

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة جيلالي بونعاما  
Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana  
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre  
Département de biologie



*Mémoire de fin d'études*

En vue de l'obtention de diplôme de **Master** en

**Domaine** : sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre

**Filière** : sciences biologiques

**Spécialité** : microbiologie appliqué

## *Potentiel probiotique des Lactobacilles*

**Présenté par :**

- M<sup>lle</sup> Bourahli Fatma zohra
- M<sup>lle</sup> Kouider Moussaoui Manel

**Devant le jury :**

M <sup>me</sup> Bensehila, S	MCA	Président	(U.D.B Khemis Miliana)
M <sup>me</sup> Sadi, F	MCA	Promoteur	(U.D.B Khemis Miliana)
M <sup>me</sup> Zaouadi, N	MCB	Co-promoteur	(U.D.B Khemis Miliana)
M <sup>me</sup> Mostapha Sari, F	MCB	Examineur	(U.D.B Khemis Miliana)

**Année universitaire : 2021/2022**

## REMERCEMENTS

*Bien que la réalisation d'un mémoire ait toute l'apparence d'un long parcours universitaire solitaire, diverses personnes ont contribué à différents degrés à mener à bien ce projet par fois périlleux, avec ses hauts et ses bas.*

❖ *Nous Remercions, en premier lieu, Allah pour nous avoir donné la force, le courage et la résolution pour réaliser ce travail.*

❖ *Nous tenons aussi à remercier notre promotrice Dr SADI-F pour l'honneur qu'il nous a fait d'accepter de diriger ce travail et de nous avoir fait bénéficier de son expérience.*

❖ *Exclusifs remerciements vont aussi aux membres du Jurys*

- *Dr BENSEHAILA S, Merci Madame de nous avoir fait l'honneur de présider ce Jury*

- *Dr MOSTAPHA SARI F, Merci madame d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et de contribuer à améliorer sa qualité.*

❖ *L'ensemble des enseignants de notre faculté SNV*

❖ *Toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## **DEDICACE**

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes chers parents,*

*Qui m'ont éclairée le chemin de la vie par leurs grands soutiens, leurs encouragements, par leurs dévouements exemplaires et les énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et toujours aimé me voir réussir, je les remercie pour tout ce qu'ils m'ont fait. Je le souhaite une très longue vie, pleine de santé et de prospérité INCHAALLAH*

*Moi-même*

*Sur mon courage et ma volonté de compléter malgré les contraintes que j'avais pendant les cinq années de ce cursus universitaire*

*Ma chère sœur*

*SOUDJOURD*

*Mes chers frères*

*AYOUB CHEMSEDDINE SOFIANE*

*Tous les membres de ma famille BOURAHLI*

*Mon collègue de travail*

*BELKACEM*

*Ma merveilleuse copine et binôme de travail*

*MANEL et sa famille*

*A tous mes amies sans exceptions*

*A Tous les étudiants de ma promotion master 2 microbiologie appliquée*

## **DEDICACE**

*Je dédie le présent travail à mon défunt père puisse-t-il reposer en paix et avoir la toute miséricorde de Dieu tout-puissant. Ainsi qu'à ma mère, mon amour pour son dévouement, sa gentillesse, son courage et son soutien durant tant d'années. Que Dieu la garde pour nous.*

*A ma grand-mère et mon grand-père,*

*Que Dieu ait pitié d'eux, qui m'ont beaucoup accompagné durant mon parcours scolaire,*

*À ma tante Al-Zahra mon amour,*

*À mes frères,*

*La prunelle de mes yeux, en particulier Bilal,*

*À mes sœurs bien-aimées*

*Hajar Ikram et Aya, Je les remercie pour leur soutien et leur aide à moi,*

*Mes adorables neveux et nièces*

*Rahma, Israa, Ghufra, Waseem, Nadhir et poussin Ibrahim. Je leur souhaite le meilleur et le succès dans leur vie*

*A tous mes chers amis*

*Fatima Al-Zahra qui m'a soutenu dans mon parcours universitaire, également soraya, marwa, khawla, asma, nour el houda, ibtissem, fella, sara*

*Et tous ceux que je n'ai pas cités mais que je garde dans ma mémoire et mon cœur.*

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : principaux groupes formés au sein du genre <i>Lactobacillus</i> sur la base des caractéristiques phénotypiques (Saaad, 2010).....	7
<b>Tableau 2</b> : Différents systèmes de transport des sucres chez certains Lactobacilles (Hurkins, 2001) .....	11
<b>Tableau 3</b> : Principaux critères utilisés pour la sélection des probiotiques (Alegre, 2009). .....	16
<b>Tableau 4</b> : Quelques souches de Lactobacilles probiotiques et leurs effets cliniques. Adapté de Mattila-Sandholm et al., (1999). .....	26

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Observation au microscope électronique du genre <i>Lactobacillus</i> .....	5
<b>Figure 2</b> : Voie de la glycolyse relative à l'utilisation du glucose chez les bactéries lactiques (voie d'Embden- Meyerhof Parnas) (Grattepanche, 2005) .....	8
<b>Figure 3</b> : Différents systèmes de transport chez Lactobacille (Grattepanche, 2005).....	9
<b>Figure 4</b> : Voie des pentoses phosphate (Hutkins, 2001).....	10
<b>Figure 5</b> : Voie du tagatose (à gauche) et voie de Leloir (à droite) (Hutkins, 2001). .....	11
<b>Figure 6</b> : Système de protéolyse des Lactobacilles (Grattepanche, 2005).....	12
<b>Figure 7</b> : Mécanismes d'action des probiotiques contre les microorganismes pathogènes (Kaur et al., 2002).....	18
<b>Figure 8</b> : Repiquage des souches de lactobacilles .....	29
<b>Figure 9</b> : Schéma de la standardisation des souches de lactobacilles .....	33

## Liste des abréviations

**ATB** : Antibiotique  
**ADH**: Arginine déshydrogénase  
**ATP**: Adénosine tri phosphate  
**ATPase** : Enzyme qui dégrade l'Atp  
**B**: *Bifidobacterium*  
**BAL** : Lactic Acid Bacteria  
**BCP** : Pourpre de bromocérol  
**C°** : Degrés Celsius  
**E** : *Esherichia*  
**EC** : *Enterococcus*  
**FAO** : Food and Agriculture Organization  
**H**: *Helicobacter*  
**h** : Heure  
**IFN** : Interfon  
**Ig** : Immunoglobuline  
**IL** : Interferon  
**KPC** : *Klebsilla*  
**LB** : *Lactobacillus*  
**LC** : *Lactococcus*  
**LDL** : low Density lipids  
**K** : Natural Killers  
**OMS** : Organisation Mondiale de la santé  
**P** : *Pediococcus*  
**PH** : Potentiel hydroélectrique  
**S** : *Staphylococcus*  
**SP** : speciess  
**Str** : *Streptococcus*  
**Subsp** : sub specie (sous espèce)  
**T** : Temps  
**TH** : Timor human  
**UFC** : Unité formant colonie

# Table des matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction .....	1
Chapitre I : Lactobacilles .....	4
1. Bactéries lactiques .....	4
2. Lactobacilles .....	4
2.1. Propriétés générales .....	4
2.2. Taxonomie.....	5
2.3. Métabolismes des lactobacilles.....	8
2.3.1 Métabolisme des sucres.....	8
2.3.2. Activité protéolytique.....	12
2.4. Intérêts des lactobacilles .....	13
Chapitre II : Probiotiques .....	14
1. Historique et définition .....	14
2. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques .....	15
2.1. Résistance à l'acidité gastrique .....	16
2.2. Résistance aux sels biliaires .....	16
2.3. Adhésion aux cellules épithéliales .....	16
2.4. Production de substances antimicrobiennes .....	17
2.5. Résistance aux antibiotiques .....	17
2.6. Critères technologiques.....	17
3. Propriété probiotique des lactobacilles .....	17
3.1. Diminution de la diarrhée associée à l'antibiothérapie.....	19
3.2. Réduire l'intolérance au lactose .....	19
3.3. Inhibition des bactéries pathogènes.....	20
3.4. Effet sur l'immunité systémique et intestinale.....	21
3.5. Action sur le syndrome d'irritabilité intestinale chronique .....	22
3.6. Réduction des allergies alimentaires.....	22
3.7. Effet anti cancérigène.....	23
3.8. Probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin.....	23
3.9. Effet sur les diarrhées à rota-virus et sur les diarrhées du voyageur .....	23

<b>3.10. Réduction du cholestérol sérique .....</b>	<b>24</b>
<b>3.11. Probiotiques et la perméabilité intestinale .....</b>	<b>24</b>
<b>3.12. Probiotiques et la motilité de l'intestin .....</b>	<b>25</b>
<b>Chapitre I : Matériels et Méthodes .....</b>	<b>28</b>
<b>1. Matériel .....</b>	<b>28</b>
<b>1.1. Matériel biologique .....</b>	<b>28</b>
<b>1.2. Milieux de culture .....</b>	<b>28</b>
<b>1.3. Produits chimiques et réactifs .....</b>	<b>28</b>
<b>2. Méthodes .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1. Revivification des souches .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2. Vérification de la pureté .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3. Examen macroscopique et microscopique .....</b>	<b>29</b>
<b>2.4. Conservation des souches .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.1. Conservation à court terme .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.2. Conservation à longs terme .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4. Quelques tests biochimiques .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5. Etude du potentiel probiotique .....</b>	<b>32</b>
<b>2.5.1. Standardisation des inocula .....</b>	<b>32</b>
<b>2.5.2. Résistance aux sucs gastriques: .....</b>	<b>33</b>
<b>2.5.3. Résistance aux sels biliaires .....</b>	<b>34</b>
<b>2.5.4. Résistance aux enzymes pancréatiques .....</b>	<b>34</b>
<b>2.5.5. Pouvoir inhibiteur .....</b>	<b>34</b>
<b>Chapitre II : Résultats et Discussion .....</b>	<b>36</b>
<b>1. Souches bactériennes .....</b>	<b>36</b>
<b>2. Caractères généraux des lactobacilles .....</b>	<b>36</b>
<b>3. Evaluation du potentiel probiotique .....</b>	<b>37</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>40</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>42</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>51</b>

## Résumé

Les probiotiques sont définis comme étant des suppléments nutritionnels composés de micro-organismes précis, vivants, en quantité suffisante et capable d'éliminer le microbiote intestinal de l'hôte. L'activité de certaines souches lactiques à caractère probiotique est exploitée pour produire des aliments fonctionnels à caractères préventifs et thérapeutiques. Dans ce travail nous avons axé notre recherche sur le potentiel probiotique de quelques souches du genre *Lactobacillus*. Les techniques microbiologiques ont été utilisées pour accomplir ce travail. D'une manière générale, et selon les travaux antérieurs, plusieurs souches de lactobacilles montrent une capacité à résister aux stress acide, basique et enzymatique, elles possèdent aussi une bonne activité inhibitrice contre les germes pathogènes, qui sont de facteur de risque du premier rang des intoxications alimentaires et des problèmes de sanitaires, à l'égard de (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, et *Salmonella*). Les lactobacilles groupe lactique très hétérogène, ont clairement prouvés leurs potentiels probiotiques.

**Mots clés :** probiotiques, *Lactobacillus*, stress acide, basique, enzymatique, activité inhibitrice.

## ملخص

يتم تعريف البروبيوتيك على أنها مكملات غذائية تتكون من كائنات دقيقة حية محددة بكميات كافية وقادرة على القضاء على الجراثيم المعوية للمضيف. يتم استغلال نشاط سلالات بروبيوتيك لاكتيك معينة لإنتاج أغذية وظيفية بخصائص وقائية وعلاجية. في هذا العمل ، ركزنا بحثنا على إمكانات الكائنات الحية المجهرية لبعض سلالات جنس *Lactobacillus*. تم استخدام التقنيات الميكروبيولوجية لإنجاز هذا العمل بشكل عام ، ووفقاً للعمل السابق ، تظهر العديد من سلالات العصيات اللبنية القدرة على مقاومة الإجهاد الحمضي والقاعدي والإنزيمية ، كما أن لها نشاطاً مثبطاً جيداً ضد الجراثيم المسببة للأمراض ، والتي تعد عوامل خطر من الدرجة الأولى كالتسمم الغذائي و من هاته الميكروبات نذكر على وجه الخصوص (*Salmonella* و *Pseudomonas* ، *Escherichia coli* ، *Staphylococcus aureus*) ومنه نستنتج الامكانات البروبيوتكية لهاته السلالة.

**الكلمات المفتاحية :** البروبيوتيك ، العصيات اللبنية ، الإجهاد الحمضي ، النشاط الأساسي ، الأنزيمي ، المثبط.

## Abstract

Probiotics are defined as nutritional supplements composed of specific, live microorganisms, in sufficient quantity and capable of eliminating the intestinal microbiota of the host. The activity of certain probiotic lactic strains is exploited to produce functional foods with preventive and therapeutic characteristics. In this work we focused our research on the probiotic potential of some strains of the genus *Lactobacillus*. Microbiological techniques were used to accomplish this work. In general, and according to previous work, several strains of lactobacilli show an ability to resist acid, base and enzymatic stress, they also have a good inhibitory activity against pathogenic germs, which are first-rate risk factors. food poisoning and sanitary problems, with regard to (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, and *Salmonella*). *Lactobacilli*, a very heterogeneous lactic group, have clearly demonstrated their probiotic potential.

**Key words:** probiotics, *Lactobacillus*, acid stress, basic, enzymatic, inhibitory activity.

# *Introduction*

---

### Introduction

L'alimentation est susceptible de moduler diverses fonctions de l'organisme, et peut aussi contribuer à diminuer le risque de certaines pathologies. Ces dernières années plusieurs études ont été entreprises afin d'évaluer l'impact sur la santé de certaines composantes de l'alimentation à caractère non nutritionnel telles que les micronutriments, les probiotiques.

Les bactéries lactiques sont présentes depuis toujours dans l'alimentation Humaine et ont souvent montré un effet bénéfique sur la santé et en particulier sur l'équilibre de la flore intestinale ([Gournier-Château et al., 1994](#)). Ces derniers temps un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation des bactéries lactiques ayant des effets probiotiques et pharmaceutiques à travers le monde ([Wunwissa et al., 2003](#)). En Algérie, un intérêt particulier a été donné aux bactéries lactiques locales, dont assez de travaux sur ces bactéries des laits crus, ont été publiés ([Guessas et Kihal, 2004](#) ; [Badis et al., 2005](#) ; [Idoui, 2008](#)).

Les lactobacilles sont des bactéries lactiques représentatifs du microbiote intestinal bénéfique de l'Homme et par conséquent sont les microorganismes les plus en vue en tant que probiotiques ([Midassirou et al., 2012](#)). Les probiotiques sont définis comme « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, confèrent des effets bénéfiques pour l'hôte » ([FAO/OMS, 2001](#)).

Certains probiotiques modifient la glycosylation apicale des cellules épithéliales, ce qui peut être associé à l'inhibition, observée avec certains probiotiques, de l'adhérence apicale intestinale de divers micro-organismes pathogènes

Les effets immunomodulateurs observés ont été souvent associés à la consommation de souches probiotiques vivantes. Cependant, des études récentes ont montré que certains probiotiques non viables sont également capables d'exercer des effets similaires sur le système immunitaire. En effet, il a été mentionné dans la littérature que des lysats cellulaires de souches probiotiques (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Bifidobacterium lactis*, et *Streptococcus thermophilus*) ont des effets immunorégulateurs ([Pessi et al., 1999](#); [Bautista-Garfias et al., 2001](#); [Kankaanpa et al., 2003](#)

Le présent travail se focalisera sur les propriétés probiotiques des souches de lactobacilles isolés à partir du lait cru.

Ces effets positifs sont le soulagement des maladies d'origine digestive (comme l'intolérance au lactose), l'amélioration du transit intestinal, et la prévention de certaines maladies comme l'augmentation du taux de cholestérol dans le sang, les diarrhées, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), le cancer du côlon, ainsi que d'autres infections d'origine microbienne (infections à *Clostridium difficile* et à *Campylobacter*), ils peuvent également modifier le microbiote intestinal par activité antimicrobienne.

# *Revue bibliographique*

---

## **Chapitre I : Lactobacilles**

### **1. Bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène d'organismes gram positifs, non sporulant et qui ferment les sucres pour produire de l'acide lactique. Leur habileté à réduire le pH par la production d'acide issue de leur métabolisme fermentatif conduit au développement de propriétés organoleptique très recherchées, à la prévention de la croissance de microorganismes pathogène et à l'élaboration d'un produit final sain (Durlux-Ozkaya *et al.*, 2001). Leur utilisation est apparue depuis des millénaires, dans la fabrication des aliments comme les fromages les charcuteries, les boissons fermentées, le pain au levain, les sauces, les légumes fermentés. Elles permettent, de par leur métabolisme, d'augmenter la durée de conservation d'origine des denrées et leur confèrent une saveur et une texture différent (Badis *et al.*, 2006). Les bactéries lactiques sont considérées comme des microorganismes non pathogènes. Depuis longtemps les bactéries lactiques sont devenues les principaux candidats probiotiques et bénéficient d'un statut GRAS (Regarded As Safe) (Belgnaoui, 2006).

### **2. Lactobacilles**

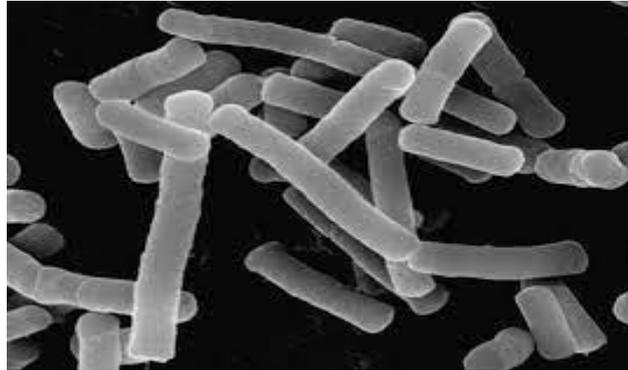
#### **2.1. Propriétés générales**

Les lactobacilles regroupent de nombreuses espèces bactériennes omniprésentes dans la nature, mais rarement pathogènes, dont les principales caractéristiques sont d'être : Gram positif, catalase négatif, en forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chaînes (figure 1). Quelquefois très longues, immobiles, asporogènes, anaérobie facultatives ou microaérophiles et inaptes à réduire le nitrate et hydrolyser la gélatine (de Roissart et luquet, 1994).

Les lactobacilles ont un métabolisme soit homofermentaire avec production uniquement d'acide lactique à partir du glucose, soit hétérofermentaire avec production d'acide lactique, d'acide acétique et de CO<sub>2</sub> (Hammes et Vogel, 1995 ; Desai, 2008). En outre et un large spectre de température de croissance (2 à 53 °C). Elles sont acidophiles avec un pH optimal de croissance de 5.5 à 6.2 (de Roissart et Luquet, 1994)

Ils sont isolés de divers niches écologiques, et sont principalement retrouvés dans les substrats riches en hydrates de carbone, ainsi que dans d'autres habitats tel que les

muqueuses de l'homme et de l'animal (cavité buccale, intestinale et vaginale), ils sont retrouvés en faibles quantités sur les végétaux mais s'y développent rapidement lorsqu'ils sont abimés (Hammes et Vogel, 1995 ; Tailliez, 2004).



**Figure 1 :** Observation au microscope électronique du genre *Lactobacillus*  
(Gagnon, 2007)

## 2.2. Taxonomie

Les lactobacilles sont groupés dans la subdivision des bactéries gram positif à GC % inférieur à 50% et classées dans le phylum des frimicutes, la classe des bacilli, l'ordre des lactobacilles et la famille des *Lactobacillaceae* (Hammes et Hertel, 2009).

Le genre *Lactobacillus* représente le plus large groupe des bactéries lactiques, il contient le plus grand nombre d'espèces qui peuvent être isolées de différents biotopes (humains, animaux, plantes...etc) (Stilles et Holzapfel, 1997). Le genre *Lactobacillus* contient un assemblage divers de 140 espèces avec des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles. Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt et al., 2000 et Singh et al., 2009). Cette différence pourrait s'expliquer par un pH optimal plus faible pour l'enzyme chargée de réguler le pH intracellulaire (translocation de protons par une ATPase) chez les lactobacilles.

Le genre *Lactobacillus* a été divisé dès 1919 par Orla –jensen en trois sous genres : *Thermobacterium*, *strptobacterium* et *Betabacterium*, suivant des critères de température

optimale de croissance et de produit de fermentation des sucres. Cette subdivision a été confirmée par les travaux de [Buyz et al., \(1957\)](#) qui ont montré que ces groupes possèdent des équipements enzymatiques différents. Néanmoins, les travaux de taxonomies moléculaire ont incité [Kandler et Weiss., \(1986\)](#) à abandonner la classification en sous-genre ([de Roissart et Luquet, 1994](#)).

Afin d'essayer de combiner les définitions de groupe de Kandler et Weiss (1986) avec le groupement basé sur le rapport phylogénétique, les espèces ont été réarrangées suivant les groupes A, B, C correspondant aux groupes respectifs 1,2,3 de Kandler et de Weiss (1986) ([Hammes et Vogel, 1995](#)) (Tableau 1) ([de Roissart et Luquet, 1994](#)) :

- **Groupe 1/A** : formé de lactobacilles homofermentaire stricts qui fermentent les hexoses, par la voie d'Embden –Meyerhof, en presque exclusivement du lactate, mais ne ferment ni les pentoses ni les gluconates.
- **Groupe 2/b** : formé de lactobacilles hétérofermentaire facultatifs qui fermentent les hexoses, par voie d'Embden-Meyerhof, en presque exclusivement du lactate, et peuvent fermenter les pentoses en lactate et acétate par une phosphokétolase inductible.
- **Groupe 3/c** : formé de lactobacilles hétérofermentaire stricts qui fermentent les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol) et CO<sub>2</sub> et qui fermentent les pentoses en lactate et acétate, en faisant appel dans les deux cas à une phosphokétolase

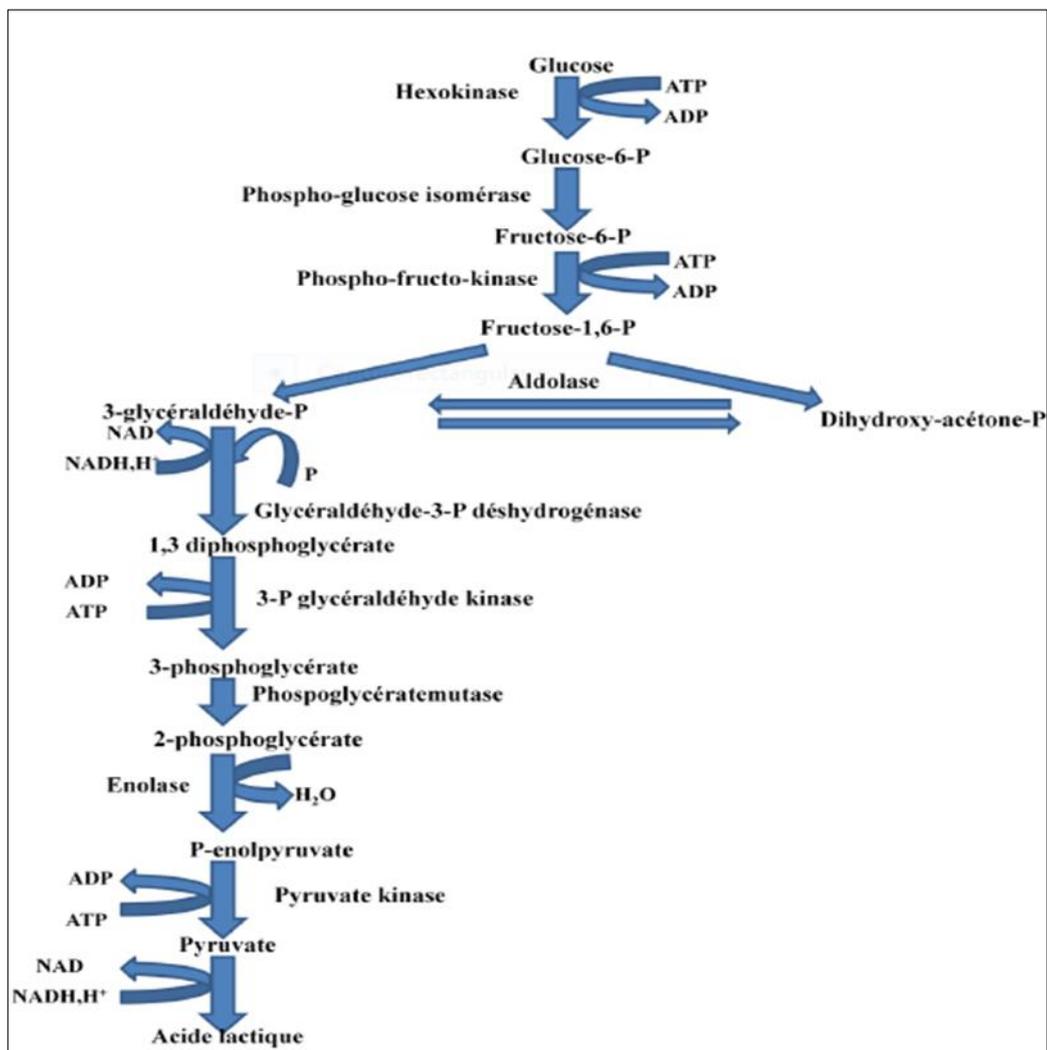
**Tableau 1** : principaux groupes formés au sein du genre *Lactobacillus*, sur la base des caractéristiques phénotypiques (Saaad, 2010).

<b>Groupe 1</b>	<b>Groupe 2</b>	<b>Groupe 3</b>
<b>Homo-fermentaires strictes</b>	<b>Hétéro-fermentaires facultatifs</b>	<b>Hétéro-fermentaires strictes</b>
<i>Lb.acidophilus</i>	<i>Lb. acetotolerans</i>	<i>Lb.brevis</i>
<i>Lb.amylophilus</i>	<i>Lb.agilis</i>	<i>Lb.buchneri</i>
<i>Lb.amylovorus</i>	<i>Lb.alimentarius</i>	<i>Lb.collinoides</i>
<i>Lb.aviarius</i> subsp <i>.araffinosus</i>	<i>Lb.bifermentans</i>	<i>Lb.fermentum</i>
<i>Lb.aviarius</i> subsp. <i>Aviarius</i>	<i>Lb.casei</i>	<i>Lb.fructivorans</i>
<i>Lb.crispatus</i>	<i>Lb.coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	<i>Lb.fructosus</i>
<i>Lb.delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus.</i>	<i>Lb.cuvatus</i>	<i>Lb.hilgardii</i>
<i>Lb.delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i>	<i>Lb.graminis</i>	<i>Lb.kefir</i>
<i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb.hamsteti</i>	<i>Lb.malefermentans</i>
<i>Lb.farciminis</i>	<i>Lb.homohiochii</i>	<i>Lb.oris</i>
<i>Lb.gallinarum</i>	<i>Lb.intestinalis</i>	<i>Lb.panis</i>
<i>Lb.gasserie</i>	<i>Lb.murinus</i>	<i>Lb.parabuchneri</i>
<i>Lb.helveticus</i>	<i>Lb.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lb.parakefir</i>
<i>bL.jensenii</i>	<i>Lb.paracasei</i> subsp <i>tolerans</i>	<i>Lb.pontis</i>
<i>Lb.johnsonii</i>	<i>Lb.paraplantarum</i>	<i>Lb.reuteri</i>
<i>Lb.Kefiranofciens</i>	<i>Lb.palantarum</i>	<i>Lb.sanfrancisco</i>
<i>Lb.mali</i>	<i>Lb.pentosus</i>	<i>Lb.suebicus</i>
<i>Lb.ruminis</i>	<i>Lb.rhamnusus</i>	<i>Lb.vaccinostercus</i>
<i>Lb.salivarius</i> subsp. <i>salicinus</i>	<i>Lb.sake</i>	<i>Lb.vaginalis</i>
<i>Lb.salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>		

## 2.3. Métabolismes des lactobacilles

### 2.3.1 Métabolisme des sucres

Les lactobacilles utilisent généralement pour le métabolisme des sucres soit la voie d'Embden-Meyerhof Parnas (EMP) soit la voie des pentoses-phosphate perméase/ $\beta$ -galactosidase (lac-Perm/ $\beta$ -gal) pour le métabolisme de ce sucre (Hutkins, 2001) (figure 4). La première, et peut-être la plus importante étape consiste dans le transport des carbohydrates jusqu'à la membrane cytoplasmique et leur accumulation ultérieure au niveau du cytoplasme. Cela dit, la plupart des cultures starter ne possèdent pas de système phosphotransférase (PTS) pour le métabolisme du lactose, et son contraints d'utiliser un système lactose (figure 2).



**Figure 2:** Voie de la glycolyse relative à l'utilisation du glucose chez les bactéries lactiques (voie d'Embden- Meyerhof Parnas) (Grattepanche, 2005)

Certaines espèces de *Lactobacillus*, comme *Lb. casei*, possèdent les deux systèmes (PTS et lac- Perm/ $\beta$ -gal. Le tableau 2 et la figure 3 résume les différents systèmes de transport quelques espèces de lactobacilles (Grossiord et al., 1998).

Il est important de souligner que les espèces qui utilisent le système lac-Perm/ $\beta$ -gal ne laissent pas le galactose à l'état libre, elles le fermentent réduisant ainsi la production d'arômes indésirables. Pour certains lactobacilles qui transportent le lactose via le système PTS, le galactose-6-phosphate (G-6-P) résultant de l'hydrolyse du lactose-phosphate par la phospho- $\beta$ -galactosidase, est directement utilisé par la voie du tagatose (Hutkins, 2001). Quand le galactose s'accumule dans le cytoplasme par le galactose perméase, il est enfin incorporé dans la voie de Leloir, qui phosphoryle le galactose, celui-ci est ensuite converti de galactose-1-P en galactose-6-P et rentre directement dans la glycolyse (de Vos, 1996 et Hutkins, 2001).

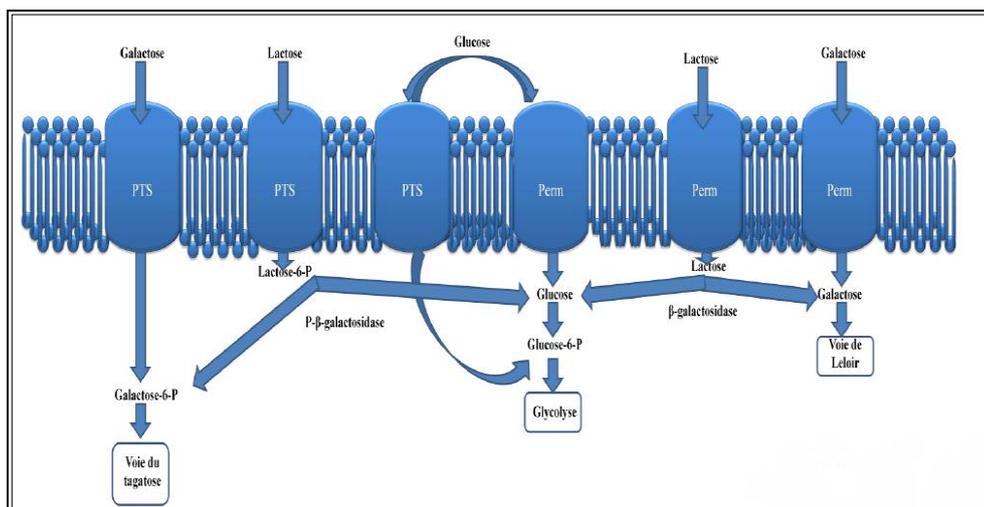


Figure 3 : Différents systèmes de transport chez Lactobacille (Grattepanche, 2005)

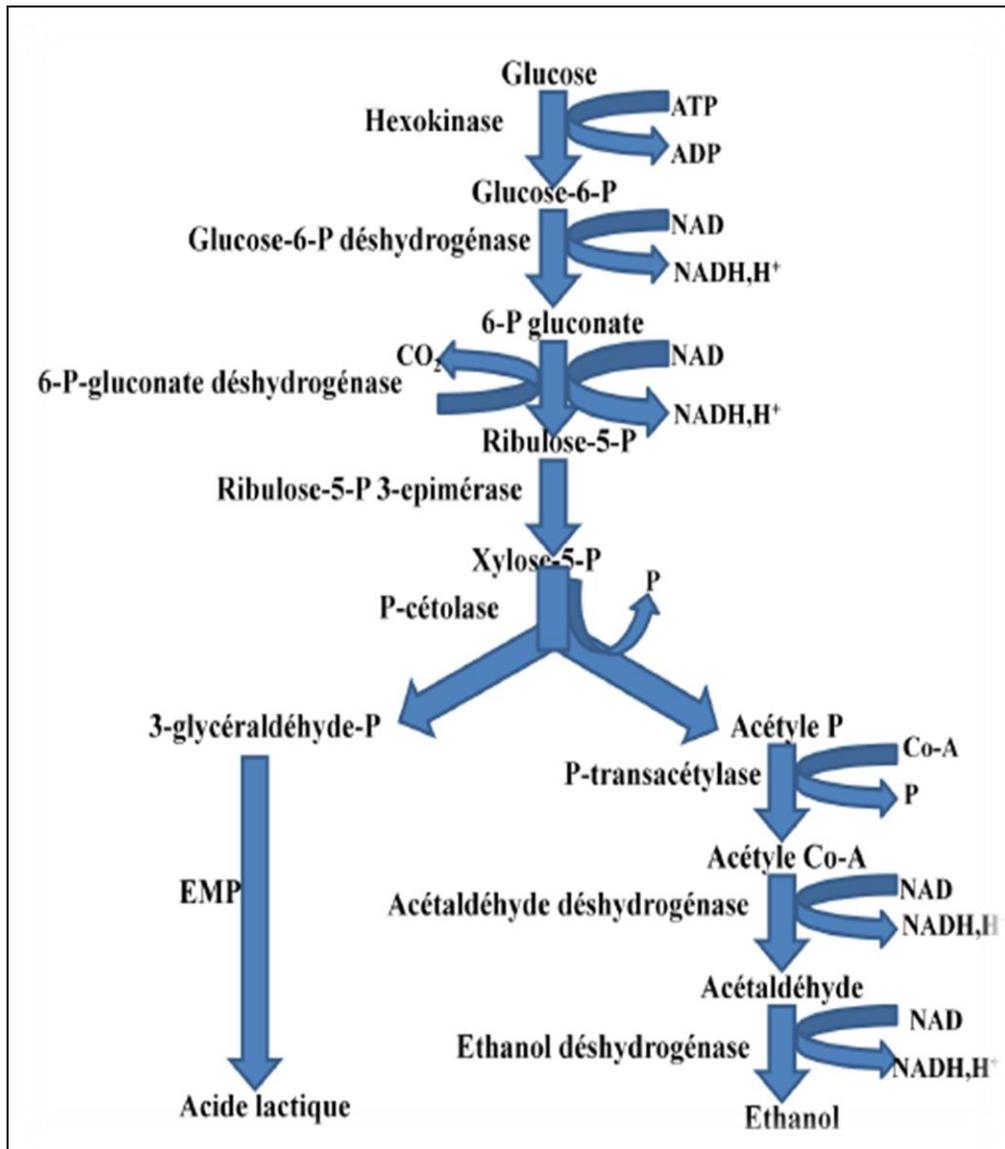
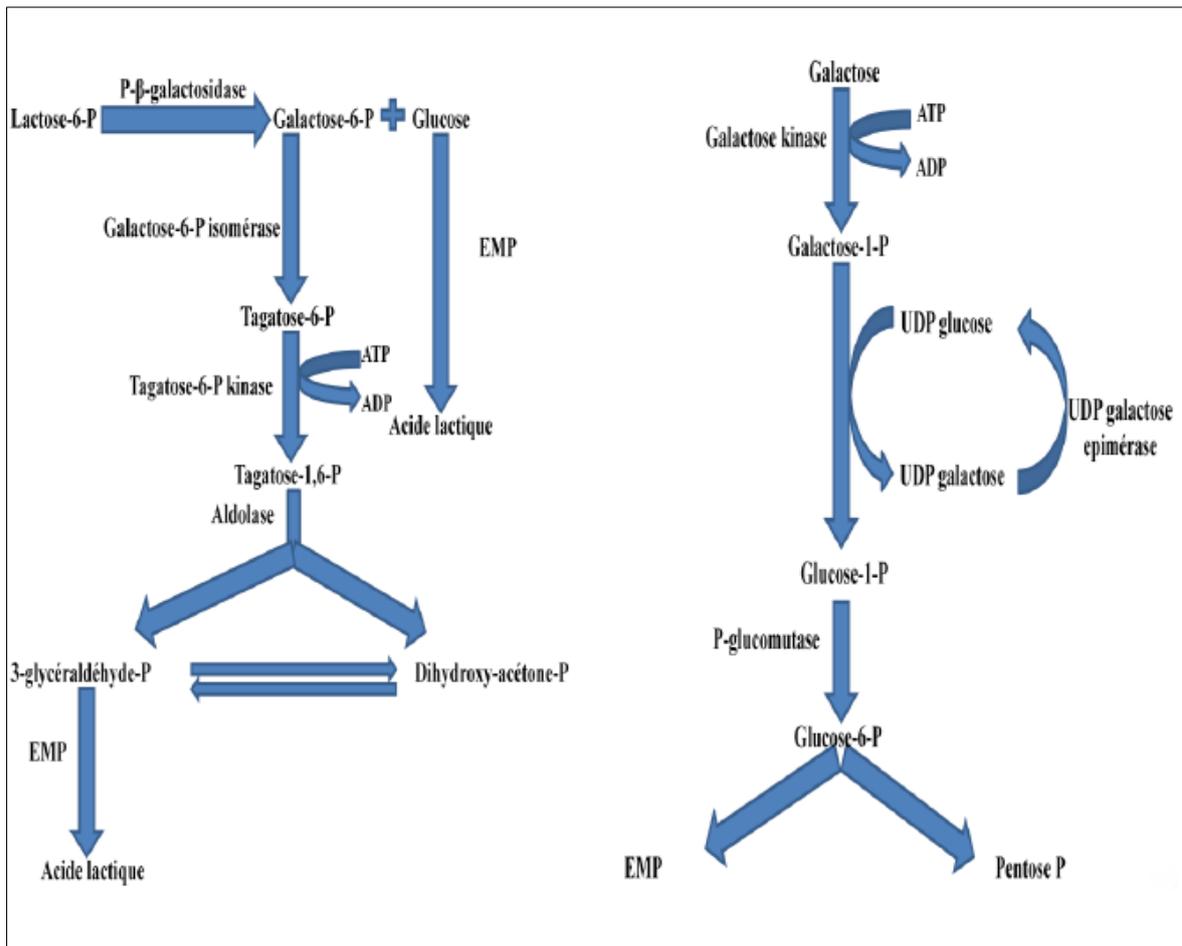


Figure 4: Voie des pentoses phosphate (Hutkins, 2001)



**Figure 5:** Voie du tagatose (à gauche) et voie de Leloir (à droite) (Hutkins, 2001).

**Tableau 2:** Différents systèmes de transport des sucres chez certains Lactobacilles (Hurkins, 2001)

Souches	Système de transport du lactose	Voie d'utilisation du galactose
<i>Lb. Delbrukii subsp bulgaricus</i>	Lactose-perméase	Leloir
<i>Lb. helveticus</i>	Lactose-perméase	Leloir
<i>Lb. Casei</i>	PTS,lactose-perméase	Leloir, tagatose

### 2.3.2. Activité protéolytique

Les lactobacilles sont auxotrophes à plusieurs acides aminés et doivent obtenir les acides aminés nécessaires du milieu où ils croissent. La quantité d'acides aminés et de peptides de petit poids moléculaire présents dans le lait ne suffisent pas à une grande densité microbienne, et pour contrer cela, les espèces du genre *Lactobacillus* ont besoin d'un système de protéolyse pour tirer le maximum d'acides aminés de la caséine (Pritchard et Coolbear, 1993 ; Chen et Steele, 2004). A l'inverse des lactocoques, le système de protéolyse des lactobacilles est très peu étudié. Toutefois, les voies métaboliques empruntées par ces deux genres bactériens semblent relativement proches (Pritchard et Coolbear, 1993). La protéolyse est cependant plus prononcée pour les lactobacilles (Marilley et Casey, 2004). L'intérêt porté à l'étude de l'activité protéolytique des lactobacilles s'est développé rapidement, ceci est dû à la découverte de plusieurs espèces de ce genre considérées comme des cultures non-starter dans différents fromages à pâte dure (Fira et al., 2001). L'activité protéolytique peut se résumer en trois points essentiels. Le premier consiste en l'hydrolyse de la caséine en une large collection de peptides (figure 6). Dans la seconde étape, les peptides sont transportés dans la cellule par l'un des plus importants systèmes de transport. Une fois à l'intérieur, les peptides sont ensuite hydrolysés par un large groupe de peptidases en acides aminés libres qui seront soit métabolisés en protéines, soit assimilés (Hutkins, 2001).

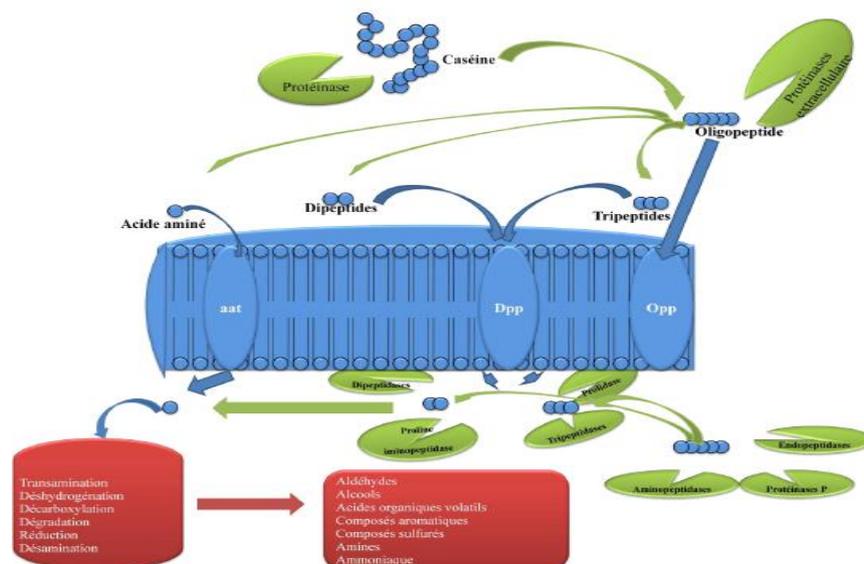


Figure 6: Système de protéolyse des *Lactobacilles* (Grattepanche, 2005)

## **2.4. Intérêts des lactobacilles**

Étant donné la diversité de propriétés métaboliques présentées par les membres du genre *Lactobacillus* ces bactéries ont été trouvées dans un certain nombre de produits alimentaires fermentés. Dans ces produits, les lactobacilles contribuent principalement à leur conservation, ou l'amélioration de leurs saveurs ou leurs propriétés nutritionnelles. Ces souches sont ajoutées en tant que démarreurs délibérés ou participent à la fermentation en raison de leur présence en tant que contaminations naturels des substrats (Givry, 2006).

Une autre propriété des lactobacilles qui est devenue très appréciées est leur pouvoir antimicrobien. En effet, selon plusieurs auteurs (de Roissart et Luquet, 1995, Collado et al., 2009, Bendali, 2009 ; Bendjeddou, 2013) l'activité antimicrobienne des lactobacilles est due à la production de plusieurs substances qui sont : les acides organiques, le diacetyl, le peroxyde d'hydrogène, et la production de bactériocines.

L'incorporation de bactéries probiotiques se fait dans différents produits agroalimentaires, mais l'industrie laitière reste la plus utilisée autant que véhicule pour l'administration de probiotiques, et le yaourt représente l'élément far de ce groupe (Lourens-Hatting et Viljeon, 2001 ; Tamime et al., 2005 et Damini et al., 2007)

Les bactéries lactiques sont capables de produire des métabolites et composés doués d'activité antimicrobienne, elles peuvent agir sur les microorganismes pathogènes et /ou d'altération et contribuer à prolonger la durée de vie des aliments (Gálvez et al., 2007). Cette protection s'effectue soit grâce à la production d'acides organiques qui en réduisant le pH du milieu inhibent la plupart des bactéries pathogène dont la majorité est neutrophile, soit par compétition pour les nutriments ou soit grâce à la production de substances dites bactériocines (Mami, 2007).

## **Chapitre II : Probiotiques**

### **1. Historique et définition**

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs « pro » et « bios » et signifie littéralement « en faveur de la vie » par opposition au terme antibiotique signifiant « contre la vie » ([Gournier-château et al., 1994](#)).

La définition des probiotiques a évolué au cours du temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. La notion de « probiotique » a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff en 1907, il avait émis l'hypothèse que la bonne santé et la longévité des paysans bulgares étaient dues à leur consommation de laits fermentés. Il a alors proposé l'ingestion des bactéries lactiques pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, donc augmenter l'espérance de vie ([Anukam et Reid, 2007](#)).

Le terme « probiotiques » a été introduit en 1965 par Lilly et Stillwell, la définition qu'ils ont formulée a été : « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes ».

Depuis ce temps, plusieurs définitions ont été données au probiotiques ([Malago et al., 2011](#)). Selon Parker (1974) « probiotiques » désigne : les microorganismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale » ([Amrouche, 2005](#)). Cette définition trop vaste englobe les cultures microbiennes mais aussi les métabolites produits par les microorganismes et par conséquent les préparations d'antibiotiques. C'est pourquoi en 1989, Fuller redéfinit les probiotiques comme étant : « des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale » ([Gournier château et al., 1994](#)).

Enfin, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) ([Report of FAO/WHO, 2002](#)), les probiotiques sont « des microorganismes vivants administrés qui lorsque sont administrés en quantités adéquates et procure des bénéfices pour la santé de l'hôte » ([AFSSA, 2005](#)).

De façon plus spécifique, pour qu'un organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes (Salminen et *al.*, 2006,)

- être un habitant naturel de l'intestin,
- être capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier
- adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des pathogènes
- avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (Acides, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bactériocines...).
- non invasif, non carcinogène et non pathogène.
- être capable de Co-agréger pour former une flore normale équilibrée.
- survivre aux différents procédés technologiques de production.
- garder sa viabilité dans l'aliment et durant le transit intestinal.

## **2. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques**

L'effet probiotique est liée à la souche microbienne, toute fois les souche ayants un statut GRAS (Generally Regarded As Safe) sont les plus favorisés, ainsi que, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques qui doivent arriver vivants à leur site d'action, à savoir l'intestin, ce qui implique la capacités de ces derniers à résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte ( la barrière intestinale, le pH acide, les sels biliaries, les enzymes pancréatiques ...etc) ([Percival, 1997](#) ; [Lamoureux, 2000](#) ; [Millette et al., 2008](#)) (tableau 3). Le débat sur l'innocuité des probiotique reste encore ouvert, car ils pourraient être des opportunistes notamment chez les patients immunodéprimés ([Cannon et al., 2005](#)).

**Tableau 3** : Principaux critères utilisés pour la sélection des probiotiques (Alegre, 2009).

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

### 2.1. Résistance à l'acidité gastrique

La survie des bactéries dans le tube digestif dépend de leur capacité à tolérer les pH bas, cependant, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2,5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (Ammor et Mayo, 2007)

### 2.2. Résistance aux sels biliaires

La tolérance aux sels biliaires est un facteur important pour la survie des probiotiques, car après leur échappement aux conditions acides de l'estomac, les probiotiques doivent faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras (Ammor et Mayo, 2007 ; Gu et al., 2008).

### 2.3. Adhésion aux cellules épithéliales

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est une condition pour la colonisation du tractus digestif, cette adhérence constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes (Palomares et al., 2007 ; Reyes-Gavilan et al., 2011).

## **2.4. Production de substances antimicrobiennes**

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques (acide lactique, acide acétique, acide formique) le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la conservation des aliments ([Titiek et al., 1996](#) ; [Labioui et al., 2005](#)). Le genre *Lactobacillus* est connu pour son pouvoir antimicrobien à large spectre qui est due notamment à la production de ces substances inhibitrices des bactéries tel que les bactériocines ([Nissen-Meyer et al., 1997](#)).

Différentes définitions ont été attribuées aux bactériocines au cours du temps, cependant la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de [Klaenhammer, \(1988\)](#) qui définit les bactériocines comme étant des molécules de nature protéique synthétisées par voie ribosomique douées d'une activité antimicrobienne envers des espèces microbiennes phylogénétiquement proches de l'espèce productrice ([Dortu et Thonart, 2009](#)). Il faut noter donc que dans certains cas les bactériocines synthétisées par les lactobacilles agissent même sur des espèces très éloignées y compris les Gram (-) ([Bendjeddou, 2013](#)).

## **2.5. Résistance aux antibiotiques**

Les travaux de [Temmerman et al., \(2003\)](#), ont montré que 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la kanamycine, à la tétracycline, à l'érythromycine et au chloramphénicol. Il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autres espèces et genre, c'est pour cette raison qu'il faut choisir des souches manquantes du potentiel de transfert de résistance ([Denohue, 2004](#)).

## **2.6. Critères technologiques**

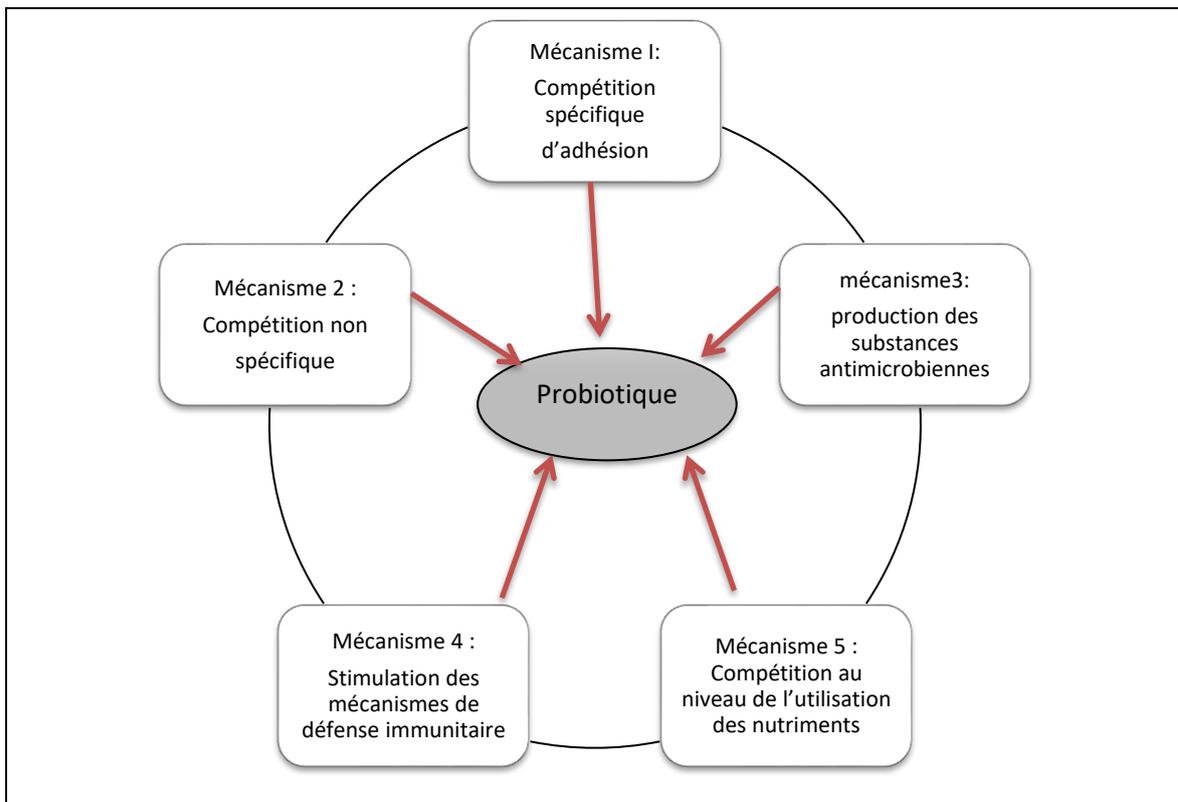
Selon [Saarela et al., \(2000\)](#), ces critères sont :

- Bonnes propriétés sensorielles ;
- Résistance aux phages ;
- Viabilité durant le traitement technologique ;
- Stabilité dans le produit et durant le stockage.

### 3. Propriété probiotique des lactobacilles

Les mécanismes d'action des probiotiques impliqués dans les effets bénéfiques exercés par ces bactéries sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et dépendent de la souche bactérienne considérée (figure 7). Les effets des probiotiques sont classiquement attribués à une modulation direct ou indirecte de la flore endogène ou du système immunitaire local (Rambaud, 1993). Ceci suggère qu'un contact direct de ces probiotiques avec les différents constituants de la barrière intestinale, tels que la microflore endogène, le mucus intestinal, les cellules épithéliales, les immunocytes, est nécessaire (Belgnaoui, 2006)

Il est à noter que la validité scientifique de ces effets bénéfiques est très variable. Pour certains effets, des preuves scientifiques irréfutables appuyées par des études cliniques existent et permettent d'attribuer certaines allégations-santé aux produits probiotiques. Pour d'autres, les allégations demeurent encore à un stade hypothétique et des études plus approfondies demeurent nécessaires pour apporter des preuves scientifiques convaincantes à ces allégations (Abour et Dabouz ,2016)



( )

**Figure 7:** Mécanismes d'action des probiotiques contre les microorganismes pathogènes  
Kaur et al., 2002

### 3.1. Diminution de la diarrhée associée à l'antibiothérapie

Les diarrhées associées à l'antibiothérapie ou DAA ont une grande importance épidémiologique, et affectent une large portion des populations du monde. Les DAA sont un effet secondaire de la consommation à court ou à long terme d'antibiotiques. Dans les cas récents, l'influence négative de l'antibiothérapie sur la microflore intestinale est acceptée comme le principal mécanisme (Cremonini et al., 2002). Plusieurs études se concentrent sur les effets que pourraient avoir les probiotiques sur les DAA. Les résultats apportés par certains scientifiques ont clairement prouvé des diminutions dans les incidences des DAA par quelques espèces de *Lactobacillus* (Jonkers et Stockbrügger, 2007). Les probiotiques peuvent prévenir et restaurer les déséquilibres dus à l'antibiothérapie, et leur utilisation au tant qu'agent traitant contre les DAA présente un très grand intérêt. Plusieurs souches probiotiques ont été utilisées dans cette voie, comme par exemple : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, les résultats ont montrés une diminution de l'incidence des diarrhées de 0 -10% (Koning et al., 2008).

### 3.2. Réduire l'intolérance au lactose

Plusieurs personnes souffrent d'une intolérance au lactose due à un déficit congénital en enzyme  $\beta$ - galactosidase résultant à une incompétence à digérer le lactose. Cela dit ces mêmes personnes peuvent assimiler le lactose présent dans le yaourt mieux que celui contenu dans le lait (Fuller, 1989). Cette assimilation peut s'expliquer par l'hydrolyse du lactose par les lactobacilles probiotiques durant leur métabolisme fermentaire (Salminen et al., 2003). L'action bénéfique résulte de la présence de  $\beta$ -galactosidase dans les cellules bactériennes (Gilliland, 2001). On peut en déduire donc que cet effet est plus métabolique que dû à l'action d'une biomasse vivante, mais les propriétés spécifiques des probiotiques peuvent influencer cette action : certains probiotiques utilisent rapidement le lactose, d'autres ont une forte activité lactasique (Salminen et al., 2003). Quand les bactéries probiotiques sont assimilées au niveau de l'intestin, elles interagissent avec la bile qui augmente la perméabilité membranaire de ces mêmes bactéries, et de ce fait permettre au substrat d'être hydrolysé (Gilliland, 2001). Ces propriétés attestent aussi sur l'aptitude des probiotiques à réduire les symptômes d'une intolérance au lactose (Marteau et al., 2001 et Salminen et al., 2003)

### 3.3. Inhibition des bactéries pathogènes

La plupart des bactéries entériques infectent l'hôte dans différentes conditions atmosphériques du tractus gastro-intestinal, causant ainsi des diarrhées et d'autres symptômes. *Salmonella sp* et *Clostridium difficile* causent des inflammations du colon et de l'iléum *Shigella sp* quant à elle préfère la muqueuse colique (Dupont, 2005). Certains lactobacilles inhibent dans différents essais la croissance de *Listeria monocytogenes* (Wilson et al., 2004).

Une des plus importantes propriétés des lactobacilles probiotiques est leur pouvoir de réduire et de prévenir les infections du tractus gastro-intestinal (Hutt et al., 2006). L'habilité des espèces du genre *Lactobacillus* à inhiber plusieurs variétés de bactéries Gram positives ou Gram négatives est mieux connue. Cette inhibition est due soit à la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène ou de bactériocines (Fernández et al., 2003). Ces bactériocines sont des substances ayant au moins une partie protéique, sécrétées par les lactobacilles ou par d'autres bactéries phylogénitiquement proches (Klaenhammer, 1988). Jusqu'à maintenant, quatre classes de bactériocines ont été identifiées : les lantibiotiques (classe I), les non lantibiotiques (classe II), les peptides à haut poids moléculaire (classe III) et les complexes glyco-lipoprotéines (classe IV) (Klaenhammer, 1993 ; Hernandez et al., 2005 et Mami, 2007). Mais d'autres études ont confirmées que l'adhésion de ces mêmes bactéries à la muqueuse intestinale empêcherait l'attachement de bactéries pathogènes par compétition sur le substrat (Fernandez et al., 2002 et Valenzuela et al., 2008). Des espèces du genre *Lactobacillus* ont données des résultats intéressants concernant l'inhibition de l'attachement d'*Helicobacter pylori* sur les cellules gastriques. Une administration de lactobacilles peut prévenir ou traiter complètement une infection à *H. pylori* (Sheu et al., 2002). En plus de l'inhibition envers les bactéries entéropathogènes citées, certains *Lactobacillus* exercent un grand pouvoir inhibiteur envers des staphylocoques à coagulase négative et *Staphylococcus aureus*, mais aussi sur d'autres pathogènes comme *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli* (Pham et al., 2009). Les lactobacilles probiotiques ont aussi montré des résultats concluants dans la prévention et l'éradication de vaginoses. Dans une étude de Kohler et Reid., (2005), ont démontré qu'une culture mixte de *Candida albicans* avec *Lb. rhamnosus* conduit à l'expression du gène de stress et diminue l'expression du gène de filamentation du champignon, des facteurs très importants dans la virulence de la candidose (Reid et al., 2005).

### 3.4. Effet sur l'immunité systémique et intestinale

Les systèmes immunitaires spécifiques et non spécifiques n'ont pas atteint leur maturité au moment de la naissance. La colonisation du tube digestif par la flore intestinale est un stimulus essentiel impliqué dans la maturation des réponses immunitaires. Toutefois, l'impact spécifique de chaque espèce est encore mal connu. Les probiotiques ont rapidement été identifiés comme potentiellement actifs sur ces paramètres. Plusieurs travaux montrent l'impact du probiotique *Lactobacillus rhamnosus* GG sur la réponse post-vaccinale d'Ig A sécrétoires (Rochat, 2004). Les parois des espèces de *Lactobacillus* probiotiques stimulent les monocytes macrophages via le TLR-2. Il existe en effet une augmentation de la réponse des macrophages en présence d'acides lipoteichoïques, composant des membranes de bactéries Gram (+). Les cellules mononuclées périphériques humaines, stimulées par *Lactobacillus bulgaricus*, *casei*, *Lactobacillus acidophilus*, ou *Lactobacillus helveticus* sécrètent de l'IL1 $\beta$ , du TNF $\alpha$  et de l'IFN $\gamma$  (Heyman et Heuvelin, 2006). Les propriétés immunologiques des probiotiques ont été largement étudiées, certains *Lactobacillus* tels que *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. plantarum* augmentent considérablement l'immunité systémique de la muqueuse (Perdigon et al., 2001). Ces mêmes souches, par leur adhérence à la muqueuse intestinale stimulent les cellules phagocytaires plus efficacement que d'autres bactéries. Dans une étude, il est démontré que l'administration de lactobacilles agissait sur la sécrétion de TNF $\alpha$ , d'IFN $\gamma$  et d'IL-12, ainsi que sur la régulation des cytokines (IL-4 et IL-10). Certaines espèces encore induisent l'immunité sécrétoire sélective, d'autres aussi augmentent la réponse inflammatoire intestinale (Maldonado Galdeano et Perdigon, 2004). Une bactériothérapie orale à base de probiotiques réduirait significativement les symptômes d'une inflammation allergique par réduction des marqueurs d'inflammation locale et systémique en cas de dermatites atopiques (Viljanen et al., 2005). Récemment, une étude de Kalliomaki et al, (2004) a déterminé l'effet de l'administration du probiotique *Lactobacillus rhamnosus* GG à des mères avec des antécédents de dermatites atopiques, en pré et post-accouchement a montrée des résultats probants contre le développement de cette maladie (Roessler et al., 2007).

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

Le syndrome d'inflammation intestinale chronique résulte d'un dysfonctionnement dans le tractus gastro-intestinal, qui se manifeste par des douleurs abdominales, des ballonnements, des diarrhées ou des constipations. La consommation de lactobacilles probiotiques peut changer la composition et l'activité métabolique de la flore intestinale par la production d'acides gras à chaînes courtes et de gaz. Plus encore, ils affectent la mobilité intestinale et exercent un effet anti-inflammatoire réduisant par cet effet les symptômes de ce syndrome (Jonkers et Stockbrügger, 2007). Des études menées à l'aide de *Lactobacillus plantarum* en addition avec *Lb. rhamnosus* GG et *Lb. reuteri* à montrer des résultats prometteurs concernant les symptômes de cette irritabilité (Kajander et al., 2007). Les derniers mécanismes connus à cet effet sont l'induction de contractions propulsives, l'accélération du transit, ou la modification de l'absorption de fluide et de sodium dans le colon (Kim et al., 2005).

### 3.6. Réduction des allergies alimentaires

L'administration de probiotiques modifie fortement l'environnement intestinal, que ce soit sur la flore endogène ou sur la sécrétion de cytokines (Paganelli et al., 2002). Le mécanisme possible par lequel les probiotiques diminuent la réponse inflammatoire lors d'une allergie induit leur effet sur les défenses non-immunologiques et immunologiques du tractus digestif ce qui modifie la dégradation des allergènes alimentaires (Kirjavainen et al., 1999). L'effet stimulant des bactéries probiotiques sur les macrophages, les cellules dendritiques, les éosinophiles, les neutrophiles les cellules NK et M et l'activation des récepteurs Toll-like induit une production d'acide nitrique et une résistance aux inflammations de la muqueuse, promouvoit la maturation des IgA plasmatiques et facilite l'induction de la tolérance orale aux antigènes alimentaires. L'association de *Lb. bulgaricus* et de *Lb. acidophilus* réduirait la fréquence des allergies alimentaires (Paganelli et al., 2002). Les bactéries probiotiques sont importantes dans la réduction de l'inflammation associée aux réactions d'hypersensibilités chez les sujets atteints d'allergies alimentaires (Isolauri et al., 2000). Aussi, certains lactobacilles probiotiques peuvent augmenter l'effet barrière de la flore endogène et diminuer l'inflammation intestinale et de ce fait apporter des outils aidant le traitement des allergies alimentaires (Kalliomaki et Isolauri, 2004). D'autres probiotiques plus spécifiques soulagent certains symptômes d'allergies alimentaires comme ceux associés

aux protéines du lait, probablement en dégradant ces dernières en petits peptides et en acides aminés (Parvez *et al.*, 2006). Il est clairement démontré que *Lb. gasseri* a un effet stimulant sur les IL-12 produites par les splénocytes ainsi qu'un effet régulateur des IgE par établissement d'un équilibre entre les Th1 et Th2, ce qui pourrait être un index important dans l'évaluation du pouvoir antiallergique des lactobacilles probiotiques (Sashihara *et al.*, 2007).

### **3.7. Effet anti cancérogène**

L'action antitumorale des probiotiques est attribuée à l'inhibition des carcinogènes et/ou des procarcinogènes, à l'inhibition des bactéries qui convertissent les procarcinogènes en carcinogènes (Gilliland, 1989 ; Gorbach *et al.*, 1987), à l'activation du système immunitaire de l'hôte (Rasic, 1983) et à la /ou réduction du pH intestinal pour réduire l'activité microbienne. Kailasapathy *et Rybka.*, (1997) ont rapporté plusieurs études animales confirmant que la consommation de yogourt et de laits fermentés contenant des bactéries probiotiques inhibait la formation et la prolifération des tumeurs.

### **3.8. Probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin**

Selon la littérature, les processus inflammatoires impliqués dans les pathologies de l'intestin de l'homme comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la pouchite sont contrôlés par les probiotiques. Une étude de Guandalini (2002) a montré que l'ingestion de *Lactobacillus* GG entraîne une amélioration notable de l'état clinique chez des enfants souffrant de la maladie de Crohn. De même Gosselink *et al.*, (2004) ont observé des effets cliniques bénéfiques chez des patients affectés par une colite ulcéreuse après ingestion de produits fermentés contenant *Lactobacillus* GG ( $1-2 \times 10^{10}$  bactéries/jour).

### **3.9. Effet sur les diarrhées à rota-virus et sur les diarrhées du voyageur**

Les virus sont responsables d'un haut pourcentage de diarrhées chez les individus quel que soit le groupe d'âge (DuPont, 2005). Parmi les entéropathogènes viraux, les norovirus, rota-virus et astrovirus sont les trois causes les plus communes d'infections entériques virales dans les pays développés (Gagnon, 2007). L'hypothèse que la diminution de la sévérité des diarrhées à rota- virus étaient liées à une diminution de l'entrée des rota-virus dans l'intestin est due aux modifications de la glycosylation de surface des cellules intestinales. Effectivement, lorsque des cellules HT-29 MTX sont traitées par des probiotiques, leur niveau d'infection par rota-virus est diminué de plus de 80% (Trugnan,

2003). La plupart des études concernant l'utilisation de *Lb. rhamnosus* GG dans la prévention de diarrhées à rota-virus ont vues des diminutions de la durée des diarrhées de 1 à 2 jours avec une augmentation des IgA et une diminution de l'entrée de rota- virus (Jonkers et Stockbrügger, 2007). La diarrhée du voyageur est la forme de diarrhées la plus commune aux touristes américains et européens qui voyagent dans certains pays d'Afrique et d'Asie. Les recherches menées en vue de soulager ces sujets de cette maladie sont revenues très prometteuses, car ces mêmes personnes ont révélé être soulagées après une consommation de *Lb. rhamnosus* en combinaison avec *Lb. acidophilus* (Salminen et al., 2003).

### **3.10. Réduction du cholestérol sérique**

Des études préliminaires ont révélé que la consommation de yogourt ou de lait fermenté contenant des probiotiques entraînent une diminution du taux de cholestérol dans le sang, et par conséquent la réduction les risques d'hypercholestérolémie responsable des maladies coronariennes. Par exemple, Bukowska et al., (1998) ont mis en évidence une diminution du taux de cholestérol sanguin chez des sujets soumis à un régime supplémenté avec *Lactobacillus plantarum* 299 v.

### **3.11. Probiotiques et la perméabilité intestinale**

L'altération de la perméabilité intestinale (fonction-barrière) causée par une infection, toxines ou autre facteur favorise un transfert aberrant d'antigènes (y compris la microflore locale) à travers l'intestin en engendrant des réponses immunitaires inappropriées (réactions inflammatoires ou auto-immunes) (Baumgart & Dignass, 2002 ; Gill, 2003). Plusieurs études ont montré que la consommation de probiotiques stabilise la fonction barrière de l'épithélium intestinal. Par exemple, Isolauri et al., (1993) ont démontré que *Lactobacillus* GG normalise le processus de perméabilité intestinale chez le rat. En outre, une étude récente de Rosenfeldt et al., (2004) a démontré qu'une administration de probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus reuteri*) permet de stabiliser la fonction-barrière de l'intestin et de diminuer les symptômes gastro-intestinaux chez des enfants souffrant d'une dermatite atopique. Cependant les mécanismes impliqués dans cette normalisation ne sont pas encore bien connus.

### **3.12. Probiotiques et la motilité de l'intestin**

La motilité intestinale joue un rôle important dans la réduction de la croissance des microorganismes pathogènes dans l'intestin. Les probiotiques pourraient avoir des effets positifs sur la motilité de l'intestin en réduisant le temps de transit des microorganismes pathogènes (Takiguchi et al., 1998). Une étude de Verdu et al., (2004) ont rapporté que l'effet de *Lactobacillus paracasei* (probiotique) sur la motilité de l'intestin se traduit par une atténuation de l'hyper contractilité post-infection du muscle. Ils suggèrent que les probiotiques peuvent être utilisés dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable.

Dans d'autres cas, les allégations-santé revendiquées demeurent purement hypothétiques et des études scientifiques plus approfondies sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces allégations. Cette situation est particulièrement vraie pour les effets des probiotiques sur le système immunitaire et pour lesquels très peu de preuves scientifiques et d'études cliniques ont été apportées pour valider ces allégations. Néanmoins, la stimulation du système immunitaire de l'hôte demeure un aspect très important dans le développement du concept « probiotiques », d'autant plus que certains travaux rapportés dans la littérature suggèrent que certaines souches à fort potentiel probiotique sont capables de stimuler certaines fonctions immunitaires notamment lors d'infections bactériennes ou virales (tableau 4).

**Tableau 4:** Quelques souches de *Lactobacilles* probiotiques et leurs effets cliniques.  
Adapté de *Mattila-Sandholm et al., (1999)*.

Souche probiotique	Effets cliniques sur l'Homme
<i>Lactobacillus GG ATCC 53103</i>	Adhésion aux cellules intestinales humaines, réduction de l'activité des enzymes fécales, prévention des diarrhées associées aux antibiotiques, prévention et traitement des diarrhées à rotavirus et autres diarrhées, modulation de la réponse immunitaire
<i>Lactobacillus johnsonii Lj-1(LA-1)</i>	Prévention de la diarrhée du voyageur, modulation de la flore intestinale, réduction des symptômes de l'intolérance au lactose, traitement de la constipation, amélioration de l'immunité, adjuvant dans le traitement de <i>Helicobacter pylori</i>
<i>Lactobacillus reuteri ATCC 55730</i>	Colonisation du tractus intestinal, réduction de la durée des diarrhées aux rotavirus, traitement des diarrhées virales
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Modulation de la flore intestinale, réduction de l'activité des enzymes fécales, effets positifs sur le cancer superficiel.
<i>Lactobacillus plantarum DSM 9843</i>	Adhésion aux cellules intestinales humaines, modulation de la flore intestinale

## *Matériel et méthodes*

---

## Chapitre I : Matériels et Méthodes

Ce travail a pour but d'étudier quelques propriétés probiotiques de souches de Lactobacilles isolées à partir du lait cru, À savoir l'activité antibactérienne et la résistance aux conditions du tube digestif : acidité gastrique, sels biliaires et enzymes digestives.

### 1. Matériel

#### 1.1. Matériel biologique

- Collection de Souches de lactobacilles isolées préalablement à partir du lait cru par [Sadi, \(2017\)](#)
- Bactéries pathogènes d'origine alimentaire et clinique (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25921, *Pseudomonas sp*, *Vibrio cholerae* et *Salmonella sp*).

#### 1.2. Milieux de culture

- **Milieu MRS (Man-Rogosa et Sharpe) (Institut Pasteur d'Algérie)** : utilisé pour la revivification, les repiquages ainsi que la croissance des lactobacilles et dans les différents tests.
- **Bouillon BHIB (Institut Pasteur d'Algérie)** : bouillon cœur-cerveille ou (Brait Heart Infusion), utiliser pour le repiquage des pathogènes.
- **Gélose MH (Muller Hinton) (Institut Pasteur d'Algérie)** : utilisé dans l'étude et l'évaluation de l'activité antibactérienne des souches étudiées.

#### 1.3. Produits chimiques et réactifs

-**Colorants** : Bleu de Méthylène, violet de gentiane, fuchsine, cristal violet

-**Autres produits** : l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eau physiologique, Huile à émulsions éthanol, HCl, NaOH).

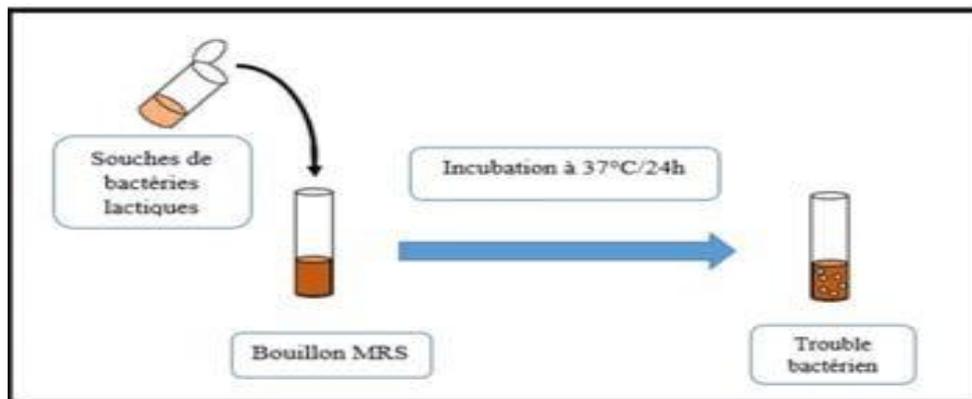
-**Tampon** : tampon phosphate salin (PBS)

## 2. Méthodes

### 2.1. Revivification des souches

La revivification des souches consiste à les repiquer sur des milieux de culture appropriés puis à l'incuber jusqu'à l'obtention de culture fraîche.

Après décongélation, Les souches de lactobacille ont été revivifiées par repiquages successifs sur bouillon MRS à pH 6,2 additionné de 0,05% de chlorhydrate de cystéine afin de réduire le potentiel d'oxydoréduction du milieu, assurer ainsi l'anaérobiose (**figure08**).



**Figure 8:** Repiquage des souches de lactobacilles

### 2.2. Vérification de la pureté

Pour la purification des souches de lactobacilles étudiées nous avons fait des successions d'ensemencements du MRS liquide au MRS solide, le pH des deux milieux étant de  $5,4 \pm 0,2$ . Il nous permet d'obtenir des cultures pures de lactobacilles vu que les espèces de ce genre sont connues pour leur caractère acidophile (Carr *et al.*, 2002)

### 2.3. Examen macroscopique et microscopique

Après observation macroscopique qui a permis de décrire l'aspect des colonies sur gélose MRS, une coloration de Gram a servi dans l'observation microscopique au grossissement (Gx100) pour classer les bactéries selon leurs Gram (Gram+), leur morphologie cellulaire (bacilles) et leur mode de regroupement (bacille ou bâtonnet et parfois coccobacilles isolé).

## 2.4. Conservation des souches

### 2.4.1. Conservation à court terme

La conservation à court terme des isolats purifiés, est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation à 37°C pendant 18 heures on verse une quantité de glycérol sur la crème bactérienne pour ralentir d'une part leur métabolisme en association avec la température et comme moyen de protection contre les changements de températures, les tubes sont placés à (+4°C), où ils peuvent être conservés pour plusieurs semaines. On l'utilise généralement pour prévenir d'éventuelles contaminations des cultures, ou dans le cas de pertes des souches (Kihal *et al.*, 1996).

### 2.4.2. Conservation à longs terme

Pour une conservation à long terme, les cultures pures sont centrifugées à 5000 trs/min pendant 5 min, elles sont lavées au tampon phosphate puis recentrifugées à 3000 trs/min pendant 3 min. Les culots sont maintenus en suspension dans un milieu contenant 10% de lait écrémé (enrichie par 0,05% d'extrait de levure) et 30% de glycérol déposées à une température de (-20°C). Au fur et à mesure des besoins, les cultures sont décongelées rapidement et repiquées dans du lait deux fois avant l'utilisation (Samelis *et al.*, 1994). Cette méthode nous permet d'avoir une collection de souches que l'on peut utiliser à volonté suivant la nécessité de l'étude.

## 2.4. Quelques tests biochimiques

### a. Test de la catalase :

La catalase est une enzyme qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène :



Pour confirmer que les Lactobacilles sont catalase (-) une colonie de la culture bactérienne qui n'a pas dépassé 48h est mise en contact avec de l'eau oxygénée sur une lame. Une effervescence (dû à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase (Larpent *et al.*, 1997).

**b. Test du type fermentaire :**

En utilisant le milieu MRS glucosé dans des tubes contenant des cloches de Durham on peut distinguer les espèces homofermentaires des hétérofermentaires. Cette différence s'explique par la façon dont chaque souche métabolise le glucose, soit en suivant la voie EMP soit d'autres voies (Carr *et al.*, 2002).

**c. Test de croissance à différentes concentrations de NaCl :**

On utilise pour ce test des milieux MRS à 4% et 8% de NaCl. Il nous permet de déterminer la résistance de la dite souche au stress halin (Larpen *et al.*, 1990 et Samelis *et al.*, 1994).

**d. Test de croissance à différentes températures et de thermorésistance :**

Ces tests nous permettent d'évaluer l'aptitude d'une espèce bactérienne à croître dans une large gamme de températures. L'ensemencement des souches se fait sur milieu MRS avec incubation à 15°C pendant une semaine et à 30°C et à 45°C pendant 18h. Pour la thermorésistance, on fait chauffer la suspension bactérienne pendant 10 min à 63,5°C puis on incube à 30°C (Bottazzi, 1988 ; De Roissart et Luquet, 1994).

**e. Test de l'ADH :**

Le test consiste en un ensemencement de la souche sur un milieu M16 BCP solide à pH 7. Les réactions observées sont un virement de couleur du milieu vers la couleur jaune après 18h qui s'explique par l'acidification de ce dernier, puis après 48h d'incubation, le milieu réalcalinisé par l'hydrolyse de l'arginine retrouvera sa couleur originelle si l'espèce possède l'enzyme sinon il restera jaune dans le cas contraire (Thomas, 1973).

**f. Test du profil fermentaire :**

C'est pour ainsi dire le test confirmatif de l'espèce mais aussi le test clé. Il consiste en une centrifugation de la culture jeune à 5000 trs/min pendant 5 min, on récupère le culot auquel on fait un lavage au tampon phosphate pour éliminer les résidus de milieu et pour équilibrer le pH à 7, s'en suit une deuxième centrifugation à 3000 trs/min pendant 3 min. Le culot final est inondé par 2 mL de MRS BCP sans sucre et à pH 7. Le mélange enfin est

distribué sur une série de tubes contenant du MRS BCP plus un sucre donné à raison de 1% (Klein *et al.*, 1998 et Stiles et Holzapfel, 1997).

## 2.5. Etude du potentiel probiotique

Les souches de *Lactobacillus* de notre collection ont subi des traitements qui résument à peu près le cours que peut suivre un microorganisme probiotique durant son passage dans le tractus digestif

### 2.5.1. Standardisation des inocula

Afin de tester quelques aptitudes probiotiques de nos souches, il est indispensable de connaître la charge de départ, pour cela une standardisation des souches est effectuée comme suite : L'inoculum des souches de lactobacilles sont revivifiés par ensemencement en stries sur gélose MRS. Après incubation à 37°C pendant 24h, deux à trois colonies bien isolées de chaque souche sont repiquées à chaque fois dans 10 ml du bouillon MRS, puis incubées à 37°C pendant 18 h. Au terme de l'incubation, des dilutions décimales sont réalisées dans l'eau physiologique stérile ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ), 1 mL de chaque dilution ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$ ) est ensemencé en masse dans une gélose MRS. Un dénombrement est effectué après incubation à 37°C pendant 48 h (figure 9)

Les boîtes sont dénombrées par un compteur de colonies, et le nombre de cellules vivantes par un mL de culture est exprimé en UFC/ mL selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V (n1 + 0,1n2) d}$$

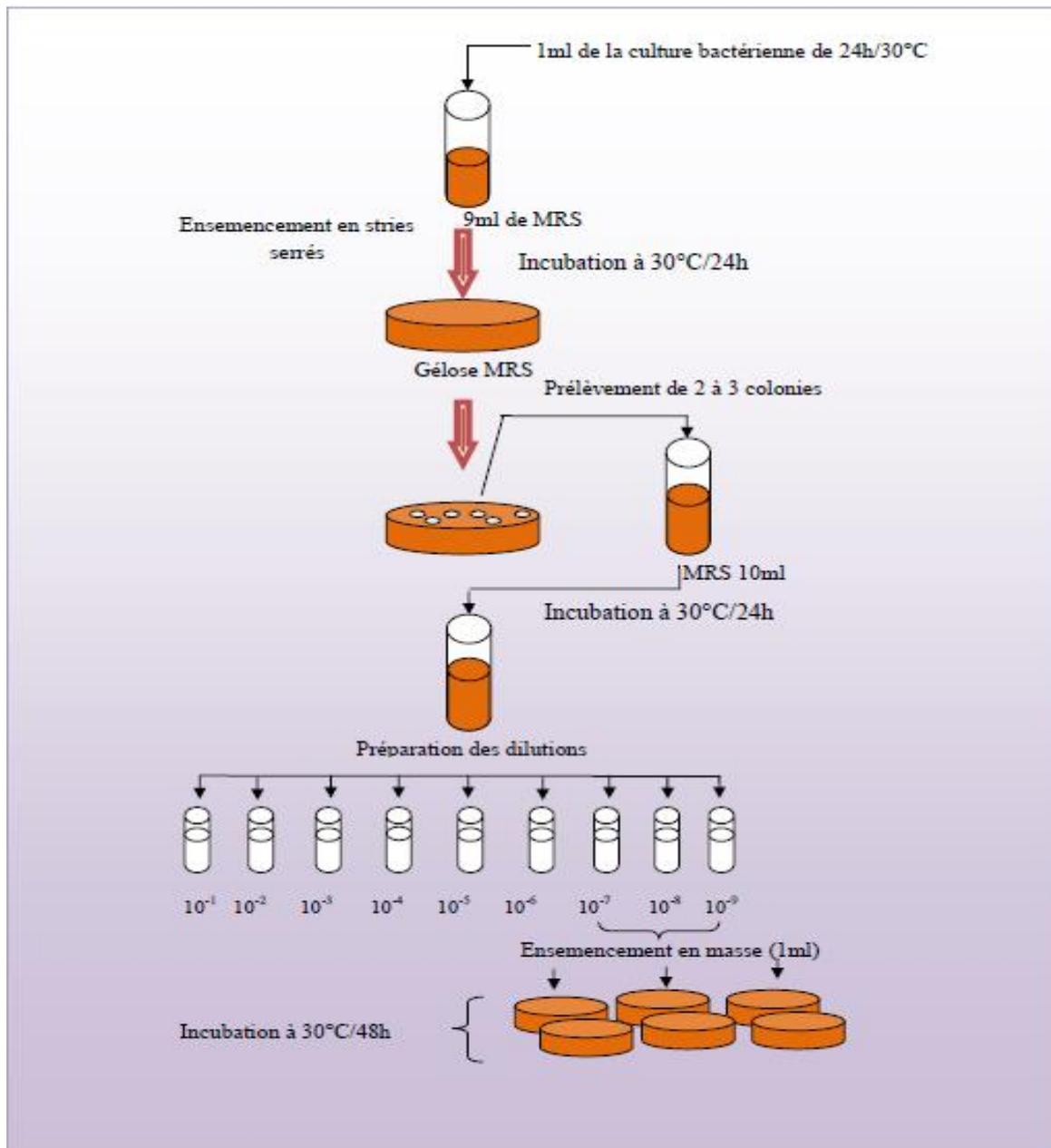
**C** : Nombre de colonies sur boîtes de chaque dilution retenue ;

**V** : Volume de la suspension bactérienne déposée sur boîte (mL) ;

**n1** : nombre de boîtes correspondant à la plus faible dilution ;

**n2** : nombre de boîtes correspondant à la plus forte dilution ;

**d** : correspond à la plus faible dilution.



**Figure 9:** Schéma de la standardisation des souches de lactobacilles

### 2.5.2. Résistance aux sucs gastriques :

Le protocole de [Fernandez et al., \(2002\)](#) et [Kim et al., \(2006\)](#) a été suivi. Aux densités de 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 et 0,8 nous avons inoculés après centrifugation à 7000 tours/min pendant 1 minute 500 $\mu$ L de sucs gastriques de synthèse à pH 2 pendant des durées de 30 min, 1h00, 1h30 et 2h00.

### 2.5.3. Résistance aux sels biliaires

Après centrifugation le culot est inondé avec 500µL de MRS additionné à 5% de sels biliaires et à pH 8,5 pour créer le maximum de stress aux cellules microbiennes et de ce fait obtenir un résultat qui pourrait justifier l'administration de ces souches comme probiotiques pour l'homme. Les durées de traitement sont toujours respectées (Shima *et al.*, 2009).

### 2.5.4. Résistance aux enzymes pancréatiques

On récolte le culot après centrifugation à 7000 trs/min lequel est lavé au tampon phosphate puis recentrifugé cette fois à 5000 trs/min pendant 1 min. Le culot final est inoculé de 500µl de MRS à 0,1% de trypsine et d' $\alpha$ -chymotrypsine à pH 7 (Kim *et al.*, 2006 et Ruiz-Moyano *et al.*, 2008). Les temps d'incubation sont respectés pour chaque traitement et la température est maintenue à 37°C. Après le dernier traitement, la souche est centrifugée à 7000 trs/min pendant 1 min, lavée au tampon phosphate puis centrifugée à 5000 trs/min pendant 1 min. Le culot final est additionné à 500 µL d'eau physiologique et on effectue des dilutions de l'ordre de 1/100 jusqu'à la dilution 10<sup>-8</sup> que l'on ensemence en profondeur dans un milieu MRS à pH 7 et qu'on incube à 37°C.

### 2.5.5. Pouvoir inhibiteur

Nous avons confronté les souches de lactobacilles de la collection avec *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25921, *Pseudomonas* sp, *Vibrio cholerae* et *Salmonella* sp. Le principe de cette méthode consiste en une confrontation directe entre les souches lactiques ensemencées sur milieu MRS tamponné versus chaque souche pathogène ensemencée sur milieu MH semi-solide en double couche. Par diffusion de la substance inhibitrice on obtient une zone claire d'inhibition que l'on mesure pour évaluer le potentiel inhibiteur de la souche. L'utilisation du MRS tamponné est facultative mais permet de restreindre le champ sur la nature de la substance inhibitrice (Fleming *et al.*, 1975 et Allende *et al.*, 2007).

## *Résultat et discussion*

---

## Chapitre II : Résultats et Discussion

**En cette période de crise sanitaire**, il n'a pas été possible de faire les expériences détaillées dans le chapitre matériel et méthodes, et par conséquent, nous allons montrer les résultats des travaux antérieurs qui ont une relation directe avec notre sujet.

### 1. Souches bactériennes

Nous avons choisi les lactobacilles du fait de leur hétérogénéité très importante dans le groupe de bactéries lactiques connues par leur statut GRAS, mais aussi du fait de leur capacité à inhiber un large spectre de bactéries indésirables. Leur identification, d'une manière générale, peut être effectuée par des méthodes classiques basées sur les caractères phénotypiques. Ces méthodes nous permettent d'avoir une connaissance préalable avant d'établir des identifications moléculaires. L'intérêt porté aux souches de lactobacilles est basé sur les données bibliographiques qui la placent au rang de microorganismes bénéfiques pour l'homme.

### 2. Caractères généraux des lactobacilles

Le genre *Lactobacillus* représente le plus large groupe des bactéries lactiques, il contient le plus grand nombre d'espèces qui peuvent être isolées de différents biotopes (humains, animaux, plantes...etc) (Stilles et Holzapfel, 1997). Le genre *Lactobacillus* contient un assemblage divers de 140 espèces avec des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles. Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt et al., 2000 et Singh et al., 2009). Cette différence pourrait s'expliquer par un pH optimal plus faible pour l'enzyme chargée de réguler le pH intracellulaire (translocation de protons par une ATPase) chez les lactobacilles. Le métabolisme des sucres chez *Lactobacillus* est hétéro- ou homofermentaire. Certaines souches sont thermophiles, d'autres mésophiles (Nannen et al., 1991). Les espèces homofermentaires strictes fermentent les hexoses en acide lactique en utilisant la voie EMP (Embden-Meyerhoff Parnas), ils ne fermentent ni les pentoses ni le gluconate, ils appartiennent aux espèces *Lb delbruekii subsp bulgaricus*, *Lb. delbruekii subsp. lactis* et *Lb. helveticus* et on les trouve généralement dans les cultures starters. Ils sont thermophiles (45°C) et thermorésistants (Law et Haandrikman, 1997). L'autre groupe renferme l'espèce

de *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*, qui ne sont pas connues pour être utilisées comme cultures starters mais qui sont très bien connues pour les bienfaits qu'elles procurent autant que microorganismes probiotiques ainsi que pour leurs utilisations dans l'affinage des fromages. Hétérofermentaires facultatives, ces lactobacilles fermentent les hexoses en acide lactique ou en acide lactique, acétique, formique et éthanol quand la quantité de glucose est limitée. Les pentoses sont fermentés en acide lactique et acétique via la voie des pentoses phosphate (Carr *et al.*, 2002). Les lactobacilles hétérofermentaires strictes fermentent les hexoses ainsi que les pentoses en utilisant la voie des pentoses phosphate, ces espèces peuvent causer des arômes indésirables et des formations de gaz durant l'affinage des fromages, ils produisent des protéinases, des endopeptidases, des aminopeptidases, des dipeptidases, des tripeptidases et des PSP (Proline-Spécifiques peptidases). L'espèce spécifique à ce groupe est *Lb kefir* (Hassan et Frank, 2001).

### **3. Evaluation du potentiel probiotique**

En raison du fait que plusieurs espèces de lactobacilles sont des hôtes normaux de l'organisme humain, et au regard d'une longue histoire d'utilisation dans l'industrie alimentaire, ces bactéries, d'origine laitière montrent après chaque étude effectuée des particularités surprenantes les unes que les autres. Dans ce contexte, certaines souches de lactobacilles semblaient être les plus aptes à compléter les fonctions probiotiques par rapport aux autres (au sein de même espèce).

Les tests de ré-identification des souches, de lactobacilles, ont l'avantage de confirmer leur stabilité surtout après une longue période de conservation au froid (Damin *et al.*, 2007). Kurtmann *et al.*, (2009) montrent que les variations de températures influent d'une manière importante sur la stabilité de l'espèce, du fait que des altérations sur le génome bactérien peuvent intervenir. Les tests biochimiques (ADH et fermentation, tolérance aux fortes concentrations de NaCl, peuvent placer ces souches au rang des microorganismes facilement inductibles en industrie laitière vu que la plupart de ces paramètres sont des facteurs limitants dans le cas de plusieurs lactobacilles (De Angelis et Gobbetti, 2004).

Les résultats trouvés par Hamdi, (2009) montrent que la souche *Lb johnsonii* a la capacité de résister aux stress acide, basique et enzymatique avec une concentration enregistrée de 8log UFC/mL. Par conséquent, elle peut être considérée comme microorganisme probiotique. Mêmes résultats ont été trouvés par Perea Velez *et al.*, (2006) avec les souches de *Lb. casei* et *Lb. rhamnosus*. D'après Salminen *et al.*, (2006), la

concentration d'administration d'un microorganisme probiotique doit être de  $10^7$  ou  $10^8$  cellules/mL. En général, un microorganisme probiotique n'est jamais administré sous forme de crème bactérienne, il est soit adjuvé dans des produits agroalimentaires (Jus, yaourt... etc.) (Fuller, 1989 et Champagne et Gardner, 2008) ou sous forme de capsules contenant ces microorganismes lyophilisés (Corcoran et al., 2003). Ces méthodes permettent même si l'espèce considérée comme probiotique de résister à l'environnement gastro-intestinal, d'augmenter leurs chances d'arriver en quantité suffisante au niveau de l'intestin (Pan et al., 2009).

Le choix des espèces pathogènes est basé sur leurs sites d'infections (agents des intoxications alimentaires, infections hospitalières comme les germes uro-pathogènes). Dans leurs études Annuk et al., (2002) et Fernandez et al., (2002), ils démontrent clairement que plusieurs espèces de lactobacilles sont largement efficaces concernant l'inhibition de ces germes, et même contre des germes sporulants (Mami, 2007) et d'autres plus ciblés comme *Helicobacter pylori* (Sheu et al., 2002) et *Listeria monocytogenes* (Benhammouche, 2005 et Falgas et Makris, 2009).

## *Conclusion*

---

### *Conclusion*

Le "microbiote" intestinal exerce un ensemble de fonctions qui amène certains auteurs à le considérer comme un « organe virtuel ». Les probiotiques permettent de favoriser le maintien de l'équilibre du microbiote. Les aliments sont actuellement de plus en plus souvent stérilisés pour des raisons d'hygiène et de conservation, ce qui les appauvrit en « probiotiques naturels ». Cela conduit les industries agro-alimentaires à supplémenter en probiotiques certains aliments comme les laits fermentés et les produits dérivés. Tous les effets bénéfiques des probiotiques conduisent à des enjeux économiques importants.

Les lactobacilles nous montrent à chaque étude effectuée des particularités très surprenantes les unes que les autres. Ces bactéries d'origine laitière semblent compenser leur déficience en facteurs de croissance par d'autres aptitudes qui servent au mieux leurs utilisateurs. Leur diversité et leur hétérogénéité font que ce sont des microorganismes de la vie de tous les jours. Du fait qu'elles participent dans de nombreuses réactions qui sont indispensables tant pour l'alimentation que pour la santé humaine. La tendance que prend les habitants du monde et surtout ceux des pays occidentaux sur les aliments et les produits bio a fait naître un grand intérêt concernant la santé humaine, depuis déjà quelques années la priorité est donnée à la prévention plus qu'à la médication. En plus de ces valeurs nutritives et thérapeutiques, le lait possède une flore riche, diversifiée et bienfaisante pour l'humain et peut être considéré comme source essentielle de probiotiques.

**En perspectives** de ce travail, dont la partie pratique n'a pas été réalisée, la possible utilisation des lactobacilles comme probiotiques pourra être poussée par l'étude d'autres points notamment :

- Pousser l'identification des souches à l'échelle moléculaire;
- Il est intéressant de faire une caractérisation plus poussée et une purification des substances inhibitrices produites par les souches lactiques;
- L'enjeu à long terme, est de trouver un moyen naturel (bactéries lactiques) de diminuer l'utilisation des conservateurs;
- Mettre en évidence les effets probiotiques des lactobacilles probiotiques par des méthodes plus approfondies.

## *Références bibliographiques*

---

## Références bibliographiques

**AFSSA. (2005).** Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme.

**Ait –Belgnaoui A, Lamine F, Han W, Eutamene H, Fioramonti J, Bueno L et Theodorou V. (2005).** A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct* .3, 59-63.

**Alegre E. (2009).** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique, Thèse de Doctorat en chimie analytique, Université de Strasbourg, France. p5.

**Allend A, Martinez B, Selmaa V, Gila MI, Suarezb JE et Rodrieuez, A. (2007).** Growth and bacteriocin production by Lactic Acid Bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes in vitro* and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiol.* 24 ,759-766.

**Ammor Ms et Mayo B. (2007).** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as Functional starter cultures in dry sausage production. *Mea. Science* .76, 138146.

**Amrouche T. (2005).** Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des Bifidobactéries : analyse *in vivo* et étude *ex vivo* des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de Doctorat en science et technologie des aliments Université de Laval, faculté des sciences de l'agriculture et des aliments, Québec .155 p.

**Annukum H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songiisepp E, Zilmer Met Mikelsaar M. (2002).** Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidate's. *J.App. Microbiol.*94, 403-412.

**Badis A, Laouabdia Sellami N, Guetarni D, Kihal M et Ouzrout R. (2006).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux population caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sci. Tech* .23, 30-37.

**Belgnaoui A. (2006).** Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale option : Qualité et sécurité des aliments. Unité de Neuro-gastroentérologie et nutrition. INRA, Toulouse. France .1-91.

**Bendali F. (2009).** Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antagoniste à l'égard de *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat en sciences biologiques, Université d'A/Mira, Béjaia, Algérie. p15.

**Bendjeddou K. (2013).** Effets anti EPEC de lactosérum : caractéristiques de sa bactériocine. Thèse de doctorat en science biologiques, Microbiologie, Université de Bejaia, Faculté des sciences de la nature et de vie, 147p.

**Benhamouche N. (2005).** Sélection de bactéries lactiques productrices de substances de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (L.M.A) Thèse pour l'obtention du diplôme de magistère en microbiologie appliquée Université d'Oran.1-90.

**Bottazi V. (1988).** An introduction to rod shaped lactic acid bacteria, *Biochimie.* 70.303-315.

- Carr F J, Chill D et Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria: a literature survey. Crit. Rev. Microbiol, 28 : 281-370.
- Cannon J P, Lee TA, Bolanos J T, &Danziger LH. (2005).** Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200cases. Eur J Clin microbiol infect Dis .24, 31-40.
- Chen Y S, Yanagida F et Shinohara T. (2004).** Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. Lett. Appl. Microbiol. 40, 195-200.
- Cremonini F, Di Caro S, Nista E C, Bartolozzi F, Capelli G, Gasbarrini G et Gasbarrini A, (2002).** Meta-analysis: The effect of probiotic administration on antibiotic associated diarrhea. Alim. Pharm. Ther. 16, 1461-1467.
- Corcoran B M, Ross R P, Fitzgerald G Fetstanton C. (2003).** Comparative survival of probiotic lactobacilli spray –dried in the presence of prebiotic substance.JAppl.Microbiol .96, 1024-1039.
- Damin, M.R., Minowa, E., Alcantâra, M.R.et Oliveira, M.N., (2007).** Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. j.texture .ST.39,40-55.
- De Angelis,M.et Gobbetti, M., (2004).** Environmental stress responses in *Lactobacillus* ; A review. Proteomics. 4,106-122.
- De Roissart H et Luquet F M. (1994).** Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques (1) : Tome 1 : 25-590.Ed. Loriga. France.
- Desai A. (2008).** Strain identification, viability and probiotic properties of *Lactobacillus casei*, a thesis submitted for the degree of doctor of philosophy, School of biomedical and health sciences, Victoria University, Werribee campus, Victoria, Australia.
- De vos WM. (1996).** Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek.70-223.
- Dortu Cet Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnologie,Agronomie ,Société et Environnement.13,143,154.
- DuPont H L. (2005).** Shigella species (Bacillary dysentery). Principles and Practice of Infectious Diseases. ed. Mandell. G.L, Bennett. J.E. et Doblin, R. 2655–2661.
- Durlu-Ozkaya F, Xanthopoulos V, Tunail N et Litopoulou–Tzanetaki E. (2001).** Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. J Appl. Microbiol.91, 861-870.
- FAO/OMS. (2001).** Health and Nutritional Properties of Probiotics in food including powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and world Health Organization (Organisation Mondiale pour la santé OMS). Working Group Report. Cordoba, Argentina.
- FAQ/WHO. (2002).** Guidelines for the evaluation of probiotics in food.Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization

(Organisation Mondiale pour la Santé OMS). Working Group Report .London ,Ontario ,Canada.

**Fernandez MF, Boris S, Barbes C. (2002).** Probiotic Properties of human lactobacilli Strains to be in the gastrointestinal tract. *J.Appl .Microbiol .*94,44-455.

**Fira D, Kojic M, Banina A, Spasojevic L, Strahinic L et Topisirovit L. (2001).** Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *J.Appl.Microbiol .*90,123-130.

**Fleming HP, Erchells J L et casilow RN. (1975).** Microbial inhibition of isolate *Pediococcus* from cucumber bunc. *Appl.Environ.Microbiol*, 30, 1040-1042

**Fuller R. (1989).** Probiotics in man and Animals.A review. *J. Appl.Bacteriol.* 66,365-378.

**Idoui T. (2008).** Les bactéries lactiques indigènes : Isolement, identification et propriétés technologiques. Effet probiotiques chez le poulet de chair ISA15, le lapin de souche locale et le rat Wistar. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie. 179.

**Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E. et Salminen, S., (2000):** Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin.Exp .Allerg .*30,1604-1610.

**Gaganon M. (2007).** Rôle des probiotiques lors d'infections entériques d'origine bactérienne et virale : Analyses *in vitro* et études *in vivo* chez des modèles murins. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor en sciences et technologie des aliments. Université Laval. Québec. 1-155.

**Gálvez A, Abriouel H, López RL et Ben Omar N. (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, *International Journal of Food Microbiology* 120:365-378.

**Gattepanche, F., (2005) :** Etude d'un système de préfermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisée fonctionnelle, thèse pour l'obtention du grade de Ph.D en sciences et technologies des aliments. Université Laval. Québec. 1-156.

**Gilliland S E. (1989).** Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. *Journal of Dairy Science*, 72,2483-2494

**Givery S. (2006).** Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son blé. Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus Bifermentans*. Thèse de Doctorat. Université de Reims champagne –ardenne .221p.

**Gosselink M. P, Schouten W. R., van Lieshout L. M., Hop W. C., Laman J. D., & Ruselervan Embden J. G., (2004).** Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Disease of Colon and Rectum*, 47, 876-884.

**Gournier –Chateau N, Larpent JP, Castellanos MI, et Larpent JL.(1994).** Les probiotiques en alimentation animale et humaine .Lavoisier Tec&Doc .Paris .192p.

**Grossiord, B., Vaughan, E. E., Luesink, E. et de Vos, W. M., (1998).** Genetics of galactose utilisation via the Leloir pathway in lactic acid bacteria. *Lait.* 78-77.

**Guessas B. (2007).** Les particularités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le biocontrôle de *staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat. Université d'Oran 1-156.

**Gu Rx, Yang ZQ, Li ZH, chen SL et Luo ZL. (2008).** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of Hotan, Xinjinag and Bama, Guangxi, China Anaerobe. 14,313-317.

**Hassan, A. N. et Frank, J. F., (2001).** Starter cultures and their use. Appl. Dairy Microbiol. 2 nd ed. Dekker, 2001. 151-207. Hassan, A. N., Frank, J. F., Farmer, M. A., Schmidt, K. A. et Shalabi, S. I., 1995: Formation of yogurt microstructure and three-dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy. J. Dairy. Sci. 78-2629.

**Hernandez, D., Cardell, E. et Zarate, V., (2005).** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. J. Appl. Microbiol. 99, 74-84.

**Heyman, M. et Heuvelier, E., (2006).** Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique : le paradoxe. Nutr. Clin. Métabol. 20, 85-94.

**Hutkins, R. W., (2001).** Metabolism of starter cultures. Appl. Dairy Microbiol. 2nd ed. Dekker, 2001. 207-241.

**Hutt, P., Shchepetova, J., Loivukene, K., Kullisaar, T. et Mikelsaar, M., (2006).** Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. J. Appl. Microbiol. 100, 1324-1332.

**Jonkers, D. et Stockbrügger, R., (2007).** Probiotics in gastrointestinal and liver diseases. Rev. Art. Alim. Pharm. Ther.

**Kailasapathy, K., a Rybka, S. (1997).** *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* Spp. Their therapeutic potential and survival in yogurt. The Australian Journal of Dairy Technology, 52, 28-35.

**Kajander, K., Myllyuoma, E., Rajilic –Stojanovic, M., Kyronpalo, S., Rasmussen, M., Jarvenpää, S., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., Vapaatalo, H. et Korpela, R., (2007).** Clinical trial : multispecies probiotics supplementation alleviates the symptoms and stabilizes intestinal microbiota .

**Kalliomaki, M. et Lsoulauri, E., (2004).** Probiotics and downregulation of the allergic response. Immunol. Allerg Clin. North Am. 24, 739-752.

**Kandler, O. et Weiss, N., (1986).** Genus *Lactobacillus*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2, 9ième ed. Ed. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. Williams and Wilkins, Baltimore USA.

**Katina, K., Sauri, M., Alakomi, H. et Mattila-Sandholm, T., (2002).** Potential of Lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread LebensmittelWissenschaft und –Technologie, 35.1:38-45.

**Kaur IP, Chopra K, Sain A (2002).** Probiotics, potential pharmaceutical applications. Eur. J. Pharm. Sci. 1 Palorames IC, Pérez –Morales R. et Acedo Félix E.

**Kihal, M., Prevost, H., Lhotte, M. E., Huang, D. Q. et Divies, C., (1996).** Instability of plasmid- encoded citrate permease in *Leuconostoc*. J. Appl. Microbiol. 22, 219-223.

- Kim, P., I jung, M.Y., Chang, Y.H., Kim, S., Kim, S. J .et park, Y.H (2006).** Probiotic Properties of lactobacillus and Bifid bacterium strains isolated from porcine gastrointestinal tract. *Appl Microbiol Biotechnol.*74,1103-1111.
- Kim, H.S., a Gilliland, S. (1983).** à.Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans .*Journal of Dairy Science*, 66,959-966.
- Kirjavainen.P.V. Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E.et Salmminen, S., (2000).** Probiotics eczema. *Clin. Exp. Allerg* .30,1604-1610.
- Kleanhammer TR. (1988).** Ge bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev* .12, 39-86.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C.et Reuter, G., (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J.Food .Microbiol* .41,103-125
- Koning, C.J.M., Jonkers,D.M.A.E,Stobberingh ,E.E., Mulder ,L.,Rombouts ,F .M.et Stockbrügger ,R.W., (2008).**the effect of a multispecies probiotic on the intestinal microbiota and bowel movements microbiota and bowel movements in healthy volunteers taking the antibiotic amoxicillin .*Amer.Jour.of gastro* .103, 178-189
- Kurtmann, L., Carlsen, C. U., Risbo, J. et Skibsted, L. H., (2009).** Storage stability of freeze- dried Lactobacillus acidophilus (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiol.* 58, 175-180.
- Labioui H, Elmoualdi L, El Yachioui M. et Ouhssine M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 144 ,237-250.
- Lamoureux L. (2000).** Exploitation de l'activité  $\beta$ -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto oligosaccharides.National Library of Canada .pp. 23-47.
- Laroia, S., a Martin, J. H. (1991).** Effect of pH on survival of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus in frozen fermented dairy desserts. *Cultured Dairy Products Journal*, 2, 13–21.
- Larpent, J. P.et Laarpent, G.M. (1990).** Mémento technique de microbiologie 2 ème Ed Technique et documentaire Lavoisier, P :417.
- law, J. et Haandrikman, A., (1997).** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy. J.* 7, 1-11.
- Leyral G et Vierling E. (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaire. Walters Klumer France.P.287.
- Lourens –Hatting, A et Viljeon, C.B., (2001).** Yogurt as probiotics carrier food. *Int. Dairy. J.* 7, 1-11.
- Malago J, Koninkx J F J G et Marinsek L. (2011).** Probiotic bacteria and enteric infections. Springer. London New York. ISBN 978-94-007-0385-8.
- Maldonado Galdeano, C .et perdigon, G., (2004).** Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J.Appl Microbiol* .97,673-681

- Mami,A., (2007).** Le biocontrôle de staphylococcus aureus par les bactéries lactiques du genre lactobacillus isolées du lait cru de chèvre. Thèse pour l'obtention de diplôme de magister en microbiologie appliquée. Université d'Oran .1-156.
- Nannen, N. L. et Huntkins, R. W., (1991).** Proton-translocating adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacteria. *J. Dairy. Sci.* 74, 747-751.
- Marilley, L.et Casey.M.G., (2004).** Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food. Microbiol.* 90, 139-159.
- Midassirou B, Mahdhi A, Chaieb K, Bakhrouf A. (2012).** Recherche de bactéries lactiques et étude in vitro de leurs propriétés probiotiques. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn* pp, 147-163.
- Millette M, Luquet FM et Ruiz MT. (2008).** Characterization of probiotic properties of lactobacillus strains. *Dairy Sci. Technol.*88,695-705.
- Mugula J. K., Narvhus J. A., Sørhaug T., (2003).** Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of togwa, a Tanzanian fermented food, *International Journal of food Microbiology* 83 :307-318.
- Nissen –Meyer J, Hauge HH., Fimland G, E ijsink V.G.Het Nes IF. (1997)** ...Ribosommaly synthesiesd antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria: Their function, structure, biogenesis, and their mechanism of action. *Recent Res.Devel.Microbiol.*, 1,141-154.
- Paganelli, R., Ciuffreda, S., Verna, N., Cavallucci, E., Paolini,F ., Ramondo ,S, .et Di Gioacchino, M., (2002).** Probiotics and food –allergic diseases. *Allerg* .72, 97-99.
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H.et Zhao, Z., (2009).** The acid, bile tolerance and antimicrobial property of lactobacillus acidophilus NIT.*food Control* .20.598-602.
- Parverz –S., Malik, K.A., Kang, S. A.et Kim, H.Y. (2006).** Producers are their fermented food products are beneficial for health. *J.Appl.Microbiol* .100,1171-1185.
- Perdigon, G., Fuller, R.et Raya, R., (2001).** lactic acid bacteria and their effect on the immune system.*Curr.Iss .Intes .Microbiol* .2, 27,-42.
- percival M. (1997).** choosing a probiotic supplement. *Clin. Nutr. Insights.*, 6(1),95100.5.1 :1-9.
- Pessi T., Sütas Y., Saxelin M., Kallioinen H., & Isolauri E., (1999).** Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4725-4728.
- Pham, L.C., van spanning, R.J.M., Röling, W.F.M., Prosperi, A.C., Terfework,Z.,ten Cate ,J.M., Crielaard ,W.F.M., Prosperi,A.C .,Terfework ,Zaura ,E., (2009).**Effects of probiotic lactobacillus salivarius W24on the compositional stability of oral microbial communities .*Arch .Oral .Biol* .54,132-13.
- Pritchard, G.G. et coolbear, T., (1993).** The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria.*FEMS .Microbiol .Rev* .12, 179-206.
- Reid, G.,Kim, S.O.et Köhler ,G.A.,(2005).**selecting ,testing and understanding

probiotic microorganisms.FEMS.Minireview .46,149-157.

**Reyes-Gavilan CG, Suarez A, Fernandez-Garcia M, Margolles A, guemande M.et Ruas Madiedo P. (2011).** Adhesion of bile-adapted Bifidobacterium strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal Juices.Res. Microbiol., 162,514-519.

**Rochat, F., (2004).** Effets biologiques des modificateurs de la flore intestinale. Arch. Pédiat .11, 576-577.

**Roessler, A., Friedrichw, U., Vogelsangz,H.,Bauer ,A.,Kaatz,,M., Hipler ,U.G.,(2007).**The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention .Clin.Exp .Allerg .38,93-102.

**Saad N. (2010).** Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique lactobacillus plantrum 299V avec l'hôte : approche in vitro. Thèse de Doctorat de l'université de Limoges, Ecole doctorale Biologie –Santé, faculté des sciences et techniques, laboratoire de chimie des substances Naturelles, France .266p.

**Saarela M,Mogensen G,Fondén R,Matto J ,et Mattila –Sandholm T.(2002).**Probiotic bacteria : Safety ,functional and technological properties .J.Biotechnol .,84,197-215.

**Salminen, S.,Benno ,Y .et de vos ,W.,(2006).**intestinal colonisation ,microbiota and future probiotics ?Aisa .Pac .J.Clin .Nutr.15,558-562

**Samelis, J., Maurogenkis, F.et Metaxopoulos,J.,(1994).**Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented greek dry salami .Int .J.Food .Microbiol .23,179-196.

**Sashihara,T ., Sueki,N.,Furuichi,K.et Ikegami ,S.,(2007).**Effect of growth conditions of lactobacillus gasseri OLL2809 on the immunostimulatory activity for production of interleukin -120,274-281.

**Shima, M.,Matsuo,T.,Yamashita ,M.et Adachi, S.,(2009).**Protection of lactobacillus acidophilus from bile salts in a model intestinal juice by incorporation into the inner –water phase of a W/O/Wemulsion .Food Hydrocolloids.23,281-285.

**Shueu,B.S.,Wu,J.J.,Lo,C.Y.,Wu ,H.W .,Chen, J.H.,Lin,Y.S.et Lin ,M.D.,(2002).**impact of supplement with lactobacillus and Bifidobacterium containing yogurt on triple therapy for Helicobacter Pylori eradication.Alim .Pharm .Ther .16, 1669-1675.

**Stiles M. E. et Holzapfel W. H., (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, International Journal of Food Microbiology 36: 1- 29.

**Tailliez P. (2004).** Les lactobacilles : Propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. Masson, Paris.6.35-41.

**Tamime, A. Y., Saarela, M., Sondergaard, A. K., Mistry, V. V. et Shah. N. P., (2005).** Production and Maintenance of Viability of Probiotic Micro-organisms. Dairy. Prod. 39–72.

**Temmerman, R., (2003).** Culture-dependent and culture-independent microbial analysis of probiotics. Thèse pour l'obtention du grade de Ph.D. Université de Ghent. Belgique. 1-192.  
ten Brink, B., Minekus, M., Van der Vossen, J. M. B. M., Leer, R. J. et Huisint Veld, J. H. J., 1994: Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization

of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 140–148.

**Tergauchi, S., Uehara, M., Ogasa, K., and Mitsouka, T. (1978).** Enumeration of Bifidobacteria in dairy products. *Japanese Journal of Bacteriology*, 33, 753-761.

**Terzaghi, B.E., and Sandine, W.E. (1975).** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29(6), 807-813.

**Thomas, T.D. (1973).** Agar medium for differentiation of streptococcus cremoris from the other bacteria. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.* 8, 70-71.

**Trepanier, G., Simard, R.E. et Lee, B.H. (1991).** Lactic acid bacteria relation to accelerated maturation of cheddar cheese. *J. Food. Sci.* 56-1238

**Valenzuela, A.S., Ruiz, G.D., Hikmate Arbriouel, N.B.O., Lopez, R.L., Canamero, M.M., Ortega, E. et Galvez, A. (2008).** Inhibition of food poisoning and pathogenic bacteria by *Lactobacillus plantarum* strain 2.9 isolated from ben saalga, both in a culture medium and in food. *Food*.

**Verdu E.F., Bercik P., Verma-Gandhu M., Huang X.X., Blennerhassett P., Jackson W., Mao Y., Wang L., Rochat F., Collins S.M.** Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut* 2006; 55:182-90.

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

**Wilson, A.R., Sigeo, D. et Epton, H.A.S. (2004).** Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* in due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1516-1522.

**Wunwissa K, Bhesh B, et Hilton D (2003).** Evaluation of encapsulation techniques of Probiotics for yoghurt. *Inter Dairy J.* 13 : 3-13.

# *Annexes*



## Annexes

### Annexe 1: composition des milieux de culture et tampon

#### ✍ **Bouillon MRS (Man- Rogosa et Sharp) pH 6, 5 (Guiraud ,2003)**

Peptone .....	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure .....	05g
Glucose .....	20g
Tween80 .....	1ml
Phosphate dipotassique.....	2g
Acétate de sodium .....	5g
Citrate triamonique .....	2g
Sulfate de magnésium.....	0.02g
Sulfate de manganèse .....	0.05g
Eau distillée .....	11

NB : Pour la gélose en ajoute 15g d'agar

Autoclavage à 120°C/20min

#### ✍ **Milieu BHIB (Bouillon cœur-cervele ou Braient Heart Infusion) pH7, 6±0,2:**

Extrait de cœur-cervele.....	17.5g
Peptone pancréatique de gélatine .....	20g
Chlorure de sodium .....	5g
Phosphate dissodique.....	2,5g
Glucose .....	2g

Autoclavage à 120°C/20 min, pour 1L d'eau distillé en ajoute 37g de poudre BHI

**✍ Gélose MH (Muller Hinton) pH 7.3±0.1:**

Infusion de viande de bœuf .....	30g
Hydrolysate de caséine.....	17.5g
Amidon.....	1.5g
Agar.....	17g
Eau distillée .....	11
Autoclavage à 120°C/20min	

**✍ Tampon phosphate PBS :**

NaCl.....	8g
KCl .....	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.24g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.24g
Eau distillée .....	QSP
Autoclavage à 120°C/20min	

***Annexe 2: Coloration de Gram***

Appeler aussi la coloration double, son principe s'intitule comme suit :

1. Préparation d'un frottis (Fixation de la culture bactérienne sur la lame par chaleur).
2. La lame est ensuite recouverte du violet de gentiane pendant 1 min.
3. Ajouter du lugol pendant 30 min.
4. décolorer avec une solution alcool 96° et rincer avec l'eau distillée.
5. ajouter la fuchsine et laisser agir 20 à 30 secondes .laver à l'eau.
- 6 .La lame après avoir été rincée et séchée, puis observée au microscope optique généralement à L'objectif x100, Avec l'huile à immersion.
7. Les bactéries à Gram(+) sont apparaissent en violet et les bactéries à Gram(-) en rose.