

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

En vue de l'obtention du diplôme de master

Spécialité: **EXPLOITATION DES ÉCOSYSTÈMES MICROBIENS LAITIERS**

THÈME

**Etude probiotique des bactéries lactiques isolées à
partir de Hamoum (blé fermenté)**

Présenté par

HAMMOUM Saliha Namira

Soutenu le **04/07/2017**

DEVANT LE JURY

Président	F. DALACHE	Professeur à Université de Mostaganem
Examinatrice	MME HENNI	M.A.A à Université de Mostaganem
Encadreur	MME TAHLAITI	M.A.A à Université de Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale

Année universitaire 2016-2017

Remerciements

J'aimerais en premier lieu remercier mon dieu Allah qui m'a donné la volonté et le courage pour la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier tout d'abord mon encadreur, madame TAHLAITI de m'avoir proposé ce sujet de recherche. La clarté et la précision de son rapport montrent à quel point elle s'est investie dans ce travail. Ses critiques et ses conseils me sont d'ores et déjà précieux

Je remercie également professeur DALACHE d'avoir accepté de juger mon travail en tant que présidente

Je souhaite aussi remercier madame HENNI de bien vouloir examiner et évaluer ce travail

Je remercie également docteur HOMRANI de nous avoir donné l'opportunité de nous ouvrir au monde de la recherche.

Je remercie aussi tous les professeurs qui ont partagés leurs connaissances pour notre apprentissage

Et en fin j'adresse mes sincère remerciements a mes parents, mes frères, ma sœur, et à tout mes amis.

Et à tous ceux qui ont contribué dans la réalisation de ce travail de près ou de loin.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire a mes chers parents à qui je dois tout ce travail est le fruit de leur amour, leurs encouragement et sacrifices

A ma chère mère MEHAL Nacéra

A mon cher père HAMMOUM Rezak

A ma chère sœur Kamelia qui était toujours mon point d'encouragement la personne que je suis son chemin

A mes frères Aboubakr Essedik, et Mohamed, merci pour vos encouragements pour vos soutiens

A la mémoire de mon oncle MEHAL Belkacem que son âme repose en paix

A mes grands parents

A toute la famille HAMMOUM et MEHAL

A me copine KHELIFA Samia

A mes amies de promotion « EEML » : Houria, Amina, Souad et Kawther.

Résumé :

Les bactéries lactiques sont utilisées comme des bactéries à potentiel probiotiques, ces derniers doivent affronter le stress gastro-intestinal afin de porter leurs effets bénéfiques aux sites d'action. En effet, les bactéries ingérées doivent survivre devant l'acidité de l'estomac et la présence des sels biliaires pour exprimer leurs fonctions métaboliques spécifiques.

Les bactéries lactiques sont utilisées dans un grand nombre de fermentations spontanées et produits alimentaires, ou elles peuvent être utilisées comme des cultures protectrices grâce à leurs effets nutritionnels et thérapeutiques.

Le but de ce projet est d'étudier la résistance des bactéries lactiques aux stress gastro-intestinal. De ce fait deux souches isolées à partir de Hamoum BL8 *Lactobacillus* et M5 *Pediococcus* ont été étudiées durant notre pratique. Ces deux dernières ont été exposées à des stress divers qui font objets d'un obstacle primaire dans le tractus digestif.

Nous avons testés la sensibilité de nos souches lactiques aux conditions particulières retrouvées dans l'estomac et l'intestin (acidité pH (2,5 ; 4,5 et 6,5) et à la présence des sels biliaires à des différents pH : 2,5 et 6,5 (0,3 ; 0,5% et 1%).

D'après les résultats, les souches ont résisté à pH bas (2,5) dont il a un effet bactériostatique, ou la M5 a enregistré le pourcentage de viabilité le plus élevé par rapport à la BL8. Les souches ont résisté ainsi aux sels biliaires. D'autre part nous avons étudié la sensibilité des souches lactiques aux antibiotiques, dont les résultats ont démontrés une résistance remarquable envers quelques antibiotiques utilisés.

A fin d'évaluer l'importance biotechnologique de nos souches, nous avons évalué leur pouvoir acidifiant. Les valeurs enregistrées expriment un bon pouvoir acidifiant pour les deux souches lactiques.

Mots clés : Probiotiques, souches lactiques, sel biliaire, acidité, résistance, Hamoum.

الملخص:

تستخدم البكتيريا اللبنية كـ بروتينيك، حيث يستوجب على هذه الأخيرة مواجهة الإجهاد الهضمي لإيصال آثارها المفيدة لمواقع العمل. في الواقع، يجب على البكتيريا المتناولة البقاء على قيد الحياة أمام عقبات حموضة المعدة ووجود أملاح الصفراء للتعبير عن وظائف الأيض الخاصة بها.

الغرض من هذا المشروع هو التحقيق في مقاومة البكتيريا اللبنية في إجهاد الجهاز الهضمي. وبالتالي، تمت دراسة اثنين من السلالات المعزولة من الحموم *BL8 Lactobacillus et M5 Pediococcus*، حيث تعرضت الأخيرين لمجموعة متنوعة من الضغوط التي تمثل العقبات الرئيسية في الجهاز الهضمي. و تمثلت هذه العقبات في حموضة المعدة، وجود الأملاح الصفراء و المضادات الحيوية.

من خلال النتائج، لاحظنا مقاومة السلالات لحموضة المعدة ووجود الأملاح الصفراء، كما قاومت بعض المضادات الحيوية.

كذلك درسنا الأهمية البيوتكنولوجية للسلالات عبر القوة الحمضية. و اظهرت القيم قوة حمضية مهمة.

الكلمات المفتاحية : البروبيوتيك، سلالات اللبنية، ملح الصفراء، حموضة المقاومة، الحموم.

Abstract :

The lactic acid bacteria are used as bacteria with probiotic potential, the latter must face the gastrointestinal stress in order to bring their beneficial effects to the sites of action. Indeed, ingested bacteria must survive the acidity of the stomach and the presence of bile salts to express their specific metabolic functions.

The aim of this project is to study the resistance of lactic bacteria to gastrointestinal stress. Therefore, two strains isolated from Hamoum BL8 *Lactobacillus* and M5 *Pediococcus* were studied during our practice. The latter two were exposed to one of the various stresses that are the objects of a primary obstacle in the digestive tract.

We tested the sensitivity of our lactic strains to the particular conditions found in the stomach and intestine acidity pH (2.5, 4.5 and 6.5) and the presence of bile salts at different pH: 2 , 5 and 6.5 (0.3, 0.5% and 1%).

According to the results, the strains were resistant to low pH (2.5), which had a bacteriostatic effect, or M5 had the highest viability percentage relative to BL8. The strains also resisted bile salts. On the other hand, we studied the susceptibility of lactic strains to antibiotics, the results of which demonstrated remarkable resistance to some antibiotics used.

In order to evaluate the biotechnological importance of our strains, we evaluated their acidifying power. The values recorded express a good acidifying power for the two lactic strains.

Key words : Probiotics, lactic strains, bile salt, acidity, resistance, Hamoum.

Table des matières

Table des Matières

Liste des tableaux	i
Liste des figures	ii
Abréviations	iii
Introduction	1

I. Synthèse Bibliographique **Chapitre I : Bactéries lactiques**

I.1. Généralités	3
I.2. Définition des bactéries lactiques	3
I.3. Habitat	3
I.4. Taxonomie	4
I.5. caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	5
I.5.1. le genre <i>lactobacillus</i>	5
1.5.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	6
1.5.3. Le genre <i>streptococcus</i>	7
1.5.4. Le genre <i>Enterococcus</i>	7
1.5.5. Le genre <i>Leuconostoc</i>	7
1.5.6. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	8
I.6. Les voies fermentaires des bactéries lactiques	9
1.6.1. Voie homofermentaire	10
1.6.2. Voie hétérofermentaire	11

Chapitre II : Les probiotiques

II.1. Historique	12
II.2. Définition	12
II.3. Caractéristiques	13
II.4. Les bactéries lactiques à potentiel probiotique	13

II.5. Les critères de sélection des probiotiques	14
II.5.1. La résistance a l'acidité gastrique	14
II.5.2 La résistance aux sels biliaires	15
II.5.3 La résistance aux antibiotiques	15
II.5.4 critères technologiques	15
II.6. Ecosystème microbien intestinal	15
II.7. Mécanisme d'action des probiotiques	17

Chapitre 3 : Applications des bactéries lactiques

III.1.1. Applications alimentaires	19
III.1.1.1. Fermentation alimentaire	19
III.1.1.2. Utilisation dans la conservation	21
III.1.1.2.1. Production d'acide lactique	21
III.1.1.2.2. Production des bactériocines	21
III.1.2. Applications en santé	22
III.2. Application des Probiotiques	22
III.2.1. Applications alimentaires	22
III.2.2. Applications dans le domaine de santé	23

II. Matériel et Méthodes

1. Lieu de travail	
2. Matériels	27
2.1. Milieux de culture	27
2.2. Les souches lactiques	27
2.3. Vérification de la pureté des souches	27
2.4. Conservation des souches	28
2.4.1. Conservation à courte durée	28
2.4.2. Conservation à longue durée	28

3. Méthodes	28
3.1. Pouvoir acidifiant	28
3.2. Résistance à l'acidité gastrique	29
3.3. Résistance aux sels biliaires	29
3.4. Résistance aux antibiotiques	30

III. Résultats et Discussion

1. Vérification de la pureté des souches	31
1.1. Examen macroscopique	31
1.2. Examen microscopique	31
2. Pouvoir acidifiant	32
3. Résistance à l'acidité gastrique	33
4. Résistance aux sels biliaires	34
5. Résistance aux antibiotiques	36

Conclusion et perspectives	37
-----------------------------------	----

Références bibliographiques

Annexe

Liste des tableaux

Tableau1. Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques.	8
Tableau 2 : Caractéristiques générales d'un probiotique.....	13
Tableau 3 : Micro-organismes considérés comme probiotiques.....	14
Tableau 4 : Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques.....	19
Tableau 5 : Rôle des ferments lactiques en fromagerie.....	20
Tableau 6 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.....	22
Tableau 7 : Etudes cliniques chez l'homme portant sur l'effet de l'ingestion de bactéries probiotiques pour lutter contre les infections hivernales.....	25
Tableau 8 : Résultats de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques.....	36

Liste des figures

Figure 01. Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).....	5
Figure 2 : Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan <i>et al.</i> , 2008).....	10
Figure 3: Composition de la microflore intestinale humaine (Holzapfel <i>et al.</i> , 1998)...	16
Figure 4 : Observation microscopique de BL8.....	31
Figure 5 : Observation microscopique de M5.....	31
Figure 6 : L'évolution de l'acidité en fonction de temps par BL8 et M5.....	32
Figure 7 : La résistance à l'acidité.....	33
Figure 8 : Résistance de M5 et BL8 à 0,3% sels biliaires.....	34
Figure 9 : Résistance de M5 et BL8 à 0,5% sels biliaires.....	34
Figure 10 : Résistance de M5 et BL8 à 1% sels biliaires.....	35
Figure 11 : Antibiogramme BL8 et M5	

Abréviations :

°C : Degré Celsius

°D : Degré dornic

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

B. : *Bifidobacterium*

BL : bactéries lactiques

DO : Densité Optique

En. : *Enterococcus*

FAO : Food and Agriculture Organization

G : gramme

G+C : Guanine + Cytosine

GRAS: Generally Regarded As Safe

H : heure

IgA : immunoglobulines

L : Litre.

Lb. : *Lactobacillus*

Lc. : *Lactococcus*

Ln. : *Leuconostoc*

Min : minute

MRS : de Man-Rogosa et Sharp

Nm : nanomètre

OMS : Organisation mondiale de la santé

pH : Potentiel d'Hydrogène

Rpm : Rotation par minute

ssp. : Sous espèce

St. : *Streptococcus*

UFC : Unité Formant Colonie

μL : Microlitre.

Introduction

Les céréales sont la base de l'alimentation humaine (Multon, 1982 ; Molinié et Pfohl Leszhowicz, 2003), où ils ont une propriété qui peut nous apporter des bienfaits pour la santé humaine (Doumandji *et al.*, 2003). Pour notre présente étude, nous avons choisi le blé fermenté « Hamoum », dont il peut avoir divers effets.

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis l'antiquité dans la production et la conservation alimentaire (Chammas *et al.*, 2006) où elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Axelsson, 2004).

Dans la fabrication fromagère, elles jouent un rôle primordial dans les premières étapes de la transformation du lait, grâce à leur propriété GRAS (Generally Recognizes As Safe). Leur action est liée principalement à deux aspects de leur métabolisme : la production d'acide lactique et l'activité protéolytique (Desmazeaud, 1998).

Les bactéries lactiques sont considérées parmi la flore intestinale normale et ont toujours montré un effet bénéfique sur la santé et en particulier sur l'équilibre de la flore intestinale. La consommation des produits issus d'une fermentation lactique est de plus en plus accrue grâce aux propriétés probiotiques qui caractérisent les bactéries lactiques et leur effet positif sur la santé et la microflore intestinale (Gorbach, 1996).

Notons que les bactéries lactiques sont reconnues comme GRAS (Generally Recognizes As Safe) (Soomro *et al.*, 2002), ces bactéries forment actuellement un groupe d'organismes utilisés comme probiotiques (Klaenhammer *et al.*, 2007 ; Corthier, 2006 ; Ninane, 2009).

Défini comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé au-delà des effets nutritionnels traditionnels (FAO, OMS, 2002), les bactéries probiotiques sont des bactéries bénéfiques qui vivent dans l'intestin humain. Les micro-organismes probiotiques sélectionnés en alimentation humaine sont représentés essentiellement par les bactéries lactiques, les *Lactobacilles* et les *Pediocoques* font partie des bactéries lactiques à potentiel probiotique.

La perception des propriétés thérapeutiques des probiotiques est à l'origine de la consommation accrue des produits laitiers fermentés notamment le yaourt. En effet, l'effet probiotique des bactéries lactiques dépend de leur survie et durant la production alimentaire y compris le traitement thermique, l'acidification, le stockage et d'autres étapes de production, et dans le tractus digestif, c'est-à-dire la résistance à l'acidité gastrique, la résistance aux sels biliaires et la résistance à d'autres stress (Shah, 2000 ; Marteau *et al.*, 2003 ; Gagnon *et al.*, 2004)

Notre travail consiste à montrer l'effet probiotique de deux souches lactiques isolées à partir de Hamoum et leur pouvoir acidifiant. La partie expérimentale, nous a permis de tester le pouvoir probiotique de nos souches par :

- ✓ L'étude de leur pouvoir acidifiant ;
- ✓ Leur résistance à l'acidité ;
- ✓ Leur résistance aux sels biliaires ;
- ✓ Leur résistance aux antibiotiques.

*Synthèse
bibliographique*

Chapitre I

I- Les bactéries lactiques :

I.1. Généralités :

Les bactéries lactiques sont très anciennes bactéries –observées avant les cyanobactéries- (Drider D et Prevost H, 2009). Depuis des siècles, elles ont été utilisées dans la fermentation de certains aliments, en maîtrisant la qualité et la durée de la conservation des aliments (Sallofe Coste, 1994). Au début du 20^{ème} siècle l'emploi des ferments ont été développé (Drider D et Prevost H, 2009).

I.2. Définition des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. La première culture pure était *Bacterium lactis* obtenue par Lister en 1873 (Ho,2008). Elles ont été isolées pour la première fois à partir du lait (Metchnikoff, 1908 ; Sandine *et al.*, 1972; et carr *et al.*, 2002).

Les bactéries lactiques ont été définit pour la première fois par Orla –Jensen en 1919 et reunit plusieurs genres caractérisés par leurs pouvoir fermentaire, ce sont des micro-organismes ubiquitaires car se retrouvent dans différents types d'habitat (Dellaglio *et al.*, 1994; Matamoros, 2008), regroupent des bacilles et des coccobacilles, elles sont à gram positif, asporulées, généralement immobiles, catalase négative, oxydase négative généralement nitrate réductase négative, aérotolérantes (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Carr *et al.*, 2002 ; Axelsson 2004). Elles sont caractérisées par la fermentation des glucides en produisant de l'acide lactique principalement (parfois production d'autres acides organiques comme l'acide acétique, acide formique...) (Raynaud., 2006).

I.3. Habitat :

Les bactéries lactiques sont ubiquistes très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent associées à des aliments riches en sucres simples, présentes dans des différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, la viande, les végétaux, les poissons. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Elles colonisent aussi les muqueuses humaines et animales et le tractus digestif (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001 ; Drouault et Corthier, 2001).

I.4. Taxonomie :

La taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente, depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*). Au cours de la dernière décennie le nombre de nouvelle espèces a augmenté, en revanche, les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

La classification des bactéries lactiques repose sur leurs critères phénotypiques comme : la morphologie, type fermentaire, la croissance à des différentes températures (Droissart et Luquet, 1994; Holzapfel et al., 2001). D'autres critères sont acquit dans l'identification des espèces, la composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase (Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho et al., 2007).

La morphologie est la caractéristique principale pour classer les genres des bactéries lactiques, essentiellement en deux groupes : des bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et des coques (tous les autres genres). En addition, le genre *Weissella* (recentment decrit) est le seul groupe qui comporte les deux morphologies (des baciles et des coques (Collins et al., 1993 ; Ho et al., 2007).

Plusieurs genres appartiennent au groupe des bactéries lactiques comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Stiles et Holzapfel, 1997 ;Pot, 2008). D'autres nouveaux genres ont été également décrits comme des BL, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupes des bactéries lactiques comme : *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera* (Broadbent, 2001 ; Axelsson, 2004).

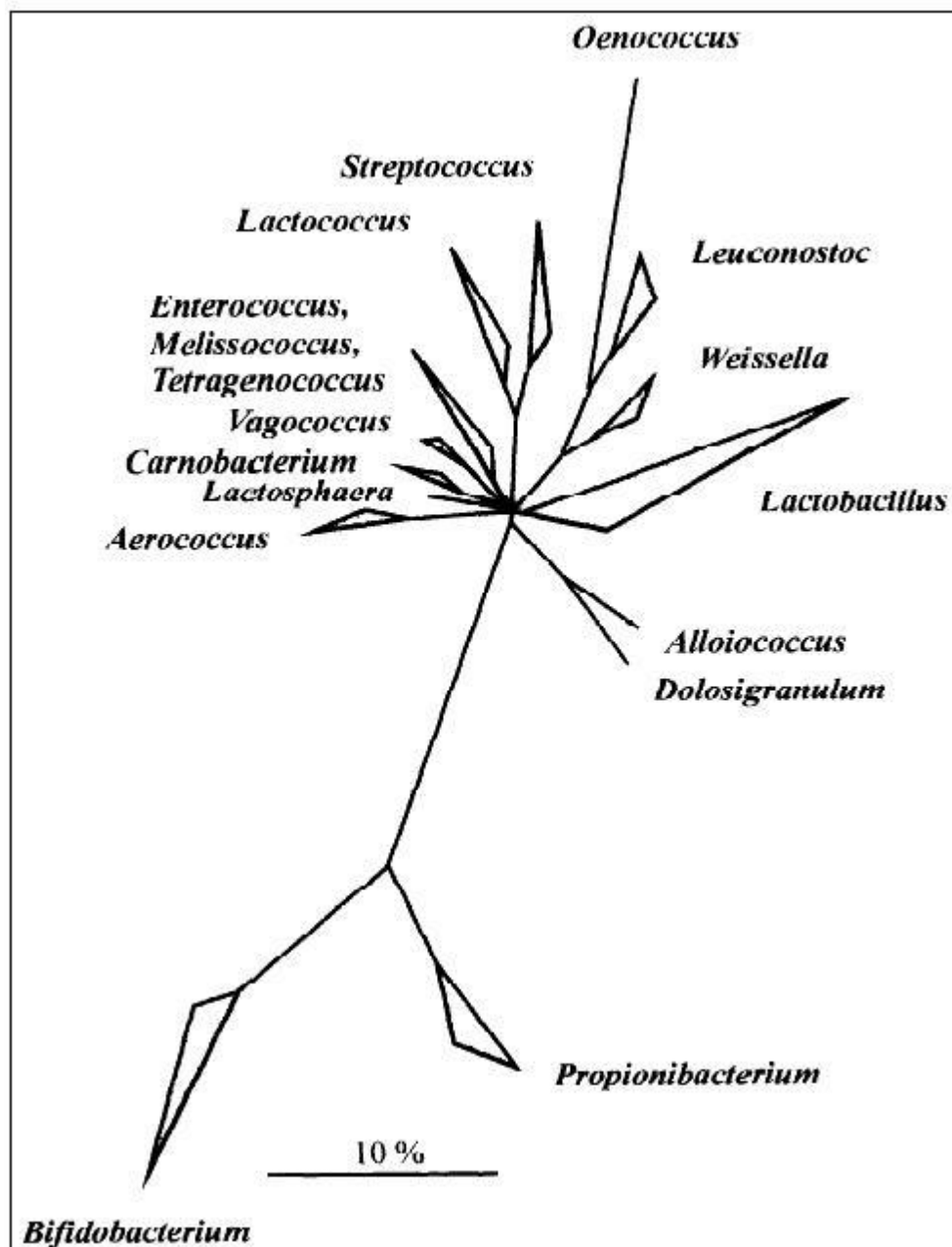


Figure 01. Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

I.5. caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques :

I.5.1. le genre *lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, regroupe un nombre important d'espèces. Ce sont des bacilles longs et fins, fréquemment associés en chaînette, Gram+, asporulées, immobiles, catalase négative, se développent dans une température située entre 30 et 40°C. ils ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en

Chapitre I : Les bactéries lactique

vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc *et al.*, 1994). Ils se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt *et al.*, 2000).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé en trois groupes selon Orla-Jensen, selon leurs profil fermentaire (Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004) :

Groupe I (*Thermobacterium*) : comprend les lactobacilles homofermentaires, c'est-à-dire produisent essentiellement l'acide lactique à partir du lactose. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, généralement thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C, les plus fréquents dans l'alimentation (lait et ses dérivés) sont : *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

Groupe II (*Streptobacterium*) : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires facultatives c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration limité de glucose. Comporte une vingtaine d'espèces essentiellement mésophiles comme : *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. Plantarum* (Laurent *et al.*, 1998).

Groupe III (*Betabacterium*) : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires obligatoires, ce groupe rassemble des espèces relativement hétérogènes, généralement mésophile comme : *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. Sanfransisco*. Généralement elles sont présentes dans les produits laitiers et carnés, et se développes dans le tube digestif de l'homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale (Laurent *et al.*, 1998).

1.5.2. Le genre *Lactococcus* :

Le genre *Lactococcus* représente les streptocoques dits « lactique » car ils sont liés à plusieurs fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Ils sont présents essentiellement dans les produits végétaux, et généralement dans le lait et les produits laitiers (Pilet *et al.*, 2005).

Ce sont des sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable, anaérobies facultatives, homofermentaires ne produisent que l'acide lactique (L+), anaérobies facultatives, leurs température de croissance est proche de 30°C, peuvent croitre à 10°C mais non à 45°C (PRESCOTT *et al.*, 2013). Quelques espèces de ce genre sont capables de produire des exopolysaccharides et des bactériocines, et elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

Chapitre I : Les bactéries lactique

Le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *hordniae* (Pot *et al.*, 1996 ; Pot, 2008).

1.5.3. Le genre *streptococcus* :

La classification de ce genre est très large, il est dévisé généralement en trois groupes essentiels : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987).

L'espèce thermophile (*Streptococcus termophilus*) est la seule espèce utilisé dans la technologie alimentaire suite a son caractère non pathogène et considéré comme un streptocoque lactique (Laurent *et al.*, 1998), elle a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles et Holzapfel, 1997).

Streptococcus termiphilus se différencie par son habitat (lait et ses dérivés), son caractère non pathogène, sa thermorésistance, elle peut croitre à 52°C (Haddie, 1986 ; Pilet *et al.*, 2005).

1.5.4. Le genre *Enterococcus* :

Ce sont des streptocoques fécaux, elles sont des commensaux de l'intestin. Elles sont des coques, parfois mobiles, homofermentaires et elles peuvent croitre dans une température comprise entre 10°C et 45°C, Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches (Tamime, 2002 ; Ho *et al.*, 2007).

1.5.5. Le genre *Leuconostoc* :

Appartient à la famille de leuconostocaceae, ce sont des coques allongées, elles se groupe par paires ou par chaines, hétérofermentaires, elles sont incapables de dégrader l'arginine ce qui leurs distinguent des lactobacilles hétérofermentaires (Gonzalez *et al.*, 2007).

Elles se considèrent généralement comme des anaérobies facultatifs, mais certains les range comme des anaérobies aérotolérants. Elles sont auxotrophes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides (Dellaglio *et al.*, 1994).

Ce genre comprend quatre espèces : *Ln. mesenteroides* avec ces sous espèce mesenteroides cremoris et dextransicum et *Ln. lactis* et *Ln. Pseudomesenteroides* et *Ln. paramesenteroides* (Collins *et al.*, 1993 ; Laease, 2005).

1.5.6. Le genre *Bifidobacterium* :

Les bifidobactéries sont des bâtonnets de morphologies variables dont la plus caractéristique est une forme en Y. Ce sont des bactéries à Gram-positif, non mobiles, catalases négatives et anaérobies strictes. Leurs conditions optimales de croissance se situent à des températures entre 37°C et 41°C et à des pH compris entre 6,5 et 7,0. Les bifidobactéries sont hétérofermentaires et dégradent les hexoses en produisant de l'acide lactique et acétique.

Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur G + C % élevé, et la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase. Elles sont isolées de l'homme et des animaux (Laurent, 1998).

Tableau1. Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Laurent *et al.*, 1998).

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaires ou hétérofermentaires	Thermophiles ou mésophiles	G1 :23 G2 :16 G3 :22
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	5
<i>streptococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles ou thermophiles	19
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	29
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	11
<i>Bifidobacterium</i>	Variables	Acide acétique et acide lactique	Mésophiles	25

1.6. Les voies fermentaires des bactéries lactiques :

L'utilisation des ferments lactiques dans les productions agro-alimentaires comme : laiterie, fromagerie, beurrerie..., a fait de la fermentation un objet d'intérêt pour les chercheurs.

C'est vers 1857, que Louis Pasteur découvrait que la fermentation lactique était due au développement de certaines bactéries. Elles forment un groupe hétérotrophe, les bactéries lactiques tirent leur énergie de la fermentation des substrats carbonés, ces derniers peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose). La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Atlan *et al.*, 2008) :

- le transport du sucre à travers la membrane cellulaire ;
- le catabolisme intracellulaire du sucre ;
- formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Les bactéries lactiques, utilisent généralement une des deux voies principales de la fermentation lactique, il s'agit de la voie homofermentaire (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Atlan *et al.*, 2008).

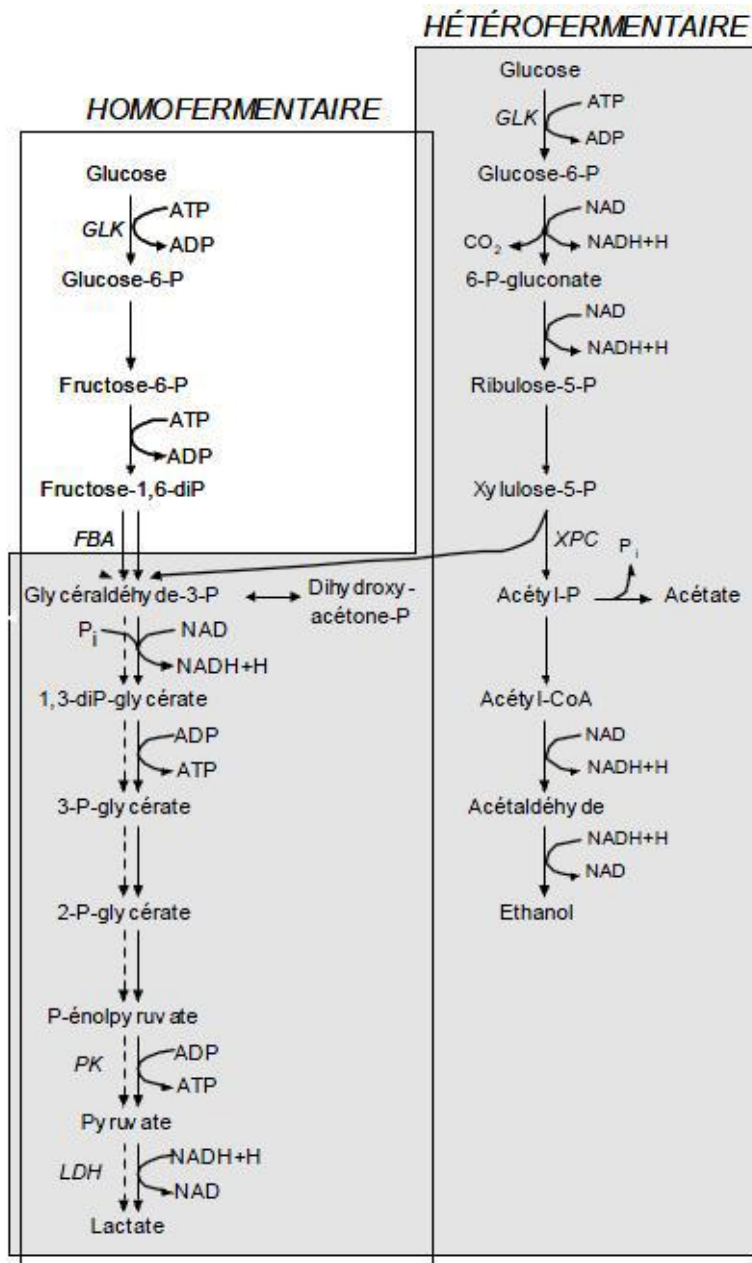


Figure 2 : Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan *et al.*, 2008).

[GLK : glucokinase, FBA : fructose-1,6- bisphosphate aldolase, XPC : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase].

1.6.1. Voie homofermentaire (EMP) :

Les genres homofermentaires des bactéries lactiques sont : Lactocoques, enterococques, streptococques et certaines espèces de lactobacilles.

Les bactéries lactiques homofermentaires transforment tout le glucose en excès en acide lactique dans les conditions optimales de croissance, produisant en parallèle deux

Chapitre I : Les bactéries lactique

molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. Cette action est assurée par la présence l'enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

1.6.2. Voie hétérofermentaire (pentose, phosphate) :

Les groupes de bactéries lactiques hétérofermentaires sont les leuconostoc et quelques espèces de lactobacilles,

Le résultat de la fermentation lactique aboutit à la formation de quantité équimolaire de lactate, d'éthanol et de gaz carbonique. Une production de formate et d'acétate peut avoir lieu, notamment en aérobiose (DESMAZEAUD, 1996). Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

Chapitre II

II.1. Historique :

Il y a un siècle, Elie Metchnikoff (scientifique russe, lauréat du Nobel et professeur à l'Institut Pasteur à Paris) a suggéré que l'ingestion des bactéries lactiques offrait des bénéfices pour la santé conduisant à une plus grande longévité. Ainsi, Metchnikoff a affirmé que "l'auto intoxication intestinale" et que le vieillissement en résultant pouvait être supprimé en modifiant la flore microbienne de l'intestin et en remplaçant des microbes protéolytiques tels que *Clostridium*, par des microbes utiles, ceci explique que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé (Tannock; 2002).

Quelques années plus tard, un médecin français, Henry Tissier a isolé une bifidobactérie à partir d'un enfant nourri au sein, et il l'a appelé *Bacillus bifidus communis*. Tout en affirmant que la bifidobactérie réduirait la bactérie protéolytique qui cause la diarrhée, Tissier a suggéré qu'il y avait une possibilité d'administrer aux enfants souffrant de ce symptôme. Le terme "probiotiques" fut d'abord introduit en 1965 par Lilly et Stillwell; par contraste avec les antibiotiques (Lamoureux, 2000 ; Ait-Belgnaoui *et al.*, 2006).

II.2. Définition :

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2006). Il a été tout d'abord défini par Lilly et Stillwell en 1965 comme : « acteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » (Lamoureux, 2000 ; Ait-Belgnaoui *et al.*, 2006). Ensuite, Parker en 1974 a défini les probiotiques comme : « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». en 1989, Fuller a proposé une définition plus proche du sens actuel : « supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ».

C'est en 2002 que la FAO (Food and Agriculture Organization) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé ; WHO) ont formulé la définition suivante : « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère».

II.3. Caractéristiques :

Ce sont des bactéries Gram-positives, anaérobies facultatives, non sporulantes, avec la capacité à produire de l'acide lactique à partir de glucides. Selon la définition formulée par la FAO, les micro-organismes probiotiques doivent survivre dans tractus digestif, et traduire un effet bénéfique à l'hôte, le tableau suivant décrit les différents critères de sélection des probiotiques (Izquierdo, 2009).

Tableau 2 : Caractéristiques générales d'un probiotique (Rousseau, 2004)

Sécurité	Technologie	Fonctionnalités	Effets santé
<ul style="list-style-type: none"> • Origine humaine • Non pathogène • Exempte de facteur de virulence 	<ul style="list-style-type: none"> • Génétiquement stable • Viable au cours de la fabrication et le stockage • Résistant aux bactériophages • Propriétés sensorielles • Apte à la propagation à grande échelle 	<ul style="list-style-type: none"> • Tolérance au suc gastrique et à la bile • Viable et métaboliquement active jusqu'à sa cible • Adhérent à la muqueuse intestinale 	<ul style="list-style-type: none"> • Cliniquement prouvé

Le terme « probiotique » devrait être réservé aux microbes vivants dont ils dévoilent un caractère non pathogène, c'est-à-dire des microbes ayant un rôle sanitaire positif

Les bactéries étant administrées par voie orale, il faut qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif : le pH acide, les sels biliaires, les enzymes pancréatiques...etc (Percival, 1997 ; Lamoureux, 2000 ; Millette *et al.*, 2008).

II.4. Les bactéries lactiques à potentiel probiotique :

A ce jour, les souches des bactéries lactiques les plus rapportée dans les littératures sont les du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, mais il faut aussi mentionner des souches du genre *Enterococcus* et *Streptococcus* (Gbassi *et al.*, 2011 ; Rokka et Rantamaki, 2010).

Le tableau suivant représente Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotiques ainsi d'autres micro-organismes à potentiel probiotique.

Tableau 3 : Micro-organismes considérés comme probiotiques (d'après Hozalpfel *et al.*, 1998).

Lactobacillus	Bifidobacterium	Autres bactéries lactiques	Autres micro-organismes
<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. acidophilus</i> • <i>L. amylovirus</i> • <i>L. brevis</i> • <i>L. casei</i> • <i>L. cellobius</i> • <i>L. crispatus</i> • <i>L. curvatus</i> • <i>L. delbrueckii</i> • <i>L. farciminis</i> • <i>L. fermentum</i> • <i>L. gallinarum</i> • <i>L. gasseri</i> • <i>L. johnsonii</i> • <i>L. paracasei</i> • <i>L. plantarum</i> • <i>L. reuteri</i> • <i>L. rhamnosus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <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>B. thermophilum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus faecalis</i> • <i>Enterococcus faecium</i> • <i>Lactococcus lactis</i> • <i>Leuconstoc mesenteroides</i> • <i>Pediococcus acidilactici</i> • <i>Sporolactobacillus inulinus</i> • <i>Streptococcus thermophilis</i> • <i>Streptococcus diacetylactis</i> • <i>Streptococcus intermedius</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus</i> spp, • <i>Escherichia coli</i> strain Nissle • <i>Propionibacterium freudenreichii</i> • <i>Saccharomyces cerevisiae</i> • <i>Saccharomyces boulardii</i>

II.5. Les critères de sélection des probiotiques :

Tout d'abord, pour sélectionner un micro-organisme autant qu'un probiotique, il ne doit présenter ni toxicité ni pathogénie. D'autre part, les probiotiques doivent stimuler une réponse immunitaire (Schiffirin *et al.*, 1997) ainsi de produire des substances antimicrobiennes et de réduire l'allergie chez les sujets sensible (Gourbeye *et al.*, 2001).

La viabilité et le survie au niveau du site d'action est un critère essentiel pour la sélection des probiotiques, toutefois la capacité de résistance aux perturbations du tractus exige une résistance aux obstacles majeur comme : le pH acide, les sels biliaries, antibiotiques... (Percival, 1997 ; Lamoureux, 2000 ; Millette *et al.*, 2008).

II.5.1. La résistance a l'acidité gastrique :

Le comportement des bactéries dans un milieu acide dépend de la souche, de ce fait il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée. A pH=2 certaines souches dévoilent une résistance qui dure en moyenne 1h30, alors que pour d'autres, après 30 minutes 1 seule bactérie résiste à partir d'un milliards (Corcoran *et al.* 2005).

II.5.2 La résistance aux sels biliaires :

Les sels biliaires sécrètent dans le duodénum des molécules qui ont un rôle de détergent, ce qui met les bactéries devant un autre obstacle à résister après l'acidité de l'estomac. En effet, 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).

II.5.3 La résistance aux antibiotiques :

La structure et la physiologie de certaines bactéries leur donne le pouvoir à résister à des différents antibiotiques. 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la kanamycine (81%), à la tétracycline (29.5%), à l'érythromycine (12%) et au chloramphénicol (8.5%). 38% des isolats de *Enterococcus faecium* ont été trouvés résistants à la vanomycine (Temmerman *et al.*, 2003).

II.5.4 critères technologiques :

D'autres critères sont aussi admises aux critères de sélection des probiotiques, ces critères sont technologiques et sont : Bonnes propriétés sensorielles, Résistance aux phages, Viabilité durant le traitement technologique, Stabilité dans le produit et durant le stockage (Saarela *et al.*, 2000).

II.6. Ecosystème microbien intestinal :

De la naissance à leur mort, les animaux ainsi que l'homme vivent en équilibre avec une flore microbienne extrêmement dense et variée. La composition de la flore intestinale varie selon l'espèce et l'alimentation de l'hôte (Drasar et Barrow, 1985). Elle est estimée numériquement 10 fois supérieure au nombre de cellules de l'organisme (Savage, 1977). Elle représente un écosystème très complexe d'au moins 500 espèces dont 30 à 40 espèces dominantes regroupant 99 % de la flore totale (Tannock, 1999).

La composition de la microflore intestinale dépend de l'espèce animale et de son alimentation (Drasar et Barrow, 1985). La flore normale est définie par la présence constante de certaines espèces dans l'intestin. Chez un individu donné, il existe également des variations quantitatives et qualitatives en fonction de la région intestinale (Drasar, 1974). Si l'on exclut la bouche, directement en contact avec le milieu extérieur, les populations bactériennes

présentes dans la lumière du tube digestif augmentent progressivement de l'estomac jusqu'aux selles (**Figure 3**)

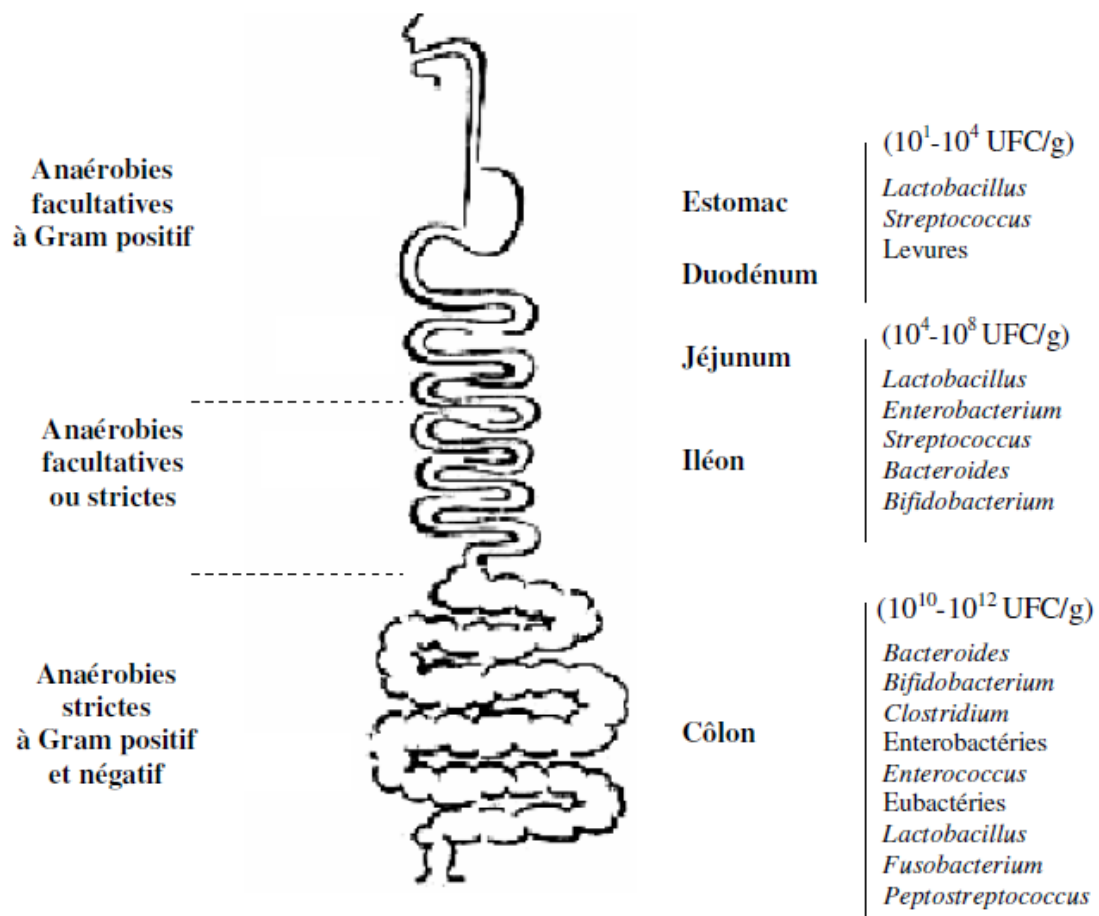


Figure 3: Composition de la microflore intestinale humaine (Holzapfel *et al.*, 1998)

L'estomac Héberge de très petites quantités de micro-organismes : $< 10^3$ de cellules bactériennes par gramme de contenu, vu que son pH est élevé comme chez le rat, le veau ou le porc et plus faible lorsque le pH est acide comme chez l'homme. Seuls les micro-organismes à Gram positif aérobie ou anaérobies facultatives acidotolérantes sont capables d'y survivre. Cependant, des bactéries anaérobies strictes résistantes à l'acidité gastrique peuvent s'y implanter, c'est notamment le cas d' *Helicobacter pylori* capable de se loger dans la sous-couche du mucus, La principale flore de l'estomac est composée principalement de streptocoques et de lactobacilles (Ait Belgnaoui, 2006).

Au niveau de l'intestin grêle, les bactéries ne peuvent pas se multiplier chez un sujet sain, dont le nombre de bactéries augmente progressivement d'environ 10^4 cellules dans le jéjunum à 10^7 cellules par gramme de contenu dans l'iléon terminal (Francisco Guarner *et al.*,

2008). Des espèces anaérobies facultatives à Gram négatif (entérobactéries) apparaissent aussi à côté des espèces à Gram positif.

Le nombre des espèces anaérobies strict augmente progressivement tout au long du tractus digestif. Le colon, représente le segment le plus peuplé environ 10^{10} à 10^{20} bactéries/g de contenu (Ait Belgnaoui, 2006). Les bactéries représentent environ 50 % du poids sec des selles (Finegold *et al.*, 1983). La flore dominante de certaines espèces est composée principalement de *Bacteroides*, *Eubactérium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*. Or, le genre *Lactobacillus* rencontré dans la flore dominante des rongeurs et du porc, ne se trouve que très occasionnellement dans la flore dominante de l'homme. Inversement, le genre *Bifidobacterium* appartenant à la flore dominante chez l'homme n'est pas répertorié chez les rongeurs.

Chez l'adulte en bonne santé, la composition fécale reste stable au cours du temps, dont elle est constituée de l'ensemble de micro-organismes qui provient des différents biotopes du tube digestif.

Vu la facilité de prélèvement, l'écosystème fécal est le plus étudié chez l'animal et l'homme (Marteau *et al.*, 2001). Les études faites sur l'écosystème bactérien fécal dévoilent que ce dernier est composé de la microflore présente dans la partie terminale du côlon, c'est-à-dire les anaérobies stricts (Ait Belgnaoui, 2006).

II.7. Mécanisme d'action des probiotiques :

Les probiotiques sont considéré comme un moyen de véhiculer leurs effets bénéfique tout au long du tractus digestif jusqu'au la partie ciblé. En effet, les mécanismes d'action des probiotiques sur l'hôte sont complexe. Les probiotiques affectent l'écosystème intestinal par :

- l'inhibition des bactéries indésirables ou pathogènes ;
- La neutralisation des toxines ;
- L'amélioration de la digestion ;
- La stimulation de l'immunité.

Le contact direct avec les barrières intestinaux est nécessaire, ce qui valide les facteurs de sélection des probiotiques. D'autre part, ils sont également une source de vitamines (groupe B essentiellement), et de sels minéraux assimilables (Robin et Rouchy, 2001 ; Ait-Belgnaoui *et al.*, 2005). Ainsi, la présence de la souche bénéfique va permettre la digestion de nutriments (Fuller 1991). De plus, la colonisation de la muqueuse associée à une rémanence de quelques

Chapitre II : Les probiotiques

heures à quelques semaines va avoir pour conséquence une évolution transitoire de la composition et de la fonctionnalité de la flore.

La sécrétion d'antimicrobiens (peroxyde d'hydrogène, acides organiques, bactériocines, antibiotiques), la diminution du pH ou encore l'inhibition par compétition limitent l'adhésion d'autres bactéries aux cellules épithéliales (Ingrassia *et al.*, 2005; Ouwehand *et al.*, 2002). De plus, certaines souches sont capables d'interagir avec les cellules hôtes pour modifier la production de défensines, induire la sécrétion de mucus, augmenter la production d'IgA ou inhiber la translocation bactérienne (Corthésy *et al.*, 2007). Ces effets favorisent le renforcement de la fonction barrière. Enfin, les probiotiques peuvent moduler la réponse immunitaire de l'hôte au niveau local et au niveau systémique en induisant la synthèse de cytokines anti-inflammatoires (Guillaume LEMETAIS *et al.*, 2014).

Chapitre III

III.1. Applications des bactéries lactiques :

III.1.1. Applications alimentaires :

III.1.1.1. Fermentation alimentaire :

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis longtemps dans la fabrication de divers produits fermentés (Leroy et Devuyst, 2004). Elles interviennent dans la transformation de divers produits agro-alimentaires (Tableau 5), comme le lait (crème maturée, yaourt, fromage...), dans la vinification, la fabrication des salaisons, fermentation des végétaux (Hamoum, ensilage) et en boulangerie traditionnelle (Desmazeaud, 1998).

Les bactéries lactiques ont plusieurs rôles dans la production des produits fermentés. Le premier rôle, intervient dans le changement de la saveur et la texture de l'aliment, grâce à l'acide lactique sécrété par les bactéries lactiques tout au cours de leur croissance. Les bactéries lactiques produisent ainsi des peptides et des molécules comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyle ou l'éthanol qui sont importants pour la saveur des aliments.

Genre	Substrat	Exemple de produit
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	Laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	Lait	Yaourts, laits fermentés, kéfirs, fromages
	Viande	Saucissons secs, jambons secs
	Végétaux	Choucroutes, olive, "yaourt" au lait de soja
	Céréales	Pain au levain, bières
<i>Lactococcus</i>	Lait	Fromages, kéfirs
<i>Leuconostoc</i>	Végétaux	Choucroutes, olives, vins
	Lait	Fromages, kéfirs
<i>Pediococcus</i>	Végétaux	Choucroute
	Viande	Saucisses semi-séchées
<i>Oenococcus</i>	Végétaux	Vins
<i>Streptococcus</i>	lait	Yaourts, laits fermentés, fromages

Tableau 4 : Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques
(Penaud, 2006)

En production laitière, la fermentation lactique joue un rôle primordial (Tableau6), c'est-à-dire, les ferments lactiques naturels ou commerciaux interviennent dans l'élaboration de tous les produits laitiers fermentés (Pilet *et al.*, 2005). Ces ferments assurent plusieurs fonctions, telles que la protéolyse qui donne aux fromages leurs caractères rhéologique (viscosité, plasticité et l'élasticité) et la production des agents épaississants pour améliorer la texture du fromage

Propriétés des ferments lactiques	Effets sur le produit
Transformer les sucres en acide lactique	<ul style="list-style-type: none"> • Abaissement du pH • conservation des produits • mitigation du développement de bactéries nuisibles • modification de la micelle de caséine • Solubilisation des minéraux liés à la caséine • action sur l'égouttage des caillés (teneur en eau) • action sur la texture des fromages • Diminution de la concentration en lactose • production de lactate (action sur la flaveur des fromages)
Transformer les sucres en CO₂	<ul style="list-style-type: none"> • Libération de CO₂ • ouverture utile en pâtes molles et pâtes persillées • ouverture nuisible en pâtes pressées
Transformer les citrates	<ul style="list-style-type: none"> • Formation de diacétyl • recherché en fromages à pâte fraîche et molles
Transformer la caséine	<ul style="list-style-type: none"> • Protéolyse pendant la maturation • activation de la croissance (peptides, acides aminés) • Protéolyse pendant l'affinage • modification de la texture, couleur, flaveur
Produire des polysaccharides	<ul style="list-style-type: none"> • Epaississement du milieu pour les pâtes fraîches • augmentation de la viscosité par libération de • polysaccharide pendant la fermentation lactique

Tableau 5 : Rôle des ferments lactiques en fromagerie (Branger *et al.*, 2007).

III.1.1.2. Utilisation dans la conservation :

La propriété des bactéries lactiques à produire des composés antagonistes est reconnue depuis très longtemps. Par cette capacité, l'utilisation des bactéries lactiques permet de satisfaire les besoins au point de vue sanitaire en industrie alimentaire.

les bactéries lactiques, synthétisent certains métabolismes à effet antimicrobien tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl (Atrih et Foster, 2001), des composés antifongiques (Lavermicocca *et al.*, 2000). Grâce à ces propriétés que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (Abee *et al.*, 1995; Rodgers, 2001).

III.1.1.2.1. Production d'acide lactique :

Issu de la fermentation lactique, cette dernière termine par une production importante d'acide lactique, ce métabolisme conduit à une acidification forte et rapide. Le pH diminue en fonction du temps, et le pH final est dépendant de la matière première, par exemple, le yaourt possède un pH entre 4 et 4.5, la choucroute 4.8, et les saucissons entre 4.6 et 5.3. Le développement de la microflore indésirable à ces valeurs sera difficile (M Federighi, 2005).

III.1.1.2.2. Production des bactériocines :

Les bactériocines sont utilisées sous forme d'additif alimentaire (E234), ce qui minimise l'utilisation des additifs chimiques et artificiels dans les produits alimentaires (Nykanen *et al.*, 1999).

Les bactériocines ont une activité bactéricide et/ou bactériostatique, elles représentent une large classe de substances antagonistes (Klaenhammer, 1988). Elles interviennent aussi dans la fabrication des produits alimentaires fermentés, et elles contribuent à l'amélioration du goût, de l'aspect et de l'innocuité microbiologique de l'aliment. En plus d'améliorer la saveur, la fermentation permet d'augmenter la durée de conservation du produit (Rogers, 1928 ; Rogers et Whittier, 1928).

III.1.2. Applications en santé

Dans le domaine de santé, les bactéries lactiques sont utilisées comme des probiotiques, c'est-à-dire qu'elles exercent un effet bénéfique par l'amélioration de la flore intestinale de l'homme ou de l'animal. Les espèces classifiées comme probiotique sont : *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. jhonsonii*, *Lb. reteri*, *Lb. delbruecki, subsp bulgaricus* (Salminen *et al.*, 2004)

III.2. Application des Probiotiques :

III.2.1. Applications alimentaires :

Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques humains ou animaux sont constitués soit d'un seul microorganisme (produits dits monosouches) ou d'une association de plusieurs espèces (produits dits plurisouches). Actuellement, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes (Patterson, 2008) :

- Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales ;
- Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation ;
- Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimés.

Utilisés pour l'enrichissement de certain yaourt et laites (Klaenhammer *et al.*, 2007). Cette utilisation est due aux effet nutritionnels et thérapeutique des ces bactéries car elles enrichissent le milieu ou elles se trouvent en vitamines B et K, acide amines , et bactériocines responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes (soomro *et al.*, 2002). Les bactéries les plus fréquemment utilisées comme probiotique sont des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* (Khan et Ansari, 2007).

III.2.2. Applications dans le domaine de santé :

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques.

Le tableau 6 illustre la diversité des effets bénéfiques sur la santé :

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autres effets
<p>Contrôle des troubles suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mauvaise digestion du lactose • Diarrhée due aux rotavirus et diarrhée-associée aux antibiotiques • Syndrome du côlon irritable • Constipation • Infection par <i>Helicobacter pylori</i> • Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle • Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin • Prévention de l'entérocolite nécrosante du nouveau-né 	<ul style="list-style-type: none"> • Modulation immunitaire • Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation • Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>) 	<p>Réduction du risque de :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein) • Coronaropathie • Maladie des voies urinaires • Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes <p>Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle</p>

Tableau 6 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Salminen *et al.*, 2004 ; Patterson, 2008).

Chapitre III : Applications des bactéries lactiques et des probiotiques

Ces micro-organismes sont impliqués dans l'amélioration de la santé intestinale et influencent positivement le développement et l'activité du système immunitaire. De nombreux effets leur sont attribués (Gareau *et al.* 2010; Gill and Prasad 2008; Moayyedi *et al.* 2010) :

- l'aide à la mal-absorption du lactose due à l'activité lactase bactérienne (Vrese *et al.* 2001),
- l'amélioration de la valeur nutritionnelle des aliments,
- la protection contre les infections gastro-intestinales (diarrhée du voyageur, diarrhée infantile, diarrhée induite par antibiotiques...) (Isolauri *et al.* 1991; McFarland *et al.* 1994),
- le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Kruis *et al.* 2004; Prantera *et al.* 2002),
- la lutte contre les infections à *H. pylori* (Nista *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004),
- la stimulation du système immunitaire,
- la lutte contre la constipation,
- la prévention des infections uro-génitales,
- la neutralisation de carcinogènes alimentaires,
- la réduction du risque de maladie coronarienne (Ebel *et al.* 2012).

Le tableau 7 décrit l'effet de l'ingestion de micro-organismes sur la réduction des symptômes dus aux infections hivernales :

Chapitre III : Applications des bactéries lactiques et des probiotiques

Tableau 7 : Etudes cliniques chez l'homme portant sur l'effet de l'ingestion de bactéries probiotiques pour lutter contre les infections hivernales
(Guillaume LEMETAIS *et al.*, 2012)

Patients	Durée	Traitement journalier	Résultats	Références
17	3 Semaines	<i>L. casei</i> Shirota (4×10^{10} UFC)	Augmentation de l'activité des lymphocytes NK après 3 et 6 semaines Effet nul au bout de 12 semaines	(Nagao <i>et al.</i> 2000)
52	3 Semaines	<i>L. rhamnosus</i> HN001 ($2,5 \times 10^{10}$ UFC)	Augmentation de l'activité phagocytaire et de l'activité des lymphocytes NK (147% vs 71%)	(Sheih <i>et al.</i> 2001)
30	3 Semaines	<i>B. Lactis</i> HN019 (5×10^9 UFC ou 5×10^{10} UFC)	Augmentation du nombre de cellules NK, de neutrophiles et de monocytes	(Gill <i>et al.</i> 2001)
99	3 Semaines	<i>L. casei</i> Shirota (4×10^{10} UFC)	Augmentation de l'activité des lymphocytes NK chez des fumeurs	(Morimoto <i>et al.</i> 2005)
479	12 et 20 Semaines	<i>L. gasseri</i> PA 16/8, <i>B. longum</i> SP 07/3 et <i>B. bifidum</i> MF 20/5 (5×10^7 UFC)	Pas d'effet sur le nombre d'infections Diminution de la durée moyenne des épisodes infectieux et de la sévérité des symptômes Augmentation des lymphocytes Tcytotoxiques	(de Vrese <i>et al.</i> 2006)
19	3 Semaines	<i>L. casei</i> Shirota (4×10^{10} UFC)	Augmentation de l'activité des lymphocytes NK	(Takeda and Okumura 2007)
24	12 Semaines	<i>L. johnsonii</i> La1 (10^9 UFC)	Dans le groupe probiotique, augmentation de la sérumalbumine et diminution de la production de TNF- α	(Fukushima <i>et al.</i> 2007)

Chapitre III : Applications des bactéries lactiques et des probiotiques

50	4 Semaines	<i>L. fermentum</i> CECT5716 (1010UFC)	Augmentation significative d'IgA Incidence plus faible de la grippe	(Olivares <i>et al.</i> 2007)
30	8 semaines	<i>L. paracasei</i> Lpc-37 (3,9 x 108 UFC) <i>L. acidophilus</i> 74-2 (2,9 x 104 UFC) <i>B. lactis</i> DGCC 420 (5,9 x 104 UFC)	Stimulation des lymphocytes Treg et de l'activité phagocytaire des monocytes et granulocytes	(Friedrich <i>et al.</i> 2008)
326	24 semaines	<i>L. acidophilus</i> NCFM <i>B. animalis</i> Bi-07 (1010 UFC)	Réduction de la fièvre, la toux et de l'incidence et la durée des épisodes. Réduction du nombre de jours d'école manqués	(Leyer <i>et al.</i> 2009)
308	7 ou 13 semaines	<i>L. casei</i> DN 114001 (1010 UFC)	Augmentation du nombre d'anticorps de la grippe après Vaccination	(Boge <i>et al.</i> 2009)
1072	12 semaines	<i>L. casei</i> DN 114001 (2 x 1010 UFC)	Réduction de la durée des épisodes infectieux	(Guillemard <i>et al.</i> 2010)
50	24 semaines	<i>L. plantarum</i> CECT 7315/7316 (5 × 109 UFC ou 5 × 108 UFC)	Les fortes doses de probiotiques entraînent une augmentation significative de lymphocytes T et NK. Les faibles doses augmentent le nombre de lymphocytes T, B et les cellules présentatrices d'antigènes	(Mañé <i>et al.</i> 2011)
272	12 semaines	<i>L. plantarum</i> HEAL 9 et <i>L.</i> <i>paracasei</i> 8700 (109 UFC)	Le nombre de jours de rhume a été réduit (8,6 jours vs 6,2 jours dans le groupe probiotique)	(Berggren <i>et al.</i> 2011)

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

1. Lieu de travail :

Ce présent travail a été réalisé au niveau de Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale (LSTPA) ,Université de Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem durant la période mars- juin de l'année 2017.

2. Objectifs :

Le travail a pour objectifs:

- ✓ Etudier les aptitudes probiotiques de nos bactéries lactiques en suivant les critères de sélection,
- ✓ Etudier leur aptitude technologique par l'acidification.

3. Matériel:

3.1.Milieus de culture :

Le milieu de culture utilisé pour l'isolement des souches lactiques est le MRS (de Man, Rogosa, Sharpe 1960)

3.2.Les souches lactiques :

Nous avons utilisé deux souches lactiques pour la réalisation de cette étude (Pediocoque et Lactobacille), ces souches ont été isolées à partir de Hamoum et font partie à la collection de madame Tahlaiti.

3.3.Vérification de la pureté des souches :

Les souches lactiques ont étéensemencées en stries sur milieu MRS, puis incubées à 30°C pendant 24h.

Un examen macroscopique est effectué en décrivant la couleur, l'aspect et la forme des colonies.

Ensuite un examen microscopique effectué, une coloration de Gram d'une colonie (annexe) a été réalisé afin de déterminer la forme, leur mode d'association et le type de gram.

Les bactéries lactiques sont Gram+.

L'appartenance des souches en groupe lactique est également vérifiée par le test de l'activité catalasique, en déposant une goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sur une colonie.

L'effervescence de la suspension bactérienne indique que la bactérie est catalase positive.

L'absence de réaction montre qu'elle est catalase négative.

Les bactéries lactiques sont catalase négative.

3.4. Conservation des souches :

3.4.1. Conservation à courte durée :

La conservation se fait sur milieu MRS incliné à +4°C en tubes à essais après croissance à température optimale (Labioui *et al.*, 2005) .

3.4.2. Conservation à longue durée :

les souches ont été stockées dans le bouillon MRS additionné de 30% de glycérol à (-20 ° C) (SAMELIS *et al.*, 1994).

4. Méthodes :

4.1. Pouvoir acidifiant :

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (MÄYRÄ-MÄKINEN et BIGRET, 2004 ; MONNET *et al.*, 2008).

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre l'évolution de pH d'une part, et à doser l'acidité en fonction du temps.

Nos deux souches M5 (*Pediococcus*) et BL8 (*Lactobacillus*) ont été testés selon le protocole suivant :

Après avoir lavé et stérilisé les flacons, on les a rempli avec 100ml de lait écrémé à 0%, ensuite chaque flacons a étéensemencé par une culture overnight des deux souches (v/100v c'est-à-dire 1ml/100ml).

Ensuite incubés a 37°C, à un intervalle du temps 2h, 6h et 24h.

L'acidité est dosée par titration de 10ml du lait avec une solution de NaOH (N/9) en présence de quelques gouttes de phénolphaléine, jusqu'au virage de la couler au rose pale persistant au moins 10 secondes (Larpen, 1997).

L'acidité est déterminée par la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

Où = V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait, et 1°D correspond à 0,1g d'acide lactique par litre de lait.

La mesure de pH est faite directement par le pH-mètre, en plongeant l'électrode dans le volume du lait. Le pH et l'acidité ont été mesurés 3 fois de chaque prise.

4.2. Résistance à l'acidité gastrique :

La méthode décrite par Hydrominus *et al.* (2000) a été appliquée, les souches ont été revivifiées en triplé.

Après la centrifugation des cultures overnight à 13000 tour/4min, les culots bactériens ont été suspendus dans 10ml du bouillon MRS ajusté à différentes valeurs de pH (2,5 ; 4,5 ; 6,5), où les tubesensemencés à pH=6,5 représentent les cultures témoins.

La croissance a été déterminée par la densité optique à 660nm et par le dénombrement des cellules viables par les dilutions en cascade. La densité optique et le dénombrement des cellules viables ont été déterminés à temps zéro heure (T₀) et temps trois heures (T_{3h}) après incubation à 37°C.

Le taux de survie est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log\text{UFC à T3h} / \log\text{UFC à T0h} \times 100$$

4.3. Résistance aux sels biliaires :

Pour déterminer l'aptitude des souches à résister à la bile, le travail a été réalisé selon la technique décrite par Hydrominus *et al.* (2000), où les cultures ont été revivifiées en trois exemplaires.

Le culot bactérien des cultures jeunes a été récupéré après centrifugation à 13000 rpm/4min, puis les cellules sont suspendues dans 10ml du bouillon MRS à 0,3 %, 0,5% et 1% ajustés à différentes valeurs de pH (2,5 ; 6,5).

La croissance a été déterminée par la mesure de la densité optique à 660nm et par le dénombrement des cellules viables par les dilutions en cascade.

La densité optique et le dénombrement des cellules viables ont été déterminés à temps zéro heure (T₀) et temps trois heures (T_{3h}) après incubation à 37°C.

Le taux de survie est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log\text{UFC à T3h} / \log\text{UFC à T0h} \times 100$$

4.4. Résistance aux antibiotiques :

Pour l'étude de la résistance aux antibiotiques, la méthode d'antibiogramme a été appliquée.

Les deux souches ont étéensemencées sur la surface du milieu MRS à l'aide d'un écouvillon.

Après séchage des boîtes à température ambiante, les disques ont été déposés sur la surface des boîtes : Amoxicilline (AML 30), Carbenicilline (CAR 100), Ampicilline (AMP 10), Cephalothine (KF 30), Acide nalidixique (NA 30), Néomycine (N 30), Amoxicilline + acide clavulanique (AUG 30µg),

Les boites ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (Leroy *et al.*, 2007).

Résultats et discussion

1. Vérification de la pureté des souches :

1.1. Examen macroscopique :

La caractérisation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, contour, aspect).

Les colonies sont de petite taille, de forme ronde, de couleur blanche à crème, avec une surface lisse et un pourtour régulier.

1.2. Examen microscopique :

L'observation microscopique a révélé que nos souches sont des cellules Gram positif,

La souche lactique BL8 se présente comme des cellules à bâtonnet, isolés ou regroupés en paire (figure 4).

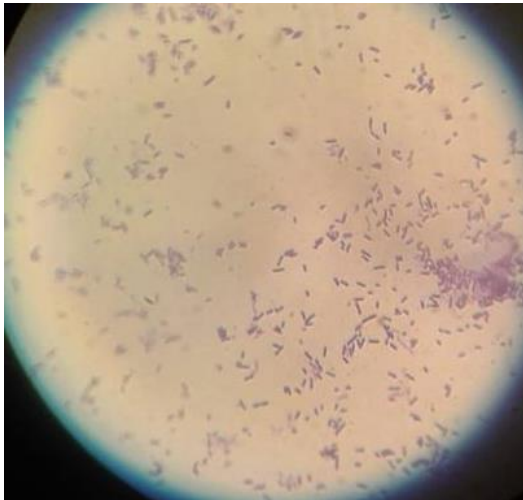


Figure 4 : Observation microscopique de BL8

La souche M5 se présente comme des cellules bien arrondies regroupé en tétrade (figure 5).

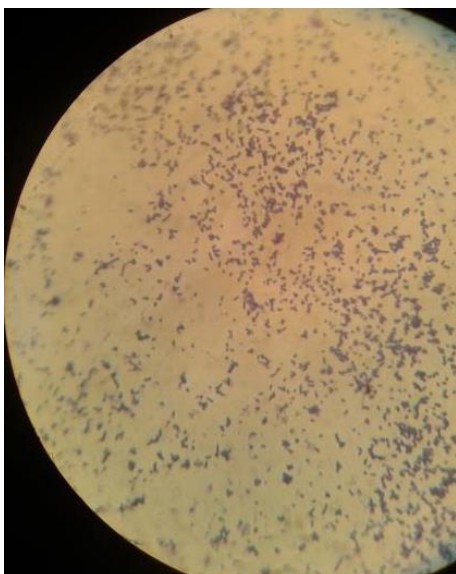


Figure 5 : Observation microscopique de M5

2. Pouvoir acidifiant :

La cinétique d'acidification étudiée chez les souches lactiques BL8 et M5 sont illustrées dans la figure 6.

Les résultats représentent les moyennes de trois essais qui dévoilent un abaissement progressif de pH contre une augmentation de l'acidité.

Pour la souche lactique BL8, l'évolution du pH a commencé à un pH de 6.7, en parallèle, la quantité initiale de l'acide lactique était de 1,5g/l. Après 24h d'incubation, la valeur de pH a diminué jusqu'à 6.44 alors que la quantité d'acide lactique tend à augmenter jusqu'à 6,3g/l.

L'évolution de l'acidité de la souche lactique M5 a commencé à un pH de 6,74 et une quantité initiale d'acide lactique de 1,6g/l. après 24h d'incubation, le pH a baissé à 5,01 et la quantité de l'acide lactique a augmenté jusqu'à 8,2g/l.

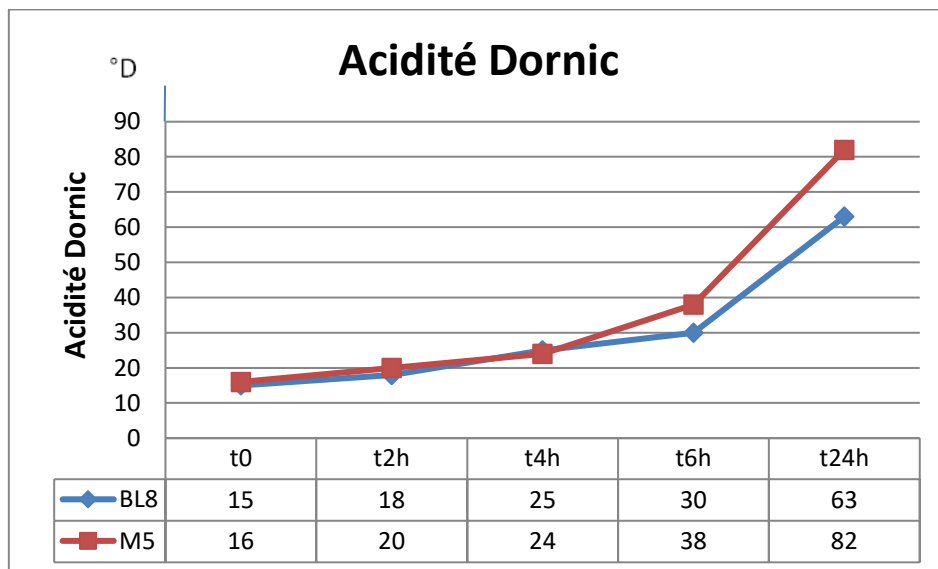


Figure 6 : Evolution de l'acidité en fonction de temps par BL8 et M5

L'acidification du lait est essentiellement due la production de l'acide lactique qui varie selon les souches (Larpen, 1987).

Les deux courbes d'évaluation de l'acidité produite au cours de la fermentation du lait par les cultures pure (M5 et BL8) indiquent que l'acidification est plus rapide chez la souche M5 que chez celle de BL8.

Le degré d'acidification varie légèrement d'une souche à l'autre en fonction du temps, ce qui a été accordé par Chougrani *et al.*, (2007) que l'acidification peut varier d'une souche à l'autre du même genre.

Il existe une relation étroite entre le pH et l'acidité, en effet au fur et à mesure que la quantité d'acide lactique produite augmente, le pH diminue. Les travaux de Chamba *et al.*,

(1989) ont rapportés que la pouvoir acidifiant diminue en fonction du temps, ce qui confirme nos résultats obtenus

2. Résistance à l'acidité :

Les bactéries lactiques probiotiques doivent pouvoir survivre en grand nombre au passage du tractus digestif, ce qui implique une résistance élevée à l'acidité gastrique et aux sels biliaires (Bölts *et al.*, 2007).

La résistance à l'acidité gastrique des souches probiotiques a été évalué (figure 7). Pour cette expérience les bactéries lactiques ont été incubées dans un milieu MRS avec des conditions de pH similaires à celles de l'estomac.

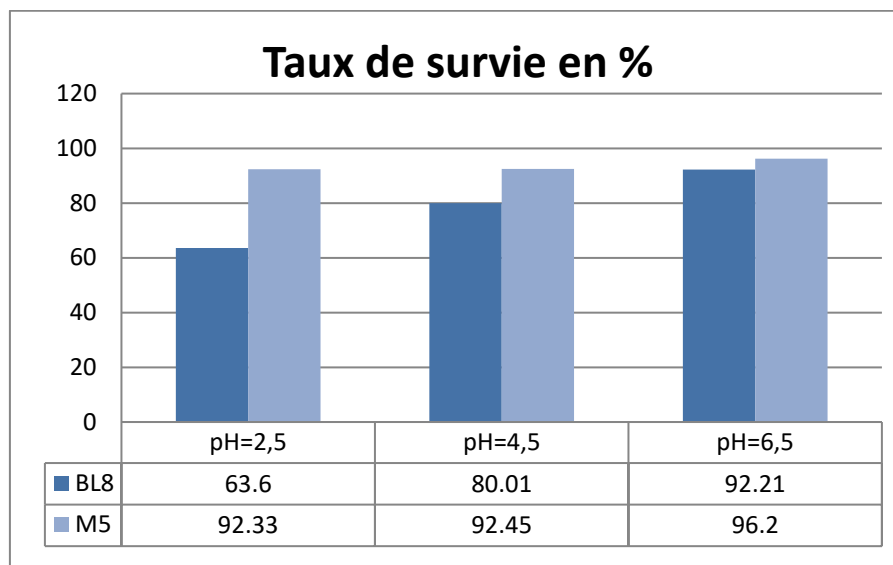


Figure 7 : la résistance à l'acidité

Les résultats démontrent une diminution de résistance des souches avec la diminution de pH du milieu. La BL8 a marqué la valeur minimale de 63,6% à pH=2,5, tandis que la M5 était à 92,33% dans le même pH. A pH=4,5 le taux de survie a augmenté jusqu'à 80,01 pour la BL8 c'est-à-dire une augmentation de 16,41%, et 92,45 pour la M5 avec 0,12% de plus. A pH =6,5 le taux de survie a augmenté avec un maximum de 96,2% pour la M5, et 92,21 pour la BL8.

Les bactéries lactiques probiotiques doivent pouvoir survivre en grand nombre au passage de l'estomac et du duodénum, ce qui implique une résistance élevée à l'acidité gastrique et aux sels biliaires (Bölts *et al.*, 2007).

Selon les études de Jesica Blajman *et al.*, (2015), un pH bas inhibe la croissance de toute les souches lactiques. Contrairement, Pereira *et al.*, (2003), qui ont démontré que les souches lactiques, y compris les lactobacilles peuvent montrer une tolérance a des pH comprises entre 2 et 3, ce qui confirme nos résultats obtenus.

D'après les études de Mathieu Millette *et al.*, (2007), les *Pediococcus* sont plus résistantes à l'acidité gastrique que les espèces du genre *Lactobacillus*. Ceci confirme nos résultats de la résistance de la souche M5 dont le taux de survie est de 96,2%.

3. Résistance aux sels biliaires :

Le taux de sécrétion et la concentration de la bile dans les différentes régions de l'intestin varie en fonction du type d'aliment consommé. Les concentrations biliaires dans l'intestin sont entre 0,5 à 2% pendant la première heure de digestion (Davenport, 1968)

Les figures 8, 9, 10 et 11 montrent la résistance aux sels biliaires des deux souches étudiées (M5 et BL8).

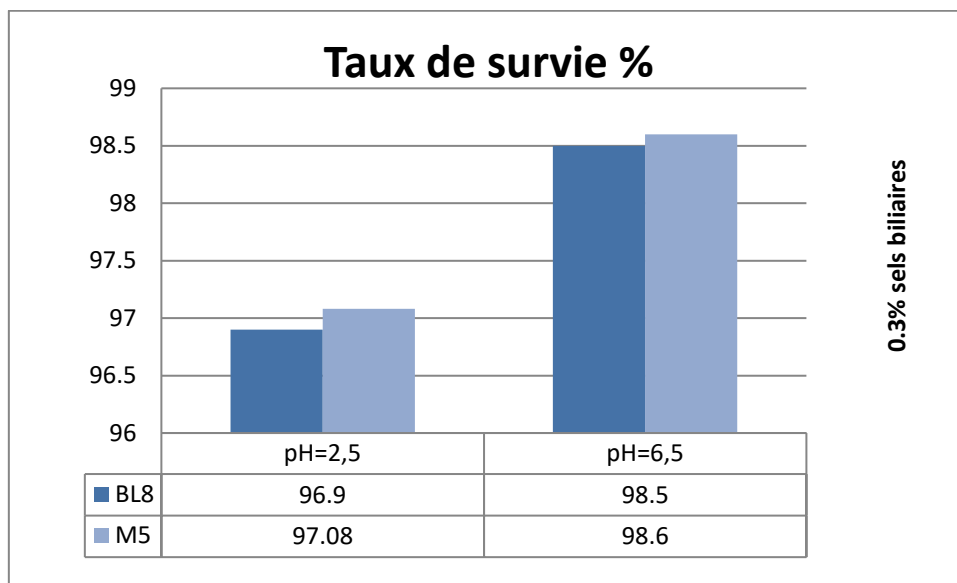


Figure 8 : Résistance de M5 et BL8 à 0,3% sels biliaires

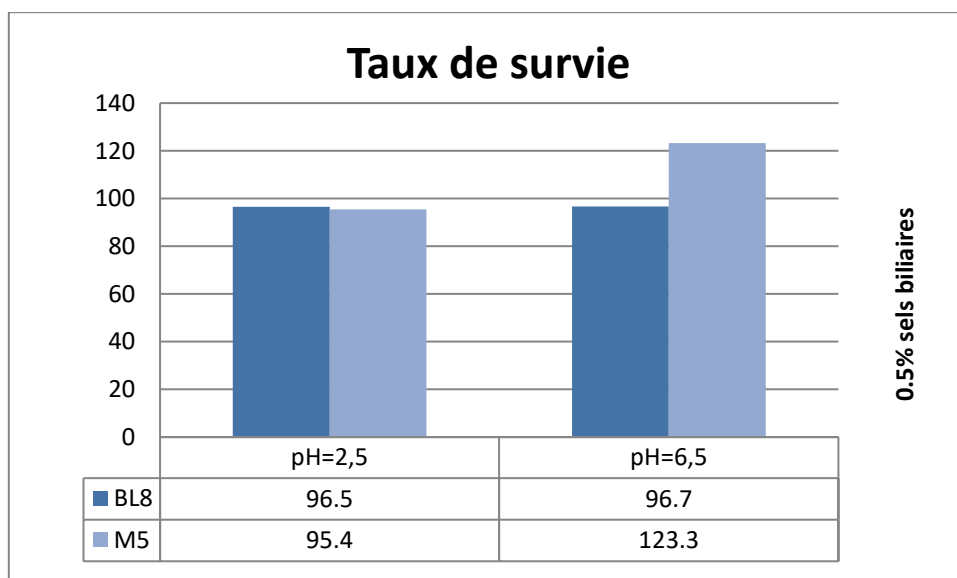


Figure 9 : Résistance de M5 et BL8 à 0,5% sels biliaires

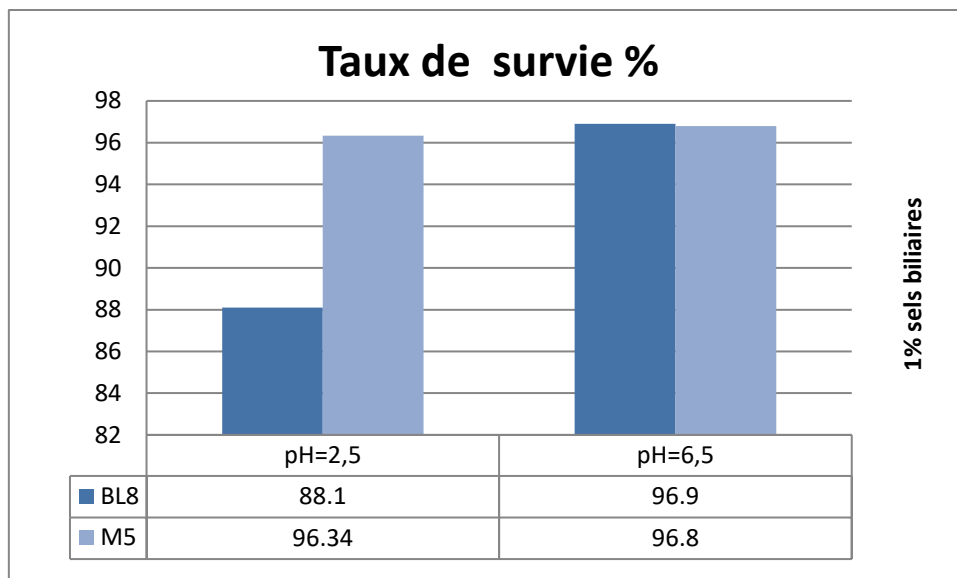


Figure 10 : Résistance de M5 et BL8 à 1% sels biliaries

A 0,3% de sels biliaries, nous avons remarqué une légère diminution de la résistance qui a touché les deux souches, à pH=2,5 les pourcentages de survie de la souche BL8 et M5 ont été proches avec des valeurs de 96,9% et 97,08% respectivement. A pH=6,5 la résistance des deux souches a augmentée avec 1,6% pour la BL8 et 1,52% pour la M5.

A 0,5% de sels biliaries, les souches ont enregistré une augmentation de résistance, notamment à pH=6,5 la M5 a enregistré la valeur la plus forte qui est de 123,3% c'est-à-dire que les cellules initiales ont augmentés avec un pourcentage de 23,3%. On remarque ainsi une augmentation des taux de survie par rapport aux pH testés.

A 1% de sels biliaries, les valeurs ont baissés par rapport aux pourcentages de sels biliaries précédents, avec une valeur minimale chez la BL8 de 88,1% à pH=2,5, et une valeur maximale chez la BL8 de 96,9% à pH=6,5.

La capacité des lactobacilles de croître dans des pourcentages élevés de sels biliaries (supérieur à 0,3%) est due à une activité exo-hydrolasique, leur permet de résister à l'action détergentes des sels biliaries en les transformant en dérivés inoffensifs (Roy, 2006), explique la résistance remarquable de la souche *Lactobacillus*.

Selon les travaux de Sanchez *et al.* (2005), le stress biliaire n'a pas influencé sur la viabilité de *Pediococcus*, Ou les bactéries possèdent une activité qui hydrolyse les sels biliaries (Turpin *et al.*, 2011).

4. Résistance aux antibiotiques:

	AML 30	CAR 100	AMP 10	KF 30	NA 30	N 30	AUG 30
BL8	S	R	R	R	S	I	R
M5	S	I	R	S	S	R	R

Tableau 8 : Résultats de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques.

R : résistante, I : intermédiaire, S : sensibles

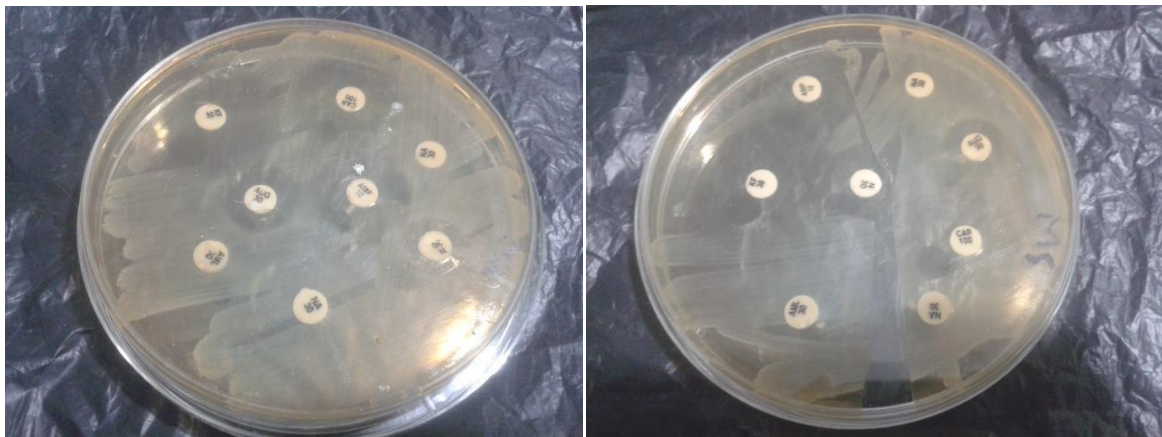


Figure 11 : antibiogramme BL8 et M5

Les études de Coppola *et al.* (2005), ont constatés que les souches de *Lactobacillus* sont résistantes à la vancomycine, qui était due à la présence de D-Ala-D-lactate dans leur peptidoglycane au lieu du dipeptide D-Ala-D-Ala normal, qui est la cible de l'antibiotique.

Les profils de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Lactobacillus* ont été révélées par de nombreux chercheurs (Zoumpopoulou *et al.*, 2008). Cependant, notre étude nous a indiquée, que la souche lactobacille a un pouvoir résistance contre les antibiotiques suivant : CAR 100, KF30 et AUG 30, tandis qu'elle est sensible envers : AMP 10, KF 30 et NA 30.

D'après Tankovic *et al* et Golledge *et al* les *pediococcus* sont pour la plupart sensibles à la pénicilline, contrairement à notre étude qui a démontrée que la souche M5 (Pediocoque) est résistante à la pénicilline. Elle a marquée une résistance aux : Ampicilline, Néomycine et Amoxicilline + acide clavulanique, tandis qu'elle a montré une résistance intermédiaire à la Carbenicilline, et une sensibilité aux : Amoxicilline, Cephalothine et Acide nalidixique.

Conclusion

Les probiotiques ont été définis comme des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte (FAO, 2002). Cette définition est assez générale, elle ne présume pas la nature de l'effet bénéfique. Dans la majorité des cas, il existe un lien direct entre les effets bénéfiques et la viabilité des bactéries probiotiques tout au long du tractus digestif.

Deux souches à potentiel probiotiques isolées à partir du Hamoum ont fait l'objet de notre étude.

L'étude du pouvoir acidifiant, nous a permis d'évaluer l'importance technologique de nos deux souches. D'après les résultats, nous pouvons déduire qu'il y a une différence entre les deux souches dans l'activité acidifiante.

Les valeurs des pH et des quantités d'acide lactique produites, nous ont permis de constater que la souche M5 (*Pediococcus*) a montré un bon pouvoir acidifiant par rapport à la souche BL8 (*Lactobacillus*).

L'évaluation *in vitro* de nos souches lactiques, a montré qu'elles peuvent survivre le long du tractus digestif. La souche M5 a pu résister aux pH acides, ainsi qu'à différentes concentrations de sels biliaires ajustés à des différents pH. Elle a pu résister à quelques antibiotiques, ceci conclut les bonnes aptitudes probiotiques de la souche.

La souche BL8 a montré une résistance faible par rapport à la M5, mais les résultats globaux suggèrent que nos deux souches semblent posséder un potentiel probiotique.

Enfin, en perspective d'avenir, nous espérons vivement d'approfondir les données concernant les deux souches BL8 et M5 par :

- ✓ Elargir l'étude de résistance aux stress gastro-intestinal
- ✓ Poursuivre l'étude d'antibio-résistance par des techniques de la génétique
- ✓ Approfondir l'étude probiotique par une étude *in vivo* à fin d'identifier l'effet bénéfique exercé, et faire la relation avec les effets bénéfiques du Hamoum afin de promouvoir les bienfaits de ce type de blé
- ✓ Et enfin d'utiliser ces souches dans le domaine pharmaceutique.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques :

Abee T., Krockel L., Hill C., 1995 - Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J. Food. Microbiol* : 28: pp 169- 85.

Ait-Belgnaoui A., lamine F., han W., eutamene H., fioramonti J., bueno L. ET theodorou V., 2005. A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct.* 3 : 59-63.

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.

Ammor MS, Belen Florez A, Mayo B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 2007;24:559–570. doi: 10.1016/j.fm.2006.11.001.

Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E., Isabelle Chevallier, I. (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *food microbiology*, 22 : 373-382.

Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Coccagn- Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M., 2008. Métabolisme et ingénierie métabolique. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 271-447.

Atrih A. et Foorste S J., 2001 - Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance proprieties and demonstration of its conservation amongst species'. *Appl. Microbiol*: 91: pp 364-372.

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. 1-66.

Bouix D. et Leveau J.Y., 1980. Les levures : Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, le contrôle microbiologique. *Col. Sci. Tech. Agro. Ali.* 2 : 159-161.

Branger A., Richer M.M. et Roustel S., 2007. *Microbiochimie et alimentation*. Educagri Edition. 166-168.

Broadbent J.R., 2001. Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.). 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 243-300.

Chougrani, F., A. Cheriguene, and A Bensoltane (2007). Identification and some technological properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian ewe's milk. *Egypt. J. Appl. Sci.* 21(8)-148-157.-91.

Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. et Wallbanks S., 1993. Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* (75) : 595-603.

Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. et Wallbanks S., 1993. Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* (75) : 595-603.

Coppola R, Succi M, Tremonte P, Reale A, et al. Antibiotic susceptibility of *L. rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait.* 2005;85:193–204. doi: 10.1051/lait:2005007

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

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

Desmazeaud M., 1998. Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. de recherches laitières INRA. 1-3.

Desmazeaud M., 1998. Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. de recherches laitières INRA. 1-3.

Drasar B.S. and Barrow P. Intestinal microecology. Van Nostrand reinhold, Workingham 1985.

Drasar B.S. Some factors associated with geographical variations in the intestinal microflora. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 1974;3:187-96.

Facklam R, Elliott J A. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding streptococci and enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:479–495.

FAO et OMS, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in Food

Federighi M., 2005 - Bactériologie alimentaire compendium d'hygiène des aliments. 2 ed. Economica. Paris: pp 224-233

Finegold S., Suttler V. and Mathison G. Normal indigenous intestinal microflora. In: Hentges DJ, ed. Human intestinal microflora in health and disease. Academic Press, New-York. **1983**.

Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol **1989**;66:365-78.

Gbassi K.G., Vandamme T., Yolou S.F. et Marchioni E., 2011. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. Int. Dairy J. 21 : 97-102.

Guiraud J.P. et Rosec J.P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237-251.

Haddie J.M., 1986. Other streptococci. In : Bergey's manual of systematic bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). 1 : 1070.

Hassan A.N. et Frank J.F., 2001. Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.

Ho T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. et Caubet R., 2007. Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology. 134-142

Hydrominus 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.

Khalid N.M. et Marth E.H., 1990. Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. Rev. Dairy Sci. 73 : 158-167.

Khan S H. and Ansari F A., 2007 – Probiotics: The friendly bacteria with market potential in global market. Pak. J. Pharm. Sci. Vol: 20(1): 76-82.

Klaenhammer T R., Azcarate-Peril M A., Altermann E. and Barrangou R., 2007 – The influence of dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. The Journal of Nutrition Effects of Probiotics and Prebiotics: 137: 748S-750S.

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 Canada. 23-47.

Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., et Gobbetti M., 2000 - Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. Appl. Environ. Microbiol: 66: pp 4084 - 4090.

Leclerc H., Gaillard F L. et Simonet M., 1994. Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. DOIN. Paris. 445.

Leroy F. et De Vuyst L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Tre.FoodSci. Technol. 15 : 67-78.

Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B., 1991. La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. 2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3 : 2-40.

Marteau P., Flourie B., Pochart P., Chastang C., Desjeux J.F., Rambaud J.C. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an *in vivo* study in lactase-deficient humans. *Br J Nutr* **1990**;64:71-9.

Mastro T D, Spika J S, Lozano P, Appel J, Facklam R R. Vancomycin-resistant *Pediococcus acidilactici*: nine cases of bacteremia. *J Infect Dis.* **1990**;161:956–960.

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

MILLETTE, MATHIEU (2007). Étude de bactéries lactiques à potentiel probiotique et de leurs métabolites Thèse. Québec, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique, Doctorat en biologie, 258 p.

Nista EC, Candelli M, Cremonini F, et al. *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:1181–8.

Nykanen A., Lapvetainen A., Hietanen R M. and Kallio H., 1999 - Applicability of lactic acid and nisin to improve the microbiological quality of cold-smoked rainbow trout. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.A* .Vol: 208(2): pp 116-120.

Percival M., 1997. Choosing a probiotic supplement. *Clin. Nutr. Insights.* 6(1): 95-100.

Pilet M.F., Magras C., Federigh M., 2005. Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.

Pot B., 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.1-106.

Pot B., Devriese L.A., Uris D., Vandamme P., Haesebrouck F. et Kersters K., 1996. Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst. Appl. Microbiol.* 19 : 213-222.

Raynaud S., Perrin R., Coccagn-Bousquet M. et Loubière P., 2003. Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis subsp. lactis* biovar diacetylactis in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *App. Env. Microbiol.* 71(12) : 8016- 8023.

Rodgers S., 2001 - Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. *Trends in Food Science and Technology*: 12: pp 276-284.

Rogers L A., 1928 - The inhibiting effect of *Streptococcus thermophilus* and on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 5: pp 161-168. *Brrlgariczw. J. Bacteriol.* 5: pp 161-168.

Rogers L A., et E O Whittier., 1928 - Limiting factors in lactic fermentation. J.Bacteriol: 16: pp 211-214.

Rokka S. et Rantamaki P., 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. Eur. Food Res. Technol. 213 : 1-12.

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

Salminen S., Wright A V., Ouwehand A., 2004 - Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel. Dekker. Inc., U.S.A.

Salminen S., Wright A V., Ouwehand A., 2004 - Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel. Dekker. Inc., U.S.A.

Savage D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annu Rev Microbiol **1977**;31:107-33.

Schiffrin E.J., Brassart D., Servin A.L., Rochat F., Donnet-Hughes A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. Am J Clin Nutr **1997**;66:515S-520S.

Sire J M, Donnio P Y, Mensard R, Pouedras P, Avril J L. Septicemia and hepatic abscess caused by *Pediococcus acidilactici*. Eur J Clin Microbiol Infect. **1992**;11:623–625.

Stiles M.E. et Holzapfel W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36 : 1-29.

Tamime A.Y., 2002. Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.

Tannock G.W. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. Antonie Van Leeuwenhoek **1999**;76:265-78.

Temmerman R., Pot B., Huys G. et Swings J., 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. Int. J. Food Microbiol. 81 : 1-10.

Thompson J., Gentry-Weeks C.R., 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). Lorica, Uriage. 1 : 239-290.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Keresters K. et Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. Microbiol. Rev. 60 : 407.

Zoumpopoulou G, Foligne B, Christodoulou K, Grangette C, Pot B, Tsakalidou E. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and salmonella infection in murine models. Int J Food Microbiol. **2008**;121:18–26. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.013.

Annexes

Annexe I : Milieu de culture**➤ Milieu MRS solide (milieu de de Man, Rogosa et Sharpe, de Man *et al*, 1960)**

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.5g
Agar	15g
Eau distillée	1l

Le pH a été ajusté à $6,5 \pm 0,2$

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

➤ Milieu MRS liquide

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.5g

Les pH ont été ajusté à 2,5 ; 4,5 et 6,5±0,2

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

➤ **Composition des diluants**

Eau peptonée :

Peptone	1g
NaCl	8,5g

Le pH a été ajusté à 6,5±0,2

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

➤ **Coloration de Gram**

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- ✓ Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- ✓ Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- ✓ Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- ✓ Décolorer avec de l'alcool, puis rincer à l'eau ;
- ✓ Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- ✓ Laver à l'eau ;
- ✓ Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.