μ L de la souche testée (DO_{600nm} initial à $0,2 \sim 10^5$ ufc/mL), incubé à

37°C pendant 24h.

Les résultats de la densité optique (croissance/survie) ont été enregistré après chaque heure d'incubation à 37°C et la croissance bactérienne était estimée par mesure spectrophotométrique à 600nm.

11. Tolérance à la bile

Le test de la tolérance des souches de *Lactobacillus* à la bile a été déterminé dans un bouillon MRS en présence de 0,3% et 1% de la bile (Ox-gall) selon la méthode décrite par **Marroki et al.,(2011)**. La bile est un liquide jaune, brunâtre ou vert, son pH compris entre 7,6 à 8,6 (Dore, 1994). La bile assure l'élimination des déchets hémoglobine et des substances étrangères (**Rullier, 1995**).

Ce test nécessite la préparation des milieux de culture additionnés de à 0,3 et 1 de la bile (Ox-gall). Les milieux sont soit repartis dans des tubes à raison de 5 mL ou l'Ox-gall est incorporé dans le milieu contenant l'agar et répartis dans des boîtes de Pétri.

Pour les milieu MRS liquide contenant 0,3 et 1 sont inoculé avec 1 de la suspension bactérienne étudiée. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C et la croissance a était mesurée après chaque heure d'incubation. est ensuite inoculé avec la souche a testée de 24h à 37C°. 1% de cette culture bactérienne doit être ensuite ajoutée dans un tube contenant 8ml de milieu contenant une concentration de 0,5 et 1% de la bile, les tubes sont ensuite incubés à 37C°.La croissance bactérienne était estimée par mesure de la densité optique à 600nm sur des prélèvements effectués chaque 1 heure pendant un intervalle de temps de 0h, 1h, 2h,3, et 4h. Une culture témoin était réalisée dans un bouillon MRS sans ox-gall.

Simultanément, un test de croissance des souches de *Lactobacillus* a été réalisé sur milieux MRS agar additionnés de 0,3 et 1 a été effectué. La croissance a été contrôlée par l'apparition ou non des colonies sur le milieu solide après 3, 12 et 24 h incubation à 37°C. Des boites sans ox-gall ont été ensemencées avec les même souche ont été utilisées comme test témoin.

Résultats et discussions

Durant ce travail, 10 souches de *Lactobacillus* ont été utilisées pour évaluer l'effet de stress acide, osmotique et biliaire. La caractérisation phénotypique des souches est considérée comme la première afin de classer les souches. Cette caractérisation est basée sur l'étude des critères morphologiques, physiologiques et biochimiques étape .

1. Examen de l'aspect macroscopique

Les résultats obtenus après isolement des souches sur milieu MRS gélosé (pH 5,5), après incubation à 37°C, montre différents aspect macroscopique de colonies ont été observées : des petites colonies blanchâtres, arrondies à contours réguliers, lisses et légèrement bombées (**figure 4**) (Aspect macroscopique des colonies sur milieu MRS d'une souche représentative **SL3**).

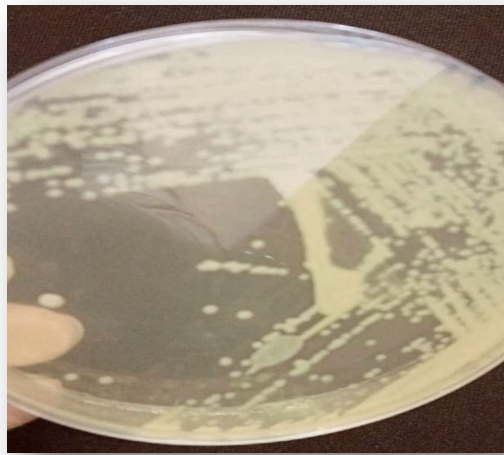


Figure 4. Aspect des colonies de la souche **SL3** sur milieu MRS agar acidifié

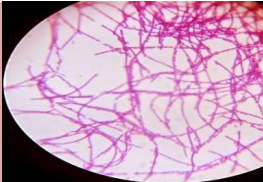
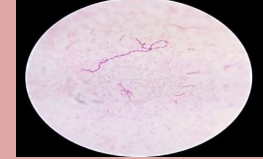
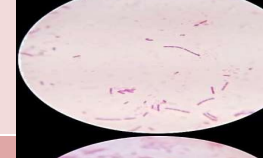
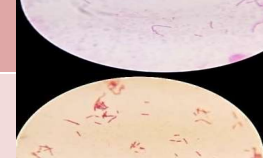
Sur milieu liquide, la culture des souches bactériennes étudiées apparaissent trouble et blanchâtre, tandis que sur la partie supérieure la culture bactérienne reste claire, ce qui suggère que les souches sont des aéro-anaérobies ou anaérobies facultatives.

2. Examen de l'aspect microscopique

Le **Tableau 5** illustre les résultats de l'examen microscopique des 10 souches étudiées. L'examen microscopique des souches après coloration de Gram, les résultats a révélé que les 10 souches testées sont des bâtonnets ou coccobacilles Gram (+), des cellules courtes arrondies, se présentent sous forme de bacilles isolés ou regroupés en paire ou en petites chainettes .

Résultats et discussions

Tableau 5 : aspects microscopiques des souches étudiées après coloration de Gram

Code souche	Aspect	Coloration de Gram	Catalase	Forme cellulaire et mode d'association
SL4		+	-	Bacilles en chaînette
SL3		+	-	Bacilles en paires et isolées
SL8		+	-	Bacilles en chaînette
SL7		+	-	Bacilles en chaînettes et isolées
SL2		+	-	Bacilles en chaînette
SL5		+	-	Bacilles en chaînette
SL10		+	-	Bacilles en chaînette
SL9		+	-	Bacilles en chaînette
SL1		+	-	Bacilles en chaînette
SL6		+	-	Bacilles en amas et en chaînettes

3. Test de catalase

Toutes les souches ont donné un résultat négatif au test de la catalase, ce qui nous a permis de classer l'ensemble des isolats au groupe de bactéries lactiques.

Basant sur les résultats obtenus par l'étude de l'aspect macroscopique et microscopique ainsi que le test de catalase, que l'ensemble des souches (10 souches), appartenant au genre de *Lactobacillus*, cette confirmation a été basée sur les critères du genre de *Lactobacillus* publiés par de Roissart et Luquet (1994).

4. Résultat du test biochimique

4.1 Identification de souches représentative par l'utilisation de la galerie API 50CHL

Le profil fermentaire des sucres par l'utilisation de la galerie API 50 CHL, après incubation à 37°C pendant 24 à 48h des souches **SL10** et **SL7** sont mentionnés dans (figure 5). Le résultat obtenu de la fermentation des sucres par l'utilisation de la galerie API 50CHL, a permis de confirmer le résultat obtenu par l'examen macro et microscopique, et physiologiques (type respiratoire et le test de catalase). De l'analyse de résultat obtenu sur le profil fermentaire par l'utilisation de la galerie API 50CHL ont comparant avec la base de données via le site web : <http://apiweb.biomerieux.com>, que les deux souches testées ont été identifiées comme ; *L. plantarum* pour la souche (**SL10**) et *L. acidophilus* pour la souche (**SL7**).



Figure 5 : Résultats de test biochimique de la galerie API 50 CHL. A : Souche *Lactobacillus plantarum*, B : Souche *Lactobacillus acidophilus*.

5. Résultat de l'effet de Stress

5.1 La tolérance au stress acide (pH 3,5 , 4,5 et 5)

Les bactéries lactiques ne survivent pas dans un milieu très acide, toutefois, ces microorganismes peuvent s'adapter à une concentration d'acidité intermédiaire. La capacité de survivre au l'acidité gastrique ou un milieu acide varie d'une souche à l'autre au sein du genre de *Lactobacillus*. Notre étude de la cinétique de croissance au différente concentration de pH (**3,5 , 4,5 et 5**) a été effectuée sur 10 souches de *Lactobacillus* sélectionnées afin d'étudier leur comportement dans le milieu MRS acidifié pendant 24 h à 37°C. Pour cela, la densité optique de chaque souche a été suivi et la biomasse à été enregistré chaque heure dans les mêmes conditions de croissance (temps et température) d'incubation. A ce titre, les cultures en phase exponentielle de croissance sont diluées à 0,02 et cultivées dans 10 mL de milieu MRS à pH (**3,5 , 4,5 et 5**) pendant 24h. La viabilité et la croissance a été estimée par mesure de la la masse cellulaire par mesure de la DO₆₀₀ à temps zéro (T0) et après chaque 60 min d'incubation à 37°C. Les résultats de la DO est mesuré pour chaque souche, et les résultats de la capacité de chaque souche testée dans différentes concentration de pH (**3,5 , 4,5 et 5**) pendant le temps d'incubation à 37°C sont mentionnées dans (**Figures 6**).

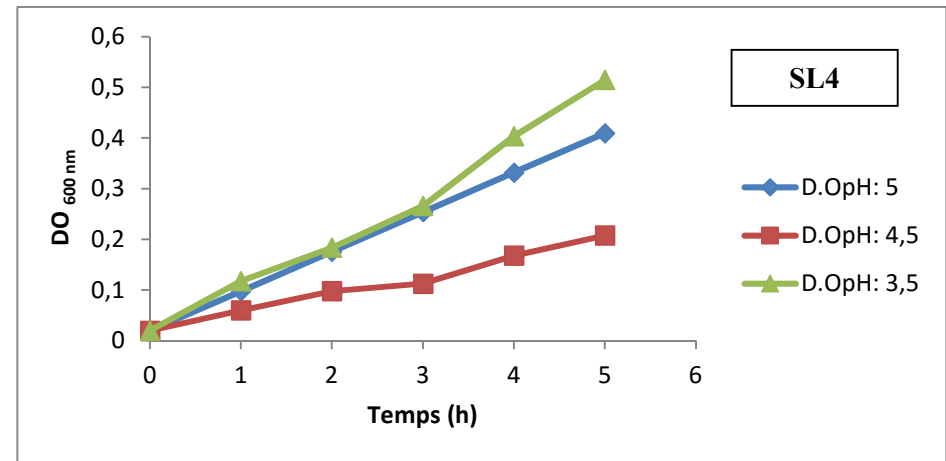
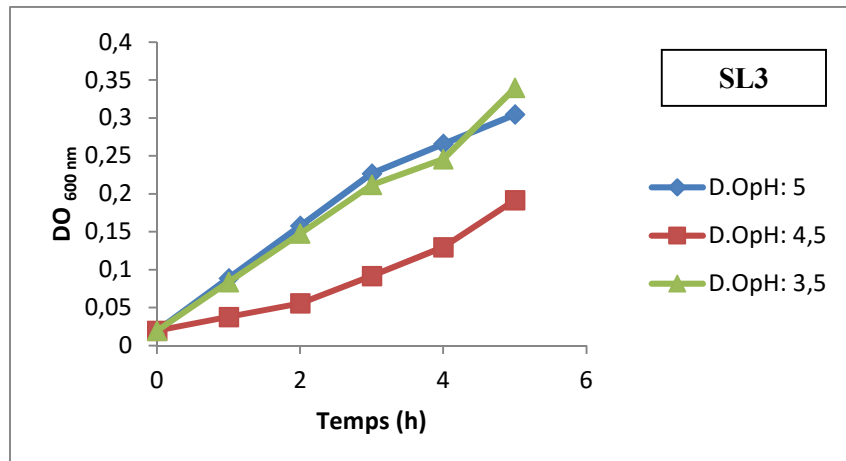
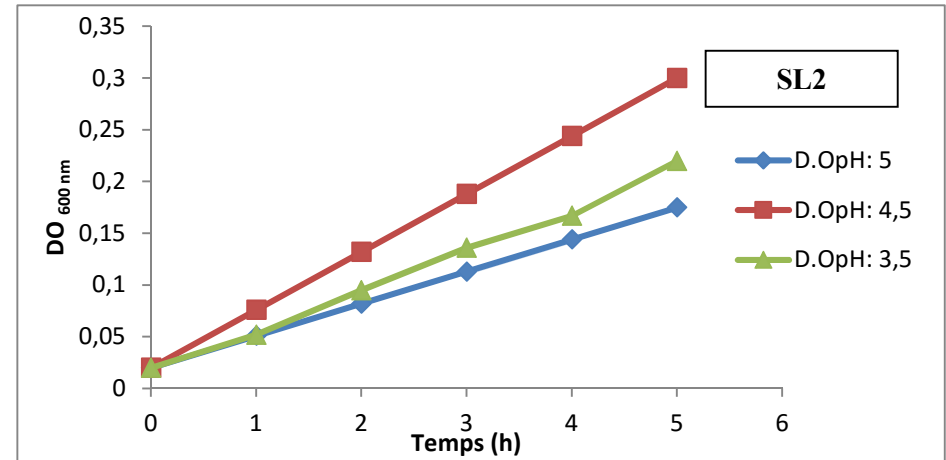
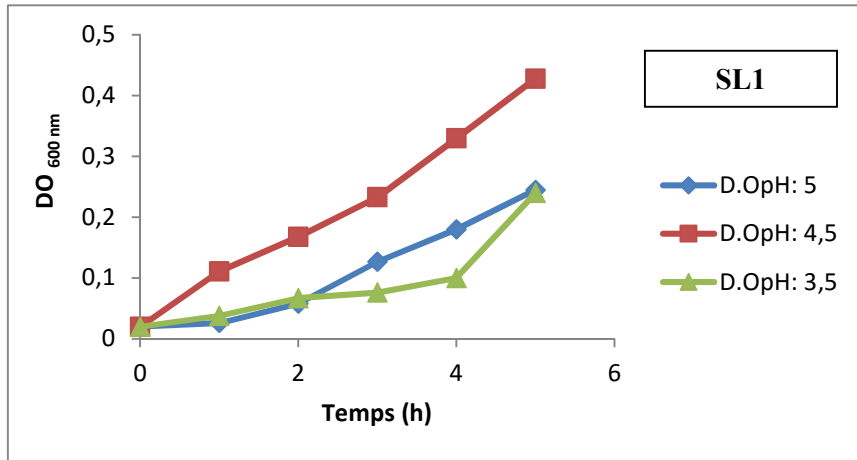
Aujourd'hui, plusieurs bactéries, l'exposition à un stress acide permet d'engendrer une réponse adaptative a cette environnement. Cette propriété est rencontré chez les BL en particulier pour les *Lactobacillus* sont capable de survivre à un choc acide létal. Nous avons comparé la capacité d'adaptation au stress acide de dix souches de *Lactobacillus* sp., les résultats montrent qu'il existe une grande variabilité entre les souches à la tolérance à un stress acide. Cependant, toutes nos souches testées sont capables de donner une réponse adaptative aux différentes concentration de pH qui augmente sensiblement leur survie en condition de stress. Dans ces conditions, et selon les résultats obtenus ,la souche SL4 est plus résistante à un choc acide (pH =5 et 4,5) par rapport aux autres souches testées, suivi par les souches SL1 , SL5 et la souche SL6.

Concernant le résultat obtenu à pH 4,5, montre que la souche SL1 adapte plus au stress acide par rapport aux autres souches testées. Toutefois, les souches SL1, SL5 et SL6 sont plus résistantes au pH 3,5 que les autres souches. Ces résultats montrent que la tolérance à l'acidité de *Lactobacillus* est variable selon les souches et les souches SL4, SL1, SL5, SL6 peuvent être sélectionnées comme starter ou culture secondaire, peuvent être utilisées dans la préparation des produits fermentés acides seuls ou mixtes.

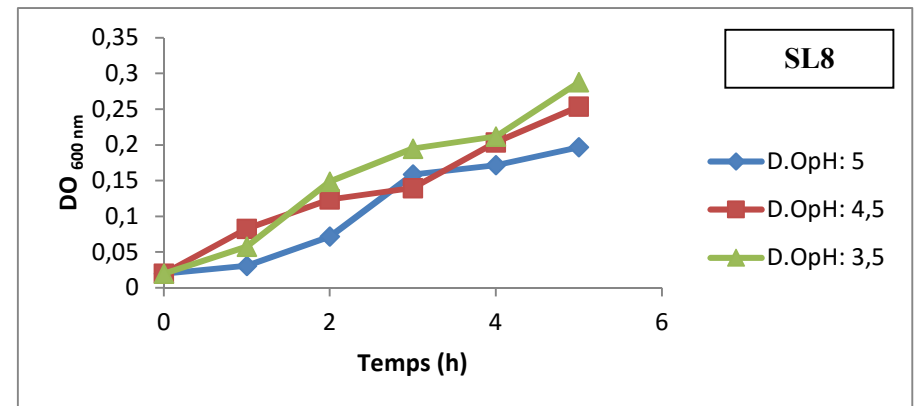
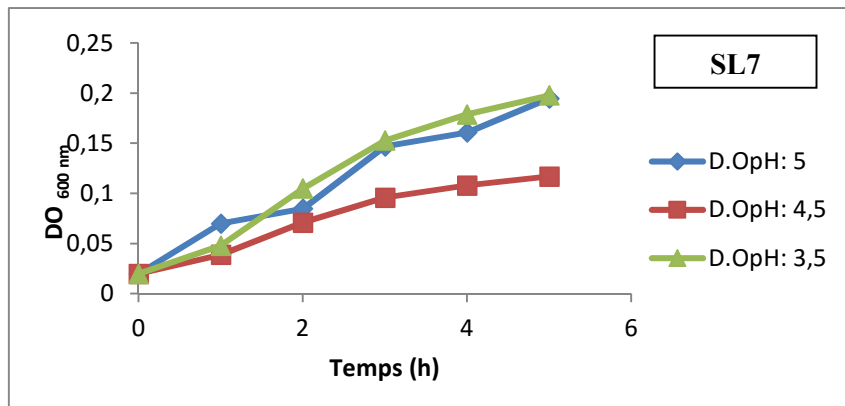
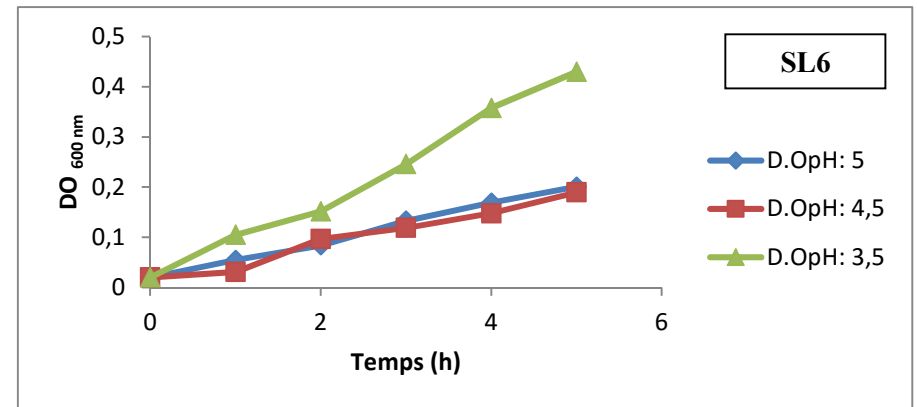
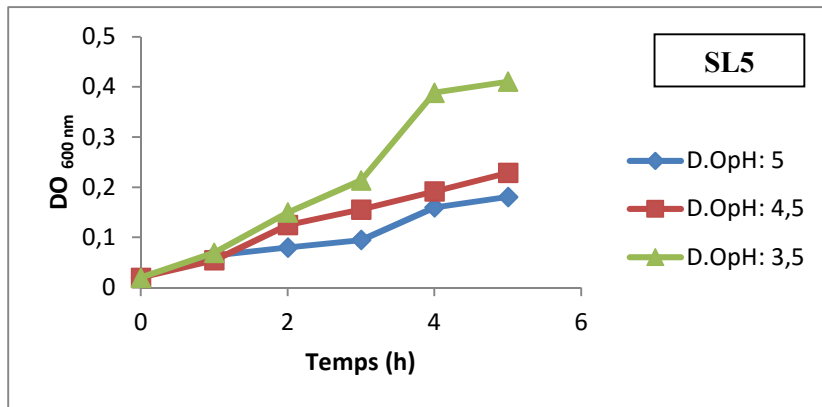
Résultats et discussions

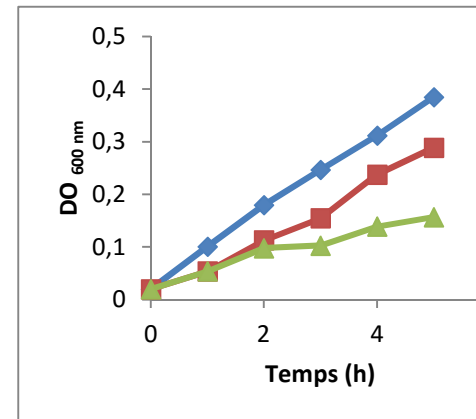
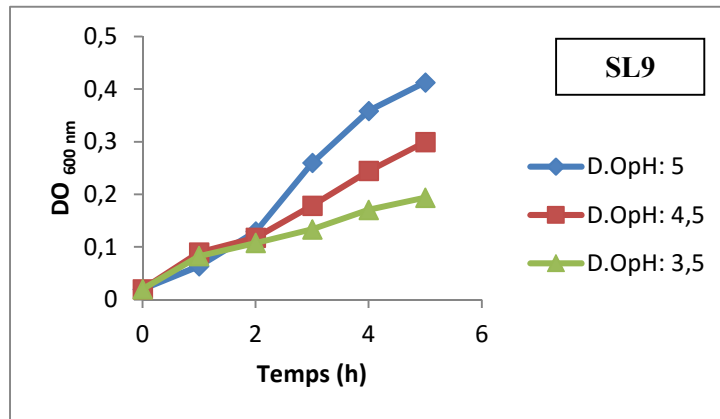
Les résultats obtenus durant cette étude est comparable avec les résultats obtenus par **Guiraud et al ; 2004**, sur la tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et **Conway et al., 1987** porte sur la survie des bactéries lactiques à pH acide.

Résultats et discussions



Résultats et discussions





Figures 6. Croissance des souches à différents pH après 24h d'incubation.

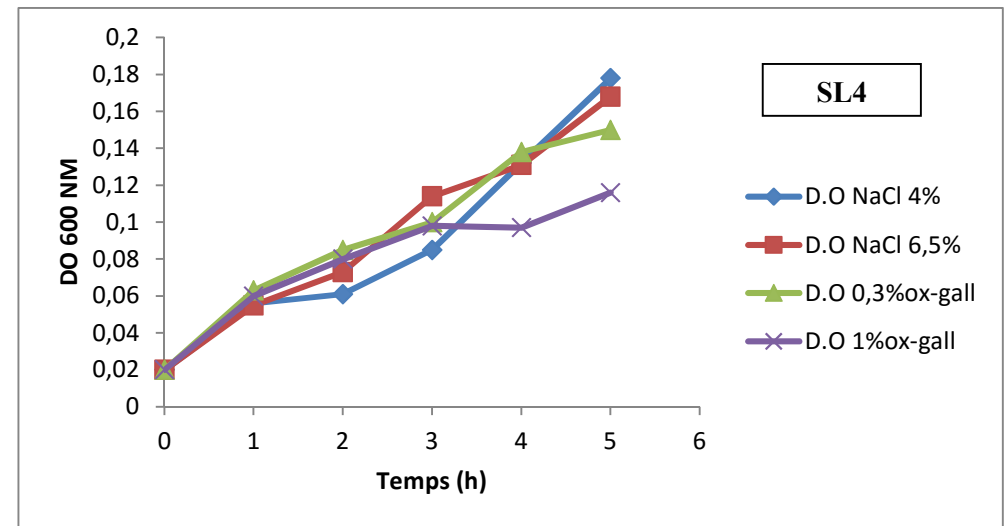
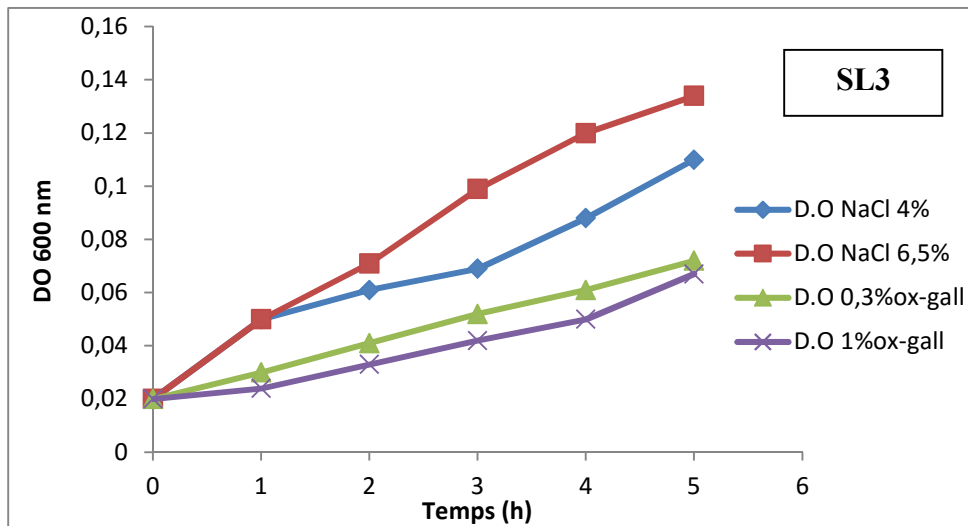
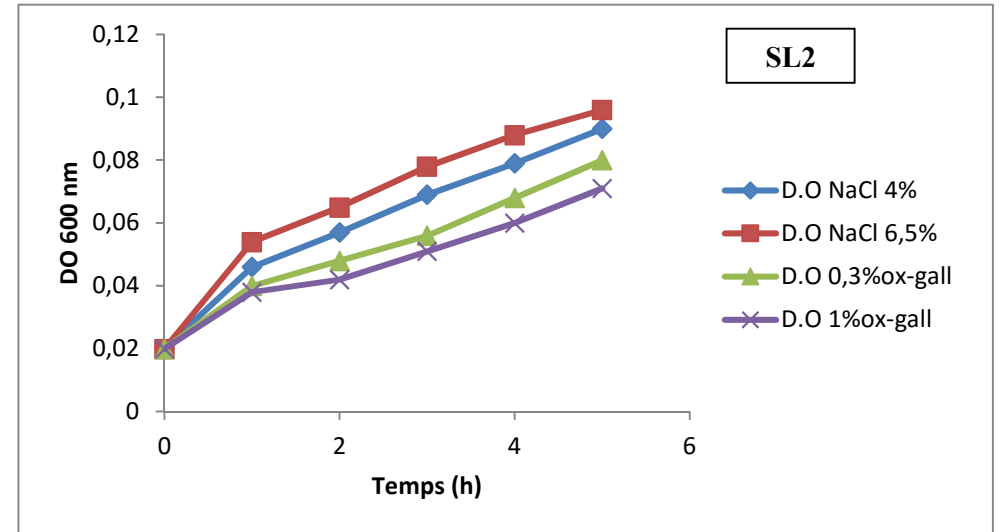
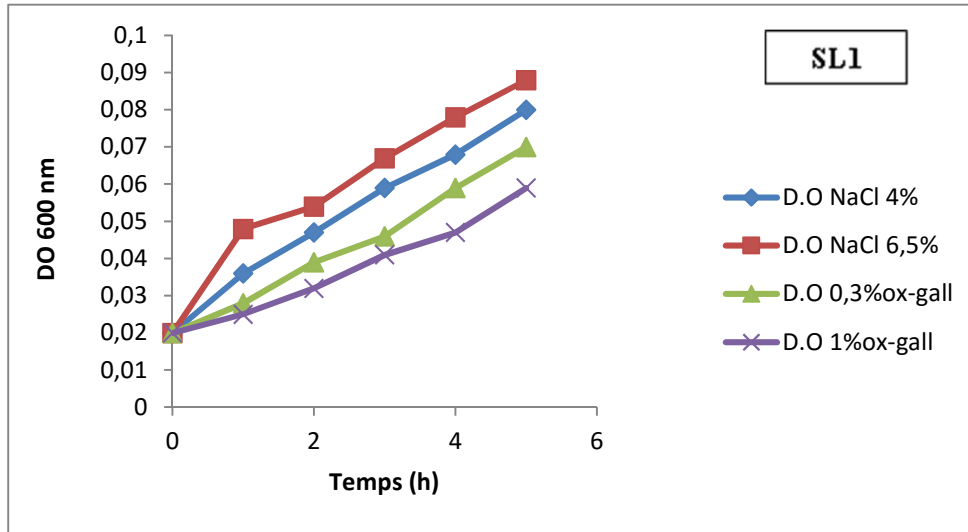
5.2 La tolérance au stress osmotique (NaCl 4%, 6,5%)

Les bactéries sont capables de vivre dans des milieux environnementaux variés car elles possèdent des systèmes de protection efficaces contre les différents stress qu'elles peuvent rencontrer. Les bactéries lactiques en particulier les lactobacilles vivent dans des milieux où l'osmolarité est élevée et varie considérablement, alors que la pression osmotique intracellulaire doit être constante.

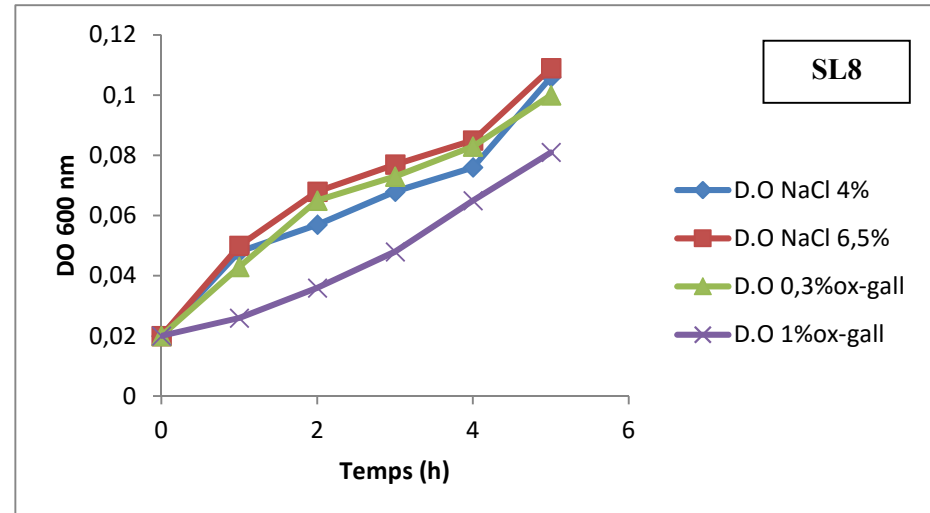
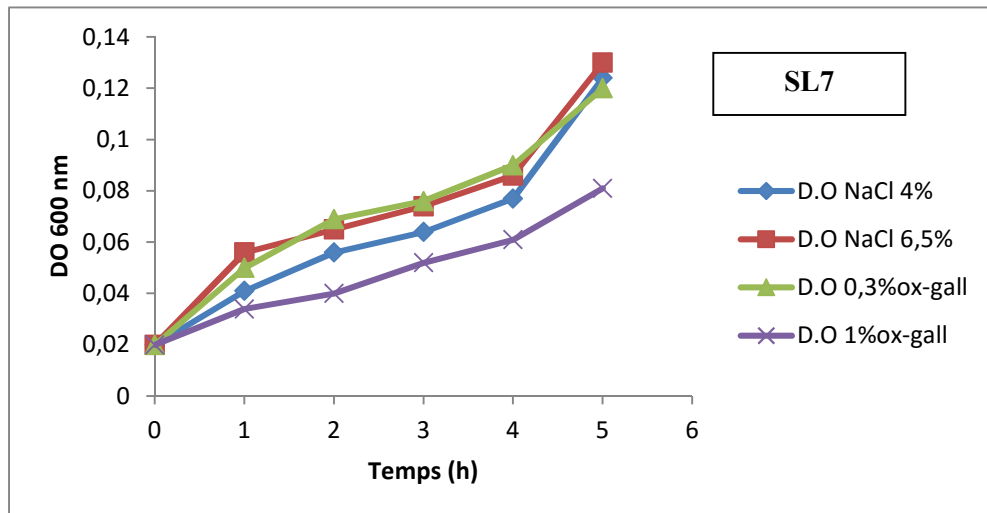
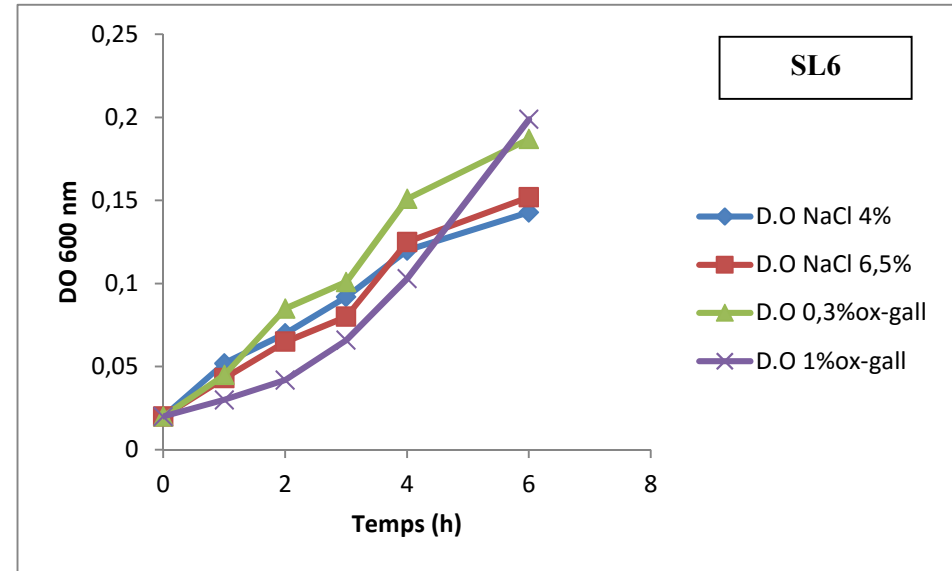
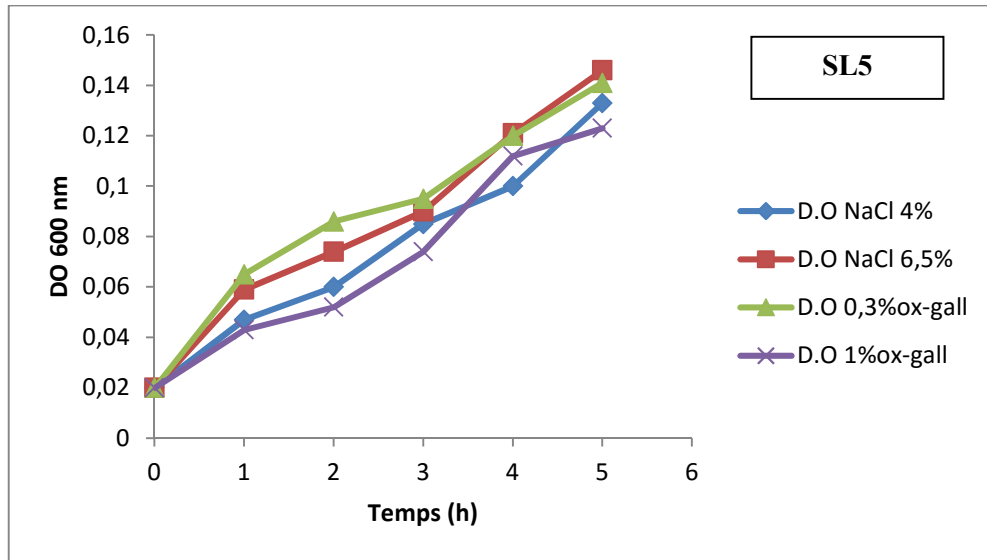
La croissance des souches de lactobacilles étudiées en présence de différentes concentrations de NaCl (4%, 6,5%) révèle une sensibilité différente des souches au stress osmotique.

Les résultats montrent que plus la concentration en NaCl augmente, plus le temps de latence est court. Cette phase correspond à la phase d'adaptation des cellules aux conditions de stress. Une augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu entraîne aussi une augmentation de la croissance bactérienne. Les valeurs de la $DO_{600\text{ nm}}$ croissent proportionnellement en fonction de l'augmentation de la concentration en NaCl, après 24 h d'incubation à 37°C. Ces résultats montrent que la tolérance au stress osmotique de *Lactobacillus* est variable selon les souches, et les souches SL4, SL1, SL5, 3, SL8 et SL10 peuvent être considérées comme souches plus adaptatives au stress osmotique à 4% et 6,5% par rapport aux autres souches testées (**Figure 7**). Lorsqu'une bactérie subit un stress osmotique, dû à une forte augmentation de la concentration en NaCl dans l'environnement, sa croissance est arrêtée, et des mécanismes de détresse se mettent en place pour éviter la mort cellulaire. Les études sur la réponse au stress osmotique des bactéries lactiques et *Lactobacillus* se sont développées depuis ces dernières années, du fait de l'intérêt économique à savoir dans leur utilisation dans l'industrie agro-alimentaire (Molenaar et al, 1993 ; Glaesker et al., 1996 et 1998 ; van der Heide et al., 2000, Roméo et al., 2001).

Résultats et discussions



Résultats et discussions



Résultats et discussions

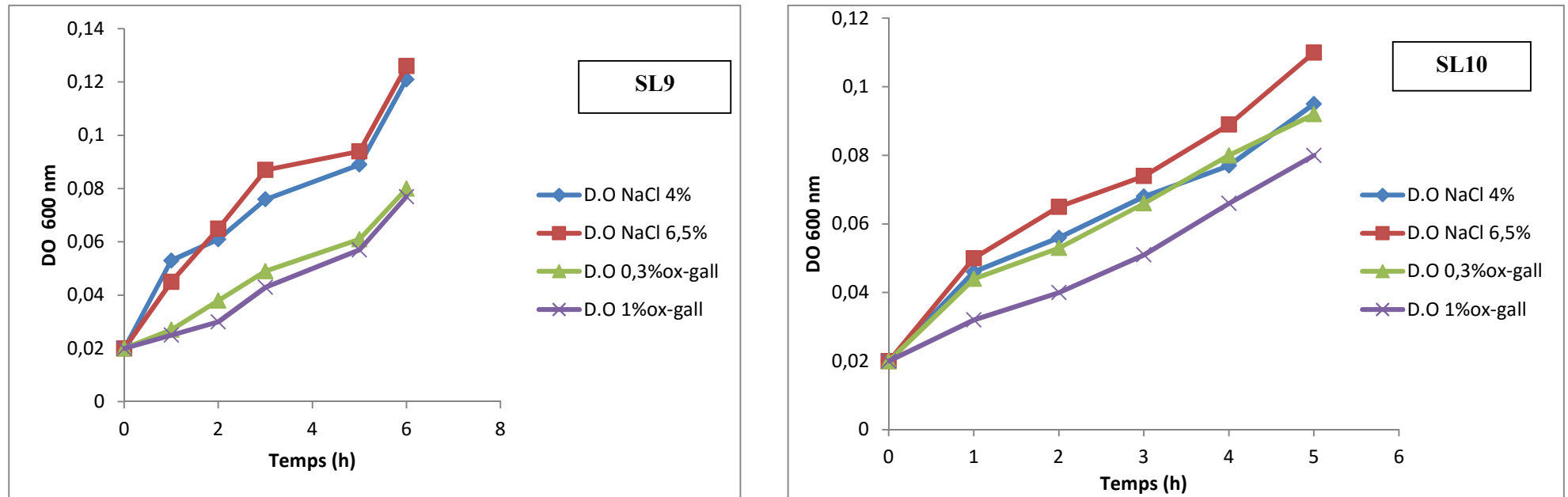


Figure 7 : Croissance des souches à différentes concentrations de NaCl et d'ox-gall.

5.3 Effet de la tolérance au stress biliaire

Les acides biliaires sont des molécules amphiphiles avec des propriétés détergentes qui s'associent à la fois dans des environnements aqueux et organiques pour former des micelles. Cette substance est une sécrétion digestive complexe qui joue un rôle déterminant comme substance antimicrobienne. Plusieurs micro-organismes de la flore intestinale y compris quelques bactéries d'acide lactique peuvent métaboliser les sels biliaires (**Begley et al., 2005**). Ceci a été pris en considération afin de contribuer à la protection contre de tel stress rencontré par les bactéries au cours de leur passage dans le tractus digestif.

Les résultats de la survie des souches de *Lactobacillus* testées après un stress biliaire à 0,3% et 1% bile (oxgall), après incubation à 37°C sont présentées dans **la figure 7**. Les dix souches de *Lactobacillus* testées présentent une résistance très variées à l'exposition aux sels biliaires (**Chung et al., 1999**).

D'après nos résultats, nous pouvons classer nos souches testées en trois classes selon le pouvoir de résistance au stress biliaire :

la 1^{ère} classe souches faiblement résistantes au stress biliaire (SL1 ,SL2 ,SL3, SL9 et SL10), regroupant les souches qui ont une densité optique entre 0,06 et 0,08.

La 2^{ème} classe : souches moyennement résistantes au stress biliaire (SL4, SL7 et SL8), leur biomasse selon la densité est comprise entre 0,1 et 0,116.

Enfin la troisième classe : souches fortement résistantes (SL5 et SL6), leur densité optique varie entre 0,141 et 0,199. La tolérance à la bile est un critère de sélection *in vitro* des bactéries probiotiques et pour évaluer leur aptitude à résister aux effets des acides biliaires qui conditionnent leur aptitude à survivre aux conditions du TGI et à coloniser l'environnement intestinal (**Begley et al., 2006 ; Alp and Aslim, 2010**).

Conclusion

CONCLUSION

Les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans le développement de certaines propriétés organoleptiques et nutritionnelles des produits fermentés grâce à leurs activités métaboliques qui servent au développement des composés aromatiques et qui contribuent également à la texture des aliments (Marroki, 2015, .Papadimitriou et al, 2016). Le présent étude, dix souches d'origine humaine sélectionnées vis à vis de certains propriétés physiologiques et biochimiques. L'évaluation de certaines propriétés technologiques et probiotiques comme l'effet de stress acide, osmotique et biliaire ont été testés sur l'ensemble des souches.

Les résultats obtenus par l'étude des tests physiologiques et l'identification biochimique montrent que les souches testées appartiennent aux genre de lactobacille, *Lactobacillus plantarum* pour la souche (SL10) et *Lactobacillus acidophilus* pour la souche (SL7).

Quant aux résultats de l'activité acidifiante , nous constatons qu'il ya une vaste hétérogénéité et de variation de pH entre les souches testées , la souche SL4 est plus résistante à un choc acide (pH =5 et 4,5) par rapport aux autres souches testées, suivi par les souches SL1 , SL5 et la souche SL6.

Compte tenu de ces résultats nous pouvons proposer de sélectionner des souches d'intérêt technologique ou performante ayant un pouvoir acidifiant très important, d'après nos résultats , les souches montrent une croissance optimale à pH 3,5 avec une DO 600nm de 0,515, ainsi, une bonne croissance est observée à pH 4,5 (DO_{600nm} =0,428).

Les résultats obtenus par l'étude du pouvoir osmotique ont révèle une grande diversité, nous permettant de dire que les valeurs de la DO_{600 nm} croissent proportionnellement en fonction de l'augmentation de la concentration en NaCl, et les souches SL4, SL1, SL5, 3, SL8 et SL10 peuvent être considérée comme souches plus adaptatives aux stress osmotique à 4% et 6,5% par apport aux autres souches testées, ainsi de sélectionner des souches susceptibles de présenter un intérêt technologique en industrie-agroalimentaire.

Quant aux résultats obtenus de la résistance de ces souches aux sels biliaire, les résultats obtenus nous permettons de classer les 10 souches lactiques testées en trois classes selon le pouvoir de résistance au stress biliaire ; souches faiblement résistantes (SL1 ,SL2 ,SL3, SL9 et SL10), regroupant les souches qui ont une densité optique entre 0,06 et 0,08 , souches moyennement résistantes (SL4, SL7 et SL8), leur biomasse selon la densité est comprise

CONCLUSION

entre 0,1 et 0,116 et souches moyennement résistantes (SL4, SL7 et SL8), leur DO est comprise entre 0,1 et 0,116..

Sur la base de résultat obtenu, deux souches présentes un intérêt probiotiques et technologiques et un susceptibles à présenter effet bénéfique sur la santé. Les deux souches sélectionnées sont SL5 et SL6 ont montré leurs résistance au stress acide, osmotique et/ou biliaire, et d'après les tests phénotypiques sont classer genre de *Lactobacillus* à lactobacilles. Finalement , ces souche sont résistante vis-à-vis la bile ce qui leur permet de survivre dans le tractus digestif et exercent de multiples actions bénéfique sur la santé de l'hôte comme l'hydrolyse des sels biliaires qui provoque une diminution du taux de cholestérol sérique .

Enfin , les souches de lactobacillus d'origine humain sélectionnées présentent de nombreuses propriétés métaboliques, dont les industriels et les nutritionnistes devrait tirer partie. La connaissance de nouvelles souches de bactéries lactiques notamment les *Lactobacillus* utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique offre une nouvelle voie dans le domaine de la recherche scientifique en microbiologie appliquée dans le but de produire des produits alimentaire et médicaux concurrentiels sur le plan national et international (**Marroki, 2011**).

Références bibliographiques

A

-**Alexander H, Grandvalet C, Guilloux-Bénatier M, Romiz-Barnavon F, Tourdot- Maréchale L.(2008).** Les bactéries lactiques en œnologie. Editions TEC & DOC Lavoisier. pp 62.

- **Antoine, J. M. (2011).** Les ferments lactiques et les laits fermentés: nature et effets. *Phytothérapie*, 9(2), 76-81.

- **Alexandre, H., Grandvalet, C., Guilloux-Bénatier, M., Remize-Barnavon, F., and Tourdot- Maréchal, R. (2008).** Chapter 3: Conditions de croissance et facteurs de stress. *Les bactéries lactiques en œnologie*. Lavoisier, Paris, 53-84.

-**Alp, G. and B. Aslim (2010).** "Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium spp.* isolated from infants feces and breast milk." *Anaerobe* 16(2): 101-105.

B

-**Booth IR. (2002).** Stress and the signal cell : intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J Food microbiol* .78(1-2) :19-30.

-**Bartels H.J., Johnson M.E. et Olson N.F. (1987).** *Milchwissenschaft*, 42, 83.-
Bencharif A. (2001). Stratégies des acteurs de la filières lait en Algérie : états des lieux et problématique. *Options Méditerranéennes Série B. Etudes et recherches* 32 : 25-45.

-**Benachour, A., Sauvageot, N., Pichebeau,V., Christophe, J.(2008).** Les réponses adaptatives : les réponses aux stress technologiques et environnementaux, In, **Drider, D., Prévost, H. (2009).** Bactéries lactiques : physiologie, métabolismes, génomique et application industrielles. *Economica*, Page (129-139). France.

-**Broadbent, J. R., Larsen, R. L., Deibel, V., and Steele, J. L. (2010).** Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *Journal of Bacteriology*, 192(9), 2445-2458.

-**Begley, M., C. G. M. Gahan and C. Hill (2005).** “The interaction between bacteria and bile.” *FEMS Microbiology Reviews* 29(4): 625-651.

-**Begley, M., C. Hill and C. G. M. Gahan (2006).** “Bile salt hydrolase activity in probiotics.” *Applied and Environmental Microbiology* 72(3): 1729-1738.

C

- Carr F.J., Chill.D., Maida .N. (2002). The lactic acid bacteria : A literature Survey.Critical Reviews in Microbiology. 28(4) : 281-370.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., and Collins, J. K. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 35(1), 1-27.
- Corrieu G,Luquet MF.(2008).Bactéries lactiques De la génétique aux ferments.Editions TEC & DOC.Lavoisier.pp : 429-431.
- Capozzi, V., Fiocco, D., Amodio, M. L., Gallone, A. and Spano, G. (2009). Bacterial stressors in minimally processed food. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(7), 3076-3105.
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2005). Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 3060-3067.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. & Collins, J.K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. *J.Appl. Microbiol.*, 84: 759-768.
- Chung, H. S., Y. B. Kim, S. L. Chun and G. E. Ji (1999). "Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria." *International Journal of Food Microbiology* 47: 25-32.
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, 53(1), 121-147.

D

- Dressaire C. (2009). Comprendre l'adaptation des *Lactococcus lactis* par une approche de biologie intégrative à l'échelle du génome. Thèse de doctorat. Institut national des sciences appliquées de Toulouse.
- Dortu, C., et Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires/Bacteriocins from lactic acid bacteria: interest for food products biopreservation. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 143. -154.

Références bibliographiques

- Deroissart HB.(1986).**Les bactéries lactiques'' in lait et produits laitiers par Luquet FM Edition Technique et documentation Lavoisier paris Tome. 3P 33.
- De Roissart H. et Luquet F.M. (1994).** Bactéries Lactiques II. Edition Lorica. pp. 39-45.
- Drider Dj,Prévoste H.(2009).**Bactéries Lactiques physiologie,Métabolisme,Génomique et applications industrielles.Ed.Economica.pp.127-129.
- De Angelis, M. and Gobbetti, M. (2004).** Environmental stress responses in Lactobacillus: a review. Proteomics, 4(1), 106-122.
- Dellaglio F, Felis, GE (2005).** Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. In :« Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects». Caister Academic Press éd.Norfolk, UK. pp. 25-49.
- De Roissart H et Luquet - Damini, M. R., Minowa, E., Alcantâra, M. R. et Oliveira, M. N., (2007).** Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. J. Texture. St. 39, 40-55.
- Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S.D. & Renault, P. (1999).** Survival, Physiology, and Lysis of Lactococcus lactis in the Digestive Tract. Appl. Environ. Microbiol., 65: 4881-4886.

F

- Fernandez C.F., Shahani M. K., Amer M.(1987).** Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacilli fermented dairy products. FEMS microbiology reviews.46 :343-356.
- Fernandez, M. F., Boris, S. et Barbes, C., (2002).** Probiotic properties of human lactobacilli strains to be in the gastrointestinal tract. J. Appl. Microbiol. 94, 449-455.
- Fox, Patrik F., Mcsweeney, Paul L.H., Cogantimothy M. and Guinee, timothy P. (2004).** Cheese : chemistry, physics and microbiology third edition vol 2 Major cheese groups. Third edition. Elsevier Ltd.

G

- Guiraud, J-P., Rosec, J-P. pratique des normes en microbiologie alimentaire. (2004), AFNOR, page (237-243).**
- Grosman, B., Shaik, OS, Helwig, BG, Leon, LR et Doyle, FJ (2011).** Une approche des systèmes physiologiques pour la modélisation et la réinitialisation de la thermorégulation de la souris sous stress thermique. Journal de physiologie appliquée, 111 (3), 938-945.
- Glaasker E., Koning W.N. and Poolman B. (1996a).**Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmostasis and hyper and hypo osmotic shock. J Biol Chem.271(17):10060-5.
- Glaasker E., Koning W.N. and Poolman B. (1996b).**Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. J Bacteriol. 178(3):575-82.
- Glaasker E., Heuberger E. H., Konings W. N. and Poolman B. (1998).** Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum* . J Bacteriol. 180(21): 5540-6.
- Guiraud, J-P., Rosec, J-P. pratique des normes en microbiologie alimentaire. (2004), AFNOR, page (237-243).**

H

- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., and Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American Journal of Clinical Nutrition, 73(2), 365s-373s.
- Hosseini Nezhad, M., Hussain, M. A. and Britz, M. L. (2015).** Stress responses in probiotic *Lactobacillus casei*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55(6), 740-749.

K

- Klein, G. ; pack, A. ; Bonapartes, C. ; Reuter, G. (1998) .** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid . Int. J. Food Microbiol., 41 : 103-125.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., and Reuter, G. (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 41(2), 103-125.
- Krämer, R. (2010).** Bacterial stimulus perception and signal transduction: response to osmotic stress. The Chemical Record, 10(4), 217-229.

Références bibliographiques

-**Kempf, B., and Bremer, E. (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology*, 170(5), 319-330.

- **Klaenhammer, T. R., (1995).** Genetic of intestinal lactobacilli. *Int. Dairy. J.* 5, 1019-1058.

L

-**Lorca, G. L. and Font de Valdez, G. F. (2000).** A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. *Current Microbiology*, 42(1), 21-25.

-**Lyu, C., Hu, S., Huang, J., Luo, M., Lu, T., Mei, L., and Yao, S. (2016).** Contribution of the activated catalase to oxidative stress resistance and γ -aminobutyric acid production in *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 302-310.

-**Licitra G.,(2010).** World-wide traditional cheeses : Banned for business. *DairySci. Technol* 90-375

M

-**Marroki , A . (2011).** caractérisation phénotypique de souches de lactobacillus isolées du lait de chèvre et étude de leurs propriétés technologique , Département de biologie ,université d'oran .

-**Mechai A, (2009).** Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques. Thèse de doctorat, Université de Annaba.

-**McKay LL, Baldwin KA.(1990).** Applications for biotechnology : present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 3-14.

-**Molenaar D., Hagting A., Alkema H., Driessen A.J. and Konings W.N. (1993).** Characteristics and osmoregulatory roles of uptake systems for proline and glycine betaine in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 175 : 5438-5444.

O

-**Özer B, Kirmaci HA, Şenel E, Atmar M ,et Hayaloglu A. (2009).**Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum*BB-12 and *Lactobacillus acidophilus*LA-5 in white brined cheese by microencapsulation . *International Dairy Journal.* 19 :22-29.

Références bibliographiques

-Ozgun D. et Vural HC. (2011). Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *J.M.G.G.* 3(3): 46-49.

-Ozgun D, Vural HC (2011). Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *J.M.G.G.3* (3): 46-49.1 ; 6-1.

P

- Papadimitriou, K., Alegría, Á. Bron, P. A., De Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos J.A., Linares, D.M., Ross, P., Stanton, C., Turróni, F., Sinderen, D.V., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., Kok, J. and Turróni, F. (2016) and Marroki, A . (2015). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837-890.

-Perry JJ, Staley JT, Lory S (2004). Bactéries Gram-Positives: Firmicutes et Actinobacteria. In: « Microbiologie ». Dunod éd., Paris. France. pp. 471-50.

-Potss M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev.* 58(4):755-805.
kempfB. Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Micro-biol.* (1998).170: 319–330.

-Piuri, M., Sanchez□Rivas, C., and Ruzal, S. M. (2003). Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: role of peptides and proteolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2), 372-379.

-Papadimitriou, K., Alegría, Á. Bron, P. A., De Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos J.A., Linares, D.M., Ross, P., Stanton, C., Turróni, F., Sinderen, D.V., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., Kok, J. and Turróni, F. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837-890.

R

-Rigaux P.(2008).Evaluation des propriétés immunomodulatrices de la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 dans le cadre de l'allergie aux acariens.Thèse de doctorat d'état. Université libre de Bruxelles.

-Rius N., Sole M. and Lore J.G. (2008). Notion stress Acid-base response of bacterial suspensions. *Journal of industrial Microbiology et Biotechnology.* 35(2) :1093-1101.

-Roissart H. et Luquet F.M. (1994). Méthodes d'Identification des Bactéries Lactiques In : « Bactéries Lactiques ; Aspects fondamentaux et technologiques ». Vol 2. Coquand édition, Grenoble. France. p. 141-167.

Références bibliographiques

-**Romeo, Y., Bouvier, J., and Gutierrez, C. (2001).** La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum* (mini-revue). Le Lait, 81(1-2), 49-55.

- **Rolfe, R.D. (2000).** The rôle of probiotic cultures in the control of gastro-intestinal health. J.Nutr.,130: 396S-402S.

S

-**Schmidt J.L., Tourneur C. et Lenoir J. (1994).** Fonctions et choix des bactéries lactiques et technologies laitières. in : Bactéries lactiques II. De Roissart H. et Luquet F.M., Ch. IV-2, P. 39-45. Edition Lorica.

- **Serrazanetti, D. I., Gottardi, D., Montanari, C. and Gianotti, A. (2013).** Dynamic stresses of lactic acid bacteria associated to fermentation processes. In Lactic Acid Bacteria-R and D for Food, Health and Livestock Purposes. InTech.

T

-**Terzaghi B.E. and Sandine W.E.(1975).** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Applied Microbiology. 29:807-813.

-**Tailliez, P. (2004).** Les lactobacilles: propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. Antibiotiques, 6(1), 35-41.

V

- **Van de Guchte, M., Serrero, P., Chervaux, T., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., and Maguin, E.(2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, 82(1-4), 187-216.

- **Viljanen, M., Savilahti, E. et Haahtela, T., (2005)** Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. Allerg. 60, 494– 500.

-**Van Der Heide T. and B. Poolman (2000).** Glycine bêtaïne transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity .J Bacteriol . 182(1): 203-6.

Y

-**Young Ng. S, Koon S.S, Padam B.S and Chye F.Y. (2015).** Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Malaysian fermented Bambang (Mangifera pajang), *CyTA-Journal of Food*, 13:4,563-572.

Annexes

Annexe 01

Composition des milieux de culture (pour 1l d'eau distillée)

1. MRS (Man Rogosa-Sharpe) bouillon et gélose

Il est composé de :

- 10 g de peptone
- 5 g d'extrait de levure
- 10 g d'extrait de viande
- 20g deglucose
- 5 g d'acétate de sodium,
- 1 g de citrate d'ammonium
- 0,2 g de sulfate de magnésium
- 0.05 gde sulfate de manganèse
- 2 g de phosphate di-potassique
- 1 ml de tween 80
- 1000 ml d'eau distillé
- 15 g d'agar.

Le pH final du milieu est de 6.2.

Autoclavage : 120°C pendant 20mn

2. M17

Il est composé de :

Milieu de culture M17

- Peptone tryptique de caséine 2.50g
- Peptone pepsine de viande 2.50g

- Peptone papainique de soja 5.00g
- Extrait de levure 2.50g
- Extrait de viande 5.00g
- Glycérophosphate de sodium 19.00g
- Sulfate de magnésium 0.25g
- Acide ascorbique 0.50g
- Eau distillée qsp 950ml

pH=7.2

Autoclavage : 120°C pendant 20mn

Annexe 02

Tableaux 6. Résultats de la croissance des différentes souches en présence de NaCl et ox-gall par la mesure de la DO

	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.O NaCl 4%	0,02	0,036	0,047	0,059	0,068	0,08
D.O NaCl 6,5%	0,02	0,048	0,054	0,067	0,078	0,088
D.O 0,3%ox-gall	0,02	0,028	0,039	0,046	0,059	0,07
D.O 1%ox-gall	0,02	0,025	0,032	0,041	0,047	0,059

SL1

	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.O NaCl 4%	0,02	0,046	0,057	0,069	0,079	0,09
D.O NaCl 6,5%	0,02	0,054	0,065	0,078	0,088	0,096
D.O 0,3%ox-gall	0,02	0,04	0,048	0,056	0,068	0,08
D.O 1%ox-gall	0,02	0,038	0,042	0,051	0,06	0,071

SL2

ANNEXES

	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.O NaCl 4%	0,02	0,05	0,061	0,069	0,088	0,11
D.O NaCl 6,5%	0,02	0,05	0,071	0,099	0,12	0,134
D.O 0,3%ox-gall	0,02	0,03	0,041	0,052	0,061	0,072
D.O 1%ox-gall	0,02	0,024	0,033	0,042	0,05	0,067

SL3

	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.O NaCl 4%	0,02	0,056	0,061	0,085	0,132	0,178
D.O NaCl 6,5%	0,02	0,055	0,073	0,114	0,131	0,168
D.O 0,3%ox-gall	0,02	0,063	0,085	0,1	0,138	0,15
D.O 1%ox-gall	0,02	0,06	0,08	0,098	0,097	0,116

SL4

	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	6
D.O NaCl 4%	0,02	0,052	0,07	0,092	0,12	0,143
D.O NaCl 6,5%	0,02	0,043	0,065	0,08	0,125	0,152
D.O 0,3%ox-gall	0,02	0,045	0,085	0,101	0,151	0,187
D.O 1%ox-gall	0,02	0,03	0,042	0,066	0,103	0,199

SL5

ANNEXES

	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.O NaCl 4%	0,02	0,047	0,06	0,085	0,1	0,133
D.O NaCl 6,5%	0,02	0,059	0,074	0,09	0,121	0,146
D.O 0,3%ox-gall	0,02	0,065	0,086	0,095	0,12	0,141
D.O 1%ox-gall	0,02	0,043	0,052	0,074	0,112	0,123

SL6

	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.O NaCl 4%	0,02	0,041	0,056	0,064	0,077	0,124
D.O NaCl 6,5%	0,02	0,056	0,065	0,074	0,086	0,13
D.O 0,3%ox-gall	0,02	0,05	0,069	0,076	0,09	0,12
D.O 1%ox-gall	0,02	0,034	0,04	0,052	0,061	0,081

SL7

	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.O NaCl 4%	0,02	0,048	0,057	0,068	0,076	0,106
D.O NaCl 6,5%	0,02	0,05	0,068	0,077	0,085	0,109
D.O 0,3%ox-gall	0,02	0,043	0,065	0,073	0,083	0,1
D.O 1%ox-gall	0,02	0,026	0,036	0,048	0,065	0,081

SL8

ANNEXES

	Temps(h)					
	0	1	2	3	5	6
D.O NaCl 4%	0,02	0,053	0,061	0,076	0,089	0,121
D.O NaCl 6,5%	0,02	0,045	0,065	0,087	0,094	0,126
D.O 0,3%ox-gall	0,02	0,027	0,038	0,049	0,061	0,08
D.O 1%ox-gall	0,02	0,025	0,03	0,043	0,057	0,077

SL9

	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.O NaCl 4%	0,02	0,046	0,056	0,068	0,077	0,095
D.O NaCl 6,5%	0,02	0,05	0,065	0,074	0,089	0,11
D.O 0,3%ox-gall	0,02	0,044	0,053	0,066	0,08	0,092
D.O 1%ox-gall	0,02	0,032	0,04	0,051	0,066	0,08

SL10

ANNEXES

Annexe 03

Tableaux7. Résultats de la croissance des souches à différentes pH par la mesure de la DO

T(h) D.OpH	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.OpH: 5	0,02	0,026	0,058	0,127	0,18	0,245
D.OpH: 4,5	0,02	0,111	0,168	0,233	0,33	0,428
D.OpH: 3,5	0,02	0,038	0,067	0,076	0,1	0,24

SL1

T(h) D.OpH	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.OpH: 5	0,02	0,051	0,082	0,113	0,144	0,175
D.OpH: 4,5	0,02	0,076	0,132	0,188	0,244	0,3
D.OpH: 3,5	0,02	0,052	0,095	0,136	0,167	0,22

SL2

T(h) D.OpH	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.OpH: 5	0,02	0,089	0,158	0,227	0,266	0,305
D.OpH: 4,5	0,02	0,038	0,056	0,092	0,13	0,192
D.OpH: 3,5	0,02	0,084	0,148	0,212	0,246	0,34

SL3

ANNEXES

T(h) D.OpH	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.OpH: 5	0,02	0,098	0,176	0,254	0,332	0,41
D.OpH: 4,5	0,02	0,06	0,098	0,113	0,168	0,208
D.OpH: 3,5	0,02	0,118	0,184	0,266	0,404	0,515

SL4

T(h) D.OpH	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.OpH: 5	0,02	0,055	0,084	0,133	0,169	0,201
D.OpH: 4,5	0,02	0,031	0,097	0,119	0,148	0,19
D.OpH: 3,5	0,02	0,105	0,152	0,246	0,358	0,43

SL5

T(h) D.OpH	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.OpH: 5	0,02	0,064	0,08	0,095	0,16	0,181
D.OpH: 4,5	0,02	0,055	0,125	0,156	0,192	0,229
D.OpH: 3,5	0,02	0,07	0,15	0,214	0,389	0,411

SL6

T(h) D.OpH	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.OpH: 5	0,02	0,031	0,072	0,159	0,172	0,197
D.OpH: 4,5	0,02	0,083	0,124	0,14	0,204	0,254
D.OpH: 3,5	0,02	0,058	0,149	0,195	0,212	0,288

SL7

ANNEXES

T(h) D.OpH	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.OpH: 5	0,02	0,064	0,13	0,26	0,359	0,413
D.OpH: 4,5	0,02	0,09	0,118	0,179	0,245	0,3
D.OpH: 3,5	0,02	0,083	0,108	0,134	0,171	0,194

SL8

T(h) D.OpH	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.OpH: 5	0,02	0,101	0,18	0,247	0,312	0,385
D.OpH: 4,5	0,02	0,054	0,113	0,155	0,238	0,289
D.OpH: 3,5	0,02	0,054	0,098	0,103	0,139	0,157

SL9

T(h) D.OpH	Temps(h)					
	0	1	2	3	4	5
D.OpH: 5	0,02	0,07	0,085	0,147	0,161	0,195
D.OpH: 4,5	0,02	0,039	0,071	0,096	0,108	0,117
D.OpH: 3,5	0,02	0,048	0,105	0,153	0,179	0,198

SL10

