



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université MUSTAPHA Stambouli Mascara



جامعة مصطفى اسطمبولي معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire

## THESE de DOCTORAT

Spécialité : Microbiologie

*Intitulée*

**IMMOBILISATION DES SOUCHES PROBIOTIQUES POUR  
L'OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'EXPOLYSACCHARIDES  
D'INTERET TECHNOLOGIQUE**

*Présentée par :* <sup>Mme</sup> **KHADEM HAFIDHA**

**Devant le jury :**

<b>Président</b>	<b>Pr MEDDAH Boumediene</b>	Université de Mascara
<b>Examinatrice</b>	<b>Pr BENMECHERNE Zineb</b>	Université d'Oran 1
<b>Examineur</b>	<b>Pr SASSI Mohamed</b>	Université de Tiaret
<b>Examineur</b>	<b>Pr MAROUKI Ahmed</b>	Université de Sidi Bel Abbes
<b>Examineur</b>	<b>Dr BOUHADI Djilali</b>	Université de Mascara
<b>Directrice de thèse</b>	<b>Pr TIR TOUIL Aicha</b>	Université de Mascara

**Année Universitaire : 2020-2021**

# *Remerciements*

الحمد والشكر لله

## *Je remercie Allah le tout puissant*

Cette thèse est l'aboutissement de longues années d'études, acharnées de hauts et de bas. Ces années de recherche ont connu l'appui et l'aide de nombreuses personnes, en effet, le résultat d'un tel projet n'est plus le travail d'une seule personne, mais de toute une équipe, qui sans leur présence, l'aboutissement été impossible.

A ma directrice de thèse, <sup>Mme</sup> **TIR TOUIL MEDDAH. A**, je vous adresse ma reconnaissance pour vos conseils judicieux, votre disponibilité exceptionnelle, votre patience. Je vous exprime mes profonds sentiments pour m'avoir guidé et soutenu. Merci pour votre générosité et pour tout l'intérêt manifesté à l'égard de ce travail. Merci de m'avoir laissé la liberté d'action tout au long de ce projet. Merci pour toutes les discussions, les conseils très enrichissants et pertinents, et les heures consacrées à corriger ce manuscrit. J'estime votre spécial soutien lors des périodes difficiles.

J'adresse mes remerciements aussi à **Mr. MEDDAH.B**, professeur à l'université de Mascara, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance. Merci pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Je remercie grandement <sup>Mme</sup> **BENMECHERNE. Z**, professeur à l'université d'Oran d'avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

A **Mr. SASSI. M**, professeur à l'université de Tiaret. Votre présence m'a tellement honoré. Merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Veuillez croire à ma grande admiration et mon profond respect.

A **Mr . BOUHADI . D**, maitre de conférences à l'université de Mascara. Vous m'avez fait l'honneur d'accepté de faire partie de ce jury de thèse. Merci pour le temps consacré.

A **Mr .MAROUKI. A**, professeur à l'université de Sidi Belabbes. Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'évaluer cette thèse, veuillez trouver ici mes profonds respects.

**Mes** remerciements seront incomplets, si je n'exprime pas avec gratitude mes reconnaissances à ma famille, et à toutes personnes qui m'a soutenu, qui m'a fait confiance, et qui a participé de loin ou de prêt pour que ce rêve soit réalité.

## *Dédicaces*

A la mémoire de mon père, *Qu'Allah l'accueille dans son vaste paradis*

**A** ma mère, lumière de ma vie, aucune dédicace ne peut exprimer mon amour et mon respect, j'implore dieu le tout puissant qu'il vous accorde bonne santé et longue vie,

**A** mon cher époux, à ma fille, princesse de ma vie,

**A** mes chères sœurs, et chers frères bien aimés,

**A** ma chère Badra, sans ton aide, ta générosité infinie, tes précieux encouragements ce travail n'aurait vu le jour. Je te souhaite tout le bonheur du monde

**A** mes chères amies, Fatima, Fadhila et Sara

**Et** à tous mes proches

## Résumé

La sonication est une des approches modernes et innovantes de plus en plus utilisées dans l'industrie alimentaire, pour maîtriser les processus de fermentation et éradiquer l'altération. Cette approche a récemment donné lieu à de nouvelles applications industrielles telles que l'amélioration de la productivité microbienne. L'objectif de la présente étude était d'appliquer une alternative aux techniques classiques d'immobilisation, pouvant stimuler les capacités métaboliques et physiologiques, et ainsi promouvoir certains traits désirés des bactéries lactiques à usage potentiel, telle *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447 et *E. durans*.

Les souches sélectionnées ont prouvé leur capacité à résister *in vitro* à des conditions simulées du tractus gastro-intestinal (GI) humain (faible pH, sels biliaires, pepsine) et ont montré une hydrophobicité de surface importante (dépassant les 70%), outre leur capacité antagoniste vis-à-vis *E. coli* et *S. aureus*, témoignant de leur aptitude à survivre à travers le tractus gastro-intestinal.

Les deux souches bactériennes immobilisées ont montré une réelle résistance au traitement, mêmes à des durées prolongées, ainsi le conditionnement a amélioré la croissance, l'adhésion, la perméabilité des membranes, la formation de biofilms et la capacité de production d'exopolysaccharides. Un traitement optimal entre 30 et 15 minutes pour *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447 et *E. durans* respectivement, a permis aux deux souches d'obtenir un excellent rendement d'exopolysaccharides désirables (1745 et 1700 mg d'équivalent glucose/L). Le conditionnement par ultrasons semble être une nouvelle approche envisageable pour renforcer certaines qualités biotechnologiques des microorganismes industriels.

**Mots clés :** *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447, *E. durans*, bactéries lactiques, immobilisation, ultrasons, probiotique, adhésion bactérienne, biofilm, exopolysaccharides

---

## Abstract

Sonication is one of the modern and innovative approaches increasingly used in the food industry to control fermentation processes and eradicate spoilage. This approach has recently given place to novel industrial applications such as the improvement of microbial productivity. The objective of the present study was to investigate an alternative to classical immobilization techniques, which can stimulate metabolic and physiological abilities, and thus promote certain desired traits of lactic acid bacteria of potential use, such as *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447 and *E. durans*.

The selected strains proved their ability to resist *in vitro* to simulated conditions of the human gastrointestinal (GI) tract (low pH, bile salts, pepsin) and showed significant surface hydrophobicity (exceeding 70%), in addition to their antagonistic capacity towards *E. coli* and *S. aureus*, demonstrating their ability to survive through the gastrointestinal tract.

The two immobilized bacterial strains showed real resistance to treatment, even over prolonged times, thus the conditioning improved growth, adhesion, membrane permeability, biofilm formation and exopolysaccharide production capacity. Optimal treatment, 30 and 15 minutes for *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447 and *E. durans* respectively, resulted in both strains achieving an excellent yield of desirable exopolysaccharides (1745 and 1700 mg of glucose equivalent /L). Ultrasonic conditioning seems to be a possible approach to enhance certain biotechnological qualities of industrial microorganism.

**Key words:** *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447, *E. durans*, lactic acid bacteria, immobilization, ultrasound, probiotic, bacterial adhesion, biofilm, exopolysaccharides

## ملخص

تعتبر تقنية الموجات فوق صوتية "Sonication" من بين التقنيات الحديثة والمبتكرة المستخدمة بشكل متزايد في صناعة الأغذية، من أجل التحكم في عمليات التخمير والقضاء على التلف. تستعمل هذه الطريقة مؤخرا في تطبيقات صناعية جديدة مثل تحسين الإنتاجية الميكروبية. كان الهدف من هذه الدراسة تطبيق بديل لتقنيات التثبيت التقليدية، والتي يمكن أن تحفز القدرات الأيضية والفيزيولوجية، وبالتالي تحسين بعض الصفات المرغوبة

لدى بكتيريا حمض اللبن ذات الاستعمال الواسع، مثل *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447 و *E. durans*

أثبتت السلالات البكتيرية المختارة قدرتها في المختبر على تحمل بعض الظروف المشابهة للجهاز الهضمي عند الإنسان (انخفاض درجة الحموضة والأملاح الصفراوية والبيبسين). كما أظهرت النتائج نوعية سطح الغشاء المقاومة للماء، والتي تجاوزت 70٪، بالإضافة إلى قدرة هذه السلالات على تثبيط البكتيريا الضارة مثل *S. aureus* و *E. coli*، مما يدل على إمكانية بقاء هذه البكتيريا على قيد الحياة خلال تواجدها بالجهاز الهضمي.

أظهرت كل من السلالتين البكتيريتين المثبتتين مقاومة حقيقية لطريقة التثبيت، حتى بعد تمديد مدة تعرضهما للموجات فوق الصوتية حيث مكنت عملية التثبيت من تحفيز النمو، الالتصاق، نفاذية الغشاء، وتشكيل البيوفلم وكذا قدرة هذين النوعين من بكتيريا حمض اللبن على تحسين مردوده متعدد السكريات. سمحت المعالجة *[E. durans* و *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447]، مدة 30 و 15 دقيقة على التوالي، على الحصول على عائد ممتاز من السكريات الخارجية المرغوبة (1745 و 1700 ملغ معادل جلوكوز / لتر).

يمكن القول أن تثبيت بكتيريا حمض اللبن باستخدام الموجات فوق صوتية في ظروف مثلى يعتبر استراتيجية جديدة، متميزة وبديلة لتعزيز بعض الوظائف الحيوية المرغوبة لدى بكتيريا حمض اللبن.

**الكلمات المفتاحية:** *E. durans*-*Streptococcus thermophilus* CNRZ 447، بكتيريا حمض اللبن، التثبيت،

الموجات فوق الصوتية، التصاق البكتيريا، البيوفيلم، السكريات الخارجية.

## Liste des abréviations

ADN = Acide désoxyribonucléique

ARN = Acide ribonucléique

ARNr= Acide ribonucléique ribosomique

ATCC= American type culture collection

ATP= Adénosine triphosphate

BALs = Bactéries lactiques

Da= Daltons

DO =Densité optique

EPS= Exopolysaccharides

FAO = Food and Agriculture Organization

GRAS= Generally recognized as safe

HePs= Hétéropolysaccharides

HoPs= Homopolysaccharides

HSP= Heat shock protein

KhZ= Kilohertz

LAB= Lactic acid bacteria

PBS = Phosphate buffer saline

QPS= Qualified presumption of safety

Rpm= Rotation par minute

UFC = Unité formant colonie

Us= Ultrasons

## Liste des figures

Figure 1-1 Arbre phylogénétique présentant la position des genres des BAL(s) entre eux. .....	9
Figure 1-2 Les principales voies de fermentation du glucose.....	17
Figure 1-3 Métabolisme du galactose par les BAL <sub>(s)</sub> .....	18
Figure 1-4 Modèle de la voie protéolytique chez <i>L. lactis</i> . ....	21
Figure 1-5 Effets des souches probiotiques sur la microflore bénéfique et les pathogène 31	
Figure 1-6 Quelques mécanismes liés aux probiotiques et aux prébiotiques où plusieurs réponses bénéfiques sont induites chez l'hôte .....	32
Figure 2-1- Produit laitier fermenté avec une souche productrice d'EPS (EPS+) de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> .....	37
Figure 2-2- Comparaison du groupe de gènes eps entre trois souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> , la similarité avec <i>Streptococcus salivarius</i> est également montrée. ....	41
Figure 2-3- Métabolisation du saccharose via GTF et FTS .....	42
Figure 2-4- Représentation schématique des unités répétitives de : dextrane, mutane, alternane, glucane et reuterane.....	43
Figure 3-1 Méthodes d'immobilisation .....	48
Figure 3-2 Substrats et hétérogénéité oxygénique du biofilm .....	52
Figure 3-3 Cycle de vie d'un biofilm(i) l'adhésion bactérienne, (ii) la maturation du biofilm par la biosynthèse de la matrice et la prolifération cellulaire, (iii) le déclin du biofilm et la dispersion cellulaire.....	53
Figure 3-4 (A) Mécanisme général du quorum sensing lors de la formation d'un biofilm, (B) Processus de développement du biofilm .....	54
Figure 3-5 Effet mécanique des ultrasons " Cavitation" .....	56
Figure 4-1 Démarche expérimentale.....	61
Figure 5-1 Spectres MALDI-TOF et coloration de Gram d' <i>Enterococcus durans</i> .....	72
Figure 5-2 Aspect macroscopique et microscopique (G×100) de <i>S.thermophilus</i> CNRZ447 .....	72
Figure 5-3 Survie et tolérance de <i>E. durans</i> et <i>S. thermophilus</i> à différentes températures .....	73
Figure 5-4 Croissance en présence de sels biliaires.....	78
Figure 5-5 Niveau d'adhésion des deux souches.....	80
Figure 5-6 Adhérence des souches aux solvants.....	81

Figure 5-7 Optimisation du milieu de production des EPSs.....	88
Figure 5-8 Optimisation de l'inoculum de production des EPSs .....	90
Figure 5-9 Optimisation de la concentration en sucrose pour la production des EPS .....	91
Figure 5-10 Effet du pH sur la production d'EPS .....	92
Figure 5-11 Effet de la température sur la production d'EPS .....	93
Figure 5-12- Effet de la durée d'incubation sur la production d'EPS.....	94
Figure 5-13 Conditions d'Aero/Anaerobiose nécessaire à la production d'EPS .....	96
Figure 5-14 Effet de l'agitation sur la production d'EPS .....	97
Figure 5-15 L'auto-adhésion de <i>S. thermophilus</i> CNRZ 447 et <i>E. durans</i> . .....	100
Figure 5-16 Propension du biofilm de <i>S. thermophilus</i> CNRZ 447 et <i>E. durans</i> sans et après conditionnement aux ultrasons .....	102
Figure 5-17 Profil HPLC de l'EPS de <i>S. thermophilus</i> CNRZ 447 .....	105
Figure 5-18 Profil HPLC de l'EPS de <i>E. durans</i> .....	106

## Liste des tableaux

Tableau 1-1 Importantes dates dans l’histoire des BALs .....	7
Tableau 1-2 Genres principaux des BALs et leurs caractéristiques différentielles .....	13
Tableau 1-3 Exemples de croissance/tolérance et adaptation des BALs à des conditions extrêmes .....	14
Tableau 1-4 Différents genres des BAL(s) principalement rencontrés dans les aliments fermentés.....	16
Tableau 1-5 Les souches lactiques et certains probiotiques présents dans divers aliments fermentés.....	26
Tableau 1-6 Exemples de souches probiotiques largement utilisées .....	29
Tableau 1-7 Prébiotiques courants et émergents des aliments fonctionnels.....	30
Tableau 2-1 Les principaux microorganismes producteurs d’EPSs .....	36
Tableau 2-2- Espèces de BALs, bifidobactéries et propionibactéries présentes dans les aliments, produisant des homo-polysaccharides (HoPS) et des hétéro-polysaccharides (HePS).....	38
Tableau 3-1 Effets de l’immobilisation des cellules sur la physiologie cellulaire .....	50
Tableau 3-2 Comparaison entre les fermentations de cellules libres et de cellules immobilisées .....	51
Tableau 5-1 Résultats de l’isolement et de l’identification de la souche .....	71
Tableau 5 -2 Viabilité à différentes températures (données exprimées en pourcentage) .	74
Tableau 5-3 Croissance à pH similaire au suc gastrique et tolérance au pH acide.....	76
Tableau 5-4 Résistance aux antibiotiques.....	83
Tableau 5-5 Activité antibactérienne .....	79
Tableau 5-6 Effet de la sonication sur la développement des souches en milieu liquide .	86
Tableau 5-7 Récapitulatif des conditions optimales de production d’ EPS des souches testées à l’état immobilisé.....	98
Tableau 5-8 Effet du conditionnement ultrasonore sur la productivité finale en EPS de <i>S. thermophilus</i> CNRZ 447 et <i>E. durans</i> .....	98
Tableau 5-9 Effet de l’immobilisation sur la perméabilité membranaire de <i>S. thermophilus</i> CNRZ 447et <i>E. durans</i> .....	103

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

## Sommaire

### Introduction générale

### **CHAPITRE 01 : BACTERIES LACTIQUES ET PROBIOTIQUES**

1.1	Historique de l'utilisation des BALs .....	6
1.2	Définition et classification des BALs .....	7
1.3	Le genre <i>Streptococcus</i> .....	10
1.4	Le genre <i>Enterococcus</i> .....	11
1.5	Habitas des BAL <sub>(s)</sub> .....	14
1.6	Voie métabolique de base des BALs .....	16
1.7	Metabolisme des glucides .....	16
1.7.1.	Métabolisme des hexoses .....	16
1.7.2.	Métabolisme des pentoses .....	19
1.7.3.	Métabolisme des disaccharides .....	19
1.8.	Métabolisme de l'azote : Système protéolytique .....	20
1.9.	Métabolisme lipidique .....	21
1.10.	Innocuité des bactéries lactiques .....	22
1.11.	Les BALs starters .....	24
1.12.	Potentiel probiotique des BALs .....	27
1.12.1.	Concept Probiotique .....	27
1.12.2.	Un bref aperçu de l'histoire des probiotiques .....	28
1.12.2.	Critère de sélection .....	29
1.12.3.	Prebiotique, Postbiotique/ Parabiotique et Symbiotique .....	30
1.13.	Probiotique et Covid 19 .....	33

### **CHAPITRE 02: EXOPOLYSACCHARIDES DES BACTERIES LACTIQUES**

2.1.	Historique .....	35
2.2.	Classification des EPSs .....	37
2.3.	Biosynthèse et génétique des EPSs .....	39
2.4.	Rendement en EPS produit par les BALs .....	43
2.5.	Exploitation des EPSs des bactéries lactiques : Effet prébiotique .....	44

### **CHAPITRE 03: TECHNOLOGIE D'IMMOBILISATION ET NOTION DE BIOFILM**

3.1.	Définition du terme immobilisation .....	47
3.2.	Techniques d'immobilisation .....	47
3.2.	Conséquences physiologiques et morphologiques de l'immobilisation .....	49

3.3.	Notion de biofilm.....	52
3.3.1.	Définition et concept général .....	52
3.3.2.	Etapas de formation de biofilm.....	53
3.3.3.	Applications et problèmes liés au biofilm .....	54
3.4.	Description de l'approche utilisée : la technologie des ultrasons.....	55

## **CHAPITRE 04: MATERIEL ET METHODES**

4.1.	Objectif de recherche.....	59
4.2.	Lieu du travail.....	59
4.3.	Matériels biologiques .....	59
4.3.1.	Souches lactiques .....	59
4.3.2.	Souches pathogènes .....	60
4.3.3.	Identification MS-MALDI-TOF .....	60
4.4.	Méthode.....	61
4.5.	Caractérisation des souches lactiques : Evaluation du potentiel probiotique.....	62
4.5.1.	Survie dans une solution similaire au suc gastrique .....	62
4.5.2.	Tolérance aux sels biliaires .....	62
4.5.3.	Tolérance aux acides.....	63
4.5.4.	Température optimale, thermotolérance et température létale .....	63
4.5.5.	Capacité d'adhésion "auto agrégation" .....	63
4.5.6.	Adhésion aux solvants .....	64
4.5.7.	Antibiorésistance.....	64
4.5.8.	effet antagoniste .....	64
4.6.	Immobilisation cellulaire, application de la sonication .....	65
4.6.1.	Optimisation de la durée d'exposition aux ultrasons.....	65
4.6.2.	Aptitude à la survie et à la croissance .....	65
4.7.	Quantification du biofilm .....	65
4.8.	Détermination de la perméabilité de la membrane .....	66
4.9.	Optimisation des conditions de production d'EPS .....	66
4.9.1.	Optimisation de l'inoculum .....	66
4.9.2.	Optimisation du milieu de production .....	66
4.9.3.	Optimisation des conditions physicochimiques.....	67
4.10.	Production finale d'EPS, extraction, précipitation et purification.....	68
4.11.	Dosage des EPSs .....	68
4.12.	Caractérisation des EPSs produit par HPLC .....	68
4.13.	Traitement des données .....	69

## **CHAPITRE 05: RESULTATS ET DISCUSSION**

5.1.	Identification et caractérisation des souches lactiques .....	71
5.1.1.	<i>Enterococcus durans</i> : Isolement et identification.....	71
5.1.2.	<i>Streptococcus thermophilus</i> .....	72
5.2.	Evaluation du potentiel probiotique .....	72

5.2.1. Croissance à différentes température/ thermorésistante .....	72
5.2.2. Croissance à pH similaire au suc gastrique et résistance au pH .....	75
5.2.3. Croissance en présence de concentrations croissantes de sels biliaires .....	77
5.2.4. Capacité d'agrégation .....	79
5.2.5. Adhérence aux solvants .....	81
5.2.6. Résistance aux antibiotiques .....	82
5.2.7. Effet antagoniste .....	84
5.3. Effet de l'immobilisation sur la viabilité des souches .....	86
5.4. Optimisation des paramètres de production des EPSs.....	88
5.4.1. Le milieu de culture .....	88
5.4.2. La concentration de l'inoculum .....	89
5.4.3. La concentration du substrat (Le rapport C/N) .....	90
5.4.4. Le pH de production .....	91
5.4.5. Effet de la température .....	93
5.4.6. La durée d'incubation .....	94
5.4.7. Effet du type respiratoire : Aero/anaerobiose .....	95
5.4.8. Effet de l'agitation .....	96
5.5. Conditions optimales de production d'EPS des souches testées immobilisées .....	97
5.6. Effet de l'immobilisation par sonication sur le rendement en EPS .....	98
5.7. Effet de l'immobilisation sur les propriétés adhésives des souches étudiées.....	100
5.7.1. Effet sur l'agrégation .....	100
5.7.2. Effet sur la formation de biofilm .....	101
5.7.3. Effet sur la perméabilité.....	103
5.8. Caractérisation par HPLC des exopolysaccharides .....	104
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>107</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>110</b>

## ***ANNEXES***

# ***INTRODUCTION GENERALE***

## ***Introduction Générale***

---

Les bactéries lactiques (BALs) forment un groupe de microorganismes communément reconnus comme sûrs (GRAS), fortement utilisés dans l'industrie biotechnologique (comme les réacteurs cellulaires) et dans le secteur de la santé (comme les probiotiques). Elles sont classées en deuxième position, après les levures, en tant que micro-organismes les plus appréciés pour l'homme (Xiao et al., 2014). Initialement les BALs ont été utilisées pour la fermentation dans l'industrie laitière, leur usage est relatif à leur capacité à transformer le lait en produits de haute qualité tels que le yaourt, le fromage, la crème glacée et le kéfir. Les principales qualités requises pour les produits laitiers sont la préservation contre l'altération, les propriétés organoleptiques et les propriétés texturantes/rhéologiques (Novel, 1993 ; Mozzi et al., 1996).

Grâce à leurs bienfaits, les BALs sont amplement considérées dans la recherche courante, pour laquelle de sérieux efforts ont été déployés en vue d'améliorer leurs aspects fonctionnels. Ainsi, leurs avantages pour la santé humaine en tant que probiotiques et leurs performances industrielles en tant que réacteurs cellulaires sont les propriétés les plus envisagées (Burgain et al., 2011). Le potentiel probiotique comprend la capacité des microorganismes à tolérer les conditions du tube digestif, à s'y installer (au moins pendant un certain temps), à concurrencer, par la production d'agents antimicrobiens, la croissance des pathogènes et améliorer la digestion et la nutrition (FAO/WHO, 2001 ; Boubakeur et al., 2018).

Le pouvoir d'adhésion et le biofilm représentent pour les micro-organismes un statut physiologique avec des traits spécifiques, les deux constituent des atouts importants facilitant la fixation des probiotiques aux muqueuses de l'appareil digestif, et améliorant la production d'exopolysaccharides (EPS) (FAO/WH, 2001 ; O'Grady et al., 2005).

En effet, les EPSs sont des biomolécules relevant de la classe des fibres, réputés avoir des effets positifs sur la santé en tant que prébiotiques, offrant une protection aux micro-organismes contre les environnements gastriques défavorables (Caggianiello et al., 2016 ; London et al., 2015). En outre, ces métabolites microbiens offrent aux produits laitiers des propriétés protectrices, rhéologiques et texturantes (Patel et al., 2012). Ainsi, leur rôle est prépondérant dans la fabrication des produits laitiers fermentés (Aslim et al., 2009).

Or, peu de micro-organismes servant à la fermentation laitière sont capables de produire efficacement ces molécules multifonctionnelles, ainsi, le rendement le plus élevé actuellement est de 3 g/L (Welman et al., 2003). En effet, les faibles quantités d'EPS générées par les BALs limitent leur éventuelle exploitation comme ingrédients de qualité alimentaire. Néanmoins, ces biopolymères ouvrent de nouvelles pistes en matière d'applications focalisées pour de plus amples bienfaits sur la santé des consommateurs (Jolly, 2002) .

Diverses stratégies ont été explorées pour améliorer la synthèse de ces biopolymères. Ces stratégies portent entre autres sur le choix des milieux idéales et l'optimisation des conditions de culture (Température, le pH, stress environnemental, et l'apport en oxygène). Le recours aux technologies d'immobilisation par un traitement ultrasonique est l'une des approches émergentes dans l'industrie biotechnologique visant l'amélioration des performances microbiennes (Chisti, 2003 ; Ojha et al, 2016). Toutefois, les paramètres associés à cette approche doivent être définis.

Peu de travaux de recherche ont été axés sur l'effet de cette technologie en termes de capacité de production de biofilm et d'EPS. Le but de cette thèse était d'étudier l'impact de l'immobilisation sur certaines propriétés adhésives, telles l'agrégation cellulaire, la formation de biofilm, et la synthèse d'EPS des souches probiotiques, *S. thermophilus* CNRZ447, et *E. durans*.

Les chapitres dans ce manuscrit sont organisés comme suit. Le premier couvre un rappel bibliographique sur l'aspect fondamental des bactéries lactiques et des probiotiques, ainsi leur application. Le concept de base des exopolysaccharides microbiens, et en particulier ceux produits par le groupe des bactéries lactiques, leur composition, classification et rendement sont détaillés dans le second chapitre. Le troisième chapitre est consacré à la technologie d'immobilisation, les techniques existantes, et aussi les approches nouvelles récemment développées, en particulier dans le domaine de l'alimentaire. Par ailleurs, une partie dans ce chapitre est dédiée à la description de l'approche adoptée dans cette étude. La partie bibliographique est suivie par une partie expérimentale décrivant les objectifs fixés, la démarche suivie et la méthodologie appliquée. Cette partie est complétée par les résultats obtenus et leur interprétation à la lumière de la littérature.

En fin, une conclusion générale récapitulera l'ensemble des résultats obtenus et les perspectives qui pouvant être envisagés pour approfondir et/ ou compléter le travail de cette thèse.

# ***PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE***

***CHAPITRE 01***

***BACTERIES LACTIQUES ET***

***PROBIOTIQUES***

L'utilisation du vivant en industrie alimentaire a pour but de produire des aliments fermentés, des cultures microbiennes, ou une large gamme de métabolites comme des additifs alimentaires. Grâce au processus de fermentation (alcoolique, acétique ou lactique) qui est considérée comme une approche pionnière, plusieurs propriétés organoleptiques (apparition du goût et d'odeur) et physicochimiques des produits sont améliorées, leur conférant des attributs nutritionnelles et un effet santé (Hugenholtz, 2013). En effet, la fermentation est le procédé le plus ancien de bio-préservation, lequel, consiste en l'utilisation des micro-organismes et ou de leurs métabolites, grâce à leur potentiel antagoniste et/ou antimicrobien, la durée de vie des aliments peut ainsi être prolongée. En fait, le groupe bactérien le plus couramment rencontré dans les aliments fermentés traditionnels correspond à celui des bactéries lactiques (Bogsan et al., 2015).

Depuis longtemps, un lien étroit a été établi entre les bactéries lactiques, la culture et le bien-être des humains. Actuellement, l'industrialisation des procédés de transformation alimentaire de même que les attributs bénéfiques qu'offrent certains micro-organismes en matière de qualité et de sécurité alimentaire témoignent de la bonne réputation des bactéries lactiques (Holzapfel et al., 2014).

En général, la production des cultures microbiennes est exploitée dans un but de consommation directe ou indirect après la lyse et l'extraction des métabolites cellulaires tels, les agents acidifiants (acide lactique, citrique, acétique...), les agents de sapidité (glutamate), les agents inhibiteurs (nisine, sbtiline, tylopsine...), les vitamines (C, D, B2, B12) ainsi que de nombreuses enzymes (lipases, protéases, amylases....) (Dupin, 1992) .

### 1.1 Historique de l'utilisation des BALs

Les BAL<sub>(s)</sub> sont un groupe de microorganismes d'une large répartition dans la nature et d'une biodiversité très riche. L'histoire de leur utilisation remontent à plus de 10 000 ans, d'ailleurs les nomades considèrent les yaourts comme un don de Dieu grâce à ses effets santé (Chen et al., 2018). Leur usage a contribué significativement au développement et aux activités sociales, de ce fait leur impact était considérable sur la culture, les traditions et le bien-être humains (Franz et al., 2011). Depuis les scientifiques n'ont pas cessé d'élargir leurs connaissances, d'investiguer sur ces bactéries, d'ailleurs les travaux du scientifique Russe "**Metchnikoff**" (1907) sur la longévité de certaines populations (de l'île des Balkan) ont révélé que la flore lactique du yaourt peut préserver la santé et prolonger la vie à travers

l'inhibition de la croissance des pathogènes et la réduction de leurs toxines bactériennes (Chen et al., 2018).

Sur le tableau ci-après, sont énumérées les importantes dates et évènements marquants l'histoire des BALs.

**Tableau 1-1 Importantes dates dans l'histoire des BALs (Chen et Wang, 2018)**

Date	Evènements
<b>1000 ans avant l'ère chrétienne</b>	Début de la fabrication de cornichons en Chine (légumes marinés)
<b>1780</b>	<b>C. Blondeau</b> a déterminé que l'acide lactique est le produit de certaines fermentations microbiennes (Blondeau 1847)
<b>1847</b>	<b>Louis Pasteur</b> a montré que les micro-organismes causent l'acidification du lait (Pasteur 1857)
<b>1857</b>	<b>Lister</b> a isolé <i>Lactococcus lactis</i> à partir du lait fermenté (Lister 1873)
<b>1884</b>	<b>Hueppe</b> a nommé pour la première fois les bactéries du yogourt comme «bactérie de l'acide lactique» (Milth 1884)
<b>1899</b>	<b>Henri Tissier</b> a isolé <i>Bifidobacterium bifiduma</i> partir des selles des nourrissons (Tissier 1906)
<b>1900</b>	<b>Ernst Moro</b> a découvert <i>Lactobacillus acidophilus</i> (Moro 1900)
<b>1905</b>	<b>Stamen Grigoroff</b> a isolé <i>Lactobacillus bulgaricus</i> à partir de yaourt, c'est-à-dire de <i>Lactobacillus Bulgaria</i> (Grigoroff, 1905)
<b>1907</b>	<b>Elie Metchnikoff</b> a prédit le bénéfice de LAB pour l'être humain (Minot 1908)
<b>1930</b>	<b>Minoru Shirota</b> isolée de <i>Lactobacillus casei</i>
<b>1935</b>	<b>Minoru Shirota</b> a commencé la fabrication et la vente de Yakult
<b>1983</b>	Isolement de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> d'un adulte sain
<b>2001</b>	La FAO / OMS a proposé une définition des «probiotiques
<b>2002</b>	Les experts conjoints de la FAO / OMS à Londres ont rédigé les directives pour l'évaluation des probiotiques dans les aliments.
<b>2003</b>	Le Ministère de la Santé n ° 84 de la République populaire de Chine a approuvé <i>Lactobacillus reuteri</i> en tant que souche probiotique pouvant être utilisée comme aliment sain
<b>2008</b>	L'organisation mondiale de gastro-entérologie a identifié les fonctions potentielles des bactéries lactiques

## 1.2 Définition et classification des BALs

Les BAL<sub>(s)</sub> sont un groupe de bactéries unies par un ensemble de caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques (Axelsson, 2004) . Ce sont des cocci ou bâtonnets gram-positifs, non sporulantes, catalase négative, dépourvues de cytochromes, non-aérobies mais aérotoles, exigeantes, acido-tolérantes et rigoureusement fermentatives, produisant de l'acide lactique comme principal produit final du métabolisme du glucose

(homofermentation), par ailleurs, certaines espèces peuvent produire de l'éthanol, CO<sub>2</sub> et l'acétate (hétérofermentation) (Klein et al., 1998; Axelsson, 2004).

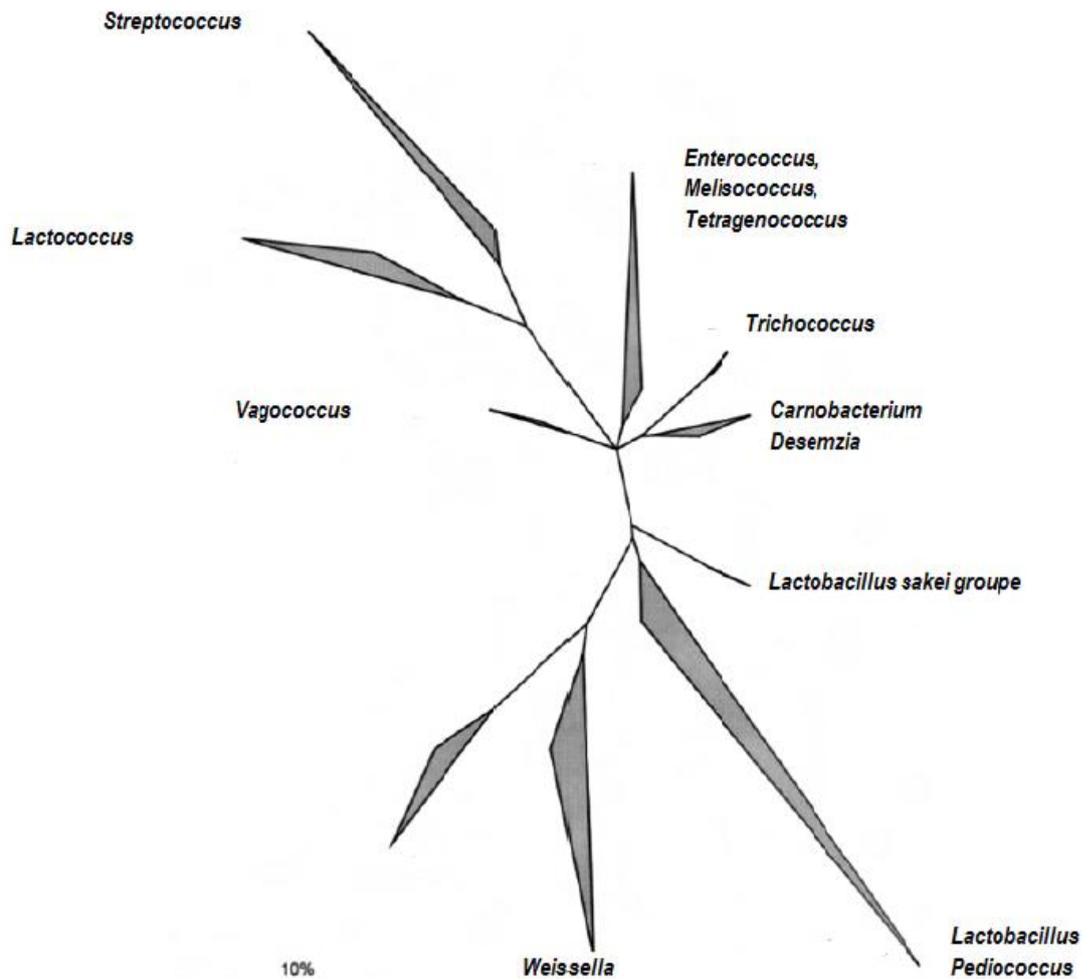
Le terme "bactéries lactiques" ne peut faire l'objet d'une définition univoque, étant donné que la majorité des caractéristiques qui y sont employées sont inévitablement soumises à des restrictions plus ou moins importantes (Ingram in Axelsson, 1975), signifiant que son exactitude se limite aux conditions "normales", et que des exceptions à la définition puissent exister. En fait, la caractéristique Gram-positif est la seule qui reste inchangée. Toutefois, la catalase et les cytochromes sont parfois formés par certaines BALs dans certains milieux.

En outre, le concept de "bactéries lactiques" n'a pas de définition taxonomique stricte. Ainsi, leurs groupes peuvent être hétérogènes dans leur taxonomie selon l'analyse des liens phylogénétiques (Chen et al., 2018). Traditionnellement, la taxonomie bactérienne reposait essentiellement sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques ainsi que sur la composition des parois et les acides gras. Toutefois, la mise en place de diverses approches moléculaires telles que le pourcentage G+C de l'ADN, l'hybridation ADN-ADN, la structure et la séquence de l'ARNr, ont conduit à de considérables changements dans la classification taxonomique des bactéries lactiques (Alexandre et al., 2008).

Selon la classification taxonomique actuelle, les bactéries lactiques appartiennent au phylum des Firmicutes à Gram positif ayant une teneur faible en G+C (Guanine plus Cytosine) dans leur ADN ( $\leq 55\%$ ), classe Bacilli, et l'ordre des Lactobacillales. On y trouve six familles: les Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae et Streptococcaceae (Franz et Holzapfel, 2011; Von Wright & Axelsson, 2019), plus de 30 genres et plus de 300 espèces (Endo et al., 2019), les genres suivants y constituent le noyau: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* (Axelsson, 2004).

La classification des BAL<sub>(s)</sub> sur le plan phylogénétique est principalement basée sur des critères de biologie moléculaire, tels que le séquençage des ARNr, la figure ci dessous illustre un exemple d'arbre phylogénétique comprenant certains genres de l'ordre des Lactobacillales.

Notant ainsi que la classification des BAL<sub>(s)</sub> a connu beaucoup de changement, étant donné que certains groupes ont été ajoutés alors que d'autres ont été fusionnés. Grâce à la masse des données issues du séquençage de l'ensemble du génome, des arbres phylogénétiques similaires, voire plus détaillés ont été établis.



**Figure 1-1** Arbre phylogénétique présentant la position des genres des BAL(s) entre eux.

L'arbre de consensus est basé sur des analyses de parcimonie maximale de toutes les séquences d'ARNr 16S disponibles, au moins 90 % des séquences d'ARNr de bactéries Gram-positives. Notez que la famille des *Lactobacillaceae* (partie inférieure ; *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* et *Leuconostoc*) comprend également les genres *Oenococcus* et *Fructobacillus*. La barre indique une divergence de séquence estimée à 10 % (Von Wright et al., 2019).

Le genre *Bifidobacterium* (famille des Bifidobactéries) est traditionnellement estimé appartenir au groupe des BAL<sub>(s)</sub>. En effet, plusieurs de ses espèces peuvent être qualifiés de bactéries lactiques au sens large, puisqu'elles remplissent la description générale des BAL<sub>(s)</sub> susmentionnée. Toutefois, elles font partie, de la seconde branche des bactéries Gram-positives, le phylum *Actinobacteria* (Von Wright et al., 2019), dont l'ADN génomique contient une forte teneur en G+C. Les différentes familles des BAL<sub>(s)</sub>, les genres communs et leurs principales caractéristiques sont fournies dans le tableau 1-2.

Quelques caractéristiques, taxonomiques, biochimiques, morphologiques, et physiologiques des genres *Streptococcus* et *Enterococcus* sont décrits ci-dessous.

### 1.3 Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* se compose de cellules Gram-positives, sphériques ou ovoïdes de 0.8-1.2  $\mu\text{m}$ , disposées en chaînes (de quelques cellules à plus de 50), ou en paires. Ce sont des cocci facultativement anaérobies, non sporulantes, catalase-négatives, homofermentaires, ayant des besoins nutritionnels complexes. Bon nombre d'espèces appartenant à ce genre sont des parasites chez l'homme et l'animal, et certains sont des agents pathogènes importants (Hardie et al., 1995). En effet, en raison de leur implication dans de nombreuses maladies humaines et animales, les streptocoques ont été parmi les premières bactéries reconnues par les microbiologistes (Lemos et al., 2011). En 1937 Sherman a classifié pour la première fois le genre *Streptococcus* en quatre groupes distincts, appelés pyogènes, viridans, lactiques et entérocoques. Cette classification a été basée sur plusieurs caractéristiques physiologiques. *S. thermophilus*, initialement décrite en 1919 par Orla-Jensen, faisait cependant partie du groupe des viridans et ne constituait pas un streptocoque lactique, bien qu'elle ait été utilisée dans les fermentations laitières (Hutkins et al., 1987 ; Lemos et al., 2011).

La taxonomie actuelle du genre *Streptococcus* a constitué un champ de recherche complexe, ayant connu plusieurs découvertes historiques menant ainsi à la classification courante (Lemos et al., 2011). En effet, la taxonomie moléculaire gouverne la classification du genre *Streptococcus*, il existe maintenant un arbre phylogénétique pour toutes les espèces tenant en compte les données moléculaires génotypiques (Facklam, 2002 ; Kohler, 2007).

Bien que les streptocoques soient des commensaux normaux des membranes muqueuses, on y trouve aussi d'importantes espèces pathogènes ; en outre, certaines espèces occupent un rôle clé dans les processus industriels (du Toit et al., 2014).

*S. thermophilus* représente une des plus importantes cultures starters de point de vue économique, largement utilisées dans l'industrie laitière pour la production de yaourt et de nombreux fromages, tels que les fromages à pâte dure, la mozzarella, le cheddar (Lemos et al., 2011), il s'agit d'un coccus non mobile, sphérique à ovoïde, Gram positif, de diamètre de 0,7 à 0,9  $\mu\text{m}$ , se présentant par paires et en chaînettes, parfois très longues. La température optimale de croissance de cette bactérie se situe entre 40-45 °C, avec un minimum de 20-25°C, et un maximum proche de 47-50 °C. Elle n'hydrolyse pas l'arginine, et ne fermente qu'un nombre limité de sucres, dont le lactose, le fructose, le saccharose et le glucose, mais

pas le galactose. *Streptococcus thermophilus* se distingue aussi par sa sensibilité aux antibiotiques et aux désinfectants et possédant une faible activité protéolytique. Distinctement des streptocoques, il est unique car il n'a pas de groupe d'antigène spécifique (Hutkins et al., 1987 ; Harnett et al., 2011).

Le *Streptococcus thermophilus* est hautement associé à la production laitière. Le lait chauffé constitue une source particulièrement importante (Hutkins et al., 1987 ; Lemos et al., 2011 ; Harnett et al., 2011). Il est utilisé traditionnellement en association avec une ou plusieurs espèces du genre *Lactobacillus* dans la production de yaourt et la manufacture de fromages Suisses et Italiens. Lors de la fabrication des yaourts, *S. thermophilus* est couplé à *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, produisant ainsi majoritairement de l'acétaldéhyde, responsable de la saveur du produit fini (Harnett et al., 2011).

#### 1.4 Le genre *Enterococcus*

Jusqu'au 1984, les entérocoques faisaient partie de la liste du genre *Streptococcus*, toutefois les techniques d'hybridation ADN-ADN et d'ARNr 16S ont permis de les classer dans un nouveau genre, "*Enterococcus*" vue qu'ils sont sensiblement distincts des autres groupes de streptocoques. Le genre *Enterococcus* se rapporte aux bactéries lactiques, et ce malgré, son origine fécale comme son nom l'indique. Ce sont des Gram positif, non sporulés, catalase-négative (certaines souches présentent une activité pseudo-catalytique), oxydase-négative, non mobiles, et anaérobies facultatifs. Sous le microscope, ces cellules apparaissent isolées, en paires ou en chainettes. Leur métabolisme est fermentatif, avec comme résultat final de la fermentation du glucose, l'acide L(+)-lactique (García de Fernando, 2011 ; Švec et al., 2014). Parmi les 43 espèces du genre *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sont les plus appropriés aux produits laitiers. Leur température de croissance optimale est 37° C, mais de nombreuses espèces peuvent se développer entre 10° C à 45° C, ainsi, des milieux de culture complexes sont nécessaires (Švec et al., 2014).

Les espèces du genre *Enterococcus* se développent en présence de 6,5 % de NaCl, à un pH de 9.6, et survivent même à 60 °C pendant 30 minutes, et en présence de 40 % de bile. Elles figurent parmi les bactéries non sporulées les plus thermorésistantes. De ce fait, elles sont fréquemment présentes dans de nombreux aliments crus ou traités thermiquement, tels que le lait cru ou pasteurisé, les fromages et autres produits laitiers (García de Fernando, 2011). Grâce à leur capacité lipolytique et protéolytique, les entérocoques, notamment *E. faecium*, contribuent considérablement au renforcement des qualités organoleptiques des

aliments fermentés tels que les fromages, les charcuteries, les produits de salaison et les olives.

Les entérocoques disposent de certains bienfaits pour la santé, par leur effet probiotique, leur capacité à réduire le cholestérol, à produire des substances antimicrobiennes, à adhérer aux muqueuses intestinales et leur effet immunomodulateur (Bagci et al., 2019).

Somme toute, de tous les genres des BALs, les entérocoques constituent la catégorie la plus controversée à cause des déterminants de la virulence de certaines souches, en effet, la salubrité des entérocoques doit donc être assurée avant de recourir à ces bactéries comme probiotique ou culture starter ou dans les produits biopharmaceutiques.

Tableau 1-2 Genres principaux des BALs et leurs caractéristiques différentielles (Von Wright et al., 2019)

		Caractéristiques								
Famille	Genre	Forme	CO <sub>2</sub> à partir de Glucose	Croissance à 10°C	Croissance à 45°C	Croissance à 6,5% de NaCl	Croissance à 18% de NaCl	Croissance à pH 4.4	Croissance à pH 9.6	Type d'acide lactique
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	Cocci (tétrades)	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	Batonnets	-	+	-	ND	-	ND	-	L
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	Cocci	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragemonococcus</i>	Cocci (tétrades)		+	-	+	+	Variable	+	
	<i>Vagococcus</i>	Cocci		+	-	-	-		-	
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	Batonnets	Variable	Variable	Variable	Variable	-	Variable	-	D, L, DL
	<i>Pediococcus</i>	Cocci (tétrades)	-	Variable	Variable	Variable	-	+	-	L, DL
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	Cocci	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Oenococcus</i>		+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Weissella</i>		+	+	-	Variable	-	Variable	-	D, DL
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i> <sup>b</sup>	Cocci	-	+	-	-	-	Variable	-	L
	<i>Streptococcus</i>		-	-	Variable	-	-	-	-	L

ND, non déterminé.<sup>a</sup> Certaines souches de *Weissella* sont en forme de bâtonnet. <sup>b</sup> Dans la littérature ancienne, les *lactocoques* sont appelés streptocoques du groupe

### 1.5 Habitas des BAL<sub>(s)</sub>

Les bactéries lactiques ont un spectre de croissance relativement large, ce groupe bactérien est connu par son extrême adaptabilité aux conditions environnementales. En effet, la température de développement de certaines espèces peut être inférieure à 15 °C ou supérieure à 45 °C, et peuvent aussi se développer à des pH compris entre 3 et 1. Ce phénomène d'adaptation explique le fait que les bactéries lactiques sont largement réparties dans la nature, dans les matières végétales et leurs produits, dans divers types d'aliments fermentés, les fruits, le sol, l'eau, les cavités (bouche, voies génitales, intestinales et respiratoires) des êtres humains et des animaux, ainsi que d'autres habitats naturels (Chen et al., 2018). En effet, la diversité physiologique des BALs, de même que leur vulnérabilité aux environnements extrêmes font qu'elles forment un ensemble hétérogène (Holzapfel et al., 2014). Le tableau ci-dessous présente des exemples concrets montrant les conditions de croissance (pH, concentration en sels biliaires, substrats) de certaines bactéries lactiques.

**Tableau 1-3 Exemples de croissance/tolérance et adaptation des BALs à des conditions extrêmes (Holzapfel et al., 2014)**

Facteur	Valeur	Organismes	Substrat/habitat
pH faible	pH 2.8 pH 3.2 pH ~3.0	<i>Lb. suebicus</i> <i>Lb. acetotolerans</i> <i>Lb. acidophilus</i> "groupe"	Purée de pommes/poires fermentées Vinaigre de riz Estomac/duodénum supérieur
pH élevé	pH 9.6	<i>Ent. Faecium</i> <i>Carnobacterium</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. reuteri</i> / <i>L. paracasei</i>	Bacillus fermentation desoja Viande
Sels biliaires et jus pancréatique	Concentrations physiologiques		Intestin grêle
Sel (NaCl)	18–24% 26,4% (tolérance)	<i>Tet. muriaticus</i> <i>C. viridans</i>	Poissons fermentés salés De la mortadelle emballée sous vide
Températures basses	0–2°C	<i>Leuc. gelidum</i> Quelques Carnobactéries	Viandes réfrigérées emballées sous vide
Températures élevés	55°C Jusqu'à 50°C	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	Fromage de type emmental Fromages à pâte dure de type

		<i>Strep. thermophilus</i>	italien
Nitrite	>150 ppm	Plusieurs BALs	Viande séchée
La résistance au houblon	a	<i>Ped. damnosus</i> <i>Ped. claussenii</i> <i>Lb. brevis</i>	Bière
Acide sorbique	>2 g/kg	Plusieurs BALs	Conserves de jus, etc.
Éthanol	15% 13%	<i>Lb. fructivorans</i> <i>O. oeni</i>	Isolé du ketchup Vin
Résistance aux radiations	$\gamma$ D10 = >1.0 kGy	<i>Lb. sakeib</i>	Viande radiée
Résistance thermique	D65 = 20–30min	<i>W. viridescens</i> <i>Ent. faecalis</i>	Viandes transformées

<sup>a</sup> : En ce qui concerne les "composés du houblon amer" à des concentrations d'environ 55 ppm d'acides iso- $\alpha$ .

<sup>b</sup> : Résistance plus élevée pendant la croissance exponentielle qu'en phase stationnaire. *C.*, *Carnobacterium* ; *Ent.*, *Enterococcus* ; *Lb.*, *Lactobacillus* ; *Leuc.* *Leuconostoc* ; *O.*, *Oenococcus* ; *Ped.*, *Pediococcus* ; *Strep.*, *Streptococcus* ; *Tet.*, *Tetragenococcus* ; *W.*, *Weisella*.

Les aliments fermentés d'origine animale ou végétale constituent un véhicule performant pour acheminer les bactéries vivantes vers le corps humain. Par exemple, une portion de 100 g de produit fermenté apporte  $10^{10}$ - $10^{11}$  microorganismes viables. D'autres parts, la présence massive des BALs dans des milieux exposés périodiquement aux antibiotiques (animaux, humains et plantes malades) les soumet à une pression, conduisant ainsi au développement d'une résistance (Teuber et al., 2003). Sur le tableau ci-dessous sont listés quelques exemples d'aliments fermentés, et les différents genres de bactéries lactiques principalement rencontrés.

**Tableau 1-4 Différents genres des BAL(s) principalement rencontrés dans les aliments fermentés (Chen et al., 2018)**

Aliments fermentés	Genres bactériens
Produits laitiers	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , et <i>Enterococcus</i> . (le genre <i>Lactobacillus</i> est le plus dominant)
Levain	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Lactobacillus crustorum</i> , <i>Lactobacillus paralimentarius</i> , <i>Lactobacillus mindensis</i> , <i>Staphylococcus pentose</i> , et <i>Enterococcus faecium</i> .
Choucroute	<i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , et <i>Lactobacillus</i>
Produits carnés	<i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , et <i>Streptococcus</i> .

## 1.6 Voie métabolique de base des BALs

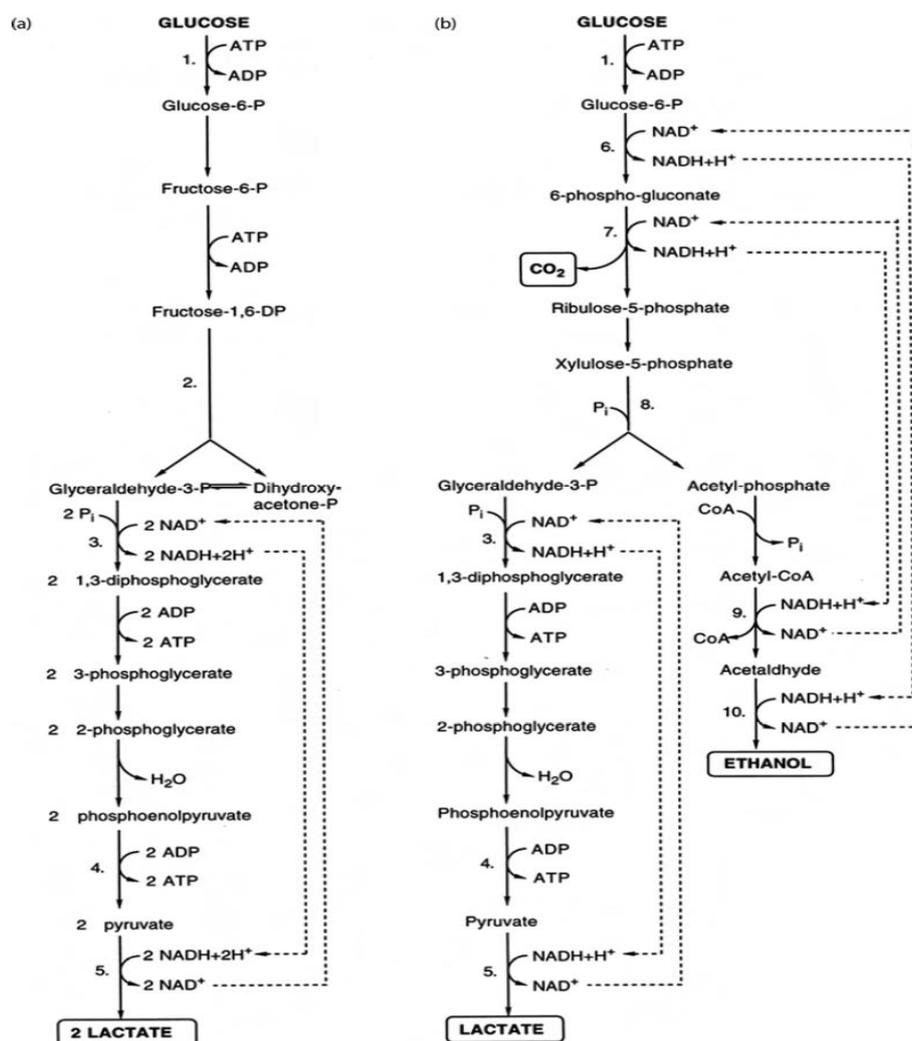
En tant que micro-organismes exigeants, les bactéries lactiques nécessitent pour leur croissance un apport riche et complexe en substances nutritives, tels que les glucides, les acides aminés, les vitamines et les minéraux. Toutefois, certaines BAL<sub>(s)</sub> exigent des facteurs de croissance particuliers, dont le jus de tomate, le lactosérum, etc (Endo et al., 2014). Le trait marquant du métabolisme des BAL<sub>(s)</sub> réside dans la fermentation des glucides, associée à une phosphorylation du substrat. L'ATP générée sera ensuite exploitée aux fins de biosynthèse. En outre, ce groupe bactérien manifeste une capacité énorme à métaboliser les glucides et leurs dérivés via différentes voies métaboliques. L'acide lactique est le principal produit final, néanmoins, et en mesure que les BAL<sub>(s)</sub> s'adaptent à divers environnements, leur métabolisme peut être modifié en conséquence (Axelsson, 2004) .

## 1.7 Métabolisme des glucides

### 1.7.1. Métabolisme des hexoses

Les bactéries lactiques sont chimiotrophes, elles puisent en effet l'énergie dont elles ont absolument besoin pour leur métabolisme en oxydant des composés chimiques (Ribéreau et al., 2006). Étant donné que celles-ci ne disposent pas de système respiratoire fonctionnel, leur énergie est donc obtenue via une phosphorylation au niveau du substrat, Deux voies de fermentation fondamentales sont possibles en présence des hexoses (Von Wright et al., 2019), de ce fait, les BAL<sub>(s)</sub> sont ainsi qualifiées comme homolactiques ou hétérolactiques. La voie

homofermentaire est basée sur la glycolyse (ou voie Embden-Meyerhof-Parnas) et ne produit pratiquement que de l'acide lactique, sous forme d'acide D(-)- lactique, L(+)- lactique, ou même les deux isomères sous forme d'un mélange racémique (**Figure 1-2.a**). Cependant la fermentation hétérolactique (hétérofermentaire), connu sous le nom "voie de la pentose phosphokétolase", produit, outre que l'acide lactique, du CO<sub>2</sub>, d'éthanol ou d'acétate (**Figure 1-2.b**) (Holzapfel et Wood, 1995; Von Wright et Axelsson, 2019). Il est en effet évident, que pour une espèce donnée, le type de sucre fermenté, ainsi que les facteurs environnementaux (présence d'accepteurs d'électrons, pH, etc.), déterminent à la fois le bilan d'énergie, et la nature des produits finaux (Ribéreau et al., 2006).



**Figure 1-2 Les principales voies de fermentation du glucose.**

(a) Fermentation homolactique (glycolyse, voie Embden-Meyerhof-Parnas). (b) Fermentation hétérolactique (voie 6-phosphogluconate/phosphokétolase). Les enzymes sélectionnées sont numérotées: 1. glucokinase ; 2. fructose-1,6-diphosphate aldolase ; 3. glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; 4. pyruvate kinase ; 5. lactate déshydrogénase ; 6. glucose-6-phosphate déshydrogénase ; 7. 6-phosphogluconate déshydrogénase ; 8. phospho-cétolase ; 9. acétaldéhyde déshydrogénase ; 10. alcool déshydrogénase (Von Wright et al., 2019).

Quant aux hexoses autres que le glucose (mannose, galactose, fructose), après avoir subi différentes étapes d'isomérisation et de phosphorylation, ils passent par les voies majeures indiquées précédemment en tant que glucose-6-phosphate ou fructose-6-phosphate (Von Wright et al., 2019); la métabolisation du galactose est assurée via deux voies différentes : par la voie de tagactose-6-phosphate (Figure 1-3.a) lorsque le sucre traverse la membrane cellulaire par le biais du système de phosphotransférase (PTS), ou par celle de de Leloir quand le galactose libre est acheminé par une perméase spécifique (la galactose perméase) (Figure 1-3.b) (Endo et Dicks, 2014 ; Von Wright et Axelsson, 2019).

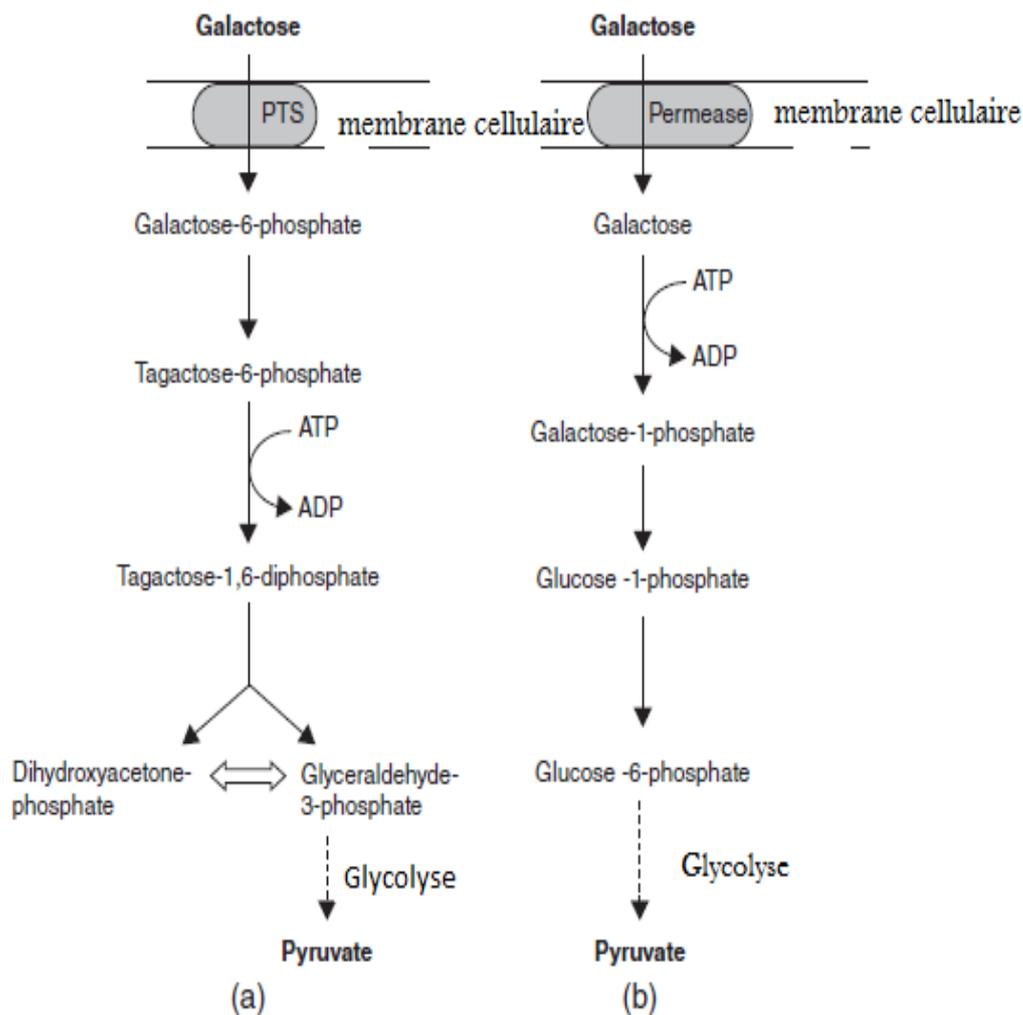


Figure 1-3 Métabolisme du galactose par les BAL<sub>(s)</sub>

(a) voie du tagactose-6-phosphate ; (b) voie de Leloir (Endo et al., 2014)

### 1.7.2. Métabolisme des pentoses

Toutefois, la phosphorylation des pentoses est réalisée par voie hétérofermentaire, ils pénètrent dans la voie sous forme de ribulose-5-phosphate ou xylulose-5-phosphate, par ailleurs le CO<sub>2</sub> n'est pas produit (Von Wright et al., 2019). Ces réactions sont présentées dans la voie hétérofermentaire pour l'assimilation du glucose (**Figure 1-2.b**). Même si la majorité des bactéries lactiques hétérofermentaires sont performantes pour la fermentation des pentoses, certaines souches semblent être pentoses négatives (Kandler et al., 1983). Toutefois, il y a en outre des souches de *Lactobacillus*, *Pediococcus* ou *Leuconostoc* qui fermentent des pentoses tels le ribose, l'arabinose et le xylose, peu importe leur type fermentaire (homo ou hétérofermentaire), ainsi, le rendement résultant de cette voie est supérieur à celui de la voie pentose-phosphate issu de la fermentation des hexoses (Ribéreau et al., 2006).

### 1.7.3. Métabolisme des disaccharides

En fonction de leur mode de transport vers la cellule, les disaccharides peuvent être introduit sous forme de sucres libres ou de phosphates de sucres (Halász, 2009). Prenant l'exemple du lactose, le disaccharide dont le métabolisme a été amplement exploré, notamment pour les espèces utilisées dans les applications laitières. Il est introduit dans la cellule via une permérase spécifique ou via un système PEP:PTS propre au lactose, en tant que lactose phosphate. Dans le premier cas, une  $\beta$ -galactosidase scinde le disaccharide en deux monosaccharides, le glucose et le galactose, qui tous les deux peuvent passer dans les principales voies fermentaires. Toutefois, dans le second cas, une autre enzyme, la phospho- $\beta$ -d-galactosidase, est nécessaire pour scinder le lactose phosphate en 1 mole de monosaccharide (glucose) et 1 mole de phosphate de monosaccharide (galactose-6-phosphate) (Halász, 2009; Von Wright et Axelsson, 2019).

Un autre exemple concerne les autres disaccharides, le maltose dont la fermentation par les BAL<sub>(S)</sub> a été largement discutée, et le saccharose. Le premier est d'abord clivé en deux monosaccharides, deux glucoses qui passent ensuite par les voies majeures de fermentation (Kandler, 1983 ; Halász, 2009). La fermentation du saccharose est amorcée par son clivage en glucose et fructose par la sucrose hydrolase. Ces deux derniers produits peuvent emprunter les voies principales, comme indiqué précédemment (**Figure 1-3**) (Von Wright et al., 2019).

Quant à la fermentation d'autres disaccharides, tels que la cellobiose et la mélibiose, l'aptitude des BAL(S) est avérée espèce dépendante. Il est probable que leur métabolisme fait

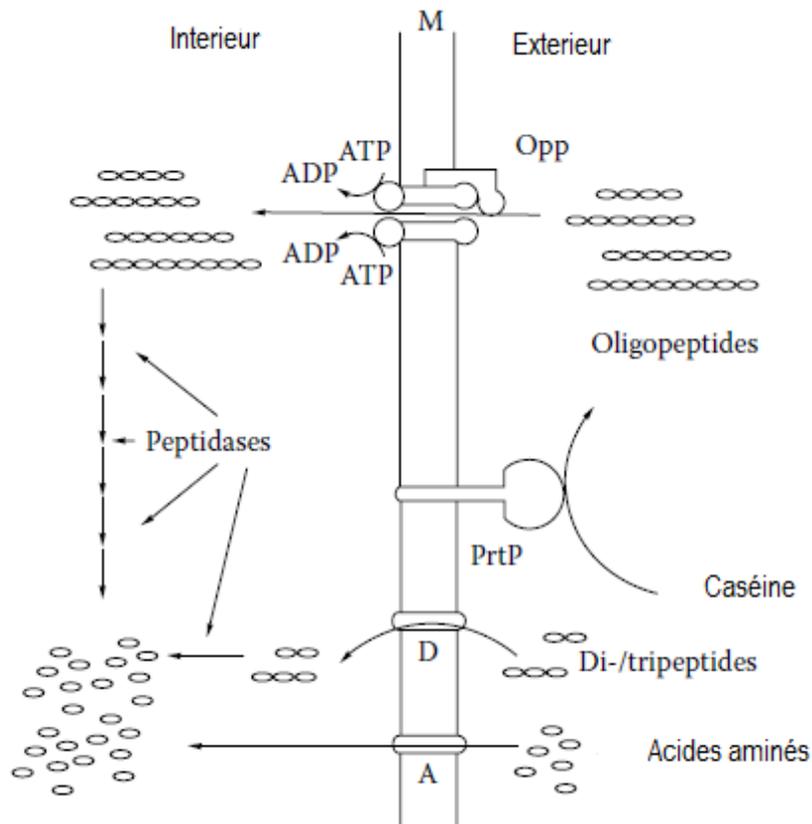
intervenir des systèmes de transport et des hydrolases spécifiques, aboutissant aux monosaccharides correspondants, qui s'engagent dans la voie commune, bien que les études y afférentes restent peu développées (Halász, 2009).

### 1.8. Métabolisme de l'azote : Système protéolytique

Certaines BAL<sub>(s)</sub> du secteur laitier sont dotées d'une activité protéolytique, qui leur permet de se procurer des acides aminés à partir de la caséine du lait, étant donné que ceux-ci manquent dans le lait (Savijoki et al., 2006 ; Holzapfel et al., 2014). Outre les principales voies métaboliques décrites précédemment, les BAL<sub>(s)</sub> sont capables de métaboliser l'azote, qui en général, est associé à l'hydrolyse et à la synthèse des protéines. Ce processus revêt une importance particulière, notamment dans la production de fromage. Par ailleurs, l'activité caséinolytique repose sur la sérine protéinase (PrtP) de type subtilisine de la paroi cellulaire. Cette enzyme décompose la caséine en oligopeptides de taille variable, les peptides de 4 à 18 acides aminés sont transportés au moyen d'un système de transport oligopeptidique (Opp), un transporteur ABC, tandis que des systèmes de transport di- et tripeptidiques permettent le transport des plus petits peptides (Von Wright et al., 2019).

Concernant les aminoacides, le rôle de la transaminase et de la décarboxylase y est important. Outre ces deux enzymes, les lyases et les déshydrogénases jouent un rôle dans le métabolisme des acides aminés des bactéries lactiques. Par exemple, ces dernières, peuvent convertir l'acide glutamique en acide  $\gamma$ -aminobutyrique sous l'action de la décarboxylase, les produits issus de ce métabolisme servent de précurseurs aux composés aromatiques, lesquels contribuent fortement à la saveur finale des produits alimentaires (Wu et al., 2019). En outre, le pouvoir protéolytique des BAL<sub>(s)</sub> se traduit aussi en autres molécules, tels que les peptides bioactifs, dotés de fonctions en rapport aux vertus probiotiques des BAL<sub>(s)</sub> (Kowalczyk et al., 2016).

*Lactococcus lactis* constitue le modèle le plus étudié pour la protéolyse de la caséine, le transport, la peptidolyse et leur régulation (Savijoki et al., 2006). La figure ci-dessous illustre le schéma général de ce système protéolytique.



**Figure1-4 Modèle de la voie protéolytique chez *L. lactis*.**

Le transport des di- et tripeptides et des acides aminés libres est également inclus, bien que leur rôle dans la croissance du lait soit limité. **PrtP**, protéinase ancrée dans la membrane ; **Opp**, système de transport des oligopeptides ; **D**, système(s) de transport des di-/tripeptides (il convient de noter que le système de transport des dipeptides est un transporteur **ABC** comme Opp) ; **A**, système(s) de transport des acides aminés ; **M**, membrane cytoplasmique (Savijoki et al., 2006)

### 1.9. Métabolisme lipidique

Comparativement à d'autres espèces bactériennes, les BALs ne sont pas très lipolytiques, toutefois, certaines souches telles, *S. thermophilus*, les lactobacilles ont montré une capacité d'hydrolyse d'esters (Medina et al., 2004 ; Georges et al., 2008). Les lipides jouissent d'un rôle primordial dans la saveur du fromage en tant que source d'acides gras libres (AGL) susceptibles d'être catabolisés en d'autres composés aromatiques (par exemple, les méthylcétones) et en servant de solvant pour les composés sapides (Gobbetti et al., 2007). Les enzymes lipolytiques sont les estérases ou les lipases, lesquelles se différencient par trois caractéristiques principales: (i) la longueur de la chaîne acylester hydrolysée, (ii) la nature physico-chimique du substrat (émulsifié ou non), et (iii) la cinétique enzymatique.

Les estérases, hydrolysent avantagusement les esters formés avec des acides gras à chaîne courte (C2 à C8), et les lipases, agissant sur des substrats en émulsion contenant des acides gras à longue chaîne (plus de C8).

Les BALs possèdent des enzymes estérolytiques/lipolytiques intracellulaires aptes d'hydrolyser une série de dérivés d'acides gras libres. Ainsi, dans les fromages de type Cheddar et Dutch fabriqués à partir de lait pasteurisé, ces enzymes représentent les principaux agents lipolytiques (Gobbetti et al., 2007 ; Fox et al., 2017). En effet, la protéolyse des protéines et la lipolyse de la matière grasse du lait par les BALs représentent les principales altérations biochimiques affectant la saveur du fromage (Katz et al., 2002). En outre, le processus de lipolyse aboutit à la formation d'acides gras libres, dont la plupart, notamment ceux à chaîne courte, ont un fort goût typique (Cogan et al., 2002), lesquels constituent des précurseurs de composés aromatiques tels que les méthylcétones, les alcools secondaires, les esters et les lactones (Poltronieri et al., 2017). La contribution des BALs est relativement faible à la lipolyse, en revanche les cultures additionnelles, telles que celles des fromages affinés en surface, ont souvent une activité élevée dans la conversion des graisses. Le goût issu de la conversion des graisses revêt une importance particulière pour certains fromages à pâte molle comme le camembert et le roquefort (Poltronieri et al., 2017).

Lee et ses collaborateurs (1990), ont indiqué dans une étude que *L. casei*-subsp-*casei* LLG avait une forte activité estérolytique pour hydrolyser les graisses. Les *Lactococcus* spp. et les *Lactobacillus* spp. ont une activité lipolytique faible en comparaison à d'autres bactéries, telles que les *Pseudomonas*, et les moisissures.

Bien qu'il soit bien établi que les bactéries lactiques telles que les lactobacilles, les lactocoques, les entérocoques et les streptocoques contribuent à la formation des esters d'arômes via les systèmes estérase/lipase, le mécanisme fondamental demeure pratiquement inconnu (Wu et al., 2018).

### **1.10. Innocuité des bactéries lactiques**

Les aliments fermentés à base de bactéries lactiques actives furent consommés il y a environ mille ans. En fait, leur introduction dans la chaîne alimentaire visait initialement à abaisser le pH afin de prolonger la durée de conservation des aliments, étant donné que celles-ci produisent de l'acide lactique (Salminen et al., 2012), en outre certaines souches sont aussi productrices d'acide acétique, d'éthanol, de composés aromatiques, de bactériocines, d'exopolysaccharides et d'enzymes importantes (telles les protéases), contribuant ainsi à inhiber les microorganismes pathogènes et limiter les risques d'altération, tout en améliorant la texture et les qualités sensorielles du produit (Chen et al., 2019 ; Hill et al., 2017).

Parallèlement, les propriétés fonctionnelles et physiologiques diverses que possèdent les BAL<sub>(s)</sub> ne se limitent pas à la préservation des aliments, mais permettent en outre d'améliorer leur qualité fonctionnelle, et par conséquent la santé du consommateur (Chen et al., 2019), qui dispose désormais de toute une gamme d'aliments fermentés salubres, sains et savoureux. On considère souvent que les BAL<sub>(s)</sub> sont des microorganismes sans danger inhérent à la consommation humaine, que ce soit directement et/ou à travers leurs métabolites (Obis et al., 2019).

La sécurité des bactéries lactiques est due en partie à leur existence en tant que microbiote commensal normal ainsi qu'à leur présence au fil des générations sans conséquences négatives. *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *Lc. lactis subsp. cremoris*, *Lc. lactis subsp. lactis*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp. lactis* et *L. fermentum*, sont autant d'exemples de probiotiques inoffensifs (Chen et al., 2018), toutefois, des rapports ont associé certaines BAL<sub>(s)</sub> appartenant surtout au groupe des *Enterococcus*, à des infections cliniques, en particulier l'endocardite. Par ailleurs, entre 0,05 % et 0,4 % des infections (endocardite ou bactériémie) sont causées par d'autres BAL<sub>(s)</sub>, telles que les *Lactobacilles* et les *Bifidobactéries*, alors que celles dues aux *Leuconostocs* ont été estimées à moins de 0,01 % (Salminen et al., 2012). En effet, grâce à leurs propriétés non pathogènes, les *Lactobacillus* et les *Bifidobacteries* restent les BAL<sub>(s)</sub> les plus souvent utilisées dans l'alimentation, car rarement associées aux infections courantes. Toutefois, les nouvelles souches lactiques dont l'innocuité fait défaut et qui n'ont pas un historique d'utilisation sûr doivent obligatoirement subir une évaluation rigoureuse, cela représente un défi en matière au développement alimentaire actuel et futur (Chen et al., 2019).

Bien que ces bactéries forment un groupe diversifié, une multitude d'espèces jouissent du statut GRAS (Generally regarded as safe) et QPS (Qualified presumption of safety) qui leur ont été attribués par la Food and Drug Administration (FDA) et l'European Food Safety respectivement (Hill et al., 2017). En effet, le défi de la salubrité microbiologique des aliments est un enjeu clef tant pour les pouvoirs publics que pour l'industrie alimentaire, il est donc essentiel d'évaluer la sécurité des ferments volontairement introduits dans les aliments, qu'ils soient destinés à la fermentation, à la conservation, ou à des fins probiotiques (Denis et al., 2013).

En bref, d'après Chen et Wang (2018), la vérification de l'innocuité des bactéries lactiques porte principalement sur les éléments suivants:

- a) Toute souche de bactérie lactique doit être sans équivoque et taxonomiquement définie et être classée dans une collection de culture internationale reconnue, accessible aux industriels, aux scientifiques et aux autorités pour garantir le contrôle de la dérive génétique des organismes et la comparaison aux isolats cliniques ;
- b) Toute nouvelle souche émanant d'une espèce aux propriétés pathogènes, toxigènes ou indésirables se doit d'être soumise à un examen minutieux et à un dépistage systématique de la résistance aux antibiotiques et de son transfert ;
- c) Les effets immunomodulateurs des bactéries lactiques nécessitent une évaluation dans des populations cibles définies ;
- d) Les bactéries lactiques présentes dans les additifs alimentaires pour animaux ou les produits vétérinaires doivent être évaluées de point de vue de leur sécurité dans la chaîne alimentaire humaine ;
- e) Le contenu, la durée de conservation, les attributs prétendus et la dose doivent être mentionnés avec exactitude sur l'étiquetage des produits à base de bactéries lactiques ;
- f) Dès l'introduction de nouvelles bactéries lactiques, des données sur leur absorption doivent être collectées, spécialement en cas de consommation à long terme ;
- g) Une surveillance épidémiologique des effets indésirables éventuels, notamment des infections, devrait être assurée ;
- h) La confirmation de son innocuité par la caractérisation des isolats cliniques en vue de leur comparaison avec des souches endogènes et probiotiques

### **1.11. Les BALs starters**

Le terme "culture starter" désigne une préparation microbiologique à base de nombreuses cellules contenant au moins un micro-organisme, incorporée dans une matière première en vue de produire un aliment fermenté, et de contrôler et d'accélérer ainsi la fermentation (Leroy et al., 2004).

Une culture starter consiste en une préparation microbienne active introduite volontairement lors du processus de fabrication pour initier certains changements souhaitables. Il peut s'agir de bactéries lactiques, de propionibactéries, de bactéries de maturation en surface, de levures et de moisissures (Hassan et al., 2001).

Les starters laitiers à base de bactéries lactiques servent essentiellement à piloter le processus de fermentation. Parallèlement, elles participent au développement des caractéristiques sensorielles et à l'amélioration de la qualité des produits (Carminati et al., 2010). En effet, outre leur production d'acide lactique, ce groupe de bactéries, génèrent

également d'autres substances, notamment l'acétaldéhyde, l'acide acétique et le diacétyl, dont le rôle est déterminant dans le développement des arômes des produits frais fermentés (Fox et al., 2017), offrant aussi une stabilisation de la flore microbienne intestinale (Chen et al., 2019).

Il existe plusieurs types de bactéries starters, cette catégorisation a été établie sur la base du nombre de souches, de la température de fermentation et des moyens de préservation.

**(i) Selon le nombre de souche**

**(i-a)** Starters mono-souche : Une seule souche est présente dans ce starter. Par exemple, pour la production du yaourt, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* sont les deux cultures de starters les plus courantes. Elles sont fermentées séparément, puis mélangées en proportions adéquates (Aghababaie et al., 2015).

**(i-b)** Starters multi-souches : En général, ce starter renferme davantage de souches, appartenant parfois à la même espèce ou à des espèces présentant des caractéristiques analogues. Par exemple, un starter multi-souches peut être constitué de *L. lactis* subsp. *cremoris/lactis* et de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Cremoris* (Chen et al., 2019).

**(i-c)** Starters mixtes: Une telle culture comporte de nombreuses souches inconnues, dont les proportions sont relatives au produit. Par exemple, les grains de kéfir forment un mélange de starters naturels, résultant d'une symbiose entre les levures et les BALs (Chen et al., 2019).

**(ii) Selon la température de fermentation** : Les cultures starters sont communément réparties en deux catégories : les cultures mésophiles, ayant une température optimale de ~30°C, et les cultures thermophiles, dont la température optimale se situe à ~42 °C. Les cultures mésophiles comportent essentiellement des souches de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, mais également, en nombre limité, des souches de *Lc. lactis* subsp. *lactis* et/ou de *Leuconostoc* sp. Parmi les cultures thermophiles, on compte le *Streptococcus thermophilus* et, selon le cas, le *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, le *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ou le *Lb. Helveticus* (Fox et al., 2017).

**(iii) Selon le moyen de préservation** : Pour maintenir à long terme la survie et les particularités initiales de la culture pure, on dispose de trois modes de conservation : **(iii-a)** les starters liquides, ces cultures sont habituellement stockées en milieu liquide (lait entier, lait écrémé, lactosérum, etc). **(iii-b)**, les starters en poudre, généralement issus par séchage avec ou sans concentration, en utilisant différentes méthodes, telles, le séchage sous vide, le séchage par pulvérisation, la lyophilisation et la lyophilisation concentrée. **(iii-c)**, les starters

congelés, il s'agit d'un concentré de cellules congelées dans diverses conditions, dont la congélation à -80 à -30 °C et la cryoconservation à -196 °C dans l'azote liquide (Chen et al., 2019). La liste des souches lactiques couramment exploitées dans les différents aliments fermentés est reprise dans le tableau ci-après.

**Tableau 1-5 Les souches lactiques et certains probiotiques présents dans divers aliments fermentés (Chen et al., 2019).**

Produits	Aliments	Souche lactique
Produits laitiers	Yogourt	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>
	Probiotique Yaourt	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofacies</i> , <i>Lb. brevis</i>
	Kéfir	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>
	Beurre et petit-lait	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
	Fromage à pâte dure non poreuse	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Légumes	Choucroute	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
	Cornichons	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i>
	Olives fermentées	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. plantarum</i>
	Légumes fermentés	<i>Lb. fermentum</i>
	Jus	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. xylosus</i> , <i>Lb. sakei</i>
	Olive	<i>Lb. brevis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosum</i>
Céréales	Pâtes fermentées	<i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Weissella cibaria</i>
Viandes	Saucisse fermentée (UE)	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i>
	Saucisse fermentée (US)	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Poissons		<i>Lb. alimentarius</i> , <i>Carnobacterium piscicola</i>

*Lb* Lactobacillus, *B* Bifidobacterium, *Lc* Lactococcus, *Leuc* Leuconostoc, *P* Pediococcus

## 1.12. Potentiel probiotique des BALs

Indépendamment de leur place dans la formulation des aliments, les BAL<sub>(s)</sub> sont associées aux surfaces des muqueuses, en particulier celles du tractus gastro-intestinal (GI), des cavités buccales et vaginales des humains et d'autres mammifères (Holzapfel et al., 1995 ; Franz et al., 2010). En majorité, les micro-organismes associés aux effets probiotiques sont issus d'aliments fermentés ou du microbiote intestinal humain, en effet, si la valeur nutritionnelle des aliments contenant des BAL<sub>(s)</sub> est significative, ceux contenant des BAL<sub>(s)</sub> probiotiques ont potentiellement un impact direct sur la santé (Salminen et al., 2001), en prévenant les maladies et favorisant la biorégulation des troubles du comportement tels que le stress et l'anxiété (Hill et al., 2017).

On a introduit dernièrement un nouveau terme - celui d'aliment fonctionnel, qui se rapporte aux aspects préventifs et/ou thérapeutiques des aliments, en dehors de leur qualité nutritionnelle. Une vaste gamme d'aliments fonctionnels a été développée récemment, dont un grand nombre fait partie de la production mondiale, tels que les aliments probiotiques, prébiotiques et synbiotiques, et ceux enrichis en antioxydants, isoflavones, phytos-terols, anthocyanes, à teneur réduite en graisses, en sucre ou en sel (Bastani et al., 2016).

### 1.12.1. Concept Probiotique

Le mot "probiotique" se réfère à un terme découlant de la combinaison linguistique du latin et du grec, où "**pro**" signifie "**pour**" et "**biotique**" signifie "**la vie**". Des définitions divergentes du terme "probiotique" ont été attribuées dernièrement, considérant leur mécanisme d'action et leur impact sur la santé humaine (El-Dalatony et al., 2020). Le concept initial de microorganismes probiotiques remonte à un siècle, quand le lauréat du prix Nobel **Ilya Metchnikoff (1908)** a affirmé dans son célèbre livre "*The Prolongation of Life*", que la longévité des paysans bulgares résultait de la consommation de produits laitiers fermentés. Selon Metchnikoff, cette longévité est associée à une réduction des bactéries productrices de toxines dans l'intestin suite à l'ingestion de yaourts à base de *Lactobacilles* (Naïma et al., 2015).

En 1965, Le terme probiotique a été inventé, pour désigner les composés engendrés par un microbe, ayant une influence sur le développement optimal d'autres microbes, par analogie au terme antibiotique. Le terme initialement utilisé pour désigner un probiotique, qui est actuellement en vigueur, les décrit comme étant des "Organismes et substances qui contribuent à l'équilibre intestinal"(El-Dalatony et al., 2020). Plus récemment, **Guarner et**

**Schaafsma (1998)** ont proposé une définition, adoptée par la FAO/OMS en 2002, qui décrit un probiotique comme "des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte".

La quantité appropriée de ces organismes diffère d'un pays à l'autre ; elle est estimée à  $10^7$  unités formant colonie (UFC)/g au Japon, alors qu'aux États-Unis, la norme exige  $10^8$  UFC/g pour qu'un produit soit étiqueté comme probiotique (De Vuyst, 2000) .

En outre, entre 2001 et 2002, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), ont établi à un consensus consistant à employer le terme "probiotique" uniquement pour les espèces microbiennes présentant des avantages évidents pour la santé sur la base d'études dûment contrôlées. Les produits commercialisés ne doivent porter que la mention "contient des probiotiques" , par ailleurs toute autre allégation relative au bienfait pour la santé demande à être justifiée (Hill et al., 2014).

Les probiotiques font partie des groupes de produits nutraceutiques, qui implique des microorganismes intacts. Ce groupe comprend essentiellement des bactéries (*Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *Bifidobacterium*), identifiées comme ayant un potentiel alimentaire fonctionnel et certaines levures dont *Saccharomyces boulardii* (Wildman Robert et al., 2007). Certaines bactéries non lactiques sont aussi considérées comme probiotiques (Mutukumira et al, 2015).

### 1.12.2. Un bref aperçu de l'histoire des probiotiques

**1890: Ernst Moro**, un médecin autrichien, a découvert une bactérie produisant de l'acide, le *Lactobacillus acidophilus*.

**1899: Henry Tissier**, un pédiatre français, a découvert les *bifidobactéries*.

**1907: Elie Metchnikoff** a constaté que la consommation de yaourt fermenté contribuait à améliorer le microbiote intestinal et la longévité des habitants des régions bulgares.

**1923: Saccharomyces boulardii** : un probiotique qui a été découvert par **Henri Boulard** en 1923. Il a aussi constaté l'effet de la consommation de litchi sur la santé humaine.

**1930** : Une nouvelle souche de *L. casei*, appelée *Lactobacillus casei* Shirota, est découverte par **Minoru Shirota**, puis un yaourt liquide contenant la même souche a été développé et nommé Yakult, après une inspiration des travaux de Metchnikoff.

**1965** : Le terme "probiotiques" a été donné pour la première fois par **RH Stillwell** et **DM Lilly**.

**1995:** le terme "prébiotique" est introduit pour la première fois, pour désigner les aliments stimulant la croissance naturelle des probiotiques et accentuant leur effet dans l'intestin humain.

**2002:** L'Organisation mondiale de la santé (OMS) et les Nations unies (ONU) reconnaissent officiellement les probiotiques comme des microbes exerçant des effets positifs chez les humains.

**2013:** Le <sup>Dr</sup> Ted Dinan a inventé le terme "psychobiotique" suite à des recherches sur l'effet de divers microorganismes sur l'humeur de l'hôte (effets psychiques) .

### 1.12.3. Critère de sélection

Les produits probiotiques se distinguent les uns des autres par leur valeur nutritionnelle et thérapeutique. Le terme "probiotique" est dénué de sens à moins qu'il contienne la bonne souche, en quantité suffisante, sous la bonne formulation et dans les conditions adéquates. C'est pourquoi il est primordial au préalable, de définir la souche, sa viabilité, ses critères d'implantation, ainsi que ses vertus santé (Dash et al., 2000). Pour être qualifié de probiotique, un micro-organisme doit satisfaire les critères suivants:

1. Pouvoir être produit à l'échelle industrielle
2. Pouvoir survivre durant le processus de production et de stockage
3. Pouvoir tolérer les conditions intestinales de l'hôte
4. Exercer des effets santé lorsqu'il est consommé (Homayouni, 2008).

**Tableau 1-6 Exemples de souches probiotiques largement utilisées (Khan et al., 2019)**

Genre	Espèce et souche	Référence
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. acidophilus</i> NCFM, <i>L. casei</i> Shirota, <i>L. reuteri</i> MM53, <i>L. rhamnosus</i> GR-1, <i>L. fermentum</i> RC-14	Reid (1999)
<i>Bifidobactéries</i>	<i>B. lactis</i> HN019, <i>B. longum</i> CECT 7210, <i>B. catenulatum</i> , <i>B. breve</i> Yakult, <i>Bifidobacterium bifidum</i> NCFB 1454, <i>B. animalis</i>	Vlasova et al. (2016)
<i>Bactéroides</i>	<i>B. uniformis</i> CECT 7771, <i>B. fragilis</i>	El Hage et al. (2017)
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i> 15B, <i>B. subtilis</i> CU1, <i>B. licheniformis</i> CH200	Elshagabee et al. (2017)
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i> FP4	Jäger et al. (2016)
<i>Clostridium</i>	<i>C. butyricum</i> MIYAIRI 588	SEKI et al. (2003)
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> K77D	Hanchi et al. (2018)
<i>Akkermansia</i>	<i>A. muciniphila</i>	Cani and de Vos (2017)
<i>Faecalibacterium</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Martín et al. (2017)

#### 1.12.4. Prebiotique, Postbiotique/ Parabiotique et Symbiotique

Le terme "**prébiotique**" a été donné en remplaçant "**pro**" par "**pré**", qui signifie "**avant**" ou "**pour**". Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non digestibles (inuline, oligofructose, stachyose, oligosaccharides et raffinose) (De Vuyst, 2000) , ayant un effet bénéfique sur l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité des bactéries du côlon et en améliorant ainsi la santé de l'hôte (Gibson et al., 1995 ; Homayoni et al., 2012). Les bactéries stimulées sont de nature bénéfique, à savoir les *bifidobactéries* et les *lactobacilles* (Leach et al., 2006), non affectés par les enzymes digestives humaines; ils sont toutefois fermentés par des probiotiques résidant le grand côlon et permettent ainsi la colonisation de micro-organismes bénéfiques. Pour être efficaces, les prébiotiques doivent résister à la digestion avant de parvenir au côlon et persister de préférence dans le gros intestin (Gibson et al., 1995). L'utilisation de prébiotiques est une alternative aux probiotiques ou un appui additionnel à ceux-ci. Toutefois, différents prébiotiques stimuleront différentes bactéries intestinales indigènes (Markowiak et al., 2017).

Les prébiotiques les mieux connus comprennent notamment les fructo- et non-fructo-oligosaccharides. À l'exception de l'inuline (mélange de fructo-oligo- et de polysaccharides), les prébiotiques identifiés sont des mélanges d'oligosaccharides non digestibles (c'est-à-dire des chaînes composées de 3 à 10 monomères glucidiques) (Anadón et al., 2016), Les prébiotiques habituellement exploités et les éventuels prébiotiques sont indiqués dans le tableau 1-7

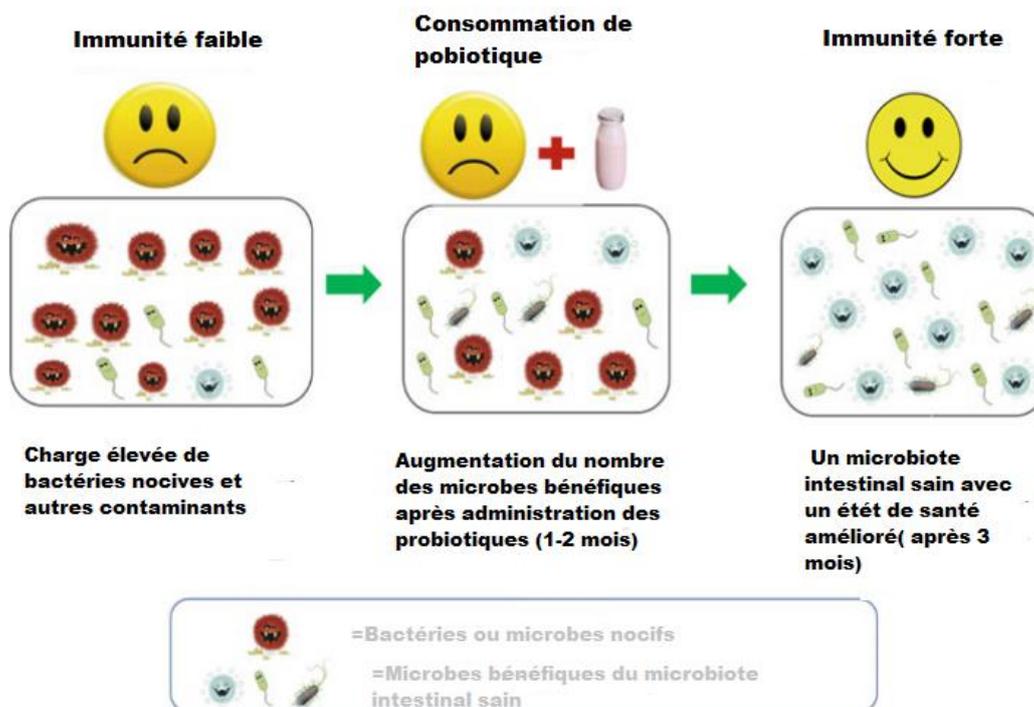
**Tableau 1-7 Prébiotiques courants et émergents des aliments fonctionnels (Anadón et al., 2016).**

<b>Prébiotiques connus</b>	Fructo- oligosaccharides (FOS), galacto-oligosaccharides (GOS), galacto-oligosaccharides (GOS)/oligosaccharides transgalacosylés(GOS/TOS), inuline, isomalto oligosaccharides, lactulose, pyrodextrines, soja-oligosaccharides (SOS)
<b>Prébiotiques émergents</b>	Gluko-oligosaccharides, isomalto-oligosaccharides (IMO), lactosucrose, levans, pectic-oligosaccharides, amidon résistant, sucro-alcools, xylo-oligosaccharides (XOS)

La microflore intestinale est étroitement affectée en présence des probiotiques, dont l'effet est intimement lié à celui des prébiotiques (Figure 1-5), lesquels remplissent divers rôles en

symbiose avec les probiotiques et en amplifient les effets comme suit (El-Dalatony et al., 2020) :

1. Outre la microflore intestinale, les prébiotiques ont une fonction éminente dans l'amélioration de l'absorption du calcium et du magnésium dans le corps, contribuant ainsi à augmenter la densité des os.
2. Les prébiotiques assurent la régulation de l'appétit en promouvant la digestion et le métabolisme des lipides, ce qui contribue à équilibrer la flore intestinale.
3. Aident au métabolisme des glucides.
4. Aident à réduire l'insulinorésistance.
5. Maintien des électrolytes tels que le sodium et le potassium, et certains minéraux pour contrôler la pression sanguine.
6. Équilibre des hormones.



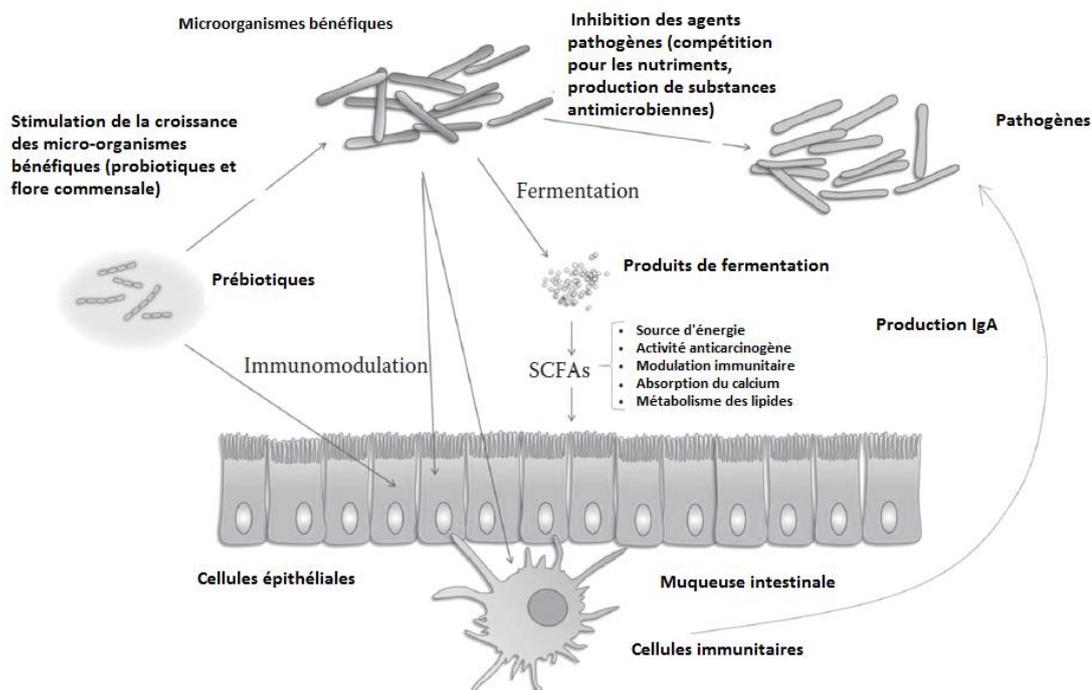
**Figure 1-5 Effets des souches probiotiques sur la microflore bénéfique et les pathogènes pour accroître le nombre de microbes bénéfiques et renforcer l'immunité sur une période donnée.**

Les vertus santé des probiotiques ont bien été démontré, ces organismes miraculeux, exercent un rôle à plusieurs niveaux, outre la restauration de la flore intestinale normale, la modulation du système immunitaire, ils ont été aussi impliqués dans l'adsorption et l'élimination des métaux lourds du corps humain. Toutefois, il est possible de multiplier ces

avantages en consommant parallèlement des prébiotiques pour créer un effet **symbiotique** (El-Dalatony et al., 2020).

Le terme "synbiotique" a été introduit en 1995 par Gibson et Roberfroid pour désigner une combinaison synergique de probiotiques et de prébiotiques, le principe est que le probiotique arriverait à la cible et qu'il proliférerait *in situ* utilisant le prébiotique (Gibson et al., 1995).

Les **post-biotiques/parabiotiques** se définissent comme des aliments fonctionnels contenant des molécules effectrices probiotiques sous forme de micro-organismes de type probiotique non viables, ou de lysats cellulaires apportant les bienfaits requis des probiotiques pour la santé. Ces post-biotiques incluent généralement des molécules dont l'acétaldéhyde, les bactériocines, les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène. Il ressort d'études récentes que même en l'absence d'organisme probiotique producteur, la présence de molécules effectrices dans l'alimentation témoigne des activités probiotiques. Par exemple, les postbiotiques à base de muramyl-dipeptide réduisent la résistance du foie à l'insuline et l'inflammation des tissus adipeux via le NOD2 (Naïma et al., 2015). Sur la figure ci-dessous sont illustrés les bienfaits liés aux **probiotiques, prébiotiques et postbiotiques**.



**Figure 1-6 Quelques mécanismes liés aux probiotiques et aux prébiotiques où plusieurs réponses bénéfiques sont induites chez l'hôte (Naïma et al., 2015)**

### **1.13. Probiotique et Covid 19**

Les infections respiratoires constituent la cause principale de décès et d'invalidité dans le monde, tant dans les pays en développement que dans les pays industrialisés (Lehtoranta et al., 2014). Ces deux dernières décennies, l'évolution et l'émergence des virus se sont sensiblement intensifiées du fait de leur mutation rapide. En effet, de nombreux facteurs sont à la base de l'émergence ou de la réémergence des virus, dont le nombre croissant de patients immunodéprimés, les changements climatiques, le manque d'agents antiviraux, les mouvements géographiques de plus en plus fréquents des personnes, ainsi que la transformation génétique des virus (Olaimat et al., 2020).

Les coronavirus (CoV) forment une grande famille de virus dont la surface est munie d'appendices en forme de couronne. Les coronavirus humains (CoV) ont été identifiés au milieu des années 60 (Khaled, 2020) . Le coronavirus 2 (SRAS-CoV-2) est un nouveau coronavirus responsable chez les humains d'une infection respiratoire, signalée pour la première fois à Wuhan, en Chine, en décembre 2019 (Olaimat et al., 2020).

Les probiotiques ont prouvé un puissant effet antimicrobien, ils ont même été proposés au cours des deux dernières décennies comme agents antiviraux lors des infections des voies respiratoires (Al Kassaa, 2017) . En effet, de nombreuses études cliniques ont été établies concernant la consommation de suppléments probiotiques lors des infections respiratoires, confirmant ainsi l'activité antivirale éventuelle des probiotiques (Zhang et al., 2015 ; Khan et al., 2019).

Les mécanismes d'action envisageables pour appuyer le rôle des probiotiques dans la lutte contre les virus respiratoires sont multiples. Mais les plus crédibles sont la modulation du système immunitaire inné et l'amélioration des réponses immunitaires acquises (Lehtoranta et al., 2014). D'ailleurs, grâce à cette activité immunomodulatrice, ces derniers sont désignés par "immunobiotiques".

Le fondement d'études antérieures sur les différentes infections virales, laisse suggérer qu'une alimentation saine et équilibrée et le recours à des compléments alimentaires tels que les vitamines, les minéraux, les fibres et les probiotiques, peut assurer une prévention contre les maladies infectieuses (Al Kassaa, 2017) .

***CHAPITRE 02 :***  
***EXOPOLYSACCHARIDES DES***  
***BACTERIES LACTIQUES***

Les polymères d'origine végétale, animale et microbienne sont des acteurs nécessaires à la formulation des aliments, parmi lesquels les polysaccharides microbiens retiennent de plus en plus l'attention depuis quelques années (De Vuyst et al., 2003), grâce à leurs propriétés uniques, et le fait qu'ils garantissent une offre de produits de valeur et de prix stable (Sutherland, 1990). Ces polysaccharides peuvent être produits par de nombreuses bactéries, levures et champignons (tableau 2-1). Ils sont présents sous forme de constituants cellulaires (par exemple, les parois cellulaires) ou sécrétés dans le milieu extracellulaire. Si leur intérêt est dû en premier à leur rôle dans l'infection (les antigènes O des lipopolysaccharides des bactéries Gram-négatives, comme facteurs de virulence ou l'adhésion), ils sont aussi utiles dans l'industrie et peuvent concurrencer d'autres polysaccharides végétaux et algaires, ainsi que des produits synthétiques (Sutherland, 1998).

### 2.1. Historique

Généralement, les polysaccharides microbiens sont présents sous forme de polysaccharides extracellulaires associés à la surface, à laquelle ils se lient de manière covalente, sous forme de capsules, et sont désignés exopolysaccharides capsulaires (CPS), ou sont sécrétés dans l'environnement sous forme de slime, et sont appelés exopolysaccharides mucilagineux (EPS) (Sutherland, 1998). Les CPSs sont visibles au microscope, alors que les EPSs conduisent à une viscosité du milieu. C'est au début des années 1950 que la production d'exopolysaccharides microbiens a commencé, suite à la découverte de la gomme de xanthane, produite par *Xanthomonas campestris*. Le xanthane reste l'exopolysaccharide microbien dont la capacité de production est la plus élevée au monde et sert en quelque sorte de modèle pour les nouveaux et les autres polysaccharides (Schmid et al., 2019 ; Selvi et al., 2019). Outre le xanthane, d'autres exemples d'EPSs microbiens revêtent un intérêt industriel, tels que les dextrans de *Leuconostoc mesenteroides*, le gellane produit par *Sphingomonas paucimobilis* (Non reconnu comme GRAS) (De Vuyst et al., 1999).

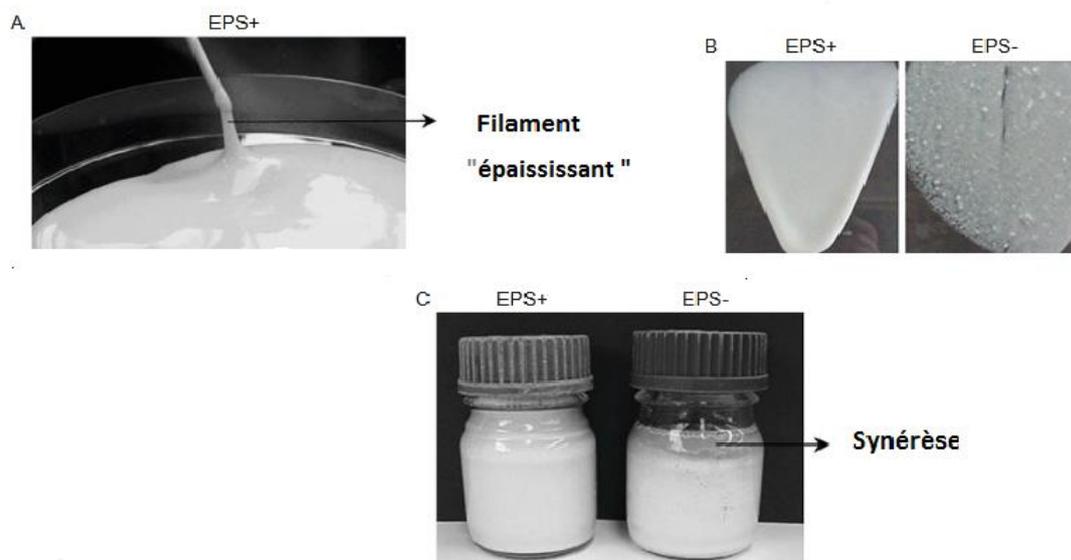
Tableau 2-1 Les principaux microorganismes producteurs d'EPSs (Vijayendra, 2015)

<i>Microorganismes</i>	<i>Exopolysaccharides</i>
<i>Acetobacter xylinum</i>	Acetane/cellulose
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Succinoglucane
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Curdlane
<i>Alcaligenes faecalis / Sphingomonas sp.</i>	Welane
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Alginate
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pullulane
<i>Epicoccum nigrum</i>	Epiglucane
<i>Grifola frondosa</i>	Grifolane
<i>Lactobacillus frumenti</i>	Fructane
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Mutane/reuterane
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	Levane
<i>Bactéries lactiques et levures</i>	Kefirane
<i>Pseudomonas aeruginosa / Lentinula edodes</i>	Lentinane
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Dextrane
<i>Pestalotia</i>	Pestolotane
<i>Saccharomyces sp.</i>	Glucane de levure
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zymosane
<i>Schizophyllum commune</i>	Schizophyllane
<i>Sclerotium glucanicum</i>	Scleroglucane
<i>Sphingomonas elodea</i>	Gellane
<i>Trametes versicolor</i>	Krestine
<i>Weissella confusa</i>	Inuline et fructane
<i>Xanthomonas campestris</i>	Xanthane
<i>Zymomonas mobilis</i>	Levane

Les EPSs microbiens offrent une alternative aux autres bio-épaississants, de propriétés physiques ou écologiques parfois insuffisantes mais dont la production et la commercialisation restent nettement moins coûteuses (Sutherland, 1998).

Les bactéries lactiques starters sont impliquées dans de multiples productions alimentaires, principalement, celle d'acide lactique, d'arômes, d'enzymes protéolytiques et de composés bioactifs, dont l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), les bactériocines, et les exopolysaccharides (EPS) (Chen et al., 2019). Les espèces lactiques productrices d'EPSs, offrent des applications utiles dans le secteur alimentaire, pharmaceutique et de la chimie

(Mende et al., 2020). En effet, depuis quelques temps, les EPSs provenant des BALs font l'objet d'un intérêt croissant grâce au statut GRAS et à leurs propriétés technologiques et physiologiques. Ces biopolymères contribuent à améliorer la rhéologie des aliments fermentés (viscosité et élasticité) comme agents bio-épaississants, émulsifiants, gélifiants et stabilisateurs physiques permettant de lier l'eau et limiter la synérèse, exemple des yaourts et les laits fermentés (**Figure 2-1**) ( Ruas-Madiedo et al., 2009). Ils peuvent en outre assurer une protection des cellules contre les phages, la dessiccation et le stress osmotique (Sutherland, 1998 ; Ruas-Madiedo et al., 2002), et jouent un rôle dans l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms, ainsi que dans la reconnaissance cellulaire (par exemple par liaison à une lectine) (De Vuyst et al., 1999). Actuellement, seul le dextrane provenant de *Weissella* et *Leuconostoc* spp est commercialisé (Mende et al., 2020).



**Figure 2-1 Produit laitier fermenté avec une souche productrice d'EPS (EPS+) de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.**

(A) Augmentation de la viscosité et formation d'un filament " Épaississant ". (B) Texture lisse dans le produit contenant la souche EPS+ comparée à une rugosité dans le produit fermenté avec une souche non productrice d'EPS (EPS-). (C) La synérèse (libération du lactosérum) dans le produit laitier fermenté avec la souche EPS- par opposition à l'absence de libération du lactosérum dans le produit EPS+ (**Ruas-Madiedo et al., 2009**).

## 2.2. Classification des EPSs

Conformément à leur composition chimique, les EPSs des BALs peuvent être réparti en deux catégories principales:

(i) **les homopolysaccharides (HoPS)** composés d'un type de monosaccharide (D-glucopyranose ou D-fructofuranose), désignés respectivement comme glucanes et fructanes. La majorité de ces homopolysaccharides présentent une caractéristique commune: être synthétisés par des glycosucrases extracellulaires utilisant le saccharose comme donneur de glycosyles (fructose ou glucose) (Monsan et al., 2001).

(ii) **les hétéropolysaccharides (HePS)** composés d'unité répétitive, qui sont ramifiées (aux positions C2, C3, C4 ou C6) ou non ramifiées, et qui renferment de trois à huit monosaccharides, dérivés de monosaccharides ou monosaccharides substitués (De Vuyst et al., 2001 ; Farnworth et al., 2006). Cette catégorie d'EPSs est habituellement produite par des BALs présentant un profil mésophile et thermophile, tel que comme les mésophiles *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* et les thermophiles *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, et *Streptococcus thermophilus* (Chen et al., 2018). Le tableau ci-dessous regroupe des espèces de BALs, bifidobactéries et propionibactéries présentes dans les aliments, productrices d'homo-polysaccharides (HoPS) et d'hétéro-polysaccharides (HePS).

**Tableau 2-2 Espèces de BALs, bifidobactéries et propionibactéries présentes dans les aliments, produisant des homo-polysaccharides (HoPS) et des hétéro-polysaccharides (HePS) (Ruas-Madiedo et al., 2009).**

	Genre	Espèce
<b><u>HoPSs</u></b>		
$\alpha$ -glucane	<i>Lactococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>weissella</i>	<i>Lc. Lactis</i> <i>Lb. reuteri, Lb. sakei, Lb. fermentum, Lb. plantarum</i> <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum, Leu. citreum</i> <i>W. cibaria</i>
$\beta$ -glucane	<i>Lactobacillus</i> <i>Oenococcus</i> <i>Pediococcus</i>	<i>Lb. diolivorans</i> <i>O. oeni</i> <i>Pediococcus P. parvulus, P. damnosus</i>
Fructose	<i>Lactobacillus</i>  <i>Leuconostoc</i>	<i>Lb. acidophilus, Lb. panis, Lb. plantarum,</i> <i>Lb. reuteri, Lb. sanfranciscensis</i>  <i>Leu. mesenteroides</i>
Polylactane	<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

<b><u>HePSs</u></b>	<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. sakei</i> <i>Lb. sanfranciscensis</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. macedonius</i> <i>S. thermophilus</i>
	<i>Bifodobactéries</i>	<i>B. lactis</i> <i>B. longum</i>
	<i>Propionibactéries</i>	<i>Pr. acidipropionici</i> <i>Pr. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>

La masse moléculaire des EPSs des BALs se situe approximativement entre  $4,0 \times 10^4$  et  $6,0 \times 10^6$  Da, cette valeur constitue un des facteurs affectant ses caractéristiques de transformation (Cerning et al., 1992). En général, les EPSs des BALs ont une masse molaire et un rayon de giration (Rg) variables, suivant les souches et le type de polymère. Pour les HoPS, les valeurs de masse molaire rapportées dans la littérature se situent entre  $2,7 \times 10^6$  et  $2,2 \times 10^7$  Da pour les souches de *Streptococcus mutans*, et entre  $1,5 \times 10^5$  et  $3,5 \times 10^6$  Da pour les souches de *Lb. reuteri*. Les HePS étant généralement plus petits, les masses molaires sont comprises entre  $4,0 \times 10^4$  et  $9,0 \times 10^6$  Da pour les souches de *S. thermophilus*, entre  $1 \times 10^5$  et  $2 \times 10^6$  Da pour les souches de *Lc. lactis* spp. *cremoris*, entre  $2,5 \times 10^4$  et  $1,4 \times 10^6$  Da pour les souches de *Lb. rhamnosus*, et entre  $3,5 \times 10^5$  Da pour la souche *Bifidobacterium longum* BB-79 (Roberts et al., 1995 ; Ruas-Madiedo et al., 2005).

### 2.3. Biosynthèse et génétique des EPSs

Le processus de biosynthèse des EPSs se révèle complexe et nécessite la mobilisation de nombreuses enzymes et protéines (Vijayendra, 2015). En effet, les HePSs résultent de la

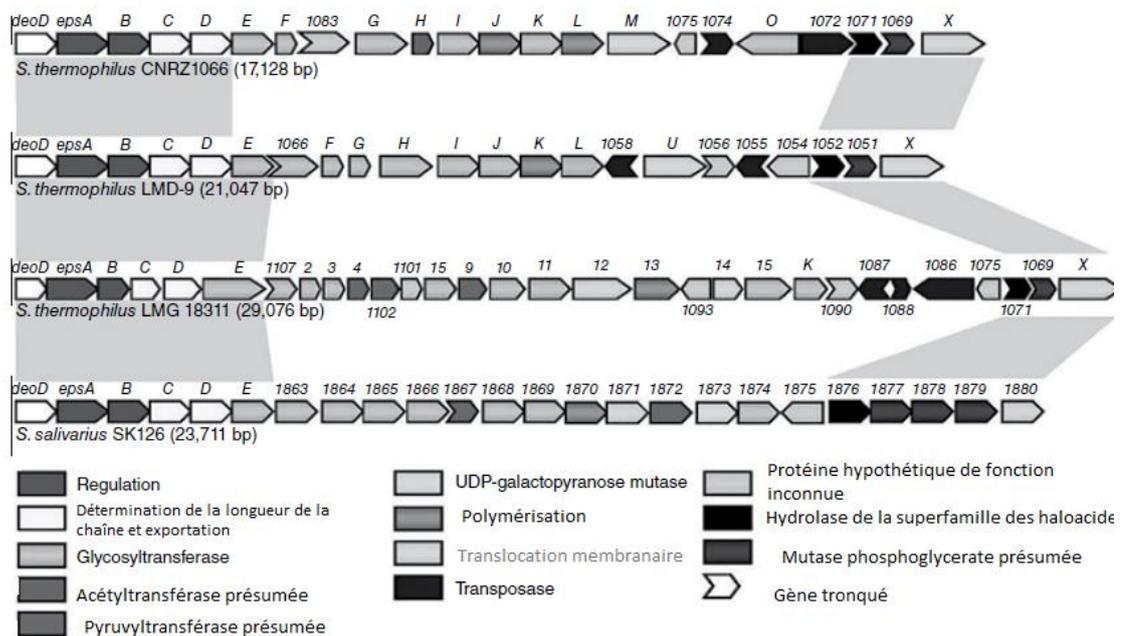
polymérisation de précurseurs d'unités répétitives formées dans le cytoplasme. Ils sont assemblés à la membrane par ajout successif de sucres nucléotidiques (par exemple, UDP-glucose, UDP-galactose et dTDP-rhamnose) ou de sucres nucléosidiques diphosphate à des motifs répétitifs en croissance grâce à l'action de glycosyltransférases spécifiques (Ruas-Madiedo et al., 2009). Le processus entier nécessite davantage d'énergie, par rapport à la synthèse des HoPSs, et permet de générer généralement moins de 2 g/ L. Les étapes de synthèse des HePSs sont les suivantes: (I) formation de sucres nucléotidiques activés (précurseurs) issus du métabolisme du carbone central, (II) formation et libération d'unités répétitives associées à la membrane cellulaire, et (III) polymérisation subséquente de l'HePS et transfert à l'extérieur de la cellule (Mende et al., 2020). Les HePSs sont constitués par un ensemble de sous-unités répétées, soit linéaires, soit ramifiées, ayant une masse moléculaire variable (jusqu'à  $10^6$  Da). Chaque sous-unité est susceptible ainsi de contenir de trois à huit monosaccharides distincts (sous la forme de l'anomère  $\alpha$ - ou  $\beta$ ) avec fréquemment plusieurs types de liaisons possibles. En effet, le D-glucose, le D-galactose et le L-rhamnose restent les plus courants. Mais parfois, la N-acétylglucosamine, le mannose, le fructose, l'acide glucuronique et les substitués non glucidiques (phosphate, acétyle et glycérol) y sont aussi présents (De Vuyst et al., 1999 ; Werning et al., 2012 ; Hutkins, 2019).

En outre, un design génétique complexe est impliqué dans la biosynthèse des HePSs, conjuguant des étapes intra et extracellulaires, ainsi que diverses enzymes intervenant dans la biosynthèse des unités répétitives, la sécrétion et la polymérisation (Jolly et al., 2001 ; Ruas-Madiedo et al., 2009).

La production des EPSs est codée par des gènes en clusters, ayant une structure particulière, avec des fonctions de régulation et de transport, souvent localisés sur les plasmides des BALs mésophiles et sur les chromosomes des BALs thermophiles (Figure 2-2) (Ruas-Madiedo et al., 2009 ; Hutkins, 2019). La localisation plasmidique de tels gènes, comme c'est le cas pour *L. lactis* subsp. *lactis*, justifie le caractère moins stable caractérisant la production des EPSs. En effet, il se produit habituellement un transfert de plasmides entre les cellules bactériennes par conjugaison, et insertion de séquences dans le chromosome. Il en résulte que la faculté en matière de production d'EPS risque de se perdre. Dans le cas de la plupart des BALs thermophiles (par exemple, *S. thermophilus*), le codage chromosomique des gènes d'EPS assure une production plus régulière. Les chromosomes bactériens concernés codent en outre pour la plupart plus d'une voie de biosynthèse des polysaccharides, ce qui fait

que l'EPS est susceptible de varier, et dépend de certains paramètres tels que les conditions de culture (source de carbone ou d'azote, pH, température, etc.) (Mende et al., 2020).

Ces gènes sont organisés en eps clusters, dont le l'organisation structurelle est hautement préservée (Ruas-Madiedo et al., 2009). En général, les clusters de gènes d'HePS comprennent quatre zones : dont la première porte des gènes régulateurs, la seconde codant pour les protéines intervenant dans la polymérisation et la détermination de la longueur de la chaîne, la troisième portant les gènes codant pour les GTFs (glycosyltransferases) requis expressément pour l'assemblage du motif répétitif ; quant à la quatrième région, elle inclut les gènes engagés dans le transport et la polymérisation (Hutkins, 2019) .



**Figure 2-2** Comparaison du groupe de gènes eps entre trois souches de *Streptococcus thermophilus*, la similarité avec *Streptococcus salivarius* est également montrée ( Hutkins, 2019) .

La synthèse des HoPSs a lieu à l'extérieur de la cellule par le biais d'enzymes appelées glycosyltransférases utilisant le saccharose en tant que substrat spécifique pour le don de glycosyle (Fru ou Glc). Toutefois, cette catégorie de polysaccharides ne comprend qu'un seul type de monosaccharide, le fructose ou le glucose, soit respectivement les fructanes et les glucanes (Monsan et al., 2001). En effet, les HoPSs comprennent quatre sous-groupes, à savoir **(a)** :  $\alpha$ -D-glucanes (ex : dextranes), **(b)** :  $\beta$ -D-glucanes, **(c)** : les fructanes (levanes), **(d)** : autres, comme les polygalactanes, qui sont composés d'unités répétitives structurellement identiques

avec des liaisons glycosidiques différentes (Figure 2-4) (De Vuyst et al., 1999 ; Werning et al., 2012).

En outre, la biosynthèse des glucanes et des fructanes fait intervenir des enzymes appelées respectivement glucosyltransférases (GTF) et fructosyltransférases (FTF). Par le biais des FTF ou des GTF, la métabolisation du saccharose sert non seulement à la formation de l'EPS, mais a aussi une incidence sur l'équilibre redox intracellulaire et la production d'énergie. La figure 2-3 résume les principales réactions mises en jeu dans ces voies métaboliques.

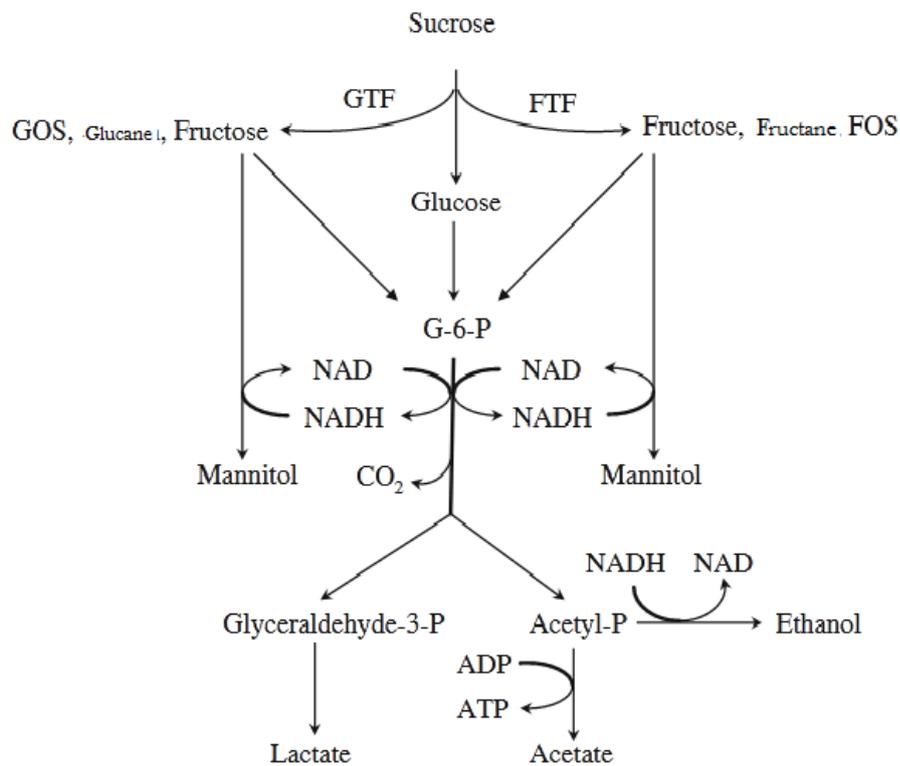
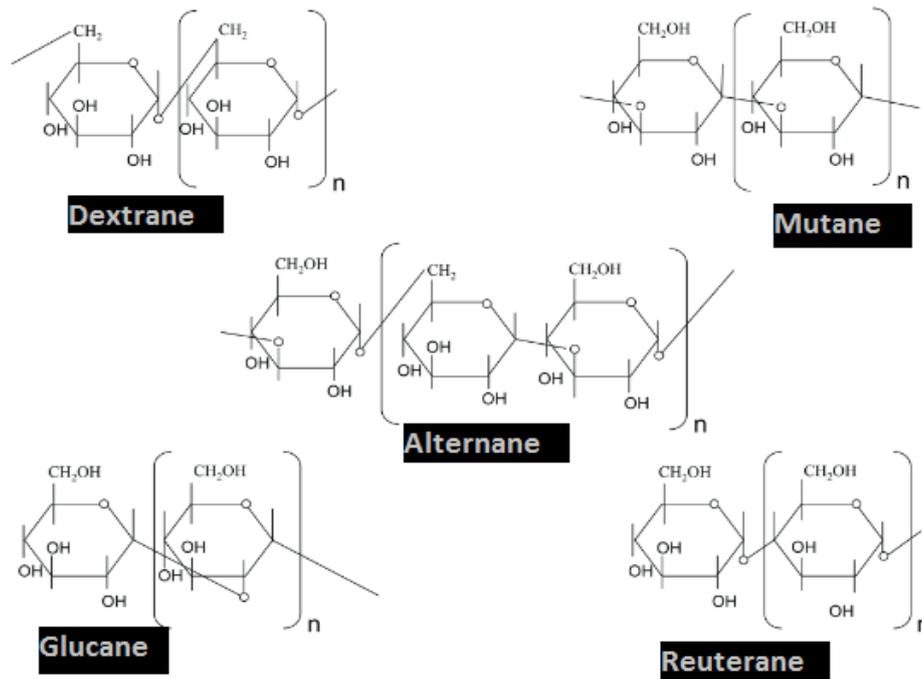


Figure 2-3 Métabolisation du saccharose via GTF et FTS

Les HoPSs sont habituellement de hauts poids moléculaires (jusqu'à  $10^7$  Da), présentant divers degrés et types de ramification, sites de liaison et longueurs de chaîne. Sur la base de leur structure, il est possible de répartir les fructanes en deux groupes : (i) les inulines (liées en  $\beta$ -2,1) et (ii) les levanes (liées en  $\beta$ -2,6), les deux étant synthétisés par diverses espèces des genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Weissella* (Werning et al., 2012).



**Figure 2-4 Représentation schématique des unités répétitives de : dextrane, mutane, alternane, glucane et reuterane (Korakli et al., 2006).**

#### 2.4. Rendement en EPS produit par les BALs

La production totale des EPS issue des BALs est fonction de plusieurs facteurs : la composition du milieu de culture (sources de carbone et d'azote et autres nutriments), les conditions de croissance (pH, température, concentration d'oxygène, etc.) et la durée d'incubation (De Vuyst et al., 1999 ; Ruas-Madiedo et al., 2009). Par ailleurs, à cause de la multiplicité des moyens de quantification disponibles, les rendements typiques en EPSs sont difficilement déterminables pour des espèces spécifiques de BALs (Cerning et al., 1992).

Les BALs produisent généralement des quantités élevées d'HoPs, dont la teneur peut atteindre 10 g par litre pour certaines souches comme *Lactobacillus reuteri* LB121. En revanche, les HePSs issus des BALs et des bifidobactéries sont générés à des taux plus faibles pouvant aller de 25 à 600 mg par litre, dépendant de la souche (Ruas-Madiedo et al., 2009).

Les quantités d'EPS produit par certaines souches lactiques d'intérêt industriel sont les suivantes. 50-350 mg/L pour *Streptococcus thermophilus*, 80-600 mg/L pour *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 60-150 mg/L pour *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 50-60 mg/l pour *Lactobacillus casei*, 140 mg/L pour *L. plantarum*, plus de 200 mg/L pour *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 et certains *Lactobacillus* spp, 196 mg/L pour *Lactobacillus mucosae* DPC 6426, 304 mg/L pour *L. plantarum* BC-25, 68,69 mg/L pour *Lactobacillus sicerae*, 37,98 mg/L pour *Lactobacillus collinoides*, et 737 mg/L pour *L.*

*rhamnosus*. Par ailleurs, le rendement le plus élevé en HePS a été enregistré pour *L. plantarum* BR2, 2775 mg/L pour *L. rhamnosus* RW-9595M, et 2200-2500 mg/L pour *L. kefiranofaciens* (Harutoshi, 2020).

### 2.5. Exploitation des EPSs des bactéries lactiques : Effet prébiotique

La recherche s'est récemment penchée sur le potentiel des EPSs isolés et purifiés pour renforcer les attributs techno-fonctionnels des aliments, grâce à leur effet viscosifiant, et leur forte capacité à lier l'eau (Mende et al., 2020). Les EPSs générés par les BALs sont utilisés comme additifs alimentaires, en tant que texturants. On leur attribue en outre de nombreux bienfaits pour la santé des humains et des animaux, dont l'effet immunomodulateur, antiviral, antioxydant et antihypertenseur, et antitumoral (Patel et al., 2012 ; Harutoshi, 2020).

Les fibres alimentaires constituent un ingrédient non digestible des plantes, des fruits et des herbes marines. Leur avantage reconnu pour la santé consiste à prévenir ou à soulager la constipation. Par ailleurs, elles peuvent constituer une véritable source d'énergie pour la microflore intestinale (Crociani et al., 1994). Les fibres alimentaires comprennent principalement des EPSs. En effet, plusieurs oligosaccharides sont considérés comme des prébiotiques (Rabiu et al., 2001), stimulant sélectivement la croissance et l'activité de certaines espèces bactériennes dans le côlon, telles que les bifidobactéries et les lactobacilles, et par conséquent, contribuent à préserver la santé de l'hôte (Rabiu et al., 2001 ; Harutoshi, 2013).

À titre d'exemple, il a été démontré que  $\alpha$ - Le D-glucane, élaboré par *L. plantarum*, s'est révélé résistant lors de son passage dans le tube digestif et a stimulé la croissance de *Bifidobacterium infantis* et de *L. acidophilus*, tandis que les Enterobacteriaceae non probiotiques ont été inhibées. D'autres part, pour certains EPSs des BALs (*P. parvulus*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*), un effet anticholestérol a été rapporté. En supposant que cette réduction est due à l'élimination de la bile et l'assimilation ou la conversion du cholestérol par liaison directe ou la promotion de la production d'acides gras (Mende et al., 2020).

La production optimale d'exopolysaccharides microbiens échappe évidemment à toute règle générale. Cela dépend fortement de la souche productrice ainsi que des particularités physico-chimiques du polysaccharide en question. Toutefois, le caractère pathogène de certaines souches productrices d'EPSs extrêmement intéressant dans un cadre technique, les rend impropres à la production industrielle. Aussi, le manque de méthodes d'analyse définies

et standard pour les produits finaux et la comparaison de souches de production spécifiques reste un inconvénient de taille dans le cadre de la recherche sur les exopolysaccharides. Par conséquent, il est recommandé d'établir une optimisation du protocole de production, de purification et d'analyse des EPSs en vue d'obtenir des résultats comparables.

La configuration et la composition des EPSs des bactéries lactiques varient souvent, conférant ainsi aux produits santé des qualités fonctionnelles exceptionnelles. Toutefois, comme ces bactéries sont peu productrices d'EPS, leur application est limitée aux additifs de qualité alimentaire. Par conséquent, des paramètres de fermentation contrôlés, combinés à un suivi métabolique et génétique de leur synthèse, sont susceptibles de contribuer à améliorer leur rendement (Liu et al., 2018).

***CHAPITRE 03 :***  
***TECHNOLOGIE D'IMMOBILISATION ET***  
***NOTION DE BIOFILM***

Le secteur alimentaire est tributaire en permanence d'un processus d'innovation, lequel est entretenu par la collaboration des scientifiques, des ingénieurs, des entrepreneurs et des consommateurs. Le développement de la technologie d'immobilisation représente un excellent exemple de succès (Kosseva, 2011) , il s'agit d'un champ captivant de l'industrie alimentaire ayant évolué et progressé rapidement ces dix dernières années (Mitropoulou et al., 2013). Cette approche est utilisée avec efficacité dans divers processus biotechnologiques de fermentation, notamment dans l'industrie laitière (Heidebach, 2010). Ainsi la technologie d'immobilisation des probiotiques a pour application thérapeutique la plus excellente, la diffusion maîtrisée et continue de cellules dans l'intestin. Ce qui permet de maintenir une viabilité cellulaire accrue malgré l'acidité de l'estomac, et d'apportent un bénéfice pour la santé de l'hôte, étant donné que les cellules sont viables (Mitropoulou et al. , 2013).

### **3.1. Définition du terme immobilisation**

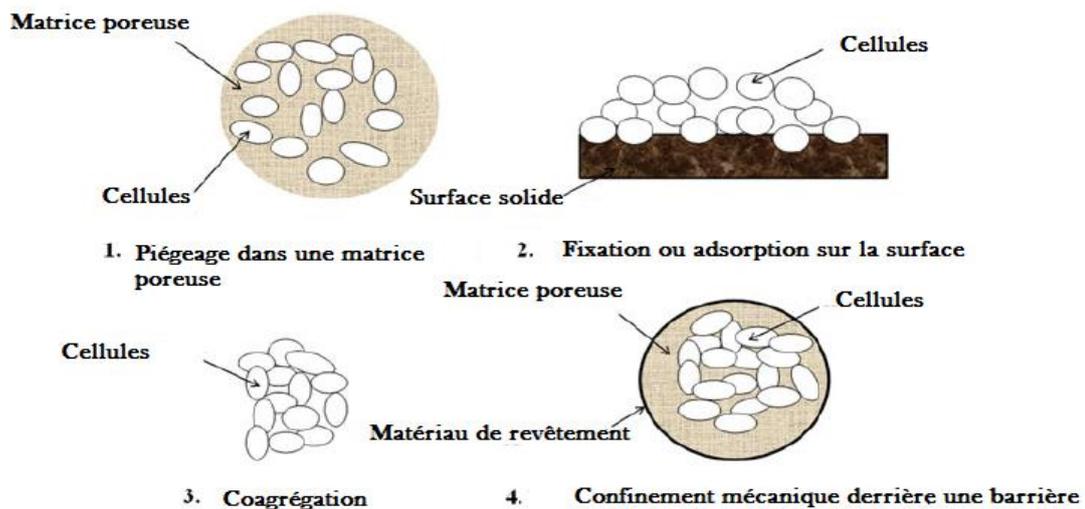
Par immobilisation cellulaire, on entend " la fixation physique ou un confinement de cellules intactes dans un espace déterminé tout en préservant la même activité catalytique souhaitée " (Gallo et al., 2016). D'après Sikyta (1995), la biotechnologie d'immobilisation peut être définie comme "la fixation ou l'immobilisation de molécules biologiquement actives (enzymes, antigènes, anticorps, antibiotiques, etc.) ou de cellules dans une phase séparée permettant un échange avec la phase principale qui contient le (s) substrat (s) et produit (s) dispersés ou dissous. Selon Bergmaier (2002), l'immobilisation est appliquée pour maintenir les cellules microbiennes dans un système de fermentation et atteindre des fortes densités de biomasse.

### **3.2. Techniques d'immobilisation**

Étant donné que de nombreux procédés biotechnologiques sont avantageusement favorisés grâce aux techniques d'immobilisation, bon nombre de méthodes et de supports sont proposés. Toutefois, il n'existe pas de méthode idéale, mais chacune présente des inconvénients et des avantages spécifiques, par conséquent il convient de trouver une procédure d'immobilisation simple et peu coûteuse (Kosseva, 2011 ; Gallo et al., 2016).

Les techniques d'immobilisation ressemblent au modèle naturel ; en réalité, la plupart des microorganismes sont aptes à adhérer et à survivre sur diverses surfaces, et les cellules qui s'y trouvent peuvent donc se développer. En fonction du mécanisme physique mis en œuvre, les méthodes d'immobilisation peuvent être catégorisées en quatre (Figure 3-1).

- Fixation ou adsorption sur des supports solides par adsorption physique due à des forces électrostatiques ou par liaisons covalentes entre la membrane cellulaire et le support.
- Auto-agrégation par floculation (naturelle) ou avec des agents de liaison artificiels.
- Piégeage dans une matrice poreuse dû à la pénétration des cellules jusqu'à ce que leur mobilité soit entravée par la présence d'autres cellules ou à la formation de matière poreuse *in situ* dans une culture cellulaire.
- Un confinement mécanique derrière une barrière qui peut être soit une membrane microporeuse, soit une microcapsule. La micro-encapsulation est appliquée depuis 1993 comme une alternative au piégeage, étant donné qu'elle présente l'avantage que les substances actives ne se fixent pas à la matrice et que le taux de libération est supérieur (Kosseva, 2011 ; Mitropoulou et al., 2013).



**Figure 3-1 Méthodes d'immobilisation (Mitropoulou et al., 2013)**

Considérant leur innocuité et leur utilisation industrielle potentielle, de nombreuses recherches investissent dans l'amélioration des attributs fonctionnels et technologiques des bactéries lactiques et des probiotique (Adhikari et al., 2000 ; Bergmaier, 2002 ; Kourkoutas et al., 2005 ; Aslim et al., 2009 ; Heidebach, 2010). Par ailleurs, contrairement à une application technique de l'immobilisation, la pratique dans l'industrie alimentaire est soumise à certaines exigences de sécurité imposées par des agences gouvernementales telles que l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) ou la Food and Drug Administration

(FDA). Ces préoccupations concernent les souches employées, la nature des matrices porteuses, les produits chimiques utilisés et les procédés de fermentation (Norton et al., 1994).

### **3.2. Conséquences physiologiques et morphologiques de l'immobilisation**

De nombreux facteurs environnementaux peuvent affecter le métabolisme des BALs, en effet, des facteurs tels l'oxygène, le pH, l'activité de l'eau et la concentration de glucose influençaient les schémas des produits de fermentation (Rhee et al., 1980). Toutefois, il existe certaines disparités dans les résultats expérimentaux, qui découlent en partie des différences dans les supports appliqués, les espèces bactériennes, les méthodes d'immobilisation ou les conditions de culture (Žur et al., 2016).

Dans une étude réalisée par De Vries et al. (1970), il a été signalé pour *L. casei* un passage de la voie métabolique de la fermentation homolactique à la fermentation hétérolactique, quand les cellules étaient cultivées en anaérobie avec une limitation du substrat. En effet, l'immobilisation est en outre connue pour altérer le métabolisme général des cellules. Ainsi une perte d'activité a été affichée avec des cellules immobilisées. Les rapports mentionnent habituellement des observations d'un comportement métabolique imprévu avec des cellules immobilisées, mais ces modifications restent peu interpréter (Krishnan et al., 2001; Žur et al., 2016). Le tableau ci-après énumère certains des changements physiologiques des cellules après immobilisation.

**Tableau 3-1 Effets de l'immobilisation des cellules sur la physiologie cellulaire  
(Zhu, 2007)**

<b>Réponses physiologiques à l'immobilisation</b>	
<b>Croissance cellulaire</b>	<p>Une croissance accrue, stable ou réduite</p> <p>Une augmentation, un maintien ou une diminution de la consommation de substrat et du rythme de formation des produits</p> <p>Augmentation de l'activité spécifique des enzymes extracellulaires ou intracellulaires</p>
<b>Tolérance aux inhibiteurs</b>	Tolérance accrue aux composés toxiques
<b>Composition cellulaire</b>	<p>Altération de la composition de la membrane ou de la paroi cellulaire et modification de la perméabilité de la membrane</p> <p>Des quantités élevées de glucides de réserve et de polysaccharides structurels</p>
<b>Génétique</b>	<p>Augmentation de la teneur en ADN et réduction de la teneur en ARN double brin</p> <p>Ralentissement de la dégradation de l'ARN total Expression différente de certains gènes liés au stress</p>

Comparée aux systèmes employant des microorganismes en suspension, la technologie des cellules immobilisées se distingue par ses innombrables avantages : usage en continu, plus haute densité cellulaire, meilleure activité métabolique, rétention des cellules à plasmides, prévention de l'inactivation interfaciale, meilleure productivité, protection contre l'acidification et les forces de cisaillement dans l'environnement, résistance aux métaux lourds, aux solvants, au pH et à la température (Ramakrishna et al., 1999 ; Žur et al., 2016 ; Mitra et al., 2016). Grâce à ces avantages attribués à l'immobilisation, divers bioréacteurs ont été conçus dans le but d'optimiser les procédés de fermentation. Le tableau ci-dessous illustre une comparaison entre la fermentation de cellules libres et celle des cellules immobilisée (Zhu, 2007).

**Tableau 3-2 Comparaison entre les fermentations de cellules libres et de cellules immobilisées (Zur et al., 2016)**

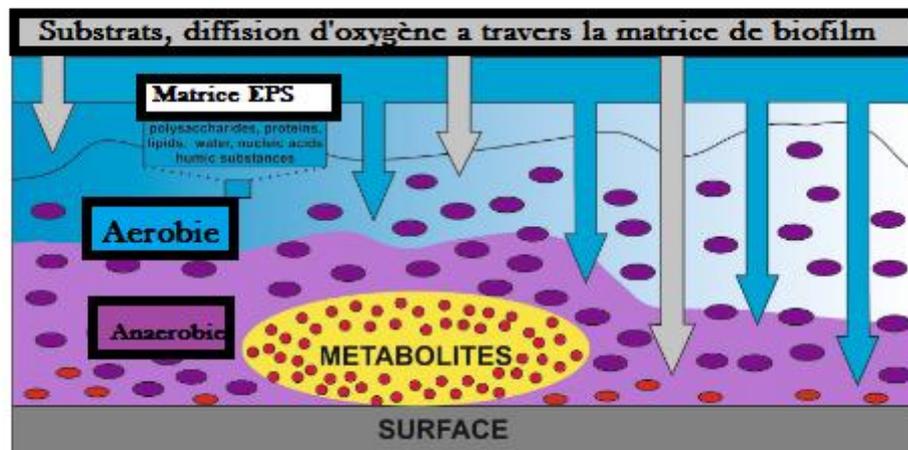
	Cellules immobilisées	Cellules libres
<b>Croissance cellulaire</b>	<p>Fermentation plus rapide grâce à la réduction de la phase de croissance non productive</p> <p>Densité cellulaire élevée Concentration élevée de substrat</p>	<p>Une fermentation plus lente car la production nécessite une croissance cellulaire</p> <p>Densité cellulaire faible Faible concentration de substrat pour éviter l'inhibition</p>
<b>Production</b>	<p>Productivité cellulaire élevée</p> <p>Rendement élevé des produits</p> <p>Concentration élevée du produit final Amélioration de la résistance des cellules aux substrats ou produits inhibiteurs</p>	<p>Faible productivité cellulaire</p> <p>Faible rendement des produits</p> <p>L'inhibition du produit entraîne souvent une faible concentration du produit final</p>
<b>Fonctionnement du processus</b>	<p>Mode de fonctionnement discontinu, continu ou par lots dans un bioréacteur immobilisé</p> <p>Pas de lavage des cellules en fermentation continue, même à un taux de dilution élevé</p> <p>Une taille de fermenteur plus petite est nécessaire en raison de la densité cellulaire élevée</p> <p>Conception simplifiée du processus grâce à la séparation des produits et des cellules</p> <p>Réutilisation des cellules pendant une période prolongée en raison de la régénération des cellules</p> <p>Stabilité opérationnelle à long terme et qualité constante des produits</p> <p>Réduction du risque de contamination microbienne</p>	<p>Fermentation en batch ou en fed-batch avec un réacteur à cuve agitée</p> <p>Difficile d'effectuer un processus continu en raison du lavage des cellules</p> <p>Un grand fermenteur est nécessaire</p> <p>Des étapes de séparation et de concentration efficaces sont nécessaires dans le traitement en aval</p> <p>Les cellules ne peuvent pas être réutilisées</p> <p>La qualité des produits varie d'un lot à l'autre</p> <p>Plus enclins à la contamination</p>

### 3.3. Notion de biofilm

#### 3.3.1. Définition et concept général

Les microorganismes sont principalement rencontrés dans les milieux naturels associés à des surfaces, créant ainsi des biofilms. Ces derniers font l'objet d'une hétérogénéité génétique et physiologique (Figure 3-2) et se caractérisent dans la matrice par une altération des microenvironnements (Žur et al., 2016).

On appelle biofilms les associations de microorganismes qui s'attachent les uns aux autres sur une surface enserrée dans une matrice extracellulaire autogénérée. Quasiment tous les microorganismes (99,9 %) ont la compétence de former un biofilm. Il s'agit d'un processus complexe, et consiste à transformer les cellules bactériennes de cellules planctoniques en mode de croissance sessile (Subramani et al., 2019).

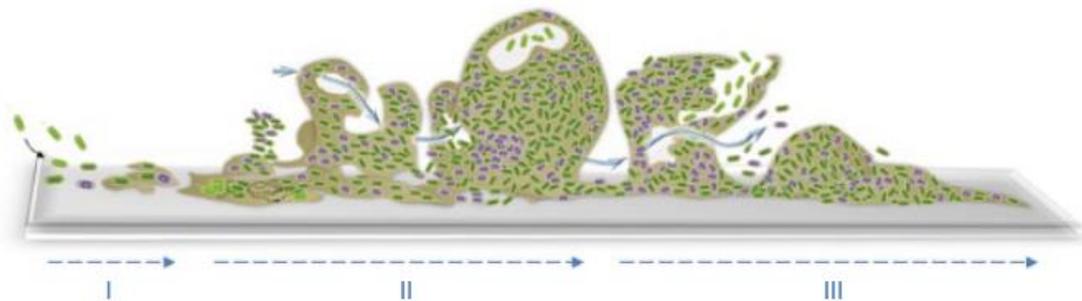


**Figure 3-2 Substrats et hétérogénéité oxygénique du biofilm (Žur et al., 2016)**

Deux phénomènes d'auto-assemblage sont observables dans les biofilms : l'auto-assemblage moléculaire et l'auto-assemblage colloïdal. Dans le premier cas, on distingue les associations entre les composants de la matrice et dans le second, la formation du biofilm lui-même, durant lequel les cellules se lient aux polysaccharides et aux protéines des substances polymériques extracellulaires (EPS) et produisent une matière visqueuse et élastique. Ce sont ces interactions colloïdales, qui sont à l'origine de la morphologie et de la mécanique du biofilm (Stewart et al., 2015 ; Žur et al., 2016). La formation d'un biofilm découle de l'expression de gènes spécifiques. Il s'agit d'une forme de stratégie adaptative permettant aux espèces bactériennes de survivre dans un environnement défavorable tout en instaurant avec leur hôte des interactions antagonistes ou avantageuses (Subramani et al., 2019).

### 3.3.2. Etapes de formation de biofilm

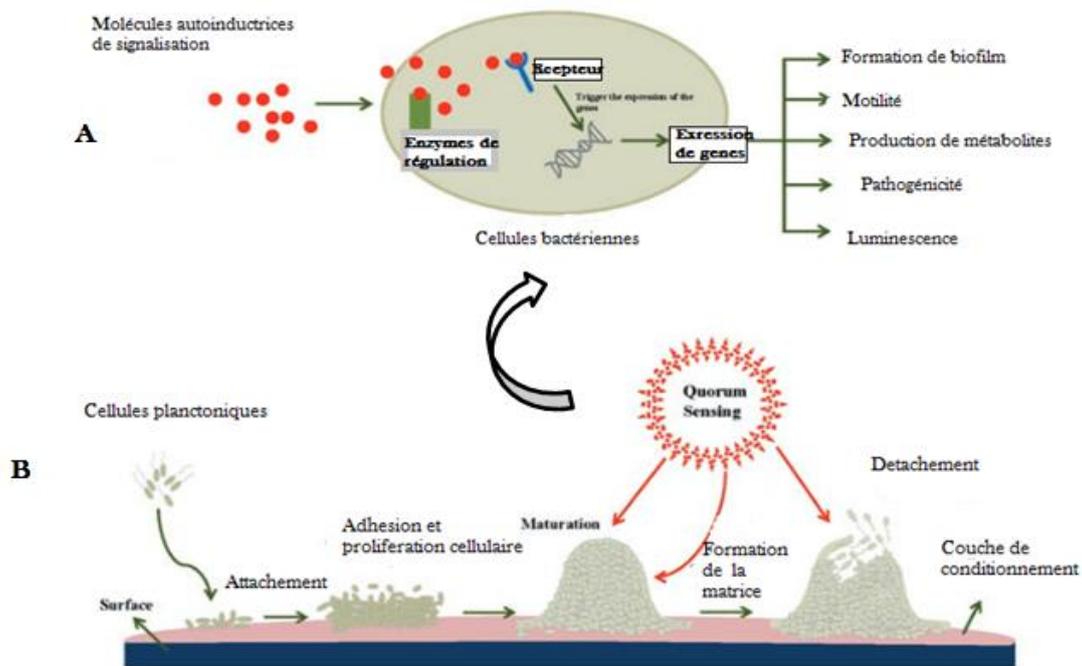
Le cycle de vie d'un biofilm se déroule en trois étapes principales, la fixation initiale des bactéries à une surface solide, la formation de micro-colonies à la surface et la différenciation de ces micro-colonies en biofilms matures encapsulés dans des exopolysaccharides (Cloete et al., 2009 ; Piard et al., 2015).



**Figure 3-3 Cycle de vie d'un biofilm (i) l'adhésion bactérienne, (ii) la maturation du biofilm par la biosynthèse de la matrice et la prolifération cellulaire, (iii) le déclin du biofilm et la dispersion cellulaire (Piard et al., 2015).**

La formation de biofilms peut se faire sur une grande variété de supports biotiques ou abiotiques. Ce mode de vie constitue pour les cellules microbiennes un refuge qui leur permet de mieux se protéger à la fois contre les environnements hostiles et les fluctuations du milieu, comme les variations de pH ou d'oxygène, la présence de biocides ou d'antibiotiques et la réaction de l'hôte dans le cas des biofilms biotiques. Ainsi, il a été estimé que les bactéries sessiles présentes dans les biofilms peuvent tolérer des concentrations de biocides 1000 fois plus élevées que leurs contreparties planctoniques (Žur et al., 2016). Un biofilm se compose majoritairement d'eau (80-90%), de substances polymériques extracellulaires (EPS) qui apportent 85-98% de la matière organique, les microorganismes, les particules organiques et inorganiques piégées, les substances adsorbées au EPS, les particules et les substances dissoutes dans l'eau interstitielle (Cloete et al., 2009).

Les communautés microbiennes, intra et inter-espèces, peuvent communiquer entre elles lors de la formation d'un biofilm via un mécanisme vital appelé "**Quorum Sensing (QS)**", il s'agit d'un processus de signalisation intercellulaire ou de communication entre cellules, par le biais de molécules de signalisation extracellulaires, que l'on appelle communément autoinducteurs (AIs). Les micro-organismes génèrent une vaste gamme de molécules de signalisation (auto-identifiées) de manière dépendante de la concentration afin d'induire ou de supprimer l'expression des gènes contrôlés par le QS (Figure 3-4) (Subramani et al., 2019).



**Figure 3-4 (A) Mécanisme général du quorum sensing lors de la formation d'un biofilm, (B) Processus de développement du biofilm (Subramani et al., 2019)**

### 3.3.3. Applications et problèmes liés au biofilm

Les biofilms posent un problème de taille dans différentes industries. En industrie laitière par exemple, ils sont désormais reconnus en tant que sources de contamination par des bactéries d'altération ou des microorganismes pathogènes, réduisant ainsi, la salubrité, la stabilité, et la valeur des produits (Bremer et al., 2015).

Toutefois, les biofilms peuvent être à la fois bénéfiques et néfastes. En effet, on distingue trois caractéristiques des biofilms susceptibles d'affecter les processus industriels : celles qui sont physiques (structurelles), chimiques (métaboliques) et biologiques (vivantes), ainsi, l'industrie peut tirer profit des biofilms en exploitant leurs activités métaboliques (Cloete et al., 2009).

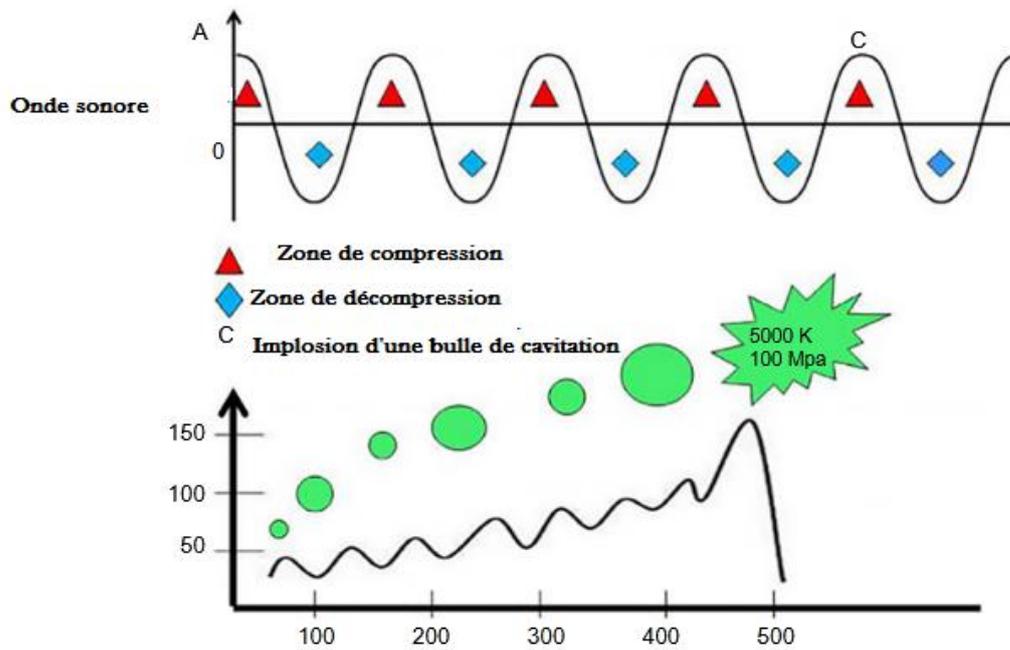
Un des aspects positifs des biofilms consiste en leur implication dans le traitement des eaux usées. En effet, les particules solides en suspension dans les eaux usées se colonisent rapidement par des biofilms bactériens avant de se décomposer (Cloete et al., 2009 ; Robertson et al., 2015). Cette stratégie se révèle également pratique pour traiter les eaux usées issues d'installations et d'usines de transformation des aliments (Robertson et al., 2015). Cette

approche semble avoir de faible coût d'exploitation, avec une manipulation aisée, et relativement moins d'effets néfastes sur l'environnement (Sehar et al., 2016).

### **3.4. Description de l'approche utilisée : la technologie des ultrasons**

Depuis quelques temps, plusieurs tentatives ont été conçues par les industriels afin de réduire le temps de transformation des produits alimentaires et prolonger leur durée de conservation. En effet, les techniques conventionnelles appliquées avaient pour effet la diminution des teneurs en nutriments et de leur biodisponibilité, en induisant des changements physiques et chimiques, ce qui minimise l'acceptabilité des propriétés organoleptiques. Par conséquent, des méthodes de transformation non conventionnelles ont été conçues dans l'industrie alimentaire en vue de maintenir les caractéristiques sensorielles, les nutriments et les composés bioactifs (Al Khawli et al., 2021), L'ultrason constitue une des techniques innovantes et alternatives.

Cette technologie est fondée sur l'application d'ondes mécaniques dont les fréquences sont supérieures à celles de l'audition humaine, allant de 20 kHz à 10 MHz et peuvent être classées en deux plages de fréquences : ultrasons de faible intensité (hautes fréquences entre 100 kHz et 1 MHz), et ultrasons de haute intensité (basses fréquences entre 20 et 100 kHz) (Leadley et al., 2006 ; Al Khawli et al., 2021). En effet, les faibles fréquences visent à moduler les propriétés physiques et chimiques des aliments en provoquant une pression, un cisaillement et une différence de température dans le milieu, susceptibles de produire des cavitations permettant d'extraire des composés bioactifs (Figure 3-5) (Agregán et al., 2018 ; Al Khawli et al., 2021).



**Figure 3-5 Effet mécanique des ultrasons " Cavitation" (Al Khawli et al., 2021)**

Dans cette étude, l'ultrason à faible fréquence (35 kHz) a été appliqué comme stratégie d'immobilisation dans le but de renforcer la productivité des EPSs, et d'améliorer certaines performances des bactéries lactiques. On suppose que l'exposition à une action mécanique telle que le traitement par sonication douce peut modifier la perméabilité des cellules sans les endommager, d'autre part, elle peut engendrer des cassures partielles au niveau du peptidoglycane, par conséquent, les protéines ancrées à la paroi et impliquées lors des phénomènes d'adhésion (adhésines), seront plus disponibles.

# ***PARTIE EXPERIMENTALE***

## ***CHAPITRE 04***

### ***MATERIEL ET METHODES***

#### 4.1. Objectif de recherche

La présente étude visait à développer et optimiser une technologie d'immobilisation permettant d'améliorer la productivité en EPS de deux bactéries lactiques à intérêt technologique, *S.thermophilus* et *E. durans*.

Pour atteindre cet objectif, les étapes ci-dessous étaient importantes :

- ✓ Évaluation du potentiel probiotique des souches lactiques, *S. thermophilus* CNRZ447, et *Enterococcus durans* isolée d'un produit fermenté local (Hamoum) ;
- ✓ Immobilisation des cellules bactériennes et optimisation des conditions liées à la sonication (Durée);
- ✓ Optimisation des paramètres physicochimiques aboutissant à une production maximale en EPSs ;
- ✓ Evaluation de l'effet de l'immobilisation sur quelques paramètres liés à l'adhésion, tels l'agrégation, rendement en EPS et la propension en biofilm ;
- ✓ Identification chromatographique de l'EPS produit

#### 4.2. Lieu du travail

La recherche expérimentale a été majoritairement réalisée en alternance dans le laboratoire de recherche "Bioconversion, Génie Microbiologique, et Sécurité Sanitaire" (BGMSS) de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Mascara et les laboratoires de Biochimie et de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Tiaret.

L'identification de la souche bactérienne isolée, a été faite au niveau du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques (CRPC) à Bou Ismail de Tipaza. L'analyse chromatographique du polymère produit a été menée dans le centre de recherche de l'université de Trakya, Edirne-Turquie.

#### 4.3. Matériels biologiques

##### 4.3.1. Souches lactiques

Les souches de bactéries lactiques utilisées dans la présente étude ont été choisies en raison de leur intérêt technologique potentiel, en particulier en industrie alimentaire. La souche starter de référence *S. thermophilus* CNRZ 447 a été obtenue de la collecte des micro-organismes du Centre National de Recherches Zootechniques INRA "Rennes-France". La deuxième souche lactique, *E. durans* a été isolée d'un produit fermenté de consommation locale, connu sous le nom Hamoum.

Pour évaluer la pureté de la souche *S. thermophilus* CNRZ 447, une culture a été réalisée sur gélose M17, en aérobiose à 42 °C. Avant chaque test une culture jeune d'une nuit a été préparée. Les colonies ont été prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et mises en suspension dans de l'eau physiologique stérile à une densité optique (DO) de 0,11 (Correspond à  $10^8$  UFC/mL) à une longueur d'onde de 578 nm (BIOCHROM Libra S6).

Quant à la seconde souche utilisée dans cette étude, elle a été isolée parmi de nombreuses espèces bactériennes et levuriennes du Hammou, selon les étapes décrites et publiées dans un travail antérieur (Drabo et al., 2019). Brièvement :

- Un échantillon de blé dur (Hammoum) a été collecté et débarrassé de tous corps étrangers (sable, cailloux, insecte..),
- 10g de cet échantillon ont été mis en suspension, dans 90mL d'eau distillée stérile
- Le mélange a été laissé 30 min puis secoué vigoureusement,
- 0.1 mL de la dilution  $10^{-3}$  a étéensemencé sur gélose MRS et M17,
- Plusieurs repiquages ont été réalisés sur milieu sélectif (M17), pour confirmer l'appartenance de l'espèce au genre suspect,
- La souche a été phénotypiquement identifiée, à travers l'observation macroscopique des colonies, et l'observation microscopique après coloration. Les différents tests biochimiques (Catalase, oxydase, LDH, ODC, ADH, ONPG...) ont été réalisés suivant les procédures décrites par Cowan (2004).

#### 4.3.2. Souches pathogènes

Les souches pathogènes testées dans la présente étude, sont *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Escherichia coli* (ATCC 25922), fournies par le laboratoire de recherche "Amélioration et Valorisation des Productions Animales Locales" de l'institut des Sciences Vétérinaires, Université IBN Khaldoun de Tiaret. Des cultures jeunes ont été réalisées dans les milieux appropriés, et les inocula ont été préparés par la suite.

#### 4.3.3. Identification MS-MALDI-TOF

L'isolement sur milieux sélectifs des BALs (MRS, M17), a conduit à deux espèces bactériennes, présentant des caractères biochimiques et microscopiques communs, aboutissant donc à un assortiment faible. Ces dernières ont été identifiées sur la base de leurs spectres protéomiques par Spectrométrie de Masse, - Désorption Ionisation Laser Assistée par Matrice - Temps De Vol (MS-MALDI-TOF) (Pavlovic et al., 2013). Les aliquotes des isolats ont été réalisés sur la gélose sélective MRS et M17 et ont été envoyés sous glacière au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques (CRAPC-Algérie). L'identification a été réalisée en utilisant le logiciel MALDI Biotyper.

4.4. Méthode

Les démarches expérimentales sont illustrées dans la figure 4-1.

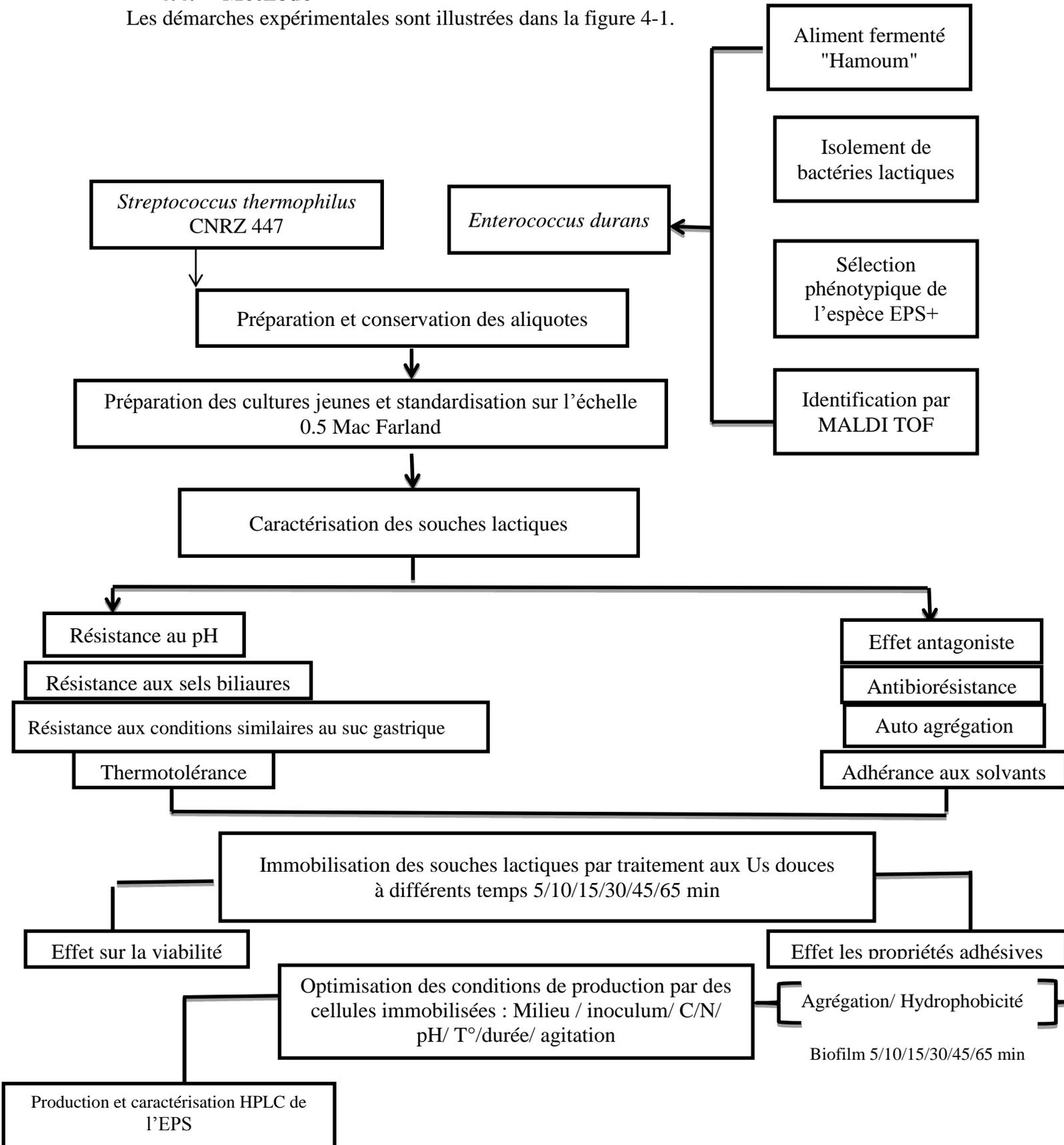


Figure 4-1 Démarche expérimentale

#### **4.5. Caractérisation des souches lactiques : Evaluation du potentiel probiotique**

L'usage des bactéries lactiques probiotiques n'est pas seulement limité à l'amélioration des propriétés sensorielles des aliments, mais elles sont également impliquées dans diverses applications, telles que les aliments fonctionnels, les vaccins et les préparations pharmaceutiques, ce qui impose la sélection des BALs robustes (Franz et al., 2011). En effet, pour être considérées comme probiotiques, les bactéries doivent survivre pendant les processus de transformation et de production des aliments (par exemple, résister au froid et à la chaleur) et préserver leur viabilité après avoir atteint le tractus gastro-intestinal (résister aux conditions acides et aux sels biliaires) afin que leur effet thérapeutique se répercute sur l'hôte (Van De Guchte et al., 2002 ; Franz et al., 2011).

Les méthodes habituelles permettant de procéder à la détermination *in vitro* du potentiel probiotique incluent notamment la tolérance au faible pH, la tolérance au sel biliaire, la sensibilité aux antibiotiques, l'activité antimicrobienne et la capacité adhésion (Wedajo, 2015 ; Mulaw et al., 2019).

##### **4.5.1. Survie dans une solution similaire au suc gastrique**

La méthode adoptée pour ce test est celle décrite par Charteris et al. (1998), avec quelques modifications. Une solution similaire au suc gastrique a été fraîchement préparée, en suspendant 0.3% de pepsine dans 0.5% de solution saline stérile, le pH de la solution a été ensuite ajusté à pH 2 et pH 3, par ajout de solution concentrée d'HCL. Une culture de 18 h a été centrifugée à 6000g, 20 min, +5 °C, puis lavée 3 fois dans le PBS (0.1 M, pH 7). Le culot récupéré a été dissout dans 3 mL de la même solution, ensuite 1 mL de cette suspension a été recueilli après centrifugation à 12000g, pendant 5 min, à +5 C° et est ensuite additionné à une solution similaire au suc gastrique à pH 2 et pH 3. La DO a été déterminée à 575 nm avant et après incubation pendant 3 h à +37 °C.

##### **4.5.2. Tolérance aux sels biliaires**

L'étude de la tolérance des deux souches aux sels biliaires a été déterminée en adoptant le protocole d'Anukam et Koyama (2007) avec quelques modifications. 1mL de la suspension à  $10^7$  germes a été inoculée dans un milieu M17 à bile à raison de: 0.3, 0.5 et 1%. Les cultures ont été incubées pendant 24 h à +37 °C. La DO a été déterminée à 575 nm après 24 h d'incubation et les résultats sont comparés à un tube contrôle (milieu sans sels biliaires). Le

pourcentage d'inhibition de la croissance en présence des sels biliaires a été calculé selon la formule :

$$(\%) \text{ Inhibition de la croissance} = [(\log N_0 - \log N_t) / \log N_0] \times 100.$$

Où  $N_0$  = nombre de cellules viables dans le bouillon M17 (pH 7.15) après 3h d'incubation et  $N_t$  = nombre de cellules viables dans le bouillon M17 contenant les sels biliaires après 3 h d'incubation.

#### 4.5.3. Tolérance aux acides

La tolérance aux acides a été testée comme décrit par Anukam et Koyama (2007) avec quelques modifications. Un bouillon M17 a été ajusté à pH 2, pH 3, par l'ajout d'HCl (1N), puis a été inoculé par 1 mL d'une culture de 18 h ( $10^8$  UFC/mL). Les DO ont été déterminées à 578nm et ont été comparées à celle du contrôle à pH 7.

#### 4.5.4. Température optimale, thermotolérance et température létale

La détermination des températures optimales de croissance, des deux souches bactériennes, leur thermotolérance et leur résistance à basse température ont été déterminées selon la méthode décrite par Panoff et al. (1995); Haddaji et al. (2015) avec quelques modifications. Une culture jeune de 18 h ( $10^8$  UFC/mL) a été inoculée dans une série de tube contenant le M17 bouillon, qui par la suite a été incubée à différentes températures:  $+15^\circ\text{C}$ ,  $+37^\circ\text{C}$ ,  $+45^\circ\text{C}$ ,  $+50^\circ\text{C}$  pendant 24 h. Les tubes servant au test de thermorésistance ont été incubés à  $+60^\circ\text{C}$  et  $+65^\circ\text{C}$  pendant 120 et 90 min respectivement. Les DO ont été lues à 578 nm.

#### 4.5.5. Capacité d'adhésion "auto agrégation"

La capacité d'agrégation a été réalisée selon la méthode de Kos et al. (2003). Une culture de 18 h a été centrifugée à 5000 g /15 min, puis lavée trois fois dans le PBS. Le culot récupéré a été dissout dans la même solution pour avoir une charge finale de  $10^8$  UFC/mL. 4 mL de cette suspension ont été mélangés à l'aide d'un vortex pendant 10s. La série des tubes a été décantée pendant 5 h, et chaque heure 0.1 mL de la surface de chaque tube a été transférée dans un autre contenant 3.9 mL de PBS. Les DO ont été mesurées à 578 nm, et les résultats ont été exprimés en pourcentage selon cette formule.

$$\% \text{ Autoagrégation} = 1 - (A_t / A_0) \cdot 100$$

$A_t$  : DO de la suspension après 1h, 2h, 3h, 4h, 5h

$A_0$  : DO de la suspension à  $t_0$

#### 4.5.6. Adhésion aux solvants

Pour évaluer l'hydrophobicité de la surface bactérienne, la méthode d'adhésion aux solvants (MATS) décrite et modifiée par Kos et al. (2003) a été adoptée. Trois solvants ont été utilisés : xylène (solvant apolaire), acétate d'éthyle (solvant polaire basique, donneur d'électrons) et le chloroforme (solvant polaire acide, accepteur d'électrons). Une culture de 24 h a été centrifugée à 5000 g/15 min, une fois lavée par le PBS, le culot a été récupéré et une suspension de  $10^8$  UFC/mL a été préparée dans le  $\text{KNO}_3$  (0.1 mole.  $\text{l}^{-1}$ ). 1mL de chaque solvant (Xylène, Acétate d'éthyle, Chloroforme) a été ajouté à 3 mL de la suspension bactérienne préalablement préparée. Cette mixture a été incubée pendant 10 min à température ambiante puis agitée pendant 2 min. Les DO de la phase aqueuse ont été mesurées après une décantation de 20 min. Le pourcentage d'adhésion aux solvants a été calculé selon la formule suivante.

$$\% \text{ Adhésion aux solvants : } (1-A_1/A_0). 100$$

$A_t$  : DO de la phase aqueuse (après 20 min)

$A_0$  : DO de la suspension à  $t_0$

#### 4.5.7. Antibiorésistance

La résistance aux antibiotiques a été étudiée en adoptant la méthode des disques (diffusion sur gélose), décrite par Bauer (1966). Au total, quatre antibiotiques ont été testés: Acide nalidixique (30 $\mu\text{g}$ ), Chloramphénicol (30 $\mu\text{g}$ ), Gentamicine (10 $\mu\text{g}$ ), Tetracyclinee (30 $\mu\text{g}$ ). Les Disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface d'une gélose Mueller Hinton inoculée par 1mL de suspension bactérienne ( $10^6$  UFC/mL). Après incubation de 24 h à  $+37^\circ\text{C}$ , les diamètres des zones de d'inhibition (mm) ont été mesurés.

#### 4.5.8. L'effet antagoniste

L'effet antagoniste des souches lactiques a été testé vis à vis deux souches pathogènes, *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), en adoptant la techniques des stries croisées décrite par Balouirin et al. (2016). La souche bactérienne concernée a été ensemencée (souche lactique) par une seule strie au centre de la boîte gélosée. Une fois la période d'incubation écoulée, la gélose a été ensemencée par les souches testées (pathogènes) par simple strie perpendiculaire à la strie centrale. Après une seconde incubation, on analyse les interactions antimicrobiennes par observation de la zone d'inhibition.

## 4.6. Immobilisation cellulaire, application de la sonication

L'immobilisation des souches bactériennes par sonication, avait pour but de provoquer des cassures partielles réversibles au niveau de la paroi cellulaire sous l'action mécanique des ondes ultrasonores. Il était fort important d'optimiser les conditions d'exposition aux ultrasons, et de vérifier leur impact sur certaines propriétés métaboliques et physiologiques des deux souches.

### 4.6.1. Optimisation de la durée d'exposition aux ultrasons

Les suspensions bactériennes ajustées à  $10^7$  UFC/mL ont été traitées par sonication (35 kHz, 240/60 W<sub>peak/nominal</sub> powers, 1.8 L capacity, SONOREX TK 52) pendant des durées croissantes de 5, 10, 15, 30, 45, jusqu'à 65 minutes.

### 4.6.2. Aptitude à la survie et à la croissance

Les suspensions bactériennes traitées par sonication ont été incubées pendant 24 h à température optimale, +37°C et +42°C pour *E. durans* et *S. thermophilus* respectivement. L'effet de l'immobilisation par traitement ultrasonique sur la croissance bactérienne a été évalué en milieu liquide (bouillon M17) et solide (M17 gélose), en mesurant et observant respectivement la densité optique à une longueur d'onde de 578 nm (BIOCHROM Libra S6), et la charge des colonies sur boîte Pétri. Les résultats de l'effet de l'immobilisation en milieu liquide calculés en DO ont été convertis en nombre UFC  $\log_{10}$ /mL.

## 4.7. Quantification du biofilm

Le potentiel de formation de biofilm des souches a été déterminé par le test du cristal violet suivant le protocole d'O'Toole (2011) avec quelques modifications. Des microplaques contenant du bouillon M17 ont été inoculées par 200  $\mu$ l d'une suspension bactérienne, *E. durans*/*S. thermophilus* à  $10^8$  UFC/mL, préalablement traitée par ultrason pendant des durées croissantes (déterminées en 4.6.1), elles ont été incubées ensuite durant 24 h à +37°C et +42°C respectivement. Les puits ont été ensuite lavés plusieurs fois par de l'eau distillée stérile, et colorés chacun par 125  $\mu$ l de cristal violet (0.1%). Après une durée d'incubation de 15 min, les microplaques ont été rincées 3-4 fois avec de l'eau en les submergeant dans un bac d'eau, puis ont été renversées et séchées toute une nuit. Le biofilm a été analysé qualitativement, par prise de photos des puits, et quantitativement par lecture des DO à l'aide d'un spectrophotomètre ELIZA (ELx800TM Biotek microplate reader).

#### 4.8. Détermination de la perméabilité de la membrane

La perméabilité de la membrane cellulaire a été déterminée par la quantification des protéines et des acides nucléiques ayant été échappés du cytoplasme, selon le protocole décrit par Dai et al. (2016). Le surnageant de culture a été recueilli par centrifugation à 3000 g pendant 20 minutes, puis dilué (surnageant 1:9 v/v: eau distillée). Les protéines extracellulaires et les acides nucléiques ont été quantifiés par mesure de l'absorbance (A) à 280 et à 260 nm respectivement. La perméabilité de la membrane (P%) a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$P\% = 100 \times (A_{US} - A_{\text{sans US}}) / A_{\text{sans US}}$$

$A_{US}$  : DO après traitement ultrasonique

$A_{\text{sans US}}$  : DO sans traitement ultrasonique

#### 4.9. Optimisation des conditions de production d'EPS

L'optimisation des paramètres de production d'EPS par les deux souches étudiées a été faite selon Kimmel et al. (1998); Zisu et Shah (2003); Purwandari et Vasiljevic (2010); Zhang et al. (2011); Wang et al. (2017), avec certaines modifications. En effet, pour une maximale productivité, certaines conditions physicochimiques et organiques ont fait objet d'un processus d'optimisation. Au préalable les cellules bactériennes ont été immobilisées (en gardant les conditions optimales spécifiques pour chaque souche), et la production finale des cellules à l'état sessile a été comparée à celle des cellules à l'état planctonique (libre).

##### 4.9.1. Optimisation de l'inoculum

Des suspensions bactériennes jeunes ont été préparées, et ont été ajustées sur l'échelle 0.5 Mac Farland pour chacune des espèces pour avoir les inocula suivants:  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  UFC/ mL. Les séries de tubes ont été incubées à  $+37^\circ\text{C}$  pendant 18 h.

##### 4.9.2. Optimisation du milieu de production

Afin de choisir le milieu le plus convenable à la production des EPSs, trois milieux ont été testés : MRS, M17 et le milieu hypersaccharosé (HPR). En effet, ces milieux de culture en bouillon, ont été inoculés par une suspension bactérienne de *S.thermophilus* et d'*E.durans* ajustée à l'inoculum optimal (fixé depuis l'étape d'optimisation précédente), les tubes ont été incubés à  $37^\circ\text{C}$  pendant 18 h.

### 4.9.3. Optimisation des conditions physicochimiques

L'optimisation des facteurs physico-chimiques s'effectue dans le milieu le plus convenable à la production pour chacune des deux espèces et à des valeurs optimales de l'inoculum.

#### ➤ pH :

Afin de déterminer l'effet du pH du milieu sur la productivité en EPS des deux souches, le pH du bouillon hypersaccharosé (qu'est normalement compris entre 4 et 4.5) a été modifié par l'ajout de quelques gouttes de NaOH (1N) ou de HCL (1N) pour obtenir un milieu à pH 3, 4.5, 6.5

#### ➤ Température

Les suspensions bactériennes ont été préparées dans le bouillon hyper saccharosé, à la valeur optimale d'inoculum (soit  $10^8$  germes/ mL pour *S. thermophilus* et *E. durans* respectivement), et de pH (soit 4.5 et 3.5 pour *S. thermophilus* et *E. durans* respectivement). Les suspensions ont été incubées à différentes températures 25,37, 45 et 50°C, pendant 18 h.

#### ➤ Durée d'incubation

En vue de fixer la durée d'incubation optimale, les cultures préparées dans l'hypersaccharosé à  $10^8$  germes/mL ont été incubées pendant 18 et 24 h. L'incubation des cultures a été réalisée à 37°C, dans les conditions optimales citées précédemment.

#### ➤ Taux d'oxygène

La production des EPSs a été déterminée en cultivant les suspensions aux conditions optimales de pH, température, pendant 24 h en présence et en absence d'oxygène.

#### ➤ Rapport C/N

Afin de déterminer l'effet de la concentration en carbone sur la production d'EPS, le bouillon hypersaccharosé a été préparé à différentes concentrations en sucre (sucrose), en fixant la concentration de l'azote. Dans ce cas quatre concentrations ont été testées : 30, 50, 70, 90 g/L

#### ➤ Agitation

Le test a été réalisé en manipulant dans les conditions optimales fixées auparavant ( $10^8$  ufc/mL hypersaccharosé "50g de sucrose/L", 3.5/4.5, 37°C, 24 h, aérobiose). Les séries de tubes ont été mis sous l'action d'une agitation moyenne dans un bain secoueur.

#### 4.10. Production finale d'EPS, extraction, précipitation et purification

Les suspensions bactériennes immobilisées ont été cultivées dans les conditions optimales déjà fixées. L'extraction des EPSs et leur purification a été réalisée en adoptant le protocole décrit par Ibarburu et al. (2007) ; Oleksy-Sobczak et Klewicka (2019) avec certaines modifications. Après incubation, les séries de tubes contenant les suspensions bactériennes ont été placées dans un bain Marie à +80°C pendant 15 min, sous agitation toute les 5 min, cette étape permet de libérer les EPSs attachés à la paroi. Ensuite, les suspensions ont été passées à travers un filtre millipore (0.45 µm), ce qui permet de se débarrasser des cellules bactériennes et de récupérer un filtrat. Trois volume d'éthanol à - 80°C ont été ajoutés à ce filtrat, et les tubes ont été conservés au froid (-18 °C) pendant une nuit. Les EPSs ont été précipités et récupérés par cryocentrifugation à 12000g/20 min/+4 °C. Après une deuxième précipitation dans l'éthanol, et une seconde centrifugation dans les mêmes conditions, les EPSs ont été récupérés et solubilisés dans de l'eau distillée stérile.

#### 4.11. Dosage des EPSs

La quantification des EPSs a été faite selon la méthode de Dubois (1956). Un volume de 1.5 mL de solution d'EPS (ou de ses dilutions) a été ajouté à 2.5 mL d'acide sulfurique et 0.5 mL de phénol (5%). La DO du mélange a été lu à 492 nm contre un blanc. La courbe d'étalonnage a été tracée en utilisant le glucose comme standard (Annexe 4).

#### 4.12. Caractérisation des EPSs produit par HPLC

L'EPS produit a été identifié par HPLC (Agilent LC 1260). Brièvement, le biopolymère été solubilisé dans l'eau pure, puis 100µl de cette suspension ont été ajouté à 200 µl d' HCL (2M) et sonifié dans un bain thermostaté à 45 min, puis soumis à une agitation continue. Un volume d'EPS hydrolysé à l'acide a été complété à 1 mL avec un éluant composé de 80 % d'acétonitrile et 20 % d'eau. Un volume de 300 µL d'extrait brut a également été mélangé à l'éluant. Les extraits ont été filtrés (0,22 µm), et un volume de 10 µL a été injecté. Les extraits bruts et hydrolysés ont été analysés sur une colonne Agilent Zorbax Carbohydrate analysis (4,6×150 mm, 5 µm). Le débit de la colonne était de 1,3 mL/min, et la température de fonctionnement était de +30°C.

#### **4.13. Traitement des données**

Tous les tests ont été réalisés en duplicata. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type ( $X \pm SEM$ ). Les données ont été analysées par analyse de la variance (ANOVA) à sens unique et les moyennes ont été comparées en utilisant le test post-hoc Turkey HSD (Honest Significance Différence) ( $P \leq 0.05$ ). Les effets des traitements ont été évalués et les souches ont été comparées entre elles. Tous les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le programme R (version 3.6.1).

## ***CHAPITRE 05***

### ***RESULTATS ET DISCUSSION***

## 5.1. Identification et caractérisation des souches lactiques

### 5.1.1. *Enterococcus durans* : Isolement et identification

Plusieurs souches lactiques, et non lactiques ont été isolées de l'aliment fermenté "Hamoum". Après avoir réalisé plusieurs repiquages des suspensions préparées de hamoum, dans des milieux appropriés, notre attention s'est portée sur une espèce dont l'aspect des colonies est muqueux, en suggérant qu'il peut s'agir d'une souche EPS+ . De ce fait les autres espèces obtenues ont été écartées. Une étape de purification sur gélose M17, après une succession de repiquages, a abouti à des colonies avec un même aspect, dont l'identification phénotypique (caractères culturels, microscopiques, et biochimiques), a été faite suivant le tableau d'assortiment décrit par Cowan et Steel (2004). Les résultats de l'isolement sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 5-1 Résultats de l'isolement et de l'identification de la souche**

Isolat	Profil
Conditions de cultures	M17 (O <sub>2</sub> , 37°C, 24 h)
Aspect de la colonie	PC translucides
Gram	+/Cocci isolés, paires, tétrades, et chaînes
Catalase	-
Oxydase	+
Manitol / Mobilité	-/-
ONPG	+
Citrate de Simmons	-
Protéolyse	+++
ADH/LDH/ODC	+/-/-
Identification*	<i>E. durans</i> / <i>Pediococcus spp.</i>

Selon Barrow et Feltham (2004)\*, \*\*Assortie faiblement, +/- Positif/Négatif, aérobie (O<sub>2</sub>), microaérobie (microO<sub>2</sub>), petite colonie (PC), Arginine Di-Hydrolase (ADH), Lysine Dé-Carboxyase (LDC), et OrnithineDé-Carboxylase (ODC)

Après identification biochimique, l'isolat a été caractérisé par MS-MALDI-TOF (Figure5-1), l'espèce isolée est présumée *Enterococcus durans*.

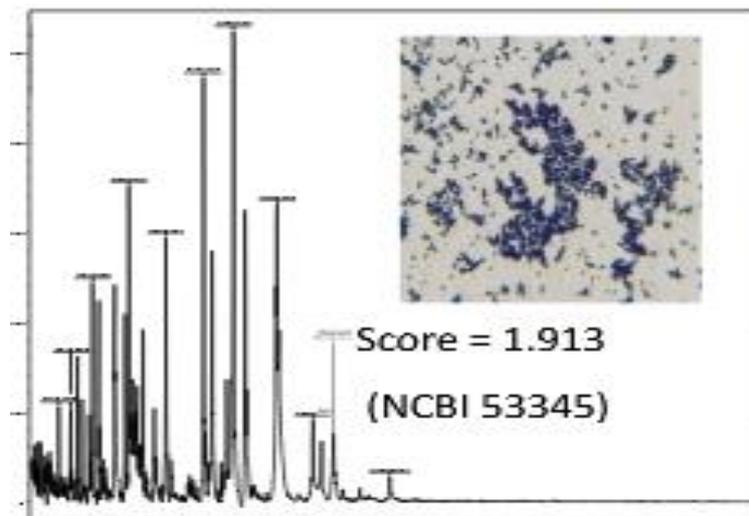


Figure 5-1 Spectres MALDI-TOF et coloration de Gram d'*Enterococcus durans*

### 5.1.2. *Streptococcus thermophilus*

Une vérification de la pureté de la souche a été faite, en inoculant un bouillon M17 par le lyophilisat de *S. thermophilus*. Après incubation à 42°C pendant 24h, des colonies bien distinctes (aspect régulier, translucide, de taille moyenne) ont été observées. L'aspect macroscopique et microscopique de *S. thermophilus* sont illustrés ci-dessous.



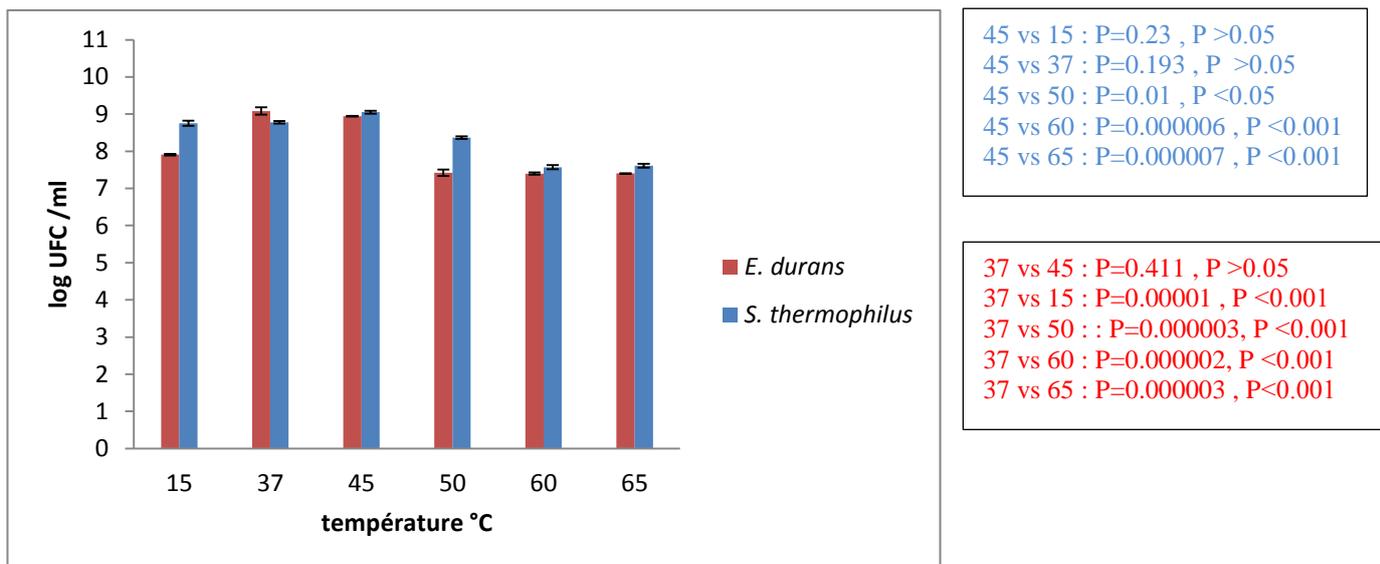
Figure 5-2 Aspect macroscopique et microscopique (G×100) de *S.thermophilus* CNRZ447

## 5.2. Evaluation du potentiel probiotique

### 5.2.1. Croissance à différentes température/ thermorésistante

La croissance bactérienne se caractérise par la capacité de ces organismes à s'adapter à la fois aux défis et aux variations des conditions environnementales. Le stress dû aux variations de température, est probablement, le plus courant, auquel les bactéries et autres organismes sont confrontés dans le monde naturel (Varmanen et al., 2011).

La figure 5-3, montre l'effet de la température, sur la croissance et la viabilité des deux souches lactiques. Il est bien remarquable, que les valeurs de température de 37°C et 45°C sont les plus idéales pour le développement de *E. durans* et *S. thermophilus* et correspondent respectivement aux taux de croissance de 9,08 log ufc/mL et de 9.05 log ufc/mL respectivement. La croissance de *E. durans* à température basse de +15°C a connu une réduction par rapport à celle à 37°C, toutefois la réduction n'était pas significative ( $P>0.05$ ) pour *S. thermophilus* (réduction de 0.3log<sub>10</sub>).



**Figure 5-3** Survie et tolérance de *E. durans* et *S. thermophilus* à différentes températures

En effet, les deux souches enregistraient un taux de croissance minimale à température dépassant la température optimale, soit respectivement +37°C et +45°C pour *E. durans* et *S. thermophilus*. Le taux à +60°C et à +65 °C, a connu une réduction estimée à 1.69 et 1.68 log ufc/mL pour *E. durans* et de 1.48 et 1.44 log ufc/mL pour *S. thermophilus* (réduction très hautement significative,  $P<0.001$ ). Ces résultats sont également exprimés en pourcentage de survie (Tableau 5-2).

Tableau 5 -2 Viabilité à différentes températures (données exprimées en pourcentage)

	Log ufc/mL	
	<i>E. durans</i>	<i>S. thermophilus</i>
15°C	7.90 (87%)	8.96 (99%)
37°C	<b><u>9.08 (100%)</u></b>	8.78 (97%)
45°C	8.94 (98%)	<b><u>9.05 (100%)</u></b>
50°C	7.41 (82%)	8.37 (92%)
<b>Contrôle</b>	9.08 (100%)	9.05 (100%)

Les résultats obtenus pour les deux souches sont en accord avec ceux retrouvés par Auffray et al.(1995); Fang et al.(2012); Růžičková et al.(2020). En effet, des expériences préliminaires établies par Auffray et al. (1995), ont montré que *S. thermophilus* se développe à des températures allant de 20 à 52°C, et que lors d'une fermentation à 58°C pendant 15 et 30 min, le taux de survie était de 1% et 0,1% respectivement. Toutefois cette souche bactérienne était capable d'acquies une thermotolérance lorsqu'elle est soumise préalablement à un choc thermique.

D'autre part, Fang et al. (2012), ont rapporté que la survie de *S. thermophilus* à basse température +5°C n'a pas été affectée significativement par rapport au témoin, après 14 jours d'exposition au froid. Ainsi, la survie des *S. thermophilus* à 10°C pendant 2h et 4h et à +15°C pendant 2h était supérieure à celle à +20°C. Cette divergence peut être due à des différences entre l'organisme étudié et les conditions particulières du choc du au froid ainsi testé.

En outre, le profil de synthèse des protéines de *S. thermophilus* lors du passage de +42 à +52°C a montré une baisse de la synthèse de nombreux polypeptides, indiquant une inhibition de synthèse des protéines, en raison du changement de température. Par ailleurs, au moins 22 des polypeptides de poids moléculaire compris entre 30 à 100 kDa étaient présents dans des proportions accrues ou ont été nouvellement synthétisés suite à un choc thermique (Auffray et al., 1995).

Růžičková et al.(2020), ont rapporté que grâce à leur capacité d'adaptation, les espèces du genre *Enterococcus* survivent dans divers environnements. Ainsi, pour la majorité des espèces, la température optimale se situe entre +35 et +37°C, toutefois quelques espèces se

développent à une température de +45 °C ou même à de basses températures autour de +10 °C, ce qui est conforme au résultat obtenu pour *E. durans*.

Suite à l'exposition des cellules à un bref choc thermique dont la température est égale ou légèrement au-dessus de la plage de croissance normale des cellules, ces dernières acquièrent une résistance (thermorésistante acquise) à un choc thermique mortel due à une température plus élevée (Jobin et al., 1998). En effet, en réponse à des fluctuations soudaines de températures, les organismes vivants réagissent par des changements rapides dans l'expression des gènes, ce qui entraîne la synthèse massive d'un ensemble de protéines appelées protéines de choc thermique (HSP) (Lim et al., 2011). Cette synthèse relève un phénomène universel survenant dans la plupart des organismes, si ce n'est dans tous.

Même si les HSPs sont présentes dans différentes bactéries, la réponse au choc thermique témoigne de l'étonnante diversité de la régulation des gènes bactériens. En effet, des études récentes ont révélé une variété de mécanismes de régulation de l'expression des gènes hsp dans diverses bactéries, dont les BALs (Varmanen et al., 2011).

### 5.2.2. Croissance à pH similaire au suc gastrique et résistance au pH

La prolifération des bactéries lactiques se caractérise par la production dans le milieu extracellulaire de produits acides issus de la fermentation. Cette production engendre un environnement défavorable pour beaucoup d'autres organismes. Cette particularité constitue le fondement de nombreuses techniques de conservation des aliments par fermentation. Toutefois, une fois consommées, ces bactéries peuvent également être confrontées à un environnement acide dans l'estomac (Van De Guchte et al., 2002).

Selon le tableau 5-3, il est remarquable que les deux souches ont pu survivre à pH acides, une légère réduction par rapport au contrôle a été enregistrée à pH=2 après 3 h d'incubation, de l'ordre de 1.0 et 0.99 log ufc/mL pour *S. thermophilus* et *E. durans* respectivement. Toutefois à pH=3, la réduction du taux de survie était de l'ordre de 1 et 0.15 log ufc/mL, ainsi *E. durans* semble être plus tolérante. Les variations du pH affectaient significativement la croissance des deux souches ( $P < 0.001$ ).

Tableau 5-3 Croissance à pH similaire au suc gastrique et tolérance au pH acide

		Viabilité log UFC /mL		
		Temps (h)	<i>E. durans</i>	<i>S. thermophilus</i>
<b>Digestion dans un suc gastriquesimulé</b>				
pH 2	0		8,225±0,00	8,245±0,005
	3		7,233±0,002	7,225±0,028
pH 3	0		7,164±0,016	8,3±0.011
	3		7,018±0,018	7,305±0,005
<b>pH Acide</b>				
pH 2	0		7,477±0,00	7,477±0,00
	3		8.365±0,005	8.37±0,00
pH 3	0		7,477±0,00	7,477±0,00
	3		8.395±0,017	8.4±0,00

La tolérance de la souche *E. durans* aux conditions acides a été aussi discutée par Nami et al.(2019), qui ont montré que les isolats d'*Enterococcus* ont une tolérance élevée à pH faible (2.5), en particulier *E. durans* ES11, ES20 et ES32, qui pourraient être d'excellents candidats à la production d'aliments fonctionnels pour promouvoir la santé. Ainsi dans leur étude portant sur la caractérisation des bactéries lactiques isolées du tractus gastro-intestinal d'un sanglier, Li et al. (2020) ont montré que la survie des isolats dans des conditions acides varie. Ce qui est du probablement au mécanisme de tolérance à l'acide dépendant de l'espèce et/ou de la souche (Nami et al., 2019) . Toutefois, Boke et ses collaborateurs (2010) ont observé une considérable réduction de la viabilité à  $\text{pH} \leq 3.0$ , pour toutes les souches testées, y compris celle de *S. thermophilus*, et que la sensibilité à l'acide est plus grande pour les souches peu productrices d'EPS.

Pieniz et al. (2014), ont montré que *E. durans* LAB18s présentait une bonne résistance aux conditions acides (pH 3 et 4,  $P > 0.05$ ), toutefois la survie de l'isolat

été affectée à pH=2. Par ailleurs, les études ont établi que les souches probiotiques ayant échoué les essais *in vitro* de résistance à pH 2 sont capables d'atteindre le côlon *in vivo* en quantité telle qu'elles peuvent exercer leur effet bénéfique. En effet, les bactéries très résistantes aux acides sont les seules à survivre aux conditions extrêmes des tests conventionnels utilisés pour la sélection des probiotiques, conditions aux quelles on ne heurte pas systématiquement *in vivo*, durant et après un repas (Mainville et al., 2005). En outre, Dressman et al. (1990), ont révélé que le pH de l'estomac pendant l'ingestion du repas dépassait la valeur de 4 au cours de 73 % du temps consacré à l'ingestion, du fait que les aliments exercent un effet tampon.

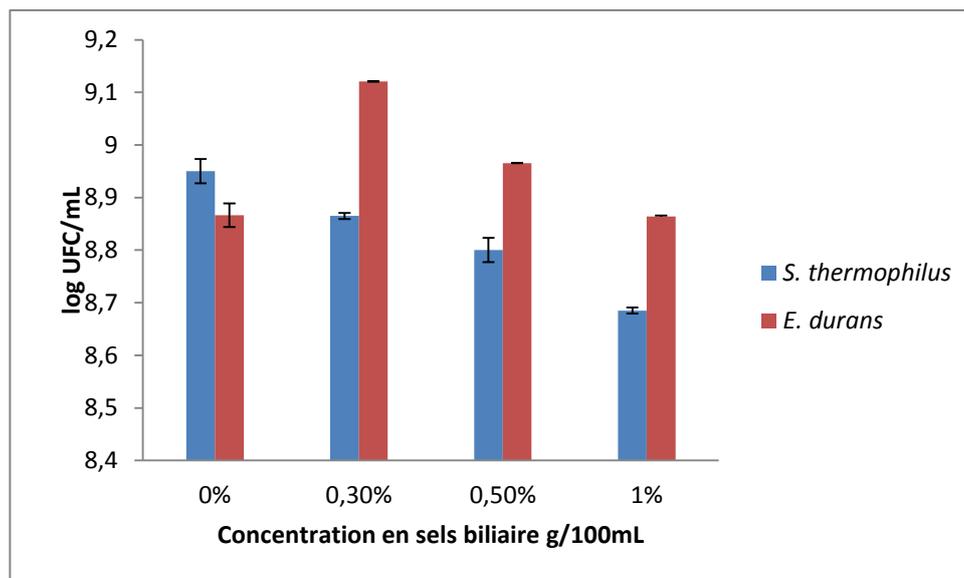
Une des caractéristiques importantes des bactéries lactiques probiotiques utilisées comme adjuvants réside dans leur tolérance à la bile et leur résistance aux sucs gastriques, qui leur permettent de survivre, de se développer et d'exercer leur action bénéfique dans le tractus gastro-intestinal (TGI). Quoique le degré de tolérance requis pour une croissance maximale dans le TGI ne soit pas déterminé, la sélection des espèces ayant une meilleure résistance aux acides semble judicieuse (De Valdez et al., 2001). En cas de jeûne, la valeur du pH du suc gastrique admise est au voisinage de 2 (Dressman et al., 1990). De ce fait, ce pH a servi de norme pour les essais *in vitro*, évaluant la survie des cultures probiotiques dans l'estomac d'un être humain (Mainville et al., 2005).

Selon Boke et al. (2010), la résistance de certaines souches lactiques aux conditions de stress (pH acide) peut être expliquée par le fait que ces bactéries sont productrices d'EPS, et que ces polymères pouvaient jouer un rôle protecteur. Les BALs sont dotées de systèmes de détection du stress destinés à activer les défenses, leur permettant de se réadapter aux conditions difficiles ou aux changements environnementaux. Les mécanismes de réparation de l'ADN peuvent également être caractérisés chez les BALs en tant que réponse au stress oxydatif et au stress acide (Chen et al., 2019).

### **5.2.3. Croissance en présence de concentrations croissantes de sels biliaires**

Les BALs, étant les probiotiques les plus représentatifs, qui servent à la production des produits laitiers, des aliments à base de légumes et du vin. La tolérance à la bile, est la propriété la plus cruciale, communément conforme à la capacité de croissance des bactéries qui agissent comme des probiotiques (Chen et al., 2019).

La figure 5-4 montre le comportement des souches étudiées en présence de concentrations croissantes en sels biliaries. Il est évident que les deux souches survivent en présence des sels biliaries, sans réduction significative considérable (1 à 3%). Le pourcentage de viabilité de *S. thermophilus* était comparable à celui du témoin (sans SB), et était estimé à 99%, 98% et de 96% pour les concentrations de 0.3, 0.5, 1%. La tolérance de *E. durans* aux différentes concentrations en sels biliaries était bien importante que celle de *S. thermophilus*, ainsi les taux de viabilité enregistrés étaient même supérieures à ceux du témoin, préservant 100% de la population initiale.



**Figure 5-4 Croissance en présence de sels biliaries**

Les résultats obtenus pour *S. thermophilus* sont en concordance avec ceux de Tuncer et Tuncer (2014), qui ont montré que la viabilité de *S. thermophilus* ST 8.01 a été maintenue après 24 h d'incubation en présence de 0.3, 0.5, et 1% de sels biliaries, et que le pourcentage d'inhibition le plus élevé a été enregistré à 1%. Contrairement à ce qui a été obtenu dans notre étude, Vinderola et Reinheimer (2003), ont signalé une faible résistance des souches de *Strep. thermophilus* en présence de sels biliaries.

Ainsi, Pieniz et al. (2014), ont montré que la capacité de survie de *E. durans* LAB18s était maintenue en présence de toutes les concentrations de sels biliaries testées (jusqu'à 1,5 %), sans aucune différence significative avec le contrôle. Toutefois, Li et al. (2020), ont estimé le taux de survie d'*E. durans* à 56% en présence de 0.3% de bile.

La bile est une sécrétion digestive intervenant dans le processus d'émulsification et de solubilisation des graisses dans le tube digestif humain. Cette sécrétion peut affecter les

phospholipides et les protéines des membranes cellulaires et dérégler ainsi l'homéostasie cellulaire. Il est donc capital pour les probiotiques de pouvoir tolérer la bile afin de survivre et coloniser le tractus gastro-intestinal (Begley et al., 2005). En effet, il est recommandé d'utiliser pour la sélection des bactéries probiotiques à usage humain des concentrations en sels biliaries de 0,15 à 0,3 % (Mainville et al., 2005 ; Boke et al., 2010).

Boke et al. (2010) ont rapporté que les souches de *Streptococcus thermophilus* ont montré une plus grande tolérance aux sels biliaries que des souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ainsi, les souches produisant plus d'EPS, ont montré un effet protecteur significatif ( $P < 0,01$ ) contre les sels biliaries (0,3 %). En outre, Bagci et al. (2019), en évaluant les caractéristiques probiotiques des souches du genre *Enterococcus* isolées du lait et du colostrum humain, ont montré que ces isolats présentaient une forte tolérance aux acides (jusqu'à un pH de 3,0) et à la bile (0,5%), suggérant leur capacité à survivre dans le tractus gastro-intestinal supérieur.

La conjugaison des acides biliaries avec les acides aminés permet de produire des sels biliaries conjugués (SBC), entraînant une émulsion et une solubilisation des lipides (Begley et al., 2005). Ces derniers peuvent exercer un effet antimicrobien en perturbant la membrane cellulaire et l'homéostasie intestinale. Toutefois, on suppose que les bactéries lactiques disposent d'une hydrolase des sels biliaries (BSH), capable de conjuguer les sels biliaries, renforçant ainsi leur tolérance et leur survie dans l'intestin (Lee et al., 2008).

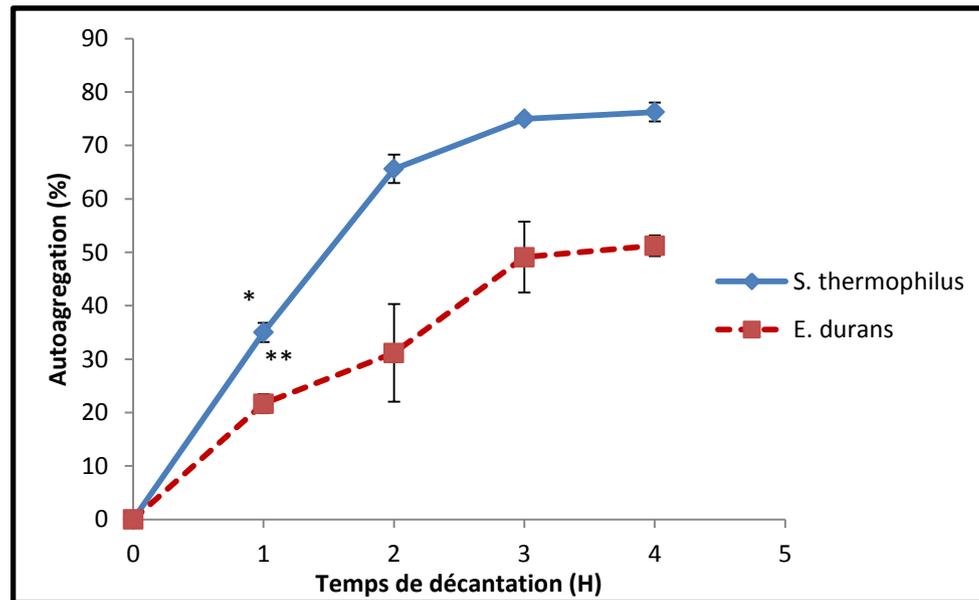
En outre selon Begley et al. (2005), la tolérance à la bile est un trait spécifique à la souche; d'autres part les bactéries à Gram positif semble être plus vulnérables à la bile que les bactéries à Gram négatif.

#### 5.2.4. Capacité d'agrégation

Un autre facteur déterminant pour la colonisation des probiotiques au niveau de l'intestin consiste en l'autoagrégation, permettant ainsi de prévenir l'adhérence des pathogènes (Bagci et al., 2019).

Les pourcentages d'agrégation des souches bactériennes sont illustrés sur la courbe présentée 5-5, et qui montre que les valeurs d'auto-agrégation ont augmenté parallèlement avec la prolongation du temps d'incubation pour les deux souches ( $P < 0,05$ ), elles varient de 35 à 76% et de 21 à 51% pour *S. thermophilus* et *E. durans* respectivement. La capacité

d'adhésion enregistrée par *S. thermophilus* après 4 h d'incubation est plus importante que celle de *E. durans* pour la même durée, soit 76% vs 51%.



**Figure 5-5 Niveau d'adhésion des deux souches.**

$p \leq 0.05$  (1 h vs 4 h: *S. thermophilus*)

$p \leq 0.05$  (1 h vs 4 h: *E. durans*)

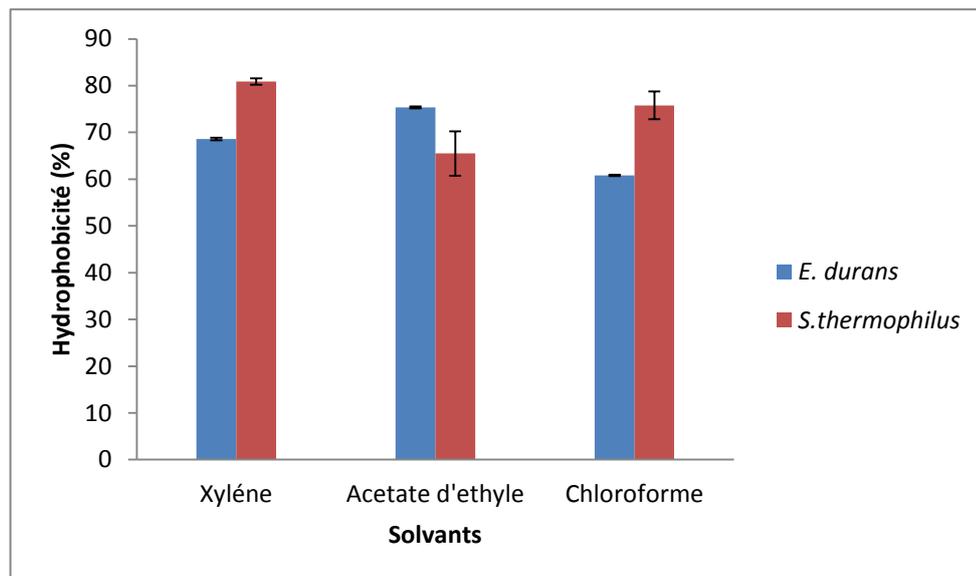
Tuncer et Tuncer (2014), ont rapporté que le pourcentage d'agrégation enregistré pour *Strep. thermophilus* ST8.01 était à  $49,55 \pm 6,24\%$ , et que même si cette valeur est considérée modérée, elle semble néanmoins, plus élevée que celle de nombreuses bactéries lactiques. Ainsi Li et al. (2020), ont enregistré pour un isolat d'*E. durans* une capacité d'autoagrégation au voisinage de 50%, ce qui est comparable à notre résultat. En outre, dans leur études portant sur l'estimation du pouvoir adhésif des probiotiques, Xu et al. (2009) ont rapporté que les valeurs d'auto-agrégation affichaient par les souches probiotiques ont été comprises entre 36% et 51%, et été supérieures à celles des pathogènes.

Le processus d'agrégation cellulaire repose sur une interaction entre les éléments de la surface cellulaire tels que les acides lipoteichoïques, les protéines de type lectine, ainsi que les protéines solubles et les phéromones (Boris et al., 1997), elle peut constituer une sorte de défense de l'hôte contre les infections. Par ailleurs, les probiotiques adhèrent différemment, il s'agit ainsi d'un trait qui dépend de la souche et des caractéristiques de la surface cellulaire, à savoir l'hydrophobicité et le profil protéique extracellulaire (Collado et al., 2008 ; Xu et al., 2009). En effet, des recherches menées antérieurement ont corroboré que des facteurs internes éventuels ainsi que le milieu environnant conditionnent tout phénomène d'agrégation (Goh et al., 2010).

### 5.2.5. Adhérence aux solvants

Le potentiel hydrophobe de la surface cellulaire des probiotiques est un critère permettant de déterminer l'aptitude de ces derniers à adhérer aux cellules épithéliales intestinales. En effet, des souches davantage hydrophobes sont susceptibles de procurer aux probiotiques une position compétitive (Ayyash et al., 2018 ; Bagci et al., 2019), leur permettant de coloniser le tractus gastro-intestinal humain et d'y exprimer leurs bienfaits, toutefois certaines études ont démontré que l'hydrophobicité ne constitue nullement un facteur unique régissant l'adhésion des microbes à la surface des cellules (Bagci et al., 2019).

L'affinité des deux souches aux solvants est indiquée dans la figure 5-6. Les pourcentages d'adhésion au xylène (solvant apolaire) étaient supérieures à 50% pour *E. durans* et *S. thermophilus*, soient respectivement 61% et 81%. L'affinité était similaire à l'acétate d'éthyle (solvant mono-polaire basique), de l'ordre de 75 et 77%, pour *E. durans* et *S. thermophilus* respectivement, et était de l'ordre de 60 et 68% pour le chloroforme (solvant mono-polaire acide).



**Figure 5-6 Adhérence des souches aux solvants**

En effet, Basson et al. (2008) ont répertorié le pourcentage d'hydrophobicité des cellules (en utilisant le xylène comme solvant) comme fortement hydrophobe (> 50%), modérément hydrophobe (20-50%) et hydrophile (<20%). Conformément à cette classification, *S. thermophilus* et *E. durans* peuvent être classées comme fortement hydrophobes. La différence d'affinité de *E. durans* aux trois solvants était hautement significative ( $P < 0.001$ ).

Cette étude a montré que les valeurs d'hydrophobicité observées pour *Streptococcus thermophilus* étaient similaires à celles rapportées par Tuncer et Tuncer (2014), qui ont enregistré une forte affinité (67%) de *S. thermophilus* ST8.01 au xylène. Inversement, Khadem (2012) a observé une affinité au xylène < 50%, pour une même espèce d'origine différente.

Ainsi conformément aux résultats obtenus pour *Enterococcus durans*, Nami et al. (2019), ont montré dans leur étude portant sur la caractérisation des probiotiques et l'évaluation de la sûreté des isolats entérocoques issus de divers produits laitiers artisanaux, que les valeurs d'hydrophobicité variaient de 23 à 58 %, et que plusieurs isolats ont enregistré des pourcentages supérieurs à 50%.

Ainsi, plus la capacité d'agrégation et l'hydrophobie sont élevées, mieux le probiotique peut s'attacher aux cellules épithéliales et donc être efficace. Conformément à la présente étude, le pourcentage d'agrégation et d'hydrophobie des deux souches étaient les deux supérieurs à 50%, et donc à celui obtenu par Ayyash et al. (2018) pour des isolats du genre *Streptococcus* et *Enterococcus*, ou autres bactéries lactiques (Marin et al., 1997 ; Bagcial., 2019). Par ailleurs, la majorité des bactéries probiotiques utilisées comme starters présentent une plus grande affinité aux solvants organiques (>32 %) (Vinderola et al., 2003).

Certains rapports ont indiqué que la provenance et les caractéristiques de surface des souches pouvaient être déterminantes dans l'hydrophobicité de leurs surfaces, engendrant des différences quant à l'affinité des microbes aux divers solvants (De Ambrosini et al., 1998). En effet, selon Kos et al. (2003), le caractère hydrophobe de la surface cellulaire est lié à la présence de composants de nature protéique, tandis que l'hydrophilie est associée à la présence de polysaccharides.

#### **5.2.6. Résistance aux antibiotiques**

Un des intérêts cliniques de l'usage des probiotiques, réside dans la prévention et le traitement des diarrhées associées aux antibiotiques. Ainsi, la tolérance des probiotiques aux antibiotiques est un trait désiré. En revanche, cette résistance ne doit être confiée aux autres bactéries (Grattepanche et al., 2010). En effet, la détermination de la sensibilité aux antibiotiques des souches destinées à être utilisées sans danger dans le secteur alimentaire, est un aspect fondamental du choix afin de ne pas propager de manière anarchique les gènes de résistance aux antibiotiques par un transfert horizontal (Terzić-Vidojević et al., 2015).

Les résultats du test de résistance aux antibiotiques sont illustrés dans le tableau 5-4. Il est notable que les deux souches se comportent différemment vis-à-vis les différents antibiotiques testés. *S. thermophilus* était sensible seulement à la gentamicine, en revanche, *Enterococcus durans* était résistante à la gentamicine, le chloramphénicol, et la tétracycline, et s'est révélée la seule résistante à l'acide nalidixique. L'effet le plus significatif ( $P < 0.05$ ) était celui du chloramphénicol.

**Tableau 5-4 Résistance aux antibiotiques**

Souches lactiques	Antibiorésistance (diamètre mm)			
	C <sub>10</sub>	GM	AN <sub>30</sub>	TE <sub>30</sub>
<i>E. durans</i>	S	S	R	MS
<i>S. thermophilus</i>	R	S	R	R

MS : modérément sensible, S : sensible, R résistant (Charteriset al., 1998).

Tuncer et Tuncer (2014) ont rapporté que *S. thermophilus* ST8.01 manifestait une sensibilité vers l'ensemble des antibiotiques testés dont la tétracycline, le chloramphénicol et la gentamicine. Khadem (2012) a indiqué dans son étude, que *S. thermophilus*, s'est révélée résistante à l'action de l'acide nalidixique, est sensible vis-à-vis du chloramphénicol.

Zhou et al. (2012) en évaluant la résistance de certaines souches lactiques vis à vis 11 antibiotiques par méthode de dilution sur gélose, ont rapporté que plusieurs espèce de *S. thermophilus* résistaient au chloramphénicol, 11% seulement étaient sensibles à la gentamicine, alors que 44% présentaient une résistance à la tétracycline. Ainsi Tosi et al. (2007) ont montré que des souches de *S. thermophilus* isolées de divers environnements, présentaient une sensibilité aux 6 antibiotiques testés, dont la gentamicine, en outre certaines étaient résistantes à la tétracycline.

Dans une autre étude, Abamecha et al. (2015) ont montré que parmi des isolats d'enterococcus, 34% présentaient une résistance à la gentamicine, 64% à la tétracycline, et 34% au chloramphénicol.

Selon Terzić-Vidojević et al. (2015), la présence de facteurs de résistance aux antibiotiques varie selon les souches et les régions. En effet, d'après les résultats de leur étude, 29% des isolats d'enterococcus dont *Enterococcus durans* étant sensibles aux antibiotiques testés (y compris gentamicine, tétracycline, chloramphénicol) et près de 59% de ces isolats étaient résistants à deux antibiotiques ou plus.

Terzić-Vidojević et al. (2015), ont indiqué aussi que sur un total de 636 isolats d'entérocoques laitiers, uniquement cinq souches relevant d'*E. durans* sont dotées d'un potentiel technologique intéressant et satisfont les critères de salubrité requis pour un usage dans l'industrie laitière.

En effet, le problème de la résistance aux agents antimicrobiens ne cesse de se renforcer partout dans le monde, compromettant ainsi l'efficacité du traitement des infections bactériennes. Le recours massif aux antibiotiques chez l'homme et l'animal a entraîné une forte probabilité de développer des résistances susceptibles d'être transmises par l'alimentation (Gousia et al., 2011 ; Zhou et al., 2012). Par ailleurs, le risque majeur de dissémination de la résistance réside dans la présence de gènes de résistance aux antibiotiques sur des composants mobiles. Dans la mesure du possible, les micro-organismes utilisés comme additifs alimentaires devraient être ciblés en priorité sur l'organisme ayant la plus faible résistance (Tosi et al., 2007), ce qui nécessite une caractérisation plus approfondie pour pouvoir déterminer le fondement génétique de la résistance.

### 5.2.7. Effet antagoniste

Les résultats du pouvoir antibactérien des deux souches lactiques sont illustrés dans le tableau 5-5, qui montre une activité antagoniste significative contre les deux pathogènes opportunistes testés, *E. coli* et *S. aureus*. Les pourcentages d'inhibition étaient respectivement 13- 9.84% avec *S. thermophilus* et 12- 9% pour *E. durans*.

**Tableau 5-5 Activité antibactérienne (diamètre mm)**

Souches lactiques	Activité antibactérienne (diamètre mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>E. durans</i>	+++	+++
<i>S. thermophilus</i>	+++	+++

( ) Pas d'inhibition, (+) zone d'inhibition 0.1-1 mm ; (++) zone d'inhibition 1.1-2.0 mm ; (+++) zone d'inhibition > 2.1 mm (Ayyashet al., 2018).

Les bactéries lactiques ont depuis toujours été utilisées dans la conservation des aliments grâce à la production des substances antimicrobiennes. En effet, grâce à la fermentation, les glucides sont réduits en une gamme de molécules organiques de faible masse moléculaire comme, les acides, lactique, acétique, propionique et l'éthanol ayant un pouvoir antimicrobien (Blom et al., 1991).

Pieniz et al. (2014) ont montré que *E. durans* LAB18s a fait preuve d'un large spectre d'activité antimicrobienne, inhibant plusieurs pathogènes tels, *E. coli*, *S. aureus*. Ainsi Belgacem et al. (2010) ont indiqué que certains isolats d'entérocoques producteurs de bactériocines révèlent de nombreuses qualités biochimiques pertinentes quant à leurs performances technologiques dans l'industrie alimentaire.

Les entérocoques (bactériocines) produites par des espèces du genre *Enterococcus* sont efficaces contre les bactéries Gram-négatif et Gram-positif. Leur résistance à une large gamme de températures et de pH, ainsi que leur vaste spectre d'activité, leur confère un grand intérêt technologique (Tosoni et al., 2019). Le profil du pouvoir antibactérien est souche et espèce dépendant. Parmi plusieurs souches du genre *Enterococcus*, *Enterococcus durans* 61E5 a été identifiée comme étant la souche dont l'activité antimicrobienne est la plus forte (Yerlikaya et al., 2020).

Vue son importance industrielle, et son usage comme bactérie starter, *S. thermophilus* a fait objet de nombreuses recherches, envisageant ses qualités fonctionnelles et technologiques. Akpinar et al. (2011) ont rapporté que toutes les souches de *S. thermophilus* présentaient une activité antimicrobienne contre *K. pneumoniae*. En outre, les souches SL4 et SY2 de *S. thermophilus* avaient une action antimicrobienne sur toutes les bactéries testées dont *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. D'autre part Mezaini et al. (2010) ont rapporté lors de leur recherche sur l'effet antibactérien de 20 bactéries lactiques isolées d'un fromage traditionnel, qu'on excluant *S. aureus*, la souche *S. thermophilus* T2 a montré un spectre d'inhibition large contre toutes les bactéries cibles à Gram positif utilisées dans cette étude. Par ailleurs, aucune activité inhibitrice contre *E. coli* et *S. typhimurium* n'a été constatée.

Parmi les souches de *S. thermophilus*, certaines génèrent une bactériocine appelée thermophiline, laquelle est efficace sur plusieurs BALs et bactéries responsables d'altération alimentaire. Étant donné ses qualités technologiques et biochimiques, cette bactériocine est envisageable comme biopréservateur puissant (Aktypis et al., 2007). En outre, les *Enterococcus*, les *Lactococcus* et les *Pediococcus*, font aussi partie des BALs fréquemment appliquées comme des conservateurs naturels, de par leur potentielle production de métabolites dotés de propriétés antimicrobiennes, dont les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, les enzymes antimicrobiennes et les bactériocines (Mataragas et al., 2003).

Le pouvoir antibactérien des BALs peut résulter de la production d'acides organiques, de la production de peroxyde d'hydrogène ou de bactériocines (Mataragas et al., 2003 ; Pieniz

et al., 2014), ce pouvoir est parfois le résultat d'un seul mécanisme ou d'une synergie entre divers mécanismes, à savoir la compétition pour les nutriments, la réduction du pH, la formation de gaz dans l'atmosphère (Mataragas et al., 2003).

### 5.3. Effet de l'immobilisation sur la viabilité des souches

Afin de fixer la durée optimale d'exposition aux ultrasons, et de vérifier l'effet de l'immobilisation sur les deux souches lactiques, sur leur viabilité, et leur développement en milieu liquide et sur gélose ont été suivie après 5, 10, 15, 30, 45 et 65 min de traitement.

Comme le montre les résultats regroupés dans le tableau 5-6 et les photos de l'annexe 3, la viabilité des souches après traitement ultrasonique a été affectait, le nombre de survivants après un traitement prolongé de 45 et 65 min décroît de manière considérable surtout pour *S. thermophilus*, dans ce cas la sonication a affecté de manière non significative ( $P>0.05$ ) sur la croissance bactérienne ( $7,76 \log_{10}$  vs  $8,55 \log_{10}$  et  $7,66 \log_{10}$  vs  $8,55 \log_{10}$ , respectivement). Cette dernière a affichait à 30 min, une légère augmentation en taux de survie par rapport au contrôle (non exposé). D'autre part *E. durans* s'est révélée plus tolérante à l'action des US, ainsi même après une exposition prolongée, la différence en nombre de survivants n'a pas été significative ( $P>0.05$ ). Un taux de survie considérablement meilleur que le contrôle a été affichait à 15 min de traitement. En effet cette valeur a été retenue pour tous les tests d'amélioration des performances technologiques et fonctionnelles de cet isolat.

**Tableau 5-6 Effet de la sonication sur la développement des souches en milieu liquide**

Les DOs ont été convertis en log UFC/ mL, le contrôle s'agit de suspension bactérienne non exposée

Souches lactiques	Durée de traitement par US (min)						
	Contrôle	5	10	15	30	45	65
<i>E. durans</i>	8.55±0.01 <sup>b</sup>	8.34±0.06 <sup>c</sup>	8.42±0.06 <sup>bc</sup>	8.72±0.01 <sup>a</sup>	8.72±0.03 <sup>a</sup>	8.53±0.00 <sup>b</sup>	8.42±0.00 <sup>bc</sup>
<i>S. thermophilus</i>	8.55±0.00 <sup>a</sup>	8.45±0.05 <sup>b</sup>	8.46±0.04 <sup>a</sup>	8.51±0.02 <sup>a</sup>	8.57±0.00 <sup>a</sup>	7.76±0.01 <sup>c</sup>	7.66±0.11 <sup>c</sup>

L'effet sur la viabilité peut être attribué à la destruction des microorganismes par action mécanique. Le principe d'action mis en avant est le phénomène de

cavitation qui créerait des cisaillements très importants et répétitifs au niveau des cellules. La cavitation entraîne une dislocation des parois cellulaires qui sont altérées par les microbulles gazeuses créées au sein du liquide. Nguyen et al. (2009) ont indiqué que les ultrasons (20 kHz) peuvent avoir un double effet sur les bifidobactéries : un impact négatif en raison de la réduction dans le nombre de cellules viables et un positif parce que les cellules endommagées ou détruites peuvent fournir les nutriments essentiels et les molécules de signalisation pouvant promouvoir la croissance de la culture. En effet, des ultrasons de faible intensité et des temps d'exposition courts (moins de 30 minutes) ont permis d'améliorer la capacité de croissance de *Lactobacillus helveticus* PTCC 1332, *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643, *Bifidobacterium longum* FTDC 8943, *B. longum* FTDC 2113, et *Lactobacillus casei* ATCC 393 (Yeo et al., 2011 ; Hashemi et al., 2018).

Il a été signalé que les ultrasons puissent intervenir dans le métabolisme bactérien. Néanmoins, en fonction des conditions d'application (temps, viscosité du milieu, puissance, et la fréquence de l'onde) de la sonication et les caractéristiques de l'espèce bactérienne (paroi cellulaire structures), les ultrasons peuvent avoir des conséquences distinctes qui sont soit délétères soit bénéfiques pour les bactéries (Tabatabaie et al., 2008 ; Kobayashi et al., 2009).

Il a été admis que la sensibilité des micro-organismes augmente avec la taille de la cellule, que les bacilles sont plus sensibles que les cocci, et les bactéries aérobies sont plus résistantes que les bactéries anaérobies. Les photos montrant le développement des souches sur gélose après traitement par US sont illustrées dans l'annexe N°3.

Selon Gracin et al. (2016), les BALs sont plus résistantes aux traitements ultrasoniques de haute puissance que les cellules levuriennes, ce qui s'expliquerait par les différences de taille des cellules, en effet, plus les cellules sont grandes, plus la sensibilité à la sonication est importante. Même parmi les bactéries, la taille des cellules semble contribuer de manière notable à la résistance au traitement ultrasonore, tel qu'observé dans notre expérience sur la résistance des souches de *Lactobacillus bulgaricus* et de *S. thermophilus* (données non publiées).

Inversement, l'exposition de certains pathogènes tel *Escherichia coli* O15 pendant les mêmes durées testées que dans notre étude, s'est traduite par une

réduction significative du nombre de survivant (Li et al., 2018), laissant supposer que l'effet est sélectif.

#### 5.4. Optimisation des paramètres de production des EPSs

Les résultats de l'optimisation des EPSs produits *E. durans* et *S. thermophilus* immobilisées par sonication à des durées optimales, 15 et 30 min respectivement, sont illustrés dans les Figures 5-7 à 5-14.

##### 5.4.1. Le milieu de culture

Sur la figure 5-7 sont présentés les résultats de l'optimisation de milieu de production. le milieu hypersaccharosé était le plus idéal à la production des EPSs pour les deux souches, soit 1232 mg/L pour *E. durans* et 1222 mg/L pour *S. thermophilus*. Le rendement en EPS dans les deux autres milieux était aussi considérable, toute fois il reste moins important par rapport à celui dans l'hypersaccharosé, il variait de 939-1023 mg/L et de 170- 559 mg/L dans M17 et MRS pour *E. durans* et *S. thermophilus* respectivement. Le milieu de culture affectait positivement la production d'*E. durans*,  $P \leq 0.05$ .

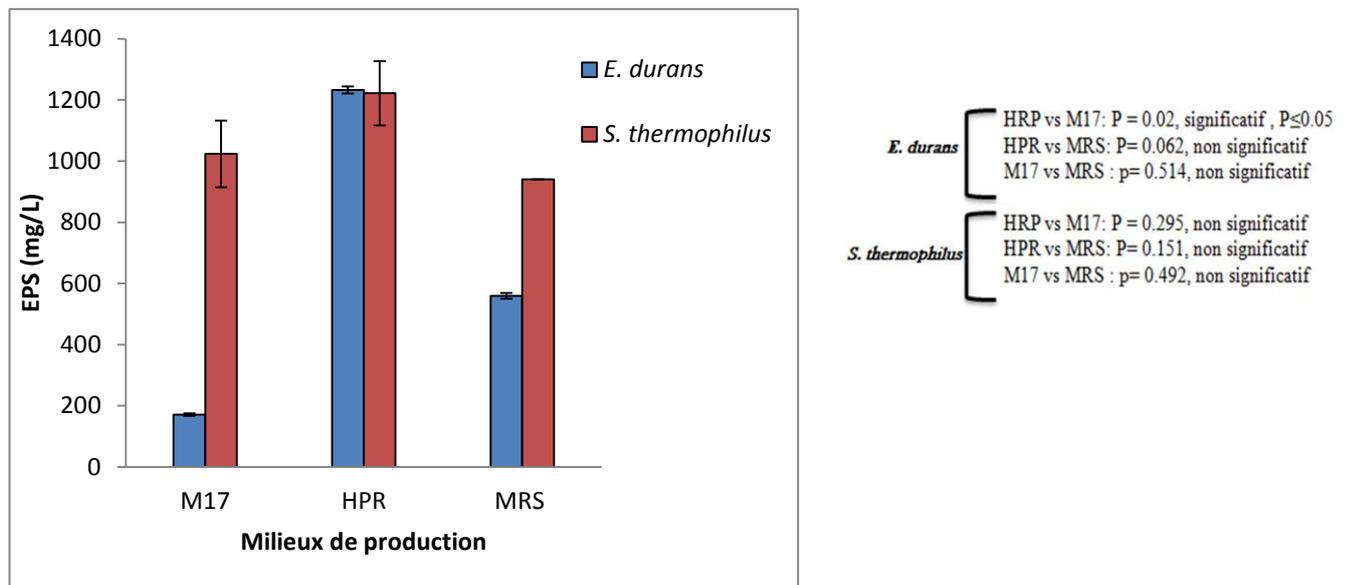


Figure 5-7 Optimisation du milieu de production des EPSs

Des travaux réalisés au sein de notre laboratoire, ont révélé que le milieu idéal pour la production des EPSs pour les trois isolats de bactéries lactiques était le milieu hypersaccharosé, par rapport au milieu MRS (Benhadria et al., 2017). Vaningelgem et al. (2004) ont observé qu'une production d'EPS à des niveaux différents a été décelée pour *Streptococcus thermophilus* ST 111 dans tous les milieux examinés (MRS, M17, lait, lait

enrichi), ainsi l'addition du sucre au milieu a fait augmenter la production en EPS de cette souche.

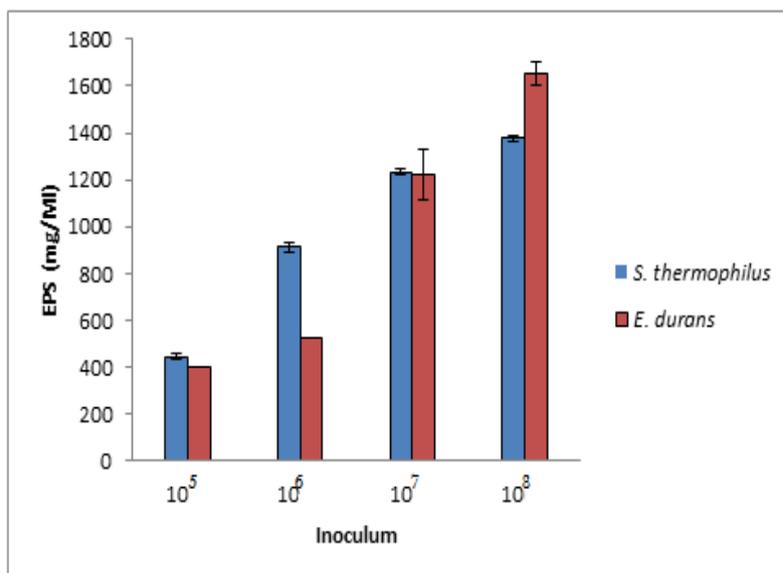
Adebayo-Tayo et Onilude (2009) ont montré lors de leur recherche portant sur l'effet du milieu sur la biomasse, la viscosité, la production d'exopolysaccharides et d'acide lactique par des isolats de bactéries lactiques que la composition du milieu avait un effet marqué sur les paramètres analysés. Ainsi, la teneur en EPS varie d'une espèce à l'autre et au sein d'une même espèce des BALs. Cerning et al. (1994) ont indiqué, que contrairement au lactose, le glucose était considéré comme étant la source de carbone la plus adaptée à la production des EPSs pour certaines bactéries lactiques.

Paulo et al. (2012) ont constaté que les isolats de bactéries lactiques produisaient plus d'EPS dans un milieu de base additionné de saccharose, par rapport au lactose et glucose. Cela dit, que certains types de sucre conviennent mieux à la production d'EPS étant donné que celle-ci est fonction de la souche testée et donc de son métabolisme enzymatique. Le saccharose et le glucose servent couramment à identifier les bactéries EPS<sup>+</sup>; ces sucres permettent à la plupart des bactéries de produire davantage de biopolymères (Paulo et al., 2012). Cependant, dans notre étude, le deuxième meilleur sucre pour la production d'EPS par *S. thermophilus* était le lactose.

Il est primordial que les milieux de production des EPSs soient bien choisis, compte tenu des interférences possibles de certains de leurs composants avec l'analyse de ce biopolymère (Ruas-Madiedo et al., 2005). Les milieux les plus fréquemment exploités sont le lait écrémé, le lactosérum et les milieux à base de lactosérum. Il est bien évident que le rendement en EPS et les spécificités moléculaires des biopolymères sont influencés non seulement par les conditions de culture mais également par sa composition (pas seulement la source de carbone).

#### 5.4.2. La concentration de l'inoculum

La figure 5-8 affiche les résultats de l'effet de la taille de l'inoculum sur la production d'EPS des deux souches testées. On constate que l'inoculum permettant un meilleur rendement à la fois pour *S. thermophilus* et *E. duarns* est de  $10^8$  germes/mL. Ainsi la production s'est révélée proportionnelle à la charge cellulaire des suspensions. En effet les plus faibles quantités d'EPS pour les deux souches ont été enregistrées à des concentrations de  $10^5$  germes/mL. L'effet de l'inoculum sur la production était significatif pour les deux souches ( $P \leq 0.05$ ).



$10^8$ vs $10^5$  :  $P=0.000059, P\leq 0.05$  (très hautement significatif)

$10^8$ vs $10^6$  :  $P=0.000088, P\leq 0.05$  (très hautement significatif)

$10^8$ vs $10^7$  :  $P=0.04, P\leq 0.05$  (significatif)

$10^8$ vs $10^5$  :  $P=1.6915E-7, P\leq 0.05$  (très hautement significatif)

$10^8$ vs $10^6$  :  $P=0.00005, P\leq 0.05$  (très hautement significatif)

$10^8$ vs $10^7$  :  $P=0.014, P\leq 0.05$  (significatif)

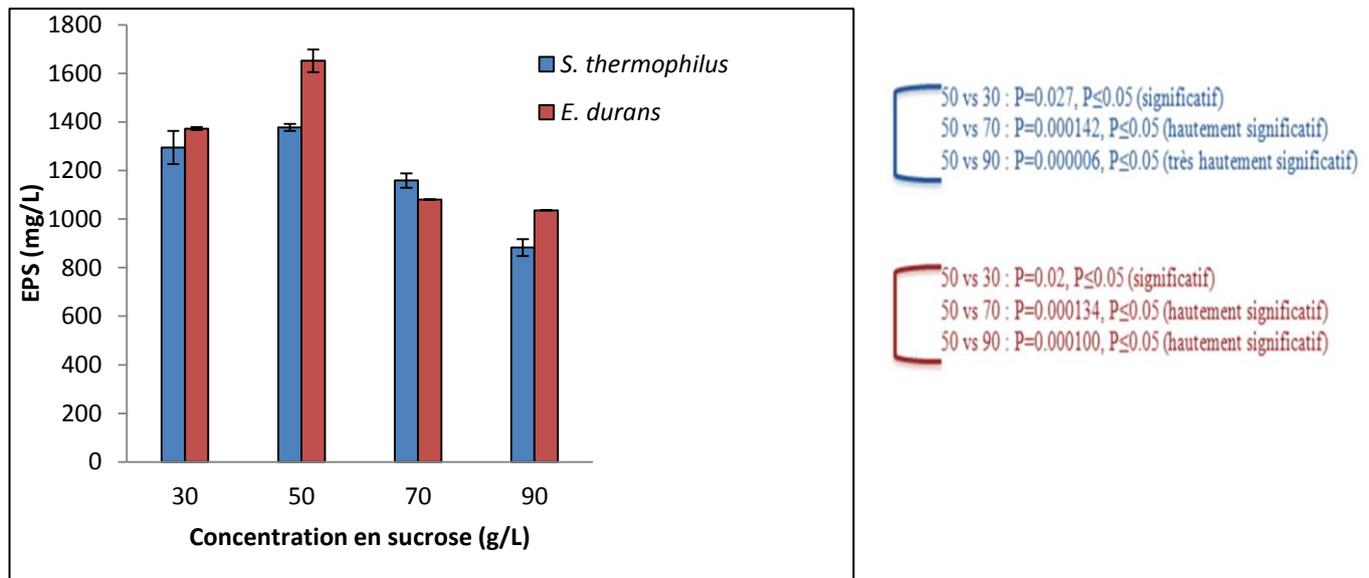
**Figure 5-8 Optimisation de l'inoculum de production des EPSs**

Ainsi l'amélioration du rendement en EPS des isolats de bactéries lactiques, est corrélée avec la concentration initiale de l'inoculum, la valeur optimale était à une concentration de  $10^7$  UFC/ mL (Benhadria et al., 2017).

Inversement, Boubakeur (2008) a constaté pour des souches de bactéries lactiques dont *S. thermophilus*, que les rendements étaient meilleurs à de faibles inoculums ( $10^5$  et  $10^6$ UFC/mL), et plus les suspensions sont chargées, plus la production est réduite. Pour autres bactéries non lactiques, Ezhil et al. (2015) ont rapporté qu'une productivité optimale en EPS a été enregistrée avec une taille d'inoculum de 3 % (v/v), contrairement à des cultures chargées (4%) et faiblement chargées (1%, 2%).

#### 5.4.3. La concentration du substrat (Le rapport C/N)

Rappelons que la concentration en sucrose, la source de carbone du bouillon saccharosé a été modifiée (30, 50 "concentration initiale", 70, 90 g/L), les concentrations en azote initialement présentes dans le milieu hypersaccharosé ont été gardées fixées. Les résultats de l'effet de la concentration en substrat (sucrose) sur la productivité en EPS sont enregistrés sur la figure 5-9. Il est bien remarquable qu'un meilleur rendement en EPS pour les deux souches a été enregistré en présence de 50g/L de sucrose, soit 1652 et 1377 mg/L pour *E.durans* et *S. thermophilus* respectivement. Au-delà de cette concentration, les valeurs ont été réduites et significativement à 70 et 90g/L ( $p\leq 0.05$ ). La concentration en sucrose avait un effet hautement significatif sur la production des deux souches ( $P\leq 0.0001$ ).



**Figure 5-9 Optimisation de la concentration en sucrose pour la production des EPS**

Conformément à ces résultats, Benhadria et al. (2017) ont constaté que l'optimum du rendement en EPS de l'ensemble des isolats était obtenu à 50 g/L, de part et d'autre la production était significativement affectait.

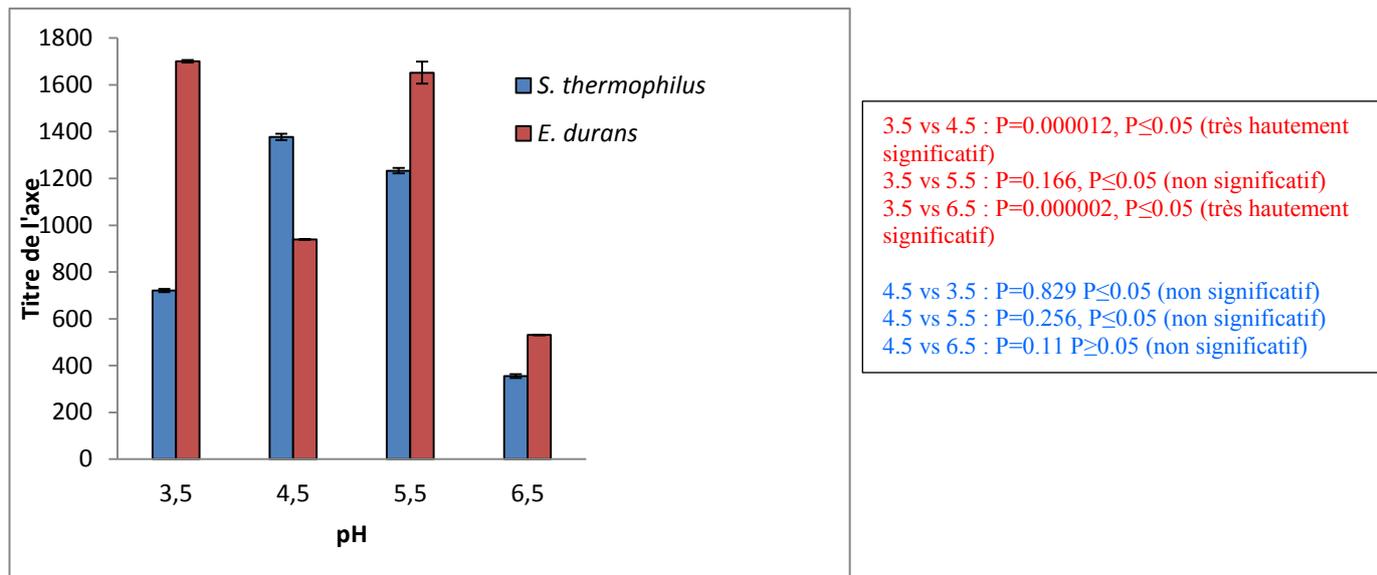
D'autre part, Cerning et al. (1994) ont souligné aussi que la concentration en sucre influençait remarquablement le rendement en EPS et que la présence de 20 g/L de glucose dans le milieu entraînait une production maximale, alors que des quantités faibles ont été traduites par un faible rendement, d'autre part, la production en présence de 20g /L de saccharose était plus élevée qu'en présence de 2g /L (50 mg/Lvs 35 mg/L), ainsi cette production n'a pas été corrélée à la croissance.

Compte tenu de cette conclusion, il est possible d'expliquer les résultats obtenus dans le cadre de notre étude par le fait que toute augmentation additionnelle de la teneur en sucre ne se traduit pas nécessairement par une augmentation de la production d'EPS, étant donné que la teneur en sucrose du bouillon hypersaccharosé (50 g/L) est amplement suffisante pour atteindre le maximum de production. En effet, il a été démontré que des teneurs optimales en sucre atteintes pour de nombreuses bactéries lactiques, variaient de 20 à 100 g/L (Kuntiya et al., 2010), ainsi une concentration en sucre supérieure risque de perturber la croissance microbienne du fait de la pression osmotique défavorable (Fang et al., 2002).

#### 5.4.4. Le pH de production

L'effet du pH sur la production des EPSs des deux souches est présenté dans la figure 5-10. Les variations du pH du bouillon saccharosé avaient un effet direct sur la production. Ainsi, l'optimum de productivité de *S. thermophilus* estimé à 1377 mg/L était obtenu à pH 4.5, alors

que la faible valeur était enregistrée à pH 6 (354 mg/L). Toutefois, *E. durans* a enregistré des valeurs maximales à pH 3.5 et 4.5, soit 1700 et 1652 mg/L respectivement, et de même une faible production à pH 6.5 (530 mg/L). L'effet du pH sur le rendement en EPS, était très significatif pour les deux souches ( $P \leq 0.001$ ), ainsi pour *E. durans*, la production à pH 5.5 n'a pas été affectée significativement ( $P \geq 0.05$ ) par rapport à celle à pH 3.5.



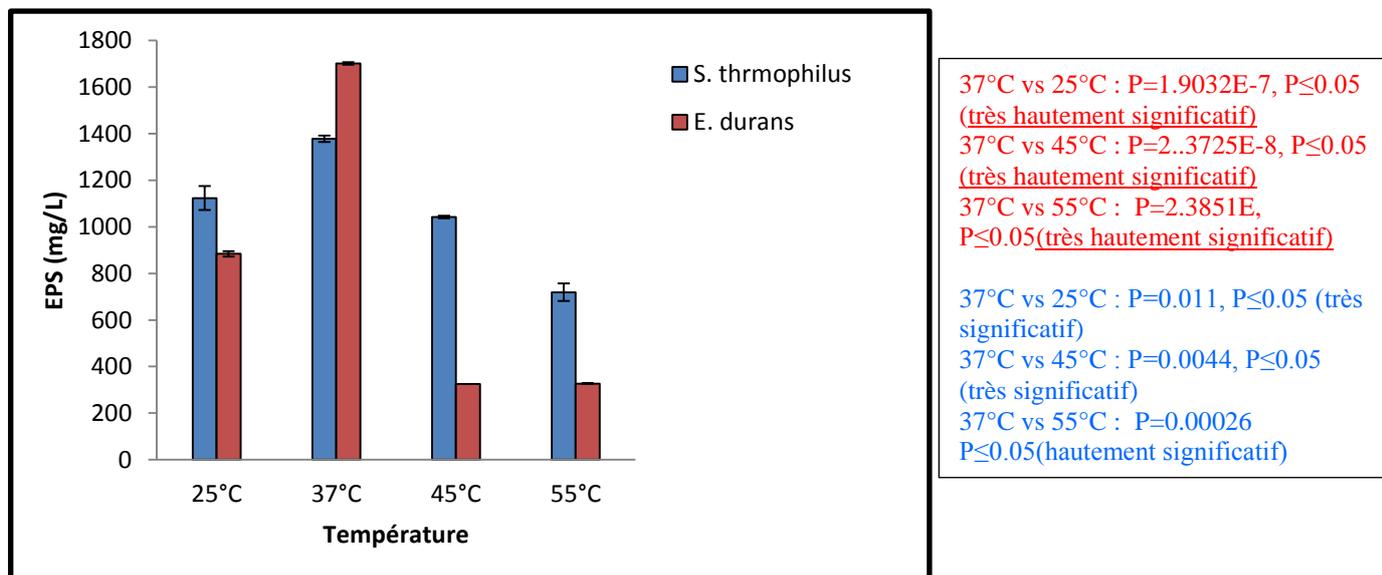
**Figure 5-10 Effet du pH sur la production d'EPS**

Les travaux de Midik et al. (2020) concordent avec nos résultats, puisque les auteurs ont observé aussi un effet significatif du pH sur le rendement en EPS de certaines bactéries lactiques, et que pour toutes les souches, le rendement en EPS a été maximal à pH 6,0, chiffre proche du pH du bouillon MRS (pH 5,8). Inversement, Benhadria et al.(2017), ont rapporté que les meilleurs rendements des isolats testés ont été affichés à pH 6.5. Toutefois, les rendements en EPS ont été réduits à pH 5,0 et 7,0, en particulier à pH 7,0. Quoique le pH optimal pour la formation des EPS soit variable selon la souche lactique et les conditions expérimentales, celui-ci se situe généralement autour de 6,0 (Midik et al., 2020). D'après cette étude, le pH optimal pour la production des EPSs par *E. durans* et *S. thermophilus* ne se situe pas entre 6 et 6,7.

Gamar-Nourani et al. (1998) ont constaté qu'un pH optimal de 6.2 à 7.2 était le plus convenable à l'amélioration de certaines performances des bactéries lactiques, telles la production d'exopolysaccharides.

### 5.4.5. Effet de la température

Sur la figure 5-11, sont regroupés les résultats de l'effet de la température sur la production des EPSs, qui montre que les valeurs optimales en EPS correspondent à celles obtenus à 37°C, soit 1377 et 1700 mg/ L pour *S. thermophilus* et *E. durans* respectivement, par contre les plus faibles taux ont été obtenus à 55°C (*S. thermophilus* : 719 mg/ L, *E. durans*: 326 mg/ L). Ces températures correspondaient aussi aux températures optimales à la croissance. En outre les quantités enregistrées à 25°C étaient considérables, particulièrement pour *S. thermophilus* (1123 mg/ L). L'effet de la température sur la productivité chez les deux souches était significatif ( $P < 0.001$ ).



**Figure 5-11 Effet de la température sur la production d'EPS**

On considère Pour *S. thermophilus*, que la température de croissance constitue le principal facteur ayant une incidence significative sur la production des EPSs. En effet, plusieurs résultats ont révélé que 37°C est une température de croissance sous-optimale pour *S. thermophilus*. Ainsi, des recherches ont confirmé que les températures sous-optimales influençaient favorablement la production d'EPS par les BALs mésophiles et thermophiles (Rabha et al., 2012).

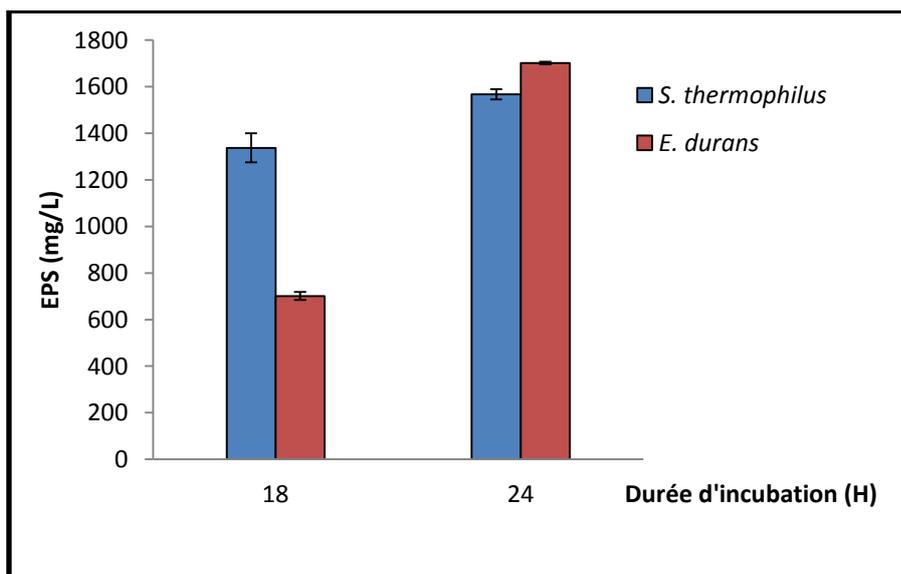
Les résultats de notre étude ont montré une similitude avec ceux de Vaningelgem et al.(2004) qui ont aussi enregistré un maximum de production d'EPS chez *S. thermophilus* ST 111à des températures comprises entre 32°C et 42°C mais à pH constant de 5.5-6.6. Des résultats analogues ont été également constatés avec d'autres souches de *S. thermophilus* productrices d'EPS (De Vuyst et al., 1998).

Toutefois, les travaux portant sur l'effet de la température sur la production des EPSs par des bactéries lactiques sont contradictoires. En effet, dans certains rapports, il a été constaté que les meilleurs rendements sont obtenus à des températures situées dans la gamme optimale de croissance, cependant dans d'autres, il a été indiqué que davantage d'EPS est généré à des températures inférieures à la température optimale de croissance. Ces disparités tiennent à de multiples raisons, dont les différentes méthodes employées pour l'estimation des EPSs, les divers milieux de croissance, les conditions et périodes de mesure, le manque de contrôle du pH, ainsi que les divers modes utilisés pour exprimer les quantités en EPS produites (mg d'EPS, mg d'EPS/ L, mg d'EPS par UFC) (Kimmel et al., 1998).

En effet, la production des EPSs semble être stimulée chez les bactéries lactiques mésophiles dans des conditions sub-optimales, telles que des températures basses, tandis qu'il a été rapporté qu'elle est généralement associée à la croissance chez les BALs thermophiles.

#### 5.4.6. La durée d'incubation

L'effet de la durée d'incubation sur le rendement en EPS est elucidé dans la figure 5-12. Il est bien évident qu' après 24 h d'incubation, les taux d'EPS enregistrés par les deux souches sont à leur maximum. En effet, les valeurs affichaient par *E. durans* ont augmenté de 700 à 1700 mg/ L lors d'incubation de 18 h et 24 h respectivement. Ainsi *S. thermophilus* enregistrait des valeurs de l'ordre de 1337 et 1565 mg/ l. Ce parametre affectait significativement le rendement pour les deux souches ( $p < 0.05$ ).



24h vs 18 :  $P=0.000237$ ,  $P \leq 0.05$   
(très significatif)

24h vs 18 :  $P=0.017$ ,  $P \leq 0.05$   
(significatif)

Figure 5-12 Effet de la durée d'incubation sur la production d'EPS

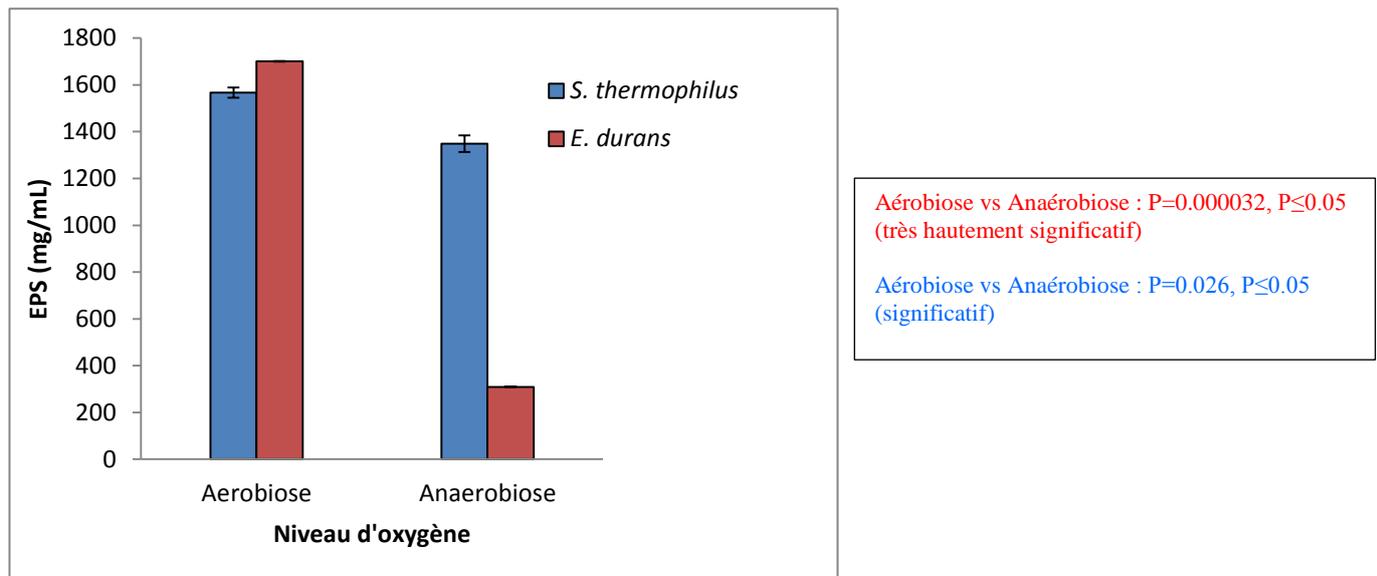
Gayathiri et al. (2017) ont constaté dans leur étude portant sur l'identification et l'optimisation des exopolysaccharides par des isolats de bactéries lactiques, que le niveau de production d'EPS a été graduellement amélioré pour atteindre son maximum à 24h. Après la 24e heure d'incubation, le rendement a diminué progressivement. Toutefois, Boubakeur (2017) a observé pour une souche de *S. thermophilus*, que 18h d'incubation était idéale pour un maximum de production. Ainsi, Aslim et al. (2005), ont constaté que la production d'EPS des différentes souches lactiques dont *S. thermophilus* augmentait jusqu'à 18 h, par ailleurs, au bout de 24 h d'incubation, la production commence à baisser.

Pour la plupart des souches lactiques testées, le niveau maximal de production d'EPS était obtenu après 120 h d'incubation (Midik et al., 2020). La non dégradation de ces polymères durant cette période prolongée, pourrait être expliqué par le fait que l'EPS a été au maximum à la fin de la fermentation. Cette constatation a été aussi observée par Vaningelgem et al. (2004) pour *Streptococcus thermophilus* ST 111 (Durée optimale de 35 h).

Selon Pham et al. (2000) les baisses de viscosité et de poids moléculaire de l'EPS extrait à différents moments de la culture laissent soupçonner la présence d'enzymes dépolymérisantes dans le milieu, dont les glycohydrolases ( $\alpha$ -d-glucosidase,  $\beta$ -d-glucosidase,  $\alpha$ -d-galactosidase,  $\beta$ -d-galactosidase,  $\beta$ -d-glucuronidase, et quelques traces de  $\alpha$ -l-rhamnosidase).

#### 5.4.7. Effet du type respiratoire : Aero/anaérobiose

La figure 5-13 récapitule l'effet du niveau d'oxygène sur la production des EPSs. Les optimums de rendement sont remarquables en aérobiose pour les deux souches. En effet, le taux de production était de 1567 mg/L pour *S. thermophilus* et de 1700 mg/L pour *E. durans*. En revanche en anaérobiose les taux ont baissé (1348 et 309 mg/L, pour *S. thermophilus* et *E. durans* respectivement). Le niveau d'oxygène avait un effet intéressant et significatif ( $P < 0.05$ ), en revanche, en anaérobiose la différence de production des deux souches était faible et hautement significative. Pour *E. durans* par exemple, la production est quatre fois moins importante que celle en aérobiose.

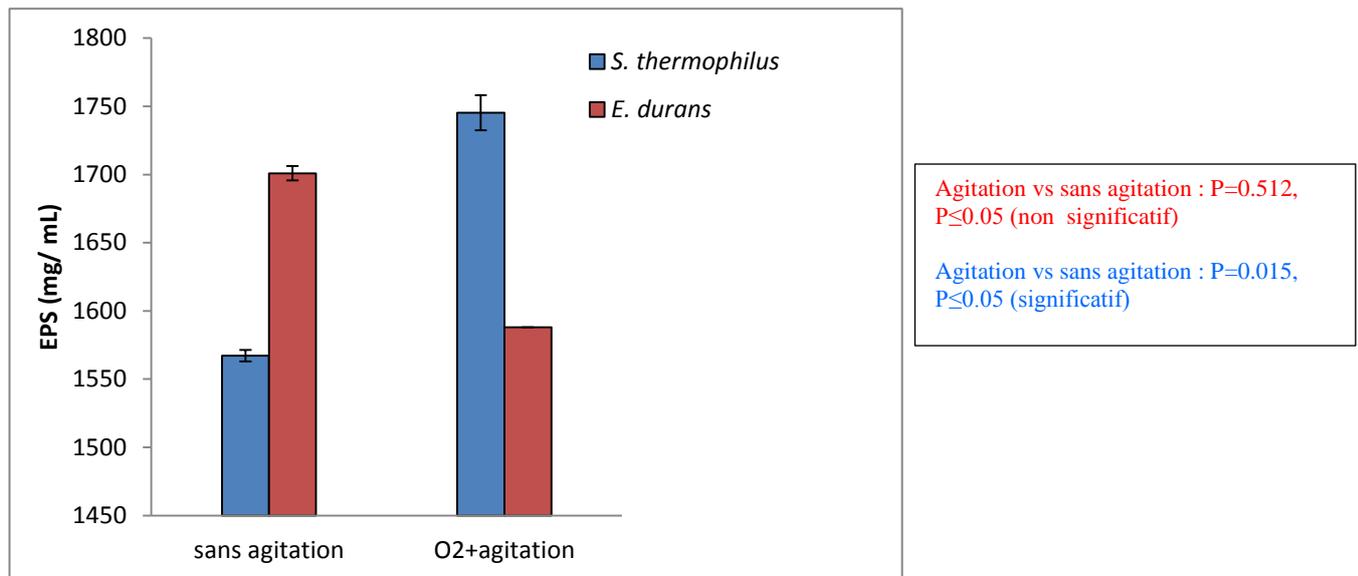


**Figure 5-13 Conditions d'Aero/Anaerobiose nécessaire à la production d'EPS**

Seuls quelques travaux ont porté sur le rôle de l'oxygène dans la production d'EPS. Un faible taux d'oxygène (10%) apparaît comme stimulant à la fois la croissance bactérienne et la production d'EPS, contrairement à des taux élevés (20, 40, et 60%) (Gamar-Nourani et al., 1998. Boubakeur (2017) a aussi observé une production maximale des souches lactiques dans un milieu aéré. Toutefois, la différence de production dans des conditions d'anaerobiose n'était pas significative.

#### 5.4.8. Effet de l'agitation

Rappelons que les conditions optimales enregistrées pour les tests cités précédemment, sont retenus (tableau 5-7). L'effet de l'agitation sur le rendement en EPS est illustré dans la figure 5-14, qui montre un comportement différent des deux souches, en matière de production d'EPS avec et sans agitation. Ainsi l'agitation affectait positivement et significativement ( $P < 0.05$ ) le rendement obtenu par *S. thermophilus*, qui s'est augmenté de 1565 à 1745 mg/ L. Inversement, la production des EPSs sous agitation pour *E. durans* est perturbée et a réduit ( $P \geq 0.05$ ).



**Figure 5-14 Effet de l'agitation sur la production d'EPS**

D'après la recherche documentaire effectuée, l'effet de l'agitation sur le rendement en EPS par les BALs n'est pas assez envisagé par rapport aux autres facteurs physicochimiques. D'après Kuntiya et al. (2010), l'agitation est une opération qui consiste à maintenir l'homogénéité du bouillon de fermentation et à favoriser le transfert de masse des éléments nutritifs et de l'air. En effet dans leur recherche envisageant l'optimisation des paramètres de production d'EPS (telle l'agitation), pour *Lactobacillus confusus* TISTR 1498, ont remarqué que dans des conditions optimales (35°C, 5.5, 100g/L de sucrose), une vitesse moyenne de 50 rpm s'est traduite par un maximum de production d'EPS contrairement à une agitation lente ou rapide.

Pereira Duta et al. (2006) ont rapporté que parmi les paramètres ayant une influence sur la production d'EPS chez *Rhizobium* sp., l'agitation à 800 tr/min, affectait positivement la productoin.

Par ailleurs, l'agitation continue affectait négativement le rendement en EPS de *Pediococcus damnosus* IOB8801, et également la croissance, mais dans une moindre mesure (Walling et al., 2005).

### 5.5. Conditions optimales de production d'EPS des souches testées immobilisées

Sur le tableau 5-7 sont affichés les paramètres optimaux de production d'EPS pour les deux souches testées à l'état sessile (immobilisé). Il est remarquable que pour *S. thermophilus* et *E. durans*, les meilleurs taux en EPSs ont été enregistrés dans le bouillon hypersaccharisé

contenant 50g/ L de sucrose, avec un inoculum de  $10^8$  ufc/ mL, à pH acide (3.5 et 4.5 pour *E. durans* et *S. thermophilus* respectivement), après 24 h d'incubation à  $+37^\circ\text{C}$ , dans des conditions d'aérobiose et sous agitation. Ainsi la production finale en EPS était importante pour les deux souches et plus meilleure pour *S. thermophilus*, soit 1745 mg/ L.

**Tableau 5-7 Récapitulatif des conditions optimales de production d' EPS des souches testées à l'état immobilisé**

Souches bactériennes	Conditions de production							
	Milieu	Inoculum	[sucrose]	pH	T	Durée	O <sub>2</sub>	agitation
<i>E. durans</i>	Sachharosé	$10^8$ ufc/mL	50g/L	3.5	$37^\circ\text{C}$	24h	+	+ <b>(1700)</b>
<i>S. thermophilus</i>	Sachharosé	$10^8$ ufc/mL	50 g/L	4.5	$37^\circ\text{C}$	24h	+	+ <b>(1745)</b>

Rendement en EPS exprimé en (mg/L)

### 5.6. Effet de l'immobilisation par sonication sur le rendement en EPS

Les résultats montrant l'effet de l'immobilisation par traitement ultrasonique sur le rendement en EPS des souches lactiques ont été élucidés dans le tableau 5-8. Notant que la production par des cellules immobilisées était hautement affectée par les multiples paramètres physicochimiques (milieu, taille de l'inoculum, concentration en sucrose, pH, température, durée de fermentation, aération et agitation).

**Tableau 5-8 Effet du conditionnement ultrasonore sur la productivité finale en EPS de *S. thermophilus* CNRZ 447 et *E. durans***

Souches lactiques	EPS (mg/ L)
<i>E. durans</i> témoin (0 min)	<b>1661 <math>\pm</math>27<sup>a</sup></b>
<i>E. durans</i> immobilisée (15 min)	<b>1700 <math>\pm</math>27<sup>a</sup></b>
<i>S. thermophilus</i> témoin (0 min)	<b>176 <math>\pm</math>4<sup>a</sup></b>
<i>S. thermophilus</i> immobilisée (30 min)	<b>1745 <math>\pm</math>12<sup>b</sup></b>

Les valeurs avec différentes lettres en exposant (a, b) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ )

Pour les deux souches testées, l'effet de l'immobilisation était notable, en particulier sur le rendement de *S. thermophilus*, cette souche généralement utilisée pour ses qualités technologiques comme starter, s'est révélée moins productrice par rapport à *E. durans*, 176 vs 1661 mg/ L, en revanche l'effet de la technologie d'immobilisation (traitement aux US pendant 30 min) était plus efficace sur cette souche, son aptitude à produire des EPSs a été

hautement et positivement influencée, et le rendement s'est amélioré de 176 à 1745 mg/ L. D'autre part, une exposition prolongée, de 65 min était délétère. Cette diminution de production pourrait s'expliquer par les effets délétères du traitement. Il est donc essentiel de conditionner le temps adéquatement en vue de l'utilisation des ultrasons pour renforcer les propriétés et les performances des microorganismes bénéfiques.

Moncada et Aryana (2012) ont noté que la sonication à faible puissance ainsi qu'une durée d'exposition contrôlée améliorent les propriétés souhaitées de *S. thermophilus*, telles que la résistance aux conditions hostiles du tractus gastro-intestinal (bile et pH) et la sécrétion de métabolites bioactifs. Les performances obtenues étaient comparables au rendement maximal en EPS des espèces de *S. thermophilus* (1-2 g/L) (Wu et al., 2014 ; Kanamarlapudi et al., 2017). En accord avec notre étude précédente (Boubakeur et al., 2018), il a été possible d'améliorer significativement le rendement en EPS de *S. thermophilus* de 200 à 826 mg de glucose/ L, en adoptant comme approche, les extraits polyphénoliques, afin de démontrer leurs propriétés prébiotiques.

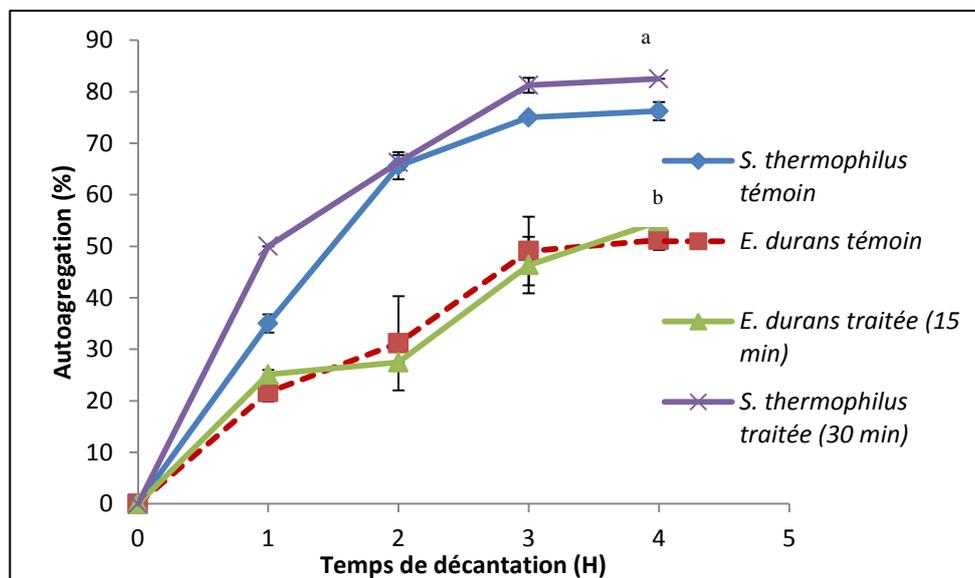
En outre *Enterococcus durans* enregistrait des valeurs importantes d'EPS à l'état libre, en fait, l'immobilisation restait sans effet significatif sur le rendement de cet isolat, même lorsque toutes les conditions physicochimiques requis pour un meilleur rendement sont assurées (1700 vs 1661 mg/ L pour le contrôle). Rares sont les travaux consacrés à identifier ou étudier l'effet des paramètres physicochimiques sur la production d'EPS par des isolats du genre *Enterococcus*, et particulièrement par l'espèce *Enterococcus durans*. Ainsi, le peu d'études existantes envisageaient les performances d'*Enterococcus fecium*. Encore, selon la recherche bibliographique effectuée, aucun travail n'a été réalisé sur l'effet de l'immobilisation sur l'amélioration de ses performances.

Abdellah et al. (2015) dans leur étude évaluant la formation d'un biofilm par des bactéries lactiques thermophiles EPS+, ont indiqué que le taux d'EPS des entérocoques étaient de 0,07 et 0,242 g/L, soit le plus faible de toutes les souches lactiques isolées. En outre, Mostafa et al. (2009) ont rapporté que pour une espèce d'*Enterococcus*, la production maximale d'EPS après 6 heures de fermentation était de 23 g /L.

## 5.7. Effet de l'immobilisation sur les propriétés adhésives des souches étudiées

### 5.7.1. Effet sur l'agrégation

La cinétique d'auto-agrégation des cellules conditionnées par ultrasons a été comparée à celle des cellules témoins (libres), comme c'est indiqué dans la figure 5-15, *S. thermophilus* CNRZ 447 présentait une forte capacité d'auto-agrégation (supérieure à 70 % après 3 heures de décantation). Ainsi l'effet de l'immobilisation était significatif, avec une remarquable amélioration, de 76 à 82 %. En revanche *E. durans* enregistrait des pourcentages d'agrégation considérables mais qui restent moins importants que ceux de *S. thermophilus* CNRZ 447, soit 51 % pour le contrôle et 55 % après traitement de 15 min. La différence de la capacité d'agrégation après 4 h de décantation était significative ( $P < 0.05$ ).



**Figure 5-15** L'auto-adhésion de *S. thermophilus* CNRZ 447 et *E. durans* telle qu'affectée par ultrasons

(Les lettres a, b montrent une différence significative entre les % des deux souches après 4h).

Les valeurs des pourcentages d'agrégation enregistrées pour *S. thermophilus* CNRZ 447 (à l'état libre) sont conformes aux observations antérieures suggérant que les espèces de *S. thermophilus* sont connues pour avoir une forte capacité d'adhésion (supérieure à 50 %) (Leighton, 2007 ; Khalil, 2010 ; Tuncer et al., 2014).

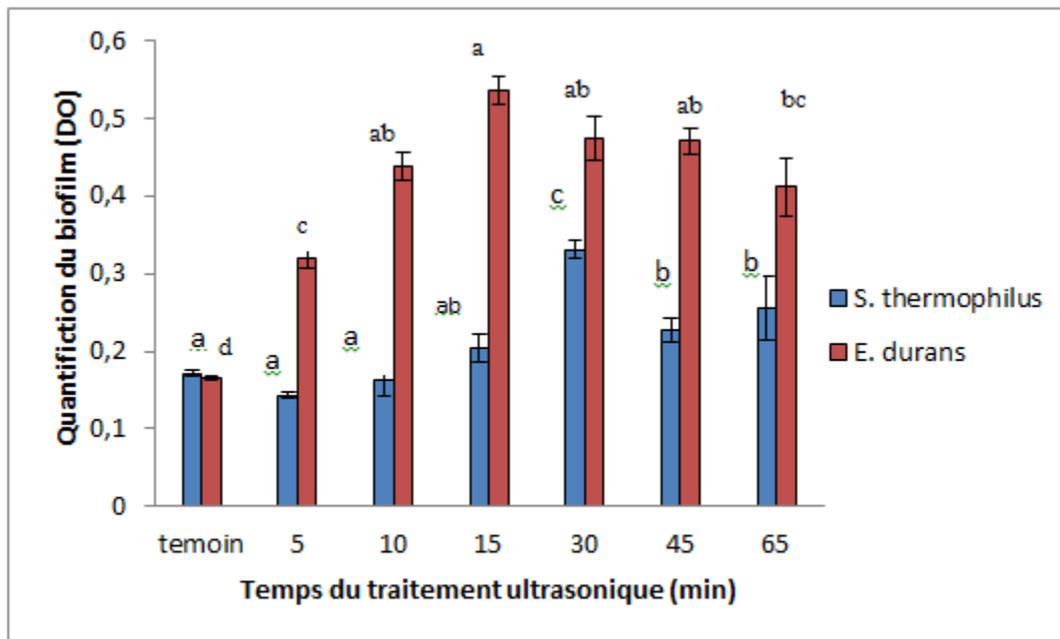
Bagci et al. (2019) ont enregistré pour des espèces d'*Enterococcus* des pourcentages d'adhésion proportionnelles au temps de décantation. Ainsi les valeurs variaient de 7 à 10 % après 3h, et de 24 à 43 après 24 h.

Nous n'avons recensé aucune étude montrant l'effet des ultrasons sur la capacité d'agrégation des souches étudiées pour mieux comprendre la nature des interactions entre les ultrasons et les propriétés adhésives. Néanmoins, on peut déduire que les ultrasons peuvent altérer la structure de surface des cellules et exposer les molécules d'adhésion.

### 5.7.2. Effet sur la formation de biofilm

Les résultats montrant l'effet de l'immobilisation sur la propension du biofilm de *S. thermophilus* CNRZ 447 et *E. durans* sont présentés dans la figure 5-16. Il apparaît clairement que les deux souches formaient des biofilms de la même propension avant qu'elles soient immobilisées (DO= 0.1), en revanche, il est notable que le conditionnement par ultrason a amélioré la capacité des souches à produire un biofilm. En effet pour *S. thermophilus* CNRZ 447, cette aptitude s'est améliorée pour les durées de traitement de 15, 30, 45 et 65 minutes par rapport au contrôle sans sonication (DO 0,20, 0,33, 0,22 et 0,25, vs 0,1 pour le contrôle). En outre *E. durans* s'est révélée plus productrice, ainsi son aptitude à former un biofilm est proportionnelle à la durée de traitement, et est plus importante que le contrôle (DO 0.31, 0.43, 0.53 et 0.47, 0.48 contre 0,16 pour le contrôle).

Après 45 et 65 minutes de traitement, la formation de biofilm de *S. thermophilus* CNRZ 447 a diminué considérablement pour atteindre environ 24-33 %, par rapport à celle de traitement de 30 minutes. Ce constat pourrait être associé à la destruction des cellules bactériennes lors de traitements prolongés. Cette situation ne concerne pas la souche *E. durans*, qui même à des durées prolongées, son aptitude à s'organiser en biofilm été préservée. Ainsi, contrairement à ce qu'il été obtenu pour *S. thermophilus* CNRZ 447, la croissance de *E. durans* n'a pas été affectée, et le traitement ultrasonique prolongé ne s'est pas traduit par une réduction significative du taux de croissance.



**Figure 5-16 Propension du biofilm de *S. thermophilus* CNRZ 447 et *E. durans* après conditionnement aux ultrasons (a, b, c et d sont significativement différentes,  $P < 0,05$ )**

En général, la technologie des ultrasons sert à éliminer les microorganismes et les biofilms indésirables qui causent la contamination. Dans la littérature, on rapporte que les ultrasons servant à éliminer les biofilms sont d'une intensité beaucoup supérieure que celles utilisées dans notre étude. Néanmoins, le traitement peut être jugé apte à déclencher un effet stimulant. Comme indiqué précédemment (Tableau 5-6), les ultrasons peuvent détruire les cellules bactériennes, mais ils peuvent être considérés comme un agent stressant ou interfèrent pouvant stimuler la formation de biofilms (un mécanisme de protection intelligent des bactéries). Ainsi, lors de la fabrication de yaourts, la sonication du lait préalablement ou juste après l'inoculation peut engendrer des propriétés physiques bénéfiques (Körzendörfer et al., 2019).

Une durée optimale pour stimuler la formation des biofilm par *S. thermophilus* CNRZ 477 et *E. durans* a été identifiée, 30 et 15 minutes respectivement. À notre connaissance, il n'existe aucune étude évaluant l'effet stimulant des ultrasons sur le biofilm des BALs. En raison de leur longue utilisation, les BALs ont perdu, contrairement aux agents pathogènes, la capacité de produire des biofilms réguliers (Couvigny et al., 2015).

Dans la présente étude, nous avons montré que la technologie d'immobilisation adoptée (sonication douce) peut être utilisée pour stimuler la formation de biofilms, qui peuvent être utiles pour les microorganismes industriels tels que les BALs. En effet, la

capacité de production de biofilms peut améliorer plusieurs performances des microorganismes, y compris la résistance aux agents antimicrobiens et lors de certaines étapes d'opérations industrielles (cisaillement et pH), les processus de biosynthèse (composés extracellulaires), et les propriétés probiotiques (adhésion, colonisation et effet immunomodulateur) (Czaczyk et al., 2011 ; Couvigny et al., 2015 ; Caggianiello et al., 2016). Les mécanismes exacts associés à l'activation biologique par ultrasons sont encore très spéculés.

### 5.7.3. Effet sur la perméabilité

Le mécanisme le plus évoqué est que cette technologie peut induire une microdiffusion, laquelle peut générer une forte convection et améliorer le transfert de substrat (Chisti, 2003 ; Leighton, 2007). Par conséquent, pour comprendre les interférences mécano-chimiques des ultrasons qui ont pu affecter la physiologie de la souche, la diffusion des protéines (280 nm) et des acides nucléiques (260 nm) a été évaluée.

Les résultats de l'effet de l'immobilisation sur la perméabilité membranaire des souches testées figurent dans le tableau 5-9. La perméabilité des protéines est presque similaire pour *S. thermophilus* et *E. durans*, au voisinage de 55%, en revanche, les acides nucléiques de *E. durans* ont diffusé de manière considérable, 26% contre 1.55 % pour *S. thermophilus*

**Tableau 5-9 Effet de l'immobilisation sur la perméabilité membranaire de *S. thermophilus* CNRZ 447 et *E. durans***

Souches bactériennes	<i>S. thermophilus</i>		<i>E. durans</i>	
	260nm	280nm	260 nm	280nm
% de perméabilité (après traitement US)	<b>1.55±0.7</b>	<b>55.07±7.07</b>	<b>26.08±0.00</b>	<b>54.9±0.00</b>

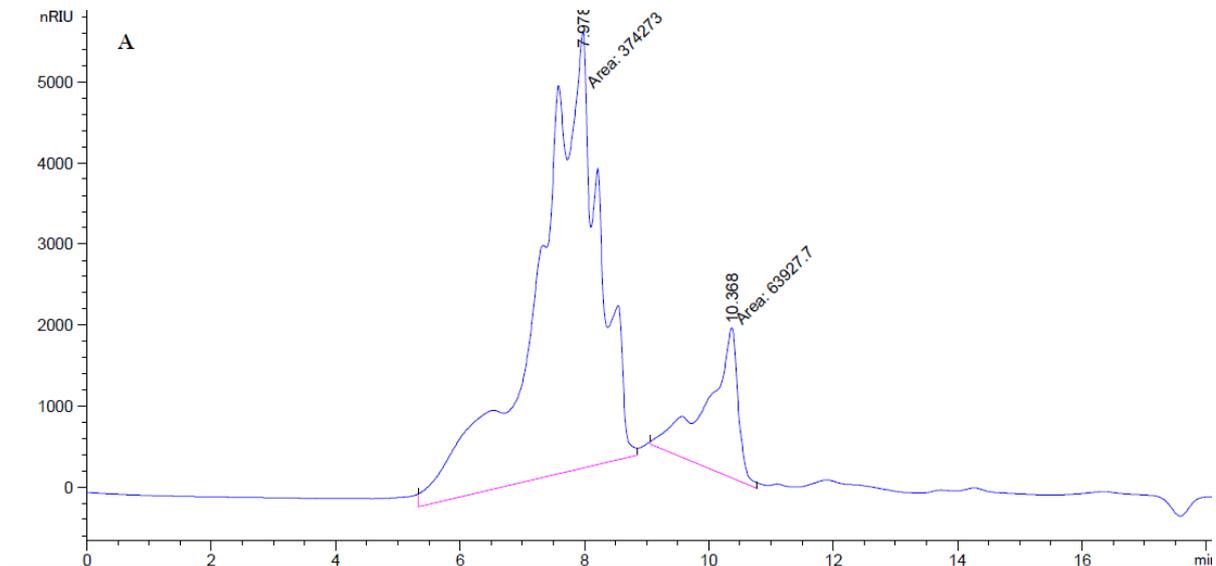
Il est remarquable que la sonication ait un faible effet sur l'excrétion des acides nucléiques, mais un effet remarquable a été induit sur les protéines. Cet effet est probablement associé à la stimulation de la synthèse des protéines. L'ultrason pourrait améliorer efficacement la perméabilité membranaire et activer les processus métaboliques.

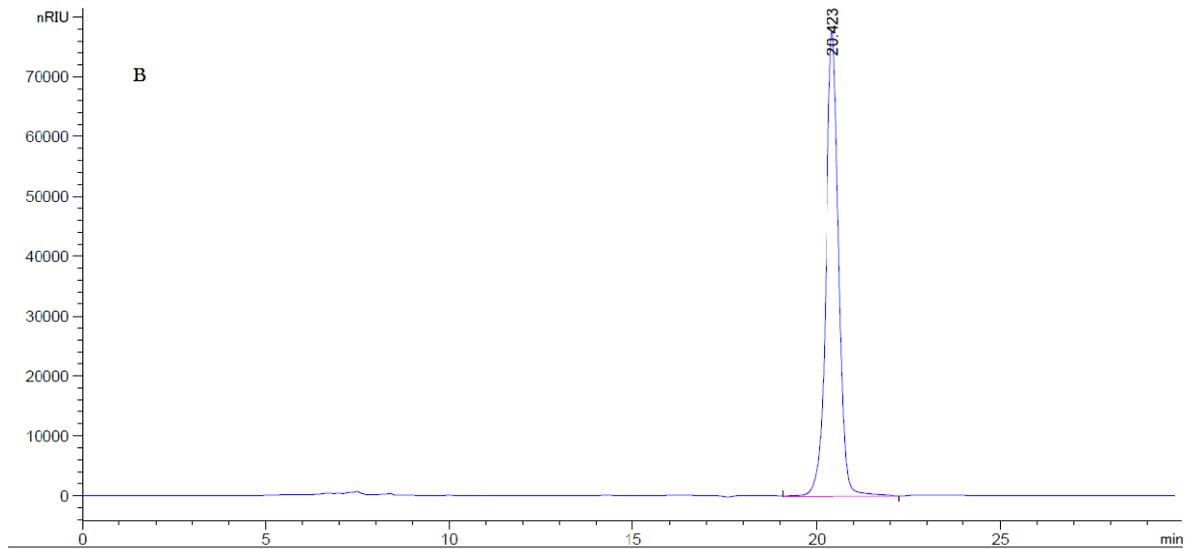
Selon Tabatabaie et Mortazavi (2008), dépendant de la durée d'exposition, des microfissures, des micro-vides et des ratures sont formés sur la paroi cellulaire. Lorsque le temps d'exposition est court, les bactéries peuvent subir des dommages comme des microfissures et des micro-vides, tandis que lorsque celui-ci est plus long, une rupture se produit. Ces dommages entraînent la libération de composés intracellulaires, d'enzymes, de

polysaccharides et de polymères dans le milieu. D'autre part, afin de garantir un niveau de perméabilité cellulaire souhaité tout en évitant la mort cellulaire, il est indispensable de définir et de contrôler les paramètres de cette technologie, étant donné qu'elle peut entraîner une fuite du contenu cellulaire (Abesinghe et al., 2019).

### 5.8. Caractérisation par HPLC des exopolysaccharides

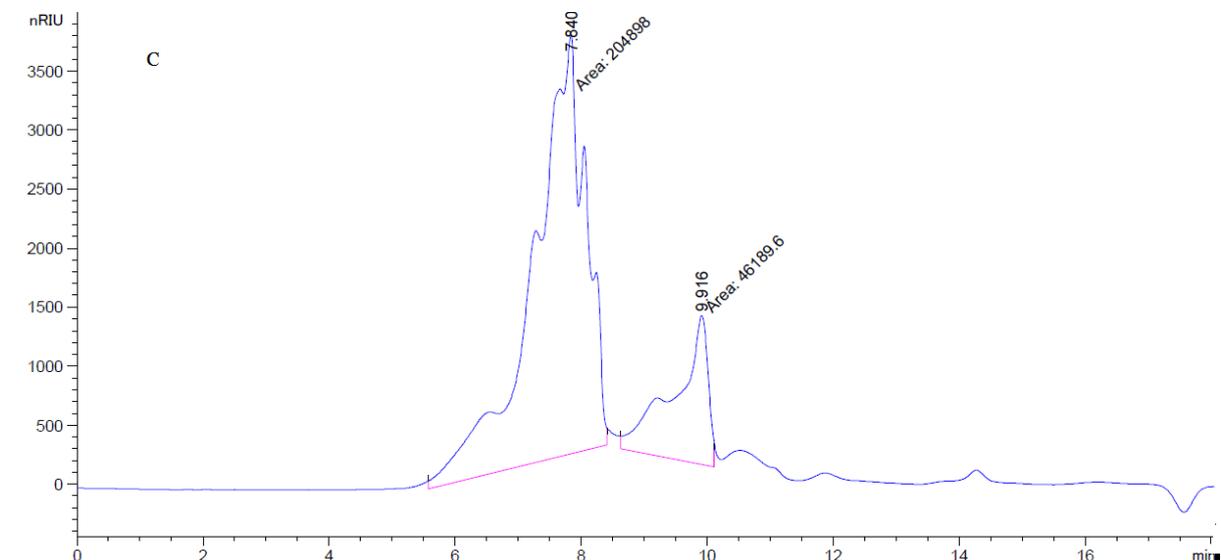
Le profil HPLC de l'EPS produit par *S. thermophilus* CNRZ 447 et *E. durans* est présenté dans la figure 5-17 (A,B) et 5-18(C,D). Les chromatogrammes "A et B" ont révélé que l'EPS généré par *S. thermophilus* CNRZ 447 était composé principalement de deux triholosides majoritairement constitués de glucose. La composition exacte en monosaccharides était insuffisamment déterminée. Toutefois, l'espèce *S. thermophilus* est déclarée produire des hétéropolysaccharides (Ricciardi, 2002; Kanamarlapudi et al., 2017). D'autre part, l'EPS produit par *E. durans* a révélé à la 7 et à 9 min des pics correspondant à des oligosaccharides, et un pic unique, résultant d'une élution à 20.4 min, qui correspondait probablement au sorbitol. Or, la caractérisation structurale des polymères produits nécessitent encore une identification plus fine.

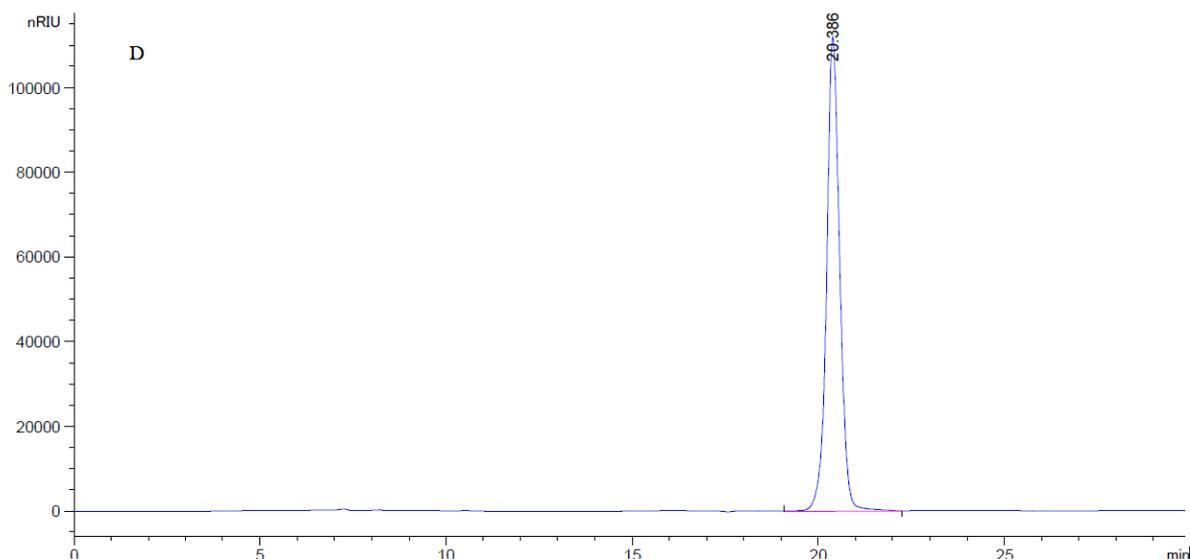




**Figure 5-17 Profil HPLC de l'EPS de *S. thermophilus* CNRZ 447**

: A) L'EPS est composé d'au moins deux triholosides distincts (entre 7 et 10 minutes) qui sont constitués principalement de résidus de glucose. B) Un pic caractéristique unique à 20,4 minutes a été observé pour l'EPS hydrolysé ; il a été identifié comme étant du glucitol.





**Figure 5-18 Profil HPLC de l'EPS de *E. durans***

: C) L'EPS est composé de quelques oligosaccharides (entre 7 et 9 minutes) qui sont constitués principalement de résidus de glucose. D) Un pic caractéristique unique à 20,3 minutes a été observé pour l'EPS hydrolysé ; il a été identifié comme étant du glucitol.

Les EPSs élaborés par les BALs affichent des structures très variées (Jolly et al., 2002). En effet, la composition en monosaccharides, les liens entre les unités, la présence de chaînes latérales répétées et les substitutions sont souvent à l'origine de divergences entre les EPSs. Par ailleurs, la longueur et la constitution des ramifications modifient fortement les propriétés rhéologiques (Vincent et al., 2001).

## ***CONCLUSION GENERALE***

L'application des BALs offrent une valeur ajoutée à la santé humaine en produisant des composés biologiquement actifs tels que les EPSs, lesquels promeuvent la santé des consommateurs grâce à leurs activités immunomodulatrices, anti-gastriques, anti-ulcéreuses et anti-virales (Panthavee et al., 2017). De ce fait, les exopolysaccharides à qualité alimentaire, suscitent encore l'attention de nombreux projets de recherches, non pas seulement pour les produire à grande échelle mais aussi, pour identifier de nouvelles souches productrices et pour y améliorer la productivité via l'adoption de nouvelles technologies, telle l'immobilisation.

L'immobilisation par traitement ultrasonique des souches lactiques est la démarche que nous avons adoptée où le choix des souches bactériennes était basé sur : d'une part l'importance technologique qu'elles occupent, en particulier dans l'industrie laitière, et sur le fait que peu de travaux existants ont envisagés l'évaluation des atouts probiotiques de la souche *Enterococcus durans*, qui a fait depuis toujours un sujet paradoxal pour certains nombres de scientifiques.

L'étude *in vitro* a montré que les deux souches *E. durans* et *S. thermophilus* CNRZ 447 ont un potentiel probiotique prometteur. Ainsi d'après les résultats de l'évaluation du potentiel probiotique des deux isolats lactiques, nous pouvons suggérer que le caractère EPS<sup>+</sup> caractérisant ces deux dernières semble contribuer potentiellement à la protection des cellules microbiennes contre des environnements extrêmes (faible pH et sels biliaries). En effet, cette investigation nous a permis de supposer qu'une production élevée en EPS peut être un trait pivotant dans le screening des souches à caractère probiotique.

Les résultats de l'optimisation de la production d'EPSs ont révélé l'importance de cette étape pour toute production microbienne, ainsi les rendements en EPS ont été significativement améliorés depuis le premier paramètre optimisé (Milieu), ainsi la productivité s'est augmentée pour les deux souches. L'amélioration de la production finale par des cellules immobilisées était importante, confirmant ainsi l'effet positif sur les divers atouts associés à l'adhésion (Agrégation, hydrophobicité, et biofilm).

La présente étude a fait état de la possibilité que la sonication puisse être envisagée comme alternative aux approches d'immobilisation classiques, vue qu'elle s'est révélée efficace pour améliorer le métabolisme bactérien, en offrant une tolérance supplémentaire aux bactéries pour faire face à certaines conditions extrêmes, et en favorisant, l'adhésion, la formation d'un biofilm et améliorant la productivité en EPSs des deux souches lactiques connu par leur application industrielle. Ainsi, les techniques de conditionnement physique telles que les ultrasons devraient être explorées plus avant et utilisées pour améliorer les performances désirées des microorganismes bénéfiques. Dans l'ensemble, il est impératif que

## ***Conclusion Générale***

---

les paramètres régissant cette technologie soient établis, contrôlés, et adaptés en fonction des applications.

D'autre part, des études supplémentaires *in vivo* envisageant le pouvoir anti-cholestérolémique, anti-hémolytique et d'autres sont nécessaires pour clarifier les propriétés probiotiques des souches. Ainsi des études supplémentaires au futur, portant sur l'immobilisation seront donc requises, en testant d'autres souches lactiques, dans un but de mieux comprendre le phénomène.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- ❖ Abamecha, A., Wondafrash, B., & Abdissa, A. (2015). Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia. *BMC research notes*, 8(1), 1-7
- ❖ Adebayo-Tayo, B., Onilude, A. (2009). Comparative influence of medium composition on biomass growth, lactic acid and Exopolysaccharides Production by some Strains of Lactic Acid Bacteria. *Internet Journal of Microbiology*, 7(2), 1-8.
- ❖ Abdellah, M., Ahcène, H., Benalia, Y., Saad, B., & Abdelmalek, B. (2015). Evaluation of biofilm formation by exopolysaccharide-producer strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian camel milk. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 513-521.
- ❖ Abesinghe, A. M. N. L., Islam, N., Vidanarachchi, J. K., Prakash, S., Silva, K. F. S. T., & Karim, M. A. (2019). Effects of ultrasound on the fermentation profile of fermented milk products incorporated with lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 90, 1-14.
- ❖ Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I. U., & Fernando, L. (2000). Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of dairy science*, 83(9), 1946-1951.
- ❖ Aghababaie, M., Khanahmadi, M., & Beheshti, M. (2015). Developing a kinetic model for co-culture of yogurt starter bacteria growth in pH controlled batch fermentation. *Journal of Food Engineering*, 166, 72-79.
- ❖ Agregán, R., Munekata, P. E., Franco, D., Carballo, J., Barba, F. J., & Lorenzo, J. M. (2018). Antioxidant potential of extracts obtained from macro-(*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) and micro-algae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*) assisted by ultrasound. *Medicines*, 5(2), 33.
- ❖ Akpınar, A., Yerlikaya, O., & Kiliccedil, S. (2011). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish homemade yoghurts. *African Journal of Microbiology Research*, 5(6), 675-682.
- ❖ Aktypis, A., Tychowski, M., Kalantzopoulos, G., & Aggelis, G. (2007). Studies on bacteriocin (thermophilin T) production by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 in batch and fed-batch fermentation modes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92(2), 207-220.
- ❖ Alexandre, H., Grandvalet, C., Guilloux-Bénatier, M., Remize-Barnavon, F., & Tourdot-Maréchal, R. 2008. Les bactéries lactiques en œnologie. Paris: Technique et documentation. Pp. 9-11.

- ❖ Al Khawli F., Zhou J., Wang M., Lorenzo J. M., Munekata P. E., Ferrer E., Barba F. J. (2021) Mind the gap in the knowledge of the potential food applications of ultrasound based on its mechanism of action. [in:] Design and Optimization of Innovative Food Processing Techniques Assisted by Ultrasound. Ed. Barba F. J., Cravotto G., Chemat Farid., Lorenzo Rodriguez J. M., Munekata Sichetti P. E. London , Academic Press: 1-13.
- ❖ Al Kassaa, I. 2017. New Insights on Antiviral Probiotics: From Research to Applications. Cham : Springer international pu. Pp. 4-13
- ❖ Alraefaei A., Taibi A., Comelli E. (2020). Probiotic Supplements–Basic Concepts of the Gut Microbiome and the Role of Probiotics to Sustain Health. [in:] Nutraceuticals and Human Health: The Food-to-supplement Paradigm. Ed. Spagnuolo P.A., Croydon: The royal society of chemistry: 185-203.
- ❖ Anadón A., Martínez-Larrañaga M. R., Arés I., Martínez M. A. (2016). Prebiotics and Probiotics: An Assessment An Assessment of Their Safety and Health Benefits. [in:] Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Bioactive foods in health promotion. Ed. Watson R. R., Preedy V, London: Elsevier:3-24.
- ❖ Anukam, K. C., Koyama, T. (2007). Bile and acid tolerance of *Lactobacillus plantarum* KCA-1: A potential probiotical agent. *Int J Dairy Sci*, 2(3),275-280
- ❖ Arroyo, C., Lyng, J. G. (2017). The use of ultrasound for the inactivation of microorganisms and enzymes. [in:] Ultrasound in Food Processing. Ed. Villamiel M., Montilla A, West Sussex. John Wiley & Sons Ltd: 255-286.
- ❖ Aslim, B., Yüksesdag, Z. N., Beyatli, Y., & Mercan, N. (2005). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 673-677.
- ❖ Aslim, B., Alp, G. (2009). The effect of immobilization on some probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* strains. *Annals of microbiology*, 59(1), 127-132.
- ❖ Auffray, Y., Lecesne, E., Hartke, A., & Boutibonnes, P. (1995). Basic features of the *Streptococcus thermophilus* heat shock response. *Current Microbiology*, 30(2), 87-91.
- ❖ Auffray, Y., Lecesne, E., Hartke, A., & Boutibonnes, P. (1995). Basic features of the *Streptococcus thermophilus* heat shock response. *Current Microbiology*, 30(2), 87-91.
- ❖ Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. [in:] Lactic acid bacteria. Ed. Salminen S., Von Wrigh A., Ouwehand A, New York: Marcel Dekker. 1-66.

- ❖ Ayyash, M., Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., Enan, M., El-Tarabily, K., & Shah, N. (2018). *In-vitro* investigation into probiotic characterisation of *Streptococcus* and *Enterococcus* isolated from camel milk. *LWT*, 87, 478-487.
- ❖ Bagci, U., Togay, S. O., Temiz, A., & Ay, M. (2019). Probiotic characteristics of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from human milk and colostrum. *Folia Microbiologica*, 64(6), 735-750.
- ❖ Balourin, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- ❖ Basson, A., Flemming, L. A., & Chenia, H. Y. (2008). Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microbial ecology*, 55(1), 1-14.
- ❖ Bastani, P., Akbarzadeh, F., Homayouni, A., & Javadi, M. (2016). Health benefits of probiotic consumption. [in:] *Microbes in food and health*. Ed. GargN., Abdel-Aziz S., Aeron A. Cham: Springer: 163-183.
- ❖ Bauer, A. W. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J clin pathol*, 45(4), 149-158.
- ❖ Begley, M., Gahan, C. G., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 625-651.
- ❖ Belgacem, Z. B., Abriouel, H., Omar, N. B., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., & Manai, M. (2010). Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21(4), 462-470.
- ❖ Benhadria, M. K., Touil, M. A. T., & Meddah, B. (2017). Optimization of production of microbial exopolysaccharides (EPS) with essential oils from two medicinal plants. *Journal of Applied Biosciences*, 111(1), 10925-10933.
- ❖ Bergmaier, D. (2002). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *LB. Rhamnosus* RW-9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de doctorat. 28383, Université Laval Quebec, PQ, Canada.
- ❖ Blom, H., Mørtvedt, C. (1991). Anti-microbial substances produced by food associated micro-organisms. *Biochemical Society Transactions*, 19(3), 694-698.

- ❖ Bogsan, C. S., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2015). From Traditional Knowledge to an Innovative Approach for Bio-preservation in Food by Using Lactic Acid Bacteria. [in:] *Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals*. Ed Liang M.T, London: Springer. 2-28.
- ❖ Boke, H., Aslim, B., & Alp, G. (2010). The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPS) produced by yogurt starter bacteria. *Archives of Biological Sciences*,62(2), 323-328.
- ❖ Boris, S., Suarez, J. E., & Barbes, C. (1997). Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, avaginal isolate. *Journal of applied microbiology*, 83(4), 413-420.
- ❖ Boubakeur, B. (2017). Recherche d'un effet prébiotiques des exopolysaccharides des bactéries lactiques produits sous l'effet des polyphénols de *Thymus fontanesii*. Thèse de doctorat, Université Mustapha Stambouli de Mascara, Algérie.
- ❖ Boubakeur, B., Soungalo, D. M., Hafidha, K., Catherine, M., & Aicha, T. (2018). Influence of the exopolysaccharides of polyphenol-conditioned lactic acid bacteria on gut microecology and bacterial translocation. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(3), 1-9.
- ❖ Bremer, P., Flint, S., Brooks, J., & Palmer, J. (2015). Introduction to biofilms: definition and basic concepts. *Biofilms in the dairy industry*, 1-16.
- ❖ Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of food engineering*, 104(4), 467-483.
- ❖ Caggianiello, G., Kleerebezem, M., & Spano, G. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(9), 3877-3886.
- ❖ Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Su á rez , V., & Jorge, R. (2010). Advances and Trends in Starter Cultures for Dairy Fermentations. [in:] *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*. Ed. Mozzi F., Raya R., Vignolo G M, Iowa: Blackwell Publishing. 177-192.
- ❖ Cerning, J. C. M. C., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., & Topisirovic, L. (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11), 3914-3919.

- ❖ Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., & Desmazeaud, M. (1992). Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 75(3), 692-699.
- ❖ Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., & Desmazeaud, M. J. (1990). Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Sciences des aliments*, 10(2), 443-451.
- ❖ 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. *Journal of applied microbiology*, 84(5), 759-768.
- ❖ Chen, H., Narbad, A. (2018). Proteins and Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria. [in:] *Lactic Acid Bacteria in Foodborne Hazards Reduction*. Ed. Chen W., Narbad A, Singapore: Springer. 51-85.
- ❖ Chen, W., Hang, F. (2019). Lactic Acid Bacteria Starter. [in:] *Lactic Acid Bacteria Bioengineering and Industrial Applications*. Ed. Chen W, Singapore: Springer.93-144.
- ❖ Chen, W., Wang, L. (2018). Lactic Acid Bacteria in Foodborne Hazards Reduction. Singapore: Springer Nature Pte Ltd.Pp. 2-14.
- ❖ Chen, W., Yu, L., & Shi, Y. (2019). Safety Evaluation of Lactic Acid Bacteria. [in:] *Lactic Acid Bacteria: Omics and Functional Evaluation*. Ed. Chen W, Singapore: Springer.371-409
- ❖ Chisti, Y. (2003). Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *TRENDS in Biotechnology*, 21(2), 89-93.
- ❖ Cogan, T. M., & Beresford, T. (2002). Microbiology of hard cheese. [in:] *Dairy Microbiology Handbook: the microbiology of milk and milk products*. Ed. Robinson R K: New York, John Wiley and Sons.515-557.
- ❖ Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European food research and technology*, 226(5), 1065-1073.
- ❖ Couvigny, B., Thériat, C., Gautier, C., Renault, P., Briandet, R., & Guédon, E. (2015). *Streptococcus thermophilus* biofilm formation: a remnant trait of ancestral commensal life?. *PLoS One*, 10(6), e0128099.

- ❖ Cowan, S. T. (2004). Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. Ed. Barrow G. I., Feltham R. K. A, New York. Cambridge university press: 21-42.
- ❖ Cloete, E., Molobela, I., Van Der Merwe, A., & Richards, M. (2009). Biofilms in the food and beverage industries: an introduction. [in:] Biofilms in the food and beverage industries. Ed. Fratamico PM., Annous A., Guenther NW, Boca Raton: Woodhead Publishing. 3-41.
- ❖ Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M. M., & Biavati, B. (1994). Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 24(1-2), 199–210.
- ❖ Czaczyk K., Myszk K. (2011) Biofilms in the food environment. [in:] Encyclopedia of agrophysics. Ed. Gliński J., Horabik J., Lipiec J. Netherlands, Springer: 76–78.
- ❖ Dash, S. K., Spreen, A., Ley, B. 2000. Health benefits of probiotics. Temecula: BI Publications. Pp 42. 43.
- ❖ De Ambrosini, V. M., Gonzalez, S., de Ruiz Holgado, A. P., & Oliver, G. (1998). Study of the morphology of the cell walls of some strains of lactic acid bacteria and related species. *Journal of food protection*, 61(5), 557-562.
- ❖ Denis, C., Champomier-Vergès, M., Zagorec, M., & Talon, R. (2013). Critères de sélection des micro-organismes bioprotecteurs. [in:] Flores protectrices pour la conservation des aliments. Ed. Zagorec M., Christeans S. Versailles, Quae 7-14.
- ❖ De Valdez, G. F., Taranto, M. P. (2001). Probiotic Properties of Lactobacilli. [in:] Food Microbiology Protocols. Ed. Spencer John F. T., Ragout de Spencer A. L. Totowa, Humana Press Inc:173-181.
- ❖ De Vries, W., Kapteijn, W. M., Van der Beek, E. G., & Stouthamer, A. H. (1970). Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and in continuous cultures. *Microbiology*, 63(3), 333-345
- ❖ De Vuyst, L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 38(2 ). 105-112.
- ❖ De Vuyst, L., de Ven, V. (1998). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 1059-1068.
- ❖ De Vuyst, L., Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 23(2). 153-177.

- ❖ De Vuyst, L., Vaningelgem, F. (2003). Developing new polysaccharides.[in:] Texture in food. Ed. McKenna B. M. Boca Raton, CRC Press: 25- 308.
- ❖ De Vuyst, L., de Vin, F., Vaningelgem, F., & Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J*, 11. 687–707.
- ❖ Drabo, M. S., Khadem, H., Benatmane, N. E., Ouhab, A., Zohra, M. F., Soualmi, K., & Badra, B. (2019). Qualité microbiologique du blé dur fermenté de Matmor Hamoum: Indispositions digestives, microflore avantageusement technologique et potentiels pathogènes. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 27(1), 11-18.
- ❖ Dressman, J. B., Berardi, R. R., Dermentzoglou, L. C., Russell, T. L., Schmaltz, S. P., Barnett, J. L., & Jarvenpaa, K. M. (1990). Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharmaceutical research*, 7(7), 756-761.
- ❖ Dupin, H. 1992. Alimentation et nutrition humaines. Paris. ESF éditeur. Pp.1305
- ❖ du Toit, M., Huch, M., Cho, G. S., & Franz, C. M. A. P. (2014). The genus *Streptococcus*. [in:] *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and taxonomy*. Ed. Holzapfel Wilhelm H., Wood Brian J.B. Hoboken, John Wiley & Sons: 457-505.
- ❖ De Valdez, G. F., Taranto, M. P. (2001). Probiotic Properties of *Lactobacilli*. [in:] *Food Microbiology Protocols*. Ed. Spencer John F. T., Ragout de Spencer A. L. Totowa, Humana Press Inc:173-181.
- ❖ EFSA. (2012). Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10(6). 1-10.
- ❖ El-Dalatony, M. M., Li, X. (2020). Introduction to Probiotics and Their Potential Health Benefits. [in:] *Gut Remediation of Environmental Pollutants: Potential Roles of Probiotics and Gut Microbiota*. Ed. Li X., Liu P. Singapore, Springer: 81-108.
- ❖ Endo, A., Tanizawa, Y., & Arita, M. (2019). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria. [in:] *Lactic Acid Bacteria: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Ed Kanauchi M. New York, : Springer: 3-13.
- ❖ Endo, A., Dicks, L. (2014 ). Physiology of the LAB. [in:] *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy*. Ed. Holzapfel Wilhelm H., Wood Brian J.B. Hoboken. London, John Wiley & Sons: 13-20.

- ❖ Ershadian, M., Branch, D., & Azad, I. (2015). Antimicrobial and co-aggregation effects of probiotic lactobacilli against some pathogenic bacteria. *Iran J Med Microbiol*, 9. 14–22.
- ❖ Ezhil, I., Belur, P. D., & Saidutta, M. B. (2015). Production optimization of a new exopolysaccharide from *Bacillus methylotrophicus* and its characterization. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 11(1), 21-39.
- ❖ Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 613-630.
- ❖ FAO/WHO (2001) Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation.
- ❖ Fang, Q. H., Zhong, J. J. (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, 10(1), 61-65.
- ❖ Fang, S. H., Chiang, S. H., Hsu, S. Y., & Chou, C. C. (2012). Cold shock treatments affect the viability of *Streptococcus thermophilus* BCRC 14085 in various adverse conditions. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20(1), 117-124.
- ❖ Farnworth, E. R., Champagne, C. P., & Van Calsteren, M. R. (2006). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Food uses, production, chemical structures, and health effects. [in:] *Probiotics in Food Safety and Human Health*. Ed. Goktepe., Juneja Vijay K., Ahmedna Mohamed. Boca Raton, CRC Taylor & Francis Group. USA.
- ❖ Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. 2017. *Fundamentals of cheese science*. New York: Springer. Pp 121-180, Pp 414,428,436.
- ❖ Franz, C. M., & Holzapfel, W. (2011). The importance of understanding the stress physiology of lactic acid bacteria. [in:] *Stress responses of lactic acid bacteria*. Ed. Tsakalidou E., Papadimitriou K. Boston, Springer:3-21.
- ❖ Franz, C. M., Cho, G.-S., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2010). Safety of Lactic Acid Bacteria. [in:] *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*. Ed. Mozzi F., Raya R., Vignolo G. Singapore, Blackwell Publishing: 341-359
- ❖ Gallo, M., Speranza, B., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2016). Novel microbial immobilization techniques. [in:] *Novel food fermentation technologies*. Ed. Shikha Ojha K., Tiwari Brijesh K. Cham, Springer: 35-55.

- ❖ Gamar-Nourani, L., Blondeau, K., & Simonet, J. M. (1998). Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology*, 85(4), 664-672.
- ❖ García de Fernando, G. (2011). Lactic Acid Bacteria | Enterococcus in Milk and Dairy Products. [in:] *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Ed. John W. Fuquay., Paul L.H. MSweeney., Patrick F. Fox. London, Academic Press: 153–159.
- ❖ Gayathiri, E., Bharathi, B., Velu, S., Siva, N., Natarajan, S., Prabavathi, S., & Selvadhas, S. (2017). Isolation, identification and optimization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from raw dairy samples. *International Journal of Pharma and Chemical Research*, 3(2), 202-211.
- ❖ Georges, C., & François-Marie, L. (2008). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. Lavoisier.
- ❖ Gibson, G., & Roberfroid, M. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Nutr*, 125, 1401–1412.
- ❖ Gobbetti, M., Angelis, M. D., Cagno, R. D., & Rizzello, C. G. (2007). The relative contributions of starter cultures and non-starter bacteria to the flavour of cheese. [in:] *Improving the flavour of cheese*. Ed. Weimer Bart C. Boca Raton, Woodhead Publishing: 121-147.
- ❖ Goh, Y. J., Klaenhammer, T. R. (2010). Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and environmental microbiology*, 76(15), 5005-5012.
- ❖ Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., & Salminen, S. (1992). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive diseases and sciences*, 37(1), 121-128.
- ❖ Gomes, AM., Manuela, E. Pintado, & Malcata Xavier, F. (2010). Probiotics. [in:] *Handbook of dairy foods analysis*. Ed. Nollet Leo M.L., Toldrá F. Boca Raton, Taylor and Francis: 503-525.
- ❖ Gousia, P., Economou, V., Sakkas, H., Leveidiotou, S., & Papadopoulou, C. (2011). Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. *Foodborne pathogens and disease*, 8(1), 27-38.
- ❖ Gracin, L., Jambrak, A. R., Juretić, H., Dobrović, S., Barukčić, I., Grozdanović, M., & Smoljanić, G. (2016). Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Applied Acoustics*, 103, 143-147.

- ❖ Grattepanche, F., Lacroix, C. (2010). Production of high-quality probiotics using novel fermentation and stabilization technologies. [in:] *Biotechnology in functional foods and nutraceuticals*. Ed. Bagchi D, Lau, Francis C., Ghosh, Dilip K. Boca Raton, Taylor & Francis: 361-388.
- ❖ Haddaji, N., Krifi, B., Lagha, R., Khouadja, S., & Bakhrouf, A. (2015). Effect of high temperature on viability of *Lactobacillus casei* and analysis of secreted and GroEL proteins profiles. *African Journal of Bacteriology Research*, 7(3), 29-35.
- ❖ Halász, A. (2009). Lactic acid bacteria. [in:] *Food quality and standards*. Ed. Lasztity, R. Oxford, Eolss:70-82.
- ❖ Hardie, J. M., & Whiley, R. A. (1995). The genus streptococcus. [in:] *The genera of lactic acid bacteria*. Ed. Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. Boston. Springer: 55-124
- ❖ Harnett, J., Davey, G., Patrick, A., Caddick, C., & Pearce, L. (2011). Lactic Acid Bacteria | *Streptococcus thermophilus*. [in:] *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Ed. John W. Fuquay., Paul L.H. MSweeney., Patrick F. Fox. London, Academic Press: 143–148.
- ❖ Harutoshi, T. 2020. Exploitation of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria.[in] *Biopolymers for Biomedical and Biotechnological Applications*, Ed. Rehm, Bernd H. A., Moradali, M. Fata. Weinheim, John Wiley & Sons:103–127.
- ❖ Harutoshi, T. (2013) Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health Applications. [in:] *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Ed. Kongo, J. M. Rijeka, IntechOpen: 515-538
- ❖ Hashemi, S. M. B., Khaneghah, A. M., Saraiva, J. A., Jambrak, A. R., Barba, F. J., & Mota, M. J. (2018). Effect of ultrasound on lactic acid production by *Lactobacillus* strains in date (*Phoenix dactylifera* var. Kabkab) syrup. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(6), 2635-2644.
- ❖ Hassan, A. N., Frank, J. F. (2001). Starter cultures and their use. [in:] *Appleid Dairy Microbiologie*. Ed. Marth, Elmer H., Steele, J. New York, Marcel Dekker. 151-206.
- ❖ Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2010). Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of food engineering*, 98(3), 309-316.
- ❖ Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*,. 11(8). 506–514.

- ❖ Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. (2017). Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research*, 6, 1-9.
- ❖ Holzapfel, W. H., Wood, B. (2014). Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. Ed. Holzapfel, W. H., Wood, B. West Sussex. John Wiley & Sons.1-9.
- ❖ Holzapfel, W. H., Wood, B. J. (1995). Lactic acid bacteria in contemporary perspective.[in:] The genera of lactic acid bacteria. Boston, Springer: 1-6.
- ❖ Homayoni Rad, A., Akbarzadeh, F., & Mehrabany, E. (2012). "Which are more important: Prebiotics or probiotics?. *Nutrition*, 28(11/12 ). 1196–1197.
- ❖ Hugenholtz, J. (2013). Traditional biotechnology for new foods and beverages. *Current opinion in biotechnology*, 24(2). 155-159.
- ❖ Hutkins, R. W., & Morris, H. A. (1987). Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. *Journal of Food Protection*, 50(10), 876-884
- ❖ Hutkins, R. W. (2019). Cultured dairy products. [in:] Microbiology and Technology of Fermented Foods. Ed. Hutkins R. W. Hoboken, John Wiley & Sons: Pp137
- ❖ Ibarburu, I., Soria-Díaz, M. E., Rodríguez-Carvajal, M. A., Velasco, S. E., Tejero-Mateo, P., Gil-Serrano, A. M., & Dueñas, M. T. (2007). Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. *Journal of applied microbiology*, 103(2), 477-486.
- ❖ Jobin, M.-P., Delmas, F., Garmyn, D., Divies, C., & Guzzo, J. (1998). Caractérisation des protéines de choc thermique de faible poids moléculaire chez les bactéries lactiques. *Le Lait*, 78(1), 165–171.
- ❖ Jolly, L., Stingle, F. (2001). Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 733-745.
- ❖ Jolly L., Vincent S.J.F., Duboc P., Neeser JR. (2002) Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. [in:] Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Ed. Siezen, R.J., Kok, J., Abee T., Schafsma, G. Dordrecht, Springer: 367-374.
- ❖ Kanamarlapudi, S. L. R. K., & Muddada, S. (2017). Characterization of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. *BioMed research international*, 2017, 1-11.

- ❖ Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49.(3 ), 209-224.
- ❖ Katz M, Medina R, Gonzalez S, Oliver G. (2002). Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk and cheese. *Journal of food protection*. 65(12). 1997-2001.
- ❖ Khadem Hafida, 2012. Application d'une méthode alternative d'immobilisation des bactéries lactiques pour l'optimisation de la production des EPSs sous l'effet des flavonoïdes naturels. Mémoire de magister. Université Mustapha Stambouli de Mascara. Algérie.
- ❖ Kohler, W. (2007). The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 297(3), 133-150
- ❖ Khaled, J. M. (2020). Probiotics, prebiotics, and COVID-19 infection: A review article. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 865–869.
- ❖ Khalil, R. K. (2010). Influence of gallic acid and catechin polyphenols on probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(11), 2069-2079.
- ❖ Khan, S. T., & Abdul , M. (2019). Next-Generation Probiotics Their Molecular Taxonomy and Health Benefits. In *Health and Safety Aspects of Food Processing Technologies*. Ed. Malik, A., Erginkaya, Z., Erten, H. Cham, Springer: 471- 500.
- ❖ Khan, R., Petersen, F. C., & Shekhar, S. (2019). Commensal bacteria: an emerging player in defense against respiratory pathogens. *Frontiers in immunology*, 10, (1203). 1-9
- ❖ Kimmel, S. A., Roberts, R. F., & Ziegler, G. R. (1998). Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* RR Grown in a Semi defined Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 659-664.
- ❖ Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 41(2), 103-125.
- ❖ Kobayashi, Y., Sakai, D., Iwashina, T., Iwabuchi, S., & Mochida, J. (2009). Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation, proteoglycan synthesis and expression of growth factor-related genes in human nucleus pulposus cell line. *Eur Cell Mater*, 17(3), 15-22.

- ❖ Korakli, M., Vogel, R. (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(6), 790-803.
- ❖ Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M., Bezirtzoglou, E., & Kanellaki, M. (2005). *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry*, 40(1), 411-416
- ❖ Krishnan, S., Gowda, L. R., Misra, M. C., & Karanth, N. G. (2001). Physiological and morphological changes in immobilized *L. plantarum* NCIM 2084 cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. *Food Biotechnology*, 15(3), 193-202.
- ❖ Körzendörfer, A., Schäfer, J., Hinrichs, J., & Nöbel, S. (2019). Power ultrasound as a tool to improve the processability of protein-enriched fermented milk gels for Greek yogurt manufacture. *Journal of dairy science*, 102(9), 7826-7837.
- ❖ Kosseva, M. R. (2011). Immobilization of microbial cells in food fermentation processes. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1089-1118.
- ❖ Kos, B. V. Z. E., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987.
- ❖ Kowalczyk, M., Mayo, B., Fernández, M., & Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2016). Updates on Metabolism. [in:] *Lactic Acid Bacteria in Light of “Omic” Technologies. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Ed. Mozzi, F., Raya, Raúl R., Vignolo, Graciela M. Hoboken, Wiley & Sons 1–24
- ❖ Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., Techapun, C., Sasaki, K., & Seesuriyachan, P. (2010). Influence of pH, sucrose concentration and agitation speed on exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as a raw material substitute. *International Journal of Science and Technology*, 4(2), 318-330.
- ❖ Leach, J. D., Rastall, R., & Gibson, G. 2006. *Prebiotics: development and application*. Hoboken: John Wiley & Sons. Pp. 29- 249.
- ❖ Leadley, C. E., & Williams, A. (2006). Pulsed electric field processing, power ultrasound and other emerging technologies. [in:] *Food processing handbook*. Ed. Brennan, James G. Weinheim, Wiley-VCH: 201-236.
- ❖ Lee, K., Lee, H.-G., & Choi, Y.-J. (2008). Proteomic analysis of the effect of bile salts on the intestinal and probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Biotechnology*, 137(1-4), 14–19

- ❖ Leighton, T. G. (2007). What is ultrasound?. *Progress in biophysics and molecular biology*, 93(1-3), 3-83.
- ❖ Lehtoranta, L., Pitkäranta, A., & Korpela, R. (2014). Probiotics in respiratory virus infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 33(8), 1289-1302.
- ❖ Lemos, J. A., Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. (2011). Stress responses of Streptococci. [in:] Stress responses of lactic acid bacteria. Ed. Doyle, Michael P. Boston, Springer: 251-303.
- ❖ Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67–78
- ❖ Li, M., Wang, Y., Cui, H., Li, Y., Sun, Y., & Qiu, H. J. (2020). Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From the Gastrointestinal Tract of a Wild Boar as Potential Probiotics. *Frontiers in veterinary science*, 7 (49), 1-10
- ❖ Li, J., Ma, L., Liao, X., Liu, D., Lu, X., Chen, S., & Ding, T. (2018). Ultrasound-induced Escherichia coli O157: H7 cell death exhibits physical disruption and biochemical apoptosis. *Frontiers in microbiology*, 9(2486), 1-10.
- ❖ Lim, B., Gross, C. A. (2011). Cellular Response to Heat Shock and Cold Shock. [in:] Bacterial Stress Responses. Ed. Storz, G., Hengge, R. Washington, ASM Press : 91-114.
- ❖ Liu, X., & Narbad, A. (2018). Lactic Acid Bacteria-Based Food. [in:] Lactic Acid Bacteria in Foodborne Hazards Reduction. Ed. Chen, W., Narbad, A. Singapore, Springer.141-182.
- ❖ London, L. E. E., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Shanahan, F., Caplice, N. M., & Stanton, C. (2015). Probiotics as Cell Factories for Bioactive Ingredients. [in:] Focus on Microbial Polysaccharides and Health Beneficial Effects. Ed. Foerst, P., Santivarangkna, C. Boca Raton, Taylor & Francis Group: 77-102.
- ❖ Mainville, I., Arcand, Y., & Farnworth, E. R. (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International journal of food microbiology*, 99(3), 287-296.
- ❖ Marin, M. L., Benito, Y., Pin, C., Fernandez, M. F., Garcia, M. L., Selgas, M. D., & Casas, C. (1997). Lactic acid bacteria: hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces. *Letters in applied microbiology*, 24(1), 14-18.

- ❖ Markowiak, P., Slizewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* , 9(9), 1-30.
- ❖ Mataragas, M., Drosinos, E. H., & Metaxopoulos, J. (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2 C. *Food microbiology*, 20(2), 259-265.
- ❖ Mäyrä-Mäkinen, A., Bigret, M. (2004). Industrial use and production of lactic acid bacteria. [in:] *Food Science and Technology: Microbiological and Functional Aspects*. Ed. Salminen, S., Von Wrigh, A., Ouwehand, A. NewYork, Marcel Dekke: 175-198.
- ❖ Medina, R. B., Katz, M. B., González, S., & Oliver, G. (2004). Determination of esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria [in:] *Public Health Microbiology*.Ed. Spencer, J. F. T., Ragout de Spencer, Alicia L. Totowa, Humana Press: 465–470.
- ❖ Mende, S., Rohm, H., & Jaros, D. (2020). Lactic Acid Bacteria:Exopolysaccharides. *Reference Module in Food Science*.1-8
- ❖ Mezaini, A., Bouras, A. D., Chihib, N., Nedjar-Arroume, N., & Hornez, J. P. (2010). Antibacterial Activity of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from an Algerian Dairy Product. *Journal of Environmental and Public Health*, 2009, 1-6.
- ❖ Midik, F., Tokatlı, M., Elmacı, S. B., & Özçelik, F. (2020). Influence of different culture conditions on exopolysaccharide production by indigenous lactic acid bacteria isolated from pickles. *Archives of microbiology*, 202(4), 875-885.
- ❖ Mitra, A., Mukhopadhyay, S. (2016). Biofilm mediated decontamination of pollutants from the environment. *AIMS Bioeng*, 3(1), 44-59.
- ❖ Mitropoulou, G., Nedovic, V., Goyal, A., & Kourkoutas, Y. (2013). Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2013, 1–15
- ❖ Moncada, M., J. Aryana, K. (2012). Influence of “Mild” Sonication Conditions on the Characteristics of *Streptococcus thermophilus* ST-M5. *Advances in Microbiology*, 02(01), 8–16
- ❖ Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.-M., & Remaud-Siméon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 675-685.

- ❖ Mostafa, H., El-Mezawy, A., Geis, A., & Heller, K. J. (2009). Exopolysaccharide production by *Enterococcus faecium*. *Milchwissenschaft*, 64(4), 361-365
- ❖ Mozzi, F., de Giori, G. S., Oliver, G., & de Valdez, G. F. (1996). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. *Biotechnology Letters*, 18(4), 435-439.
- ❖ Mulaw, G., Sisay, T., Muleta, D., & Tesfaye, A. (2019). In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products. *International journal of microbiology*, 1-32.
- ❖ Mutukumira, A. N., Ang, J., & Lee, S. (2015). Microencapsulation of probiotic bacteria. [in:] *Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals*. Ed. Liang, M.T. Cham: Springer.63- 78.
- ❖ Nag, A., Das, S. (2013). Improving ambient temperature stability of probiotics with stress adaptation and fluidized bed drying. *Journal of functional foods*, 5(1), 170-177.
- ❖ Naïma, S., Villeger, R., Ouk, T.-S., Delattre, C., Urdaci, M., & Bressollier, P. (2015). Probiotics, prebiotics, and synbiotics for gut health benefits. [in:] *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*. Ed. Rai, V. R., Bai J. Boca Raton: Taylor & Francis: 363-386.
- ❖ Nami, Y., Vaseghi Bakhshayesh, R., Mohammadzadeh Jalaly, H., Lotfi, H., Eslami, S., & Hejazi, M. A. (2019). Probiotic Properties of *Enterococcus* Isolated From Artisanal Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, 10 (300), 1-13.
- ❖ Nguyen, T. M. P., Lee, Y. K., & Zhou, W. (2009). Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by high intensity ultrasound. *International dairy journal*, 19(6-7), 410-416.
- ❖ Norton, S., Vuillemand, J. C. (1994). Food bioconversions and metabolite production using immobilized cell technology. *Critical reviews in biotechnology*, 14(2), 193-224.
- ❖ Novel G. (1993) Les bactéries lactiques. [in:] *Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel*. Ed. Leveau J.Y, Bouix M., Paris, Tec et Doc Lavoisier: 170–331.
- ❖ Obis, D., Paris, M., & Ouwehand. , A. (2019). The Safety of Lactic Acid. [in:] *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Ed. Vinderola, G., Ouwehand, A., Salminen, S., von Wright, A. Boca Raton, Taylor & Francis:355-365.
- ❖ O'Grady, B., Gibson, G. R. (2005). Microbiota of the human gut. [in:] *Probiotic Dairy Products*. Ed. Tamime, Adnan Y.Oxford, Blachwell :1-15.

- ❖ Olaimat, A. N., Aolymat, I., Al-Holy, M., Ayyash, M., Ghoush, M. A., Al-Nabulsi, A. A., & Shah, N. P. (2020). The potential application of probiotics and prebiotics for the prevention and treatment of COVID-19. *NPJ science of food*, 4(1), 1-7.
- ❖ Oleksy-Sobczak, M., Klewicka, E. (2019). Optimization of media composition to maximize the yield of exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-10.
- ❖ O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 49–79
- ❖ O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 47( e2437), 1-3.
- ❖ Panoff, J.-M., Thammavongs, B., Laplace, J.-M., Hartke, A., Boutibonnes, P., & Auffray, Y. (1995). Cryotolerance and Cold Adaptation in *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* IL1403. *Cryobiology*, 32(6), 516–520
- ❖ Panthavee, W., Noda, M., Danshiitsoodol, N., Kumagai, T., & Sugiyama, M. (2017). Characterization of exopolysaccharides produced by thermophilic lactic acid bacteria isolated from tropical fruits of Thailand. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(5), 621-629.
- ❖ Patel, S., Majumder, A., & Goyal, A. (2012). Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian journal of microbiology*, 52(1), 3-12.
- ❖ Paulo, E. M., Vasconcelos, M. P., Oliveira, I. S., Affe, H. M. D. J., Nascimento, R., Melo, I. S. D., & Assis, S. A. D. (2012). An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. *Food Science and Technology*, 32(4), 710-714.
- ❖ Pavlovic, M., Huber, I., Konrad, R., & Busch, U. (2013). Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *The Open Microbiology Journal*, 7(1), 135–141
- ❖ Pereira Duta, F., Pessôa de França, F., & de Almeida Lopes, L. M. (2006). Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4), 391-399.
- ❖ Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., & Cerning, J. (2000). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic

- degradation during prolonged fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2302-2310.
- ❖ Piard, J. C., Briandet, R. (2015). Lactic acid bacteria biofilms: from their formation to their health and biotechnological potential. [in:] *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Ed. Mozzi, F, Raya Raúl, R., Vignolo Graciela, M. Hoboken, Wiley Blacwel:341-361
  - ❖ Pieniz, S., Andreatza, R., Anghinoni, T., Camargo, F., & Brandelli, A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37, 251-256.
  - ❖ Poltronieri, P., Battelli, G., & Mangia, N. P (2017). Metabolism and biochemistry of LAB and dairy-associated species. [in:] *Microbiology in Dairy Processing*. Ed. Poltronieri, P. West Sussex, John Wiley & Sons:97-122.
  - ❖ Purwandari, U., Vasiljevic, T. (2010). Production of Exopolysaccharides by Strains of *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology Indonesia*, 4(1), 8-8.
  - ❖ Rabha, B., Nadra, R. S., & Ahmed, B. (2012). Effect of some fermentation substrates and growth temperature on exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* BN1. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2(1), 44.
  - ❖ Rabiou, B. A., Jay, A. J., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2001). Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by  $\beta$ -Galactosidases from *Bifidobacterium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2526–2530.
  - ❖ Ramakrishna, S. V., Prakasham, R. S. (1999). Microbial fermentations with immobilized cells. *Current Science*, 77 (1), 87-100.
  - ❖ Rawal, P. M., Chauhan, P. B., Prajapati, H., & Gahlout, M. (2016). Evaluation of cultivation condition for enhanced production of exopolysaccharide by bacterial isolate P 11 under submerged culture condition. *International Journal Advanced Research Biology Science*, 3(5), 183-190.
  - ❖ Rhee, S. K., & Pack, M. Y. (1980). Effect of environmental pH on fermentation balance of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*, 144(1), 217-221.
  - ❖ Rehm, B. H. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 578-592.

- ❖ Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006.). Metabolism of Lactic Acid Bacteria. [in:] Handbook of *enology*: The microbiology of wine and vinifications. Ed. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu., Donèche, B. A., Lonvaud, J. Hoboken, Wiley & Sons: 139-157.
- ❖ Ricciardi, A., Parente, E., Crudele, M. A., Zanetti, F., Scolari, G., & Mannazzu, I. (2002). Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer. *Journal of applied microbiology*, 92(2), 297-306.
- ❖ Roberts, C. M., Fett, W., Osman, S., Wijey, C., & O'Connor, J. (1995). Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(5), 463-468.
- ❖ Robertson, S. R., McLean, R. J. (2015). Beneficial biofilms. *AIMS Bioengineering*, 2(4), 437-448.
- ❖ Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 163–171.
- ❖ Ruas-Madiedo, P., Salazar, N., & Clara, G. d.-G. (2009). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in food and probiotic applications. [in:] *Microbial Glycobiology*. Ed. Moran A. P. London, Academic Press: 885–902.
- ❖ Růžičková, M., Vítězová, M., & Kushkevych, I. (2020). The characterization of *Enterococcus* genus: resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. *Open Medicine*, 15(1), 211-224.
- ❖ Salminen, S.J., von Wright, A., Ouwehand, A., Holzappel, W.H. (2001). Safety assessment of probiotics and starters. [in:] *Fermentation and food safety*. Ed. Adams, M. R., Nout, M. Gaithersburg, Aspen Publishers:239-251.
- ❖ Salminen, S., Von Wright, A. (2012). Probiotics: safety and Efficacy. [in:] *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Ed. Lahtinen, S., Ouwehand, S., , S. Salminen, S., Von Wright. Boca Raton, Taylor & Francis.689-702.
- ❖ Santosa, S., Farnworth, E., & Jones, P. J. (2006). Probiotics and their potential health claims. *Nutrition reviews*, 64(6), 265-274.
- ❖ Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71 (4), 394–406.
- ❖ Schillinger, U., Guigas, C., & Heinrich Holzappel, W. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, 15(12), 1289–1297

- ❖ Schmid, J., Sieber, V. (2019). Fermentative Production of Microbial Exopolysaccharides. [in:] *Bioprocessing for Biomolecules Production*. Ed. Molina, G., Gupta, V. K., Singh, B. N., Gathergood, N. Hoboken, John Wiley & Sons :145-166.
- ❖ Sehar, S., Naz, I. (2016). Role of the biofilms in wastewater treatment. [in:] *Microbial biofilms-importance and applications*. Ed. Dhanasekaran, D., Thajuddin, N. ExLi4EvA: 121-144.
- ❖ Selvi, S. S., Eminagic, E., Kandur, M., Ozcan, E., Kasavi, C., & Oner, E. (2019). Research and Production of Microbial Polymers for Food Industry. [in:] *Bioprocessing for Biomolecules Production*. Ed. Molina, G., Gupta, V. K., Singh, B. N., Gathergood, N. Hoboken, John Wiley & Sons: 211-238.
- ❖ Seo, B. J., Bajpai, V. K., Rather, I. A., & Park, Y. H. (2015). Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with total phenolic content, antioxidant and free radical scavenging efficacy. *Indian Journal of pharmaceutical education and research*, 49(4), 282-292.
- ❖ Sharma, D., Saharan, B., & Kapil, S. 2016. *Biosurfactants of lactic acid bacteria*. Switzerland: Springer. Pp 17-30.
- ❖ Sikyta, B. 1995. *Progress in industrial microbiology: Techniques in applied microbiology*. Nex York. Elsevier. Pp. 375-413.
- ❖ Stewart, E. J., Ganesan, M., Younger, J. G., & Solomon, M. J. (2015). Artificial biofilms establish the role of matrix interactions in staphylococcal biofilm assembly and disassembly. *Scientific reports*, 5(1), 1-14.
- ❖ Subramani, R., Jayaprakashvel, M. (2019). *Bacterial Quorum Sensing: Biofilm Formation, Survival Behaviour and Antibiotic Resistance*. [in:] *Implication of Quorum Sensing and Biofilm Formation in Medicine, Agriculture and Food Industry*. Ed. Bramhachari, P. V. Singapore, Springer: 21-37.
- ❖ Sutherland, I. W. 1990. *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Ed. Sutherland, I. W. New York, Cambridge University Press: 1-157.
- ❖ Sutherland, I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*, 16(1), 41-46
- ❖ Švec, P., Franz, C. M. A. P. (2014). The genus *Enterococcus*. [in:] *Lactic Acid Bacteria, Biodiversity and Taxonomy*. Ed. Holzapfel, W. H., Wood, Brian J.B. Hoboken, John Wiley & Sons:175-211.

- ❖ Tabatabaie, F., Mortazavi, A. (2008). Studying the effects of ultrasound shock on cell wall permeability and survival of some LAB in milk. *World Applied Sciences Journal*, 3(1), 119-121.
- ❖ Tamime, A. Y., Robinson, R. (2007). Biochemistry of fermentation. [in:] Tamime and Robinson's Yoghurt. Ed. Tamime, A.Y., Robinson, R.K. Boca Raton, Woodhead Publishing: 353-607.
- ❖ Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Begović, J., Filipić, B., Popović, D., Tolinački, M., Golić, N. (2015). Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures?. *Frontiers in Microbiology*, 6, (954). 1-10.
- ❖ Teuber, M., Schwarz, F., & Meile, L. (2003). Antibiotic Resistance and Transfer in Lactic Acid Bacteria. [in:] Genetics of Lactic Acid Bacteria. Ed. Wood, B. J., Warner, P. New York, Springer: 317-354.
- ❖ To, B. C., & Etzel, M. (1997). Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *Journal of Food Sciences*, 62(3), 576-578.
- ❖ Tosoni, N. F., Perini, H. F., Terra, M. R., Katsuda, M. S., Furlaneto, M. C., & Maia, L. F. (2019). Antimicrobial activity of enterocin obtained from *Enterococcus durans* on Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Ciência Rural*, 49(9), 1-7.
- ❖ Tuncer, B. Ö., Tuncer, Y. (2014). Exopolysaccharide producer *Streptococcus thermophilus* ST8. 01 strain; A potential probiotic culture. *GIDA/The Journal of FOOD*, 39(4), 195-202.
- ❖ Van De Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 187-216
- ❖ Vaningelgem, F., Zamfir, M., Adriany, T., & De Vuyst, L. (2004). Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST 111 in milk-based medium. *Journal of applied microbiology*, 97(6), 1257-1273.
- ❖ Varmanen, P., Savijoki, K. (2011). Responses of lactic acid bacteria to heat stress. [in:] Stress responses of lactic acid bacteria. Ed. Tsakalidou, E., Tsakalidou, k. London, Springer: 55-66.
- ❖ Vijayendra, S. V. N. (2015). Microbial Biopolymers: The Exopolysaccharides. [in:] Microbial Factories. Ed. Kalia. V.C. New Delhi, Springer: 113-125.

- ❖ Vincent, S. J., Faber, E. J., Neeser, J. R., Stingele, F., & Kamerling, J. P. (2001). Structure and properties of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus macedonicus* Sc136. *Glycobiology*, 11(2), 131-139.
- ❖ Vinderola, C. G., Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10), 895-904.
- ❖ Von Wright, A., Axelsson, L. (2019). Lactic acid bacteria: an introduction. [in:] Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Vinderola, G., Ouwehand, A.C., Salminen S., von Wright, A., Taylor & Francis: 2-17.
- ❖ Walling, E., Dols-Lafargue, M., & Lonvaud-Funel, A. (2005). Glucose fermentation kinetics and exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* IOEB8801. *Food microbiology*, 22(1), 71-78.
- ❖ Wang, X., Shao, C., Liu, L., Guo, X., Xu, Y., & Lü, X. (2017). Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1173-1184.
- ❖ Wang, Y., Corrieu, G., & Béal, C. (2005). Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Journal of dairy science*, 88(1), 21-29.
- ❖ Wedajo, B. (2015). Lactic acid bacteria: benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. *J Prob Health*, 3(2), 1-9.
- ❖ Welman, A. D., & Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in biotechnology*, 21(6), 269-274.
- ❖ Werning, M. L., Notararigo, S., Náchér, M., Fernández de Palencia, P., Aznar, R., & López, P. (2012). Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. [in:] Food additives. Ed. El-Samragy, Yehia. Rijeka, InTech: 83-114.
- ❖ Wildman Robert, E. C., Mike, K. (2007). Nutraceuticals and Functional Foods. [in:] Handbook of Nutraceuticals and functional foods. Ed. Wildman, Robert E.C.. Boca Raton, Taylor & Francis: 1-22.
- ❖ Wu, Q., Tun, H. M., Leung, F. C. C., & Shah, N. P. (2014). Genomic insights into high exopolysaccharide-producing dairy starter bacterium *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Scientific reports*, 4(1), 1-8.

- ❖ Wu, W., Li, H. (2018). Metabolites of Lactic Acid Bacteria. [in:] Lactic Acid Bacteria in Foodborne Hazards Reduction. Singapore, Springer: 87-113.
- ❖ Wu, W., ZHAO, N. (2019). Metabolomics of Lactic Acid Bacteria. [in:] Lactic Acid Bacteria: Omics and Functional Evaluation. Ed. Chen, W. Singapore, Springer: 167-182
- ❖ Xiao, J., Zhang, Y., & Yang, Z. (2014). Lactic acid bacteria in health and disease. [in:] Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice. Ed. Zhang, H., Cai, Y. New York, Springer: 303-374.
- ❖ Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y., & Ahn, J. (2009). Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in applied microbiology*, 49(4), 434-442.
- ❖ Yeo, S. K., Liong, M. T. (2011). Effect of ultrasound on the growth of probiotics and bioconversion of isoflavones in prebiotic-supplemented soymilk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(3), 885-897.
- ❖ Yerlikaya, O., Akbulut, N. (2020). *In vitro* characterisation of probiotic properties of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1), 98-107.
- ❖ Zhang, T., Zhang, C., Li, S., Zhang, Y., & Yang, Z. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1470-1478.
- ❖ Zhang, Y. J., Li, S., Gan, R. Y., Zhou, T., Xu, D. P., & Li, H. B. (2015). Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(4), 7493-7519.
- ❖ Zhou, N., Zhang, J. X., Fan, M. T., Wang, J., Guo, G., & Wei, X. Y. (2012). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts. *Journal of dairy science*, 95(9), 4775-4783.
- ❖ Zhu, Y. (2007). Immobilized cell fermentation for production of chemicals and fuels. [in:] Bioprocessing for value-added products from renewable resources. Ed. Yang, S.T. London, Elsevier: 373-396.
- ❖ Zisu, B., Shah, N. P. (2003). Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of dairy science*, 86(11), 3405-3415
- ❖ Żur, J., Wojcieszynska, D., & Guzik, U. (2016). Metabolic Responses of Bacterial Cells to Immobilization. *Molecules*, 21(7), 958.

# *ANNEXES*

**ANNEXE 1 : MILIEUX DE CULTURE ET COMPOSITION PAR L**

<b>Milieux</b>	<b>Composition par L</b>
<p><b>Gélose M17</b></p> <p>β-glycerophosphate Disodium  Agar  Extrait de viande  Peptone papainique de soja  Extrait de levure  Acide ascorbique  MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  Lactose (10%)</p> <p>pH 6.9 ± 0.2 à 25°C</p>	<p>19.0g  11.0g  5.0g  5.0g  2.5g  0.5g  0.25g  50ml</p>
<p><b>Bouillon M17</b></p> <p>β-glycerophosphate Disodium  Extrait de viande  Lactose  Peptone papainique de soja  Peptone pancréatique de caséine  Extrait de levure  Acide ascorbique  MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</p> <p>pH 7.15 ± 0.05 à 25°C</p>	<p>19.0g  5.0g  5.0g  5.0g  2.5g  2.5g  0.5g  0.25g</p>
<p><b>Gélose MRS (DeMan, Rogosa, Sharpe Agar)</b></p> <p>Glucose  Peptone  Agar  Extrait de viande  Acétate de sodium ·3H<sub>2</sub>O  Extrait de levure  K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  Citrate de triammonium  MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O  Monooléate de sorbitan</p> <p>pH 6.2 ± 0.2 à 25°C</p>	<p>20.0g  10.0g  10.0g  8.0g  5.0g  4.0g  2.0g  2.0g  0.2g  0.05g  1.0mL</p>

<p><b>BouillonMRS</b></p> <p>Peptone          Extrait de viande          Extrait de levure          Glucose          Tween 80 (=polysorbate80)          Phosphate dipotassique          Acétate de sodium          Citrate triammonique          Sulfate de magnésium          Sulfate de manganèse          PH 6.9</p>	<p>10g          10g          5g          20g          1mL          2g          5g          2g          200mg          50mg</p>
<p><b>Gélose Mannitol</b></p> <p>Plant peptone          Agar          Mannitol          Nitrate de potassium          Rouge de phenol</p> <p>pH 7.6 ± 0.2 at 25°C</p>	<p>20.0g          3.0g          2.0g          1.0g          0.04g</p>
<p><b>Bouillon nutritif</b></p> <p>Peptone          Extrait de viande          extrait de levure          Chlorure de Sodium</p> <p>pH 7.4</p>	<p>5g          1g          2g          5g</p>
<p><b>Gélose Mueller-Hinton II</b></p> <p>hydrolysate de casein          Agar          Extrait de viande          Amidon</p> <p>pH 7,3 ± 0,1 à 25°C</p>	<p>17.5g          17g          2.0g          1.5g</p>

<b>Citrate de simmons</b>  Citrate de sodium Chlorure de sodium Sulfate de magnésium Phosphate monoammoniaque Phosphate bipotassique Bleu bromothymol Agar  pH 7.2	  2g 5g 0.2g 1g 0.08g 15g
<b>PBS (Phosphate Buffer Saline)</b>  Chlorure de sodium Chlorure de potassium Phosphate disodique Phosphate monopotassique  pH 7.3	  8g 0.2g 1.15g 0.2g
<b>Bouillon hypersaccharosé</b>  Tryptone KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Saccharose  pH 6.5	  10g 5g 5g

**Annexe 2 : RESULTATS DE L'IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE**

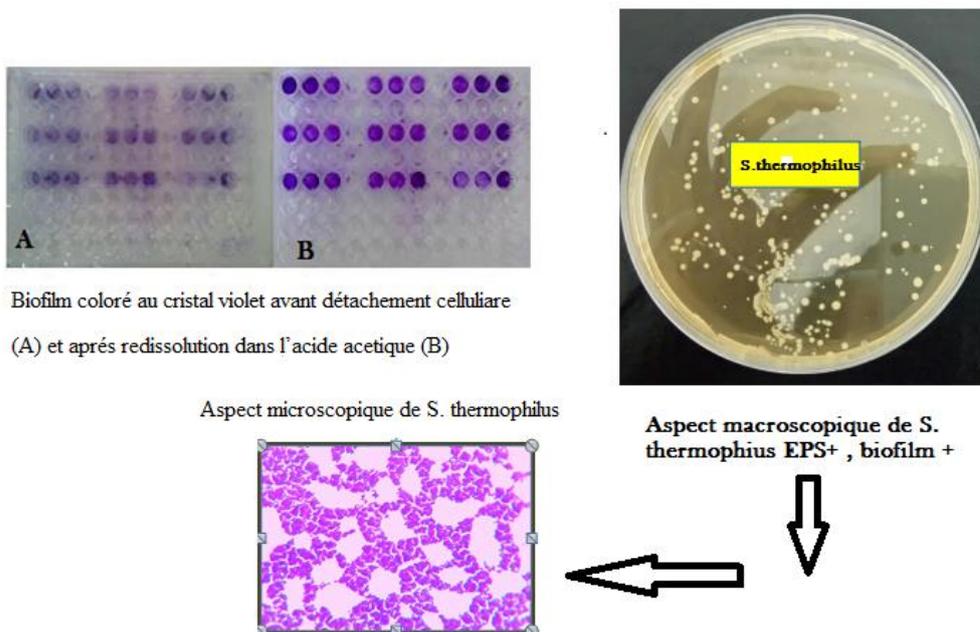
<b>Tests biochimiques</b>	<b><i>E. durans</i></b>	<b><i>S. thermophilus</i></b>
Oxydase	-	+
Catalase	-	-
ONPG	-	+
ADH	+	+
ODC	-	-
LDH	-	-
Mannitol mobilité	-	-
Citrate de Simmons	-	-
TSI	+	+
Type fermentaire	Homofermentaire	Homofermentaire

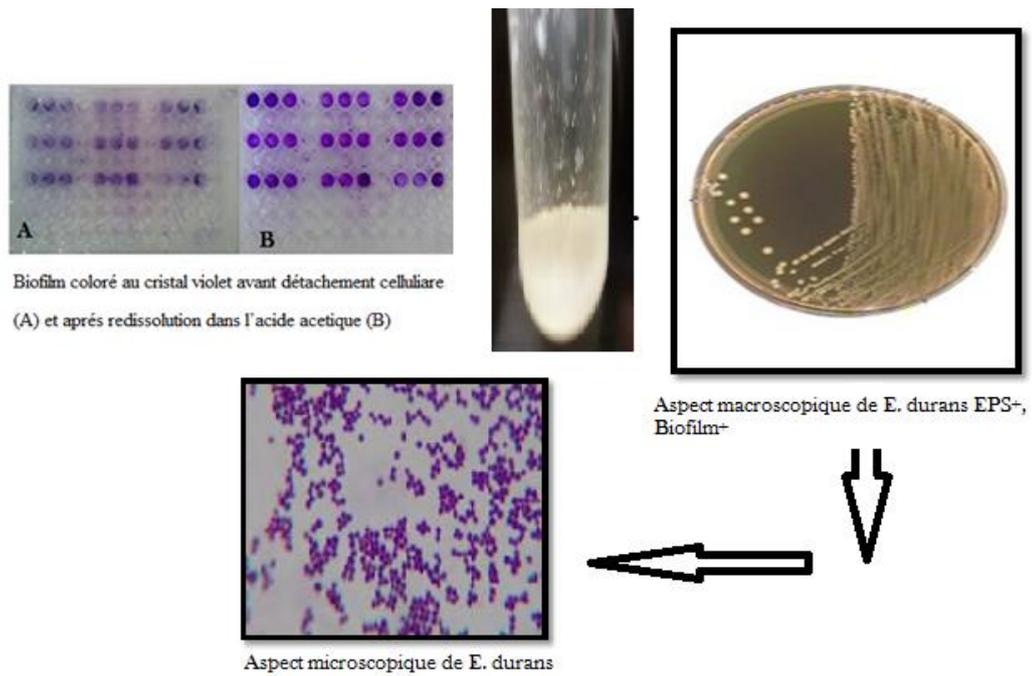


**Annexe 4: RENDEMENT EN EXOPOLYSACCHARIDES ET COURBE D'ETALONNAGE**

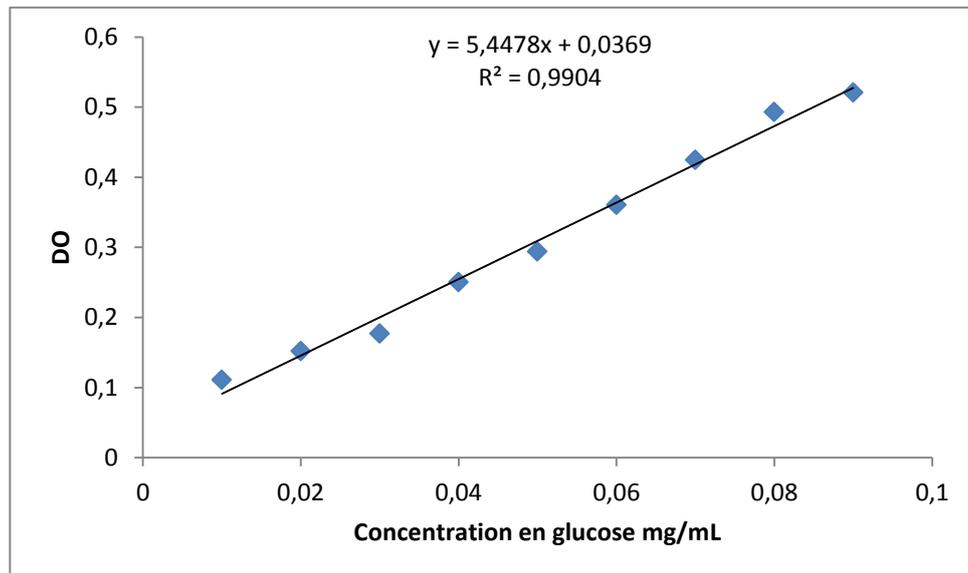


**Exopolysacchrides de *S. thermophilus* CNRZ 447 isolé, purifié et précipité dans l'éthanol**





### Exopolysaccharides de *E. durans* isolé, purifié et précipité dans l'éthanol



Courbe d'étalonnage (Dosage d'exopolysaccharides)

## **PUBLICATIONS ET PRESENTATIONS AUX CONGRES**

### **Présentations nationales et internationales**

1. Poster présenté dans le cadre de la célébration de la journée de Science, Biotechnologie au service de la Santé. Mascara, Algérie, Avril 2012  
**Khadem.H**, Boubakeur.B, Meddah.A. Effet des composés phénoliques extraits d'une plante médicinale sur l'amélioration de la production d'exopolysaccharides chez *S.thermophilus* et *L.bulgaricus*.
2. Poster présenté dans le cadre des journées internationales des substances naturelles et développement durable. Rabat, Maroc, Juin 2012  
**Khadem.H**, Boubakeur.B, Tirtuil Meddah.A: Effet des composés phénoliques de *thymus fontanesii* sur l'amélioration de la production d'exopolysaccharides chez *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.
3. Présentation orale dans le cadre du 5ème Symposium International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales **SIPAM5, 14-16 Novembre 2013, Marrakech, MAROC**  
**Khadem.H**, Boubakeur.B, Tirtuil Meddah.A: Effet de l'extrait aqueux de *Thymus fontanesii* sur la production d'exopolysaccharides et la capacité d'adhésion de deux bactéries lactiques.
4. Poster présenté dans le cadre du Colloque international sur les plantes aromatiques et médicinales de la méditerranée. **Blida Novembre 2015**  
**Khadem.H**, Boubakeur.B, **HALLALIS, SNOUCIS, TALEB.Asma** : Etude comparative de l'effet biologique de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*
5. Poster présenté dans le cadre du workshop international sur l'hygiène des process agroalimentaires. **Tlemcen. Octobre 2017**  
**Khadem.H**, Boubakeur.B, Tirtuil .A : effet des ultrasons sur l'agregation et la production d'exopolysaccharides de *Lactobacillus bulgaricus*
6. Poster présenté dans le cadre du 6<sup>ème</sup> symposium sur les plantes aromatiques et médicinales SIPAM6. **Marrakeche Mars 2017**  
**Khadem.H** , Boubakeur.B, Boukraa. L, Tir touil meddah. A, Seddi.I : effet du miel de la carotte sauvage sur le developpement et a formation de biofilm d'*E. coli*
7. Poster présenté dans le cadre d symposium International **AGBIOL Conference** .Edirne Septembre 2018  
**Khadem.H**: Assessment of the antibacterial, antioxidant and antibiofilm properties of aqueous thymus fontanesii extract against staphylococcus aureus

### Articles publiés

1. Article publié dans: Ukrainian Journal of Ecology, 2018, 8(3):**Influence of the exopolysaccharides of polyphenol-conditioned lactic acid bacteria on gut microecology and bacterial translocation.**

B. Badra, D.M. Soungalo, **K. Hafidha**, M. Catherine, T. Aicha

## Ukrainian Journal of Ecology

*Ukrainian Journal of Ecology*, 2018, 8(3), 1–9

---

ORIGINAL ARTICLE

### **Influence of the exopolysaccharides of polyphenol-conditioned lactic acid bacteria on gut microecology and bacterial translocation**

**B. Badra<sup>1</sup>, D.M. Soungalo<sup>2</sup>, K. Hafidha<sup>1</sup>, M. Catherine<sup>3</sup>, T. Aicha<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Bioconversion, Health Safety and Microbiological Engineering, University of Mascara, Algeria Saulėtekio al. 11, Vilnius 10221, Lithuania

<sup>2</sup>Laboratory of Applied Biochemistry and Immunology - CRSBAN, UFR-SVT 03 B.P. 7021 Ouagadougou 03, University of Ouagadougou, Burkina Faso

<sup>3</sup>Laboratory of Glycochemistry, Antimicrobials and Agriresources, UMR 7378 CNRS, UFR de Pharmacy, 1 rue des Louvels, University of Picardie Jules Verne, 80037 Amiens Cedex 1, France  
E-mail: [boubakeurbadra82@yahoo.fr](mailto:boubakeurbadra82@yahoo.fr)<sup>1</sup>

**Received: 18.04.2018. Accepted: 07.05.2018**

The aim of this work was to assess *in vivo* prebiotic effects of exopolysaccharides produced by polyphenols extract-conditioned lactic acid bacteria. The polyphenolic content of *Thymus fontanesii* was extracted in water by sonication, with a yield of 41.5% and 156 mg equivalent of gallic acid/g. Gallic, caffeic, syringic, vallinic and carboxylic acids, catechin, and epicatechin were the important phenolic acids identified in the extract. Then, two dairy industrial strains *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* were treated at different concentrations with the extract to improve exopolysaccharides production. *Streptococcus thermophilus* yielded more exopolysaccharides, thrice than control (826 mg/l vs 219 mg/l), in presence of 100 µg/ml (concentration of 0.01 mg/ml) of the polyphenolic extract. Besides, polyphenols had no significant effect on *Lactobacillus bulgaricus* for exopolysaccharides production. Last, the effects of *Streptococcus thermophilus* exopolysaccharides produced in presence of the polyphenols were evaluated on gut microecology composition on some bacteria and bacterial translocation in liver, spleen, kidneys, and lungs. The molecules shaped Wistar Rat gut microbiota in favour of beneficial lactic acid bacteria and in detriment of pathogenic bacteria, and prevented bacterial translocation. Therefore, the exopolysaccharides exhibited considerable prebiotic properties.

**Keywords:** Bacterial translocation; lactic acid bacteria; exopolysaccharides; polyphenols; prebiotic; *Thymus fontanesii*

---

2. Article publié dans : International Journal of Innovation and Applied Studies, 2019, 27(1) : **Qualité microbiologique du blé dur fermenté de Matmor Hamoum : Indispositions digestives, microflore avantageusement technologique et potentiels pathogènes**

Moustapha Soungalo Drabo, **Hafidha Khadem**, Nour-eddine Benatmane, Abdelhak Ouhab, Mazouzi Fatma Zohra, Kheira Soualmi, and Boubakeur Badra

International Journal of Innovation and Applied Studies  
ISSN 2028-9324 Vol. 27 No. 1 Aug. 2019, pp. 11-18  
© 2019 Innovative Space of Scientific Research Journals  
<http://www.ijias.issr-journals.org/>

---

**Qualité microbiologique du blé dur fermenté de *Matmor Hamoum* : Indispositions digestives, microflore avantageusement technologique et potentiels pathogènes**

**[ Microbial quality of fermented durum wheat in *Matmor Hamoum* : Digestive discomfort, functional microbiota and potential pathogens ]**

**Moustapha Soungalo Drabo<sup>1</sup>, Hafidha Khadem<sup>2,3</sup>, Nour-eddine Benatmane<sup>2</sup>, Abdelhak Ouhab<sup>2</sup>, Mazouzi Fatma Zohra<sup>2</sup>, Kheira Soualmi<sup>2</sup>, and Boubakeur Badra<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Laboratoire de Biochimie et Immunologie Appliquées, Université de Ouagadougou, Burkina Faso

<sup>2</sup>Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Tiaret, Algeria

<sup>3</sup>Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire, Université de Mascara, Algeria

Copyright © 2019 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** *Hamoum* is a secular fermented food in Algeria that remains beyond any official control for its microbiological compliance. Its microflora was investigated in the aim to evaluate the microbial quality in term of beneficial flora and potential contaminants. A sample was obtained from two years old fermented wheat in *Matmor* (in Relizan, Algeria). A Survey was carried out to evaluate the appreciation of the food commodity in city of Relizan and the microflora was analyzed according to the biochemical phenotypes and MALDI-TOF spectra. Then, the presumptive beneficial isolates were screened for biofilm and protease production ability. The commodity is rich in potential probiotic and starter cultures from microbial groups lactic acid bacteria (LAB), *Actinomyces* and *Bacillus* (*Lysinibacillus fusiformis*). Besides, 53% of surveyed individuals asserted digestive discomfort, diarrhea, nausea or flatulence, associated to the consumption, and microbial analysis identified potential pathogenic or toxigenic microorganisms, *Candida Krusei*, *Staphylococcus* spp., *Micrococcus kristinae*, *Enterococcus durans*, et *Clostridium* spp. Whenever *Hamoum* is rich in functional microorganism, it can expose to potential health or microbiological risks. It should be appropriate to have closer look at its production and marketing practices.

**KEYWORDS:** *Hamoum*, sanitary quality, microflora, *Lysinibacillus fusiformis*, *Clostridium* spp., *Enterococcus durans*, MALDI-TOF identification, Algeria.

3. Article publié dans: Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology, vol. 101 (2) C pp. 159–165 C 2020: **Ultrasound conditioning of *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447: growth, biofilm formation, exopolysaccharide production, and cell membrane permeability.**

**HAFIDHA KHADEM**, AICHA MEDDAH TIR TOUIL, MOUSTAPHA SOUNGALO DRABO, BADRA BOUBAKEUR



## Ultrasound conditioning of *Streptococcus thermophilus* CNRZ 447: growth, biofilm formation, exopolysaccharide production, and cell membrane permeability

HAFIDHA KHADEM<sup>1,2\*</sup>, AICHA MEDDAH TIRTOUIL<sup>1</sup>, MOUSTAPHA SOUNGALO DRABO<sup>3</sup>, BADRA BOUBAKEUR<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> A Bioconversion Laboratory, Microbiology Engineering and Health Safety,  
Faculty of Nature and Life Sciences, University Mustapha Stambouli of Mascara, Algeria

<sup>2</sup> Ibn Khaldoun University, Tiaret, Algeria

<sup>3</sup> University Joseph Ki-Zerbo, Ouagadougou, Burkina Faso

### Abstract

Sonication is one of the new and innovative approaches that is being increasingly used in food industry to control fermentation processes and to eradicate spoiling. Recently, this approach has seen new industrial applications such as enhancing microbial productivity. The present study aimed to assess the effects of ultrasound conditioning on the metabolism and extracellular matrix production of *Streptococcus thermophilus*. Bacterial suspensions were treated in ultrasonic bath (35 kHz, 240/60 W peak/nominal power, 1.8 l capacity) for different time periods (5, 10, 15, 20, 30, 45, and 65 min), and the growth improvement, adhesion ability, biofilm formation, and exopolysaccharide production of the bacterial strain were measured. The bacterial strain exhibited resistance to the treatment, and the conditioning improved the growth, adhesion, membrane permeability, biofilm formation, and exopolysaccharide production ability. An optimal treatment was obtained for 30 minutes of conditioning. An excellent yield of desirable exopolysaccharides (1788 mg glucose equivalent/l) was achieved. Ultrasound conditioning may be used as a potential approach to enhance certain biotechnological properties of industrial microorganisms.

**Key words:** *Streptococcus thermophilus*, ultrasound conditioning, bacterial adhesion, biofilm, exopolysaccharides

### Introduction

Lactic acid bacteria (LABs) are a group of microorganisms that are generally recognized as safe (GRAS) and are highly used in biotech industry (such as cell reactors) and healthcare (such as probiotics). They are ranked second after yeasts as the most valued microbial bioresource for humans (Xiao et al., 2014). For instance, LABs were first used for fermentation in dairy industry, and their use is related to their ability to transform basic milk to high-grade products such as yogurt, cheese, ice cream, and kefir. The principal qualities of dairy products are preservation from spoiling, organoleptic properties, and texturing/rheological properties (Novel, 1993; Mozzi et al., 1996). In addition, contemporary consumers are increasingly anxious about the health-related

properties of food and are raising concerns for safety and probiotic properties of dairy products. Because of their beneficial uses, LABs are widely considered in mainstream research, and many efforts have been made to improve their functional properties. The most investigated properties are their benefits to human health as probiotics and their industrial performance as cell reactors (Burgain et al., 2011).

Probiotic properties imply the ability of the microorganisms to tolerate digestive tract conditions, to nest in (at least for some time), to compete (through either production of antimicrobial or outgrowth against pathogens), and/or to improve digestion and nutrition (FAO/WHO, 2001; Boubakeur et al., 2018). Biofilm is a physiological state of microorganisms that exhibits

\* Corresponding author: A Bioconversion Laboratory, Microbiology Engineering and Health Safety, Faculty of Nature and Life Sciences, University Mustapha Stambouli of Mascara, Algeria; Ibn Khaldoun University, Tiaret, Algeria; e-mail: boubakeurbadra82@yahoo.fr; hafidha.khadem@univ-mascara.dz

specific traits, including improving adhesion ability and production of exopolysaccharides (EPS). Adhesion ability is an important characteristic that facilitates probiotic nesting in the mucous membranes of the digestive tract (FAO/WHO, 2001; O'Grady and Gibson, 2005). EPS are biomolecules belonging to the class of dietary fibers, which are known for their health effects as prebiotics and shield for the microorganisms against the adverse gastric environment (Caggianiello et al., 2016; London et al., 2016). In addition, these microbial metabolites exhibit anti-spiling, rheological, and textural properties in milk products (Patel et al., 2012). However, only few dairy fermentative microorganisms can efficiently produce these multifunctional molecules, and the highest production yield currently reported is 3 g/l (Welman and Maddox, 2003). For instance, the most efficient dairy fermentative bacteria *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) can yield only 1–2 g/l (Wu et al., 2014; Kanamarlapudi and Muddada, 2017).

Many strategies have been investigated to enhance microbial biosynthesis. These strategies include improvements of the culture media and conditions (i.e., temperature, pressure, pH, shear stress, and oxygen supply). The use of ultrasound is an emerging technology in biotech industry to improve microbial performance (Christi, 2003; Shikha et al., 2016). Ultrasounds are human-inaudible sound waves (frequencies superior or equal to 20 kHz) that can interfere mechanically and chemically with cell structure, metabolism, and physiology (Leighton, 2007). Few research studies have focused on investigating microbial conditioning by using this technology in terms of biofilm and EPS production capacities. In our previous study (Boubakeur et al., 2018), we reported interesting functional properties (prebiotic effects) of EPS of a local dairy starter isolate *S. thermophilus*. Therefore, with an interest in this microbial metabolite, the purpose of this study was to investigate the effects of ultrasound conditioning on biofilm formation, cell aggregation, EPS synthesis, and cell membrane permeability properties of the reference starter culture *S. thermophilus* CNRZ 447.

## Materials and methods

### Bacterial suspension preparation

The reference dairy starter culture *S. thermophilus* CNRZ 447 was obtained from INRA Rennes-France

microbial collection. To assess the purity of the strain, it was grown aerobically on M17 agar (Pronadisa, Spain) at 42°C. An overnight grown new culture was always prepared on M17 agar for analysis. The colonies were picked with a Pasteur pipette and suspended in saline physiological water to optical density (OD) of 0.11 (10<sup>8</sup> CFU/ml) at 578 nm wavelength (BIOCHROM Libra S6).

### Ultrasound conditioning

A series of glass test tubes were prepared, each containing 9 ml of M17 broth (Pronadisa) and 1 ml of 10<sup>8</sup> CFU/ml *S. thermophilus*, and sonicated using the cavitation effect in Sonorex ultrasonic bath (35 kHz, 240/60 W peak/nominal powers, 1.8 l capacity) (SONOREX TK 52). Briefly, the test tubes were placed in a porous rack and put in the sonicator tank. The tank was filled to the mark with 5% Tickopur R 33 (Sigma-Aldrich), and the sonication was operated continuously. The time was measured with a chronometer, and duplicate tubes were withdrawn after 5, 10, 15, 30, 45, and 65 minutes. The experiment was performed at room temperature of 25°C.

### Survival and growth ability

The sonicated bacterial suspensions were incubated at 42°C for 24 h. Bacterial growth after the sonication treatments was subjectively assessed through OD measurement at 578 nm wavelength (BIOCHROM Libra S6). The OD reading was then converted to CFU log<sub>10</sub>/ml. The tolerance of the strain to sonication was also verified on agar plates.

### Biofilm quantification

Microplate containing M17 broth was inoculated with the sonicated inocula and then incubated at 37°C for 24h and the biofilm was quantified using the crystal violet staining method as described by O'Toole (2011). The stained biofilm was read at the determined optimal wavelength of 492 nm (ELx800TM Biotek microplate reader).

### Membrane permeability

The cell membrane permeability was determined using the quantification of the leaked protein and nucleic acid according to Dai et al. (2016). The culture supernatant was collected by centrifugation at 3000 g for 20 minutes and subsequently diluted (1:9 v/v supernatant: distilled water). The extracellular proteins and

nucleic acids were measured by absorbance (A) at 280 and 260, respectively. The membrane permeability (P%) was calculated using equation (1):

$$P\% = 100 \times (A_{\text{ultrasound}} - A_{\text{without ultrasound}}) / A_{\text{ultrasound}} \quad (1)$$

#### Autoaggregation ability

The autoaggregation kinetics were measured according to Kos et al. (2003). The bacterial suspension was incubated for 18 h at 42 °C and centrifuged at 5000 *g* for 15 minutes. The cell sediment was then washed twice with saline phosphate buffer (PBS) and dissolved again in PBS to achieve a cell concentration of 10<sup>7</sup> to 10<sup>8</sup> (OD<sub>0</sub> = 0.11 at 578 nm). Subsequently, a 10 ml aliquot was transferred into a glass test tube and isolated from shocks. The OD of the 1–2 cm upper layer of the suspension was monitored after 1, 2, 3 and 4 hours (OD<sub>t</sub>). The autoaggregation percentage (A%) was calculated using equation (2):

$$A\% = 100 \times (1 - OD_t / OD_0) \quad (2)$$

#### EPS production

The ultrasonic-treated and nontreated bacterial suspensions in M17 broth were grown for 18 h at 42 °C. The EPS were released using a thermal shock in water bath (80 °C for 15 minutes) and ethanol precipitation as described by Ricciardi et al. (2002).

#### EPS HPLC-profiling

The EPS of the isolate were HPLC-profiled using the Agilent LC 1260 - Refractive index detector system. The EPS were dissolved in 1 ml of HPLC grade water (Sigma-Aldrich). Then, 100 µl of the extract suspension was mixed with 200 µl of 2M HCl and sonicated for 45 min a 45 °C bath and continuously vortexed. The acid-hydrolyzed EPS volume was made up to 1 ml with the eluent 80% acetonitrile and 20% water (HPLC grade, Sigma-Aldrich). A volume of 300 µl of crude extract was also mixed with the eluent. The extracts were filtered (0.22 µm), and a volume of 10 µl was injected. The crude and hydrolyzed extracts were analyzed on an Agilent Zorbax Carbohydrate analysis column (4.6 × 150 mm, 5 µm). The flow rate was 1.3 ml/minute, and the operation temperature was 30 °C.

#### EPS quantification

Crude EPS extracts were quantified as glucose equivalent according to the phenol-sulfuric acid method (Dubois et al., 1956).

#### Statistical analysis

All the analyses were performed in duplicate and expressed as mean ± standard deviation. ANOVA one-way and Tukey's HSD were performed with the significance level of 0.05 by using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 21.0.

## Results and discussion

#### Effect of ultrasound conditioning on growth

The sonication effects on the growth ability of the model strain *S. thermophilus* CNRZ 447 is shown in Figure 1. The species tolerated the sonication treatment for the duration below 30 minutes. For longer treatments (45 and 65 minutes), the sonication significantly affected the bacterial growth ability (7.76 log<sub>10</sub> vs 8.55 log<sub>10</sub> and 7.66 log<sub>10</sub> vs 8.55 log<sub>10</sub>, respectively) (*P* < 0.05), thus suggesting the destructive effect of the ultrasound treatment. In contrast, Nguyen et al. (2009) indicated that ultrasounds (20 kHz) can have dual effects on bifidobacteria: a negative effect because of the reduction in the number of viable cells and a positive one because of the fact that broken or destroyed cells can provide essential nutrients and signaling molecules that can promote culture growth. In agreement with our results, low intensity ultrasounds and short exposition times (less than 30 minutes) were demonstrated to improve the growth ability of *Lactobacillus helveticus* PTCC 1332, *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643, *Bifidobacterium longum* FTDC 8943, *B. longum* FTDC 2113, and *Lactobacillus casei* ATCC 393 (Yeo et al., 2011; Hashemi et al., 2018). It could be interpreted that ultrasounds can interfere with bacterial metabolisms and conditions important for physiological effects (Christi, 2003; Leighton, 2007; Shikha et al., 2016). However, depending on the application conditions (time, viscosity of the media, potency, and frequency of the wave) of the sonication and the characteristics of the bacterial species (cellular wall structures), ultrasounds can have different consequences that are either deleterious or beneficial for the bacteria (Tabatabaie and Mortasavi, 2008; Kobayashi et al., 2009). Tabatabaie and Mortasavi (2008) showed that selected LABs could tolerate sonication at different intensities. According to Garcin et al. (2015), LABs are more resistant to high-power ultrasonic treatment than yeast cells and suggested that this is due to the differences in cell sizes—sensitivity to sonication is greater when

the cell is larger. Even among bacteria, cell sizes seem to have an important contribution to resistance to sonication treatment, as observed with our laboratory experience on resistance of *Lactobacillus bulgaricus* and *S. thermophilus* strains (data not published).

#### Effect of ultrasound conditioning on biofilm propensity

The results of the biofilm propensity of the strain *S. thermophilus* CNRZ 447 are presented in Figure 2. Ultrasound conditioning improved the biofilm production ability of the strain for the treatment durations of 15, 30, 45, and 65 minutes as compared to the control without sonication (OD 0.20, 0.33, 0.22, and 0.25, respectively vs 0.1 for control). The biofilm production declined significantly to approximately 24–33% after 45 and 65 minutes of sonication as compared to the conditioning time of 30 minutes. This observation could be associated with the destruction of the bacterial cells with prolonged sonication treatments (Fig. 1). Generally, ultrasounds are being used as a cleaning technology to eradicate unwanted microorganisms and biofilms causing contamination. Nonetheless, the treatment can be gauged to trigger a stimulatory effect. As shown in Figure 1 and Figure 2, ultrasounds can destroy bacterial cells, but they can also be considered as a stressing or an interfering agent that can stimulate biofilm formation (a sophisticated protection mechanism of bacteria). We identified an optimal ultrasound conditioning time (30 minutes) to stimulate biofilm formation by *S. thermophilus* CNRZ 477. To the best of our knowledge, there is no study on the biofilm stimulation effect of ultrasound on LABs. Because of the long domestication of the LABs, they have lost, in contrast to the pathogens, the ability to produce consistent biofilms (Couvigny et al., 2015). Here, we showed that the ultrasound technology can be used to stimulate biofilm formation, which can be valuable for industrial microorganisms such as LABs. The biofilm production capacity can enhance several performances of the microorganisms, including resistance to antimicrobial agents and some industrial operations steps (shears and pH), the biosynthesis processes (extracellular compounds), and the probiotic properties (adhesion, colonization, and immunomodulatory effect) (Czacyk and Myszka, 2011; Couvigny et al., 2015; Caggianiello et al., 2016).

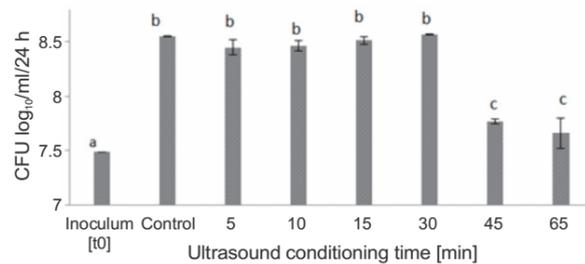


Fig. 1. Tolerance and growth ability of *S. thermophilus* CNRZ 447 as affected by ultrasound conditioning (values with different superscript letters (a, b, and c) are significantly different,  $P < 0.05$ )

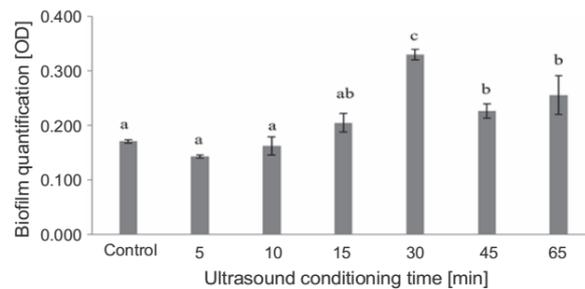


Fig. 2. Biofilm propensity of *S. thermophilus* CNRZ 447 as affected by ultrasound conditioning (values with different superscript letters (a, b, and c) are significantly different,  $P < 0.05$ )

#### Effects of ultrasound conditioning on membrane permeability

The precise mechanisms associated with biological activation with ultrasounds are still highly speculated. The most suggested mechanism is that the ultrasonic waves can induce microdiffusion, which can generate strong convection and improve substrate transfer (Christi, 2003; Leighton, 2007). Therefore, to understand the mechanochemical interferences of the ultrasounds that may have affected the strain's physiology, the protein and nucleic acid diffusion was assessed. The increase in the content of extracellular proteins and nucleic acids was  $55 \pm 7.07\%$  and  $1.55 \pm 0.7\%$ , respectively. These results suggest that the ultrasounds had a low effect on nucleic acid diffusion but induced a high excretion of proteins, probably associated with the stimulation of protein synthesis and/or membrane permeability. The ultrasounds can effectively improve cell membrane permeability, facilitate the flow of nutrients and metabolites, and activate the metabolic processes

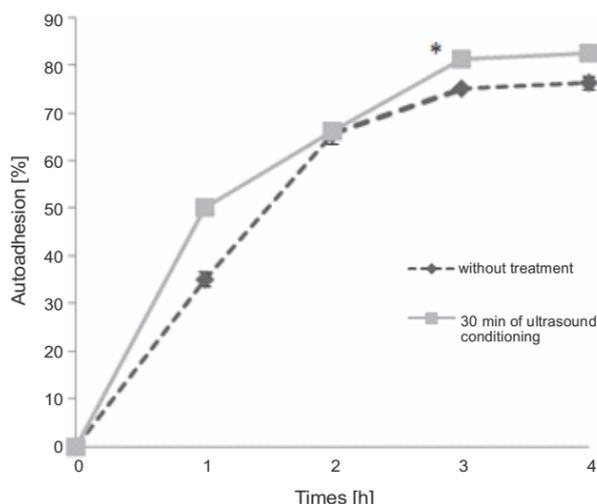


Fig. 3. Autoadhesion of *S. thermophilus* CNRZ 447 as affected by ultrasound conditioning (\* indicates that the value is significantly different compared to the control without treatment (0.05))

(Pitt and Ross, 2003; Yang et al., 2010). The cell membrane permeability is associated with passive diffusion of the quorum-sensing protein signaling molecules that can explain the stimulation of biofilm formation (Kamaraju et al., 2011; Fitzgerald et al., 2018).

#### Effects of ultrasound conditioning on autoaggregation

Adhesion ability is a fundamental step for probiotics to exert their health effect on the host. Several molecules may be involved in this process, such as cell wall teichoic and lipoteichoic acids, peptides and proteins, peptidoglycans, and EPS (Sanchez et al., 2007). The autoaggregation kinetics of the ultrasound-conditioned cells were compared to those of the control cells, as shown in Figure 3. *S. thermophilus* CNRZ 447 exhibited strong autoaggregation ability (above 70% after 3 hours), which is consistent with previous observations suggesting that *S. thermophilus* species are known to have strong adhesion ability (above 50%) (Leighton, 2007; Khalil, 2010; Tuncer and Tuncer, 2014). Ultrasound-conditioning (30 minutes treatment) significantly improved the adhesion capacity of the strain (to approximately 82%) ( $P < 0.05$ ). We did not find any study that has evaluated the effect of ultrasounds on the aggregation capacity of this strain to better understand the nature of the interactions between ultrasounds and the adhesive properties of the strain. However, it could be inferred that the ultrasound can erode the surface structure of the cells and expose the adhesion molecules. Tabatabaie

and Mortasavi (2008) showed that after an ultrasonic treatment (20 kHz) with increasing duration, some proteins of the cell wall were activated and promoted good adhesion of the bacteria to surfaces.

#### Effects of ultrasound conditioning on EPS production

HPLC-profiling (Fig. 4) revealed that *S. thermophilus* CNRZ 447 EPS was mainly composed of two triholosides constituted mostly of glucose. The exact monosaccharide composition of the EPS was not adequately determined. Nonetheless, *S. thermophilus* species has been reported to produce heteropolysaccharides (Ricciardi et al., 2002; Kanamarlapudi and Muddada, 2017); however, the structural characterization of EPS of the *S. thermophilus* strains still needs further characterization. The present study showed that the *S. thermophilus* strain has important potential to produce EPS (Table 1). Ultrasound conditioning enhanced the metabolic activity of the strain and it outperformed EPS production (1745 mg glucose equivalent/l vs  $176 \pm 4$  mg glucose equivalent/l) for an optimal time of 30 minutes of sonication. Importantly, EPS production increased after 15 minutes of sonication but declined after 65 minutes ( $541 \pm 0.1$  mg glucose equivalent/l and  $83 \pm 3$  mg glucose equivalent/l, respectively). The decrease in EPS production after the prolonged sonication time might be explained by the deleterious effects of the treatment. Adequate time conditioning is thus essential for the use of ultrasound to improve the properties and performance of the beneficial microorganisms. Moncada and Aryana (2012) observed that low-potency sonication and controlled duration of exposure improve the desired properties of *S. thermophilus*, such as resistance to hostile gastrointestinal tract conditions (bile and pH) and secretion of bioactive metabolites. The performance achieved was comparable to the maximum EPS yield of *S. thermophilus* species (1–2 g/l) (Wu et al., 2014; Kanamarlapudi and Muddada, 2017). In agreement with our previous study (Boubakeur et al., 2018), it was possible to improve EPS yield (from 200 to 826 mg glucose/l,  $P < 0.05$ ) by conditioning *S. thermophilus* with polyphenol extract and to demonstrate their properties as probiotics.

#### Conclusions

The present study reported the potential of sonication in improving bacterial metabolism, conditioning biofilm physiological traits, and enhancing EPS produc-

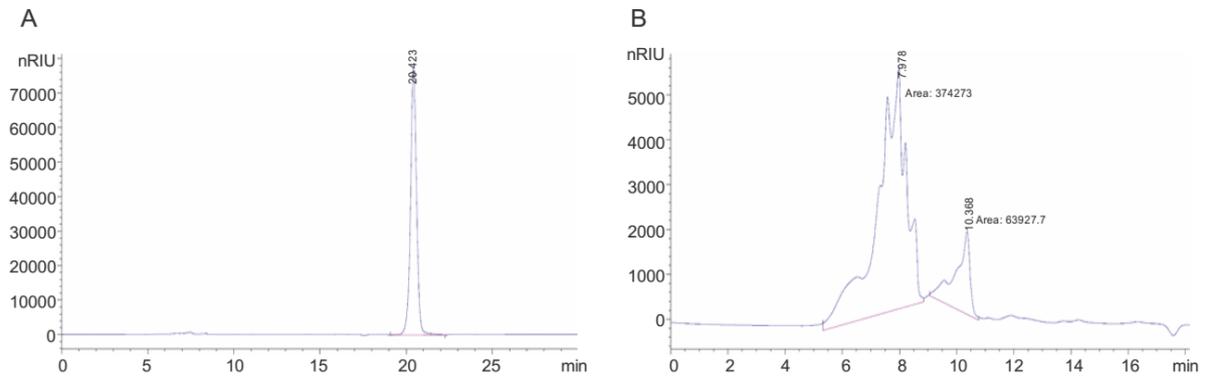


Fig. 4. HPLC-profiling of EPS of *S. thermophilus* CNRZ 447: A) A unique characteristic peak was observed in the EPS hydrolysis at 20.4 minute; it was identified as glucitol, which suggests that, B) the EPS is composed of at least two distinct triholosides (between 7 and 10 minutes) that are constituted of mainly glucose residues

Table 1. EPS productivity of *S. thermophilus* CNRZ 447 as affected by ultrasound conditioning

Time [min]	Control	15 min	30 min	65 min
EPS [mg glucose/l]	176 ± 4 <sup>a</sup>	541 ± 0.1 <sup>b</sup>	1745 ± 12 <sup>c</sup>	83 ± 3 <sup>d</sup>

Values with different superscript letters (a, b, c, and d) are significantly different ( $P < 0.05$ )

tion of a potential dairy starter and probiotic strain. There is increasing interest in the health-promoting properties of probiotics and their EPS. Physical conditioning techniques such as ultrasound should be further explored and used to enhance the properties of beneficial microorganisms.

#### Acknowledgments

The authors express their gratitude to Algeria Ministry of Higher Education and Scientific Research and to the General Directorate for Scientific Research and Technological Development for the PhD grant.

#### References

- Boubakeur B., Drabo M.S., Khadem H., Mullier C., Tirtouil A. (2018) Influence of the exopolysaccharides of polyphenols-conditioned lactic acid bacteria on gut microecology and bacterial translocation. *Ukr. J. Ecol.* 18: 1–9.
- Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J. (2011) Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food. Eng.* 104: 467–483.
- Caggianiello G., Kleerebezem M., Spano G. (2016) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100: 3877–3886.
- Christi Y. (2003) Sonobioreactors: Using ultrasound for enhanced microbial productivity. *Trends Biotechnol.* 21: 89–93.
- Couvigny B., Th erial C., Gautier C., Renault P., Briandet R., Gu edon E. (2015) *Streptococcus thermophilus* biofilm formation: a remnant trait of ancestral commensal life? *PLOS One.* 10: 1–23.
- Czaczyk K., Myszka K. (2011) Biofilms in the food environment. [in:] *Encyclopedia of agrophysics*. Ed. Gliński J., Horabik J., Lipiec J. Netherlands, Springer: 76–78.
- Dai C., Xiong F., He R., Zhang W., Ma H. (2016) Effects of low-intensity ultrasound on the growth, cell membrane permeability and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ultrason. Sonochem.* 36: 191–197.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350–350.
- FAO/WHO (2001) Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation.
- Fitzgerald N.J.M., Simcik, M.F., Novak, P.J. (2018) Perfluoroalkyl substances increase the membrane permeability and quorum sensing response in *Aliivibrio fischeri*. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 5: 26–31.
- Garcin L., Jambrak A.R., Juretić H., Dobrović S., Barukčić I., Grozdanović M., Smoljanić G. (2016) Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Appl. Acoust.* 103B: 143–147.
- Hashemi S.M.B., Mousavi Khaneghah A., Saraiva J.A., Jambrak A.R., Barba F.J., Mota J.M. (2018) Effect of ultrasounds on lactic acid production by *Lactobacillus* strains in date (*Phoenix dactylifera* var. *kabkab*) syrup. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102: 2635–2644.

- Kamaraju K., Smith J., Wang J. (2011) *Effects on membrane lateral pressure suggest permeation mechanisms for bacterial quorum signaling molecules*. *Biochemistry* 50: 6983–6993.
- Kanamarlapudi S.L.R.K., Muddada S. (2017) *Characterization of exopolysaccharide produced by Streptococcus thermophilus CC30*. *Biomed. Res. Int.* 2017: 1–11.
- Khalil R.K.S. (2010) *Influence of gallic acid and catechin polyphenols on probiotic properties of Streptococcus thermophilus CHCC 3534 strain*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 2069–2079.
- Kobayashi Y., Sakai D., Iwashina T., Iwabuchi S., Mochida J. (2009) *Low-intensity pulsed ultrasounds stimulates cell proliferation, proteoglycan synthesis and expression of growth factor-related genes in human nucleus pulposus cell*. *Eur. Cell Master.* 17: 15–22.
- Kos B., Suskovic J., Vukovic S., Simprag M., Frece J., Matosic S. (2003) *Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92*. *J. Appl. Microbiol.* 94: 981–987.
- Leighton T.G. (2007) *What is ultrasound?*. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 93: 3–83.
- London L.E.E., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Shanahan F., Caplice M.N., Stanton C. (2016) *Probiotics as cell factories for bioactive ingredients: focus on microbial polysaccharides and health beneficial effects*. [in:] *Advances in probiotic technology*. Ed. Foerst P., Santivarangkna C., Boca Raton, Taylor and Francis Group: 77–103.
- Moncada M., Aryana K.J. (2012) *Influence of "mild" sonication conditions on the characteristics of Streptococcus thermophilus ST-M5*. *Adv. Microbiol.* 2: 8–16.
- Mozzi F., Savoy de Giori G., Oliver G., Font de Valdez G. (1996) *Exopolysaccharide production by Lactobacillus casei in milk under different growth conditions*. *Milchwissenschaft.* 51: 670–673.
- Novel G. (1993) *Les bactéries lactiques*. [in:] *Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel*. Ed. Leveau J.Y., Bouix M., Paris, Tec et Doc Lavoisier: 170–331.
- Nguyen T.P., Lee Y.K., Zhou W. (2009) *Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by high intensity ultrasounds*. *Int. Dairy J.* 19(6–7): 410–416.
- O'Grady B and Gibson G.R. (2005) *Microbiota of the human gut*. [in:] *Probiotic dairy products*. Ed. Tamime A., Oxford, Blackwell Publishing Ltd: 1–20.
- O'Toole G.A. (2011) *Microtiter dish biofilm formation assay*. *J. Vis. Exp.* 47: 1–3.
- Patel S., Majumder A., Goyal A. (2012) *Potential of exopolysaccharides from lactic acid bacteria*. *Indian J. Microbiol.* 52: 3–12.
- Pitt W., Ross G.S.A. (2003) *Ultrasounds increase the rate of bacterial cell growth*. *Biotechnol. Prog.* 19: 1038–1044.
- Ricciardi A., Parente E., Crudele M.A., Zanetti F., Scolari G., Mannazzu I. (2002) *Exopolysaccharide production by Streptococcus thermophilus SY: production and preliminary characterization of the polymer*. *J. Appl. Microbiol.* 92: 297–306.
- Sanchez B., Champomier-Verges M.C., Collado M.D.C., Anglade P., Baraige, F., Sanz Y., De Los Reyes-Gavilan C.G, Margolles A., Zagorec M. (2007) *Low-pH Adaptation and the acid tolerance response of Bifidobacterium longum biotype longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6450–6459.
- Shikha O.K., Donnell P.O., Colm J.C., Brijesh K.T. (2016) *Ultrasounds and food fermentation*. [in:] *Novel food fermentation*. Ed. Shikha Ojha K and Brijesh Tiwari K., Switzerland, Springer International Publishing: 125–142.
- Tabatabaie F., Mortazavi A. (2008) *Studying the effects of ultrasounds shock on cell wall permeability and survival of some LAB in milk*. *World Appl. Sci. J.* 3: 119–121.
- Tuncer B.O., Tuncer Y. (2014) *Exopolysaccharide producer Streptococcus thermophilus st8.01 strain; a potential probiotic culture*. *GIDA.* 39: 195–202.
- Welman A.D., Maddox I.S. (2003) *Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges*. *Trends Biotechnol.* 21: 269–274.
- Wu Q., Tun M.H., Leung F.C., Shah N.P. (2014) *Genomic insights into high exopolysaccharide-producing dairy starter bacterium Streptococcus thermophilus ASCC 1275*. *Sci. Rep.* 15: 49–74.
- Xiao J., Zhang Y., Yang Z. (2014) *Genomic of lactic acid bacteria*. [in:] *Lactic acid bacteria fundamental and practis*. Ed. Zang H., Cai Y., Dordrecht, Springer : 250–303.
- Yang S., Zhang H., Wang W. (2010) *The ultrasonic effect on the mechanism of cholesterol oxidase production by Brevibacterium sp.* *Afr. J. Biotechnol.* 9: 2574–2578.
- Yeo S.K., Liong M.T. (2011) *Effect of ultrasounds on the growth of probiotics and bioconversion of isoflavones in prebiotic-supplemented soymilk*. *J. Agric. Food Chem.* 59: 885–897.