

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة موالى الطاهر

Université Saida MOULAY Tahar



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

N° d'Ordre

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

La contribution des exopolysaccharides des bactéries lactiques comme un outil biotechnologie

Présenté par :

- melle MENTEFA Ikram

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président	Mr. KEBIR Nasreddine	MCA Université SAIDA
Examineur	Mr. BENREGUIG Mokhtar	Pr Université SAIDA
Rapporteur	Mme CHAHROUR Wassila	MCA Université SAIDA
Co-Rapporteur	Mr. BELLIL Yahya	MCA Université SAIDA

Année universitaire 2021/2022

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة موالى الطاهر

Université Saida MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

La contribution des exopolysaccharides des bactéries lactiques comme un outil biotechnologie

Présenté par :

- Mme MENTEFA Ikram

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président

Mr. KEBIR Nasreddine

MCA Université SAIDA

Examineur

Mr. BENREGUIGE Mokhtar

Pr Université SAIDA

Rapporteur

Mme CHAHROUR Wassila

MCA Université SAIDA

Co-Rapporteur

Mr. BELLIL Yahya

MCA Université SAIDA

Année universitaire 2021/2022

Dédicaces

À l'aide d'ALLAH tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, qui m'a donné la force, la volonté, la santé et le courage durant la réalisation de ce travail

Je dédie ce travail :

À mes adorables grand parents YAMINA et MOUHAMED, que Dieu les garde pour moi pour ce jour-là, qui ont toujours été à mes côtés pour leur encouragement.

À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère BAHIA qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

À mon cher père TAHAR qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements, que Dieu vous garde et vous procure tout puissant te garde santé, longue vie et bonheur afin que vous demeuriez le soleil qui illumine notre vie.

À mon très cher frère : YUCEF pour leurs encouragements, qui m'ont soutenu depuis toujours. Je te souhaite du bonheur et du succès dans toute votre vie.

À ma chère oncle ABD EL WAHAB et son filles NORHAN et leurs femmes.

À mon oncle AHMED et sa petite famille et Ma tante FOUZIA et leurs filles

À mes oncles AHMED et MOKHTAR

À mon très cher ami KHALED mes remerciements ne pourront jamais égaler ton grand cœur qui m'a apporté du soutien au moment où j'avais besoin d'aide. Merci encore.

À tous mes amis surtout : Hana, Feryel, Halima, Kawthar, Imen, Hanan, Walaa Je garderai de vous les bons souvenirs. Merci d'être toujours à côté de moi.

À mes collègues : Houria, Houda, Wafae, Mouhamed . À toute ma famille MENTEFA.

IKRAM

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier Dieu tout puissant ; qui nous a donné la santé, la volonté, et la patience pour l'accomplissement de ce travail. Nous tenons en premier lieu, à exprimer notre profonde gratitude à notre

Promotrice :

CHAHROUR WASSILA, pour la qualité de son encadrement ; Nous la remercions infiniment de nous avoir été d'une grande efficacité, par sa disponibilité à tout moment, ses conseils constructives, ses orientations et ses encouragements.

JE remercie chaleureusement Mr. BELILE YAHYA, pour sa disponibilité durant toute la période de réalisation de ce travail.

Nous tenons également à exprimer nos remerciements aux membres du jury :

Mr BENREGUIGE et Mr KEBIR Merci d'avoir accepter de faire partie du jury et d'examiner ce modeste travail.

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin et qui nous ont soutenus durant notre cursus universitaire et nous ont encouragé afin de persévérer et d'avancer Nous remercions aussi nos collègues de promotion de Microbiologie appliquée (2021-2022).

Liste des abréviations

- EPS:** Exo-polysaccharides
- LAB :** Bactéries lactiques
- MRS:** Man, Rogosa, Sharpe
- MSE:** Mayeux, Sandine et Elliker
- BN:** bouillon nutritif
- GN:** gélose nutritif
- PH:** potentiel Hydrogène
- NK:** les cellules cytotoxiques naturelles
- CEPS:** Exo-polysaccharides capsulaire
- fEPS:** Exo-polysaccharides libres
- Lb:** lactobacillus
- DPPH:**
- Mg:** milligramme
- ml:** millilitre
- Vit C:** vitamine C
- EI:** indices d'émulsification
- ARN** Acide ribonucléique
- ADP** adénosine-diphosphate
- ATP** adenosine triphosphate
- Pi:** phosphate inorganique
- NAD:** nicotinamide adénine dinucléotide
- ARN:** Acide ribonucléique
- %:**pourcentage
- NaCl :** chlorure de sodium

°C: degré Celsius

GC%: pourcentage de guanine avec cytosine

TCA: Acide Trichlorid Acetic

Min :minute

Rpm: rotation par minute

DM :dilution mère

Liste des tableaux

Table 1: Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques au stade genre (Salminen et al. ,2004).....	8
Table 2: exemples d'utilisation des bactéries lactiques en industrie alimentaire (d'après Romain, 2011).....	16
Table 3: Homopolysaccharides produits par les bactéries lactiques (Sanlibaba et Çakmak, 2016).....	26
Table 4 : préparation des dilutions de glucose	43
Table 5: Examen macroscopique des colonies sur le milieu MSE et MRS _{RC}	48
Table 6: les aspects microscopiques des isolats après coloration de gram.....	50
Table 7 : Résultats de test de formation de biofilm sur microplaque 96 puits	53

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (Makhloufi, 2011).	6
Figure 2: Dendrogramme consensus reflétant les relations phylogénétiques de l'ordre des «Lactobacillales» au sein de la classe « Bacilli» (De Vos et al., 2009).	9
Figure 3: Lactococcus lactis subsp. lactis sous forme de cellules ovoïdes par paire et en chaînette selon la souche (Teuber et Geis, 2006).	11
Figure 4: Contraste de phase(A-E) et d'électrons (F) des micrographies montrant la différence de morphologie des cellules de Lactobacilles (De Vos et al, 2009).	15
Figure 5: Mode d'action sur les pathogènes des acides organiques produits par les lactobacilles.	18
Figure 6: Représentatif des homo et hétéropolysaccharides(Sanlibaba et Çakmak, 2016).	23
Figure 7: Représentation schématique des unités répétitives de: dextran, mutan, alternan, glucan et reuteran(Werning et al., 2012).	24
Figure 8: Représentation schématique des unités répétitives de β -(1,3-1,2)-D-glucan of <i>P. parvulus</i> (Werning et al., 2012).	25
Figure 9: Classification des homopolysaccharides produits par <i>Lactobacillus</i> sp(Badel et al., 2011).	26
Figure 10: lacto fermentation des aliments (blé, betterave, carotte, olive)	36
Figure 11: les dilutions décimales préparé	37
Figure 12 : schéma récapitulative de screening jusqu'à la conservation	38
Figure 13: schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées (Saidi et al, 2002).	41
Figure 14: l'aspect des echantillons moisi	46
Figure 15 : les boites de blé après 20jours de fermentation lactique	47

Figure 16: les légumes après 43 jours (17/01/2022à27/02/2022) de fermentation lactique	47
Figure 17: la galerie API50 CHde B11 après 24heures et après 48heures	52
Figure 18: la plaque 2eme de test de formation de biofilm	53
Figure 19: aspect visqueux et colonie marron des colonies B11	54
Figure 20: la formation d'un trouble confirme la formation de production desexo-polysaccharides pour les isolats	55
Figure 21: les trois souches sélectionnés (B11, B12, MB2-5) pucées sur milieu MRS amidon (avant de l'ajout de lugole)	55
Figure 22 : résultats de test amylolytique (après l'ajout de lugol)	56
Figure 23: Les résultats d'activité antioxydante des souches B11, B12,MB2-5 et VitC.....	57
Figure 24: les résultats de l'activité émulsifiant en 1h,24h,48 pour les EPSB11et EPSB12et EPSMB2-5.....	59
Figure 25: les tableau représentatif des diamètres des zones d'inhibition.....	60
Figure 26: les résultats d'activité antimicrobienne contre les souches (Kleibseilla pneumonie et Acinetobacter baumanii).....	61

Résumé

La recherche des souches bactériennes lactique productrice des Exo-polysaccharides a été isolée à partir des légumes et blé fermenté.

L'isolement sur milieu sélective nous a permis d'obtenir 17 souches susceptible d'être des bactéries lactiques. La mise en évidence de formation de biofilm été réalisée pour tous les isolats. Que 03 souches ont été sélectionné pour des tests approfondie ; le test de l'activité amylolytique été négative pour les souches sélectionnés ; la production des EPS sur milieu hypersaccharosée MRS 5% été visible grâce au test de Langani, l'études de pouvoir antioxydant des EPS des lactobacillus a réveillé que ces EPS possèdent un pourcentage important 87.5% et 89.1% pour les souches lactobacillus BI2 et Lactobacillus MB2 respectivement ; autrement les EPS de la souche lactobacillus BI1 possède 36.6% de l'activité émulsifiante dans laquelle on observe quelle été stable en 1h ,24h et 48h.

Les EPS de Lactobacillus acidophilus BI1 montre Une faible activité en vers les souches pathogènes 19et 02et17 et nul en vers 15et08et38

Mot clé : Bactéries lactiques, Exo-polysaccharides, Fermentation lactique, activité antioxydante, activité émulsifiante.

Abstract

Research into lactic bacterial strains producing Exo-polysaccharides has been isolated from vegetables and fermented wheat.

Isolation on a selective medium allowed us to obtain 17 strains that could be lactic acid bacteria. Evidence of biofilm formation was performed for all isolates. That 03 strains were selected for in-depth testing; the amyolytic activity test was negative for the selected strains; the production of EPS on hypersaccharosed medium MRS 5% was visible through the Langani test, Studies of the antioxidant potency of Lactobacillus EPS have awakened that these EPS possess a significant percentage 87.5% and 89.1% for the lactobacillus strains B12 and Lactobacillus MB2 respectively; otherwise the EPS of the lactobacillus strain B11 has 36.6% of the emulsifying activity in which it is observed that was stable in 1h, 24h and 48h.

Lactobacillus acidophilus B11 EPS shows low worm activity in pathogenic strains 19and02and17 and no worm activity in 15and08and38

Keywords: Lactic bacteria, Exo-polysaccharides, Lactic fermentation, antioxidant activity, emulsifying activity.

ملخص

البحث عن سلالات بكتيرية من النوع البكتيريا اللبنية المنتجة لمتعددات السكريات الخارجية المعزولة من الخضار والقمح المخمر

سمح لنا العزل على وسط حيوي انتقائي بالحصول على 17 سلالة يمكن ان تكون بكتيريا لبنية. تم اجراء اختبار على قدرة تكوين الاغشية الحيوية لجميع المعزولات. 3 سلالات فقط قد اختيرت للاختبار العميق. وكان اختبار النشاط الانحلالي سلبي بالنسبة للسلالات المختارة وكان انتاج متعددات السكريات الخارجية في الوسط MRS 5% مرثيا وذلك بالتأكد من خلال اختبار LANGANI. دراسة الاكسدة لمتعددات السكريات للنوع *Lactobacillus* أظهرت انه هناك نسبة عالية قدرت ب 87.5% و 89.1% للمعزولات BI1 و MB2 بالترتيب. من جهة أخرى متعددات السكريات الخاصة بالمعزولة اعطت 36 % في اختبار المستحلب اين لاحظنا استقرار بعد 1 ساعة و 24 ساعة وأيضا 48 ساعة

متعددات السكريات الخاصة ب *Lactobacillus acidphilus* BI1 اعطت نشاط ضعيف ضد *Actinobacter*
Selmonella spp و *baumanii* في حين لا يوجد نشاط ضد *Streptococcus pneumonie* و *Klebsella*
Yersinia و *pneumonie*

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية. متعددات السكريات الخارجية. التخمر اللبني. النشاط المضاد للاكسدة. نشاط المستحلب

Table des matières

Généralités.....	5
Homofermentaires	5
Hétérofermentaires	6
Habitat.....	7
Classification.....	7
Classification génotypique.....	9
Genres lactiques associés aux aliments	10
Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus et Vagococcus.....	10
Enterococcus	10
Lactococcus.....	10
Streptococcus	11
Vagococcus	12
Aerococcus, Pediococcus et Tetragenococcus	12
Aerococcus.....	12
Pediococcus	12
Tetragenococcus	13
Leuconostoc, Oenococcus et Weissella	13
Leuconostoc.....	13
Oenococcus	13
Weissella	14
Lactobacillus.....	14
Carnobacterium.....	15
l'intérêt DES BACTERIES lactiques.....	16
Activité acidifiante	16
Activité protéolytique.....	17
Activité lipolytique.....	17
Activité antimicrobienne	17
Les acides organiques	18
Le diacétyl et d'autres produits	18
Le dioxyde de carbone	18

Le peroxyde d'hydrogène	19
La production d'antibiotiques	19
La production des Bactériocines	19
Activité antifongique.....	20
Généralité	22
Classification des EPS des bactéries lactiques.....	22
Homopolysaccharides	23
Hétéropolysaccharides.....	27
Rôle des EPS dans la cellule procaryote.....	27
Les applications des exo polysaccharides.....	28
Activité antioxydante.....	28
Activité anti-inflammatoire.....	29
Activité immunomodulatrice.....	29
Activité antivirale	30
Applications de l'EPSS dans les denrées alimentaires.....	30
Applications de l'EPS dans les produits de boulangerie	32
Applications de l'EPS dans les produits à base de viande fermentée	33
Echantillonnage	35
Préparation des échantillons.....	35
Légumes fermentés	35
Blé fermenté.....	35
Screening des souches productrices d'EPS:.....	36
Préparatio des dilutions décimale	36
Purification	37
Pré identification	39
Examen macroscopique	39
Examen microscopique.....	39
Tests physiologiques et biochimiques	39
Identification par galerie Api 50	39
Préparation de galerie	39
Préparation de l'inoculum	40
Conservation des isolates:.....	40

Conservation à court terme	40
Conservation à long terme	41
Extraction des EPS.....	42
Quantification des EPS par la méthode du phenol-sulfurique	42
Activité amylolytique.....	43
Activité antioxydante	43
Activité d'émulsification.....	44
Test antimicrobien	44
Echantillon	46
Isolement des bactéries lactiques productrices d'EPS.....	47
La pré identification des souches.....	51
La mise en évidence de formation de biofilm	52
La production des exo-polysaccharides	54
Activité amylolytique.....	55
L'extraction des exo-polysaccharides	56
Activité antioxydante	56
Activités émulsification	58
Activité antimicrobienne	59
Annex1 : les ingrédients des milieu de culture	82
Annexe 2 : technique de coloration de gram	84
Annexe 3 GALERIE API 50	85

PARTIE I. INTRODUCTION

Introduction

Les bactéries lactiques possèdent plusieurs actions bénéfiques que ce soit au niveau du produit obtenu ou au niveau des bénéfices pour le consommateur en améliorant les propriétés sensorielles et les propriétés nutritionnelles. Pendant la fermentation lactique, les bactéries lactiques synthétisent plusieurs molécules, telles que les acides organiques, les exopolysaccharides, les bactériocines.

A l'heure actuelle, l'utilisation des EPS bactérien, couvre de vastes domaines qui vont de l'industrie alimentaire ou pharmaceutique à la récupération assistée des pétrole basée principalement sur les aptitudes épaississantes, gélifiantes, stabilisation et émulsifiantes des EPS a fine d'améliorer la consistance et la texture des aliments (Ruas-Madiedo et al., 2002a; Welman imaddox, 2003)

De plus, le EPS confèrent des propriétés nutraceutiques (immunomodulatrices, antitumorales, antidiabétiques, anti-obésités, anti-oxydants et amélioration du transit digestif), qui sont fortement affectées par la structure chimique des EPS et la conformation de la chaîne (thakar et al ., 2012 ;ahmed et al ., 2015 ,2016)

De ce fait, plusieurs industriels et chercheurs ont focalisé leurs travaux sur les EPS des bactéries lactiques, leur classification, leur composition chimique, leur structure, leur biosynthèse, leur ingénierie (De vuyst et al ., 2001). Leurs effets sur les produits carnes (Ho ,2008) ainsi que sur le perfectionnement de la recherche biomédicale.

Dans cette étude, il s'agit d'identifier des souches bactériennes isolées productrices des exopolysaccharides de blé et de légumes fermentés de les caractériser phénotypiquement et étudier l'impact technologique.

Cette étude est structurée en deux parties dont un rappel bibliographique mettant en avant quelques notions sur les bactéries lactiques ainsi que sur les Exo-polysaccharides et son intérêt bénéfique. La deuxième partie regroupe l'ensemble des techniques et la méthodologie utilisées pour la

réalisation de ce travail, ainsi que les résultats générés associés à leur discussion.

PARTIE II. LES BACTERIES LACTIQUES

Généralités

Les bactéries lactiques (LAB) est un groupe hétérogène des microorganismes qui a été défini en 1919 par Orla Jensen. Elles produisent toutes l'acide lactique comme un produit final à partir de la fermentation de glucose. Toutefois, il existe d'autres bactéries qui produisent de l'acide lactique mais elles ne sont pas considérées comme des LAB le cas de *Bacillus* et de *Sporolactobacillus* (**Axelsson, 2004**).

Le terme « bactéries lactiques » a été toujours lié aux bactéries qui sont impliquées dans la fermentation des aliments. La première culture pure a été obtenue en 1873 par Listen définie comme *Bacterium lactis* probablement réfère à l'espèce *Lactococcus lactis*. Les premiers genres décrits sont : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. LAB regroupent 12 genres dont *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. (**Limsowtin et al., 2004**).

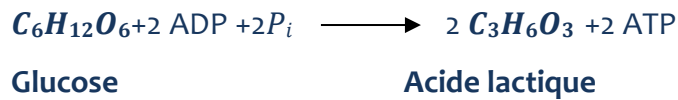
Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, immobiles, aéro-anaérobie facultatives, asporulées, . Ces bactéries peuvent avoir des formes en bâtonnets ou en coques (**Figure 1a, Figure 1b**) la majorité de ces bactéries sont des bactéries non pathogènes mais elles renferment certains genres qui sont pathogènes opportunistes le cas de *Streptococcus* et d'*Enterococcus* (**Aguirre et Collins, 1993**).

Elles sont auxotrophes vis-à-vis les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Hogg, 2005**). Elles peuvent croître à un pH allant jusqu'à 4,5 et à une température comprise entre 10°C et 45°C (**Pringsulaka et al., 2011**).

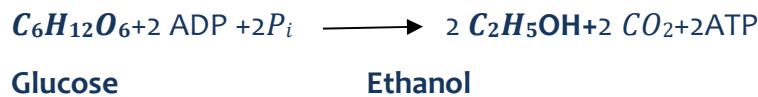
Les bactéries lactiques se divisent en deux groupes différents selon les voies métaboliques utilisées pour fermenter le glucose.

Homofermentaires :

Elles produisent de l'acide lactique comme un produit majeur de la fermentation de glucose.

**Hétérofermentaires :**

Elles produisent de l'éthanol et /ou de l'acide acétique en plus de l'acide lactique.



1.

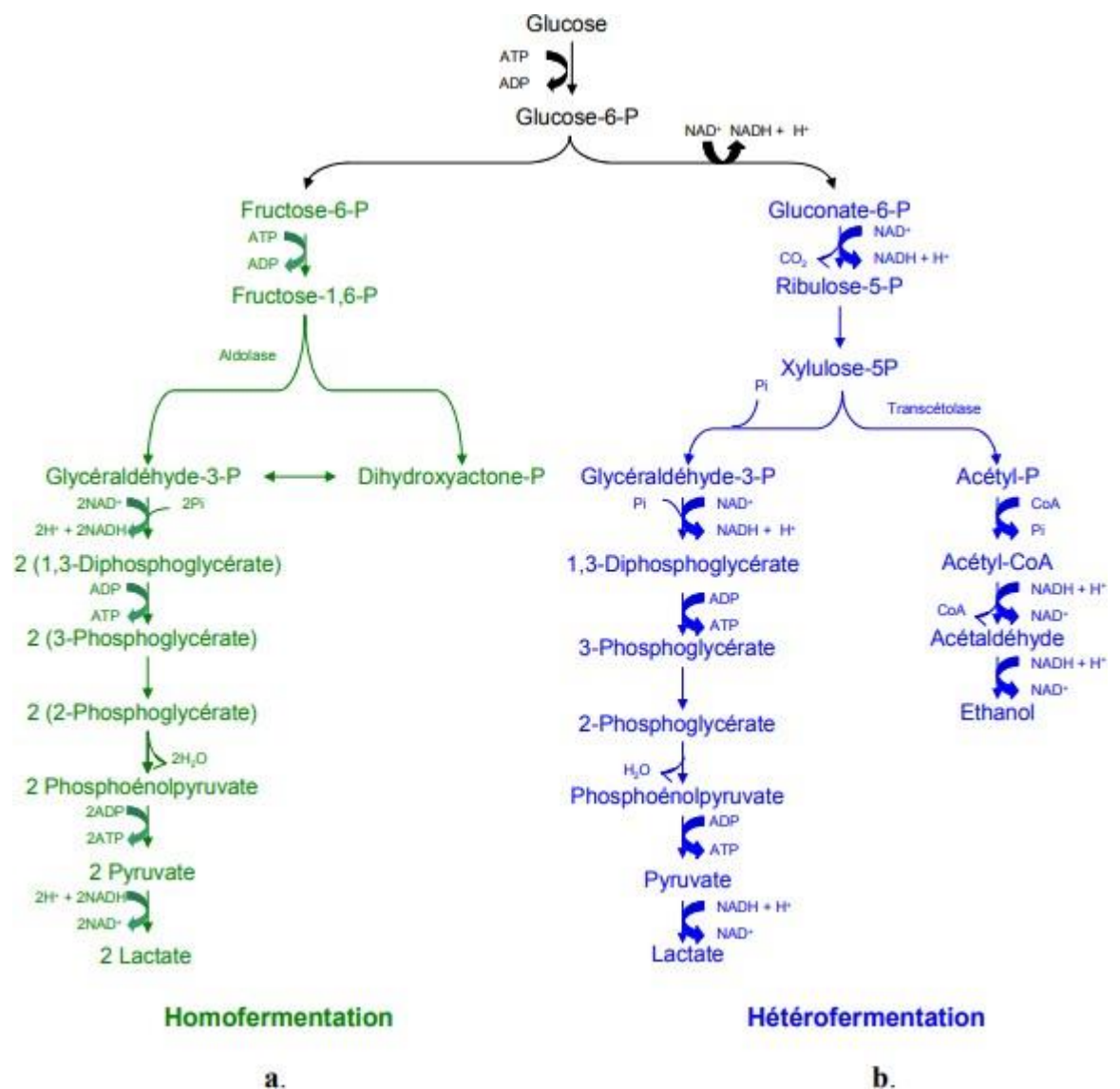


Figure 1 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (**Makhloufi, 2011**).

ATP : adénosine triphosphate.

ADP : adénosine diphosphate.

NAD⁺ / NADH, H⁺ : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

Pi : phosphate inorganique.

Habitat

Les bactéries lactiques sont des bactéries ubiquistes. Elles font partie de la flore intestinale et vaginale humaine et animale comme elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, les végétaux, la viande et les céréales (**Dortu et Thonart, 2009**). Elles sont essentiellement cultivées dans le milieu Man Rogosa Sharpe (MRS).

Acidotolérantes, les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides en raison de leur production d'acide lactique(**Gálvez et al., 2011**).

Aussi, les bactéries lactiques sont à l'origine de la fermentation utilisée pour la préparation de boissons à partir de plantes (boza, cidre, ...). Parmi elles, on distingue des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* (**Gálvez et al., 2011**).

Classification

La classification phénotypique des bactéries lactiques est basée essentiellement sur la morphologie, la croissance à des différentes températures, le mode de fermentation de glucose, les constituants de la paroi cellulaire, la tolérance à de hautes concentrations de sel et la capacité de croître aux pH acide ou alcalin (**Konig et Frohlich, 2009**).

Table 1: Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques au stade genre (Salminen et al., 2004).

Caractère	Carnob.	Lactob.	Aeroc.	Enteroc.	Lactoc. vagoc.	Leucono. Oenoc.	edioc.	Streptoc.	Tetrahe- noc.	eiss-e ^a
formation des tetrads	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ a partir de glucose ^b	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Croissance a 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Croissance a 45°C	-	±	-	+	-	-	±	-	+	±
Croissance a 6,5 % d'NaCl	<i>ND^d</i>	±	+	+	-	-	±	-	+	±
Croissance a 18 % d'NaC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance a pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Croissance a pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Configuration d'acide lactique ^e	L	D,L <i>DL^f</i>	L	L	L	D	L <i>,DL^f</i>	L	L	D <i>,DL^f</i>

+ : positif ; - : négatif ; ± : réponse variables selon les espèces ; ND : nom déterminé ; weisse a : souches peuvent être bâtonnets. b : - : Homofermentaires, + : Hétérofermentaires. C : petite

Classification génotypique

L'analyse comparative des séquences d'Acide ribonucléique (ARN) ribosomal 16s a entraînée des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (**Salminen et al., 2004**). Selon Bergy's manuel of Systematic Bacteriology (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la classe des Bacilli et l'ordre des Lactobacillales qui renferme six familles avec 35 genres.

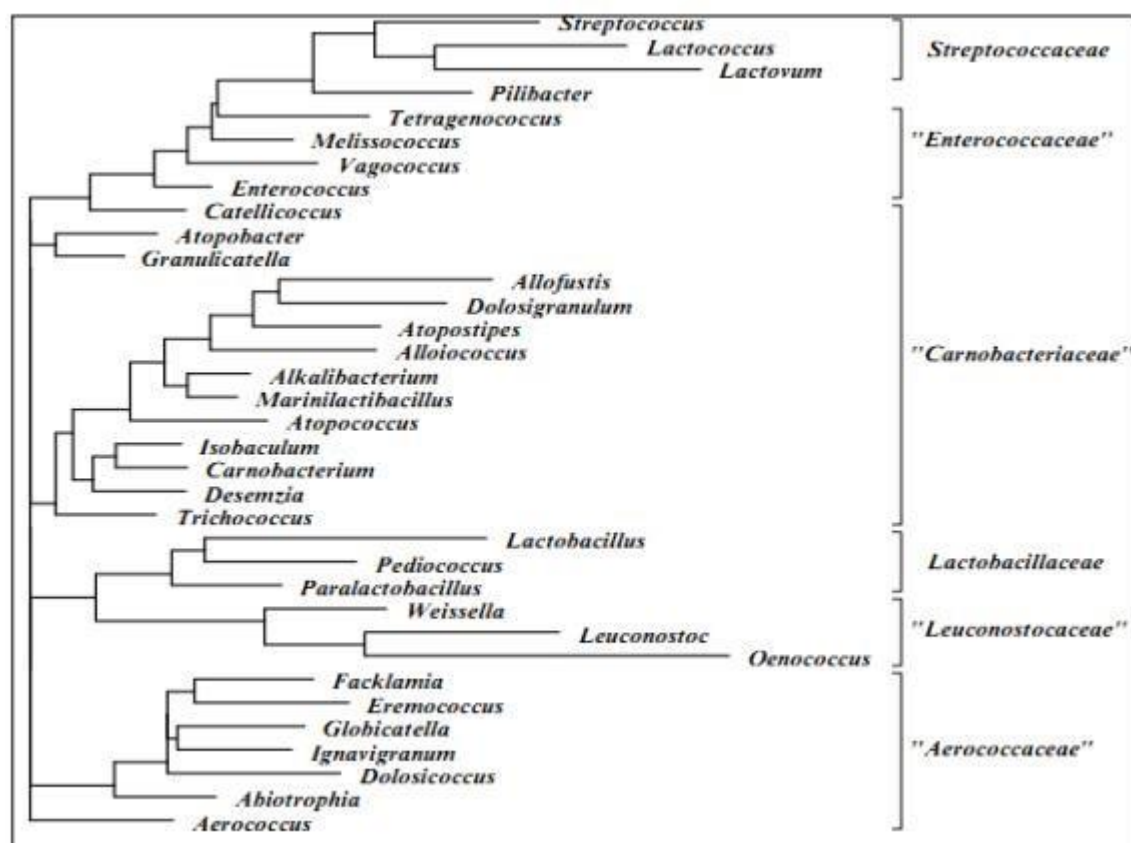


Figure 2: Dendrogramme consensus reflétant les relations phylogénétiques de l'ordre des «Lactobacillales» au sein de la classe «Bacilli» (**De Vos et al., 2009**).

Genres lactiques associés aux aliments

Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus et Vagococcus

Enterococcus, Lactococcus et Streptococcus étaient regroupés en un seul genre qui est Streptococcus. Ils sont très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminants et surtout comme agents de fermentation homolactique (**Salminen et al., 2004**).

Enterococcus

En 1987 Schleifer et Kilpper-Bälz ont proposé une nouvelle classification dont ils ont transféré certaines espèces du genre Streptococcus dans le nouveau genre : Enterococcus. Il s'agit de :Streptococcus faecalis et Streptococcus faecium qui sont devenues ainsi :Enterococcus faecalis« espèce type »Enterococcus faecium (**Leclerc et al., 1996**).

Les membres de ce genre sont des homofermentaires, facilement différenciables en se basant sur leurs capacités de croître à 10 et à 45°C, en présence de 6,5% de NaCl, à pH 9,6 et en présence de 40% de bile, 0,04% d'azide de sodium ou dans du lait avec 0,1% de bleu de méthylène, en plus de leur survie après un chauffage à 60°C pendant 30 min (**Hardie et Whiley, 1997**).

Diverses souches d'Enterococcus sont employées comme probiotiques et beaucoup d'autres sont impliquées dans des fermentations naturelles, comme des olives de table, des produits carnés, et des produits laitiers, en particulier des fromages (**Franz et al., 2003**).

Lactococcus

Les membres de ce genre se présentent sous forme de cocci en paire ou en chaînes de longueur variable (**Fig.4**). Ils sont des homofermentaires qui ne produisent que l'acide lactique L(+). Leur température optimale de croissance est proche de 30°C. Ils peuvent se développer à 10°C mais pas à 45°C. Comme ils croissent à 4% de NaCl (**Desmazeaud, 1992**). En dehors des cinq espèces actuellement reconnues, seule l'espèce Lactococcus lactis est utilisée en industrie laitière. En effet pour l'espèce Lactococcus lactis trois sous espèces ont été attribuées : Lactococcus lactis subsp. lactis,

Lactococcus lactis subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Seules les deux premières ; *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* sont importantes dans l'industrie laitière (Axelsson ,1998).

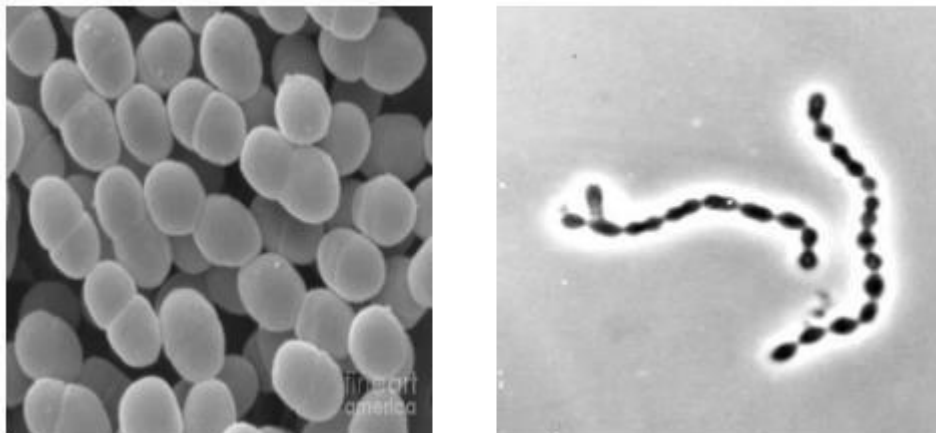


Figure 3: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sous forme de cellules ovoïdes par paire et en chaînette selon la souche (Teuber et Geis, 2006).

Streptococcus

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tels que *S. salivarius* et *S. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987).

La seule espèce de streptocoques utilisée en technologie alimentaire est *S. thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des “autres streptocoques”, mais ensuite transférée au groupe des streptocoques oraux à cause du degré d’homologie de son ADN avec l’ADN de *S. salivarius* (Stiles et Holzapfel, 1997).

S. thermophilus se différencie par son habitat ; lait et produits laitiers ; et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité deshydrates de carbones permettent de distinguer *S. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie, 1986 ; Pilet et al., 2005). Cependant, cette bactérie est incapable de croître à des valeurs de pH supérieures à 9.6, à une concentration égale ou supérieure à 4% (p/v) de NaCl et en présence de 0.1% (p/v) de bleu de méthylène (Klaenhammer et al., 2002).

Vagococcus

Les souches mobiles de *Vagococcus* spp. se différencient des enterococci mobiles (*Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus flavescens*, *Enterococcus gallinarum*) par leur incapacité à acidifier le L-arabinose et le raffinose. Les espèces de ce genre récemment décrites se confondent facilement des lactococci et se distinguent principalement par leur composition en acides gras et leur mobilité (Collins et al., 1990).

Aerococcus, Pediococcus et Tetragenococcus

Aerococcus, *Pediococcus* et *Tetragenococcus* ont tous la capacité de se regrouper en tétrade.

Aerococcus

Le genre *Aerococcus* se différencie de *Streptococcus* par son mode de regroupement en tétrades ou en amas. *Aerococcus viridans* est souvent considérée comme un simple contaminant de l'air et cette bactérie est également présente dans divers prélèvements : eau douce et eau de mer, sol, sédiments marins, végétaux, produits d'origine animale.

Pediococcus

Les *pediococci* sont formés de cellules regroupées en paires ou en tétrades. Il s'agit des bactéries microaérophiles, leur métabolisme homofermentaire produit principalement de l'acide lactique DL, bien que l'acide lactique L (+) fréquent (Garvie, 1986 ; Holt et al., 1994).

D'autre part la nature du peptidoglycane constitue un critère important qui distingue le genre *Pediococcus* du genre *Streptococcus*. Actuellement, les tests immunologiques sont d'une grande importance, ils sont utilisés pour trancher entre les différentes espèces des deux genres. Les espèces se différencient par leur tolérance à la température, à NaCl, au pH et par leur spectre fermentaire. Les différentes espèces du genre *Pediococcus* sont présentes dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons : bière, cidre et vin. *P. pentasaceus* avec *P. acidilactici* prédominent les matières végétales mais elles peuvent aussi être trouvées dans le lait et les produits laitiers (Simpson et Taguchi, 1995).

Tetragenococcus

Le genre *Tetragenococcus* regroupe des souches étroitement apparentées à l'espèce *Pediococcus halophilus*. Une seule espèce a été récemment reconnue, il s'agit de *Tetragenococcus halophilus* (**Collins et al., 1990**). Il a été démontré, qu'en plus de leur tolérance extrême au sel (>18% de NaCl), qui le distingue des autres genres des LAB; *Tetragenococcus* a besoin de sel pour sa croissance, généralement 5% de NaCl, c'est la raison pour laquelle cette espèce s'est avérée très importante dans la fabrication des produits fermentés, surtout ceux contenant une concentration élevée en sel (**Garvie, 1986**).

Leuconostoc, Oenococcus et Weissella

Leuconostoc, *Oenococcus* et *Weissella* forment un groupe des genres apparentés des LAB. Ils sont tous hétérofermentaires (**Bjorkroth et Holzapfel, 2006**).

Leuconostoc

Le terme *Leuconostoc* vient du mot « *Nostoc* » qui est une algue bleue mucilagineuse et « *Leuco* » veut dire blanc. La première description du genre *Leuconostoc* a été rapportée par Van Tieghem en 1878 (**Zhanget Cai, 2014**).

Les cellules de *Leuconostoc* sont des cocci en paires ou en chaînes comme les streptocoques mais les *Leuconostoc* sont des bactéries hétérofermentaires produisant de l'acide D (-) lactique, de l'éthanol et du CO₂.

Les *leuconostocs* principalement *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoriset* *Ln. Lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et du CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétone à partir des citrates du lait (**Hadef, 2012**).

Oenococcus

Les membres de ce genre sont non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Leur température optimale est de 20°C à 30°C, acidophiles qui se développent à un pH initial de 4,8. Elles ont pour habitat le vin et par conséquent, elles

tolèrent l'éthanol et se développent dans des milieux contenant 10% d'éthanol (Bjorkroth et Holzapfel, 2006 ; Zhang et Cai, 2014).

Weissella

Les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont des hétérofermentaires et sont généralement immobiles. Cependant, une nouvelle espèce mobile avec des flagelles péritriches, *Weissella beninensis*, a récemment été décrite par Padonou et al. en 2010.

Les lactobacilles et les Carnobacteria sont des bactéries à Gram+, polymorphe .asporogènes, non pigmentées, immobiles (sauf *Lb. agilis*), catalase-, nitrate réductase -, gélatinase -, leur morphologie diffère de cocci plus ou moins allongées à des formes longues, ce qui les rend parfois difficile à les distinguer des leuconostocs. Leur GC% varie de 32 à 53% (Axelsson, 1998).

Lactobacillus

En 1896, le genre *Lactobacillus* a été décrit pour la première fois par Beijerinck, et l'espèce type était *Lactobacillus delbrueckii*. Le genre *Lactobacillus* est le genre principal et le plus diversifié de la famille des Lactobacillaceae. Il comprend actuellement 158 espèces, sept de ces espèces sont constituées de 18 sous-espèces (Zhang et Cai, 2014).

On rencontre chez les lactobacilles une variabilité de forme (fins, incurvés, coccobacilles ... etc) (Fig.3). La longueur des bacilles et le degré de courbure dépend de l'âge de la culture, la composition du milieu (par exemple, la disponibilité des esters d'acide oléique) et le taux d'oxygène.

Certaines espèces de lactobacilles produisent du gaz (Ex : *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus brevis*) (De Vos et al, 2009). Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides, glucides et en sels minéraux. La température de croissance est comprise entre 2 et 53 ° C, avec un optimum entre 30 et 40 ° C (De Vos et al., 2009). Le pH de

croissance est compris entre 3 et 8 avec un optimum habituellement allant de 5,5 à 6,2 (Zhang et Cai, 2014).

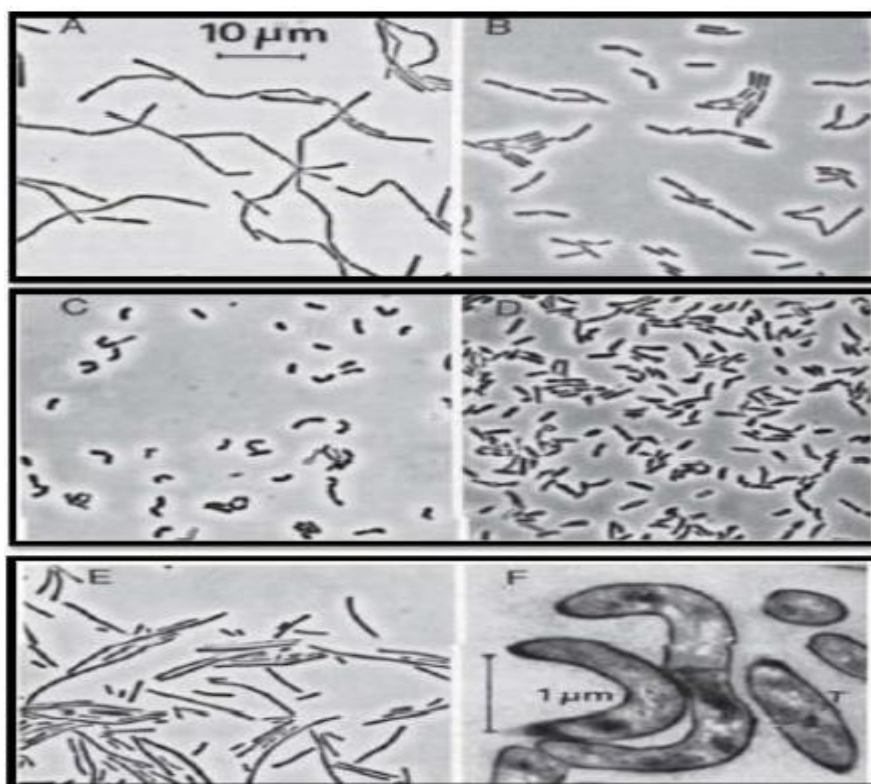


Figure 4:Contraste de phase(A-E) et d'électrons (F) des micrographies montrant la différence de morphologie des cellules de Lactobacilles (De Vos et al, 2009).

A *Lactobacillus gasseri*; B:*Lactobacillus agilis*; C:*Lactobacillus curvartus*; D :*Lactobacillus mineur*; E : *Lactobacillus fermentum*; et F : la forme de l'involution de lactobacilles dans une lame mince d'un grain de kéfir

Carnobacterium

Le genre Carnobacterium est constitué des bacilles minces, droits ou légèrement incurvés. Leurs cellules se présentent de manière isolée ou regroupée par deux ou parfois en courtes chaînes. Elles sont incapables de croître sur des milieux à base d'acétate et ne peuvent croître ni en présence de 8 % NaCl ni à 45°C.

Toutefois, elles peuvent croître à 10°C et parfois à 0°C. Il est difficile de distinguer le genre Carnobacterium du genre Lactobacillus. Toutefois, on peut noter que les Carnobacterium ssp. ne se développent pas sur les milieux à l'acétate de Rogosa et sont

capables de se développer à des pH plus élevés que ceux des *Lactobacillus* ssp. (Croissance possible jusqu'à pH 9,1) (Collins et al., 1987).

l'intérêt DES BACTERIES lactiques

L'utilisation des bactéries lactiques pour une application industrielle donnée (tableau 3) est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques qui recouvrent ces propriétés :

Table 2: exemples d'utilisation des bactéries lactiques en industrie alimentaire (d'après Romain, 2011).

Genre	Substrat	Exemples de produits
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	Laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	Lait, Viande, Végétaux, Céréales	Yaourts, lait s fermentés, kéfirs, fromages Saucissons secs, jambons secs Choucroute, olives, « yaourts » au lait de soja Pain au levain, bières
<i>Lactococcus</i>	Lait	Fromages, kéfirs
<i>Leuconostoc</i>	Végétaux, Lait	Choucroute, olives, vin Fromages, kéfirs
<i>Pediococcus</i>	Végétaux, Viande	Choucroute Saucisses semi-séchées
<i>Oenococcus</i>	Végétaux	Vin
<i>Streptococcus</i>	Lait	Yaourts, lait s fermentés, fromages

Activité acidifiante

En industrie laitière, on cherche le plus souvent des souches rapidement acidifiantes ; alors, trois critères sont à prendre en compte en l'occurrence : la quantité de lactate produite, la nature de l'acide produit (D, L ou DL) et la vitesse d'acidification qui est un critère important en technologie (le pH peut atteindre 4 à 4.5) (Luquet, 1994,).

Sur un autre substrat, comme exemple: dans la fabrication des produits carnés fermentés, la chute du pH due à la production d'acide lactique résulte de l'utilisation des

hydrates de carbone par les bactéries lactiques provenant des matières premières ou de l'environnement (**Papamanoli et al., 2003**). Cette acidification provoque la coagulation des protéines musculaires et induit ainsi à la fermeté, à la cohésion et au découpage facilité de la viande. En outre, l'accumulation des acides organiques produits inhibe la croissance des bactéries pathogènes et celle de la flore d'altération de la viande.

Activité protéolytique

En général, les bactéries lactiques ont une faible propriété protéolytique sur les protéines myofibrillaires (**Molly et al., 1997**). Toutefois, certaines souches de *Lb* participent à l'hydrolyse des protéines sarcoplasmiques et par conséquent, contribuent à la décomposition des peptides en acides aminés. Des peptidases issues de ces bactéries lactiques hydrolysent des oligopeptides et de ce fait, produisent les substances responsables de la flaveur et de la texture des produits fermentés (**Ho Thi Nguyet, 2008**).

Activité lipolytique

on trouve que dans le groupe des lactobacilles thermophiles, les activités lipolytiques de *Lb. delbrueckii ssp. lactis* et *Lb. acidophilus* sont supérieures à celles de *Lb. Delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Lb. helveticus*. et dans le groupe des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs : *Lb. casei* et *Lb. plantarum*, possèdent un système estérasique plus actif que les hétérofermentaires strictes : *Lb. brevis* et *Lb. fermentum* (**Talon et al., 2006**).

Activité antimicrobienne

Essentiellement les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactococcus*) et des Bifidobactéries qui sont connus pour posséder de telles activités grâce à leur capacité à produire lors de leur croissance des composés actifs ; à savoir, les acides organiques qui acidifient le milieu (lactate, acétate ..), des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H_2O_2), et des substances naturelles de nature protéique; douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes écosystèmes (**Vandervoorde et al., 1991; Annika et Marc, 2004 ; Herreros et al., 2005; Belal et al., 2011**).

Les acides organiques :

Parmi lesquels l'acide lactique et l'acide acétique et tous ceux causant la diminution du pH qui induit à une acidification du cytoplasme cellulaire (figure ci-dessous) ; en conséquence les flores acido-sensibles (exemple: *Pseudomonas*) sont inhibées. Cependant, un grand nombre de *Lactobacillus* produisent ces acides organiques (Annika.M.M et Marc.B, 2004).

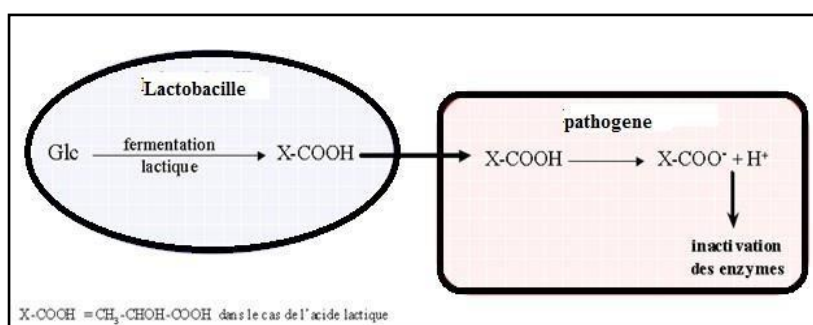


Figure 5: Mode d'action sur les pathogènes des acides organiques produits par les lactobacilles.

Le diacétyl et d'autres produits

Le diacétyl ($C_4H_6O_2$) un des composants aromatiques essentiels du beurre synthétisé par différents genres de bactéries lactiques il est produit suite à la dégradation du citrate, un composé inhibiteur à pH 5 plus actif contre les bactéries à Gram négatif, les levures et les champignons que contre les bactéries à Gram positif non lactiques pour les non lactiques (Jay, 1982; Smaoui, 2010) .

Le dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est produit par des bactéries lactiques hétéro-fermentaires. Il peut jouer un rôle dans la création d'un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylation enzymatique, il peut effectivement inhiber la croissance de nombreux germes d'altération et essentiellement les germes psychrotrophes à Gram négative (Smaoui, 2010).

Le peroxyde d'hydrogène

C'est un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques Vu qu'elles soient catalase négatif et certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose ou en microaérobiose ce qui induit l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines des cellules des différents microorganismes parmi en on cite *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas. spp*(**Ammor, 2004, Annika.M.M et Marc.B, 2004; Smaoui, 2010 ; Boumehira.Z, 2010**).

La production d'antibiotiques

Il existe aussi les antibactériens non peptidiques, parmi lesquels la reuterine produite par *Lactobacillus reuteri* : un antibiotique à large spectre, actif *vis-à-vis* des bactéries Gram- positives et Gram-négatives, des levures, des moisissures et des protozoaires. Il s'agit d'un dérivé du glycérol, le 3-hydroxypropionaldéhyde produit lors de la fermentation anaérobie de ce dernier (**Piard and Desmazeaud, 1991**).

La production des Bactériocines

Les bactériocines : un groupe hétérogène de molécules de nature protéique produites par synthèse ribosomique dotées d'un site actif et qui ont un pouvoir antimicrobien ;elles présentent une activité bactéricide ou bactériostatique contre les souches bactériennes phylogénétiquement proches à la souche productrice (**Piard et Desmazeaud, 1991; Muriane et Klaenhammer, 1991; Tomomi et al., 2009**) ; avec un large spectre d'activité contre les germes pathogènes gram positif et gram négatif(**Paulraj et al ., 2011**).

Il est établi que le point d'entrée de plusieurs bactériocines est les pores formés dans la membrane cytoplasmique des bactéries sensibles(**Alain, 2004**). D'autres bactériocines ne forment pas de pores mais interfèrent avec l'activité de certains enzymes des bactéries suspects. Plusieurs genres de bactéries lactiques y compris *Lactobacillus* (**klaenhammer, 1998**) *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Carnobacterium* produisent ces molécules. On a même caractérisé les bactériocines de plusieurs espèces comme : *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, et *Lb. plantarum*.

Activité antifongique

Vanne *et al.*,(2000) a démontré que la croissance de champignons toxinogènes était limitée *in vitro* par des bactéries lactiques par l'effet combiné entre l'acide lactique et des bactériocines(**Adebayo et Aderiye, 2010**). Le genre *Lactobacillus* qui avaient une activité antifongique efficace en produisant des substances comme l'acide phényllactique (en quantités inférieures à 7.5 mg/ml et l'acide 4-hydroxy-phényllactique isolés des souches de *Lb. plantarum* 21B. Ces substances ont montré une activité inhibitrice contre :*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium requeforti*, *Penicillium expansum*, *Fusarium graminearum* (**Doguiet et Denis,2010**). On a même noté l'effet des mêmes substances produites cette fois par la souche *Lb. plantarum* 20B contre *Aspergillus*, *Penicillium* et *Monilia* (**Kouakou et Philippe, 2011**).

Plusieurs applications de lactobacilles sont mises en évidence parmi lesquelles : l'affinage des fromages et la fabrication du yaourt en contribution avec l'acidification, l'aromatisation et l'amélioration de la Texture (**Saxer et al., 2013**).

**PARTIE III. LES
EXOPOLYSACCHARIDES
MICROBIENS**

Généralité

Les polysaccharides microbiens sont produits par une grande variété de microorganismes eucaryotes et procaryotes, mais les bactéries produisent la plus grande diversité de molécules et produisent plus souvent des quantités supérieures à 10 g/l, Les microorganismes producteurs n'utilisent pas les EPS bactériens comme sources d'énergie, les EPS microbiens se situent entre les composés les plus multifonctionnels et industriellement intéressants (**Sanlibaba et Çakmak, 2016**).

Les polysaccharides microbiens sont susceptibles à la biodégradation dans la nature et sont moins nocifs pour l'environnement que les polymères synthétiques, cela contribue à leur respect de l'environnement dans les applications industrielles, ainsi que dans l'élimination des eaux usées ou dans l'environnement (**Shailesh et al., 2016**).

Parmi les différentes bactéries productrices d'EPS, les bactéries lactiques ont acquis une attention particulière. Les bactéries lactiques sont généralement reconnue comme microorganismes sans danger (GRAS) ainsi que leurs capacités à produire les EPS ont une grande diversité de structures sans risque pour la santé (**Sanlibaba et Çakmak, 2016**).

Classification des EPS des bactéries lactiques

Fondamentalement, en fonction de la composition des unités répétitives et voie de biosynthèse, les EPS peuvent être classés en deux classes homopolysaccharides ou des hétéropolysaccharides (**figure 2**) (**Mishra et Jha, 2013**).

La masse moléculaire des hétéropolysaccharides varie de 10^4 à 10^6 Da, généralement inférieure à la masse moléculaire moyenne de homopolysaccharides (jusqu'à environ 10^7 Da) (**Sanlibaba et Çakmak, 2016**).

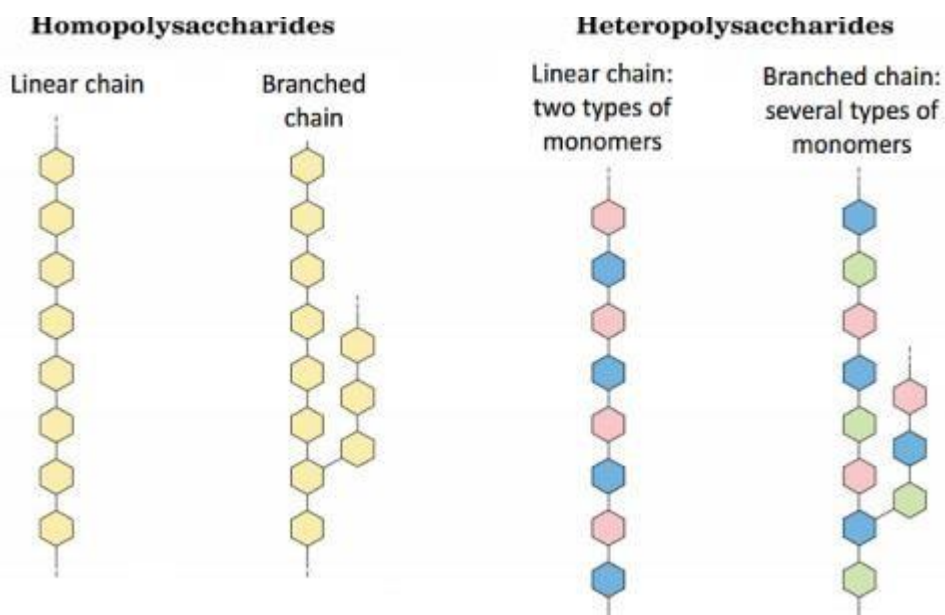


Figure 6: Représentatif des homo et hétéropolysaccharides (Sanlibaba et Çakmak, 2016).

Les homopolysaccharides et hétéropolysaccharides respectivement diffèrent également par le nombre des enzymes et l'organisation des gènes impliqués dans leur synthèse.

Enfin, en fonction des substituants présents dans les unités répétitives d'hétéropolysaccharides, il y a des polymères chargés ou neutres, ce dernier est appelée « zwitterionique ».

Les EPS se caractérisent d'avoir à la fois des radicaux chargés positivement (par exemple amine libre) ou chargés négativement (par exemple, des phosphates ou des carboxylates) dans leurs unités répétitives (Hidalgo-Cantabrana et al., 2012).

Homopolysaccharides

Les homopolysaccharides contiennent un seul type de monosaccharide synthétisé par conversion de substrats extracellulaires par des enzymes sécrétées, par exemple, la dextranase, la lévansucrase (Jolly et al., 2002) composé de quatre sous-groupes différents (α -D-Glucans, β -D-glucanes, fructanes et autres).

- Les α -D-glucanes sont plus répandus chez les bactéries lactiques et sont produits par des souches appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* (Werning et al., 2012). Selon les liaisons de la chaîne principale, les α -glucanes sont subdivisés en dextrans (α -1,6) sont principalement constitués de

monomères de glucose liés en α -1,6 avec diverses chaînes ramifiées en position 3, mais parfois en positions 2 et 4 avec une probabilité relativement plus faible tels que les EPS de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et *dextranicum* (Hongpattarakere et al., 2012), mutan (α -1,3), glucanes (α 1,2), reutérans (α -1,4) et alternans (α -1,3 et α -1,6) (Werning et al., 2012).

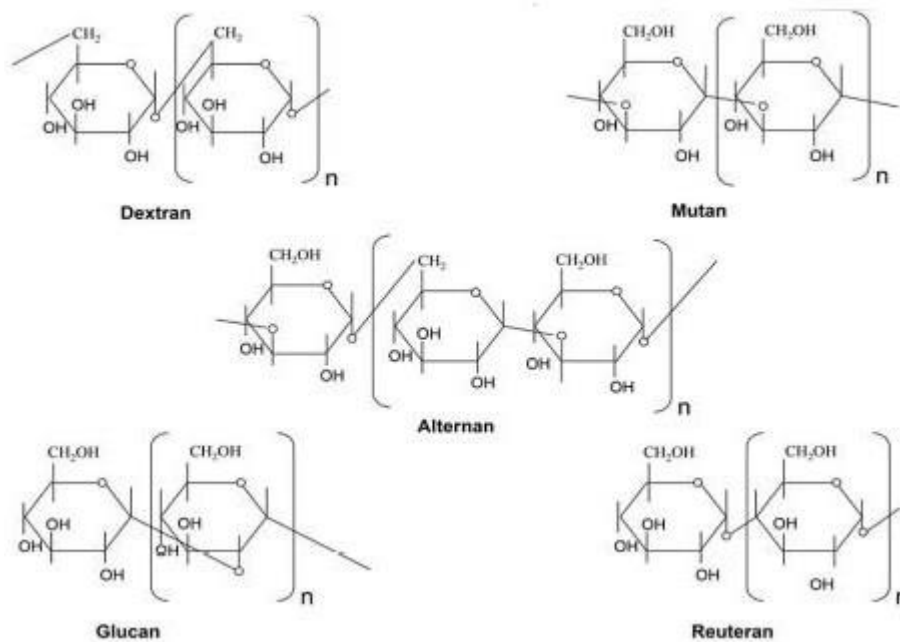


Figure 7: Représentation schématique des unités répétitives de: dextran, mutan, alternan, glucan et reuteran (Werning et al., 2012).

- β -D-glucanes constitués de monomères de glucose liés en β -1,3 avec des chaînes ramifiées en β -1,2, tels que les EPS de *Pediococcus* spp. et *Streptococcus* spp (Hongpattarakere et al., 2012).

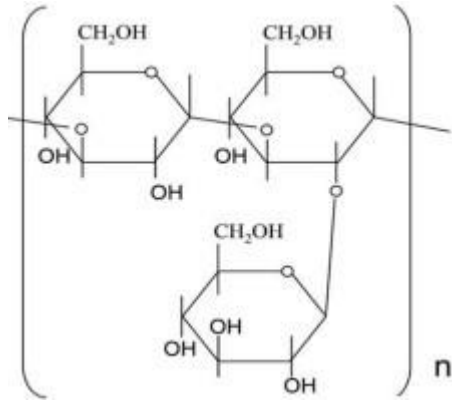


Figure 8: Représentation schématique des unités répétitives de β -(1,3-1,2)-D-glucan of *P. parvulus* (Werning et al., 2012).

- Les fructane peuvent être classées en : type levane : β -D-Fructose(2,6), le type Inuline : β -D-Fructose (2,1) toutes deux synthétisées par différentes espèces des genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Weissella*. (Sanlibaba et Çakmak, 2016; Werning et al., 2012). D'autre comme le polygalactane : Galactose produit par des souche *Lb. lactis* (Badel et al., 2011).

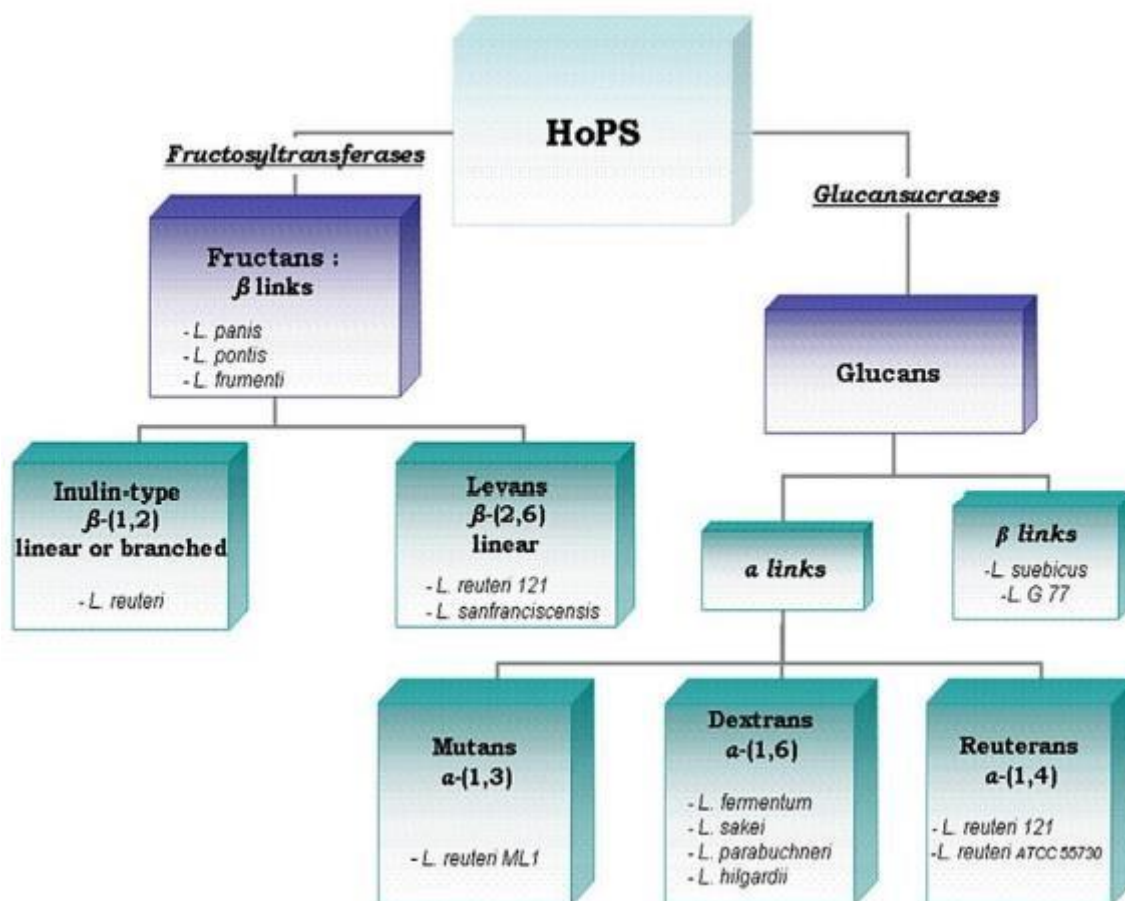


Figure 9: Classification des homopolysaccharides produits par *Lactobacillus* sp (Badel et al., 2011).

Table 3: Homopolysaccharides produits par les bactéries lactiques (Sanlibaba et Çakmak, 2016).

EPS		Souches
α-D-glucans	Dextra	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
		<i>subsp. mesenteroides</i>
	Mutan	<i>Streptococcus mutans</i>
		<i>Streptococcus sobrinus</i>
	Altarnen	<i>Leuconostoc mensenteroides</i>
	Reuteran	<i>Lactobacillus reuteri</i>

β-glucans		<i>Pediococcus ssp.</i>
		<i>Streptococcus ssp</i>
Fructan	Levans	<i>Streptococcus salivarius</i>
	Inulin-type	<i>Streptococcus mutans</i>
		<i>Leuconostoc citreum</i>
Polygalctan		<i>Lactobacillus reuteri</i>
		<i>Lactococcus lactis subsp.lactis H414</i>
		<i>Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus(CRI 406 and 142)</i>

Hétéropolysaccharides

Les hétéropolysaccharides comprennent des unités répétitives de différents monosaccharides dont le nombre d'unités varie entre tri et octasaccharides (**Hongpattarakere et al., 2012**).

Leur composition, beaucoup plus diversifiée que celle des homopolysaccharides, inclue des oses neutres (D-glucose, D-galactose, L-rhamnose), acides (acide glucuronique, acide galacturonique, etc.) ou encore des amines (N-acétyl-D-glucosamine, N-acétyl-D-galactosamine). Ils sont par ailleurs fréquemment sujets à des additions de substituants organiques (Exemples : acides aminés, pyruvate) ou inorganiques (Exemples : sulfate, phosphate) qui leur confèrent des propriétés physiques et biologiques supplémentaires et augmentent leur diversité (**Sanlibaba et Çakmak, 2016**).

Rôle des EPS dans la cellule procaryote

Les EPS sont une composante importante des systèmes biologiques, bénéfiques pour les organismes qui les produisent, car ils remplissent diverses fonctions :

- Les EPS protègent les microorganismes en tant que barrière physique, leur production est une réponse directe aux pressions environnementales sélectives, y compris le stress osmotique, la température, pH, pression et intensité lumineuse. En cas d'espèces acidophiles ou de thermophiles et des Archaea, les EPS aident à l'adaptation aux conditions extrêmes (**Kambourova et al., 2015**).

La capacité d'un microorganisme à s'en tourer d'une couche exopolysaccharidique hautement hydratée peut lui fournir une protection contre la dessiccation et ceci menant à la survie dans les régions déficientes en eau (**Kambourova et al., 2015; Suresh Kumar et al., 2007**).

- Le glycocalyx est principalement composé d'EPS, est essentiel pour la formation d'un biofilm. La formation de biofilms occupe une place importante dans l'adaptation des bactéries aux conditions physico-chimiques de l'environnement et favorise l'association de différentes espèces microbiennes, comme dans le cas de la muqueuse intestinale de plus une fois associé au biofilm, les produits métaboliques d'une espèce peuvent servir de substrats pour processus métaboliques d'une autre espèce.

Ce biofilm confère une protection contre les forces mécaniques, les antibiotiques et les composés antimicrobiens (notamment lors du nettoyage) et la prédation par protozoaires (**Badel et al., 2011; Caggianiello et al., 2016; Donot et al., 2012**).

- Un autre avantage est indirect, en effet, les polysaccharides facilitent la communication entre les cellules, car ils agrègent les bactéries et réduisent les distances entre les cellules (**Badel et al., 2011**).

Les applications des exo polysaccharides :

L'activité biologiques des EPS permet l'utilisation dans différents secteurs

Activité antioxydante

Les EPSS jouent également un rôle d'antioxydants car ils sont capables de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Nampoothiri et al., 2017**). L'activité antioxydante de l'EPSS peut être due à la présence d'un groupe hydroxyle et d'autres groupes fonctionnels dans les EPS, qui peuvent donner des électrons pour réduire les radicaux à une forme plus stable, ou pour réagir avec les radicaux libres pour mettre fin à la réaction radicalaire en chaîne (**Silva et al., 2019**).

Activité anti-inflammatoire

Les fucanes sont des polysaccharides sulfatés présents dans la matrice intercellulaire des algues brunes Phaeophyceae. In vitro, ces polysaccharides induisent l'agrégation plaquettaire. Certains fucanes sont anti-inflammatoire et plusieurs fucanes présentent également des potentialités anti-tumorales (BRUNETON., 2009).

Activité immunomodulatrice

Un agent immunomodulateur permet de stimuler ou d'inhiber divers acteurs du système immunitaire et de prévenir des maladies infectieuses ou cancéreuses. L'une des nouvelles tendances de la recherche dans le développement d'agents immunomodulateurs est l'identification de produits naturels présentant une toxicité faible ou tolérable dans les applications cliniques (HUANG et al., 2014).

Plusieurs polysaccharides d'origine fongique sont capables de stimuler simultanément les différentes composantes du système immunitaire, ce qui leur confère différentes propriétés thérapeutiques, notamment des propriétés antitumorales et anti-inflammatoires. Pour cette raison, ils sont appelés immunomodulateurs, immunostimulateurs ou modificateurs de la réponse biologique (SANCHEZ., 2006).

Puisque les polysaccharides, y compris les 3 glucanes, ne peuvent pénétrer dans les cellules en raison de leur grande taille moléculaire, Ils exercent leur action en se liant à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules Immunes telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules cytotoxiques naturelles (NK) et les lymphocytes T (DJABALI et al, 2016).

Parmi ces récepteurs, le CR3, un des plus importants récepteurs membranaires chez les phagocytes impliqués dans la reconnaissance des pathogènes, a été identifié comme un des récepteurs des β -glucanes.

L'affinité différentielle montrée par les récepteurs vis-à-vis les différents β -glucanes varie en fonction du poids moléculaire, de la conformation acquise en solution, ainsi que du degré de ramification de ces molécules. Cette affinité différentielle affecte de manière significative leur activité immunomodulatrice (SANCHEZ, 2006).

Les polysaccharides sulfatés, y compris ceux provenant d'algues, possèdent des activités immunomodulatrices qui peuvent être utiles pour stimuler la réponse

immunitaire ou contrôler l'activité des cellules immunitaires pour atténuer les effets négatifs associés tels que l'inflammation. Les polysaccharides sulfatés peuvent affecter plusieurs cibles dans les systèmes immunitaire et inflammatoire qui peuvent avoir un impact sur la progression de la maladie et les résultats, y compris la progression tumorale et la métastase (JAIO et al., 2011).

Activité antivirale

Les maladies infectieuses virales mettent gravement en danger la santé humaine. Dans la recherche de médicaments antiviraux efficaces, les chercheurs ont trouvé que les polysaccharides ont une bonne activité antivirale. En tant que composant antiviral efficace et peu toxique, les polysaccharides ont de larges perspectives d'utilisation médicinale et méritent d'être étudiées plus avant (CHEN et HUGAN, 2018).

Applications de l'EPSS dans les denrées alimentaires.

Les EPS microbiens ont des effets fonctionnels dans la transformation des aliments en raison de leur interaction avec les composants alimentaires, ce qui peut se traduire par l'amélioration des propriétés rhéologiques et sensorielles des aliments. L'EPSS peut agir comme texturants, stabilisants, viscosifiants, bio-épaississants ou émulsifiants, selon la température, le pH et la force ionique du milieu (Angelin & Kavitha, 2020 ; Korcz & Varga, 2021).

L'EPS peut modifier les propriétés viscoélastiques des aliments de différentes manières (Korcz & Varga, 2021).

Les exopolysaccharides du LAB ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leurs applications industrielles potentielles, notamment ceux formés in situ. Ils peuvent être utilisés pour remplacer ou réduire l'utilisation d'hydrocolloïdes externes, car ils lient l'eau et retiennent l'humidité dans le produit (Lynch et al., 2018).

Il existe deux phénotypes possibles de souches productrices d'EPS : filants ou non filants. Ceux-ci sont définis en fonction du fait que les EPSS sont libérés dans le milieu sous forme d'EPSS libres (fEPS) ou restent attachés à la paroi cellulaire bactérienne sous forme d'EPSS capsulaire (CEPS), respectivement. Certains résultats

indiquent que les deux, fEPSS Et cEPSS, peuvent contribuer à améliorer la viscosité, l'onctuosité, la résistance au cisaillement ou la capacité de rétention d'eau.

Cependant, la viscosité apparente des cultures filantes est supérieure à celle des cultures non filantes (Mende et al., 2016 ; Zei dan et al., 2017). Cirrincione et al. (2018) ont rapporté que les souches filantes confèrent une consistance plus lisse et une viscosité plus élevée que les souches non filantes dans les produits laitiers fermentés. De plus, l'utilité de l'EPSS en tant que modificateurs de viscosité améliore la perception du goût du produit en lui permettant de persister plus longtemps dans la bouche (Nam poothiri et al., 2017).

La composition en sucre, la longueur de la chaîne, les liaisons entre les sucres, la fréquence de ramification et la masse moléculaire affectent les propriétés technologiques de l'EPSS (Abid et al., 2018 ; Silva et al., 2019).

La relation entre la structure et la fonction des EPSS n'a pas encore été entièrement comprise, en raison de leur complexité et de la difficulté de leur analyse structurale (Riaz Rajoka et al., 2020). La contribution des EPS aux propriétés des produits alimentaires dépend des propriétés des EPS et des interactions des EPS avec les composants alimentaires, notamment les protéines (Kleerebezem et al., 1999). De plus, plusieurs études indiquent que les EPS influencent la rhéologie et la texture des produits fermentés à des concentrations extrêmement faibles par rapport aux autres épaississants (Zarour et al., 2017).

Un autre aspect à prendre en compte est la méthode de production et d'utilisation de l'EPSS.

A l'heure actuelle, les polysaccharides microbiens ne représentent qu'une petite fraction du marché actuel des biopolymères, car la connaissance de leur biosynthèse fait encore défaut, ainsi qu'une technologie de bioprocédés appropriée (De Vuyst & Degeest, 1999).

Cependant, dans des conditions de croissance contrôlées, il est possible d'augmenter la production d'EPSS (Cirrincione et al., 2018). En fait, il a été rapporté que les souches de *Lactobacillus plantarum* peuvent produire entre 450 et 515 mg L⁻¹ dans des conditions optimales (Aarti & Khusro, 2019 ; Midik et al., 2020).

Applications de l'EPS dans les produits de boulangerie

L'effet positif des EPS sur les produits de boulangerie est basé sur leur capacité à lier l'eau et à former un réseau avec différents composants de la pâte. Ainsi, les EPS peuvent améliorer la rhéologie, la structure et le volume du pain, entraînant une diminution des taux de rassissement et une durée de conservation prolongée (Korcz & Varga, 2021).

L'incorporation de levain lors de la cuisson du pain a des répercussions sur sa texture et ses propriétés sensorielles (Casado et al., 2017). Les écosystèmes du levain sont caractérisés par des associations stables de levures et de BAL, en particulier de lactobacilles (De Vuyst et al., 2014). L'une des principales activités métaboliques des espèces LAB du levain est la production d'EPS qui peuvent affecter les propriétés viscoélastiques, la texture et les propriétés technologiques du levain ainsi que la texture et durée de conservation du pain (Ispirli et al., 2020 ; Riaz Rajoka et al., 2020).

Sur le plan technologique, les effets bénéfiques de l'EPS sur la pâte et le pain sont les suivants :

- (i) Une plus grande absorption d'eau par la pâte,
- (ii) Une meilleure rhéologie et machinabilité de la pâte,
- (iii) Le maintien de la structure du pain,
- (iv) Un volume de pain plus important et
- (v) Augmentation de la douceur de la mie et retard du rassissement du pain, entraînant une durée de conservation plus longue (Tieking & Gänzle, 2005).

Les perspectives futures se concentrent sur l'utilisation de l'EPS de LAB pour la production de pain sans gluten, puisque l'EPS peut potentiellement agir comme des hydrocolloïdes améliorant leurs propriétés rhéologiques (Torino et al., 2015). Le gluten est la principale protéine structurante de la farine et, en raison de son rôle majeur dans la détermination des propriétés viscoélastiques de la pâte, il apporte une contribution certaine à l'apparence, à la texture, à la structure de la mie et à la sensation en bouche du produit cuit final.

Les produits sans gluten se caractérisent par une faible absorption d'eau, des changements dans les caractéristiques de la mie, une diminution du volume du pain et une mauvaise stabilité.

Ces défauts peuvent être éliminés en ajoutant du LAB EPSS à une pâte au levain sans gluten (Lynch et al., 2018a). L'effet bénéfique des EPSS sur le pain est basé sur leur

capacité à former un réseau avec d'autres composants de la pâte et à améliorer la durée de conservation en raison de la propriété de rétention d'eau (Xu et al., 2019).

La production in situ d'EPSS pourrait remplacer le gluten, permettant de produire du pain sans gluten avec des propriétés sensorielles acceptables (Lynch et al., 2018a). Des recherches récentes ont montré la possibilité d'améliorer la qualité du pain sans gluten grâce aux EPS produisant des souches de *Lactobacillus reuteri* et par conséquent, certains EPSS peuvent réduire le besoin d'utiliser des polysaccharides hydrocolloïdaux coûteux dans l'industrie de la boulangerie (Daba et al., 2021).

Applications de l'EPS dans les produits à base de viande fermentée

Les exopolysaccharides produits par LAB sur les produits carnés ont été généralement considérés comme des facteurs de détérioration et leurs applications potentielles dans la viande transformée restent inexplorées (Prechtl et al., 2018).

Dertli et al. (2016) ont découvert que l'EPS pouvait améliorer les propriétés texturales des saucisses, en fournissant un produit plus dur, moins adhésif et plus résistant.

Loeffler et al. (2020) ont examiné l'utilisation de LAB formant des EPS in situ dans les produits carnés, décrivant leur rôle positif dans différentes matrices de viande, telles que les saucisses fermentées à faible teneur en matières grasses. Korcz & Varga (2021) ont rapporté que l'EPSS formé in situ a influencé la qualité des produits de viande fermentés, ce qui élargit sans aucun doute les possibilités de leur application, en particulier dans les produits de viande allégés, puisque leur consommation est actuellement en croissance.

Ainsi, plusieurs études ont montré que la production d'EPS par LAB peut trouver une application pour améliorer la texture des produits carnés, notamment ceux à faible teneur en matières grasses. Cependant, pour garantir leur qualité, la concentration d'EPS dans le produit carné doit se situer dans une fourchette bien définie (Loeffler et al., 2020).

PARTIE IV. MATERIEL ET METHODES

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université Dr Moulay Tahar Saida, durant la période février -Mai2022.

Echantillonnage

Préparation des échantillons

IV Légumes fermentés

Carotte, betterave, olives ont été choisis pour la Lacto Fermentation, on a pesé 200g de chaque produit après les rincées deux fois pour se débarrasser des restes de sol, puis on a découpé en petits morceaux ; en suite une préparation d'une saumure avec 4% de sel dans de l'eau est effectuée. Pour assurer l'anaérobiose des pots à fermeture hermétique (couvercle avec joint en caoutchouc) été choisi pour mettre les légumes dedans ; alors on verse la saumure à condition qu'ils sont submergés pour créer un environnement sans O₂.

Les pots ont été déposés au laboratoire à une température entre 15-20 ° C.

La fermentation à durer 6 semaines.

V Blé fermenté

La préparation des échantillons a été faite selon la méthode de **Merabti, 2015** ou la préparation des blé fermenté été sur des bocaux en verre de 250g ; chaque bocal est rempli par 150g de Blé +100ml d'eau minérale contenant 3.75ml de vinaigre de 5°, en scellant les bocaux pour créer l'anaérobiose et en incubant à l'abri de la lumière. La température de laboratoire.



Figure 10: lacto fermentation des aliments (blé, betterave, carotte, olive)

Screening des souches productrices d'EPS:

La stratégie adoptée pour isoler des souches lactique productrice des EPS été par l'utilisation d'un milieu sélective qui est MRS rouge congo (MRS_{RC}) et MSE (annexe 01).

L'observation du phénotype des colonies représente la première ligne de sélection des souches ;

- ✓ **Sur Milieu MRS_{RC}** des colonies apparaissent noire et marron considérées comme productrice d'EPS ; colonie rouge considérées comme non productrice EPS,
- ✓ **Sur milieu MSE** Les souches productrices d'EPS forment des colonies brillantes, bombées et visqueuses ; on dit alors qu'elles ont un phénotype mucoïde (**Dupont, 1998**). L'une des caractéristiques de ce phénotype est que lorsque l'on touche et étire la colonie avec un cure-dent, celle-ci forme un long filament.

IV Préparation des dilutions décimale

Une solution mère a été préparée par l'ajout de 10g de chaque échantillon choisi dans 90ml d'eau physiologique stérile (**Ulacio et al., 1997**) puis le mélange a été haché par un hachoir plongeant pendant 1min maximum , ensuite une série de dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10^{-5} (figure 10), chaque dilution subit une homogénéisation par agitation (**Boulal et al., 2017**).



Figure 11: les dilutions décimales préparé

Isolement été réalisée par l'ensemencement en surface ; les boites ont été incubé à 30°C pendant 48h.

V Purification

La purification des souches isolées a été réalisée par repiquages alternés et successifs sur milieux MRS (bouillon /gélose) jusqu'à l'obtention de colonies bien séparé.

La pureté des souches est révélée par la présence sur gélose de colonies homogènes ayant le même aspect, la même couleur, la même taille et la même forme (**Heleni et al ., 2006; Guiraud., 2004**) puis la vérification a été réalisée par l'étude macroscopique et microscopique.

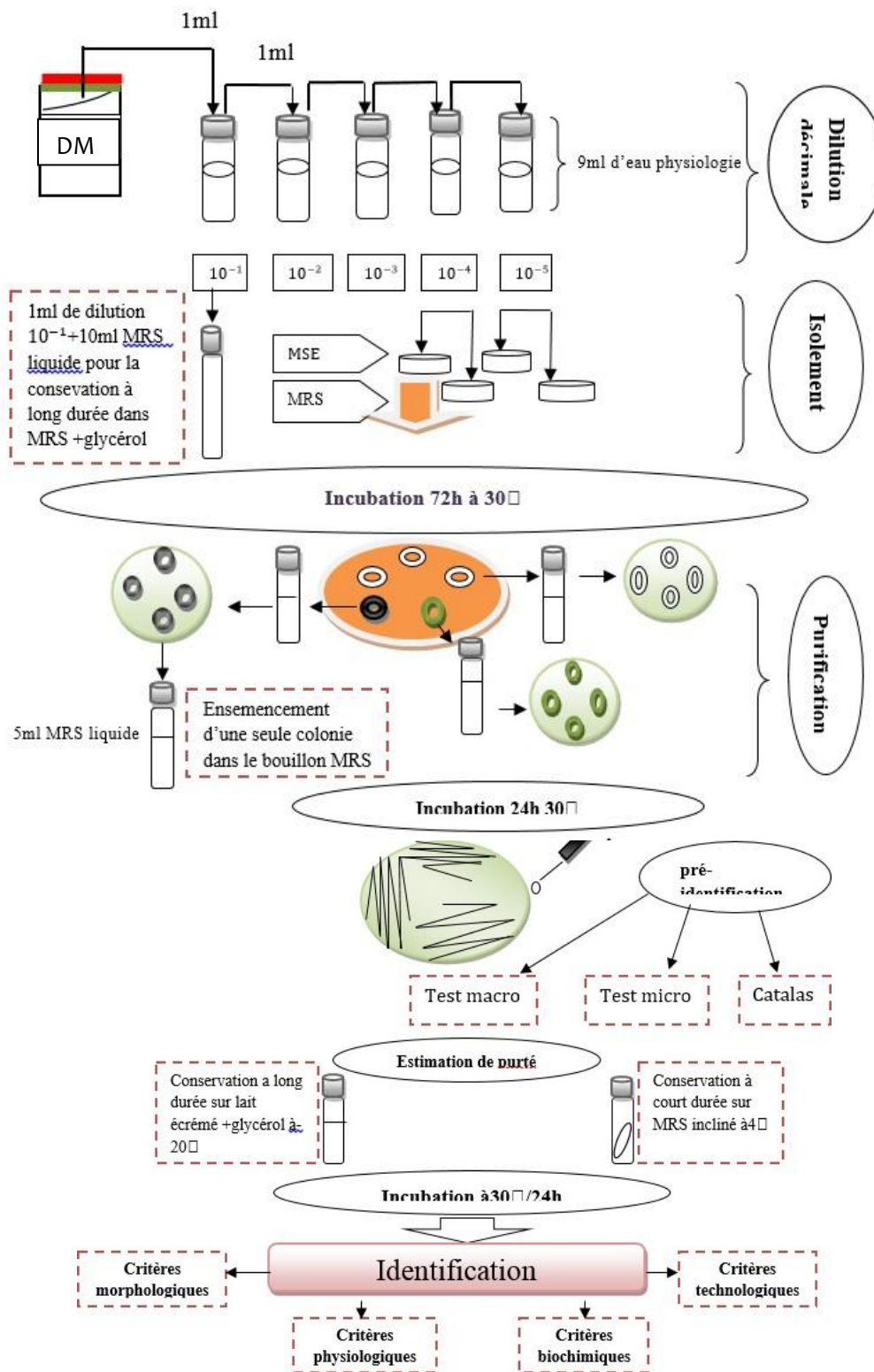


Figure 12 : schéma récapitulative de screening jusqu'à la conservation

VI Pré identification

Après purification, les isolats sont pré-identifiés en se basant sur différents caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques (**Mostefaoui et al., 2014; Badis et al., 2005; Zidani; 2015; Bai et al., 2016; Sandes et al., 2017**)

Examen macroscopique

Ce test est basé sur l'observation visuelle des colonies cultivées sur boîtes de Petrie afin de déterminer leur taille, leur forme et leur couleur (aspect macroscopique).

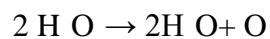
Examen microscopique

L'aspect microscopique est révélé par l'intermédiaire de la coloration de Gram (Annexe 2), elle permet de différencier les bactéries à Gram + de celles à Gram -, les bâtonnets des coques ainsi que la détermination du mode de regroupement

Tests physiologiques et biochimiques

✓ Recherche de la catalase

L'activité catalytique est mise en évidence en émulsionnant sur une lame la culture bactérienne à tester dans une solution d'eau oxygénée. La présence d'une catalase se manifeste par l'apparition de bulles abondantes d'oxygène.



Les bactéries à Gram + et à catalase négatif ont été considérées comme des bactéries lactiques présomptives (**Silva et al., 2017**).

✓ Type fermentaire

Ce test permet la distinction entre les bactéries lactiques homofermentaire et hétérofermentaire, grâce à la production de gaz (CO₂).

L'ensemencement des souches à tester s'effectue dans un milieu liquide MRS sans glucose et sans l'extraire de viande avec une cloche du Durham, mis à incubé à 30°C ; les tubes sont observés dans un délai de 48h en fonction de l'aspect du milieu (trouble) et la production de gaz (**Garvie, 1984 ; Schilinger et Lücke, 1989**).

Identification par galerie Api 50

IV.3.3.4.1. Préparation de galerie

On a utilisé une seule galerie pour l'identification de l'isolats B1 cette galerie est constituer de 5 bande comprenant chacune 10 tubes numérotés.

Préparer une boîte incubation

Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

Répartir environ 10ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.

Sortir les bandes de leur emballage, séparer en deux les bandes 0-19 et 20-39 et les déposer dans le fond de la boîte d'incubation

Compéter la galerie avec la bande 40-49

IV.3.3.4.2. Préparation de l'inoculum

Cultiver les bactéries sur un milieu adapté à sa croissance

Après 24h d'incubation, la culture est récupérée par centrifugation à 4000rpm/mm pendant 10mn, le culot est rincé 2 fois à l'eau physiologique stérile.

Préparer l'inoculum dans le milieu API50CH.

Inoculation des galeries

Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes

- Incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation
- Eviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur côté de la cupule.
- Après l'inoculation, les cupules sont remplies avec de l'huile de paraffine stérile.
- Incuber la galerie à la température optimum de croissance de bactéries étudiées.

Durant la période d'incubation, la fermentation des sucres est indiquée par une couleur jaune exceptée pour l'esculine (brun foncé). Les résultats sont lus à 24h et vérifiés après 48h d'incubation.

L'interprétation des résultats peut se faire par le site <http://lab.upbm.org/> pour identifier les bactéries lactiques.

VII Conservation des isolates:

Conservation à court terme :

Les bactéries lactiques sont ensemencées sur gélose MRS incliné en tube. Après incubation à 30 °C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à 4°C. Les repiquages se font toutes les trois ou quatre semaines (**Badis et al., 2004**).

Conservation à long terme:

A partir des cultures jeunes (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes eppendorf à -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0,5% d'extrait de levure, avant utilisation (**Saidi et al., 2004**). Le protocole réalisé est représenté par la (Figure suivante).

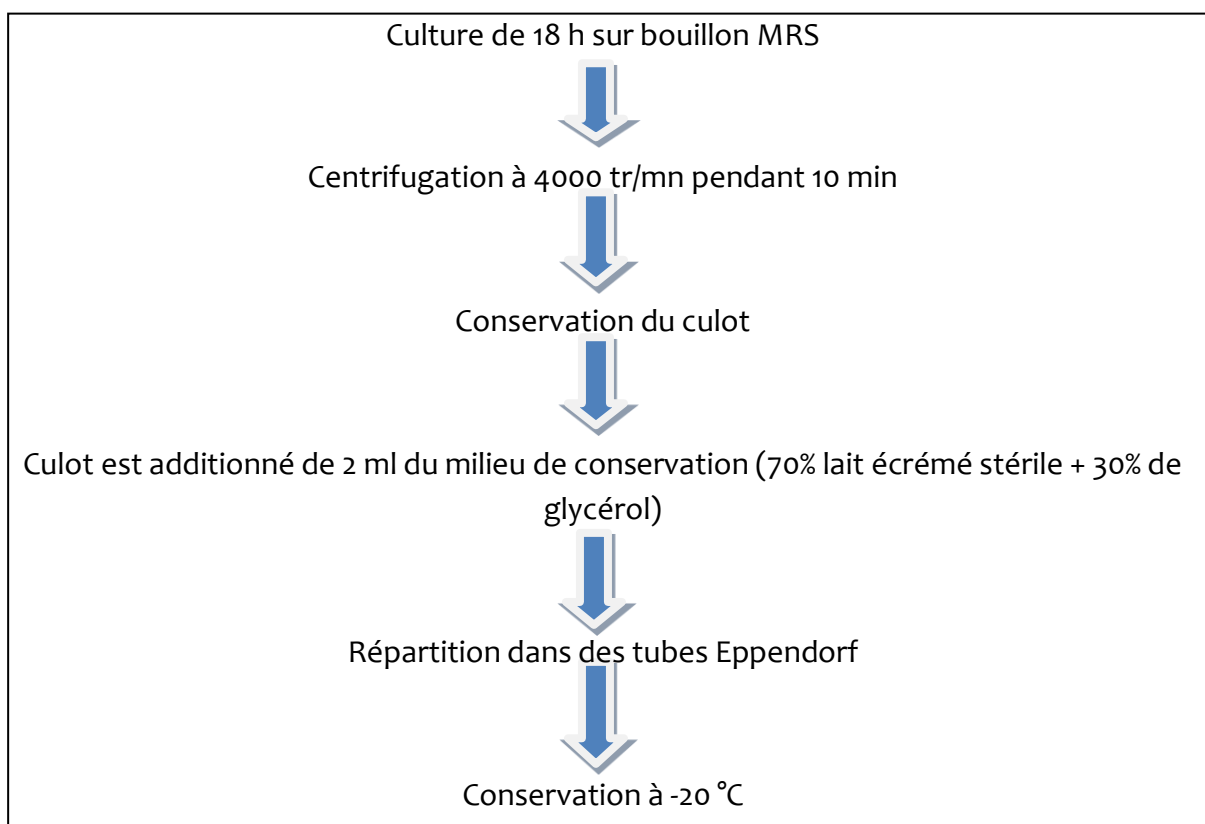


Figure 13: schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées (**Saidi et al., 2002**).

IV .3.4.2 Formation des biofilms

Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm in vitro ont été établies, tel que la méthode quantitative et qualitative de la microplaque 96puits (**Freeman et al.1989 ; Mathuret al., 2006**)

A partir d'une culture jeune de 18 h à 30°C dans le milieu MRS liquide.

Les puits d'une microplaque de 96 puits (polystyrène) sont inoculés avec 0.1ml de suspension diluée de bactéries à laquelle sont ajoutés 0,1ml de différents milieux MRS (MRS, MRS à 5%, 10%, 20% et 25% saccharose).

Les microplaques sont incubées pendant 24 heures à 30°C. Les puits sont lavés trois fois avec 0,2 ml de l'eau physiologique stérile afin d'éliminer les bactéries libres (Planctoniques). Après Ajouter l'alcool pendant 5 minutes fixé le biofilm formé puis laver, Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec du cristal violet (0,1%) (**Stepanovic et al., 2000**).

L'excès de colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée et les plaques sont laissées pour le séchage, la formation de biofilm se manifeste par un dépôt violet (**Hola etRuzicka, 2011**).

IV .3.6. Extraction des EPS

Parmi 17isolats, que Trois '03' souches ont été choisis pour l'étude de l'activité antioxydant, antimicrobienne et émulsifiante des extractions d'EPS.

Des cultures jeunes standardisés (10%) incubé a 30°C /48h, l'ajout (en complétant) TCA Acide Triclorid Acetic 4% puis homogénéisation de suspension pendant 30min.

L'extraction a été réalisée selon **Ismail et al, (2003)** ; 30ml de suspension a été centrifugée a15000 rpm pendant 15min, à4°C les surnageant ont été récupéré sur lesquels on a ajouté deux volumes d'éthanol frais à 95° puis on laisse précipiter à4°C toute la nuit. Les précipités récupérés sur des eppendorfs après centrifugation 6000rpm pendant 20min. on ajoute 2ml d'eau distillé stérile puis conservé à 4°C

IV .3.7. Quantification des EPS par la méthode du phenol-sulfurique

La quantification des glucides peut se faire par des méthodes colorimétriques dont souvent on utilise la méthode du phénol-acide sulfurique, qui repose sur le traçage d'une courbe d'étalon (tableau3)à partie des dilutions réalisées d'une solution de stock 'ou le glucose est le standard (0.1gr/l)).

Dans des tubes à essai, 40µl de phénol (80%) et 2 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) sont additionnés à800 µl d'échantillon (solution d'EPS). Les tubes sont maintenus en obscurité pendant une demi-heure à la température ambiante, après 30 minutes la

densité optique est mesurée à 490 nm (BIBBY Anadéo) contre un blanc dans lequel 800 µl d'eau distillée remplace la solution d'EPS (Dubois et al., 1956).

Table 4 : préparation des dilutions de glucose

Solution de glucose 0.1g/l (ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Eau distillée (ml)	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Glucose g / l (ml)	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1

IV .3.8. Activité amylolytique

Les souches de Lactobacillus B11, Lb B12 et Lb MB2 étudiées ont été ensemencées par touche sur une gélose MRS_{amidon} dans laquelle le glucose a été remplacé par 2 % (p/v) d'amidon soluble et incubée à 30 °C pendant 72 h.

La mise en évidence de l'activité de l'amylase est effectuée par l'inondation de la surface de la gélose avec une solution de lugol. Une lecture positive de la production de l'amylase se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie ensemencée. Les diamètres des zones d'hydrolyses de l'amidon formés sont mesurés pour la sélection des souches productrices de l'amylase (Fossi et al., 2009 ; Tatsinkou et al., 2005).

IV .3.9. Activité antioxydante

L'activité de scavening des radicaux libres de l'EPS a été mesurée par DPPH (Pieniz et al., 2014). Brièvement, un volume de 0,8 ml de solution de DPPH (0,1 mg/ml dans du méthanol à 95 %) a été mélangé avec 0,2 ml des EPS et incubé à l'obscurité pendant 30 minutes. Les échantillons ont ensuite été mesurés à 517 nm. Acide ascorbique (10mg/ml) a été utilisé comme témoin positif. L'activité antioxydante a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\%Activité = \frac{(A_0 - A)}{A_0} * 100$$

A₀ : l'absorbance du blanc de réactif (vit C)

A : l'absorbance des échantillons d'EPS

% Activité : pourcentage d'activité antioxydante

IV .3.10. Activité d'émulsification

Les émulsions ont été préparées avec 1.5ml d'une des huiles (huile de coco vierge, huile d'arachide, huile d'olive et huile de moutarde) et 1.5 ml suspension EPS dans un tube en verre à bouchon à vis (100 13 mm) et vortex pendant 20 min à 40 Hz selon la méthode expliquée par **Freitas et al. (2009)**. L'activité émulsifiante (EA) a été déterminée après 1, 24 et 48 h pour les EPS des isolats (BI1, BI2et MB2-5) 1.5ml de suspension EPS

$$\% \text{ l'index d'émulsion} = \frac{\text{hauteure de la couches emulsion}}{\text{hauteur de la mélange}} * 100$$

IV .3.11. Test antimicrobien

La méthode de Barefoot et **Kaenhammer, 1983** a été choisi dans laquelle des puits de 5 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce (cloche de durham) sur la gélose nutritive inoculé par la souche indicatrice (pathogène) et seront remplies avec 100 µl du surnageant de culture et EPS de chaque culture. Les boîtes de petri sont mises à une température de +4°C/4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (**Doumandji et al., 2010**). Les boites sont incubées à 37°C et la présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 24h d'incubation (**Hwanhlem et al., 2011**).

PARTIE V. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats d'analyse des activités biologiques des extraits bruts des exopolysaccharides des bactéries lactiques isolées à partir des légumes et blé fermenté sont développés dans ce chapitre.

Les ferments lactiques, contenant une ou plusieurs cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques, sont largement utilisés en agroalimentaire (Holzapfel, 2002). Pour cela nous sommes choisies les légumes et blé fermenté pour notre isolement des bactéries lactique.

V .1. Echantillon

L'analyse microbiologique été entamé après vingt jours de fermentation.

Une fois les buccaux ont été ouvert, on observe que à la surface des trois buccaux contenant les échantillons de Blé; des graines de blé commençant à germer par la libération des radicules, en plus la surface du boites été couverte par une couche blanche avec une texture laineuse, au sous de ce dernier on trouve une matière visqueux blanc et un peu noire (figure 14).

Tandis que ; on observe que le cinquième bocal, ne possèdent pas une couche de moisissure ni des graines germer ce qu'on a observé que les grains ont été humide, plus aux moins grande avec un changement de couleur (devienne plus foncée).

Dans ce cas la , le cinquième bucal été choisi pour l'isolement des bactéries lactique productrice d' EPS, puisque les trois buccaux été moisi avec germination des graine ; donc pas de condition d'anérobiose , la présence d'oxygéné été claire.



Figure 14: l'aspect des échantillons moisi



Figure 15 : les boîtes de blé après 20 jours de fermentation lactique.



Figure 16: les légumes après 43 jours (17/01/2022 à 27/02/2022) de fermentation lactique

Concernant la fermentation lactique des légumes pendant 43 jours sur les boîtes l'observation d'une couche blanche avec des changements organoleptiques des légumes (changement de l'odeur et la texture rigide des légumes a été diminué de sorte qu'ils deviennent mous, mais aussi le changement de couleur du liquide (l'eau+sel) de sorte chaque légume diffuse sa couleur dans la solution (jaune pour les carottes, violet pour les betteraves et marron pour les olives) figure 16


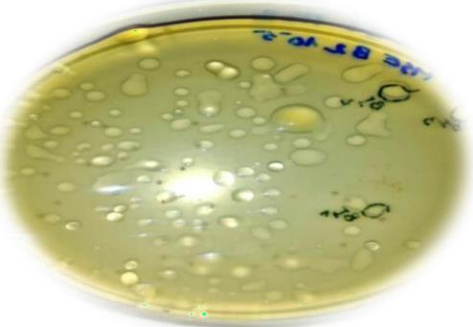
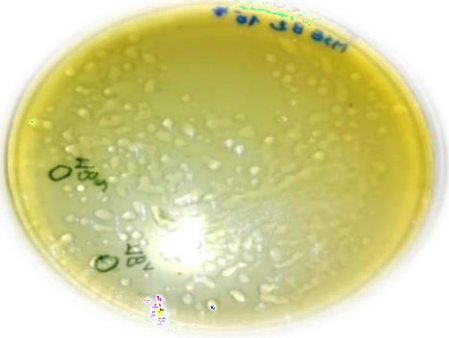
V .2. Isolement des bactéries lactiques productrices d'EPS

Vingt-huit isolats ont été isolée à partir des boîtes de MRS RC et MSE qui possèdent les caractères suivants :

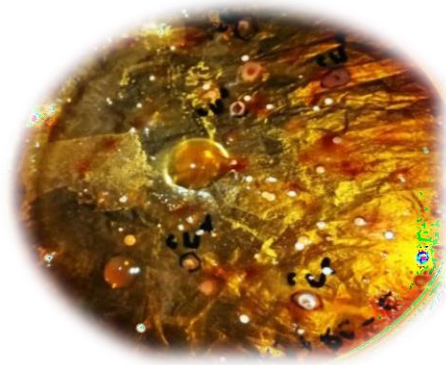
Sur milieu MRS+RC montre des colonies circulaire, bombés et de couleur marron ou blanches par fois de couleur crème leur taille est d'environ 1mm à 6mm de diamètre, une deuxième forme de colonies irréguliers, visqueux de couleur transparent à marron de taille grand à partir de 5mm jusqu'à 1.5cm

Sur milieux MSE montre des colonies circulaires bombées et de couleurs blanches de tailles petites maximum 1mm de diamètres, une deuxième forme de colonies irrégulières transparentes visqueuses de grande taille 3mm à 1.2cm de diamètre

Table 5: Examen macroscopique des colonies sur le milieu MSE et MRS_{RC}

Les codes des isolats	L'aspect macroscopique sur milieu de culture gélosé	Description
MSE C 10 ⁻⁵		Colonies de taille moyen irréguliers brillantes, bombées et visqueuses de couleurs transparent.
MSE B2 10 ⁻⁵		Colonies de taille moyen irréguliers brillantes, bombées et visqueuses de couleurs transparent.
MSE B2 10 ⁻⁴		Colonies de taille moyen irréguliers brillantes, bombées et visqueuses de couleurs transparent.

MRC+RC C

 10^{-4} 

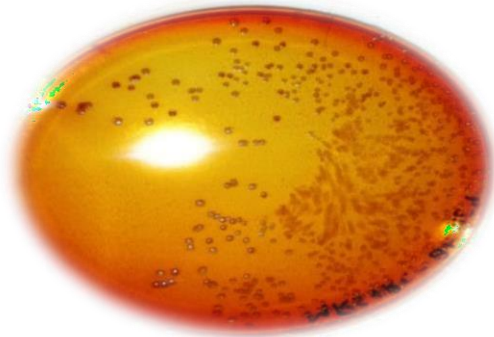
Des colonies rondes
visqueuses
marron >colonies rondes
petits bombés blanc.

MRS+RC

B1 10^{-5} 

Colonie rond visqueuses
marron petits.

MRS B4

 10^{-4} 




Colonies rond visqueuses
marron petits

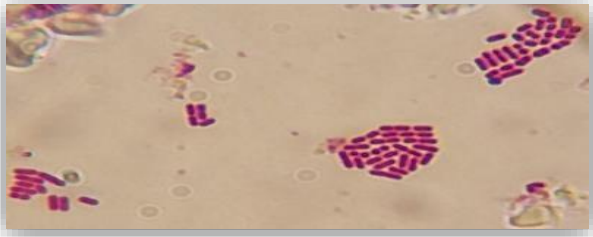
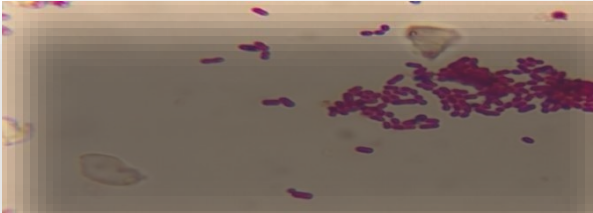

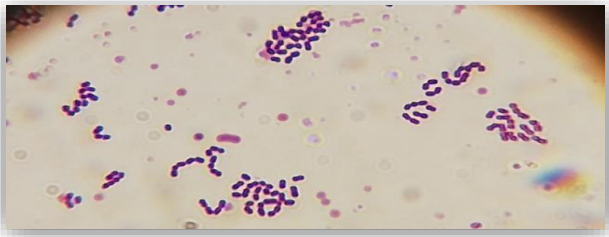
Les bactéries lactiques sont connues pour produire des EPS, soit visqueux ou non visqueux (Roger.,2010). La recherche de production conduit sur milieu MRS riche en saccharose et rouge Congo, qui donne des colonies de couleur marron ou noir pour souche productrice et rouge pour souche non productrice (**Oucharet al, 2013 ; Boukhelifa, 2017**). Les colonies possédant la couleur noir seront retenues ; le milieu MSE est le milieu qui nous donne seulement des colonies productrices des EPS (brillantes, bombées et visqueuses) donc en considère le milieu MSE comme milieu sélectif des bactéries lactiques productrices des EPS.

La purification a été réalisée sur milieux MRS, puisque les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles.

A partir de 26 isolats, 17 isolats ont été catalase négative et le Gram+ (cocci et bacille). Toutes ces colonies isolées ayant un aspect macroscopique des souches lactiques sur milieu MRS solide qui semble des colonies petites, rondes, blanches, et cette caractéristique indique que ces isolats appartiennent au groupe bactéries lactiques (De Vos et al., 2009, Ababsa, 2012).

Table 6: les aspects microscopiques des isolats après coloration de gram.

Le code	Gram	Catalase	Forme	OBSERVATION SUR MICROSCOPE
$MB_{210^{-5}}$	+	-	BACILLES Palissade	
CI_6	+	-	BACILLES	
C_310^{-5}	+	-	Diplocoques	

MIBt 10 ⁻⁴	+	-	Diplocoques	
BI ₁ *	+	-	Cocci	
BI ₁	+	-	Bacilles (palisade)	
BI ₃	+	-	Cocci en court chains	

V .3. La pré identification des souches

Cette étape a été réalisée sur 03 souches qui ont été bacille Gram positive, catalase négative et homofermentaire, donc susceptible d'être des lactobacilles ; il ya que la souches LB BI₁subie le tes d'identification d'espèce par Galerie api 50 d'où elle appartient aux : *Lactobacillus acidophilus*, ce genre de bactérie jouent un rôle important dans la fermentation.



Figure 17: la galerie API50 CHde B1 après 24heures et après 48heures

V .3.1La mise en évidence de formation de biofilm

La mise en évidence de formation des biofilms été révélé sur une multi-plaque, la croissance des souches été sur milieu MRS glucose et MRS saccharose avec des pourcentages varier (5%, 10%, 20%, 25%), le but est de savoir dans quelle pourcentage de saccharose obtient une forte formation de biofilm ; les résultats obtenus (Fig 18) montre que la plupart des souches n' ayant pas un dépôt violet au fond des puitspar contre la souche B₄10 et MB₂ 10c ayant un dépôt violet (**Stepanovicet al, 2000**)cela veut dire formation de biofilm dans le milieu MRS 5%,

Le résultat négatif de la majorité des souches peut due à une mauvaise manipulation.

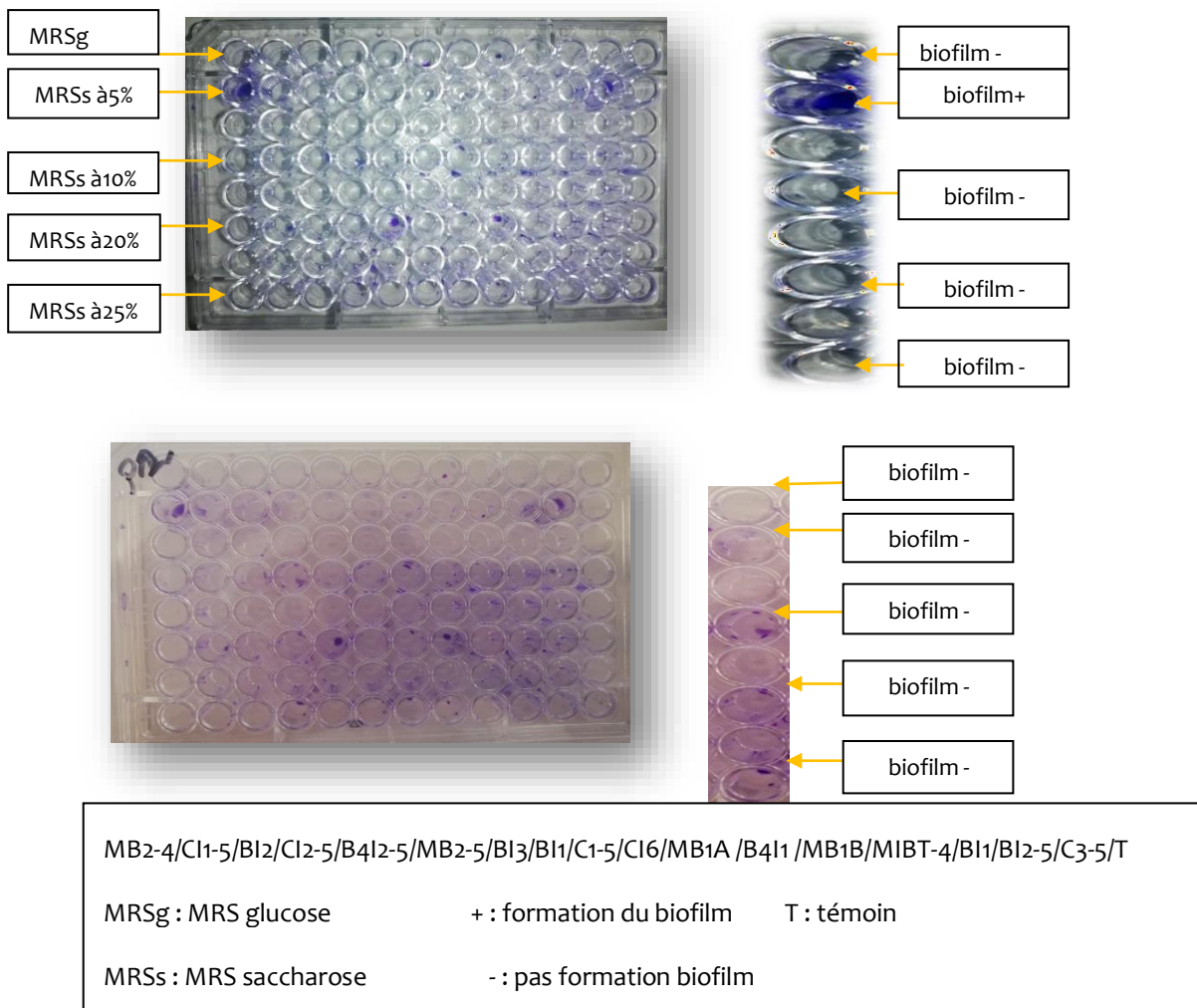


Figure 18: la plaque zeme de test de formation de biofilm

Table 7 : Résultats de test de formation de biofilm sur microplaque 96 puits.

S	Souche	Témoin	MB2-4	Cl1-5	Bl2	Cl2-5	B4l2-4	B4l2-5	MB2-5	Bl3	Bl1	C1-5	Cl6	MB1A	B4l1	MB1B	MIBT-4	Bl1	Bl2-5	C3-5
	MRSg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MRSs	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MRSs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MRSs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRSs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: formation du biofilm / - : pas formation du biofilm / MRSg: MRS glucose/ MRSs: MRS saccharose

V 3.2. La production des exo-polysaccharides

Cette technique est effectuée sur 03 souches de lactobacillus (BI1, BI2et MB210⁻⁵)

La production d'exopolysaccharide pour les souches été réveillée par la production des colonies visqueuses et colonies marron sur les milieux MSE et MRS_{RC} fig 19 cette production a été confirmé par la méthode décrite par (Linganie et al.2010) la figure..... illustre l'apparition d'un anneau opaque après l'ajout de l'éthanol de 95% au surnageant de la culture bactérienne (après 24h d'incubation à 30°C sur milieu MRS saccharose 5%) qui réveillée la production des EPS.

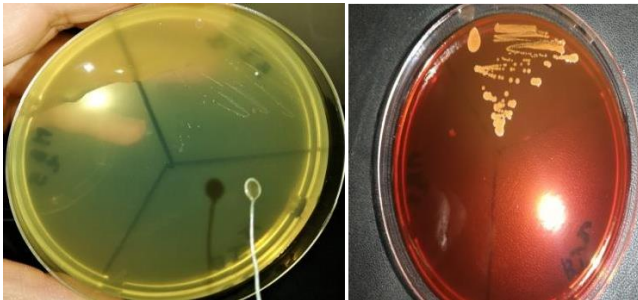


Figure 19: aspect visqueux et colonie marron des colonies BI1

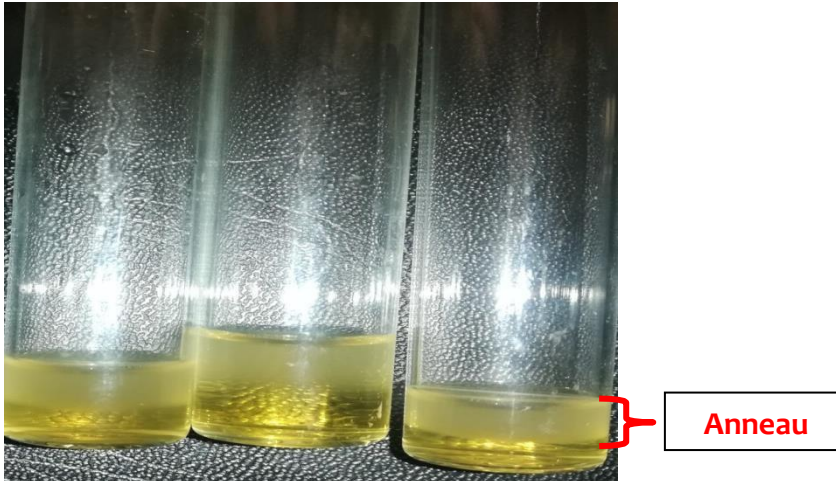


Figure 20: la formation d'un trouble confirme la formation de production de sexopolysaccharides pour les isolats.

V .3.3. Activité amylolytique

Ce test permet de définir la capacité de la bactérie à l'hydrolyse d'amidon. L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un halo d'éclaircissement autour de chaque colonie l'observation est plus nette en inondant la surface du milieu avec du lugol (solution iodurée). zone claire jaunâtre (couleur du lugol autour des colonies) : amidon hydrolysé test positif. présence de zone bleue amidon non hydrolysé (négatif) (Delarras, 2014). pour les trois souches testées (B1, B2, MB2-5) l'activité amylolytique est négatif (fig 21), les souches sont incapables d'hydrolyser l'amidon, ce qui signifie que ces dernières ne possèdent pas une amylase.

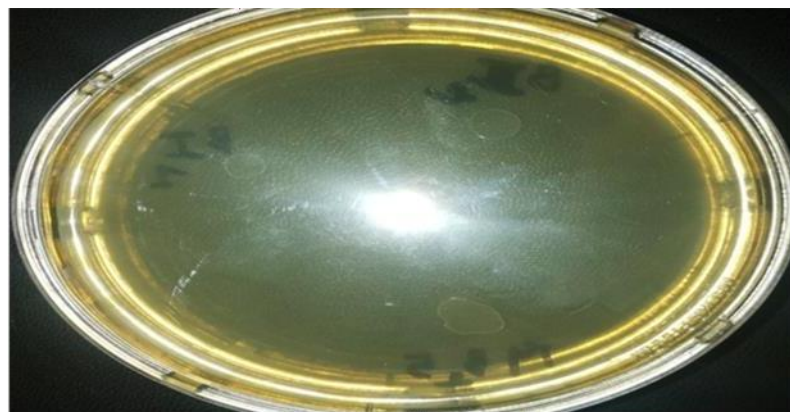


Figure 21: les trois souches sélectionnées (B1, B2, MB2-5) poussées sur milieu MRS amidon (avant de l'ajout de lugol)

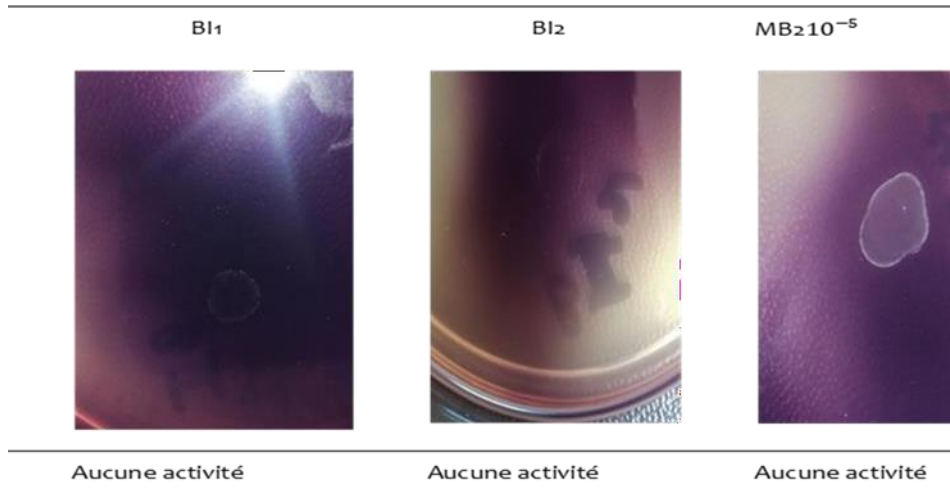


Figure 22 : résultats de test amylolytique (après l'ajout de lugol)

V .3.4. L'extraction des exo-polysaccharides

Extraction et dosage des polysaccharides produit dans le bouillon MRS hyper-saccharosée , après purifié les EPS par précipitation à l'alcool, il est possible de doser ces dernière par méthodes colorimétrique par l'acide sulfurique et phénol ; cette quantification est basé sur le dosage des sucres totaux en se référant à une courbe d'étalonnage du glucose à révéler des seuils de production qui varie entre 0.02g/l , 0.02g /l et 0.35 g/l des souches Lb MB2 , Lb BI2 et Lb BI1 respectivement.

Ces résultats sont inferieur aux travaux de **Abo saif et Sakr (2020)** qui ont pu isolée 0.5g jusqu'à 1g d'EPS par souche.

V .3.5. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des EPS des souches de *lactobacillus sp* a été évaluée par le piégeage des molécules du radical libre DPPH. L'activité antioxydants de nos souches et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 600 nm. (**Bozin et al., 2008**).

Les résultats du pouvoir antioxydant des souches testées affichent des pourcentages d'inhibition du radical DPPH appréciables allant de 28.64%, 25% et 87.50% pour les

souches lactobacillus B1, B2 et MB2 (Figure 18). Les EPS ont montré des activités antioxydantes plus élevées par rapport aux résultats rapportés par (Wang et al., 2017). Alors que Li et al. (2012) affichent une activité de piégeage du radical DPPH de 53.05% avec *Lactobacillus plantarum* C88.

Les EPS ont un rôle vital en tant que piègeurs de radicaux libres dans l'inhibition des dommages oxydatifs dans les organismes vivants et peuvent être considérés comme un antioxydant potentiel unique (Adebayo-Tayo et al., 2018)

En conséquence, les EPS des lactobacillus peuvent être une substance antioxydante potentielle qui peut s'appliquer dans les aliments fonctionnels.

L'acide ascorbique a présenté la meilleure activité antioxydante, qui a été atteint un pourcentage d'inhibition de 94% la concentrations de 20mg/ml.

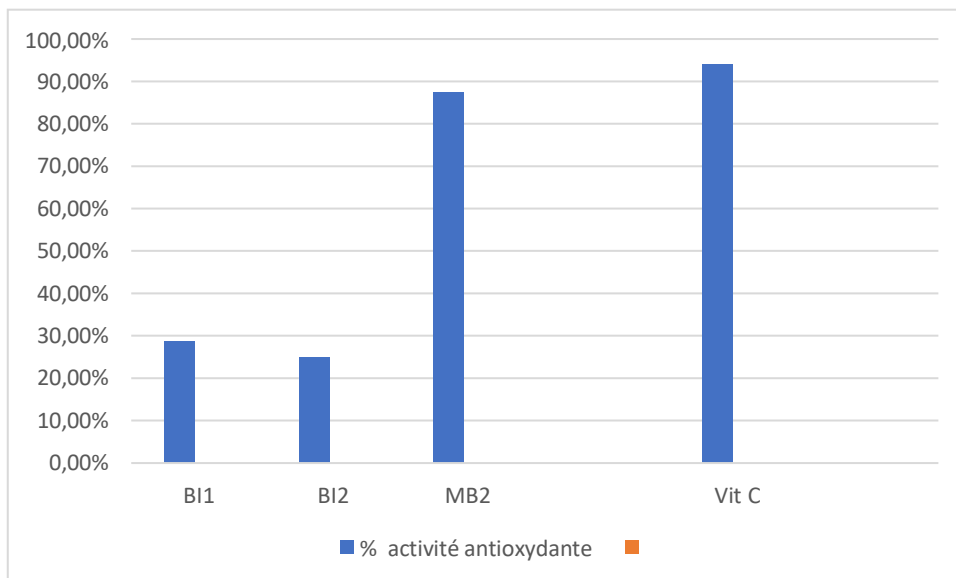


Figure 23: Les résultats d'activité antioxydante des souches B1, B2, MB2-5 et VitC

V .3.6. Activités émulsification

Les indices d'émulsification (EI) des trois EPS avec de l'huile d'olive ont été présentés dans la figure 20. La valeur de l'indice était la plus élevée pour EPS B1 (36.60 %) après 1 heure d'incubation. L'activité émulsifiante pour EPS B2 et EPS MB2 était de 30 et 33.30 % respectivement, cette activité est restée stable pendant 48 heures pour EPS B1. Une petite augmentation de l'activité notée après 48 heures (de 33.30% en 24h vers 36.6 %) pour EPS B2 et une augmentation en 24h puis une stabilisation pour EPS MB2 (36.60%).

Les micelles se forment lorsque les parties hydrophobes incapables de former des liaisons hydrogène dans la phase aqueuse, elles s'unissent et se déplacent vers le centre laissant les parties hydrophiles vers l'extérieur bien que l'agitation par vortex permette d'isoler les molécules hydrophobes du solvant et de les piéger à l'intérieur des micelles (Haigh, 1996).

Un émulsifiant efficace doit être maintenu à au moins 50 % du volume d'émulsion initial jusqu'à 24 heures après sa formation (Willumsen & Karlson, 1996). Donc selon les résultats les EPS des souches de lactobacillus ne possèdent pas une activité émulsifiante, cela peut être expliqué par la faible quantité d'EPS utilisée puisque les travaux de Abo saif et Sakr (2020) ont montré qu'il existe une relation entre la concentration des EPS et l'activité ; en augmentant la concentration de la solution d'EPS à 10 mg/mL, les indices d'émulsion ont progressés.

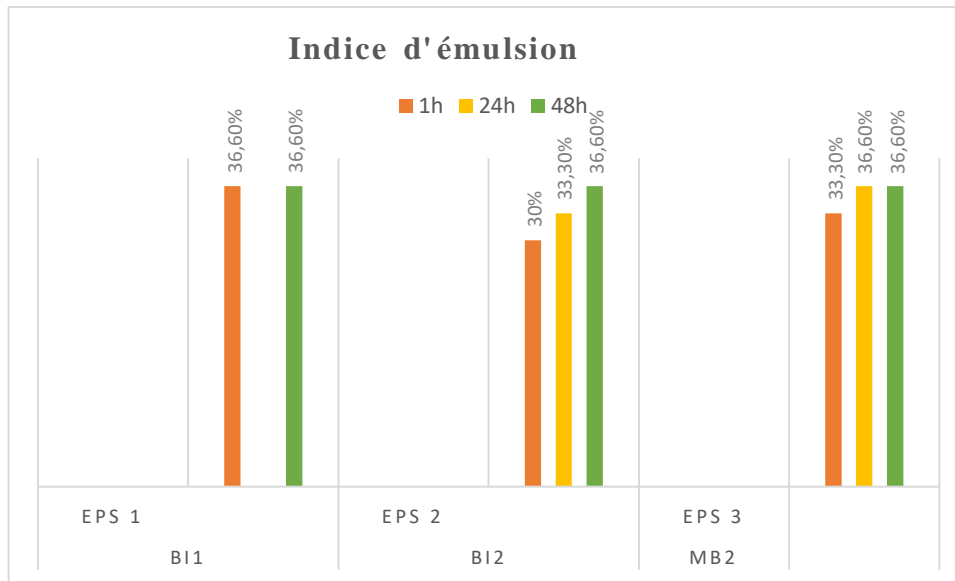


Figure 24: les résultats de l'activité émulsifiant en 1h,24h,48 pour les EPSB11et EPSB12et EPSMB2-5

V .3.7. Activité antimicrobienne

Le tableau représente les résultats des interactions entre des souches pathogènes pré-identifier isolée à partir d'un milieu hospitalier. Ces souches possèdent une résistance d'antibiotique remarquable, donc l'étude d'antagoniste envers les surnageant et les EPS des souches de lactobacillus a montrée :

Absence d'activité inhibitrice des surnageants et des EPS des trois souches en vers *streptococcus pneumoniae*.

Le surnageant ou bien les EPS extraits des *Lactobacillus B11* possèdent aucune activité en vers : *Yarssinia spp* et *Streptococcus pneumoniae* par contre une inhibition de 3 à 1 mm et 2 à 1 mm été observée envers les souches de *Acinetobacter baumannii* et *Salmonella spp* respectivement.

Les ESP de la souches Lb B12 et MB2 montre une activité remarquable maximale 03 mm envers les souches indicatrice : *Acinetobacter baumannii* , *Salmonella spp* et *Yersinia spp*

Autrement les surnageant des souches Lb B11 et Lb B12 et Lb MB2 jouant un rôle remarquable est variables (min 1 mm et max 6mm) dans l'inhibition

des *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* 15, *Salmonella* spp et *Klebsiella pneumoniae* 17 ; cela est peut-être due aux différents type de métabolite : l'acidité, acides organique, bactériocines.

	Surnagent de la souche		EPS
<i>Acinetobacter baumannii</i>	BI1	3mm	1mm
	BI2	1mm	2mm
	MB2	6mm	3mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 15	BI1	/	/
	BI2	/	/
	MB3	2mm	/
<i>Salmonella</i> spp	BI1	2mm	1 mm
	BI2	2mm	1,35mm
	MB2	2mm	2mm
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	BI1	/	/
	BI2	/	/
	MB2	/	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 17	BI1	3 mm	/
	BI2	1 mm	/
	MB2	1 mm	/
<i>Yersinia</i> spp	BI1	/	/
	BI2	/	1 mm
	MB2	/	2 mm

Figure 25: les tableau représentatif des diamètres des zones d'inhibition

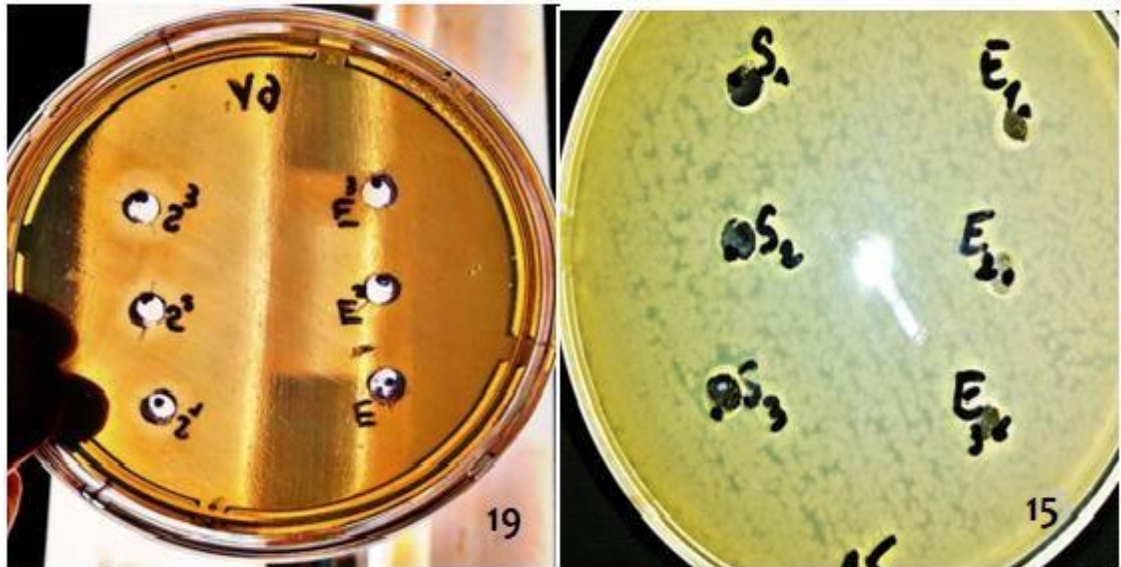


Figure 26: les résultats d'activité antimicrobienne contre les souches (*Kleibseilla pneumonie* et *Acinetobacter baumanii*)

PARTIE VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Notre travail est consacré pour l'évaluation biotechnologique des EPS de quelques souches de bactéries lactiques isolée de blé et des légumes fermenté.

Grâce au screening mis en place dans ce travail nous avons pu isolés 17 souches qui ont été purifiée, prés identifiés par quelques test classiques (caractéristique morphologique, des test biochimiques et physiologique) révèlent que ces isolats appartiennent des bactéries lactiques. Que 3 souches ont été sélectionnés de Lactobacillus et l'identification de l'isolat B11 révèlent qu'elles appartiennent au Lactobacillus acidophilus destiné par la suite à des essais concernant la production des EPS, l'activité antioxydante, test d'émulsifiant, amylolytique, antimicrobiennes.

Les résultats obtenus dans cette étude sont résumés dans les points suivants :

- Les souches sélectionnées sont aptes à produire des EPS avec une rendement maximale obtenue par la souche B11 (0.35g/l)
- L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH des souches (B11, B12et MB2-5) montre une activité antioxydante qui diffère d'une souche à l'autre
- La souches MB2-5 a été estimée comme souche possédant un potentiel antioxydant important au niveau de l'EPS de (87.50%).
- L'indice d'émulsification pour les trois Lactobacillus est faible (moins de 50%).
- Une faible activité antimicrobienne de notre Lactobacillus contre la majorité des pathogènes utiliser

Sur la base de ces résultats, on suggère que les EPS obtenus de ces souches de bactéries lactiques notamment la souche B11, établissent une possibilité d'être souches probiotiques et peuvent être des candidats excellents quant à leur puissance en tant qu'antioxydants potentiels.

À cet égard, des travaux futurs pourraient soulevés pour mieux comprendre la structure et le mode d'action des EPS des bactéries lactiques in afin de les pouvoir appliquer a la biotechnologie comme des antioxydants, ainsi compenser les baisses de la capité des antioxydants.

PARTIE VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Aarti, C., & Khusro, A. (2019). Functional and technological properties of exopolysaccharide producing autochthonous *Lactobacillus plantarum* strain AAS3 from dry fish based fermented food. *LWT*, 114, 108387.
- Adebayo, C. O., & Aderiye, B. I. (2010). Antifungal activity of bacteriocins of lactic acid bacteria from some Nigerian fermented foods. *Research Journal of Microbiology*, 5(11), 1070-1082.
- Aguirre, M., & Collins, M. D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(2), 95-107.
- Aker, S., & Midik, Ö. (2020). The views of medical faculty students in Turkey concerning the COVID-19 pandemic. *Journal of Community Health*, 45(4), 684-688.
- Allemani, C., Matsuda, T., Di Carlo, V., Harewood, R., Matz, M., Nikšić, M., ... & Hood, M. (2018). Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *The Lancet*, 391(10125), 1023-1075.
- Allison, G. E., & Klaenhammer, T. R. (1998). Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 8(3), 207-226.
- Amantini, A., Fossi, S., Grippo, A., Innocenti, P., Amadori, A., Bucciardini, L., ... & Pinto, F. (2009). Continuous EEG-SEP monitoring in severe brain injury. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology*, 39(2), 85-93.
- Ammor, S., Yaakoubi, K., Chevallier, I., & Dufour, E. (2004). Identification by fluorescence spectroscopy of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Journal of Microbiological Methods*, 59(2), 271-281.

- Annika, M. M. M. B., & Marc, B. (2004). Industrial use and production of lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects*. Salminen, AV and AO Wright (Eds.) ouwehand. Marcel Dekker, New York.
- Aoki, N., et al. "Genetic modification of nitrogen use efficiency in potato and rice by introducing fungal glutamate dehydrogenase, American Society of Plant Biologist." *Plant Biol* (2009).
- Arsenault, B., & Alain, P. (2004). *Histoire des Acadiens*. Les Éditions Fides.
- Axelsson, P., Nyström, B., & Lindhe, J. (2004). The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults: results after 30 years of maintenance. *Journal of clinical periodontology*, 31(9), 749-757.
- Ayad, R., Ababsa, Z. E., Belfadel, F. Z., Akkal, S., León, F., Brouard, I., & Medjroubi, K. (2012). Phytochemical and biological activity of Algerian *Centaurea melitensis*. *Int J Med Arom Plants*, 2(1), 151-154.
- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R. (2005). CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES A PARTIR DE LAIT CRU DE CHEVRE DEDEUX POPULATIONS CAPRINES LOCALES" ARABIA ET KABYLE". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 30-37.
- Badis, G., Saveanu, C., Fromont-Racine, M., & Jacquier, A. (2004). Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Molecular cell*, 15(1), 5-15.
- Baele, G., Li, W. L. S., Drummond, A. J., Suchard, M. A., & Lemey, P. (2012). Accurate model selection of relaxed molecular clocks in Bayesian phylogenetics. *Molecular biology and evolution*, 30(2), 239-243.
- Bai, L., Huan, S., Gu, J., & McClements, D. J. (2016). Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 61, 703-711.
- Bavu, É., Gennisson, J. L., Couade, M., Bercoff, J., Mallet, V., Fink, M., ... & Pol, S. (2011). Noninvasive in vivo liver fibrosis evaluation using supersonic shear imaging: a

clinical study on 113 hepatitis C virus patients. *Ultrasound in medicine & biology*, 37(9), 1361-1373.

Bederina, M., Makhloufi, Z., & Bouziani, T. (2011). Effect of limestone fillers the physic-mechanical properties of limestone concrete. *Physics Procedia*, 21, 28-34.

Belal, A. R., & Cooper, S. (2011). The absence of corporate social responsibility reporting in Bangladesh. *Critical Perspectives on Accounting*, 22(7), 654-667.

Bendifallah, L., Louadi, K., & Doumandji, S. (2010). Apoidea et leur Diversité au Nord d'Algérie. *Silva Lusitana*, 18(1), 85-102.

Björkroth, J., & Holzapfel, W. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *The prokaryotes*, 4, 267-319.

Blauth, M., Jürgensen, M., Vest, G., Hartwig, O., Pechtl, M., Cerne, J., ... & Kaniber, M. (2018). Coupling single photons from discrete quantum emitters in WSe₂ to lithographically defined plasmonic slot waveguides. *Nano letters*, 18(11), 6812-6819.

Boudraa, A. O., Cexus, J. C., & Saidi, Z. (2004). EMD-based signal noise reduction. *International Journal of Signal Processing*, 1(1), 33-37.

Boudrahem-Addour, N., Izem-Meziane, M., Bouguerra, K., Nadjem, N., Zidani, N., Belhani, M., & Djerdjouri, B. (2015). Oxidative status and plasma lipid profile in β -thalassemia patients. *Hemoglobin*, 39(1), 36-41.

Boukhelifa, N., Perrin, M. E., Huron, S., & Eagan, J. (2017, May). How data workers cope with uncertainty: A task characterisation study. In *Proceedings of the 2017 CHI Conference on Human Factors in Computing Systems* (pp. 3645-3656).

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food chemistry*, 111(4), 925-929.

Busse, M. D., Beattie, S. E., Powers, R. F., Sanchez, F. G., & Tiarks, A. E. (2006). Microbial community responses in forest mineral soil to compaction, organic

matter removal, and vegetation control. *Canadian Journal of Forest Research*, 36(3), 577-588.

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.

Camille, D. E. L. A. R. R. A. S. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire? Recherche de bactéries et de levures-moisissures*. Lavoisier.

Chen, Y. J., Xu, L. X., Li, J. H., Li, Y. W., Wang, H. Y., Zhang, C. F., ... & Chen, Y. L. (2019). Topological electronic structure and its temperature evolution in antiferromagnetic topological insulator MnBi₂Te₄. *Physical Review X*, 9(4), 041040.

Clifford, G. D., Liu, C., Moody, B., Li-wei, H. L., Silva, I., Li, Q., ... & Mark, R. G. (2017, September). AF classification from a short single lead ECG recording: The PhysioNet/computing in cardiology challenge 2017. In 2017 Computing in Cardiology (CinC) (pp. 1-4). IEEE.

Conesa, A., Nueda, M. J., Ferrer, A., & Talón, M. (2006). maSigPro: a method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments. *Bioinformatics*, 22(9), 1096-1102.

Daba, G. M., Elnahas, M. O., & Elkhateeb, W. A. (2021). Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 79-89.

Dalie, D. K. D. (2010). *Biocontrôle des moisissures du genre Fusarium productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs* (Doctoral dissertation, Université des Sciences et Technologies (Bordeaux 1)).

De Vos, A., De Clippeleer, I., & Dewilde, T. (2009). Proactive career behaviours and career success during the early career. *Journal of occupational and organizational psychology*, 82(4), 761-777.

- De Vriese, A. S., Verbeuren, T. J., Van de Voorde, J., Lameire, N. H., & Vanhoutte, P. M. (2000). Endothelial dysfunction in diabetes. *British journal of pharmacology*, 130(5), 963-974.
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 23(2), 153-177.
- Djaa, N. E. H., Boulal, A., & Zagane, A. (2017). Generalized warped product manifolds and biharmonic maps. *Acta Mathematica Universitatis Comenianae*, 81(2), 283-298.
- Djekidel, R., Mahi, D., Ameer, A., Ouchar, A., & Hadjaj, M. (2013). Calcul et atténuation du champ magnétique d'une ligne aérienne HT au moyen d'une boucle passive. *Acta Electrotechnika journal*, 54(2), 103-108.
- Doan Dang, P., Van Khoi, N., Nguyet Nga, L. T., Thanh, D. N., & Ho Thanh, H. (2015). *Identification handbook of freshwater zooplankton of the Mekong River and its tributaries*. Mekong River Commission, Vientiane.
- Donnelly, J. P., Chen, S. C., Kauffman, C. A., Steinbach, W. J., Baddley, J. W., Verweij, P. E., ... & Pappas, P. G. (2020). Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clinical Infectious Diseases*, 71(6), 1367-1376.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951-962.
- Dortu, C., & Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1).
- Drake, G., Hawkins, T., Brand, A., Hall, L., McKay, M., Vij, A., & Ismail, I. (2003). Energetic, low-melting salts of simple heterocycles. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics: An International Journal Dealing with Scientific and Technological Aspects of Energetic Materials*, 28(4), 174-180.

- DuBois, A. B., Botelho, S. Y., Bedell, G. N., Marshall, R., & Comroe, J. H. (1956). A rapid plethysmographic method for measuring thoracic gas volume: a comparison with a nitrogen washout method for measuring functional residual capacity in normal subjects. *The Journal of clinical investigation*, 35(3), 322-326.
- Eisikowitch, D., Lachance, M. A., Kevan, P. G., Willis, S., & Collins-Thompson, D. L. (1990). The effect of the natural assemblage of microorganisms and selected strains of the yeast *Metschnikowia reukaufii* in controlling the germination of pollen of the common milkweed *Asclepias syriaca*. *Canadian Journal of Botany*, 68(5), 1163-1165.
- El-Abid, H., Amaral, C., Cunha, S. C., Augusto, T. V., Fernandes, J. O., Correia-da-Silva, G., ... & Moumni, M. (2019). Chemical composition and anti-cancer properties of *Juniperus oxycedrus* L. essential oils on estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 59, 261-271.
- Farhi, E., & Werning, I. (2012). *Dealing with the trilemma: Optimal capital controls with fixed exchange rates* (No. w18199). National Bureau of Economic Research.
- Ferrario, M., Alesini, D., Anania, M. P., Artioli, M., Bacci, A., Bartocci, S., ... & Zobov, M. (2018). EuPRAXIA@ SPARC_LAB Design study towards a compact FEL facility at LNF. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 909, 134-138.
- Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International journal of food microbiology*, 151(2), 125-140.
- Freitas, F., Alves, V. D., Carvalheira, M., Costa, N., Oliveira, R., & Reis, M. A. (2009). Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. *Carbohydrate Polymers*, 78(3), 549-556.
- Gabriel, D., Gordon, L. B., & Djabali, K. (2016). Temsirolimus partially rescues the hutchinson-gilford progeria cellular phenotype. *PloS one*, 11(12), e0168988.

- García-Olmo, D., García-Arranz, M., Herreros, D., Pascual, I., Peiro, C., & Rodríguez-Montes, J. A. (2005). A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Diseases of the colon & rectum*, 48(7), 1416-1423.
- GARVIE, R. C. et GOSS, M. F. Intrinsic size dependence of the phase transformation temperature in zirconia microcrystals. *Journal of materials science*, 1986, vol. 21, no 4, p. 1253-1257.
- Haigh, J. D. (1996). The impact of solar variability on climate. *Science*, 272(5264), 981-984.
- HARDIE, J. M. et WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of applied microbiology*, 1997, vol. 83, no S1, p. 1S-11S.
- Hardie, J. M., & Whiley, R. A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of applied microbiology*, 83(S1), 1S-11S.
- Heleni, S. (2006). Application Model Learning Creative Problem Solving (CPS) Math Learning To Improve Results Class VIII SMPN 3 Pekanbaru.
- Hidalgo-Cantabrana, C., López, P., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Suárez, A., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P. (2012). Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 227-237.
- Hogg, M. A. (2005). Uncertainty, social identity, and ideology. In *Social identification in groups*. Emerald Group Publishing Limited.
- Hola, V., & Ruzicka, F. (2011). The formation of poly-microbial biofilms on urinary catheters. Urinary tract infections. InTech, 153-72.
- Hols, P., Kleerebezem, M., Schanck, A. N., Ferain, T., Hugenholtz, J., Delcour, J., & de Vos, W. M. (1999). Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to

homoalanine fermentation through metabolic engineering. *Nature biotechnology*, 17(6), 588-592.

Huang, N. E. (2014). *Hilbert-Huang transform and its applications* (Vol. 16). World Scientific.

Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A., & Maneerat, S. (2011). Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control*, 22(3-4), 401-407.

JAIQ, Y., Wickett, N. J., Ayyampalayam, S., Chanderbali, A. S., Landherr, L., Ralph, P. E., ... & DEPAMPHILIS, C. (2011). Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*, 473(7345), 97-100.

Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. Lavoisier.

Jolly, L., Vincent, S. J., Duboc, P., & Neeser, J. R. (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications*, 367-374.

Kavita, K., Mishra, A., & Jha, B. (2013). Extracellular polymeric substances from two biofilm forming *Vibrio* species: characterization and applications. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), 882-888.

Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., ... & Siezen, R. (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, 29-58.

Kongnum, K., & Hongpattarakere, T. (2012). Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish & shellfish immunology*, 32(1), 170-177.

König, H., Uden, G., & Fröhlich, J. (Eds.). (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3-29). Heidelberg: Springer.

- Korcz, E., & Varga, L. (2021). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 375-384.
- Kotsonis, S. E., Powell, I. B., Pillidge, C. J., Limsowtin, G. K., Hillier, A. J., & Davidson, B. E. (2008). Characterization and genomic analysis of phage ascc ϕ 28, a phage of the family Podoviridae infecting *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology*, 74(11), 3453-3460.
- Kumar, S. K. (2007). Kerala, India: a regional community-based palliative care model. *Journal of pain and symptom management*, 33(5), 623-627.
- Kurtz, J., & Franz, K. (2003). Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*, 425(6953), 37-38.
- Limón, R. I., Peñas, E., Torino, M. I., Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M., & Frias, J. (2015). Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chemistry*, 172, 343-352.
- Liu, W. L., Xia, B., Zhong, Y., Cai, J. X., Li, J. F., Liu, H. F., ... & Sun, Z. L. (2014). Age and composition of the Rebang Co and Julu ophiolites, central Tibet: Implications for the evolution of the Bangong Meso-Tethys. *International Geology Review*, 56(4), 430-447.
- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J., & Riley, P. W. (2002). The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. The GenBank accession numbers for the mcrA sequences reported in this paper are AF414034–AF414051 (see Fig. 2) and AF414007–AF414033 (environmental isolates in Fig. 3). *Microbiology*, 148(11), 3521-3530.
- Maji, T. K., Mukherjee, P. S., Mostafa, G., Zangrando, E., & Chaudhuri, N. R. (2001). 1D porous framework of copper (ii) showing a novel coordination mode of Ni (CN) 42– Electronic supplementary information (ESI) available: Fig. 4: ORTEP view of 2. Fig. 5: view of 2 down the crystallographic b axis. Fig. 6: TG-DTA curves of 1, 1a

and 1b. Fig. 7: view of 1 showing the water filled channels. See <http://www.rsc.org/suppdata/cc/b1/b103823k>. *Chemical Communications*, (15), 1368-1369.

Materiel Merabti, B., Lebouz, I., Adamou, A., & Ouakid, M. L. (2015). Effet toxique de l'extrait aqueux des fruits de *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad sur les larves des Culicidae. *Revue des Bio Ressources*, 5(2), 120-130.

Mesbahzadeh, B., Garmsiri, M., Jalalvand, F., Shojaie, L., & Kakar, M. A. (2017). Oral Administration of Menthol Alleviate Adverse Effects of Polycystic Ovarian Syndrome on Blood Biochemical Parameters and Antioxidant Status in Wister Rats. *GMJ Medicine*, 1(1), 9-14.

Milles, K. (1999). Samtal. *Tidskrift för genusvetenskap*, (2), sid-60.

Mischenko, A. S., Zhang, Q., Scott, J. F., Whatmore, R. W., & Mathur, N. D. (2006). Giant electrocaloric effect in thin-film PbZr_{0.95}Ti_{0.05}O₃. *Science*, 311(5765), 1270-1271.

Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M., & Geenen, I. (1997). The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food chemistry*, 59(4), 539-545.

Mostéfaoui, A., Moumen, H., & Raynal, M. (2014, July). Signature-free asynchronous Byzantine consensus with $t < n/3$ and $O(n^2)$ messages. In Proceedings of the 2014 ACM symposium on Principles of distributed computing (pp. 2-9).

Nairooz, R., Ayoub, K., Sardar, P., Payne, J., Almomani, A., Pothineni, N. V., ... & Mukherjee, D. (2016). Uninterrupted new oral anticoagulants compared with uninterrupted vitamin K antagonists in ablation of atrial fibrillation: a meta-analysis. *Canadian Journal of Cardiology*, 32(6), 814-823.

OMAR, A. Bulletin du CRAPC sur les Analyses Physico-Chimiques.

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented

sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat science*, 65(2), 859-867.

Paulraj, A. (2011). Understanding the relationships between internal resources and capabilities, sustainable supply management and organizational sustainability. *Journal of Supply Chain Management*, 47(1), 19-37.

Philipot, J. M., P. Pluvinage, and F. Luquet. "Clinical characterization of a syndrome by ecopathology methods: an example of dairy cow lameness." *Veterinary research* 25.2-3 (1994): 239-243.

PIARD, J. C. et DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le lait*, 1992, vol. 72, no 2, p. 113-142.

Piard, J. C., & Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le lait*, 71(5), 525-541.

Pieniz, S., Andrezza, R., Anghinoni, T., Camargo, F., & Brandelli, A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37, 251-256.

Pons-Guiraud, A. (2004). Sensitive skin: a complex and multifactorial syndrome. *Journal of cosmetic dermatology*, 3(3), 145-148.

Pringsulaka, O., Patarasinpaiboon, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., & Rangsiruji, A. (2011). Isolation and characterisation of a novel Podoviridae-phage infecting *Weissella cibaria* N 22 from Nham, a Thai fermented pork sausage. *Food microbiology*, 28(3), 518-525.

Privat, K., & Thonart, P. (2011). Action des cultures protectrices: cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(2).

- Riaz Rajoka, M. S., Mehwish, H. M., Wu, Y., Zhao, L., Arfat, Y., Majeed, K., & Anwaar, S. (2020). Chitin/chitosan derivatives and their interactions with microorganisms: a comprehensive review and future perspectives. *Critical reviews in biotechnology*, 40(3), 365-379.
- RINDERER, T. E., SYLVESTER, H. A., COLLINS, A. M., LANCASTER, V. A., CREWE, R. M., DAVIS, G. L., & WINFREY, D. (1987). Morphometric differences between South American Africanized and South African (*Apis mellifera scutellata*) honey bees. *Apidologie*, 18(3), 217-222.
- Roberts, M. N., Wallace, M. A., Tomilov, A. A., Zhou, Z., Marcotte, G. R., Tran, D., ... & Lopez-Dominguez, J. A. (2017). A ketogenic diet extends longevity and healthspan in adult mice. *Cell metabolism*, 26(3), 539-546.
- Rohwer, F. C., & Freeman, S. (1989). The distribution of conspecific nest parasitism in birds. *Canadian Journal of Zoology*, 67(2), 239-253.
- Saif, F. A. A., & Sakr, E. A. (2020). Characterization and bioactivities of exopolysaccharide produced from probiotic *Lactobacillus plantarum* 47FE and *Lactobacillus pentosus* 68FE. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 24, 100231.
- Salminen, S., & Von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press.
- Sanalibaba, P., & Çakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. open access*, 2(115), 10-4172.
- Sarwat, F., Ahmed, N., Aman, A., & Qader, S. A. U. (2013). Optimization of growth conditions for the isolation of dextran producing *Leuconostoc* spp. from indigenous food sources. *Pak. J. Pharm. Sci*, 26(4), 793-797.
- Sasikumar, K., Vaikkath, D. K., Devendra, L., & Nampoothiri, K. M. (2017). An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresource technology*, 241, 1152-1156.

- Saxer, M. (2013). *Manufacturing Tibetan medicine: the creation of an industry and the moral economy of Tibetanness* (Vol. 12). Berghahn Books.
- Schleifer, K. H., and R. Kilpper-Bälz. "Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review." *Systematic and Applied Microbiology* 10.1 (1987): 1-19.
- Shang, H., Lang, D., Jean-Marc, B., & Kaelin-Lang, A. (2004). Localization of DJ-1 mRNA in the mouse brain. *Neuroscience letters*, 367(3), 273-277.
- SIMPSON, W. J. et TAGUCHI, H. The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. In : *The genera of lactic acid bacteria*. Springer, Boston, MA, 1995. p. 125-172.
- Smaoui, S. (2010). *Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés* (Doctoral dissertation).
- Stepanović, S., Ćirković, I., Mijač, V., & Švabić-Vlahović, M. (2003). Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, 20(3), 339-343.
- Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L., & Švabić-Vlahović, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in applied microbiology*, 38(5), 428-432.
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), 1-29.
- Suarez, P. A. Z., Einloft, S., Dullius, J. E. L., De Souza, R. F., & Dupont, J. (1998). Synthesis and physical-chemical properties of ionic liquids based on 1-n-butyl-3-methylimidazolium cation. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 95(7), 1626-1639.
- Tang, W., Yao, X., Xia, F., Yang, M., Chen, Z., Zhou, B., & Liu, Q. (2018). Modulation of the gut microbiota in rats by Hugaan Qingzhi tablets during the treatment of high-fat-diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

- Tatsinkou, F., Frederic, T., & Robert, N. (2005). Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 14-18.
- Teuber, M., & Geis, A. (2006). The genus lactococcus. *The prokaryotes*, 4, 205-228.
- Teuner, Michael et GEIS, Arnold. The genus lactococcus. *The prokaryotes*, 2006, vol. 4, p. 205-228.
- Tiekink, M., & Gänzle, M. G. (2005). Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 79-84.
- Turajlic, S., Xu, H., Litchfield, K., Rowan, A., Chambers, T., Lopez, J. I., ... & TRACERx Renal Consortium. (2018). Tracking cancer evolution reveals constrained routes to metastases: TRACERx renal. *Cell*, 173(3), 581-594.
- Ulacio, D., Pérez, C., & Pineda, J. (1997). Micoflora asociada a las raíces de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) provenientes del estado Portuguesa. *Bioagro*, 9(1), 3-11.
- van den Hoogen, M. W., Kamburova, E. G., Baas, M. C., Steenbergen, E. J., Florquin, S., M. Koenen, H. J. P., ... & Hilbrands, L. B. (2015). Rituximab as induction therapy after renal transplantation: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and safety. *American Journal of Transplantation*, 15(2), 407-416.
- Van der Sande, G., Brunner, D., & Soriano, M. C. (2017). Advances in photonic reservoir computing. *Nanophotonics*, 6(3), 561-576.
- Willumsen, P. A., & Karlson, U. (1996). Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, 7(5), 415-423.
- Yilmaz, M. T., İspirli, H., Taylan, O., & Dertli, E. (2020). Synthesis and characterisation of alternan-stabilised silver nanoparticles and determination of their antibacterial and antifungal activities against foodborne pathogens and fungi. *LWT*, 128, 109497.

- Zarour, M., & Alharbi, M. (2017). User experience framework that combines aspects, dimensions, and measurement methods. *Cogent Engineering*, 4(1), 1421006.
- Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M., Øregaard, G., & Neves, A. R. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS microbiology reviews*, 41(Supp_1), S168-S200.
- Zile, M. R., & Brutsaert, D. L. (2002). New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function. *Circulation*, 105(11), 1387-1393.

PARTIE VIII. ANNEXES

Annex1 : les ingrédients des milieu de culture

Milieu MRS :

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween80	1ml
Citrate d'ammonium	2g
Acetate de sodium	5g
sulfate de magnesium	0.1g
Sulfate de manganese	0.05g
Phosphate disodique	2g
Agar	2g
Eau distillée	1000ml

🌈 pH= 6.2

Autoclavage 20min à 120°C

Milieu MRS solide Rouge Congo(MRS+RC) :

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween80	1ml
Citrate d'ammonium	2g
Acetate de sodium	5g
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween80	1ml
Citrate d'ammonium	2g
Saccharose	100g

Rouge congo	25g
-------------	-----

✚ Autoclavage 20min à 120°C

Milieu MSE :

Tryptone	10g
Gelatin	2.5g
Extrait de levure	5g
Saccharose	100g
Glucose	5g
Citrate de Na	1g
Azide de Na	0.075g
Agar	20g

✚ pH=6.9

✚ Autoclavage 20min à 120°C

Milieu GN :

Peptone	5g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Na cl	5g
Agar	20g
Eau distillé	1000ml

✚ pH=7

✚ autoclave durant 15min à 121°C

Milieu lait écrémé :

Poudre lait écrémé	10g
Extrait de levure	3g
L'eau d'estillé	100ml

✚ PH=7

✚ Stérilisation à 110°C pendant 10min

Eau physiologique :

Nacl	8.5g
-------------	-------------

Peptone	0.5g
Eau distillé	1000ml

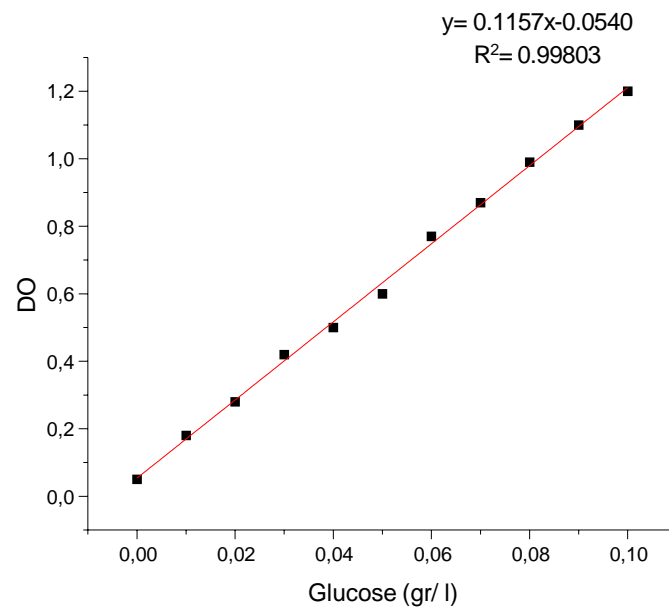
🚦 Autoclave durant 15min à 121°C

Annexe 2 : technique de coloration de gram

COLORATION DE GRAM

- Verser sur une lame une goutte d'eau physiologique et mélanger avec une colonie de l'échantillon puis fixer à la chaleur.
- Couvrir le frottis avec le violet de Gentiane, laisser agir pendant 1 minute. Rincer la lame avec l'eau de robinet.
- Recouvrir la lame avec de lugol et laisser agir 1 minute. Rincer la lame avec l'eau de robinet.
- Recouvrir la lame avec de l'alcool pendant 30 secondes. Rincer avec l'eau de robinet jusqu'à disparition de la couleur violette.
- Couvrir la lame avec un contre colorant la fushine et laisser agir pendant 1 minute. Rincer doucement avec l'eau de robinet et sécher avec du papier absorbant.
- Examiner sur microscope sous l'objectif x100 avec une goutte d'huile à immersion

ANNEXE3 : COURBE D'ETALONNAGE DE GLUCOSE



Annexe 3 GALERIE API 50 :



L'équipement de la galerie API50CH

1 : bec benzène

2 : huile de paraffine

3 : eau distillé stérile

4 : eau physiologie

5 : suspension bactérien incubé 18h

6 : medium de galerie API50CH

7 : portoir des bandelettes

8 : bandelettes



INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API 50 CH est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes. API 50 CH est utilisé en combinaison avec API 50 CHL Medium pour l'identification des Lactobacillus et apparentés, avec API 50 CHBE Medium pour l'identification des Bacillus et apparentés, des Enterobacteriaceae et Vibrionaceae. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'identification en fin de notice des milieux associés.

PRINCIPE

La galerie API 50 CH est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (nétéroacides, polyalcools, acides uroniques) et des tests de fermentation sont inoculés avec API 50 CHL Medium ou API 50 CHBE Medium qui réhydrate les substrats.

Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif.

NOTE : La galerie API 50 CH peut être utilisée pour étudier deux autres voies :
- l'oxydation se traduisant par un changement de couleur dans la cupule, dû à une production d'acide en aérobose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.
- l'assimilation se traduisant par une croissance du microorganisme dans la cupule quand le substrat est utilisé comme seule source de carbone présente.
Dans ce cas, le milieu employé pour l'inoculation des galeries doit être choisi en fonction du métabolisme et des exigences du groupe microbien étudiés (voir paragraphe bibliographie).

PRESENTATION (Coffret de 10 tests)

- 10 galeries API 50 CH
- 10 boîtes d'incubation
- 10 fiches de résultats
- 1 notice

COMPOSITION DE LA GALERIE

La composition de la galerie API 50 CH est reportée dans la liste des tests ci-dessous :

Bande 0 - 9

Table with 5 columns: Tube, Test, Composants actifs, QTE (mg/cup.), and a reference value. Rows include TEMOIN, GLY, ERY, DARA, LARA, RIB, DXYL, LXYL, ADO, MDX.

Bande 10 - 19

Table with 5 columns: Tube, Test, Composants actifs, QTE (mg/cup.), and a reference value. Rows include GAL, GLU, FRU, MNE, SBE, RHA, DAL, INO, MAN, SCR.

Bande 20 - 29

Table with 5 columns: Tube, Test, Composants actifs, QTE (mg/cup.), and a reference value. Rows include MDM, MDG, NAG, AMY, ARB, ESC, SAL, CBL, MAL, LAC.

Bande 30 - 39

Table with 5 columns: Tube, Test, Composants actifs, QTE (mg/cup.), and a reference value. Rows include MEL, SAC, TRE, INU, MLZ, RAF, AMD, GLYG, XLT, GEN.

Bande 40 - 49

Table with 5 columns: Tube, Test, Composants actifs, QTE (mg/cup.), and a reference value. Rows include TUR, LYX, TAG, DFUC, LFUC, DARL, LABL, GNT, ZKG, SKG.

Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Milieu d'inoculation : API 50 CHL Medium (Réf. 50 410), API 50 CHBE Medium (Réf. 50 430), produits mentionnés dans les notices de ces milieux ou autre milieu adapté.
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- McFarland Standard (Réf. 70 900) ou DENSIMAT (Réf. 99 234) ou Densitomètre ATB®
- Logiciel d'identification (consulter bioMérieux)

Matériel :

- Pipettes ou PSpipettes
- Portoir pour ampoules
- Protège-ampoules
- Ecouvillons
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic in vitro et pour contrôle microbiologique.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec des précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée par un personnel compétent et averti. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "NCCLS M29-A, Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissues; Approved Guideline - December 1997". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'origine.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage des différents composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Les performances sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 50 CH ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine cliniques ou autre. Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

MODE OPERATOIRE

Selon le milieu utilisé, API 50 CHL Medium ou API 50 CHBE Medium, lire attentivement la notice correspondante.

Préparation des galeries

- Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.
- Préparer une boîte d'incubation (fond et couvercle).
- Inscrive la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.)
- Répartir environ 10 ml d'eau distillée ou déminéralisée (ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl2, CO2 ...)) dans les aréoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- Sortir les bandes de leur emballage, séparer en deux les bandes 0-19 et 20-39 et les déposer dans le fond de la boîte d'incubation.
- Compléter la galerie avec la bande 40-49.

Préparation de l'inoculum

- Couvrir le microorganisme sur un milieu adapté à sa croissance.
- Vérifier la pureté de la souche.
- Récolter cette culture par écouvillonnage d'un milieu solide, ou par centrifugation d'un milieu liquide.
- Préparer l'inoculum dans le milieu approprié (voir notices API 50 CHL Medium et API 50 CHBE Medium). Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

Inoculation des galeries

- Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes :
- Incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation.
- Éviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule.
- Lorsque le tube seul doit être inoculé, ne pas dépasser la limite supérieure du tube afin de conserver une bonne anaérobiose.
- Lorsque le tube et la cupule doivent être complètement remplis, éviter la formation d'un ménisque concave ou convexe.
- Incuber les galeries à la température optimum de croissance du groupe de microorganismes étudiés : 30°C, 37°C, 55°C.

LECTURE ET INTERPRETATION

Lecture des galeries

La lecture des galeries est réalisée à des temps d'incubation définis (24 h, 48 h par exemple), dépendant du microorganisme et du type de réaction étudié.

Interprétation

Interpréter chaque test (positif (+), négatif (-), douteux (?)) et les noter sur la fiche de résultats.

CONTROLE DE QUALITE

Les galeries font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique des tests de la galerie est de plus réalisable par l'utilisateur.

Pour Lactobacillus : avec la souche Lactobacillus paracasei ssp paracasei NFCB 206 ou ATCC BAA-52 (avec API 50 CHL Medium)

Control table for Lactobacillus with 49 tubes and 48 results.

Pour Bacillus : avec la souche Bacillus polymyxa (C) ATCC 43865 (avec API 50 CHBE Medium)

Control table for Bacillus with 49 tubes and 48 results.

(C) Bacillus polymyxa identifié à Enterobacillus polymyxa sur API 50 CH et API 50 CHBE Medium.

Pour Enterobacteriaceae : avec la souche Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae ATCC 35657 (avec API 50 CHBE Medium)

Control table for Enterobacteriaceae with 49 tubes and 48 results.

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

NCFB : National Collection for Food Bacteria (NCDO), Institute of Food Research, Reading Laboratory, Earley Gate, Reading RG6 6BZ, ENGLAND.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

LIMITES DU TEST

- Toute identification d'espèces non répertoriées dans les bases de données API 50 CHL et API 50 CHBE est sous la responsabilité de l'utilisateur.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

RESULTATS ATTENDUS

Se référer aux tableaux d'identification des milieux associés à cette galerie pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

BIBLIOGRAPHIE

p. 1

PERFORMANCES

Se référer aux performances des milieux associés à cette galerie.

ELIMINATION DES DECHETS

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.



bioMérieux® sa
49 rue du Capitaine Lacroix 94155 Le Kremlin-Bicêtre Cedex
673 620 399 RCS LYON
69280 Marcy l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 90
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
http://www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc
Box 15969
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11
http://www.biomerieux.com



Imprimé en France

Le logo est une marque déposée et protégée qui est la propriété exclusive de bioMérieux sa ou de l'une de ses filiales.