

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE SCIENCE ALIMENTAIRE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Bouhafs Fatiha

Medjahed Nouriya

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Nutrition et pathologie.

THÈME

**Survie in vitro de souches lactiques locales
aux conditions gastriques simulées.**

Soutenue publiquement le 02/07/2018

DEVANT LE JURY

President	Mr. CHAALEL ABDELMALEK	MCA	U. Mostaganem
Encadreur	Mme KOUADRI BOUDJELTHIA NACIMA	MAA	U. Mostaganem
Examinatrice	Melle YAHLA IMENE	MAB	U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments fonctionnels et de la Santé (LMBAFS)

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail.

Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

On tient aussi à remercier notre Encadreur *Mme Kouadri Boudjelthia*, d'avoir dirigé ce travail, on vous dit merci pour tous les moments qu'on a passé avec vous, ils sont gravés à jamais.

Nos plus vifs remerciements vont aussi aux membres du jury :

M. Chaalal, merci monsieur de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury, et un grand merci pour votre disponibilité.

Melle. Yahia, merci madame d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et de contribuer à améliorer sa qualité.

On exprime aussi notre profonde reconnaissance *Mme Djahira* pour son aide et les moyens humains et matériels qu'elle nous a apporté pour réaliser ce travail dans les meilleures conditions

Nos remerciements s'adressent aussi à nos *Parents*, et nos familles pour leur présence et leur soutien moral.

A vous tous, un grand Merci

Dédicaces

*Louanges à Allah, seigneur de L'univers ; que la salutation d'Allah
soie sur son messenger*

*qu'il a envoyé en qualité de miséricorde universelle, ainsi que sur
ses compagnons et ses frères jusqu'à la résurrection.*

Je dédie ce modeste travail à :

*mon très cher Père et ma tendre **Mère***

Qui m'ont appris tout ce que je sais

Qui m'ont guidé vers le tunnel éclairé du savoir

Qui m'ont nourri d'amour, enveloppé de confort

*Qui m'ont encouragé durant tous mon cursus universitaire, je souhaite qu'ils soient
heureux pendant toute leur vie.*

*A mes chers frères **Abd elkader, ahmed, karim, Abd elfateh** qui m'ont donné toujours les
bons conseils et les nouvelles idées pour le développement de mon projet .*

*A mes sœurs **Aicha, Halima et Zohra** .*

*A ma soeur **Khadija** avec son mari Mr **Benharrat Afif***

*A mes neveux et mes nieces : **Hadjer, Ghofran et Mourad***

A mes Grands Parents : paternel et maternelle

*A mon binôme **Nouriya** à qui je présente mes sincères remerciements de m'avoir supporté
durant tout ce travail.*

*A mes très chère amies **Siham, Amina, Saada, ahlem et Zahiya**.*

A toute ma familles plus élargie, mes amies A toute la promotion Nutrition et Pathologie.

Fatiha

Dédicaces

Louanges à Allah, seigneur de L'univer ; que la salutation d'Allah soit sur son messager qu'il a envoyé en qualité de miséricorde universelle, ainsi que sur ses compagnons et ses frères jusqu'à la résurrection.

Je dédie ce modeste travail à :

*A la mémoire de **mon Père**, qui a veillé sur mon éducation, que dieu L'accueille dans son vaste Paradis.*

*A ma très **chère Mère** qui m'a encouragé durant tous mon cursus universitaire, je souhaite qu'elle soit heureuse et en bonne santé pendant toute sa vie.*

*A la personne qui est mon deuxième père **Mr. Hammoudi***

*A mes chers frères : **Mansour et Mohamed***

*A mes adorables sœurs : **Kola et Fatma, KHayra, Yamina.***

*A mes neveux et nièces : **Ikram, Rihab, Salsabil, Kawthar, Rofayda, Lakhdar, Hicham***

*A mon très cher ami **Brahim** qui m'a toujours encouragé et m'a aidé pour améliorer mon travail.*

*A ma binôme **Fatifa** à qui je présente mes sincères remerciements de m'avoir supporté durant tout ce travail.*

A toute ma famille plus élargie

*A mes amies **Zoubida, Khadidja, Nouriya, Siham, Fatima***

A toute la promotion Nutrition et santé

Nouriya

Liste des abréviations

C °	Degré Celsius.
%	Pourcentage.
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
ADP	Adénosine-5'-diphosphate
BB	Bleu de Bromothymol
Cell	Cellule
D	Dilution
DO	Densité Optique
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Gramme
g/l	Gramme par litre
h	Heure
Lb	Lactobacillus
Log	Logarithme
m	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
MRS	Man, Rogosa et Sharp
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Potentiel Hydrogène
rpm	Rotation par minute
sp	Sous espèce
T	Temps
UFC	Unité Formant Une Colonie
UFC/g	UFC par gramme
UFC/ml	UFC par Millilitre
µl	Microlitre

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Classification des lactobacilles (kandler et weiss., 1986, dans : Mami,2013)	07
Tableau 2	Les conditions physiologiques des différentes sections du tractus digestif et leurs rôles (Walter and Ley 2011).	13
Tableau 3	Principaux micro-organismes utilisés comme agents probiotiques (Ouwehand et al., 2002)	17
Tableau 4	Proposition de critères de sélection des probiotiques à application intestinale, adapté de Saarela et al. (2000)	18
Tableau 5	Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine selon la (FAO/OMS., 2001) et WGO., 2008)	22
Tableau 6	Caractères cultureux des souches lactiques utilisées	34
Tableau 7	Les résultats de l'adhésion au colon et à l'intestin	43

Liste des Figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Aspect morphologique de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (A) <i>Lb helveticus</i> , (B) <i>Lbcasei</i> (C) observées au microscope électronique (Mami,2013)	03
Figure 2	Les principes voies métaboliques des lactobacilles (Source Perry et al., 2004) .	05
Figure 3	Structure et conditions physicochimiques du tractus digestif (Walter and Ley 2011)	11
Figure 4	Quantité et répartition des micro-organismes le long du tractus digestif (Walter and Ley.,2011; Wilson 2008)	14
Figure 5	Les différentes étapes du mécanisme d'adhésion aux cellules épithéliales (Crittenden et al 2005)	19
Figure 6	Défenses antimicrobiennes de l'hôte face à l'intrusion de micro-organismes pathogènes au niveau du tractus intestinal (Tirée de liévin-Le Moal et Servin ., 2006)	20
Figure 7	Les différents mécanismes d'action des probiotoques (Kaur et al., 2002)	23
Figure 8	Technique de test de ph	27
Figure 9	Technique de dilution et de dénombrement par des spots (Guiraud, 2003)	30
Figure 10	Protocole de l'adhésion aux cellules epithéliales	32
Figure 11	L'aspect macroscopique des lactobacilles dans un milieu solide et liquide	33
Figure 12	La cinétique de croissance de Lb N01 aux différents pH	36
Figure 13	La cinétique de croissance de Lb N05 aux différents pH.	36
Figure 14	La cinétique de croissance de Lb N09 aux différents pH.	37
Figure 15	La cinétique de croissance de Lb N10 aux différents pH.	37
Figure 16	La cinétique de croissance de Lb N11 aux différents pH.	37
Figure 17	La cinétique de croissance de Lb N12 aux différents pH.	38

Figure 18	La cinétique de croissance de Lb N13 aux différents pH	38
Figure 19	La cinétique de croissance de Lb N14 aux différents pH.	38
Figure 20	La cinétique de croissance de Lb N15 aux différents pH.	39
Figure 21	La cinétique de croissance de Lb NP aux différents pH.	39
Figure 22	Taux de survie des lactobacilles dans le suc gastrique a pH=2,5	41
Figure 23	Taux de survie des lactobacilles dans le bouillon MRS à 0,5% de sels biliaires	41
Figure 24	Adhésion des Lb N10 aux cellules épithéliales	44
Figure 25	Adhésion des Lb N09 aux cellules épithéliales	44

SOMMAIRE

Liste des Abréviations

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Introduction 01

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 02

I. Les Bactéries Lactiques 02

I.1. Généralités 02

I.2. Le Genre *Lactobacillus*..... 03

I.2.1. Généralités 03

I.2.2. Caractères cultureux et exigences nutritionnelles des lactobacilles.... 06

I.2.3. Classification des lactobacilles..... 07

I.2.3. Classification des lactobacilles 07

I.2.4. Intérêt des lactobacilles 07

II. Le Tractus digestif 09

II.1. Généralité 09

II.2. Composition du tractus digestif de l'homme 09

II.3. Les Conditions hostiles du tractus digestif..... 10

II.3.1.Le suc gastrique 10

II.3.2. Les sels biliaires.....	11
II.3.3. Les variation de pH.....	12
II.3.4. Les Enzymes digestives.....	13
II.4. Le microbiote intestinal	14
II.4. Rôle du tractus digestif et sa microflore.....	15
III. Les Probiotiques.....	16
III.1. Historique et définition.....	16
III.2 Critères de sélection des probiotiques.....	17
III.2.1. La résistance à l'acidité gastrique	18
III.2.2. La résistance aux sels biliaires.....	19
III.2.3. L'adhésion aux cellules épithéliale.....	19
III.2.4. La production des substances antimicrobiennes.....	20
III.2.5. Résistance aux antibiotiques.....	20
III.2.6. Critères technologiques.....	21
III.4.Rôle des probiotiques.....	21
III.5. Mécanismes d'action des probiotiques	22

CHAPITRE II : MATERIEL & METHODES

IV. Matériels et Méthodes.....	24
IV.1. L'objectif du travail.....	24
IV.2. Lieu du travail.....	24
VI.3. Origine des souches.....	24
VI.4. Matériel utilisé.....	24

VI.4.1. Les milieux de culture	24
VI.4.2. Les produits et réactifs	25
VI.4.3. Appareillage.....	25
IV.5. Méthodes	26
IV.5.1. Réactivation des souches	26
IV.5.2. Confirmation de la viabilité des souches	26
IV.5.3. Résistance des souches aux conditions Gastro-intestinales simulées	27
IV.5.3.A. Résistance à l'acidité du tractus digestif (variation de pH)	27
IV.5.3.B. La Résistance au suc gastrique stomacal simulé.....	29
IV.5.3.C. La Résistance aux Conditions intestinales.....	29
1. Teste de résistance aux sels biliaires.....	29
2. Test d'Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial.....	31

CHAPITRE III.RESULTATS ET DISCUSSION

V. Résultats et discussion	33
V.1. Les Caractéristiques Culturelles des souches utilisées	33
V.2. Résistance des souches aux conditions Gastro-intestinales simulées...	36
V.2.1. Résistance à la variation d'acidité de l'estomac.....	36
V.2.2.Résistance aux sucs Gastriques simulés à pH=2,5 et aux sels biliaires (0,5%).....	40
V.3. Résultats d'adhésion.....	43
Conclusion.....	46

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Introduction

Les bactéries lactiques occupent une place prépondérante dans le groupe des bactéries « GRAS » (Generally recognized as safe); et nombreuses de ces bactéries ont le statut « probiotique » qui les implique à manifester diverses propriétés bénéfiques pour la santé de l'homme comme, par exemple: la diminution de l'incidence de diarrhées; la stimulation de la défense immunitaire (**Vanderhoof et al.,1999; Fukuschima et al.,1998**).

Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte (**FAO/OMS, 2001**). Plusieurs critères majeurs de sélection des probiotiques, in vitro et in vivo, ont été établis et retenus par différents auteurs. En effet, les Bactéries lactiques utilisés comme probiotiques doivent répondre à certaines propriétés fonctionnelles comme la survie pendant leurs transit dans le tractus digestive: (résistance à l'acidité gastriques; sels biliaires, enzymes ...etc) (**Ouwehand et al., 2002**).

Le tractus digestif représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement, il abrite une microflore naturel de bactéries lactiques ainsi que d'autres microorganismes qui vivent en équilibre physiologique avec l'hôte(**Isolauri et al.,2002**), et l'utilisation de bactéries lactiques à potentiel probiotique pour le maintien de cet équilibre intestinale et le traitement des maladies digestives semble prometteuse selon les observations rapportées par plusieurs travaux de recherche. (**Ennahar et al.,2000**).

L'objectif de Notre travail est la mise en évidence in vitro de deux critères fonctionnelles pour la sélection de probiotiques chez Neuf souches de lactobacilles nouvellement isolées à partir du lait de vache; à savoir:

- 1) La survies des souches dans des conditions de suc gastrique simulées (l'acidité de l'estomac; pepsine et sels biliaire)
- 2) La capacité d'adhésion des souches aux cellules intestinales.

I. LES BACTÉRIES LACTIQUES

I.1. Généralités

Les bactéries lactiques sont des microorganismes GRAS (Generally Regarded As Safe), très fréquentes dans la nature et elles vivent dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif. **(Leveau et Bouix., 1993)**

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène dont la taxonomie est en évolution permanente ainsi quatorze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella* et le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dernières années **(Carr et al.,2002; Axelsson.,2004; Pot., 2008).**

Ces bactéries se présentent sous formes de bâtonnet ou de coques (cocci), se sont des Gram positif, elles sont catalase négative, cytochrome oxydase négative, et nitrate réductase négative, immobiles et asporulés. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles **(Dellaglio et al., 1994 ; Hogg., 2005).**

Ce groupe de bactéries se caractérise par un métabolisme exclusivement fermentaire, qui permet de produire des quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation lactique est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂...etc.) **(Leveau et Bouix., 1993 ; Pilet et al., 2005).**

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles pour la fermentation d'un grand nombre de produits comme le yaourt, le fromage et le beurre **(CHAMPAGNE., 1998).**

Elles interviennent également dans la fabrication des salaisons, et peuvent aussi produire de nombreux agents antibactériens tels que les bactériocines **(Bourgeois et Larpent., 1996).**

I.2. Le Genre *Lactobacillus*

I.2.1. Généralités

Les lactobacilles sont présents dans de nombreux biotopes, et constituent une part très importante du microbiote digestif humain et animal. Chez l'Homme sain, ils se retrouvent tout au long du système digestif : de la bouche au côlon (**Fredereghi., 2005**).

Les espèces les plus rencontrées sont : *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. brevis*, le groupe *L. casei*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. vaginaliset*, *L. ruminis* (**Reuter., 2001; Eckburget al., 2005 ; Walter., 2008; Ozgun et Vural., 2011**) .

Ils peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets (**Figure-1**) longs et fins ou très courts ou coccobacilles et formant de long chaines parfois segmentées (**De Vos et al., 2009**).



Figure 01 : Aspect morphologique de *Lactobacillus acidophilus*(A) *Lb helveticus*, (B)*Lbcasei*(C) observées au microscope électronique (**Mami., 2013**)

Les bactéries lactiques colonisent de nombreux produits alimentaires tels que les produits laitiers, la viande, les végétaux, et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (**Dortu et Thonart., 2009**).

Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement fermentaire avec différentes voies métaboliques (**Figure-2**) (**Perry et al., 2004**).

- *La voie métabolique homofermentaire* : dont il s'agit de la voie de la glycolyse (production à partir d'une molécule de glucose deux molécules d'acide lactique) **Perry et al., 2004.**
- *Le voie métabolique hétérofermentaires* : qui est représenté par la voie de 6-phosphogluconate, qui fermente les hexoses pour former l'acide lactique, le dioxyde d'oxygène et l'éthanol (ou l'acide l'acétique) comme produits finaux .La différence entre ces deux voies métaboliques est détectable par dégagement de CO₂.

Certaines bactéries lactiques homofermentaires : dans les milieux pauvres en hexoses, peuvent fermenter les pentoses pour produire de l'acide lactique et de l'acide acétique comme produits finaux. Ces bactéries sont qualifiées d'hétérofermentaires facultatives **(Axelsson., 2004).**

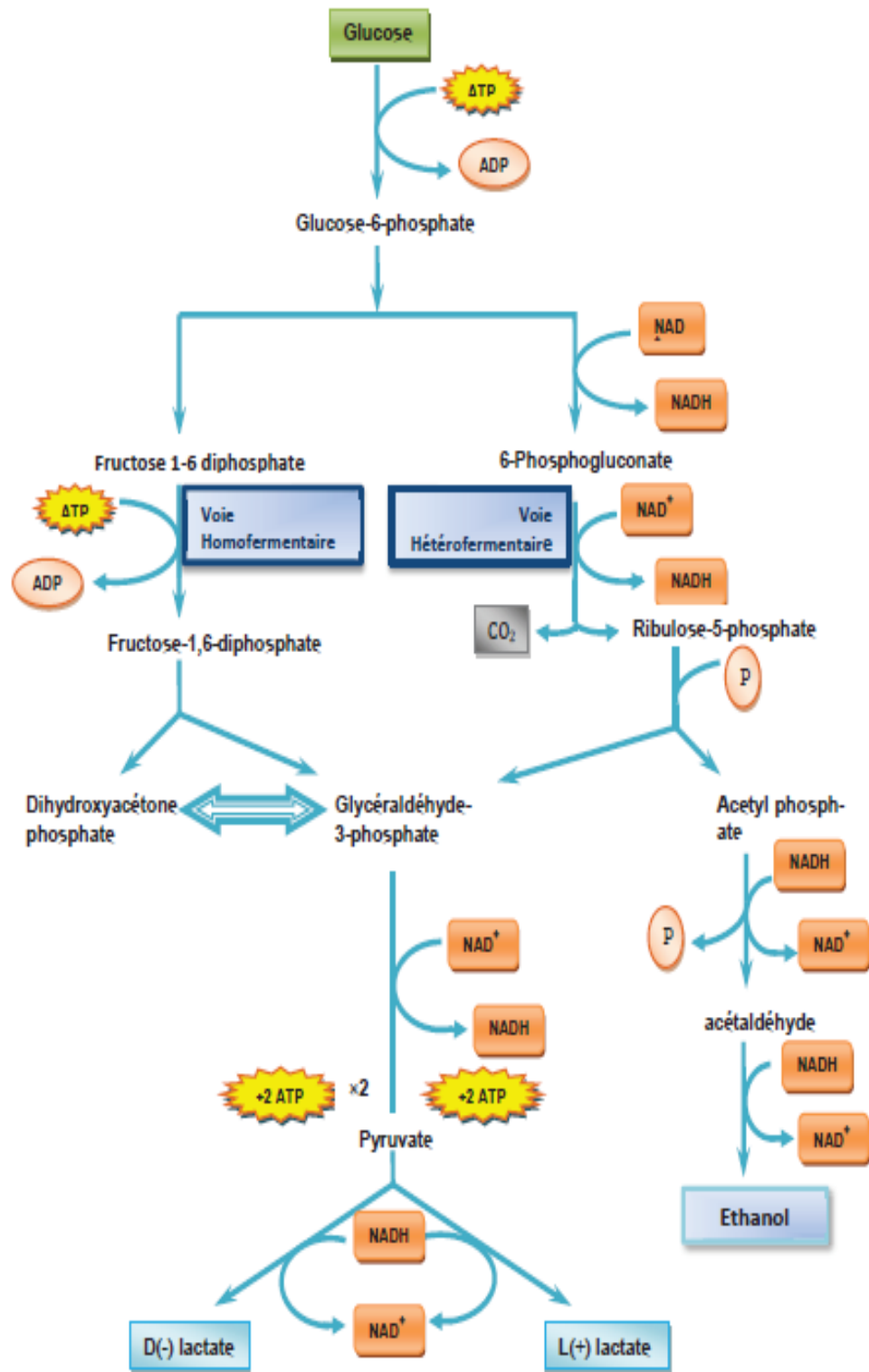


Figure 2 : Les principes voies métaboliques des lactobacilles (Source Perry et al., 2004) .

I.2.2. Caractères culturels et exigences nutritionnelles des lactobacilles :

La plupart des lactobacilles se multiplie dans une gamme de température comprise entre 15°C et 42°C. Certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55 °C (Adams et Moss., 2000 ; Tailliez., 2004) .

Ils se développent au mieux dans des conditions acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4,. Certaines souches résistent à des pH très acides et milieu le plus adapté à leur culture est celui De Man, Rogosa et Sharpe (MRS) (Kandler et Weiss., 1986).

En culture, ils se développent au bout de 24 à 48 heures, et les lactobacilles se présentent généralement avec des petites colonies, incolores, blanchâtres ou jaunâtres, lisses ou rugueuses, arrondies ou lenticulaires (De Vos *et al.*, 2009).

Ces microorganismes sont auxotrophes pour bon nombre de facteurs de croissances et ont des exigences nutritionnelles nombreuses qui peuvent être classées selon De (Man *et al.*, 1960 et De Vos *et al.*, 2009) comme suit :

➤ Exigences en vitamines :

Toutes les espèces ont un besoin absolu en vitamines telles que la pantothenate (B5), en niacine (B3) et en cobalamine (B12). Les déficiences en vitamine B12 peuvent induire une diminution de la synthèse de l'ADN et entraîner des changements morphologiques et les cellules deviennent filamenteuses. Une telle élongation cellulaire a été observée avec *L. helveticusspjugurtilors* de déficiences en cobalamine (B12) ou en acide folique (De Man *et al.*, 1960; De Vos *et al.*, 2009).

➤ Exigences en bases azotées

Dans les milieux synthétiques, les lactobacilles, exigent la présence d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile. Ces exigences sont variables selon les espèces (De Man *et al.*, 1960; De Vos *et al.*, 2009) .

➤ Exigences en cations

Les ions Mg²⁺ et Mn²⁺ ou Fe²⁺ sont nécessaires pour la croissance des lactobacilles. Il a été démontré que le manganèse et le magnésium interviennent comme activateurs d'un grand nombre de réactions enzymatiques et comme stabilisateurs de la structure des

acides nucléiques, des ribosomes et de la membrane cellulaire des lactobacilles (De Man *et al.*, 1960; De Vos *et al.*, 2009) .

I.2.3. Classification des lactobacilles

Les lactobacilles sont subdivisés en trois groupes selon leur type fermentaire (Tableau 1), par la classification d'Orla-Jensen Kandler et Weiss., (1986).

Tableau 1 : Classification des lactobacilles (kandler et weiss., 1986; Mami., 2013)

Les groupes	Caractéristiques	Les complexes	Exemple : espèces et sous-espèces
Groupe I	Homofermentaires strict fermentent les hexoses par voie E.M.P, ne fermentent ni gluconate ni les pentoses.	<i>Lb. delbrueckii</i>	Trois sous-espèces : <i>delbruckii, lactis, bulgaricus</i>
		<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. acidophilus, Lb.heverticus Lb. amylovorus, Lb.crispatus, Lb. gassaeri, Lb. gallinarum, Lb. johnsonii</i>
		Autres espèces	<i>Lb. intestinalis, Lb. jonsonii, Lb.aviarius, Lb. hamsteri Lb. kefiranofaciens, Lb. mali, Lb. acetotolerans, Lb. ruminus, Lb. vitulinus.</i>
Groupe II	Hétérofermentaires facultatifs, fermentent les hexoses par E.M.P et les pentoses	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. plantarum, Lb. pentosus et Lb. agilis</i>
		<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. casei, Lb. paracasei, Lb. rhammosus.</i>
		<i>Lb.bavaricus</i>	<i>Lb. bavaricus, Lb. curvatus, Lb. sake</i>
		Autres espèces	<i>Lb.uli, Lb.graminis.</i>
Groupe III	Hétérofermentaires stricts fermentent les hexoses et les pentoses.	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb.fermentum, Lb.cellobiosis, Lb.reuteri et Lb.vavaginalis.</i>
		<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. brevis, Lb. buchneri, Lb. kefir Lb. hilgardii, Lb. collinoides Lb. oris, Lb. sanfrancisco Lb. malfermentans.</i>
		Autres espèces	<i>Lb. fructivorans, Lb. suebicus, Lb. bifermentans (seule espèce capable, selon le pH, de dégrader le glucose en acide acétique).</i>

I.2.4. Intérêt des lactobacilles :

De nombreuses allégations santé ont été associées à l'utilisation des lactobacilles en tant que probiotiques chez l'Homme. Les principaux effets bénéfiques sont :

- Prévention et traitement des diarrhées,
- Atténuation de l'intolérance au lactose,
- Prévention des allergies atopiques,
- Diminution du risque de réapparition des infections urinaires,
- Prévention et retardement de l'apparition de certains cancers,
- Prévention et thérapie des vaginoses bactériennes,

- Réduction du taux de cholestérol et prévention de certaines maladies cardio-vasculaires,
- Modulation et stimulation de la fonction immunitaire,
- Prophylaxie et thérapie des maladies intestinales inflammatoire : maladie de Crohn, et le syndrome du côlon irritable,
- Prévention et traitement de l'infection par *Helicobacter pylori*

(Reid *et al.*, 2003 ; Hsieh et Versalovic., 2008 ; Vasiljevic et Shah., 2008).

II. Le Tractus digestif

II.1. Généralité :

Le tractus digestif est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes, par sa totale (muqueuse) estimé à 200-300 m². Il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement et constitue un principale habitat naturel des bactéries lactiques ainsi que d'autre microorganismes, du fait qu'il fournit un environnement stable et un approvisionnement continu en éléments nutritifs, sous forme d'aliments ingérés ou sécrétés par l'hôte (**de Roissart.,1986**) .

Les Lactobacilles comptent parmi la flore dominante du microbiote intestinale et sont présents tout au long du tractus digestif en quantités variables. Il représentent environ 1% de la microflore intestinale et on les retrouve au niveau de l'intestin grêle (duodénum et jéjunum) ou ils accèdent aux réserves de glucides provenant de l'alimentation de l'hôte et qu'il utilisent comme sources d'éléments nutritifs pour leur métabolisme fermentaire (**Dal Bello et al.,2003; Tannock.,2005**) .

Toutefois, La croissance de ces bactéries dans les différentes sections du tube digestif, dépend d'autres facteurs physiologiques tels que l'acidité, les sécrétions biliaires, la présence d'immunoglobulines, d'enzymes digestives, l'exfoliation des cellules épithéliales, la sécrétion du mucus et les mouvements péristaltiques (**Holzapfel et al.,1998; Tannock.,1999**) .

La principal action du tube digestif réside dans la digestion des aliments, qui débute dans la cavité buccale, ces nutriments vont subir des transformations progressives pour les réduire en substances absorbables et utilisables par l'organisme hôte, et ces transformations sont de deux ordres : mécanique par une action de broyage et de brassage et chimique par l'utilisation des enzymes digestives (**Holzapfel et al., 1998; Perlemuter et al.,1998**) .

II.2. Composition du tractus digestif de l'homme :

Selon **Taglang, (2005)** le tractus gastro-intestinal humain (**Figure-3**) est composé de:

- **La bouche** : où se passe la mastication des aliments.
- **L'estomac** : où les aliments s'accumulent, c'est un réservoir (~1,3 L) dans lequel le chyme alimentaire est brassé et imprégné par les sucs gastriques. Le jus stomacal est

constitué de mucus, de pepsinogène (converti en pepsine), d'acide chlorhydrique, de facteur intrinsèque et de gastrine (Wilson 2008).

➤ **Les intestins** : Les sécrétions intestinales maintiennent un pH légèrement basique ($7 < \text{pH} < 8$) et la quantité d'oxygène diminue. Les sels biliaires, le suc pancréatique et les enzymes (protéases, lipases et amylases) permettent la digestion du chyme alors que les composés non digérés (fibres, amidon résistant, quelques peptides et lipides) passent dans le gros intestin (Walter and Ley 2011). On retrouve :

- Intestin grêle (6 à 8 m de long) composé d'un duodénum qui est un carrefour important où vient confluer les sucs biliaires et pancréatiques et du jéjunum et l'iléon, où s'opère la plus grande partie des actions digestives qui permettent l'utilisation des aliments (Taglang.,2005) .
- Le gros intestin (1,40 à 1,70 m de long) composé d'un caecum (peu développé), côlon où le contenu intestinal prend un caractère fécal, et le rectum (Taglang.,2005)

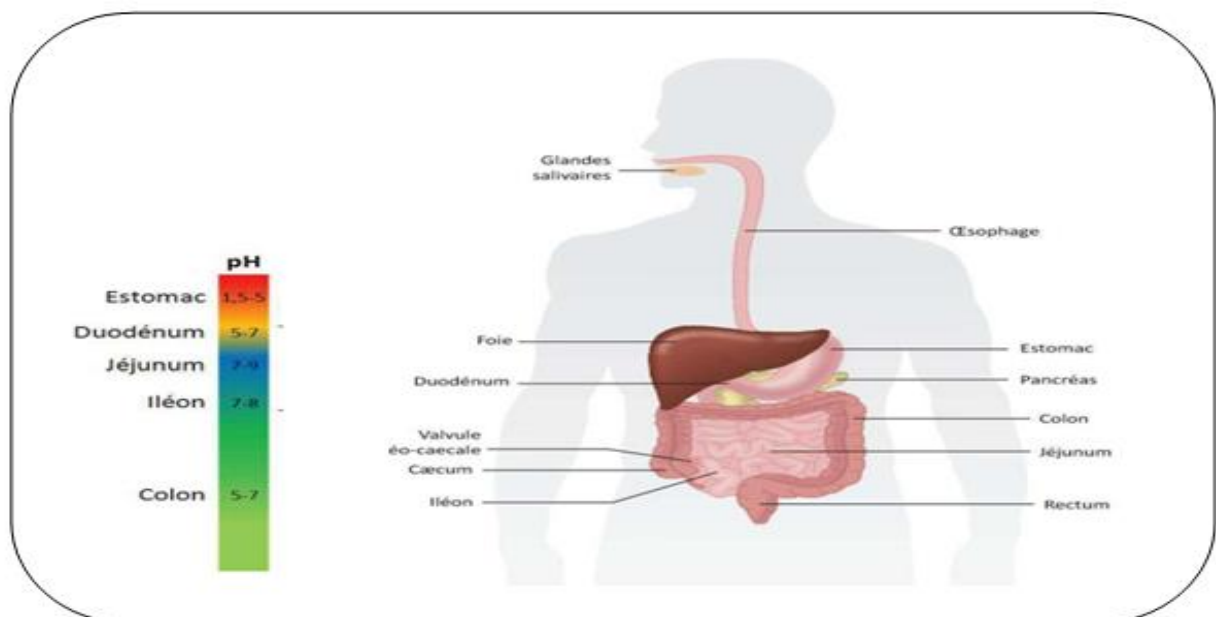


Figure-3: Structure et conditions physicochimiques du tractus digestif (Walter and Ley 2011)

II.3. Les Conditions hostiles du tractus digestif :

Pour pouvoir exercer leur(s) effet(s) biologique(s), les bactéries lactiques probiotiques, ingérées oralement, doivent atteindre l'intestin grêle et le côlon vivants et en quantité

suffisante. Cela suppose qu'ils puissent résister à un certain nombre de barrières physiologiques à la colonisation bactérienne digestive (**Flourie et Nancey., 2007**).

II.3.1. Le suc gastrique

Selon **Perlemuter et al.(1998)**, C'est un liquide pratiquement incolore, très acide avec un pH qui varie de [1,5 à 3] sécréter par les glandes de la paroi gastrique, sa sécrétion et sa composition sont rythmées par les repas; elles sont variables dans les 24 heures, il est constitué de :

- A. l'acide chlorhydrique (HCl) :** Il confère au suc gastrique son acidité, et il permet l'inhibition de la prolifération de certaines bactéries nuisibles dans l'estomac et la transformation de pepsinogène inactif en pepsinogène actif (**Perlemuter et al., 1998**).
- B. Le mucus :** Son rôle est de protéger la muqueuse gastrique contre l'acidité de ses propres ferments et de l'acide chlorhydrique. Il est riche en bicarbonates (HCO_3) (**Rullier., 1995**).
- C. Les pepsinogènes :** Ce sont des enzymes protéolytiques qui dégradent les protéines en molécules plus petites après être transformées en pepsine grâce à l'acide chlorhydrique (**Perlemuter et al., 1998**).

II.3.2. Les sels biliaires :

Elles se présentent sous forme d'un liquide jaune, brunâtre ou vert olive, sécrétées quotidiennement (800 à 1000 ml de bile) par les hépatocytes et leur pH est compris entre 7,6 et 8,6 (**Dore., 1994**).

La bile contient principalement :95% d'eau, du mucus, des sels minéraux et du cholestérol. Elle agit essentiellement sur les graisses et les transforme en micelles ce qui va permettre leur absorption au niveau intestinal et elle assure aussi l'élimination des déchets d'hémoglobine et de substances étrangères (**Rullier., 1995 ; Moserscott et al., 2001**).

II.3.3. Les variations de pH

L'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions très différentes (**Tableau-2**) pour la survie des différents microorganismes (**Wilson., 2008**).

- A. Au niveau de l'estomac :** La prolifération microbienne est fortement réduite est

fortement réduite (inférieure à 10³ UFC /g) à cause de la présence d'oxygène apporté par la déglutition et de la forte acidité. De ce fait, l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acidotolérants et anaérobies facultatifs comme les lactobacilles, streptocoques, levures, etc. Le pH est légèrement acide ($1,5 < \text{pH} < 5$) (**Wilson., 2008**).

- B. Au niveau de l'intestin grêle :** On observe une variation quantitative (duodénum 10³-10⁴ UFC/g, jéjunum 10⁴-10⁶ UFC/g, iléon 10⁶-10⁸ UFC/g) et qualitative : diminution progressive des bactéries aérobies au profit des bactéries anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies. Il y a peu de bactéries dans l'intestin grêle où elles ne jouent pratiquement aucun rôle (**Gournier-Château., 1994 et Dacosta., 2001**). Les sécrétions intestinales maintiennent un pH légèrement basique ($7 < \text{pH} < 8$) et la quantité d'oxygène diminue. C'est au niveau de l'intestin grêle que les composés alimentaires sont dégradés en sucres simples, acides aminés et acides gras qui vont être absorbés. Les sels biliaires, le suc pancréatique et les enzymes (protéases, lipases et amylases) permettent la digestion du chyme alors que les composés non digérés (fibres, amidon résistant, quelques peptides et lipides) passent dans le gros intestin (**Walter and Ley., 2011**).
- C. Au niveau du colon :** (absence d'oxygène), le transit, très fortement ralenti, est à l'origine d'une stase d'où l'augmentation importante de la population bactérienne (de 10⁹ à 10¹¹ UFC/g). C'est une véritable chambre de fermentation, siège de très nombreuses biotransformations des aliments non assimilés au niveau du grêle. Le côlon est la seule zone colonisée de façon permanente : la flore microbienne essentiellement anaérobie est dense et active, produisant localement de nombreux métabolites (**Blum et al., 1999 ; Rastall., 2004**). Le pH est légèrement acide ($5 < \text{pH} < 7$) dans la partie proximale du gros intestin et augmente progressivement jusqu'à la neutralité (**Fonty and Chaucheyras-Durand 2007**).

Tableau 2 : Les conditions physiologiques des différentes sections du tractus digestif et leurs rôles (Walter and Ley., 2011).

Segment	Rôle	pH
Estomac	Stérilisation du bol alimentaire. Broyage des aliments.	2 1,5 pendant la nuit ; 2 en début de digestion et 5 en fin de digestion
Duodénum (intestin grêle proximal)	Neutralisation du bol alimentaire en provenance de l'estomac, grâce aux sécrétions biliaires et pancréatiques.	7,5 à 8,2 correspondant au pH des sécrétions biliaires et pancréatiques (bile 7,5 – pancréas 8,2)
Iléon (intestin grêle terminal)	Assimilation des micro-nutriments : vitamines, minéraux, sucres simples, grâce à l'action d'enzymes cellulaires (issues de la muqueuse intestinale).	6 correspondant au pH optimal d'activité des enzymes cellulaires
Côlon droit	Digestion des sucres lents grâce à l'action de la flore microbienne de fermentation, avec libération de métabolites acides.	6,5 à 7 correspondant au pH optimal d'action de la flore de fermentation.
Côlon transverse	Segment de transition entre les flores de fermentation et de putréfaction, siège de la réabsorption de composés acides.	8
Côlon gauche	Digestion des protéines grâce à l'action de la flore microbienne de putréfaction, avec libération de métabolites alcalins.	8 correspondant au pH optimal d'action de la flore de putréfaction.

II.3.4. Les Enzymes digestives :

Les sécrétions digestives constituent aussi une condition physiologique très importante et influencent sur la survie des microorganismes probiotiques et c'est dans la partie intestinale que les enzymes digestives sont plus redoutable.

En effet, la digestion se poursuit au niveau de la lumière intestinale sous l'action de cinq enzymes protéolytiques d'origine pancréatique : la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase, la carboxypeptidase A et la carboxypeptidase B (Van Dyke., 1989). Les enzymes pancréatiques sont synthétisées et libérées par les cellules acineuses du pancréas sous forme de zymogènes inactifs (Van Dyke., 1989).

La bordure en brosse de l'intestin grêle contient plusieurs peptidases qui participent à la phase finale de la digestion. Ces enzymes sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux et sont transportées à travers l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane de la bordure en brosse (Van Dyke., 1989; Erickson & Kim, .,1990)

II.4. Le microbiote intestinal

Selon Isolauri et al., 2002, la flore intestinale se compose de nombreux microorganismes (Figure-04) qui vivent en équilibre avec l'hôte dans son tractus gastro-intestinal, et forment un écosystème très complexe qui peut influencer sur les fonctions

immunologiques, physiologiques, métaboliques et nutritionnelles de l'hôte (Isolauri et al., 2002).

La microflore intestinale humaine renferme environ 10^{14} cellules microbiennes, soit 10 à 20 fois le nombre de cellules de l'organisme. Les différences interindividuelles sont importantes, accentuent la biodiversité et compliquent, fatalement, son étude et sa compréhension, c'est pourquoi l'identité complète de cette flore n'est pas complètement élucidée mais parmi cette population, seuls 20% des espèces bactériennes sont actuellement répertoriées dans les collections de souches (Bjorksten., 2004).

Parmi les micro-organismes présents, la grande majorité sont des bactéries anaérobies strictes du phylum des Firmicutes, des Bacteroidetes (*Bacteroides* spp, *Clostridium* spp) ou des Actinobacteria (*Bifidobacterium* spp, *Atopobium* spp) . On retrouve aussi des bactéries anaérobies facultatives (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*) et des Proteobacteria (*Escherichia coli*). Enfin, en dehors de cette flore majoritaire, on retrouve également, en quantité moindre, des archées, des protozoaires et des champignons (Walter and Ley., 2011).

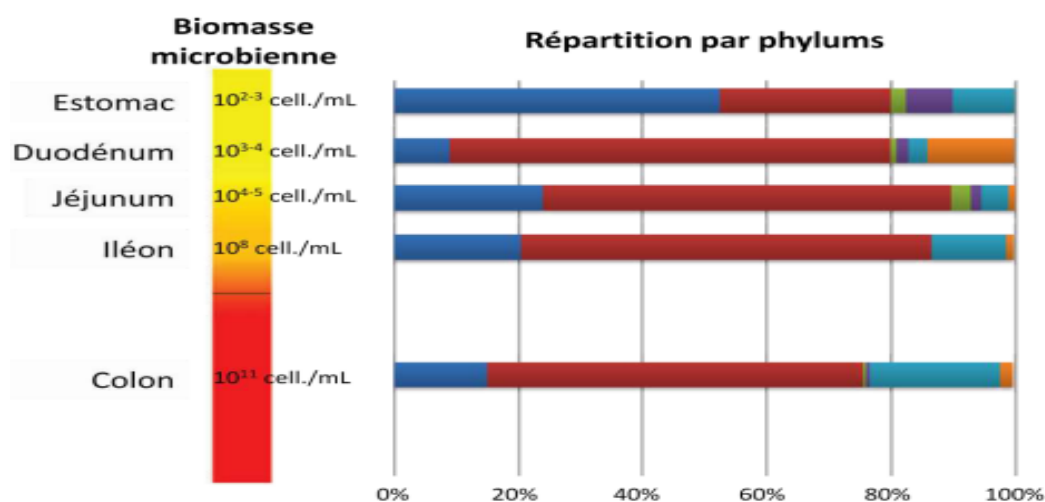


Figure 4 : Quantité et répartition des micro-organismes le long du tractus digestif (Walter and Ley .,2011; Wilson., 2008) - Proteobacteria (■), Firmicutes (■), Fusobacteria (■), Actinobacteria (■), Bacteroidetes (■), Autres (■)

II.4. Rôle du tractus digestif et sa microflore :

Le Tractus digestif avec sa microflore constitue une barrière physiologique pour l'homme contre les différents microorganismes nuisibles et lui procure un équilibre digestif et vital pour survivre.

En effet, il a été démontré que les populations microbiennes du tractus contribuaient à l'absorption des nutriments (glucides, lipides) et régulaient le stockage des graisses (**Backhed et al., 2004; Backhed et al., 2005**).

Le microbiote participe à la décomposition des substances non digérées, à la production de vitamines et à la régulation de la physiologie intestinale (**Gibson and Roberfroid., 1995; Rumney and Rowland., 1992**).

Les glucides y sont transformés en acides organiques et en acides gras à chaîne courte (acétate, butyrate...), bénéfiques pour la prévention contre les infections digestives (**Fukuda et al., 2011; Pryde et al., 2002**).

La flore intestinale joue aussi un rôle important dans la maturation et la stimulation du système immunitaire intestinal de l'hôte (**Macpherson and Harris., 2004; Mazmanian et al., 2005**).

Enfin, il a été démontré que les gènes impliqués dans les réponses immunitaires et le métabolisme sont principalement régulés par le microbiote intestinal dans l'intestin grêle, et notamment l'iléon (**Hooper et al., 2001; Larsson et al., 2011**).

III. Les Probiotiques

III.1. Historique et définition

Il y a un siècle, Elie Metchnikoff (microbiologiste russe, élève de Louis Pasteur et lauréat du prix Nobel) émet l'hypothèse que la bonne santé et la longévité de certaines populations de l'Europe de l'est seraient due à leur consommation quotidienne de laits fermentés (Sanders., 2000).

Ensuite, plusieurs travaux se sont développés selon le concept que l'ingestion de microorganismes peut améliorer la santé de l'hôte et ce fut Parker qui proposa pour la première fois en 1974 le terme « probiotique » pour désigner les microorganismes et substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la microflore intestinale (Vasiljevic et Shah., 2008).

Plus tard, Fuller (1991) a redéfini les probiotiques de la façon suivante : « préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additif alimentaire, ayant une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale » et depuis, plusieurs définitions des probiotiques ont succédé sur la base des nouvelles connaissances de leurs modes d'actions et de leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (Millette., 2007).

Actuellement, la définition la plus utilisée a été validée par l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO) et par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) et qui ont défini les probiotiques comme étant « des microorganismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » (Salminen *et al.*, 1998; FAO/OMS, 2001).

Les principaux microorganismes probiotiques (Tableau-3) connus à ce jour sont des bactéries (Lactobacilles, bifidobactéries, propionibactéries, *Escherichia coli* et entérocoques) et des levures (*Saccharomyces boulardii*) (Ouweland *et al.*, 2002).

Tableau 3 : Principaux micro-organismes utilisés comme agents probiotiques (Ouwehand et al., 2002).

Lactobacillus sp.	Bifidobactérium sp	Autre
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>L.amylovorus</i> <i>L. casei</i> <i>L. cripatus</i> <i>L.delbrueckii subspbulgaricus</i> <i>L.gallinarum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. onhsonii</i> <i>L .aracasei</i> <i>L.plantarum</i> <i>L.reutei</i> <i>L.rhammosus</i>	<i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> <i>B.Bifidum</i> <i>B. Breve</i> <i>B.infantis</i> <i>B.lactis</i> <i>B.longum</i>	<i>Bacillus cereus</i> <i>E.coli souche Nissele</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Propionibacterium freudeneichii</i> <i>Streptococcus thremophilus</i> <i>Saccharomyces cerevisie</i> <i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Sporolactobacillus inulinus</i>

III.2 Critères de sélection des probiotiques :

Tout microorganisme reconnu potentiellement probiotique doit obligatoirement répondre à certains critères (**Tableau 4**).

La première étape essentielle réside dans le choix du micro-organisme qui doit non pathogène sur le plan sécuritaire et ne présente pas des risques de virulence (**Suvarna et Boby., 2005 ; Anuradha et Rajeshwari., 2005**).

Les probiotiques étant administrées vivantes par voie orale, il est nécessaire qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif pour être efficace. Elles doivent donc résister aux enzymes présents dans la cavité buccale dont la principale est le lysozyme, au pH acide de l'estomac dû à la présence de forte concentration d'acide chlorhydrique, aux sucs pancréatiques et aux concentrations de bile et de mucus présentes dans l'intestin grêle (**Percival., 1997; Malinen., 2002 ; Chafai sihem.,2006**).

Tableau 4 : Proposition de critères de sélection des probiotiques à application intestinale, adapté de **Saarela et al., (2000)**.

Critères de sécurité	Critères fonctionnelles	Critères technologiques
<ul style="list-style-type: none"> • Souche pour l'usage humain d'origine humaine (isolée du tractus intestinal d'un homme sain ou alimentaire (utilisée dans les produits fermentés) • Souche déposée dans une collection de cultures reconnue internationalement • Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques • Historique de non pathogénicité • Pas de déconjugaison excessive des sels biliaires au risque des lyses cellulaires • Pas de transmission possible de gènes résistant aux antibiotiques • Pas de dégradation excessive de mucus 	<ul style="list-style-type: none"> • Tolérance à l'acidité et aux enzymes gastriques • Tolérance à la bile et aux enzymes digestives • Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastro-intestinal • Immunostimulation • Production de substances antimicrobiennes et antagonisme vis -à-vis des pathogènes • Effets positifs sur la santé 	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini • Conservation des propriétés probiotiques après production

III.2.1. La résistance à l'acidité gastrique

Le temps de passage des probiotiques dans l'estomac peut durer de 1h à 4h selon l'individu et son alimentation, ce qui peut influencer sa survie du fait de la présence de l'acide chlore hydrique. C'est pourquoi différents auteurs s'intéressent aux études de survie des probiotiques à l'acidité et mettent en évidence leur résistance in vitro dans des milieux de culture à pH bas pendant au moins quatre heures (**Ammor et Mayo., 2007**).

III.2.2. La résistance aux sels biliaires :

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (**Ammor et Mayo, 2007 ; Gu et al., 2008, Hadeef Sawssen.,2012**).

III.2.3. L'adhésion aux cellules épithéliales

Il est intéressant que les souches probiotiques puissent adhérer aux cellules de la paroi intestinale (**figure 5**), ceci facilitant une bonne colonisation du tube digestif par les probiotiques (**Bezkorovany., 2001 ; Crittenden et al., 2005; Chafai sihem., 2006**).

L'adhésion constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes (**figure 6**). Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests *in vitro* puis *in vivo* en utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine (**Palomares et al., 2007 ; Reyes-Gavilan et al., 2011; Hadeef Sawssen.,**).

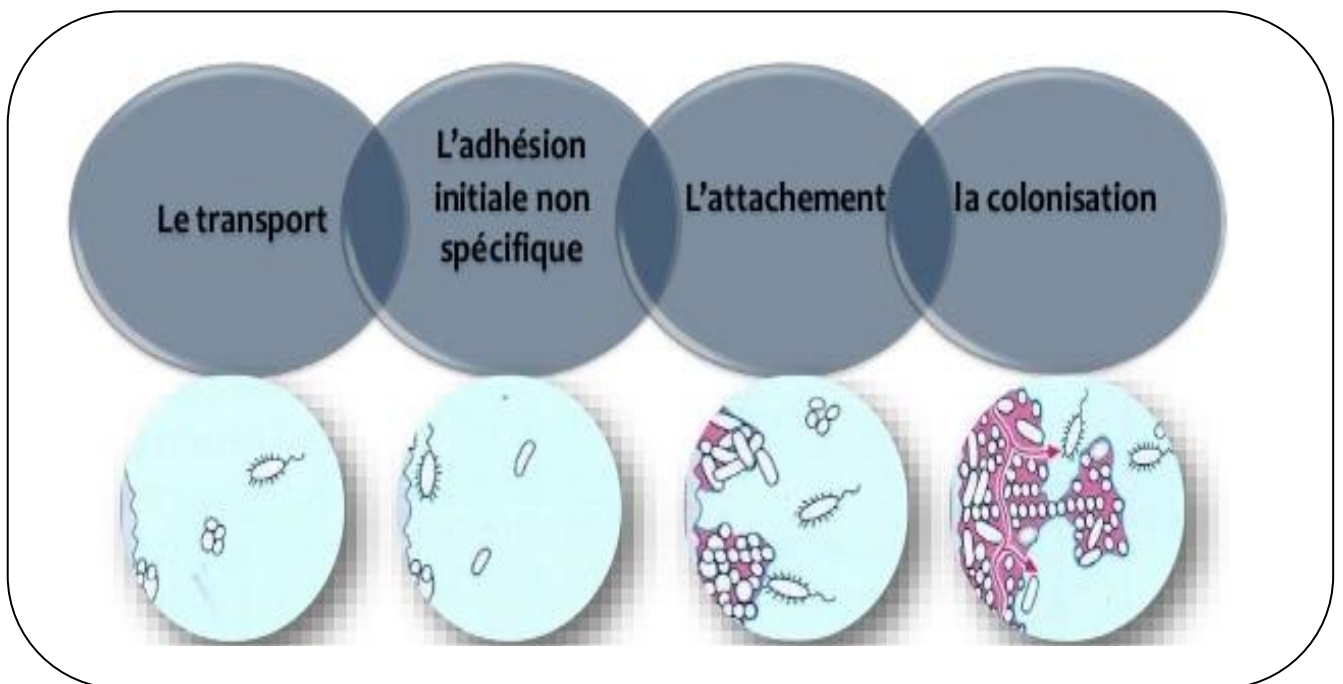


Figure 5 : Les différentes étapes du mécanisme d'adhésion aux cellules épithéliales (**Crittenden et al., 2005**).

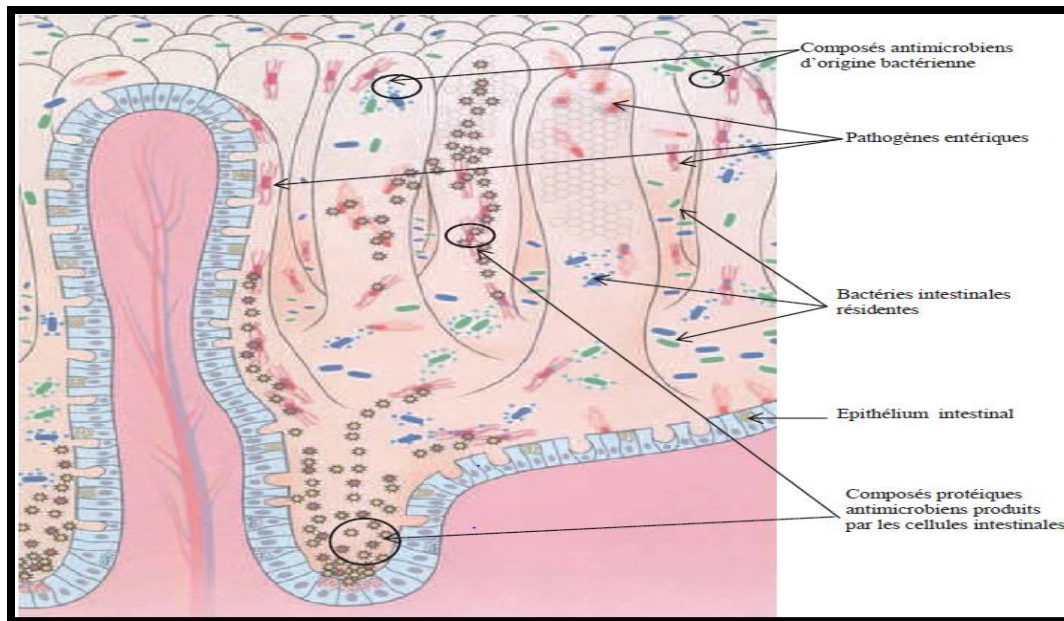


Figure 6 : Défenses antimicrobiennes de l'hôte face à l'intrusion de micro-organismes pathogènes au niveau du tractus intestinal (Tirée de **liévin-Le Moal et Servin , 2006**)

III.2.4. La production de substances antimicrobiennes

Parmi les critères de sélection des probiotiques on retrouve aussi la capacité à produire et à synthétiser des molécules à effet bactéricides ou bactériostatique.

Les bactéries lactiques produisent différentes substances telle que l'acides lactique ; H₂O₂; CO₂; di-acétyle et les bactériocines dont les propriétés inhibitrices sont utilisé en alimentation pour améliorer la préservation des aliments, et en santé humaine et animale pour le traitement de certaines infections bactériennes (**Titiek et al., 1996 ; Labiouiet al., 2005**).

III.2.5. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques. Dans la plus part des cas la résistance n'est pas transmissible, cependant, il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autre espèces et genre. C'est une raison significative pour choisir des souches manquantes du potentiel de transfert de résistance (**Denohue., 2004**).

Les autorités européennes ont récemment conclu que quelques bactéries utilisées pour la production d'aliment pourraient poser un risque à la santé humaine et animale en raison

d'héberger des souches avec les gènes de résistance transmissibles. Par conséquent, avant de lancer une culture probiotique, il est important de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne comportent pas de gènes transmissibles de résistance aux antibiotiques (Ammor et Mayo., 2007).

III.2.6. Critères technologiques

En plus de l'innocuité et des propriétés fonctionnelles, des critères technologiques sont également pris en considération dans la sélection des souches probiotiques Saarela et al., (2000).

Selon Saarela et al., 2000, ces critères sont : Avoir de bonnes propriétés sensorielles, une résistance aux phages, une viabilité durant le traitement technologique et une stabilité dans le produit et durant le stockage (Saarela et al.,2000).

III.4.Rôle des probiotiques

Plusieurs effets bénéfiques sont attribués aux microorganismes probiotiques (Tableau-5). L'effet de barrière, constitue un des effets très efficace contre la colonisation du tube digestif par des bactéries étrangères, pathogènes ou non. Cette fonction protectrice permet également le maintien de l'équilibre de la flore intestinal et limitent également l'adhésion des micro-organismes pathogènes entéro-invasifs (*Salmonelles, Shigelles, E. coli entérotoxigène, Vibriocholerae*) aux cellules épithéliales intestinales (De Vrese et Marteau., 2007).

Des études réalisées avec différents probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus casei Shirota, Bifidobacterium animalis ssp. Lactis BB-12, Enterococcusfaecium SF68, S. boulardii*, etc.) montre aussi leur efficacité, en association avec la réhydratation, dans le traitement de la diarrhée infectieuse aigue virale ou bactérienne chez l'enfant et l'adulte (De Vrese et Marteau., 2007; Sartor.,2005).

D'autres études cliniques contrôlées ont suggéré que les probiotiques pourraient avoir un effet bénéfique dans le traitement des rhinites allergiques ainsi que dans la réduction de la sévérité des symptômes (aucun effet n'est avéré sur le traitement de l'asthme) (Tableau 5) (Vliagoftis et al., 2008) .

Les probiotiques participent également à la stimulation des fonctions immunitaires (Gueimonde et Salminen., 2003) .

Tableau 5 : Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine selon la FAO/OMS, 2001;et WGO, 2008.

Effet probiotiques	Mode d'activité propose
Réduction des risques des diarrhées	-Résistance à la colonisation des pathogènes. -Stimulation du système immunitaire.
Diminution des allergies alimentaires	-Modulation de la flore intestinale. -Stimulation du système immunitaire.
Réduction du cholestérol	-Assimilation du cholestérol. -Déconjugaison des sels biliaires.
Amélioration de la digestion du lactose	-Action de la β galactosidase dans l'intestin grêle.
Prévention du cancer du côlon	-Stimulation du système immunitaire. -Production de composés antimutagéniques -Modulation des enzymes fécales carcinogéniques. -Dégradation des carcinogènes. -Élimination des bactéries impliquées dans la production de carcinogènes.

III.5. Mécanismes d'action des probiotiques

Les effets bénéfiques chez les probiotiques sont dues aux divers mécanismes d'action qu'exercent ces probiotiques (**Figure 8**). Ces mécanismes d'action se résument comme suit :

- ❖ Stabilisation de la flore intestinale par compétition avec des bactéries pathogènes au niveau de la fixation aux récepteurs (adhésion),
- ❖ Inhibition des germes pathogènes ou indésirables par production de métabolites tels que les acides organiques (diminution de pH), peroxyde d'hydrogène et production de substances antibactériennes comme les bactériocines
- ❖ Stimulation du système immunitaire intestinale de l'hôte,
- ❖ Neutralisation de produits toxiques (ammoniac, amines et indoles) et diminution des biotransformations des sels biliaires et des acides gras en substances toxiques.

(Matilla-Sandholmet *al.*, 2002; Isalouriet *al.*, 2004 ; Patel et Lin, 2010 ; Quigley., 2011).

- ❖ Parmi les effets les mieux documentés figurent l'effet antidiarrhéique dans le cadre d'une antibiothérapie (Gill., 2003), ou encore l'amélioration des troubles intestinaux associés à l'intolérance au lactose (Pettoello et al., 1989) ;
- ❖ Des études expérimentales et cliniques montrent une efficacité des traitements probiotiques dans le cadre des colites expérimentales (Matsumoto et al., 2001) et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Gossum.,2007);
- ❖ Réduction de l'absorption du cholestérol en utilisant le cholestérol comme nutriment par le microbiote intestinal ainsi par la déconjugaison des Sels biliaires qui seront plus facilement excrétables dans les selles, ce qui induit l'épuisement des stocks de cholestérol de l'organisme (Gournier-Chateau et al.,1994) ;
- ❖ Diminution de l'incidence du cancer du côlon (Gournier-Chateau et al., 1994)

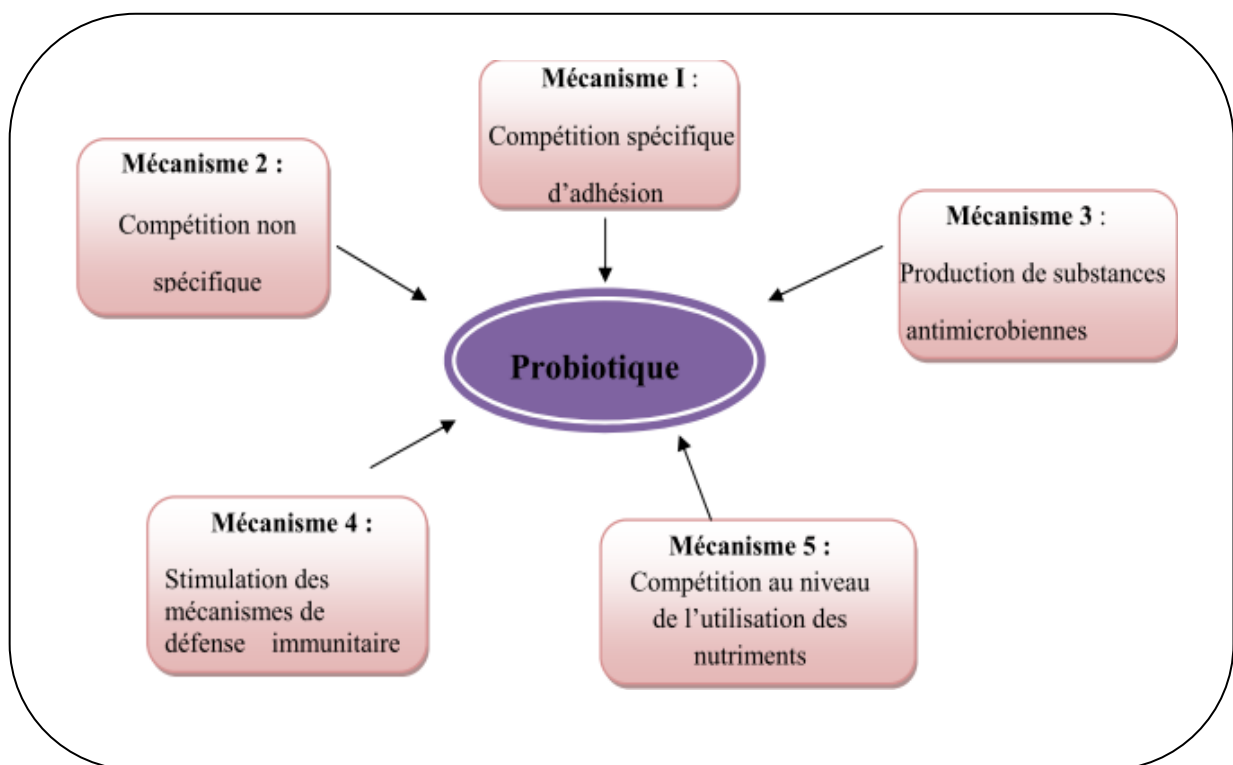


Figure 7 : Les différents mécanismes d'action des probiotiques (Kaur et al., 2002).

IV. Matériels et Méthodes :

IV.1. L'objectif du travail

Le but de cette étude est l'évaluation in vitro de la survie de souches de *Lactobacillus sp* locales isolées à partir du lait de vache dans des conditions gastriques simulées.

IV.2. Lieu du travail

Tout le travail de cette étude est réalisé au niveau du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques et des Aliments fonctionnels et Santé (LMBFAS), durant le mois de Février jusqu'au mois d'Avril 2018.

VI.3. Origine des souches

Les Neuf souches lactiques utilisées dans ce travail ont été isolées à partir du lait de vache, ont été purifiées et conservées à 4°C et sont identifiées génétiquement dans le cadre d'une étude de doctorat de notre Encadreur Mme KOUADRI BOUDJELTHIA N.

Une souche de *Lactobacillus plantarum* qui appartient à la collection du laboratoire des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBFAS), a été utilisée comme souches témoin.

VI.4. Matériel utilisé :

VI.4.1. Les milieux de culture :

- ❖ **Bouillon MRS** : utilisé pour la réactivation des bactéries lactiques.
- ❖ **Gélose MRS** : est utilisée pour la culture et dénombrement des lactobacilles, dans les différents tests.
- ❖ **Milieu hypersalé** : MRS, Bouillon hypersalé à 4% et à 6.5% de NaCl.
- ❖ **Le milieu de suc gastrique simulé** : pour le test de résistance des bactéries lactiques dans l'estomac.
- ❖ **Eau physiologique**

VI.4.2. Les produits et réactifs :

- ❖ **Les sels biliaires en poudre** : pour le test de la résistance des bactéries lactiques dans la bile.
- ❖ **Tampon** : tampon phosphate salin (PBS).
- ❖ HCl et NaOH
- ❖ **Colorants** : Bleu de Méthylène, violet de gentiane, fuchsine, lugole. L'huile d'immersion, Alcool

VI.4.3. Appareillage :

- ❖ Agitateur magnétique,
- ❖ Autoclave,
- ❖ bain marie,
- ❖ Balance électronique (KB 6000-1),
- ❖ pH mètre,
- ❖ Etuve,
- ❖ Réfrigérateur (Condor),
- ❖ Spectrophotomètre (Hanna-Roumanie),
- ❖ Vortex (Stuart),
- ❖ Microscope optique (Olympus Optical CO-LTD),
- ❖ Centrifugeuse (Sigma).

IV.5. Méthodes :

IV.5.1. Réactivation des souches :

Les 10 souches de lactobacilles ont été réactivées dans des bouillons MRS à partir des cultures conservées à 4°C sur Gélose MRS inclinée, ensuite, elles sont incubées à 37°C pendant 16 à 18h pour l'obtention des cultures jeunes.

IV.5.2. Confirmation de la viabilité des souches :

A. Examen macroscopique :

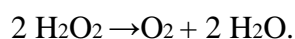
L'observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies, obtenues sur milieu solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité).

B. Examen microscopique :

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS, et dans le but d'écartier toute contamination, les souches ont été soumises à la coloration de Gram, celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, et de déterminer la forme des cellules bactériennes (les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement).

C. Recherche de la catalase :

La catalase est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester.



D. Culture sur milieu hypersalé :

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont étéensemencées sur des bouillons hypersalés à 4% et à 6.5% de NaCl.

Après une incubation à 37°C pendant 24h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble

IV.5.3. Résistance des souches aux conditions Gastro-intestinales simulées :

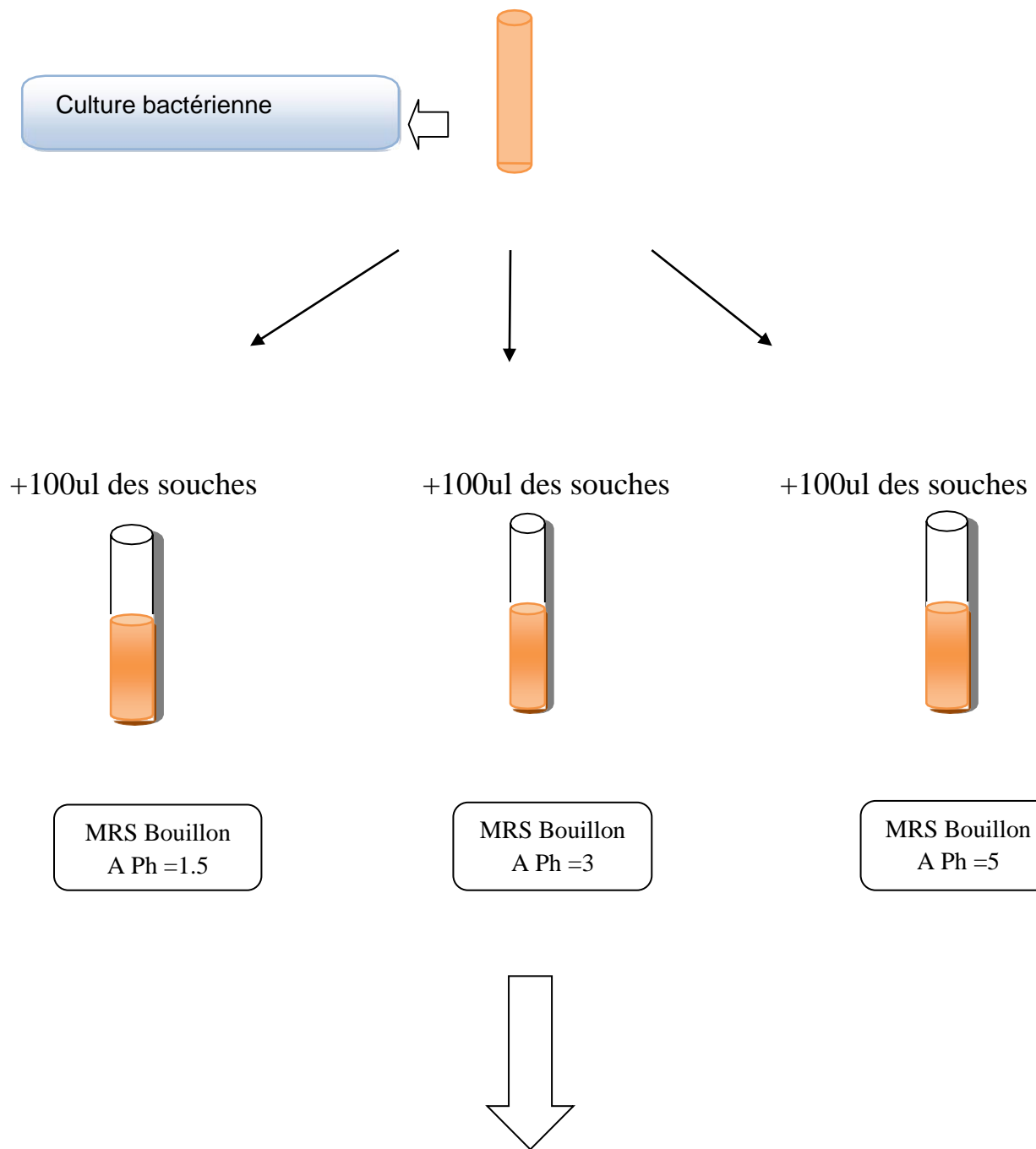
Parmi les bactéries les plus fréquemment utilisées comme probiotiques on trouve les lactobacilles. Ces bactéries étant administrées par voie orale, il est obligatoire qu'elles franchissent les différentes conditions du transit digestif (l'acidité, sels biliaires et suc gastrique) et répondre à un certain nombre de propriétés pour être qualifié de probiotique

(Midassirou et *al.*, 2012)

Dans ce travail, les 10 souches de lactobacilles ont fait l'objet des différents tests qui simulent le parcours que peut subir un microorganisme probiotique durant son passage dans le tractus digestif.

IV.5.3.A. Résistance à l'acidité du tractus digestif (variation de pH) :

Avant d'atteindre le tractus intestinal, les bactéries probiotiques doivent survivre dans le transit à travers l'estomac où le pH peut être très faible. Par conséquent, la tolérance à l'acidité chez les souches de lactobacilles utilisés a été testée en mettant en suspension les cellules bactériennes dans MRS bouillon de pH 1.5,3,et 50 et la cinétique de résistance a été établie par mesure de la Densité optique à 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre , le suivi de la résistance se fait pour chaque souche au cours de l'incubation à 37°, et aux des intervalles de temps 0h, 02h, 04h; 06h, 8h et après 24h d'incubation (figure 9) (Gautam et Sharma.,2015).



La mesure de la densité optique par le spectrophotomètre a 600nm après incubation à 30min ; 2h ; 4h ; 6h ; 8h ; 24h.

Figure 08 : Technique de test de ph (Gautam et Sharma., 2015).

IV.5.3.B. La Résistance au suc gastrique stomacal simulé :

Afin de déterminer la capacité de survie des souches de lactobacilles au passage de l'estomac ; les bactéries ont été soumises à des conditions mimant le suc stomacal (pH 2,5 et pepsine à 1.3%).

La proportion des cellules viables a été évaluée par dénombrement sur gélose MRS en boîte de Pétri après 30min, 1h, 2h et 4h d'exposition à 37°C selon la technique de **Guiraud (2003)** : Une série de dilutions (10^{-1} , 10^{-2} ... 10^{-5}) dans 450 µl de MRS bouillon a été réalisée.

Pour la réalisation de ce protocole, chaque boîte contenant MRS solide est divisée en 4 parties ; à l'aide d'une micropipette, on dépose 3 spots (10 µl) d'une dilution dans chaque partie. Après avoir déposé les différents diluants dans toutes les boîtes, on incube le tout dans l'étuve à 37°C.

La survie des bactéries a été évaluée par méthode de dénombrement (**Guiraud., 2003**) en milieu solide sur boîtes de Pétri après une série de dilution à T0; 30min; 2h; 4h à 37°C et le taux de survies a été calculé par la formule suivante:

$$\text{Taux de survie \%} = \log(\text{UFC à T(n)h} / \log\text{UFC à T0}) \times 100$$

IV.5.3.C. La Résistance aux Conditions intestinales :

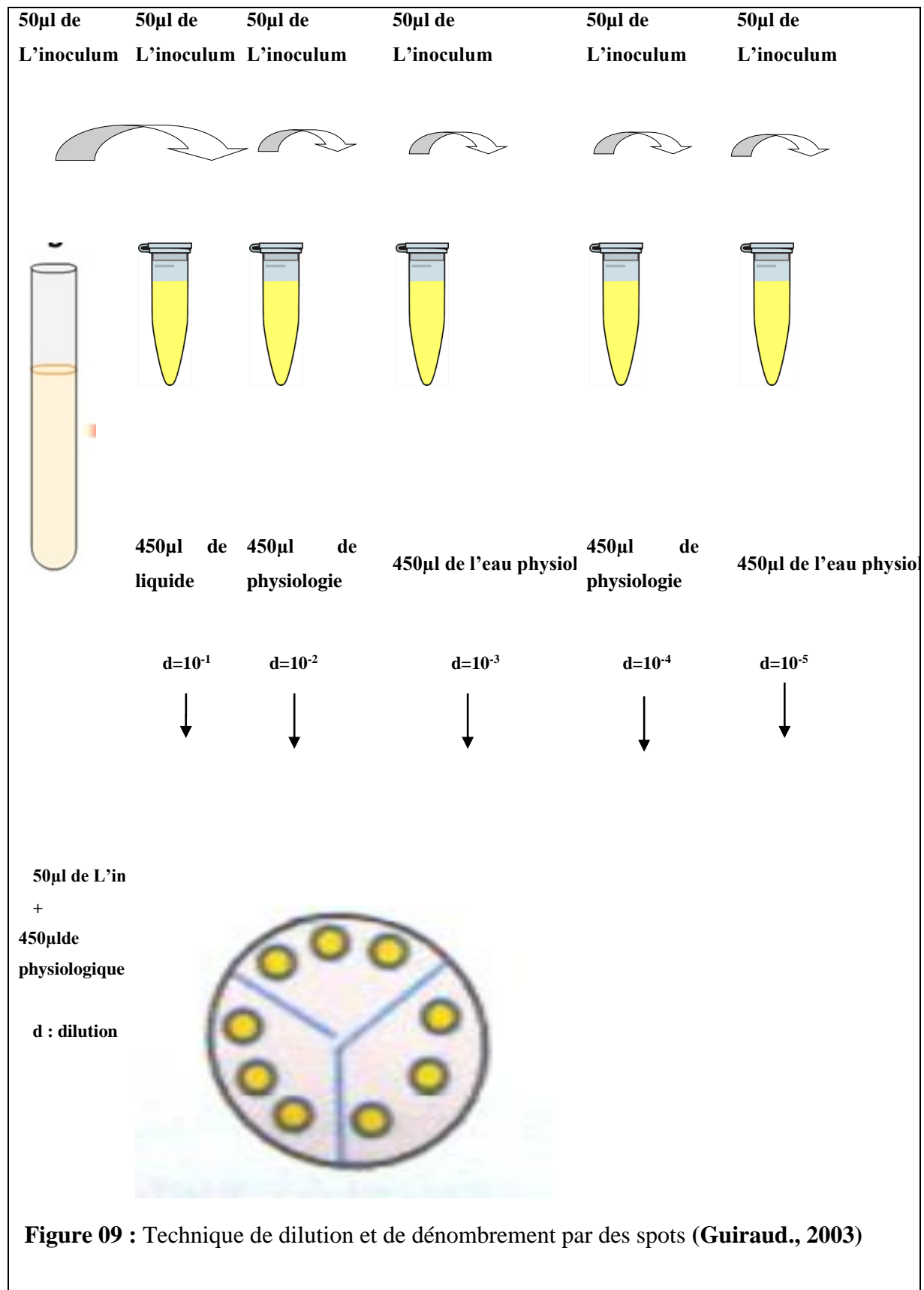
1. Teste de résistance aux sels biliaires :

La tolérance des lactobacilles aux sels biliaires a été testée avec un protocole modifié selon les techniques utilisées par (**Hyronimus et al., 2000; Concoran et al., 2013**).

Le milieu **MRS additionné de 0.5%** de sels biliaires à pH=8 a été utilisé pour mettre en évidence la résistance des souches lactiques : 1ml de chaque souche (culture jeune de 18h) est centrifugé à 8000rpm/10min et le culot bactérien (50µl) a servi pour l'inoculation de 450µl de MRS à 0.5% de sels biliaires (pH=8).

La survie des souches de lactobacilles a été évaluée par méthode de dénombrement (Figure 10) (**Guiraud., 2003**) en milieu solide sur boîtes de Pétri après une série de dilution à T0; 30min; 2h; 4h à 37°C et le taux de survies a été calculé par la formule suivante:

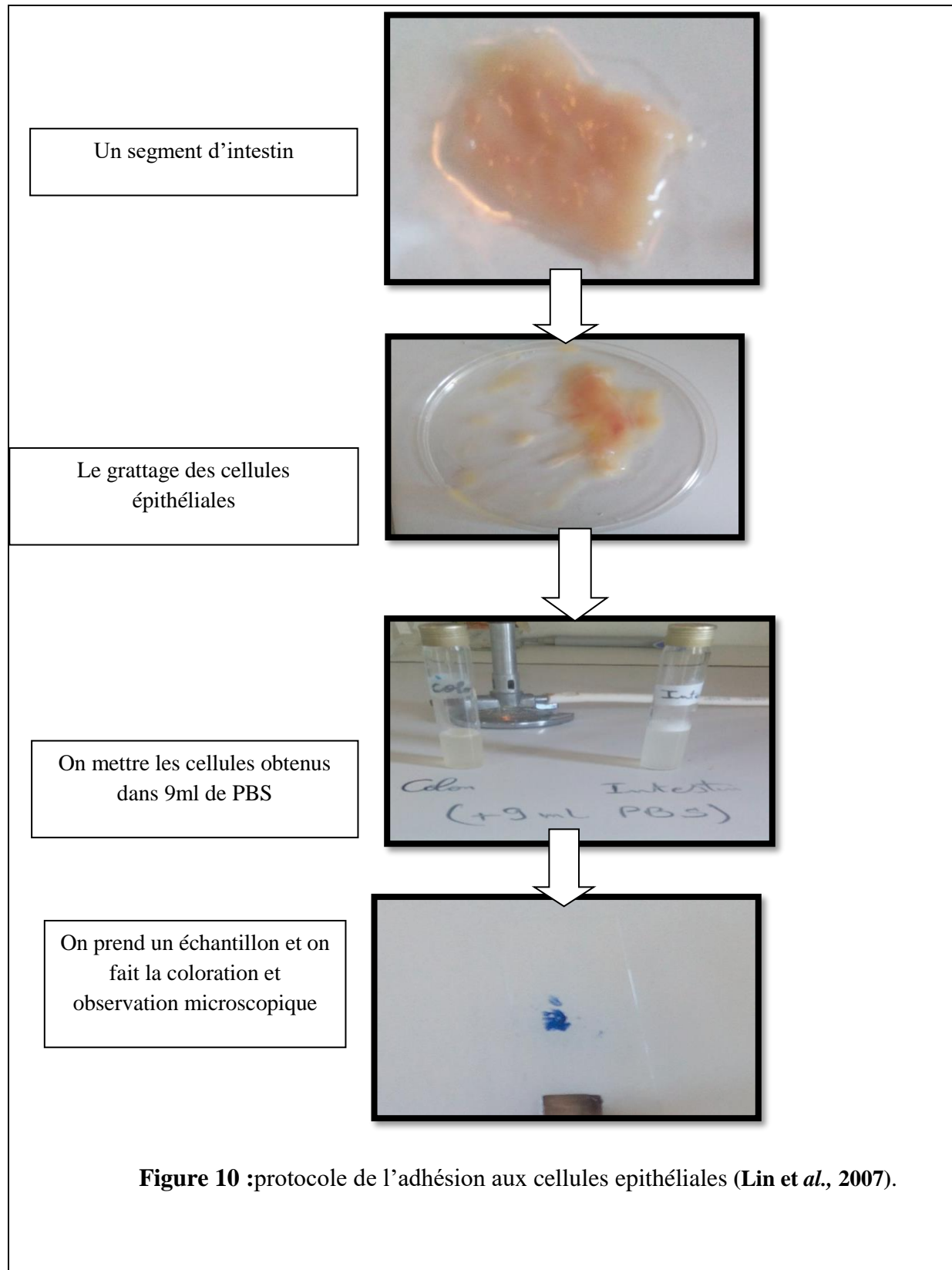
$$\text{Taux de survie \%} = (\log\text{UFC à T(n)h} / \log\text{UFC à T0}) \times 100$$



2. Test d'Adhésion *in vitro* au tissu épithélial :

Cette étude est réalisée dans le cadre d'essai d'évaluation de la capacité des lactobacilles de s'adhérer aux cellules épithéliales, pour cela on a appliqué la méthode décrite par **Lin et al., 2007** qui est subdivisée en 3 étapes :

- **Préparation du tissu épithélial** : Un segment du côlon ainsi qu'une partie de l'intestin grêle sont mis dans du tampon phosphate salin stérile (PBS pH 7) pendant 30 minutes à 4°C avant d'être lavé, puis un lavage 10 fois avec ce tampon est réalisé, par la suite ils sont tenus une deuxième fois au repos à 4°C dans le PBS pendant 3h. Les segments sont ouverts et les cellules sont récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin grêle et le côlon à l'aide d'une lame stérile dans 9ml du PBS.
- **Préparation des souches bactériennes** : Après centrifugation des cultures fraîches (8000rpm/10min), le culot est récupéré dans 2ml de PBS suivie de deux dilutions pour avoir approximativement 10^8 cellule/ml.
- **Réalisation du test** : 1ml de chaque culture est mélangé avec 1 ml de la dilution 10^{-2} de la suspension des cellules épithéliales (côlon et intestin grêle). Après incubation à 30°C pendant 40min, un frottis ainsi qu'une coloration au cristal violet 0,5% pendant 5 min est réalisée pour observer l'adhésion au microscope optique (figure 11).



W²V. Résultats et discussion :**V.1. Les Caractères Cultureux des souches utilisées :**

L'examen macroscopique représenté dans la figure 13 a permis d'identifier l'aspect culturel des colonies des souches de lactobacilles. Sur Bouillon MRS la culture est confirmée par la présence d'un trouble opaque et uniforme du milieu dans le tube de culture, et sur la Gélose MRS la croissance est révélée par la présence de colonies bactérienne dont l'aspect était caractéristique du genre *lactobacillus*.

Les souches apparaissent sous forme de colonies lisses, blanchâtres, crémeuses, avec une forme arrondie et elles dégagent aussi une odeur agréable, semblable à celle des laits fermentés due à la production de l'acide lactique.


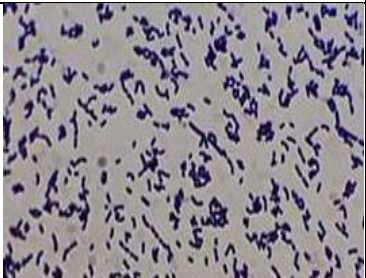


En effet le groupe des bactéries lactiques se caractérise par un aspect macroscopique semblable à l'aspect obtenu





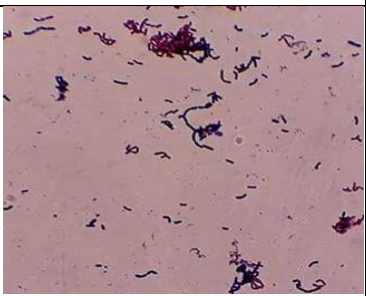



Figure 11 :L'aspect macroscopique des lactobacilles dans un milieu solide et liquide.

L'examen microscopique ainsi que les tests, de catalase et de croissance sur milieu hyper salée qui ont servi pour confirmer la viabilité des souches utilisées lors de ce travail sont résumés dans le (Tableau- n°6) suivant :

Tableau06 : Caractères cultureux des souches lactiques utilisées.

Liste des souches	T°C de Croissance	Croissance à 4,5% de NaCl	Croissance à 6,5% de NaCl	Catalase	Gram	Forme cellulaire
LbN01	37°C	+	+	-	+	
LbN05	37°C	+	+	-	+	
LbN09	37°C	+	+	-	+	
LbN10	37°C	+	+	-	+	

LbN11	37°C	-	+	-	+	
LbN12	37°C	+	+	-	+	
LbN13	37°C	-	+	-	+	
LbN14	37°C	+	+	-	+	
LbN15	37°C	-	-	-	+	
<i>Lactobacills plantarum</i>	37°C	+	+	-	+	

V.2. Résistance des souches aux conditions Gastro-intestinales simulées :

V.2.1. Résistance à la variation d'acidité de l'estomac :

Les souches de Lactobacilles utilisés doivent résister et rester viables pendant leur passage à l'estomac avant d'arriver au niveau de l'intestin, pour acquérir le statut probiotique.

Afin de sélectionner les souches ayant ce potentiel probiotique, la capacité des souches (LbN01; LbN05; LbN09; LbN10; LbN11; LbN12; 13; 14 et 15) à croître dans le milieu MRS (au différents pH = 1,5/3/5) a été déterminé et les résultats obtenus sont représentés par les figures suivantes:

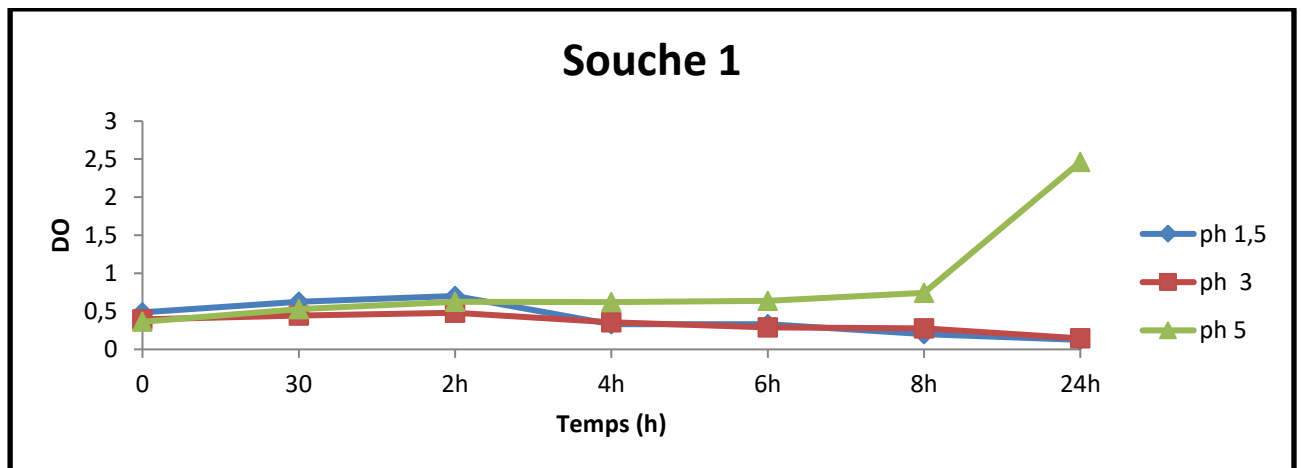


Figure12 :La cinétique de croissance de **Lb N01** aux différents pH.

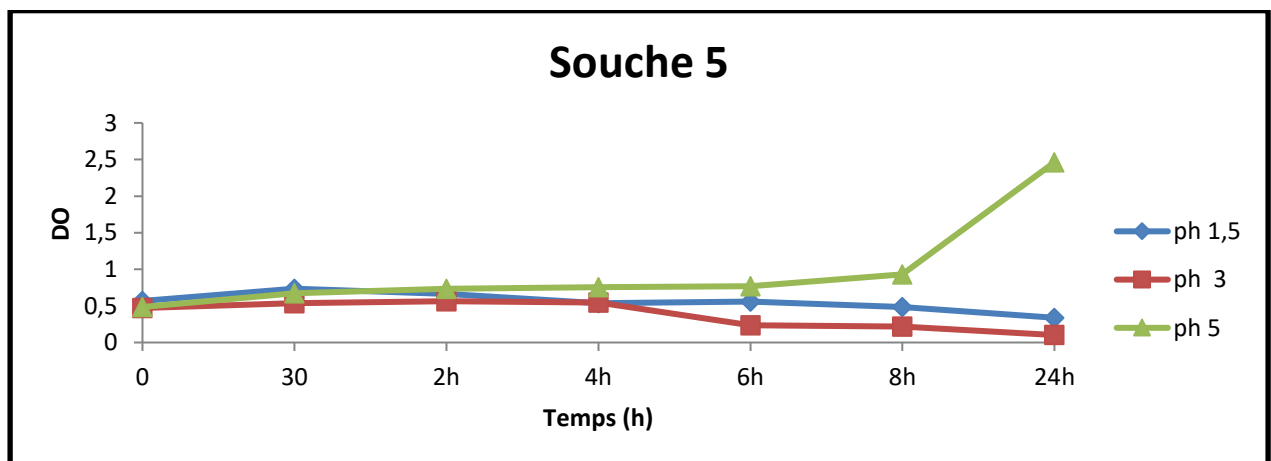


Figure13 :La cinétique de croissance de **Lb N05** aux différents pH.

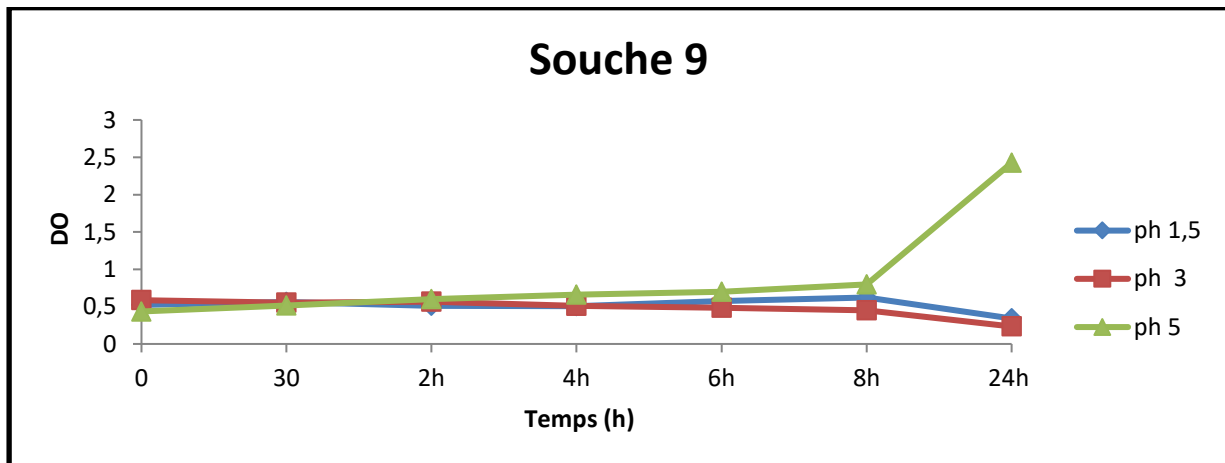


Figure14 :La cinétique de croissance de Lb N09 aux défférents pH.

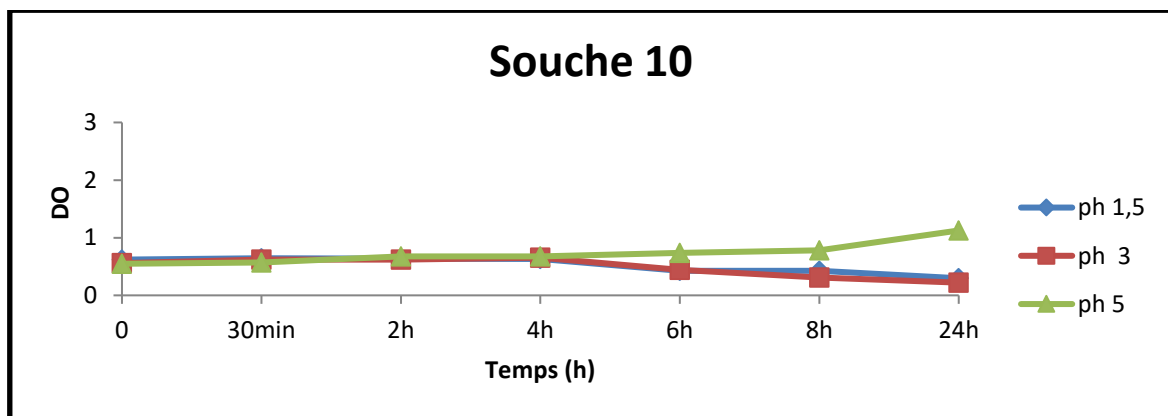


Figure15 :La cinétique de croissance de Lb N10 aux défférents pH.

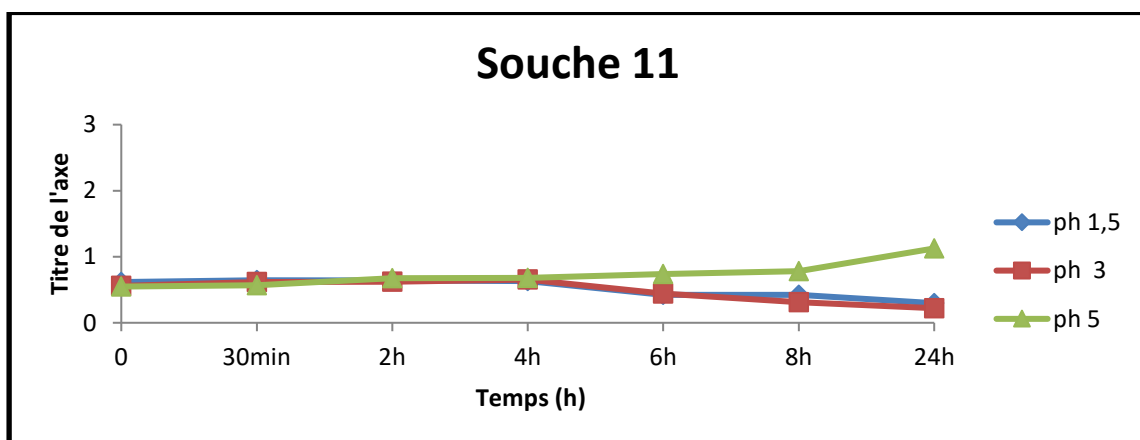


Figure16 : La cinétique de croissance de Lb N11 aux défférents pH.

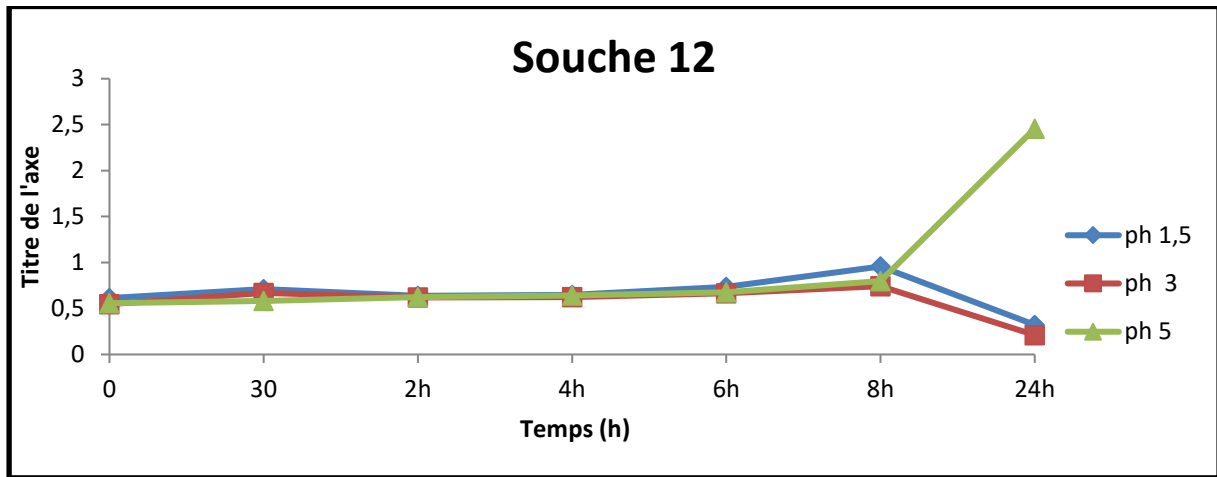


Figure17: La cinétique de croissance de Lb N12 aux différents pH.

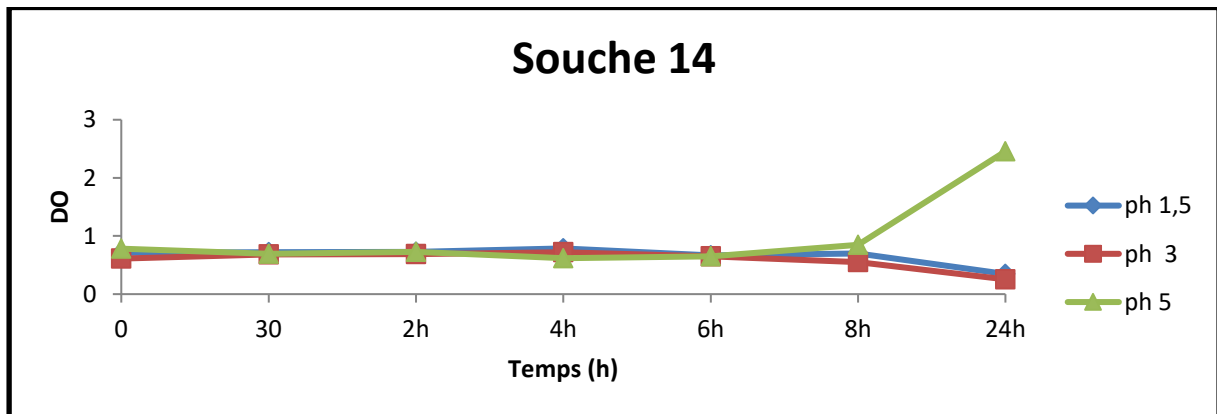


Figure18 : La cinétique de croissance de Lb N13 aux différents pH.

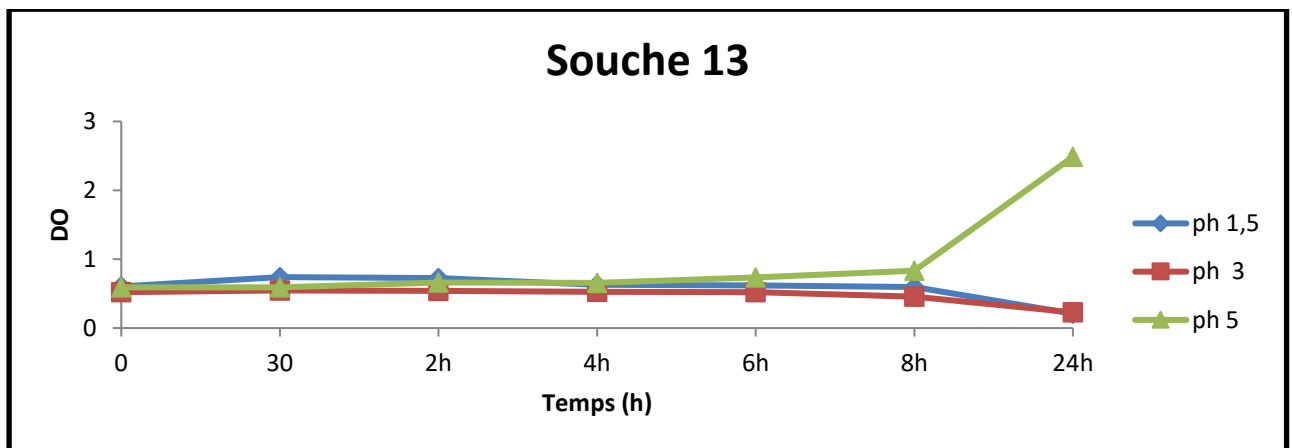


Figure19 : La cinétique de croissance de Lb N14 aux différents pH.

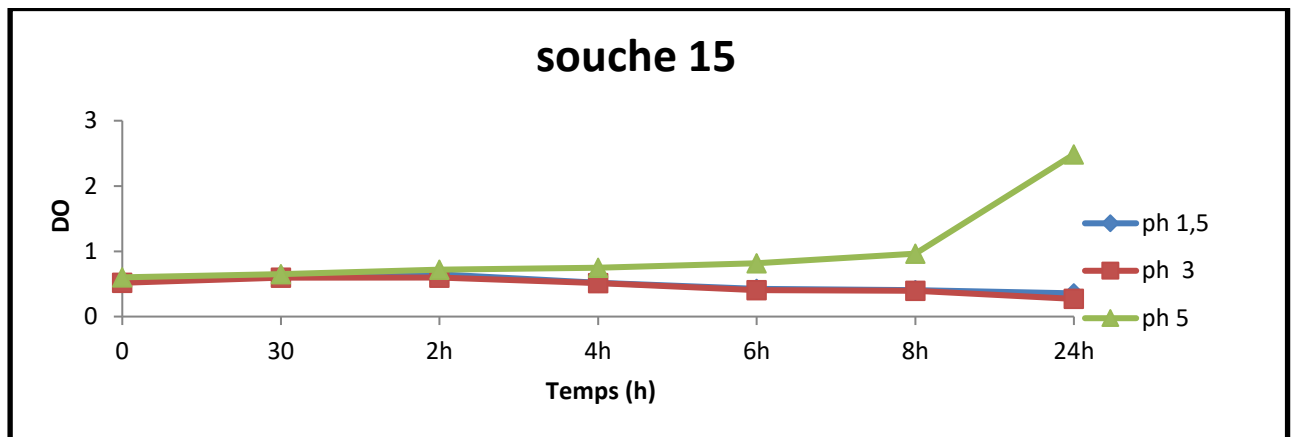


Figure20 : La cinétique de croissance de Lb N15 aux différents pH.

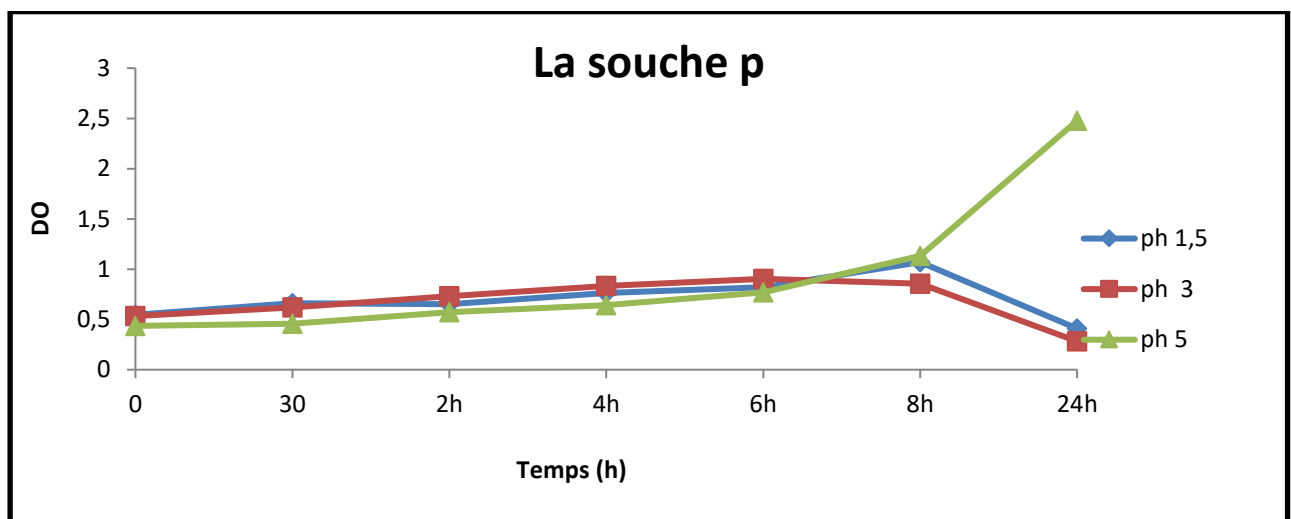


Figure21: La cinétique de croissance de *Lactobacillus Plantarum* aux différents pH.

Les résultats obtenus de la cinétique de résistances au différent pH, montrent clairement la résistance de la majorité des souches au pH =5 de 0h- 8h et même après 24h la DO à nettement augmenté ce qui indique une bonne tolérance des souches et la concentration bactérienne est estimé entre $[1,4 \cdot 10^9$ et $2,4 \cdot 10^9$ bactéries/ml] (en considérant $1DO = 10^9$ bactéries/ml selon la bibliographie).

Pour les pH = 1.5/et/3, les résultats indiquent une variation dans la résistance qui ne dépasse pas les 2h/4h ou 6h d'incubation selon la souche considéré et après ce laps de temps la mesure de la DO. Chute considérablement même après 24h ce qui traduit ici la non viabilité des souches.

La seule souche qui a présenté une sensibilité différente au deux pH de 1.5 et 3 est la Souches LbN09 : 2h pour pH 1.5 ($6,6 \cdot 10^8$ bactéries/ml) et 4h pour pH 3 ($5,4 \cdot 10^8$ bactérie/ml). Les

souches LbN05 et LbN15 ; ont révélé une tolérance pendant 2h au pH 1.5 et 3 (\approx de 4 à 7, 10^8 bactéries/ml) ; les souches LbN01 ; 11, leur viabilité à durée 4h (\approx 6 à 7. 10^8 bactéries/ml), et les souches LbN10.13 et 14 pendant 6h (\approx 5 à 7. 10^8 bactéries/ml). La souche LbN12 est le seul à avoir persisté pendant 8h en pH 1.5 ($6,2 \cdot 10^8$ bactéries/ml) et pH 3 ($4,5 \cdot 10^8$ bactéries/ml) avec la souche témoin *lactobacillusplantarum* ($8,5 \cdot 10^8$ bactéries/ml) à pH 3 et ($1,07 \cdot 10^9$ bactéries/ml) à pH 1,5.

Nos résultats se concorde d'une part avec les nombreux travaux qui démontrent une très bonne résistance chez les bactéries lactiques du Genre *Lactobacillus* aux pH bas entre [2 à 3,4] (Dunne et al.,2001; Mathara et al., 2008)et d'autre part ; avec les résultats des travaux réalisés par Mc Donald et al.,1990) ont révélé une baisse de croissance des souches *Ln mesenteroides* et *Lb. plantarum* à pH =3.

D'une manière générale, la résistance aux conditions acides diminue considérablement avec la diminutions du pH du milieu et plusieurs études démontrent que la concentration encellules bactériennes des souches probiotiques pour qu'elles survivent lors du transit dans l'intestin humain dépend de la souche en elle – même ,de la dose ingérée ,des facteurs liés à l'hôte (acidité,etc...) mais aussi de l'aliment vecteur, en effet, une grande partie des souches de Bifidobactéries et de Lactobacilles survivent dans le transit intestinal pour arriver en grande quantité dans les fèces alors que les souches *Lactococcuslactis* résistent mal au transit et peu de souches sont récupérées après ingestion (Pochart et Marteau.,2000).

V.2.2. Résistance aux sucs Gastriques simulés à pH=2,5 et aux sels biliaries (0,5%) :

Les souches à potentiel probiotique doivent être non seulement capables de résister à leur passage (estomac) dans le tube digestif mais aussi avoir la capacité de proliférer dans l'intestin pour exercer leurs effets bénéfiques sur l'hôte.

Au repos le pH de l'estomac est d'environ 2,5, mais peut atteindre une valeur de 5 avec un apport de repas (effet tampon), et revenir à la ligne de base dans les deux heures (Hill etMarsh.,1989).La moyenne de la concentration des sels biliaries dans le tractus intestinal humain est d'environ 0,3% (p/v) (Dunne et al.,1999).

Dans le but de sélectionner des souches probiotiques capables de survivre au passage de l'estomac et leur survie dans l'intestin ; les souches lactiques ont été soumises à des conditions mimant le suc stomacal (pH 2,5 et pepsine à 1.3%) ainsi qu'à une concentration en sels biliaries pour mimer les conditions intestinales ; les taux de survies ont été déterminé

pendant 30min, 2h, et après 4h d'exposition. Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 22 et 23 suivantes :

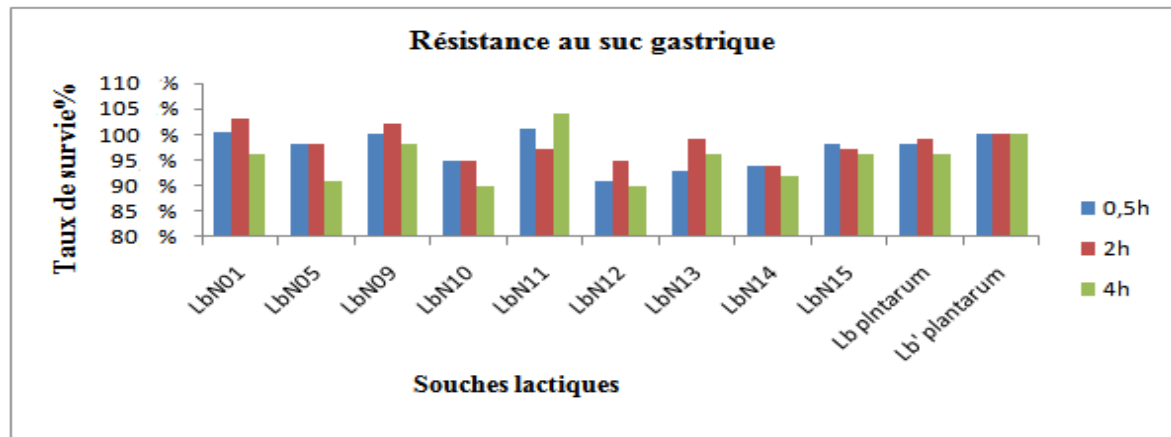


Figure 22 : Taux de survie des lactobacilles dans le suc gastrique a pH=2,5.

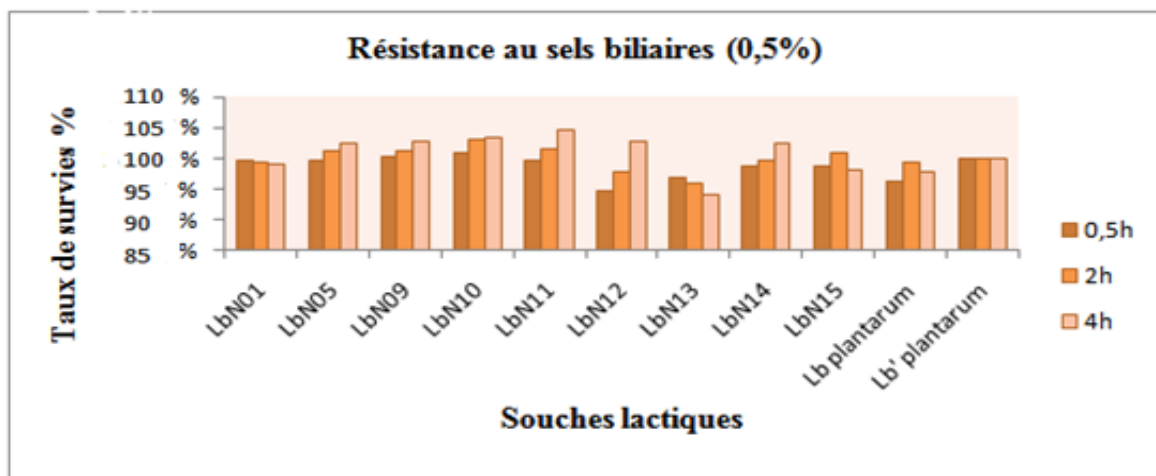


Figure 23 : Taux de survie des lactobacilles dans le bouillon MRS à 0,5% de sels biliaries.

Les taux des survies obtenus reflètent une très bonne résistance au suc stomacal selon ainsi qu'aux sels biliaries selon la souche considéré et le temps d'exposition (30min ; 2h et 4h) dans le milieu, avec un maximum supérieur à 100% un minimum de 90% de survies et la meilleur tolérance était enregistrée pour les sels biliaries.

La souche Témoin *Lactobacillus plantarum* a été mise en culture en même temps sur milieu MRS à pH 6,5 sans sels biliaires et le résultat obtenu est estimé avec un taux de survie de 100% avec lequel les autres taux de survies ont été comparés, ainsi *Lb plantarum* sur le milieu suc gastrique simulé à pH=2,5 ainsi qu'en présence de sels biliaires le taux de survie était aussi important à 99% après 2h d'exposition.

Les souches **LbN05; LbN09; 10; 11; 12 et 14** ont présenté des taux de survies en présence de sels biliaire supérieur à 100% avec une moyenne de $103,24 \pm 1,5$ % après 4h d'exposition, alors que leur tolérance à l'acidité du suc gastrique avec l'action de la pepsine était différente, les taux de survies les plus élevés sont enregistrés seulement après 2h d'exposition : **LbN01 et LbN09** avec des taux supérieur à 100% alors que les souches **LbN05;10;12;13;14;et LbN15**, leur taux n'ont pas dépassés en moyenne 97 ± 2 %. Seulement la souche **LbN11** a enregistré un taux de survie au suc gastrique supérieur à 100% après 4h d'exposition.

Malgré la baisse de croissance enregistrée ; nos souches de lactobacilles testées sont considérées comme ayant une bonne tolérance aux conditions gastro-intestinales simulées vue que la baisse enregistrée dans les taux de survie ne dépasse pas les 1% pour chaque souche.

Nos résultats de tolérance aux sels biliaires semble être en concordance avec plusieurs études: **Amar sidi Mohamed.(2015)** a étudié les potentialités probiotiques de 15 souches de *Lactobacillus* et 07 souches de *Streptococcus* isolés à partir de matières fécales, les bactéries testées étaient nettement plus résistant aux sels biliaires à une teneur physiologique de 0,3% par rapport au milieu acide où la plupart des souches ont été inhibées.

Selon plusieurs auteurs, une bonne résistance à la barrière gastrique est un critère important pour la sélection des micro-organismes probiotiques (**Amar Sidi Mohamed.,2015 ; Charteris et al.,1998**).

La quantité de probiotiques survivant lors du transit dans l'intestin humain dépend de la souche, de la dose ingérée, des facteurs liés à l'hôte (acidité, sels biliaires, etc.) mais aussi de l'aliment vecteur (**Pochart et Marteau., 2000**). En effet, plusieurs études vise à améliorer la survie des bactéries probiotiques pendant leur transit au tractus digestif pour y parvenir vivantes afin d'exercer leurs effets bénéfiques (**Ziar., 2013**).

V.3. Résultats d'adhésion :

Afin d'exercer leurs effets bénéfiques, les probiotiques doivent adhérer au mucus intestinal ou aux cellules épithéliales et persister dans l'intestin (Collado *et al.*, 2006; Xiaodong *et al.*, 2009). La capacité des probiotiques à adhérer aux surfaces des muqueuses empêche leur évacuation rapide par la contraction intestinale et après écoulement péristaltique du digeste.

Vu la difficulté d'étudier l'adhérence des probiotiques, *in vivo*, différentes méthodes sont utilisées, *in vitro*, des lignées cellulaires intestinales d'origine humaine en culture comme modèles mimant l'épithélium intestinal (Vesterlund *et al.*, 2005; Gueimonde *et al.*, 2006).

Tableau 07 : les résultats de l'adhésion au colon et à l'intestin.

Les souches	Adhésion	Evaluations
Lb N 1	+	bonne Adhésion
Lb N 5	+	bonne Adhésion
Lb N 9	+	bonne Adhésion
Lb N 10	+	bonne Adhésion
Lb N 11	+	bonne Adhésion
Lb N 12	+	bonne Adhésion
Lb N 13	-	Pas d'Adhésion
Lb N 14	-	Pas d'Adhésion
Lb N 15	-	Pas d'Adhésion
Lactobacillus plantarum	+	bonne Adhésion

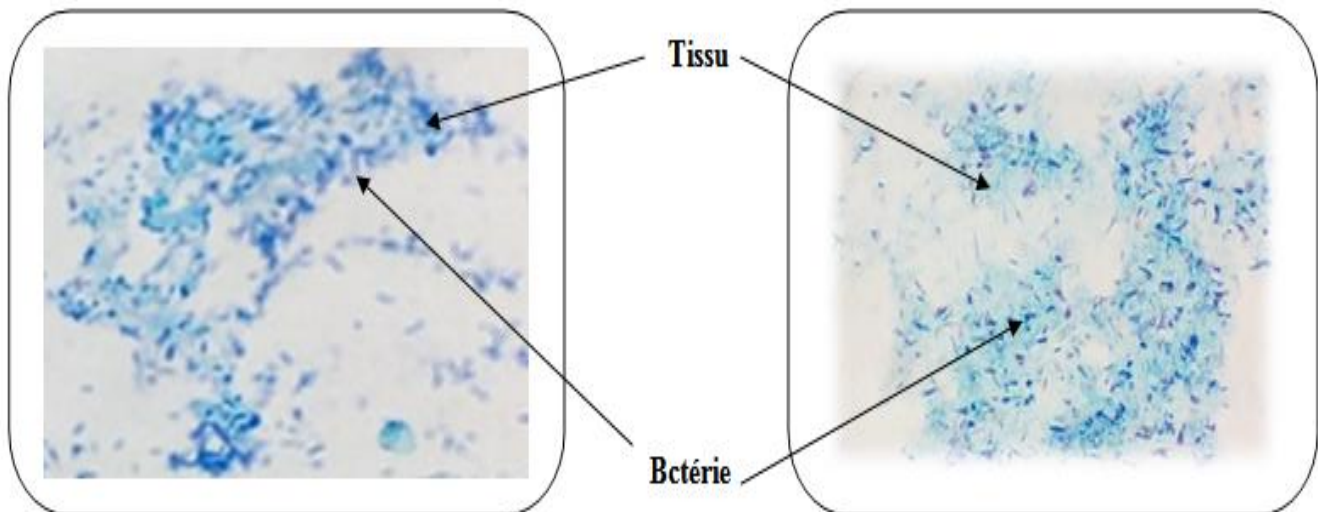


Figure 24 : adhésion de souche LbN10

Figure 25 : adhésion de souche LbN09

selon les résultats obtenus on remarque une adhésion de sept souches (**LbN01, LbN05, LBN09, LbN10, LbN11, LbN12, *Lactobacillus plantarum***) (**Tableau 7**) aux cellules épithéliales parmi les 10 souches et seulement trois souches (**LBN13, LbN14, LbN15**) qui n'adhèrent pas.

Un plus grand nombre de cellules bactériennes adhérentes aux cellules épithéliales est observé chez la souche LbN10 et la souche LbN09 (**figure 24**) et (**figure 25**). La souche *Lb.plantarum* présente aussi une bonne adhésion aux cellules épithéliales. En effet plusieurs travaux ont démontré que des espèces de *lactobacillus plantarum* ont une forte adhésion aux cellules épithéliales de lignée humaine (**Tuomola et Salminen., 1998**), et cette adhésion peut varier d'une espèce à une autre comme il a été rapporté par plusieurs auteurs (**Coconnier et al., 1992 ; Fernandez et al., 2002**).

Pour jouer leur rôle d'amélioration de l'hygiène intestinale, il est intéressant que les souches probiotiques puissent adhérer aux cellules de la paroi intestinale, d'une part pour faciliter la colonisation du tube digestif par le probiotique, et d'autre part pour obtenir un effet "barrière" optimal contre l'invasion de la muqueuse intestinale par des bactéries pathogènes (**Huang et Adamst., 2003 ; Normande et al., 2006 ; Song et al., 2015**).

Conclusion

Les neuf souches de lactobacilles ont présentés une très forte résistance aux différents paramètres fonctionnels mis en évidence lors de cette étude in vitro.

La survie au différents pH, montrent clairement la résistance de la majorité des souches au pH =5 jusqu'à 24h d'exposition avec une concentration bactérienne considérable entre [$1,12 \cdot 10^9$ et $2,4 \cdot 10^9$ bactéries/ml]. Aux pH = 1.5/et/3, les résultats indiqués une variation dans la résistance selon la souche considéré et une persistance dans la viabilité d'au moins 6h d'incubation.

Les résultats du dénombrement de la croissance sur milieu suc gastrique simulé (1.3% pepsine+pH2.5) et sur milieu MRS additionné de 0.5% de sels biliaires ; indiquent des taux de survie remarquables chez les souches. La souche **LbN11** semble la plus performante en terme de résistance car elle a présenté un taux de survie supérieur à 100% après 4h d'exposition pour les deux milieux testés ; Les souches **LbN05; LbN09; LbN10;; LbN12et LbN14**, ont survécus jusqu'à 4h d'incubation dans le milieu MRS+Sels biliaires avec un taux supérieur à 100% et 2h sur le milieu suc gastrique simulé avec 97 ± 2 ; les souches LbN01 et LbN09 ont enregistré plus de 100% en taux de survie dans le milieu suc gastrique après 2h, indiquent des taux de survie remarquable chez toutes les souches. Les souches (LbN01, 05, 09, 10, 11,12,) présentent une bonne adhésion aux cellules épithéliales.

Nos résultats permettent de placer ces souches lactiques comme des candidates probiotiques et qui doivent être engagées dans un parcours expérimental complémentaire visant à en explorer d'autres propriétés qui leurs permettraient de remplir les nombreux critères requis pour l'acquisition du statut probiotique.

Références bibliographiques

A

Adams MR, Moss MO (2000). Food Microbiology. Second Edition, The Royal Society of Biochemistry éd. Cambridge. UK. pp. 318-323.

Paris

Amar Sidi Mohamed El Yacine (2014-2015). Effet préventif et curatif de certains aliments fonctionnels sur le développement du cancer colorectal **p**.

AUBERT L. C., (1998). Anatomie et physiologie pour les souris infirmiers. Ed : MASSON,

Ammor M.S. et Mayo B., 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science*. 76: 138-146.

Axelsson L. (2004). Classification and physiology .In: Lactic acid bacteria Microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 1-66.

B

Benkerroum N. et Tamime A.Y., 2004. Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.* 21 : 399-314.

Barefoot SF, et Klaenhammer TR. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* .*Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1808-1815.

Bjorksten b., (2004). Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. Springer Seminras in Immunopathology, 25: 257-270

Bourgeois C.M., Mescle J., Zucca J. et Larpent J.F. 1996. Microbiologie alimentaire (tome 1) Lavoisier. Paris, P : 29-245.

C

Carr FJ, Chili D et Maida N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev. Microbiol.* 28, 281-370.

Chafia S.(2006). Effet de l'addition des probiotiques dans les régimes alimentaire sur les performances zootechniques du poulet de chair ; mémoire de magister en science vétérinaires. Université El-hadj lakhdar – batna.

Champagne C. P., (1998). Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. Ed : Maloine, Paris.

Références bibliographiques

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK (1998). Antibiotic susceptibility of Potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food. Prot.* 61: 1636–1643.

Coconnier M.E., Klaenhammer T.R., Kernéis S., Bernet M.F., Servin A.L., Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 2034-2039.

Corcoran B, Stanton C, Fitzgerald G, Ross R. 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6):3060-3067.

D

Dacosta Y. Probiotiques et prébiotiques en alimentation humaine, Lavoisier, Paris, 2001.

Dellaglio F, de Roissard H, Torriani S, Curk MC et Janssens D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). Lorica, Uriage. 1, 25-116.

De Man, JC, Rogosa M, Sharpe, ME (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. App. Bacteriol.* 23 (1): 130-135.

Denohue DC. (2004). Safety of novel probiotic bacteria. In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright AV. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 531-546.

De Roissard H et Luquet FM. (1994). Bactéries lactiques ., Lorica Uriage.1, 25-116

De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, 108 Whitmanet WB (2009). Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In : « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Springer éd., New York. pp.19-511.

Dore .D.(1994). Biochimie clinique ed :Maloine, p150-180

Dortu C, Thonart P (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *B. A. S. E.* 3(1): 143-154

Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (suppl): 386-392.

E

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005). Diversity of the human microbial flora. *Science.* 308:1635-1638.

Références bibliographiques

F

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

FAO/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.

Fredereghi M (2005). Les bactéries lactiques. *In* : « Bactériologie alimentaire, Compendium d'hygiène des aliments ». Lavoisier éd., Paris.France. pp. 101-130. strains to be in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 94, 449-455.

Fernandez MF, Boris S, Barbes C.(2002). Probiotic properties of human lactobacilli

Fuller R (1991). Probiotics in human medicine. *Gut.* 32: 439-442.

G

Gavilan C.G., Suarez A., Fernandez-Garcia M., Margolles A., Gueimonde 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.

Gerrit S., Bart A.S. et Wim J.M.E., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS. Microbiol. Rev.* **29** : 591-610.

Gu R.X., Yang Z.Q., Li Z.H., Chen S.L. et Luo Z.L., 2008. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe.* **14**: 313-317

Gueimond M , Sanchez B, de los Reyes-Gavilan C et Margolles ,A.(2013).

Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol.* 18, 4 -202. *Digestion.* 64,92-9. 1

Guiraud J.P., 2003. Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Dunod.* Paris. 90-292.

Gossum AV.(2007). Probiotiques et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). *Nutrition Clinique et métabolisme.* 21, 81- 84 .

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

Références bibliographiques

H

- Hadef S. (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques des bactéries lactiques locales, Thèse de magistère en microbiologie Appliquée, Faculté des sciences de la nature et de la vie et Science de la terre et de l'univers l'université Kasdi Merbah, Ouargla, p87
- Hasnia Ziar (2012-2013).** Contribution à l'amélioration de la survie de bactéries lactiques d'intérêt assimilatrices de cholestérol p
- Hill MJ, Marsh PD.** 1990. Human microbial ecology. CRC press. PP. 57-69.
- Hogg T. (2005).** Essential microbiology. *John Wiley & Sons, Ltd.* 188-190.
- Holzappel W. H., Haberer P., Snel J. et Schillinger U., (1998).** Overview of gut flora and Probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41(2).
- Hooper L.V., Wong M.H., Thelin A., Hansson L., Falk P.G., Gordon J.I.** Molecular analysis of commensal host / microbial relationships in the intestine. *Science*, 2001, 291 : 881-4.
- Hsieh MH, Versalovic J (2008).** The Human Microbiome and Probiotics: Implications for Pediatrics. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health. Care.* 38:309-327.
- Hyrominus B, Le Marrec P, Hadj Sassi A et Deschamps A. (2000).** Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 61 : 193-197.

I

- Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC (2004).** Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18:299-313

K

- Kandler, O. et N. Weiss (1986).** Regular non sporing Gram-positive rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams, Wilkins, Baltimore, 2, 1208-**Kaur IP,**
- Chopra K, Saini A (2002).** Probiotics, potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15:1-9.1209

L

- 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 β -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. *National Library of*

Références bibliographiques

Canada. 23-47. **Larpent SP. (1997).** Microbiologie alimentaire techniques de laboratoire. *Ed. Tech et Doc*, Lavoisier .Paris. 1041p

Leveau et Bouix. (1993). microbiologie industrielles : les microorganismes d'intérêt industrielles .*Tec & doc*, Lavoisier. Paris., 85-87.

Lin WH, Yu B, Jang SH, Tsen HY. (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* swine and poultry. *Anaerobe*. 13,107-113.

M

Malinen E. (2002). Molecular methods for detection of probiotics and intestinal microbiota and evaluation of *Lactobacillus brevis* as a potential probiotic dietary adjunct. University of Helsinki. 65p.

Mami A., Boumehira A.Z., Hamedi A.R., Henni J.E. et Kihal M. 2012. Screening of autochthonous *Lactobacillus* species from Algerian raw goats' milk for the production of bacteriocin-like compounds against *Staphylococcus aureus*. *Afr. J. Biotechnol.* 11(20), pp. 4595-4607.

Marteau P. 2001. Safety aspects of probiotic products. *Scand. J. Nutr.* 45: 8-12.

Mathara J.M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P.M., Mbugua S.K., Shin H.K. et Holzappel W.H., 2008. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* **126** : 57-64.

Matilla-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *Inter. Dairy. J.* 12 :173-182.

Matsumoto S, Watanabe N, Imaoka A, Okabe Y. (2001). Preventive effects of Bifidobacterium- and Lactobacillus-fermented milk on the development of inflammatory bowel disease in senescence-accelerated mouse P1/Yit strain mice.

McDonald L.C., Fleming H.P. et Hassan H.M., 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *App. Env. Microbiol.* **56**(7) : 2120-2124.

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 Environ* pp,147-163.

Millette M., Luquet F.M. et Ruiz M.T., 2008. Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *Dairy Sci. Technol.* 88: 695-705.

MOSERSCOTT A. et SAVAGE DWAYNE C., (2001). Bile salt hydrolase. Activity and resistance of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Applied and Environmental microbiology*

Références bibliographiques

O

- Orla-Jensen S. 1919.** The lactic acid bacteria. A.F. hostand son, Koenighichen Hof Boghamdel, Copenhagen. Ouwehand, A. C. and S. Vesterlund (2003). "Health aspects oprobiotics." *Drugs* **6**: 573-580.-
- Ouwehand AC.** 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In Salminen S et Von Wright A. Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects.Eds. New York. Marcel Dekker Inc. pp: 139-160.
- Ozgun D, Vural HC** (2011). Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *J.M.G.G.* 3(3): 46-49.

P

- Palomares I.C., Pérez-Morales R. et Acedo-Félix E., 2007.** Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **49**(3-4) : 46-54.
- Patel RM, Lin PW** (2010). Developmental biology of gut-probiotic interaction. *Gut. Microbes.* 1:186-195.
- Perlemuter L., Quevanvilliero g., Perlemuter G., Z Amer B. Et Aubert I. C.,** (1998). Anatomie et physiologie pour les souris infirmiers. Ed : MASSON, Paris.
- Percival M., 1997.** Choosing a probiotic supplement. *Clin. Nutr. Insights.* **6**(1): 95- 64-72
- Perry JJ, Staley JT, Lory S** (2004). Bactéries Gram-Positives : Firmicutes et Actinobacteria. In: « Microbiologie ». Dunod éd., Paris. France. pp. 471-50
- Pettoello MM, Guandalini S, Ecuba P, Corvino C. (1989).** di Martinol. Lactose malabsorption in children with symptomatic gardia lambia infection feasibility of yoghurt supplementation. *J. Pediatric Gastreterol*; 9,295-300.
- Pot b. (2008).** The taxonomies of lactic acid bacteria.in: bacteria lactique aux ferments
- Prescott C.E., Hope G.D. et Blevins L.L. 2003.** Identification of newly isolated lactobacilli from stomach mucus of lamb.Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae. 55 : (corrieu g.et luquet F.M).Tec & Doc, lavoisies.Parie.,1-106.
- Pochart P., Marteau P., Bouhnik Y., Goderel Y., Bourlioux P., Rambaud J.C.,** Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion, *Am.J. Clin. Nutr.* 55 (1992) 78-80.

Références bibliographiques

Q

Quigley EMM (2011). Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Cur. Opi. Pharm.* 11:593–603.

R

Rallu F., (1999). Etude de la résistance au stress acide de *Lactobacillus lactis*. Thèse de doctorat, Université Paris VI, France.

Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK (2003). Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clin. Micro. Rev.* 16(4): 658–672.

Reyes-Gavilan CG, Suarez A, Fernandez-Garcia M, Margolles A, Gueimande 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.

Rullier B., (1995). L'hygiène alimentaire. Ed: Nathan. Paris, p160.

Reuter G (2001). The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Microflora of the Human intestine: Composition and Succession. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* 2(2): 43-53.

S

Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Matto J., et Mattila-Sandholm T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84 : p 197-215.

Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos W.M., Demonstration of safety of probiotics – a review, *Int. J. Food Microbiol.* 44 (1998) 93-106.

Sanders ME (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr.* 130(Suppl): 384-390.

Shah NP. 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal.* 17, 1262-1277.

Shihata A. et Shah N.P. 2000. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 10: 401-408

T

Taglang S., (2005). Cours de physiologie de l'appareil digestif. [http : // frank paillard.chez.tixali.fr/infirmier digestif.htm](http://frank.paillard.chez.tixali.fr/infirmier_digestif.htm).

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

Tannock GW: Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. [Review] [33 refs]. *Trends In Biotechnology* 1999; 15:270-274.

Titiek F.D., Endang S.R., Djoko W. et Slamet S., 1996. Antimicrobial substance produced by *lactobacillus* sp. TGR-2 isolated from *Growol*. *Indonesian. Food Nutr. Prog.* 3(2) : 29-34.

Références bibliographiques

Tuomola EM, Salminen SJ (1998). Adhesion of some probiotics and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food. Microbiol.* 41: 45-51.

V

Vanderhoof J.A., Young R.J., Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 27 (1998) 323-332.

Vasiljevic T, Shah NP (2008). Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy. J.* 18: 714–728.

Vesterlund S, Paltta J, Karp M, Ouwehand AC (2005). Measurement of bacterial adhesion: in vitro evaluation of different methods. *J. Microbiol. Meth.* 60: 225-233.

W

Walter J (2008). Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4985-4996.

WGO: World Gastroenterology Organisation. (2008). Probiotiques et prébiotiques. Recommandation pratique

Whitmanet WB (2009). Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In: « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Springer éd. New York. Pp.19-511.

Annexe

Milieux de culture

Milieu de culture MRS (Terzaghi et Sandine, 1975)

Tableau 1 : Composition de milieu de culture MRS en g/l (Terzaghi et Sandine, 1975)

Milieu M1	Composition	Quantité
Milieu de base	Peptone	10,0 g
	Extrait de viande	8,0 g
	Extrait de levure	4,0 g
	Glucose	20,0 g
	Tween 80	1 mL
	Hydrogénophosphate de potassium	2,0 g
	Acétate de sodium 3 H ₂ O	5,0 g
	Citrate d'ammonium	2,0 g
	Sulfate de magnésium 7 H ₂ O	0,2 g
	Sulfate de manganèse 4 H ₂ O	0,05 g
	pH 6,2 +/- 0,2	
Stérilisation à 120 pendant 20mn		

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

Bouillon hypersalé (pH 7.2)

composition	Quantité
Extrait de viande	5g
Glucose	5g
Peptone	15g
NaCl	40/65g
Eau distillée qsp	1000ml
Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.	

Tampon phosphate PBS

composition	Quantité
Na ₂ HPO ₄	17,81g/l
KH ₂ PO ₄	13,697g/l
Eau distillée	1000 ml
Stérilisation à 120 pendant 20mn	

L'eau physiologique

composition	Quantité
Chlorure de sodium	8.5g
Eau distillé	1000ml
Ph=7	
Stérilisation à 120 pendant 20mn	

Suc gastrique

composition	Quantité
glucose	3.5g
NaCl	2.05g
KH ₂ PO ₄	0.6g
CaCl ₂	0.11g
KCl	0.37g
pepsine	13.3g
L'eau distillée	1000ml
Ph=5.6	
100C° pendant 10min dans le bain marie	

Coloration de Gram

Les principales étapes de la coloration sont comme suit :

1. Préparation d'un frottis (Fixation de la culture bactérien sur la lame par chaleur).
2. Recouvrir la lame avec le violet de gentiane pendant 1 min.
3. Ajouter du lugol pendant 1 min.
4. Décolorer avec une solution alcool 96° pendant 30 sec et rincer avec l'eau distillée.
5. Ajouter la fuchsine et laisser agir 20 à 30 secondes .laver à l'eau.
6. Rinçage et séchage de la lame.
7. L'observation au microscope optique à l'objectif x100, avec l'huile à immersion.
8. Les bactéries à Gram(+) sont apparaissent en violet et les bactéries à Gram(-) en rose.

Résumé

Le présent travail vise l'évaluation in vitro de la survie de neuf souches lactiques locales déjà isolées à partir de lait de vache (LbN01, LbN05,09,10,11,12,13,14,15), dans des conditions gastriques simulées à savoir : l'acidité, suc gastrique (pepsine) et présence de sels biliaires à 0.5%, adhésion aux cellules épithéliales. Une souche de *Lactobacillus plantarum* est utilisée comme souche Témoin.

La survie aux différents pH, montrent clairement la résistance de la majorité des souches à pH =5 (survie pd 24H), suivie d'une persistance variable dans la viabilité aux pH = 1.5 et 3 d'au moins 6h d'incubation selon la souche considéré. Les résultats du dénombrement de la croissance sur milieu suc gastrique simulé (1.3% pepsine+pH2.5) et sur milieu MRS additionné de 0.5% en sels biliaires ; indiquent des taux de survie remarquable chez toutes les souches. Les souches (LbN01, 05, 09, 10, 11,12,) présentent une bonne adhésion aux cellules épithéliales. La souche **LbN11** est la plus performante à l'ensemble des paramètres testés par un taux de viabilité supérieur à 100%.

Mots clefs : *Lactobacillus* sp, probiotique, tube digestif ; suc gastriques ; sels biliaire

Abstract

The main goal of this study is in vitro evaluation of survival for nine local lactic strains isolated from cow's milk: (LbN01, LbN05,09,10,11,12,13,14,15), in the simulated gastric conditions, namely: acidity, gastric juice (pepsin), presence of bile salts 0.5% and test adhesion . A strain of *Lactobacillus plantarum* is used as a control strain.

Resistance test in different pH, indicate the viability of all strains at pH = 5 (survival/24H), while at pH = 1.5 and 3 the resistance lasted at least 6h of incubation. The results of plate counting method on simulated gastric juice medium (1.3% pepsin + pH2.5) and on MRS medium supplemented with 0.5% bile salts; showed a very high survival rates in used lactic strains, and LbN11 was the most strain that have viability rate greater than 100%. Test adhesion showed that most of strains could adhere to epithelial cels

Key words: *Lactobacillus* sp, probiotic, digestive tract, gastric juice; bile salts

الملخص

تهدف هذه الدراسة الي تقييم وتتبع تسع سلالات لبنيّة المعزولة من حليب البقر (LbN01, LbN05, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15) وذلك بوضعها تحت ظروف محاكيه لشروط مختلف اجزاء الجهاز الهضمي كالأملح الصفراوية (0.5%) وعصارة المعدة (pH=2.5 و pepsine 1.3) والالتصاق بخلايا الامعاء وكذلك الحموضة؛ وقمنا باستعمال سلالة شاهدة وهي *Lactobacillus plantarum* وكل ذلك من اجل الكشف والبحث عن بعض الخصائص البروبيوتكية.

وقد اسفرت النتائج عن مقاومة جيدة للحموضة خاصة عند pH=5 الي غاية 24 ساعة بينما مقاومة مؤقتة الي غاية 6 ساعات كحد ادني في pH=1.5 و3 وعند تعريضها لعصارة المعدة والاملح الصفراوية لاحظنا عدد هائل من البكتيريا توافق مع هذه الشروط اما بالنسبة لاختبار الالتصاق بخلايا الجدار المعوي فالسلالات التالية هي تميزت بهذه لخاصية (LbN01,05,09,10,11,12) والى LbN11 والتي تميزت بمعدل بقاء كبير عن باقي السلالات الأخرى في مختلف الاختبارات التي اجريت.

الكلمات المفتاحية: *Lactobacillus* sp، بروبايوتيك، الجهاز الهضمي، العصارة المعدية، الاملاح الصفراوية.