

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 و الحياة

DEPARTEMENT DE DE SCIENCE ALIMENTAIRE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mehaddi Dalila

Belkediem Aicha

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Nutrition et pathologie.

THÈME

**Etude in-vitro l'effet des enzymes digestives sur la survie
des lactobacilles isolé du lait de vache**

Soutenue publiquement le 11/9/2019

DEVANT LE JURY

Président	Pr .RIAZI ALI	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur	Mme KOUADRI BOUDJELTHIA NACIMA	MAA	U. Mostaganem
Examineurs	Dr. YAHLA IMENE	MCB	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 :

Pr.Riazi, merci monsieur de nous avoir fait l'honneur de présider ce

Jury, et un grand merci pour votre disponibilité.

Dr. Yahla, 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**

Nos remerciements s'adressent aussi à nos Parents, et nos familles Pour leur présence et leur

soutien moral. A vous tous, un grand Merci

Dédicace

C'est avec immense fierté et respect que je dédie ce modeste travail:

A ceux qui donnent un sens à mon existence, A ma très chère **mère** et Mon très cher **père**

Je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

A mes très chères sœurs : **Mehdia** et **Hakima, Asma.**

A mon cher mari **yassine** :

Ton encouragement et ton soutien étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance. Merci d'être toujours à mes côtés, par ta présence, par ton amour dévoué et ta tendresse, pour donner du goût et du sens à notre vie de famille En témoignage de mon amour, de mon admiration et de ma grande affection, je te prie de trouver dans ce travail l'expression de mon estime et mon sincère attachement. Je prie dieu le tout puissant pour qu'il te donne bonheur et prospérité.

On pensant à mes chères amies : **aicha, Nour el hoda , karima, chaima, abire**

A tous ceux qui ont pris place dans mon cœur et à tous ceux qui m'ont aidé de Près ou de

loin

Dalila... 😊

Dédicaces

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 mon cher frère : **RABIE**

A mes chères sœurs : **BOUCHRA, IKRAM**

A mon binôme **Dalila**

A mes amies et mes cousins **Khadîdja, Chaima, Abir, Nouria, keira,feriel.**

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

A toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à la réalisation de ce modeste
travail

Aicha

Sommaire

Introduction	01
---------------------------	----

Partie 1 : Rappel bibliographique

I.	Bactérie lactique et potentiels probiotique	02
I.1.	Généralité.....	02
I.2.	Propriété et caractéristiques des probiotique	04
I.3.	<i>Lactobacillus sp</i> comme bactérie probiotique.....	05
I.3.1.	Définition et caractéristique générale de lactobacillus.....	05
I.3.2.	Caractères morphologiques cultureux et exigences nutritionnelles des lactobacilles	06
I.3.3.	Caractère biochimique.....	07
I.3.4.	Rôle bénéfique de lactobacilles probiotique.....	08
I.4.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	09
I.4.1.	Caractère biochimique.....	09
I.4.2.	Aspect sécuritaire de <i>Lactobacillus plantarum</i>	10
I.4.3.	Survie de <i>L. Plantarum</i> aux conditions hostiles du tractus gastro-intestinal.....	10
I.4.4.	Allégation santé de lactobacillus <i>plantarum</i>	11
II.	La digestion enzymatique.....	13
II.1.	Définition.....	13
II.2.	Organisation général de tube digestif.....	13
II.2.1.	Les organes annexe du tube digestif.....	14
II.3.	Les enzymes digestives.....	16
II.3.1.	Alpha amylase.....	16
II.3.2.	Lysozyme.....	16
II.3.2.1.	Mécanismes d'action du lysozyme.....	17
II.3.3.	La digestion des protéines.....	17
II.3.3.1.	Les protéase.....	18

II.3.4.	Digestion des lipides.....	19
---------	----------------------------	----

Partie 2 : Matériel et Méthode

I.	Matériel utilisé.....	21
I.1.	L'origine des souches.....	21
I.2.	Produite et milieux de culture utilisé	21
I.3.	Verrerie et petite matériel utilisé	21
II.	Méthode.....	22
II.1.	Réactivation des souches.....	22
II.2.	Contrôle de la viabilité des souches.....	22
II.2.1.	Examen macroscopique.....	22
II.2.2.	Examen microscopique.....	22
II.2.3.	Recherche de catalase.....	23
II.2.4.	Vérification de l'identité des souches par spectrométrie de masse Maldi-Tof..	23
II.2.4.1.	Principe de la technique.....	23
II.3.	La résistance aux enzymes digestives.....	24
II.3.1.	Teste de résistance à l'action enzymatique de l'alpha amylase salivaire.....	24
II.3.2.	Teste de résistance à l'action du Lysozyme.....	25
II.3.3.	Teste de résistance à l'action l'amylase pancréatique.....	25
II.3.4.	Teste de résistance à l'action de la Trypsine.....	25
II.3.5.	Teste de résistance à l'action de la pancréatine.....	26

Partie 3 : Résultats et discussion

I.	Confirmation de la pureté et l'identité des souches de lactobacilles utilisées..	27
I.1.	Caractère macroscopique.....	27
I.2.	Caractéristique microscopique et test catalase.....	27
I.3.	Identification MALDI-TOF.....	29
II.	Survie des souches aux enzymes digestives.....	30
II.1.	L'effet de l'±-amylase salivaire et pancréatique.....	33

II.2.	L'effet du Lysozyme sur la survie des souches lactiques.....	32
II.3.	L'effet de la Trypsine.....	34
II.4.	L'effet de la Pancréatine.....	36
Conclusion		37
Références bibliographiques		39
Annexe		

Liste des tableaux :

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	caractéristiques de bactéries lactiques au niveau du genre basées sur la morphologie et physiologie.	3
Tableau 2	Exemple de souches probiotiques disponibles sur le marché international.	3
Tableau3	classification des groupes des lactobacillus.	5
Tableau 4	Importance in vitro de <i>Lactobacillus plantarum</i> probiotique en relation avec le domaine médical.	12
Tableau 5	Spécificité des protéases.	18
Tableau6	les souches lactiques utilisées	21
Tableau7	Interprétation standards des valeurs des scores obtenus par le logiciel du MALDI-TOF.	24
Tableau8	Caractéristiques culturaux des souches lactiques utilisées.	28
Tableau9	Résultats d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF des souches lactiques.	29

Liste des Figures

Figure	Titre	Page
Figure1	Observation en microscopie électronique, ($\times 7000$) de <i>Lactobacillus casei</i> .	6
Figure2	Schéma succinct des principales voies métaboliques des lactobacilles.	8
Figure3	Structure du PG et site de clivage du lysozyme.	17
Figure4	Réaction d'hydrolyse complète de triglycérides (TG) par une lipase non-sélective dans un milieu aqueux.	20
Figure5	Aspect macroscopique de la souche lactique LbN12 isolée à partir de lait de vache sur milieu MRS à 37°C pendant 24h.	27
Figure6	Observation microscopique ($\times 100$) de la souche lactique <i>LbN14</i> après coloration de Gram.	28
Figure7	Taux de servie des souches sous l'action de l'alpha amylase salivaire après (30 min d'exposition).	31
Figure8	Taux de servie des souches sous l'action de l'alpha amylase salivaire après (2h d'exposition).	32
Figure9	Taux de servie des souches sous l'action de l'alpha amylase salivaire après (180 min d'exposition).	32
Figure10	Taux de servie des souches en présence de lysozyme (100mg/ml) (pendant 30min et 2h d'exposition).	34
Figure11	taux de servie des souches en présence de trypsine (pendant 30min et 4h d'exposition).	35
Figure12	taux de servie des souches en présence de pancréatine (pendant 5hd'exposition).	36

Liste des abréviations

ADNr	Acide Désoxyribonucléique Ribosomique.
AG	Acide Gras
AGCM	Acide Gras à Chaîne Moyenne.
AGCL	Acide Gras à Chaîne Longue.
C °	Degré Celsius.
DG	Diacylglycérol.
FAO	Food and Agriculture Organisation.
g	Gramme.
h	Heure.
Lb	Lactobacillus.
Log	Logarithme.
MG	Monoacylglycérol.
TG	Triglycéride.
ml	Millilitre.
MRS	Man, Rogosa et Sharp.
NAM	N-acétyl-muramique.
NAG	N-acétyl-glucosamique.
OMS	Organisation Mondiale de la Santé.
PBS	Phosphate buffered saline.
pH	Potentiel Hydrogène.
PG	Peptidoglycane.
sp	Sous espèce.
T	Temps.
UFC	Unité Formant Une Colonie.
UFC/g	UFC par gramme.
UFC/ml	UFC par Millilitre.
µl	Microlitre.

Introduction

INTRODUCTION:

Les produits laitiers fermentés ou non sont connus pour être de bons vecteurs de probiotiques notamment en raison de leur large consommation. Il a ainsi été suggéré que la prise quotidienne de probiotiques doit être comprise entre 10^8 et 10^9 unités formant colonie (UFC) pour avoir un effet. Cependant, en Algérie, un intérêt particulier s'est développé au tour des bactéries lactiques locales à potentiel probiotique, dont assez de travaux sur ces bactéries des laits crus, ont été publiés (**Guessas et Kihal,2004 ; Badis et al.,2005 ; Idoui,2008; Bruno Ebel.,2012; Benregui Mokhtar.,2015**).

Les probiotiques sont définis comme « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, confèrent des effets bénéfiques pour l'hôte » (**FAO/OMS, 2001**). Ce sont majoritairement des bifidobactéries ou des lactobacilles, qui en agroalimentaire, sont à l'origine des processus de transformation conditionnant la texture et les qualités des produits alimentaires fermentés (lait fermentée, beurre, olive, choucroute, différents types de fromage, dans certain cas de charcuteries et dans l'ensilage) (**Ganzele et al., 2000 ; Delgado et al., 2001 ; Tailleux, 2001; Forsythe and Bienenstock 2010**)

Cependant, les microorganismes probiotiques étant administrées vivantes par voie orale, doivent obligatoirement franchir les obstacles majeurs du transit digestif pour être efficace. Elles doivent donc résister aux enzymes digestives présentes dans la cavité buccale dont les principales enzymes sont l'alpha amylase salivaire et le lysozyme, ensuite au pH acide de l'estomac en présence de la pepsine, aux sucs pancréatiques, aux protéases et aux concentrations de bile présentes dans l'intestin grêle (**Percival., 1997; Malinen., 2002 ; Chafai sihem.,2006**).

C'est dans cette optique que s'inscrit notre modeste travail, qui vise à mettre en évidence in vitro, la viabilité de souches de *lactobacillus plantarum* en présence de différentes enzymes digestives selon les différents compartiments du tractus gastro-intestinale simulées.

L'étude est divisé en trois parties principales, la première consacré aux rappelle bibliographique, la deuxième partie expérimentale où en premier lieu, les souches ont fait l'objet d'un contrôle de pureté et d'identité par la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ensuite, chaque effet d'enzyme a été évalué séparément à savoir; l'effet de L'alpha amylase salivaire et pancréatique, l'effet du lysozyme, et de la Trypsine, et enfin, l'effet combiné de la Pancréatine à été déterminer. La troisième partie consacrée à l'exploitation des résultats et la discussion.

Rappels

bibliographique

I. Bactéries lactiques et Potentiel probiotique:

I.1.Généralités:

Ces derniers temps un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation des bactéries lactiques ayant des effets probiotiques et pharmaceutiques à travers le monde (**Wunwissa et al.,2003**). En Algérie, un intérêt particulier a été donné aux bactéries lactiques locales, dont assez de travaux sur ces bactéries des laits crus, ont été publiés (**Guessas et Kihal,2004 ; Badis et al.,2005 ; Idoui,2008; Benreguiég Mokhtar.,2015**).

Les bactéries lactiques sont anaérobies facultatives à Gram positif, incluant des Genres très hétérogène. Ce sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont Gram +, généralement immobiles, et 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**), selon le produit finale de la fermentation lactique elles sont dites homo-fermentative, produisant principalement de l'acide lactique, et hétéro-fermentative qui en plus de l'acide lactique, produisent une grande variété de produits de fermentation tels que l'acide acétique, éthanol, dioxyde de carbone et acide formique (**Kleerebezem et Hugenholtz 2003**).Elles sont capables de se développer dans une large gamme de températures, de concentrations en sel (NaCl) et de pH (**Tableau 1**), (**Doyle et Mena., 2006**).

Les probiotiques sont définis comme « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, confèrent des effets bénéfiques pour l'hôte » (**FAO/OMS, 2001**).La majorité des bactéries probiotiques aujourd'hui sur le marché international, sont majoritairement des bactéries lactiques (BL) et plus particulièrement des bifidobactéries ou des lactobacilles (**Forsythe et Bienenstock 2010; Bron, van Baarlen et al. 2011**).ainsi que d'autres souches bactériennes sont commercialisées (**Tableau 2**). Si les bactéries lactiques possèdent généralement le statut « Generally Recognized As Safe » (GRAS) ; pour les souches bactériennes n'appartenant pas à ce groupe, il est important de vérifier ce statut, puisque le produit probiotique doit présenter une parfaite innocuité pour le consommateur et l'environnement.

Aussi ,un probiotique doit être capable de survivre dans le produit final (matrice humide ou sèche) ainsi que dans le TD de sorte à délivrer son effet bénéfique dans l'intestin grêle et dans le côlon ,c'est pourquoi la souche devrait présenter une bonne activité et viabilité aux

conditions gastro-intestinales ainsi qu'une bonne résistance aux procédés de congélation et lyophilisation (Kechaoui Nora., 2012).

Tableau 1: caractéristiques de bactéries lactiques au niveau du genre basées sur la morphologie et physiologie (Doyle and Mena., 2006)

Type de Bactéries/Caractéristiques	Lactobacillus	Lactococcus	Streptococcus	Pediococcus	Enterococcus	Leucostoc
CO2 glucose	Homo/hétéro	hétéro	hétéro	hétéro	hétéro	Homo
Croissance à 10°C	+/-	+	-	+/-	+	+
Croissance à 45°C	+/-	+	-	+/-	+	
6,5%Nacl	+/-	+	-	+/-	+	+/-
PH 4,4	+/-	+	-	+/-	+	+/-
PH 9,6	+/-	+	-	-	+	-
Acidelactique	D, L ;DL	L	L	D, L ;DL	D,L ;DL	D

+ Positive, - négative, +/- les réponses varient selon les espèces.

(a) Test pour homo ou hétéro-fermentation du glucose : homo (homo-fermentation), hétéro (hétéro-fermentation); (b) Configuration de l'acide lactique produit par le glucose.

Tableau 2: Exemple de souches probiotiques disponibles sur le marché international (adapté de Kechaoui Nora., 2012).

	Dénomination	Exploitant
Lactobacilles	<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1	Nestlé, suisse
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GC	Valio Dairy, Finlande Danone, France
	<i>Lactobacillus casei</i> DN114-001	Probi, Suède
	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	Rhodia, USA
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Yakult, Japon
	<i>Lactobacillus casei</i> shirota	
Bifidobactérium	<i>Bifidobacterium breve</i> yakult	Yakult, Japon
	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173-010	Danone, France
	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12	Chr Hansen, USA
Saccharomyces	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Biocodex, France

I.2. Propriétés et caractéristiques des probiotiques:

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne, notamment des propriétés fonctionnelles, et technologiques. Cependant, l'aptitude de ces souches à être industrialisées n'est souvent vérifiée qu'après leur sélection sur les critères de fonctionnalité ; mais les souches les plus fonctionnelles ne sont pas forcément des souches industrialisables. Les études présentant à la fois l'aptitude des souches à résister aux conditions du tractus gastro-intestinal et aux conditions du procédé de fabrication sont également assez rares. (Saarela et al., (2000) , Bruno Ebel.,2014)

Toutefois, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques. Ainsi, la capacité de survie des probiotiques dans l'hôte après leur ingestion, dépend de leur résistance intrinsèque, des facteurs de l'hôte et du véhicule par lequel ils ont été ingérés (Marteau et Shanahan, 2003). Parmi les facteurs de l'hôte qui réduisent la survie des probiotiques, on cite principalement l'acide gastrique, l'oxygène, le potentiel redox, les sels biliaires, les autres sécrétions digestives (mucus, défensines) et l'interaction avec la flore endogène (Godward et al., 2000; Marteau et Shanahan, 2003). Compte tenu des tous ces facteurs, il est donc recommandé de consommer les probiotiques à des doses appropriées pour obtenir les effets bénéfiques escomptés (1×10^9 UFC/jour). (Bruno Ebel.,2014).

Afin qu'une souche bactérienne soit qualifiée de probiotique, elle doit avoir des caractéristiques précises pour atteindre l'intestin et pouvoir agir pleinement tout en étant sans risque pour l'hôte. Ces caractéristiques ont été établies par la FAO /WHO (2002) comme suite:

- ✓ Désignation du genre / espèce / souche par une identification phénotypiques et génotypiques
- ✓ Innocuité de la souche probiotique : Aucun effet secondaire indésirable : infections systémiques, activités métaboliques délétères, stimulation immunitaire excessive chez des personnes sensibles et transfert de gènes entre les espèces bactériennes probiotiques et celles de la flore intestinale.
- ✓ Réalisation de tests in vitro spécifiques à l'effet santé recherché. Exemple : résistance à l'acidité gastrique et aux acides biliaires, enzymes digestives, adhérence au mucus et/ou cellules épithéliales humaines, activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes, propriétés d'immuno-modulation, diminution des espèces réactives de l'oxygène,...

- ✓ Etudes in vivo et cliniques : l'étude clinique doit être menée en double aveugle, contre placebo, contrôlée et randomisée. Elle doit utiliser la version finale du produit vecteur du probiotique.

I.3. Les Lactobacilles comme bactéries probiotiques:

I.3.1. Définitions et caractéristiques générales des Lactobacilles:

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles constituent un genre important reconnu pour sa capacité fermentaire ainsi que pour ses bienfaits pour la santé et la nutrition humaine (**Kannahi et Viji.,2014**). Ils appartiennent au groupe des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae* (**De Vos et al.,2009**).

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques, découvert, il comprend actuellement, plus de 175 d'espèces reconnues qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême et qui sont classiquement divisées en trois groupes en fonction de leurs caractéristiques de fermentation: A) homo-fermentation obligatoire, B) hétéro-fermentative facultative et C) hétéro-fermentative obligatoire, (**Tableau 3**). De nombreux lactobacilles sont associés à des produits destinés à l'alimentation humaine et animale, principalement parce qu'ils contribuent à la conservation en raison de l'acidification, et également préservent des caractéristiques uniques de goût et de texture. (**Claesson et al., 2008 ; Corrieu et Luquet., 2008 ; Barinonet al., 2011**).

Tableau 3 : classification des groupes des lactobacillus (**Salminen et al. ; 1998**)

Caractères	Groupe I:Homo-fermentaires	Groupe II :Hétéro-fermentairesfacultatifs	Groupe III:Hétéro-fermentairesobligatoires
Fermentationpantoses	-	+	+
Glucose \rightleftharpoons CO ₂	-	-	+
Gluconete \rightleftharpoons CO ₂	-	+	+
FDP Aldolase	+	+	-
Phosphokatalase	-	+	+
Souches	<i>L.acidophilus</i> <i>L. debrueckii</i> <i>L. heverticus</i> <i>L. sulivurius</i>	<i>L .casei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. sake</i>	<i>L .brevis</i> <i>L .buchneri</i> <i>L .fermentum</i> <i>L. reuteri</i>

I.3.2. Caractères morphologiques,cultureux et exigences nutritionnelles des lactobacilles:

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulées et généralement non mobiles. Ils peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs ou très courts, épais ou fins, et l'association en chaînes des cellules est courante (De Vos *et al.*, 2009). La **figure 1** montre l'aspect microscopique d'une souche de lactobacilles observée par microscopie électronique.

Le milieu le plus adapté à leur culture est celui De Man, Rogosa et Sharpe (MRS). Sur MRS gélosé, les colonies se développent en 24 à 48 heures. Elles sont généralement petites, incolores, blanchâtres ou jaunâtres, lisses ou rugueuses, arrondies ou lenticulaires (De Vos *et al.*,2009).Les lactobacilles sont caractérisés par des exigences nutritionnelles nombreuses; en plus de la source de carbone et d'azote, toutes les espèces ont un besoin absolu en vitamines telles que la vitamine (B5), la niacine (B3) et en cobalamine (B12), et les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} ou Fe^{2+} sont aussi nécessaires pour la croissance des lactobacilles (De Man *et al.*,1960; De Vos *et al.*,2009)

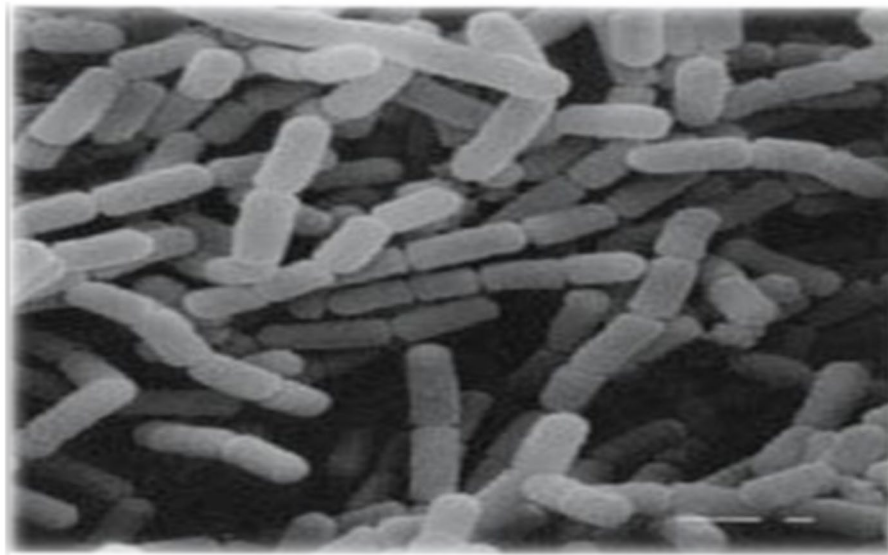


Figure 1 : Observation en microscopie électronique, ($\times 7000$) de *Lactobacillus casei* (<http://Bottazzi Vittorio>)

I.3.3. Caractères biochimiques

Les lactobacilles sont catalase négative, certains ont une pseudocatalase. Ils sont dépourvus de cytochrome. Généralement, nitrate réductase négative, gélatinase négative et ils sont microaérophiles ou anaérobies (**Prescott et al., 2003**). Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement fermentaire. La **figure 2** résume les voies métaboliques des lactobacilles (**Perry et al., 2004**).

Les lactobacilles sont subdivisés selon leur type fermentaire en trois groupes selon la classification d'Orla-Jensen remaniée par Kandler et Weiss (**Selon De vos et al., 2009**).

- ❖ **Le groupe I** : Comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire qui produisent uniquement de l'acide lactique à partir du glucose et qui sont incapables de fermenter les pentoses ou le gluconate. Elles possèdent un fructose 1,6-diphosphate aldolase et une phosphofructokinase. Ce groupe est constitué majoritairement d'espèces présentes chez l'Homme et les animaux et qui participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme. Exemple : *L. acidophilus* et *L. gasseri*.
- ❖ **Le groupe II** : Comprend les espèces à métabolisme hétérofermentaire facultatif. Ces espèces utilisent la voie homofermentaire mais elles sont capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration de glucose limitée. Elles ont un fructose 1,6-diphosphate aldolase 6-phosphogluconate déshydrogénase. Exemple : *L. casei*, *L. sake*, *L. curvatus* et *L. plantarum*.
- ❖ **Le groupe III** : Comprend les espèces hétéro fermentaires obligatoires qui forment des quantités équimolaires de CO₂, d'acide lactique, d'acide acétique et / ou d'éthanol. Les pentoses sont fermentés en acides lactique et acétique par la voie de la phosphocétolase car ces bactéries possèdent une phosphocétolase mais pas d'aldolase. Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'Homme et participent à l'équilibre de la flore intestinale. Exemple : *L. brevis* et *L. fermentum*.

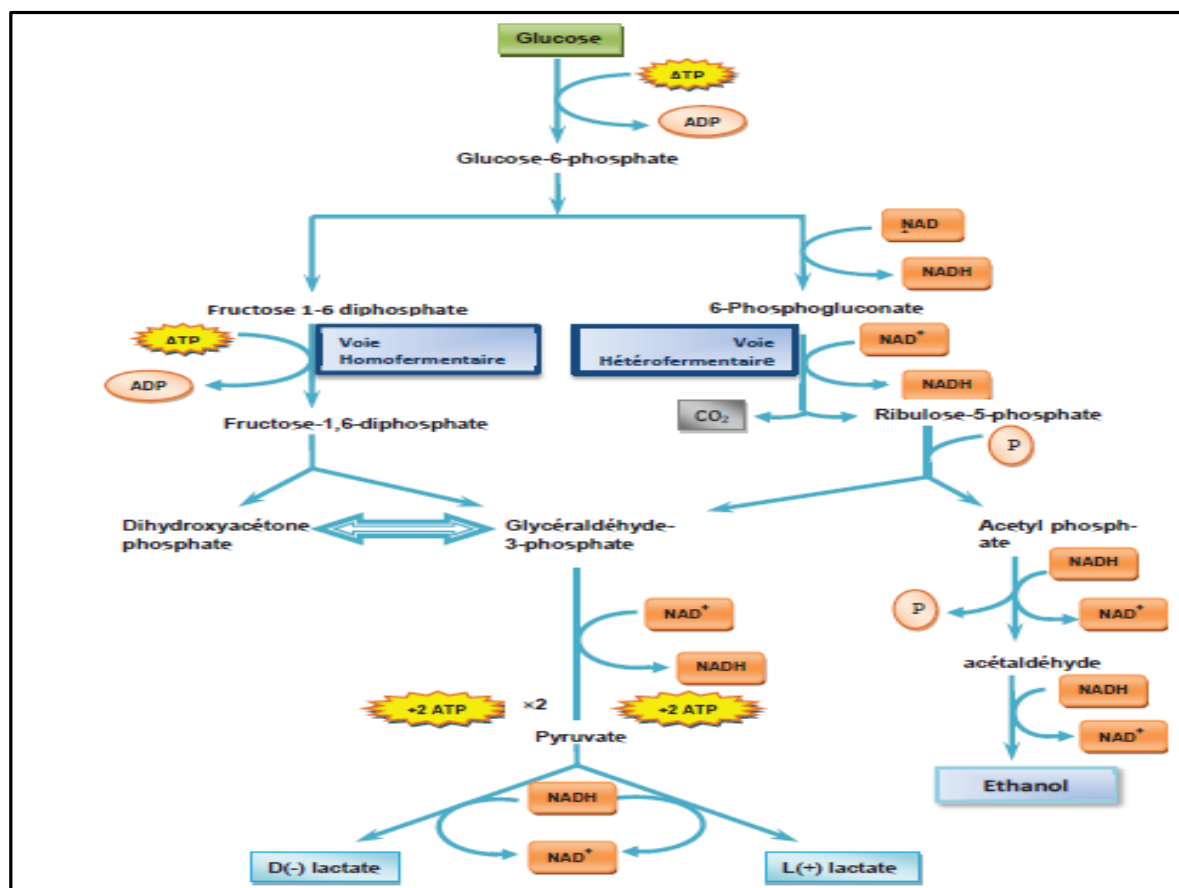


Figure 2 : Les principes voies métaboliques des lactobacilles (Source Perry et al., 2004) .

1.3.4. Rôle bénéfique des lactobacilles probiotiques:

Les probiotiques contribuent à l'amélioration de la flore microbienne naturelle intestinale et par conséquent, leur plus grande importance, sur la santé humaine, concerne leur rôle dans l'inhibition des germes pathogènes et la prévention et/ou le traitement des différentes maladies intestinales (FAO/OMS., 2002), c'est pourquoi de nombreuses allégations santé ont été associées à l'utilisation des lactobacilles probiotiques en tant qu'adjuvants chez l'Homme (Bahri Fatiha., 2014). dont les principaux effets bénéfiques sont :

- ✓ Prévention et traitement des diarrhées.
- ✓ Atténuation de l'intolérance au lactose.
- ✓ 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 cardiovasculaires.

- ✓ 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).

I.4. *Lactobacillus plantarum*:

Lactobacillus plantarum est l'une des espèces les plus largement réparties dans la nature et les plus polyvalentes, utilisée comme probiotique et ferment lactique d'importance industrielle, qui peut être trouvée dans les aliments fermentés (Siezen *et al.*, 2011), dans les aliments probiotiques, fonctionnels et thérapeutiques (De Vries *et al.*, 2006).

Lb. plantarum est un bacille Gram positif, à hétéro-fermentation facultative, qui a d'abord été nommé *Streptobacterium plantarum* par Orla-Jensen en 1919 et renommé *Lactobacillus plantarum* par Pederson (1936) qui décrit ces espèces pour ces caractéristiques biochimiques et morphologiques. (Melgar-Lalane, 2012). Cette espèce rencontrée aussi dans le microbiote normal chez l'homme et les animaux, ils sont utilisés dans diverses applications notamment la souche *Lactobacillus plantarum* 299v est présente naturellement dans le microbiote intestinal des personnes en bonne santé et contribue à la fermentation de nombreux aliments, d'origine végétale notamment (d'où « *plantarum* »). Elle fait partie de notre alimentation depuis plus d'1,5 millions d'années. (Molain *et al.*, 1993)

I.4.1. Caractères Biochimiques:

Lactobacillus plantarum fermente généralement les hexoses par la voie métabolique EMP (Embden-Meyerhoff-Parnas) entraînant la formation d'acides D et L-lactiques. De plus, les pentoses sont fermentés pour former l'acide lactique et acétique en présence de phosphocétolase inductible (Todorov *et al.*, 2010). *Lb. plantarum* fermente les carbohydrate suivant : l'amygdaline, le cellobiose, l'esculine, le gluconate, le mannitol, le mélézitose, le mélibiose, le raffinose, le ribose, le sorbitol, le saccharose et xylose dans plus de 90% et l'arabinose et le xylose entre 11 et 89% (Bergey et Boone, 2009). *Lb. plantarum* a montré des réponses diverses pour certains facteur de stress : résistance à une température élevée de (55°C pendant 10 min), bile (0,5% oxgall®), stress oxydatif (0,1% H₂O₂), pH bas (2,5), éthanol (10%); (7,5%) de NaCl et même à montrer une tolérance d'un détergent le SDS (dodécylsulfate de sodium à 0,05%) (Parente *et al.*, 2010).

Les bactériocines sont des protéines biologiquement actives contre les espèces étroitement liée à la souche de production. Les bactériocines de *Lb. plantarum* (la plupart appelées plantaricines) ont été partiellement caractérisées et seulement quelques-uns d'entre eux leur séquence d'acides aminés avait été complètement séquencée (Todorov., 2009).

I.4.2.Aspect sécuritaire de *Lactobacillus plantarum*:

Lb. plantarum a une longue histoire d'occurrence naturelle et d'utilisation sans danger dans une variété de produits alimentaires et il est un hôte normal dans le microbiote intestinale humain.

La plupart des souches de *Lb. plantarum* se sont révélées sensibles à certains antibiotiques (la céphalotin, à la clindamicin, au chloramphénicol, à la cloxaciline, au co-amoxycylav et à la novobiocine) et résistantes à d'autres (l'éritromine, à l'acide fusidique, à la gentanine, à la kanamycine, à l'acide nalidixique, à la néomycine, à la néomycine et à la vancocmycine) (Zhou et al., 2005; Melgar-Lalane.,2012). Cette résistance aux antibiotiques peut survenir de deux manières dans une population bactérienne: la mutation d'un gène endogène ou l'acquisition d'un gène de résistance d'une source exogène par transfert de gène (Liu et al., 2009). De nombreuses bactéries lactiques sont naturellement résistantes à certains antibiotiques. Ces attributs de résistance sont généralement pas transférables aux agents pathogènes opportunistes du tractus gastro-intestinal humain (Zhou et al., 2005; Jacobsen et al., 2007; Liu et al., 2009).

I.4.3. Survie de *Lb. Plantarum* aux conditions hostiles du tractus gastro-intestinal :

Après ingestion orale, les bactéries rencontrent un certain nombre de systèmes de défense humains associés à différentes sécrétions via le système du tractus gastro-intestinale. Le premier système de défense est la présence de lysozyme et d'±-amylase dans la cavité buccale, qui présentent une activité antimicrobienne. Après cela, les bactéries subissent la présence d'un pH faible (entre 2,0 et 3,0) et d'enzymes protéolytiques comme la pepsine au niveau de l'estomac ensuite dans l'intestin grêle, le pH augmente à 8,0 et les sels biliaries ainsi que les sucs pancréatiques sont sécrété (de Vries et al., 2006).

La tolérance au lysozyme des souches de *Lb. plantarum* est très peu étudié. Zago et al. (2011) ont analysé 27 souches de *Lb. plantarum* et ont constaté une résistance élevée au

lysozyme parmi 15 souches (e 68% du taux de survie) alors que **Golowyc et al. (2010)** ont constaté un taux de survie proche de 100% pour *Lb. plantarum* CIDCA83114.

Aussi de nombreuses souches de *Lb. plantarum* ont montré une tolérance élevée à l'acide chlorhydrique (pH 3,0) en présence ou en l'absence de pepsine (0,3%) et la plupart d'entre elles ont présenté une forte diminution du taux de survie avec un pH de 2,0 avec et sans pepsine, et la plupart des études ont signalé un taux de mortalité élevé de *Lb. plantarum* en présence de pepsine au pH bas, probablement en raison de l'hydrolyse du peptidoglycane présent dans la paroi cellulaire (**Zhu et al., 2006; Zago et al., 2011**).

D'autres auteurs ont démontré une survie de différentes souches de *Lb. plantarum* aux conditions intestinales avec des taux est proche de 100% à des concentrations allant jusqu'à 0,5% de sel biliaire (Ox-gall®) pendant 4 h, et certaines souches ont survécu dans des conditions de stress biliaire plus élevé allant jusqu'à 1,0% de sel biliaire, à pH 8,0 pendant 24 h (**Jamaly et al., 2011; Wang et al., 2010; Zago et al., 2011**). La présence de pancréatine (1% avec sels biliaires) n'a apparemment pas eu d'effet significatif sur le taux de survie des souches de *Lb. plantarum* chez selon d'autres auteurs (**Botes et al., 2008; Michida et al., 2006; Jiménez-Pranteda et al., 2011**).

Des études actuelles, contribuent à l'amélioration de la survie de ces bactéries dans les hostilités du tubes digestif en protégeant les bactéries par le pouvoir tampon d'un l'aliment vecteur, ou en utilisant la technologie de micro-encapsulation qui sont destiné à la protection des bactéries de l'acidité gastrique et offrant un grand potentiel de cellules viables qui vont atteindre l'intestin vivantes et exercer leurs action bénéfiques pour l'hôte (**Brinques et al., 2011; Melgar-Lalane., 2012**).

I.4.4 Allégation santé de *Lactobacillus plantarum*:

Outre ses applications dans l'industrie alimentaire, *Lb. plantarum* a de nombreuses applications dans l'industrie pharmaceutique en contribuant de manière significative à la médecine humaine sans contribuer à aucun effet secondaire. Récemment, *Lb. plantarum* a été appliqué dans les domaines médicaux pour le traitement de diverses maladies chroniques et cardiovasculaires telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, le diabète, l'obésité, le cancer, l'hypertension, les complications urogénitales, les troubles du foie, etc. (**Woo et al., 2014**)

La littérature affirmait que les souches de *Lb. plantarum* étaient largement étudiées pour leurs applications dans le domaine médical (**tableau 4**). En particulier, on a signalé que ces souches réduisent le risque de maladies cardiovasculaires (**Ahren et al., 2014**), produisent des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales de l'intestin (**Murofushi et al., 2015**), produisent des concentrations variées d'exopolysaccharide. avec propriété anticancéreuse (**Wang et al., 2014**), stimulé l'activité immunitaire (**Ku et al., 2014**) et réduisent le taux de cholestérol dans le tissu adipeux (**Li et al., 2014**).

Tableau4 : Importance *in vitro* de *Lactobacillus plantarum* probiotique en relation avec le domaine médical. (**Mariadhas Valan Arasu et al.,2015**)

Découverte primordiale	Références
<ul style="list-style-type: none"> • Cette étude a montré que <i>Lb. plantarum</i> et les bleuets réduisaient de manière significative l'hypertension et pression artérielle. par conséquent, cette souches pourrait être utilise pour les traitement cardiovasculaires. 	(Ahren et al.,2014)
<ul style="list-style-type: none"> • Les exopolysaccharides obtenus à partir <i>Lb. plantarum</i> ont significativement diminué la production de pro- inflammatoire dans les cellules épithéliales intestinales de manière dépendante de RP105/MD1 	(Murofushi et al.,2015).
<ul style="list-style-type: none"> • Cette étude révèle que l'exopolysaccharide lié aux cellules isolées de <i>L. plantarum</i> 78010 a montré une activité anticancéreuse significative 	(Wang et al.,2014)
<ul style="list-style-type: none"> • Les produits extracellulaires de <i>Lb. plantarum</i> ont révèle des effets anticancéreuse en augmentant la résistance électrique transépithéliale des cellules H4 et en diminuant la sécrétion de cytokine pro- inflammatoire IL-6 et IL-8. 	(Dimitrovski et al.,2014)
<ul style="list-style-type: none"> • L'administration de <i>Lb. plantarum</i> régule le métabolisme des lipides dans tissus adipeux en abaissant le taux de cholestérol 	(li et al.,2014)
<ul style="list-style-type: none"> • L'étude démontre pour la première fois le rôle protecteur de <i>Lb. plantarum</i> sur les symptômes du syndrome du côlon irritable. Cette étude a confirmé que l'administration orale <i>Lb. plantarum</i> stimule des taux élevés de cytokine pro-inflammatoire IL-12 et de faibles taux de cytokine anti- inflammatoire IL-10 	(Stevenson et al.,2014)
<ul style="list-style-type: none"> • Cette étude a confirmé que l'administration orale <i>Lb. plantarum</i> vivant ou tué par la chaleur atténue les symptômes de maladie de crohn et maladie de colite ulcéreuse. 	(Chie et al.,2014)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lb. plantarum</i> récupéré a partir de cornichons traditionnelles coréens présentait une activité anti oxydante significative .Cette étude a conclu que l'administration cette souches avait divers effets oxydants. 	(Arasuet al.,2014)

II. La digestion Enzymatique:

II.1. Définition:

La digestion concerne l'ensemble des processus au cours desquels les aliments ingérés, constitués en large part d'éléments non directement utilisables par les cellules, sont réduits par hydrolyse enzymatique en nutriments utilisables.

Le système de digestion extracellulaire implique une sécrétion d'enzymes digestives dans un espace déterminé du tractus digestif, extérieur aux cellules, où les éléments ingérés sont hydrolysés complètement ou partiellement. L'intestin intervient dans tous les cas, l'estomac dans de nombreux cas et la cavité buccale dans quelques cas seulement.

La digestion met en jeu des enzymes et des structures différentes selon la nature chimique des aliments ingérés: protéines, lipides ou hydrates de carbone (glucides). La plupart des études concernant les mécanismes impliqués sont relatives aux mammifères.

II.2. Organisation générale du système digestif:

L'appareil digestif est constitué des organes du tube digestif (bouche, œsophage, estomac, intestin) et de ses organes annexes (dent, gland annexes, pancréas et foie). (Widmaier et al., 2013).

La première partie de l'appareil digestif est constituée de la bouche suivie du pharynx qui sert de réceptacle pour nourriture. Les dents participent à la mastication et trois glandes salivaires (parotides, sublinguales et sous-maxillaire) sécrètent la salive cette portion permet une réduction de la taille des particules alimentaire, leur lubrification ainsi qu'un début de digestion chimique. Après déglutition, les aliments circulent dans l'œsophage sous l'effet d'ondes péristaltique puis atteignent l'estomac. Celui-ci en forme de sac limité par des sphincters, est à la fois un réservoir pour les aliments au cours du repas et une zone de brassage pour ces aliments. Ce brassage est assuré grâce à motricité gastrique. Les sécrétions acides et enzymatiques gastrique permettent au début de digestion chimique des aliments. (Widmaier et al., 2013).

Le sphincter pylorique, qui ferme l'estomac, se relâche régulièrement pour laisser passer le chyme (bouillie issue des aliments après le séjour gastrique) vers l'intestin. L'intestin grêle est subdivisé en trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum reçoit, via des canaux, les sécrétions exocrines de deux organes annexes : le pancréas et le foie. Ces sécrétions contiennent des enzymes, des électrolytes et des selles biliaires qui permettent la réalisation des processus de digestion de la plupart des aliments, la digestion a lieu pour l'essentiel dans le duodénum et le jéjunum. Ces segments participent également à

l'absorption du nutriment issu de la digestion. Le chyme transite relativement rapidement dans le duodénum, puis par des mouvements plus lents dans les autres segments. Dans la partie proximale du colon, le chyme restant se transforme en fèces semi-solides par fermentation bactérienne des résidus alimentaires non digérables et déshydratation. Les fèces s'accumulent dans les rectums puis sont évacuées à niveau de l'anus. (**Widmaier et al., 2013**).

II.2.1 Les organes annexes du tube digestif :

A. Les glandes salivaires : La langue est composée d'une glande salivaire à mode de sécrétion exocrine : la glande sublinguale (située en avant et en bas de la langue). Celle-ci a pour rôle la production de salive.

- **Caractère de la salive :** Un litre à un litre et demi de salive est sécrété chaque jour par deux types de cellules : Les unes, séreuses, produisent une salive fluide contenant de l'amylase salivaire. La salive serait très légèrement acide. Elle contient le lysozyme (une enzyme dégradante) qui a une action bactériostatique vis-à-vis de nombreux microbes. (**Dupin H.,1992**).
- **Action de salive :** La salive a essentiellement un rôle mécanique d'humidification qui complète l'action des Dents, donnant aux aliments une consistance de pâte molle. Elle a aussi une action chimique car elle contient une amylase spécifique qui est capable de dégrader l'amidon cuit. A première vue, l'amylase salivaire devrait avoir peut d'action puisque les aliments arrivent très vite à l'estomac dont le suc fortement acide inactive cette amylase. Cependant l'action de l'amylase se poursuit un certain temps après l'entrée des aliments dans l'estomac. (**Dupin H.,1992**)

B. Le Pancréas : Le pancréas dérive de la partie haute de l'intestin primitif. Il s'agit d'un organe indissociable Du duodénum de par sa localisation dans la cavité abdominale, sa vascularisation et la position de ses canaux excréteurs. Le pancréas est une glande à la fois exocrine et endocrine :

- La fonction de pancréas exocrine se scinde en 2 types de sécrétions. D'une part une sécrétion hydro-électrolytique riche en eau et en bicarbonate qui assure le transport Des enzymes pancréatiques vers la lumière duodénale et la neutralisation du pH acide gastrique au niveau du duodénum. D'autre part, le pancréas exocrine synthétise au niveau des acini des enzymes digestives diverses. On compte parmi celles- ci les

protéolytiques telle la trypsine pour la dégradation des protides, les amylolytiques telle que l'amylase pour la dégradation des glucides et les lipolytiques telle que la lipase pour la dégradation des lipides. La plupart de ces enzymes sont sécrétées sous formes inactives ce qui permet une protection du pancréas face à une autodigestion. Les enzymes sont activées principalement dans le duodénum et dégradent ainsi le contenu du chyme gastrique en vue d'une absorption intestinale. **(Dufresne M, 2012).**

- Le pancréas endocrine joue un rôle fondamental dans l'homéostasie glucidique et Lipidique par la synthèse d'insuline et de glucagon au niveau des îlots de Langherans. **(Dufresne M, 2012).**

C. Le Foie : Le foie est un organe abdominal central, logé dans l'hypochondre droit. Il s'agit du viscère Humain le plus volumineux avec un poids moyen d'environ 2% du poids corporel. Du fait de sa position dans l'abdomen, il assure de nombreuses fonctions nécessaires à l'homéostasie de l'organisme et participe notamment à la digestion des nutriments à travers la bile sécrétée. Son rôle d'organe annexe du système digestif est principalement décrit par sa faculté à Produire et excréter de la bile. La bile est sécrétée par les hépatocytes et les cellules épithéliales biliaires. Elle a une double fonction pour la glande hépatique ; elle représente un mode d'élimination des produits du catabolisme hépatique et une sécrétion exocrine essentielle aux fonctions digestives d'absorption. . **(Maitre M et Blicklé, 2008.)**

Le foie produit environ 600mL de bile par jour, composée essentiellement d'eau (à 97%) et riche en acide biliaire, phospholipides, cholestérol, bilirubine, protéines et notamment en ions tels que les bicarbonates. **(Maitre M et Blicklé, 2008).**

Entre les repas et notamment la nuit, la bile est produite puis stockée dans la vésicule biliaire hépatique. L'arrivée du chyme acide riche en acide gras stimule la sécrétion duodénale de cholécystokinine qui va provoquer l'ouverture du sphincter d'Oddi et la contraction de la vésicule biliaire. La cholécystokinine permet le largage via le canal cholédoque de la bile hépatique ainsi que les sécrétions pancréatiques dans le duodénum. Cette bile liquide alcaline exerce un pouvoir tampon supplémentaire sur l'acidité du chyme gastrique et permet une solubilisation micellaire des produits résultant de l'action des lipases et des estérases pancréatiques sur les lipides alimentaires. Cette solubilisation des lipides et vitamines liposolubles favorise leur diffusion vers la membrane des entérocytes permettant ainsi leur absorption. **(Maitre M et Blicklé, 2008).**

II.3. Les enzymes digestives:

II.3.1 Alpha amylase : (digestion de glucide)

L'α-amylase est une enzyme digestive classée comme saccharidase (enzyme qui brise les polysaccharides). C'est surtout un constituant de suc pancréatique et de la salive, requis pour le catabolisme des glucides à longue chaîne en unités plus petites (**Payan et al.1997**)

L'α-amylase est la principale enzyme digestive dans la salive. On hydrolyse l'a-1,4 glucosidiques des liaisons en amidon. L'efficacité de la mastication est importante pour l'α-amylase salivaire de pénétrer dans la nourriture bol. Malgré la courte exposition de la salive dans la bouche, la digestion salivaire de l'amidon est importante car elle se poursuit une fois que les aliments ont atteint l'estomac. L'acide gastrique dans l'estomac inactive l'α-amylase, mais comme le bolus de nourriture met un certain temps à se désintégrer dans l'estomac, la digestion salivaire peut s'y poursuivre jusqu'à une demi-heure. Lorsque l'acide a complètement pénétré dans l'aliment, l'enzyme est inactivée. L'α-amylase fonctionne mieux à un pH légèrement alcalin. L'amidon dans les pommes de terre ou le pain peut être digéré jusqu'à 75% par l'α-amylase salivaire avant que l'enzyme ne soit inactivée par l'acide dans l'estomac. (**Margaret E et al., 2010**).

De petites quantités d'autres enzymes sont également présentes dans la salive, notamment le lysozyme, le sial peroxydase, la lipase linguale, la ribonucléase, la désoxyribonucléase. Ces composants salivaires ne sont pas importants pour le processus digestif, bien que le lysozyme et la sialoperoxydase fournissent des fonctions protectrices importantes. (**Margaret E et al., 2010**).

II.3.2 Le Lysozyme :

Le lysozyme est une protéine globulaire de 129 acides aminés (chez la poule). Elle se compose d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile. L'activité enzymatique du lysozyme dépend évidemment, des facteurs environnementaux tels que le pH, la température et la pression osmotique. Ces dépendances sont différentes pour chaque type de lysozyme. Cette enzyme est très stable dans une large gamme de température. Le lysozyme en poudre peut être conservé pendant de longues périodes (plus de 6 mois) à des températures supérieures à 30 °C sans perdre de son activité (**Proctor et Cunningham., 1988**).

Le lysozyme fait aussi partie des rares enzymes ayant un goût sucré. Des expériences de mutagenèse dirigée ont d'ailleurs été effectuées afin de déterminer par quels mécanismes cette protéine active les récepteurs du goût. (Masuda et Kitabatake., 2005).

II.3.2.1 Mécanisme action du lysozyme:

Le lysozyme est une enzyme qui digère la paroi cellulaire des bactéries, en coupant le lien glycosidique (1-4) entre une molécule NAM et une molécule NAG, d'une chaîne de polysaccharides NAM-NAG. La coupure se fait entre le carbone 1 du NAM et le carbone 4 du NAG (Figure 03).

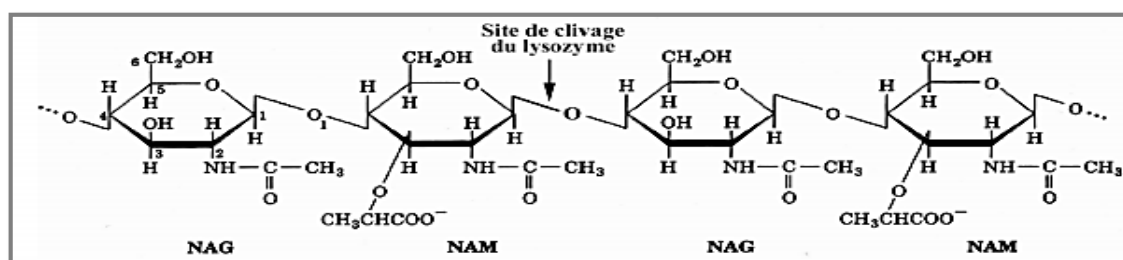


Figure 3 : Structure du peptidoglycane et site de clivage du lysozyme.

Des lysozymes peuvent aussi couper des polysaccharides naturels (ex : chitine) ou synthétique (ex : poly NAG). En plus d'être la première enzyme dont la structure en 3 dimensions a été élucidée, le lysozyme est la première enzyme dont un mécanisme d'action a été proposé (Phillips 1966).

II.3.3. Digestion de protéine :

Les besoins nutritionnels de l'organisme humain en acides aminés, indispensables pour la croissance et le renouvellement tissulaire, sont assurés par la digestion des protéines alimentaires dans le tube digestif. La digestion est amorcée dans l'estomac par l'acide chlorhydrique (hydrolyse acide) et l'action de la pepsine. Cette enzyme est sécrétée sous forme d'un précurseur inactif, le pepsinogène, sécrété par les cellules principales des glandes gastriques. L'activation du pepsinogène en pepsine se fait à pH acide, donc idéalement dans la lumière gastrique. La pepsine agit, lorsque le pH est acide, sur le pepsinogène inactif et sur les protéines alimentaires, en produisant plus de pepsine active (autocatalyse) et des polypeptides de grande taille. (Laurent Beaugerie., 2014).

II.3.3.1 Les protéases :

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases. En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques qui scindent la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique (Tableau 05) et sont produites en extracellulaire comme en intracellulaire (**Kumar et al., 2008b**). Ces enzymes les protéases sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs (**Pelmont, 1995**). Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulateurs plus spécifiques (**Kumar et al., 2008a**).

Tableau 5 : Spécificité des protéases (Rao et al, 1998).

Enzymes	Liaison peptidique à clivée
Trypsine.....	-Lys (ou Arg)“-----
Chymotrypsine.....	-Trp (ou Try, Phe, Leu)“-----
<i>Staphylococcus</i> V8 protéase.....	- Asp (ou Glu) ↓ -----
Papaïne.....	- Phe (ou Val, Leu) Xaa ↓ -----
Thermolysine.....	--- “Leu (ou Phe) -----
Pepsine.....	-Phe(ou Tyr , Leu) ↓ Trp (ou Phe, Try)
La flèche indique le site d'action des protéases, Xaa, n'importe quelle acide amine	

A. La Trypsine:

La trypsine appartient à la famille des protéases à sérine, caractérisée par la présence d'une triade catalytique composée des chaînes latérales de trois acides aminés : une sérine (Ser-195), une histidine (His-57) et un aspartate (Asp-102). C'est l'une des protéases digestives les plus importantes de la plupart des vertébrés. Elle est produite dans les cellules acineuses du pancréas et est libérée par le canal pancréatique dans le tube digestif. Après activation par l'entérokinase ou autocatalyse, et en présence de la chymotrypsine et l'élastase, elle permet l'hydrolyse des protéines alimentaires en peptides. Les peptides résultants sont en outre digérés par une variété d'exopeptidases et les petits fragments peptidiques sont ensuite absorbés par l'intestin (**Whitcomb et Lowe, 2007**).

- **Mécanisme d'action de la trypsine :** La trypsine contient un « trou oxyanion » bordé par les groupements amides du squelette polypeptidique au niveau de la glycine 193 et de la serine 195. Cette cavité accueille l'atome d'oxygène du groupement carbonyle de la liaison peptique clivée et stabilise l'intermédiaire de réaction en favorisant la formation d'une charge négative sur l'oxygène. La reconnaissance d'un résidu chargé positivement juste en amont du site de coupure est réalisée par le groupement carboxylate ($-\text{COO}^-$) de l'aspartate 189 qui est situé au fond de la poche de reconnaissance de la chaîne latérale de l'acide aminé situé juste en amont (côté *N*-terminal) du site de clivage. L'interaction électrostatique entre la charge positive de l'acide aminé reconnu et la charge négative de l'aspartate est le facteur principal de cette sélectivité. (**Whitcomb et Lowe, 2007**).

B. Chymotrypsin:

Chymotrypsine se trouve dans l'extrait pancréatique animal. La chymotrypsine pure est une enzyme coûteuse qui n'est utilisée que pour des applications diagnostiques et analytiques. Il est spécifique à l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans lesquelles les groupes carboxyle sont fournis par l'un des trois acides aminés aromatiques, à savoir la phénylalanine, la tyrosine ou le tryptophane. Il est largement utilisé dans la désallergénisation des hydrolysats de protéines du lait. Il est stocké dans le pancréas sous la forme d'un précurseur, le chymotrypsinogène, et est activé par la trypsine dans un processus en plusieurs étapes. (**Mala et al.,1998**)

II.3.4 Digestion des lipides :

Lors de la phase digestive des graisses, deux processus interdépendants sont impliqués l'hydrolyse des lipides et la dispersion micellaire des produits de la lipolyse par les acides biliaires. L'hydrolyse des TG débute dans l'estomac essentiellement grâce à l'action de la lipase gastrique. (**Moreau H, 1988**).

Cette enzyme agit principalement sur les liens en position sn-1 et sn-3 pour les AGCL alors qu'elle hydrolyse les AGCM également en position sn-2. L'activité de la lipase gastrique est retrouvée principalement dans le fundus de l'estomac avec un pH acide optimal se situant entre 3 et 6. (**Abrams CK et al, 1988**).

La lipase pancréatique qui est déversée dans le duodénum représente l'enzyme principale pour la digestion des TG ; elle assure 70 à 75 % de l'hydrolyse des TG et des diacylglycérols (DG). Elle scinde les AGCL en position sn-1 ou sn-3 libèrent ainsi des AG libres et

monoacylglycérols (MG) qui se caractérisent particulièrement par la présence de son AG en position sn-2, ce qui représente la forme prédominante des MG absorbés au niveau intestinal. (Hofmann AF et Borgstrom B, 1963 ; Sternby B et Nilsson A *et al.*, 1991).

II.3.4.1 Lipase : Les lipases ou triacylglycérol hydrolases sont une classe particulière des hydrolases d'esters carboxyliques (Figure 02). Ces enzymes catalysent, en présence d'eau, le clivage des liaisons esters des triglycérides libérant des acides gras et successivement des diglycérides, des monoglycérides et dans certains cas du glycérol. (Verger *et al.*, 1989).

Les lipases ou TG hydrolases Elles sont ubiquitaires dans le monde du vivant et catalysent l'hydrolyse des fonctions esters des TG à longue chaînes pour libérer un ou plusieurs acides gras, suivant leur spécificité. Elles set peuvent être classées comme des carboxyl ester hydrolases lipolytiques pour les distinguer des carboxylester hydrolases non-lipolytiques (Ben Ali *et al.* 2012).

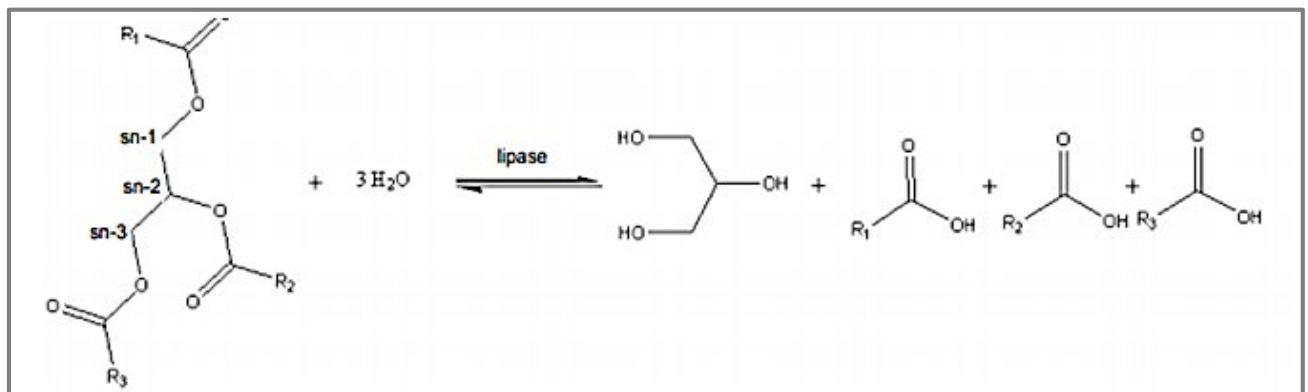


Figure 4 : Réaction d'hydrolyse complète de triglycérides (TG) par une lipase non-sélective dans un milieu aqueux. (Verger *et al.*, 1989).

Matériels

&

Méthodes

Matériels et Méthodes :

Le but de cette étude est l'évaluation in vitro de l'effet des enzymes digestives sur la survie de souches de *Lactobacillus sp* locales isolées à partir du lait de vache. Cette étude a été réalisée au niveau du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques et des Aliments fonctionnels et Santé (LMBFAS), durant le mois de Février jusqu'au mois de mai 2019.

La partie d'indentification MALDI-TOF, a été réalisé par notre encadreur au niveau de centre de Recherche scientifique et technique en analyse Physico- chimiques de BOU-ISMAIL, Tipaza .Algérie.

I. Matériels utilisés :

I.1. Origine des souches: Les huit souches lactiques utilisées dans ce travail ont été isolées, purifiées et ont été identifiées génétiquement dans le cadre d'une étude de doctorat en science de notre Encadreur (**Tableau 6**).

Tableau 6: les souches lactiques utilisées

Souches	Identification Moléculaire PCR16s/ BLAST	Origine
LbN05	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de vache
LbN09	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de vache
LbN10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de vache
LbN11	<i>Lactobacillus hebarum</i>	Lait de vache
LbN12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de vache
LbN13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de vache
LbN14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de vache

I.2. Produits et milieux de culture utilisés :

- Le milieu MRS : (**milieu de de Man, Rogosa et Sharpe, de Man *et al*, 1960**) utilisé pour la culture des lactobacilles
- Enzymes digestives (alpha amylase, lysozyme, Pancréatine, trypsine)
- Solution HCl 1N et NaOH 1N

- Colorants : Bleu de Méthylène, violet de gentiane, fuchsine.
- Eau distillée, Eau physiologique, L'eau oxygénée
- Solution Na Cl 9%, Solution SES, Solution de NaOH (1N), Solution Ringer
- Tampon phosphate (PBS); Tampon acétate de sodium
(La composition des milieux est présentée en annexe)

I.3. Verrerie et petit matériel:

- Pipettes Pasteur,
- Flacons en verre (de 250 ml),
- Tubes à essai,
- Boîtes de pétri en plastique,
- Bêchers de 200, 500 et 1000 ml,
- Erlen Myers,
- Micropipette (200 µl) et (1000 µl),
- Anse de platine,
- Mortier,
- Tubes ependoff
- Filtres
- Agitateur magnétique
- Bec bunsen
- Autoclave
- bain marie
- Balance électronique (KB 6000-1)
- pH mètre
- Etuve
- Spectrophotomètre Vortex (Stuart)
- Microscope optique (Bentley LAB SCOPE 200)
- Centrifugeuse

II. Méthodes

II.1. Réactivation des souches :

Les 08 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 de cultures jeunes.

II.2. Contrôle de la viabilité des souches :

II.2.1. Examen macroscopique :

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

II.2.2. 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).

II.2.3. Recherche de la catalase :

Ce test est utilisé pour différencier les bactéries catalase positive et catalase négative, la présence d'une catalase se traduit par l'apparition de bulles d'oxygène lors du contact de la bactérie avec l'eau oxygénée (H_2O_2) comme suit : $\text{Inoculum} + 2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$.

Quelques gouttes d'eau oxygénée ont été déposées sur une lame puis, à l'aide d'une anse la suspension bactérienne ou l'inoculum bactérien est prélevé à partir de la colonie isolée et mis en contact avec la goutte d' H_2O_2 . L'apparition ou non de bulles de gaz sur la lame témoigne respectivement de la présence ou pas de la catalase dans le métabolisme bactérien, (Stiles et Holzappel, 1997).

II.2.4. Vérification de l'identité des souches par spectrométrie de masse MALDI-TOF:

Initialement réservée au domaine de la recherche, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF fait, depuis peu de temps, son apparition dans les laboratoires de microbiologie. L'essor de cette technologie est lié à la grande précision et à la rapidité d'identification des bactéries, levures mais aussi champignons, à son utilisation aisée et à la simplicité de son intégration en routine dans les laboratoires, et au faible coût des analyses. De plus, cette approche peut être utilisée pour identifier directement les micro-organismes à partir des prélèvements, dont les hémocultures et les urines, permettant au final d'optimiser la prise en charge des patients (Carbonelle et Nassif, 2011).

II.2.4.1. Principe de la technique:

Le principe général du MALDI-TOF-MS est simple : des ions de masse et de charge différentes soumis à un champ électrique se déplacent, et la distance parcourue en un temps donné est fonction du rapport masse sur charge (m/z) (Nacef et al. 2016; Tahlaïti Hafida., 2019):

- La première étape consiste à mélanger l'échantillon à la matrice, à l'aide d'un cure-dent stérile, on récupère 3 à 4 colonies à identifier que l'on dépose sur une plaque cible (MS BigAnkor 24BC Bruker).
- Ajouter 10 μl d'une solution saturée d'acide trans-3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (HCCA portioned, Bruker) pour permettre la cristallisation de la matrice avec l'échantillon. ensuite on ajoute 0,1 μl d'acide formique.
- La plaque est mise à sécher à température ambiante ensuite elle est introduite dans le Spectrophotomètre de masse de type (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation-Time- Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS); Microflex, Bruker) où chaque

dépôt est soumis à l'action du rayon laser UV. Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie provenant du laser ce qui provoque la vaporisation de l'échantillon avec formation d'ions de masses différentes.

- Les spectres sont obtenus à l'aide d'un système informatique et grâce à un logiciel (MALDI Biotyper TM4.0 Data base Brucker Daltonics, Germany), adapté à l'appareil utilisé, les données sont comparées à une banque de données NCBI pour classer ensuite les échantillons identifiés selon des scores de fiabilité dont le détail est dans le **Tableau 7**.

Tableau 7: Interprétation standards des valeurs des scores obtenus par le logiciel du MALDI-TOF

Intervalle du score	Description	symbole	couleurs
[2.300- 3.000]	Identification probable élevé de l'espèce	(+++)	Vert
[2.000- 2.299]	Identification sécurisé du genre, identification probable de l'espèce	(++)	Vert
[1.700-1.999]	Identification probable du genre	(+)	jaune
[0.000- 1.699]	Identification non fiable	(-)	Rouge

II.3. La Résistance aux enzymes digestives:

Dans Cette partie, les 08 souches de lactobacilles ont fait l'objet des différents tests qui simulent le parcours des barrières de digestion enzymatique que peut subir un microorganisme probiotique durant son passage dans le tractus digestif.

II.3.1. Teste de résistance à l'action enzymatique de l'alpha amylase salivaire:

La viabilité des souches de lactobacilles en présence de l'enzyme digestive alpha amylase (Megamylase; laboratoire exploitant TOP PHARM; composition pour un comprimé 3000 U.CEIP/cp) a été mise en évidence selon le protocole de (**Ouwehand et al.,2001**) "modifié". Une solution stérile d'alpha amylase a été préparée en filtrant par filtre millipore (0.22µm) 100ml de tampon acétate (0.1M, pH= 5,6) additionné de l'enzyme à raison de 100mg/L. L'action enzymatique a été suivie pendant une incubation de 2h à 37°C, et la survie des bactéries a été évaluée par méthode de dénombrement en milieu solides sur boîtes de Pétri après une série de dilution à T0; 30min; 2h à 37°C et Le taux de survies a été calculer par la formule suivante: Taux de survie % = $\log(\text{UFC à T(n) h} / \log \text{UFC à T0}) \times 100$.

II.3.2. Teste de résistance à l'action du Lysozyme:

L'activité enzymatique du lysozyme contre les souches de lactobacilles a été évaluée selon le protocole de **Zago et al. (2011)**. Brièvement les souches de Lactobacilles cultivées pendant 18h ont été centrifugées (5 000 tr / min, 10 min, 4 ° C). Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et les culots ont été remis en suspension dans une solution de Ringer. 50 µl de la suspension a ensuite été inoculée dans une solution électrolytique stérile (CaCl₂ 0,22 g / l; NaCl 6,2 g / l; KCl 2,2 g / l; NaHCO₃ 1,2 g / l) additionnée de lysozyme (FLUKA) à raison de 100 mg/l. Les souches ont été incubées à 37 ° C pendant 2h.

Ensuite la survie des bactéries a été évaluée par méthode de dénombrement en milieu solide sur boîtes de Pétri après une série de dilution à T0; 30min; 2h à 37°C et Le taux de survies a été calculé par la formule suivante:

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

II.3.3. Teste de résistance à l'action l'amylase pancréatique:

Toujours dans le but de mimer les conditions digestives que peut affronter tout microorganisme ingéré vivant au niveau du tube digestif, un prétraitement des souches dans du tampon PBS à pH=2.5 additionné de Pepsine 0.3% (RIEDEL-DE HAEN AG), pour simuler le suc gastrique (**Conway et al., 1987**), et après 3h d'exposition à 37°C , les suspensions sont récupérées pour centrifugation de (5 000 tr / min, 10 min, 4 ° C). Les culots ont été lavés deux fois avec du PBS et ont été remis en suspension dans une solution de Ringer. Ensuite 50 µl de la suspension a été inoculée dans 450µL de solution d'amylase pancréatique (Sigma) préparé à raison de 0.1 mg ml⁻¹ dans un tampon PBS à pH 6.9 (**Ouwehand et al.,2001**).

La survie des bactéries a été évaluée après 4h d'incubation à 37°C, par méthode de dénombrement en milieu solide sur boîtes de Pétri après une série de dilution à T0, et T= 4h à 37°C et Le taux de survies a été calculé par la formule suivante: Taux de survie % = log (UFC à T(n) h / log UFC à T0) x 100

II.3.4. Teste de résistance à l'action de la Trypsine:

Afin de tester la tolérance des souches à l'action de la trypsine, la technique de **Bao et al. (2010)**, a été utilisée avec quelques modifications: 0.1 g de trypsine de pancréas bovin (ALFA AESAR) a été ajouté à une solution stérile de 1.1 g de NaHCO₃; et 0.2 g de NaCl dilué dans

100 mL d'eau distillé. Le pH de la solution a été ajusté à 7.6 avec une solution de NaOH 1N, et la solution enzymatique a été stérilisé par filtration à l'aide de filtre millipore a 0.22. La survie des bactéries a été évaluée après 4h d'incubation à 37°C, par méthode de dénombrement en milieu solides sur boîtes de Pétri après une série de dilution à T0, 30min, 2h et T= 4h à 37°C et Le taux de survies a été calculer par la formule suivante: Taux de survie % = $\log (\text{UFC à T(n) h} / \log \text{UFC à T0}) \times 100$

II.3.5. Teste de résistance à l'action de la pancréatine:

Ce test est réalisé selon la méthode de **Ziarno et al.(2007)**, les cultures jeunes (18h) des lactobacilles sont centrifugées (5000tr/min pd 10min), les cellules sont récupérées et rincées à l'aide du tampon PBS, ensuite 50µL ont servi pour inoculer 450µl du fluide duodéal artificiel: (5.0 g de NaCl, 0.6 g de KCl , 0.03 g de CaCl₂ et 17 g de sels biliaires dissoute dans 1 L of 1 mol/L NaHCO₃) , après stérilisation par autoclavage du milieu à 121°C pendant 15 min) le pH était de 7.0 ±0.2; ce fluide est additionné avec les enzymes pancréatines et c'est des capsules d'une préparation pharmaceutique nommée "Créon® 10000 " obtenue à partir de poudre de pancréas d'origine porcine (MYLAN Medical SAS) qui ont été utilisé comme source du complexe enzymatique à raison de deux capsules par 50 ml de jus . Une capsule de Creon® 10 000 contient 150 mg d'enzymes pancréatine:10.000 unités UPh.Eur. De lipases, 8 000 unités U Ph .Eur d'amylases, 600 unités U Ph.Eur. De proteases. La solution enzymatique a été stérilisé par filtration à l'aide de filtre millipore a 0.22. La survie des bactéries a été évaluée après 4h d'incubation à 37°C, par méthode de dénombrement en milieu solides sur boîtes de Pétri après une série de dilution à T0, et T= 5h à 37°C et Le taux de survies a été calculer par la formule suivante: Taux de survie % = $\log (\text{UFC à T(n) h} / \log \text{UFC à T0}) \times 100$.

Résultats

&

Discussion

I. Confirmation de la pureté et l'identité des souches de lactobacilles utilisées :

A la lumière de ces résultats culturels et morphologiques (observation macroscopique et microscopique); le test catalase et l'identification Maldi TOF, nous avons pu, s'assurer que les souches revivifiées après conservations, sont pure et n'ont pas été contaminées.

I.1. Caractère macroscopique:

L'observation macroscopique en milieux liquide indique la présence d'un trouble homogène indiquant une bonne croissance après 24 h d'incubation. Sur milieux MRS solides, l'observation a permis de déterminer l'aspect morphologique des colonies de lactobacilles: Colonies circulaires petites, moyennes, bombées, lisses, de couleur blanchâtre ayant un contour régulier.

La figure 5 montre l'aspect macroscopique des colonies cultivées sur milieu MRS solide.

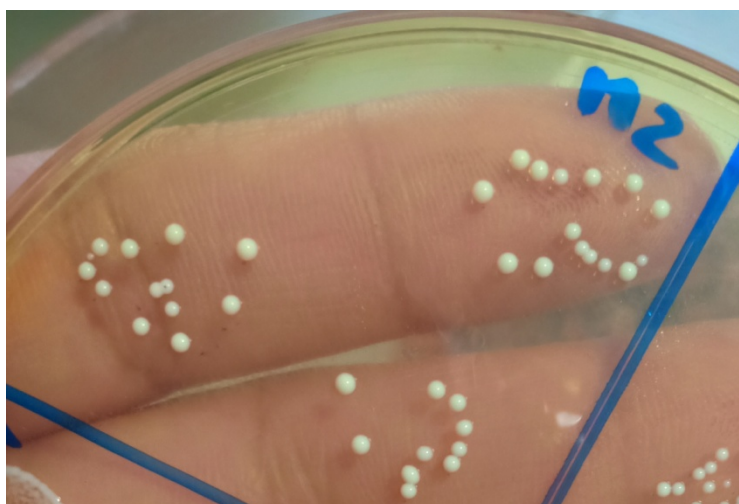


Figure 5: Aspect macroscopique de la souche lactique LbN12 isolée à partir de lait de vache sur milieu MRS à 37°C pendant 24h

I.2. Caractéristique microscopique et test catalase:

L'observation microscopique des caractères culturels montre la forme des colonies, ainsi que la pureté des souches. Les colonies des lactobacilles sont distinguées par leurs formes bâtonnets : courts et longs, isolés, en amas ou en palissade.

L'observation microscopique après coloration de Gram des souches est représentée par la **(figure 6)**. Toutes les souches étaient Gram positif et Catalase négative **(Tableau 8)**.



Figure 6: Observation microscopique (x100) de la souche lactique *LbN14* après coloration de Gram

Les Bactéries lactiques sont Gram positif, catalase négative. Les lactobacilles se présentent sous forme de bacilles ou coccobacilles long ou court, isolé, regroupé en deux, en amas, palissade ou en chaîne, par contre les lactocoques (entérocoques, streptocoques, pédiocoques, etc.....), eux se présentent sous forme circulaire (cocci) avec différents modes d'associations (**Kandler et Weise, 1986**).

Tableau 8: Caractéristiques culturaux des souches lactiques utilisées.

Souches lactiques	T°C de croissance	Milieu de culture	Gram	Catalase	Forme cellulaire	Origine de souche
LbN05	37°C	MRS	Positif	Négative	Bacille	Lait de vache
LbN09	37°C	MRS	Positif	Négative	Bacille	Lait de vache
LbN10	37°C	MRS	Positif	Négative	Bacille	Lait de vache
LbN11	37°C	MRS	Positif	Négative	Bacille	Lait de vache
LbN12	37°C	MRS	Positif	Négative	Bacille	Lait de vache
LbN13	37°C	MRS	Positif	Négative	Bacille	Lait de vache
LbN14	37°C	MRS	Positif	Négative	Bacille	Lait de vache
LbN15	37°C	MRS	Positif	Négative	Bacille	Lait de vache

I.3. Identification MALDI-TOF:

Dans le but de s'assurer que, les souches n'ont pas été contaminé lors des étapes de revivification après conservation, une confirmation de l'identité moléculaire des souches s'avère indispensable. L'utilisation de la technique d'identification des microorganismes par spectrométrie de masse MALDI-TOF/ MS, c'est étendue ces dernière années en recherche microbiologique car elle permet une identification efficace, fiable et rapide. D'autant plus que cette technique est à moindre coût par rapport aux techniques moléculaires utilisées pour l'identification microbienne. L'identification des souches est obtenue par interprétation des spectres de masses à l'aide d'un logiciel qui génère automatiquement les graphiques des pics à partir de tous les spectres et extrait les pics typiques en répertoriant par la suite les souches avec des scores d'identification selon le **Tableau 7**.

Les résultats obtenus par cette technique d'identification révèlent la présence de souche de *Lactobacillus Plantarum*, et sont représentés dans le **Tableau 9**. La comparaison des résultats avec l'identification moléculaire démontre clairement la fiabilité de cette technique de spectrométrie MALDI-TOF utilisée et démontre bien que les souches sont pures. Par conséquent, nos résultats génotypiques sont en accord avec les résultats protéomiques.

Tableau 9: Résultats d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF des souches lactiques

Symbole d'analyse selon le score obtenu	Identifiant d'analyse ID	Identification MALDI-TOF
(+)	LB05/ LbN05	<i>Lactobacillus plantarum</i>
(+++)	LB09/ LbN09	<i>Lactobacillus plantarum</i>
(++)	LB10/ LbN10	<i>Lactobacillus plantarum</i>
(-)	LB11/ LbN11	<i>Lactobacillus plantarum</i>
(+)	LB12/LbN12	<i>Lactobacillus plantarum</i>
(++)	LB13/ LbN13	<i>Lactobacillus plantarum</i>
(+++)	LB14/ LbN14	<i>Lactobacillus plantarum</i>
(+)	LB15/ LbN15	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>ssp</i> <i>argenteratensis</i>

Le MALDI-TOF MS pourrait donc être une alternative intéressante aux techniques moléculaires basées sur le séquençage de l'ADNr 16S, généralement coûteuses. Ce constat est en accord avec d'autres travaux (**Maier et al., 2006 ; Dubois et al., 2010 ; Bizzini et al., 2011 ; Welker et Moore, 2011**) qui ont comparé les techniques protéomiques avec celles de l'identification moléculaire (**Khelili kaoutar, 2015**).

Des études, comme celles de **Bizzini et Greub (2010)**, ont démontré que les performances d'identification des bactéries par cette nouvelle technologie ont pu atteindre des pourcentages élevés variant de 88,8 à 98,2 % et de 75,6 à 97,7 % d'identification correcte à l'espèce pour les bactéries Gram-négatif et Gram-positif respectivement ; ce qui rassure sur l'utilisation du MALDI-TOF MS. (**Khelili kaoutar, 2015**)

Par ailleurs, de nombreuses études ont comparé la technique spectrométrique aux techniques utilisées traditionnellement dans les laboratoires de microbiologie, toutes concluent que le MALDI-TOF MS surpasse les techniques conventionnelles tant dans la qualité de l'identification des bactéries, qu'elles soient courantes ou moins fréquentes, que dans le taux de mauvaise identification observé, généralement négligeable pour le MALDI-TOF MS (**Martiny et al., 2010 ; Cherkaoui et al., 2011**).

Cependant, il reste à souligner que cette technique peut soulever parfois des difficultés d'identification, plus souvent rencontrées avec les bactéries à Gram positif; comme pour la souche LB11, l'identification est non fiable et cela peut s'expliquer par la qualité du dépôt qui est en cause: soit par un excès de bactéries dans le mélange avec la matrice, soit par un dépôt non homogène sur la cible ce qui crée des spectres de mauvaise qualité et dans d'autres cas, il est au contraire nécessaire de faire des dépôts plus riches, par exemple en présence de bactéries difficiles à prélever à partir du milieu de culture (**Carbonelle et Nassif, 2011**).

II. Survie des souches aux enzymes digestives:

La capacité de survivre à travers le tractus gastro-intestinal humain est un trait important pour la sélection de souches probiotiques, c'est pourquoi différents compartiments simulant le passage gastro-intestinal in vitro, ont été testés.

II.1. L'effet de l'±-amylase salivaire et pancréatique:

Les Résultats obtenus sont représentés par les figures numérotées (7,8 et 9) pour l'alpha amylase salivaire, les souches testées expriment une viabilité importante puisque les taux de survie varient entre [97% à 106%]. Les souches LbN10 ont un taux de survie qui augmente de 4% de 30min à 2h pour atteindre une charge de $6.5 \cdot 10^8$ UFC/ L, la souche LbN09 de 3% ($4.30 \cdot 10^8$ UFC/L), et les souches LbN14 et LbN15, ont montrées une élévation de 1% pour atteindre

respectivement $[4.10; 4.8] 10^8$ UFC/L , par contre les souches LbN12 et LbN05 sont resté presque stables alors que la souche LbN13 à présenter une diminution de 1% avec une charge de $(3,30 10^8$ UFC/L).

Pour l'effet de l'alpha amylase pancréatique qui a duré plus de 02h et ce jusqu'a 5h d'exposition après un prétraitement qui simule le passage de l'estomac (suc gastrique) pendant 3h; les Taux de survies étaient variables selon la souche considéré, et n'ont pas atteint les 100% sauf la souches LbN14 qui a affiché un taux de 100.5% avec une charge bactérienne de $9 10^7$ ufc/l mais dans l'ensemble, les taux de survies à 0h après les 03h à pH=2.5 (0.3% de pepsine), des souches ont révélées une bonne résistance.

Les aliments arrivant dans la cavité buccale sont tout d'abord réduits et mastiqués par l'action des dents, puis prédigérés par la salive sécrétée par les glandes annexes (contenant principalement de l \pm -amylase qui assure un début de dégradation des sucres à pH neutre). Ceci conduit à la formation du bol alimentaire (**Domitille Lardeur,2018**).

L \pm -amylase est une endoglycosidase et une des fonctions majeures de la digestion par cette enzyme est de casser des chaînes glucosidique par hydrolyse des liaisons osidiques en unités de glucose individuelles, qui sont alors livrées par le sang aux cellules qui en ont besoin. L'alpha-amylase débute le processus de digestion. Elle casse les grosses chaines en unités de 2 ou 3 glucoses. Il existe 2 types similaires d'amylases dans l'organisme, une sécrétée dans la salive qui commence son action lors de la mastication, l'autre sécrétée par le pancréas, achève l'action. Enfin, ces unités de 2 ou 3 glucoses (dextrines) seront séparées en molécules de glucose individuelles par des enzymes associées à la paroi intestinale (**Ramasubbu et al. 2003**).

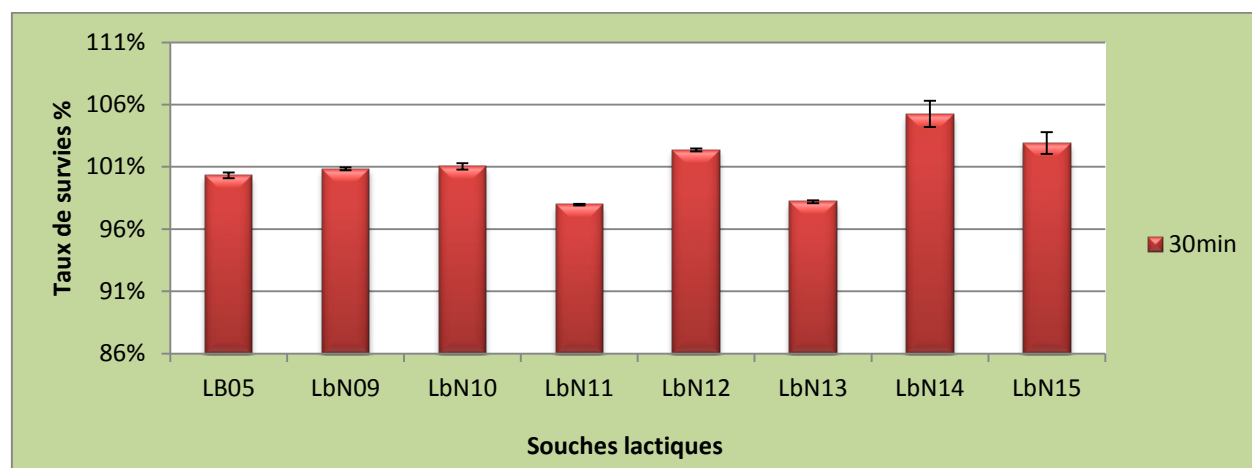


Figure 7 : Taux de survie des souches sous l'action de l'alpha amylase salivaire après 30min d'exposition

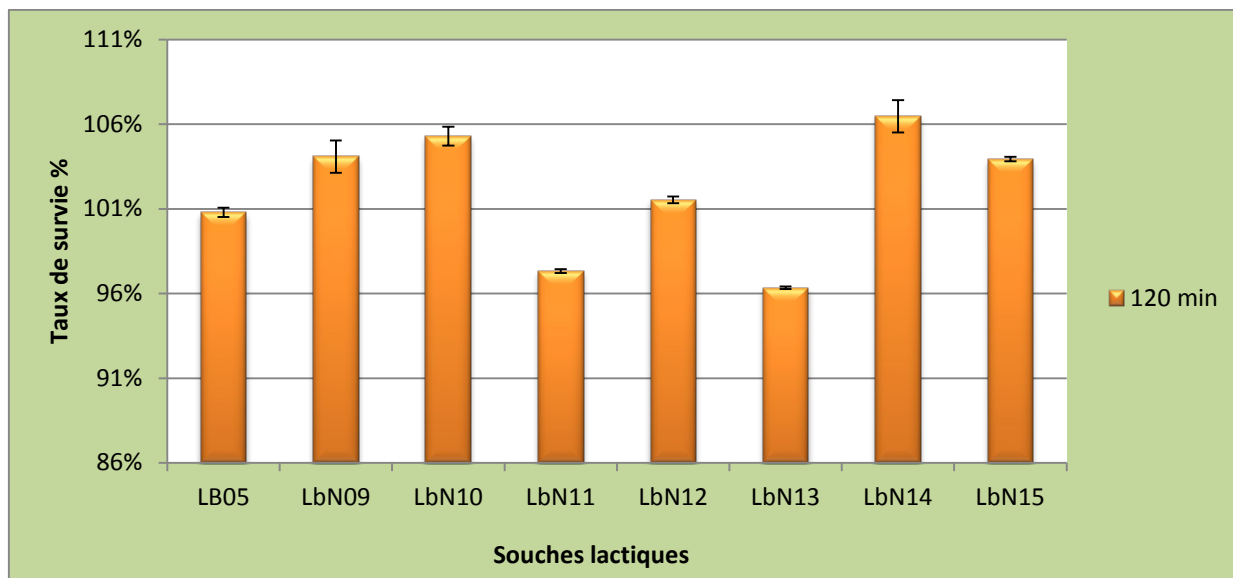


Figure 8 : Taux de survie des souches sous l'action de l'alpha amylase salivaire après 2h d'exposition

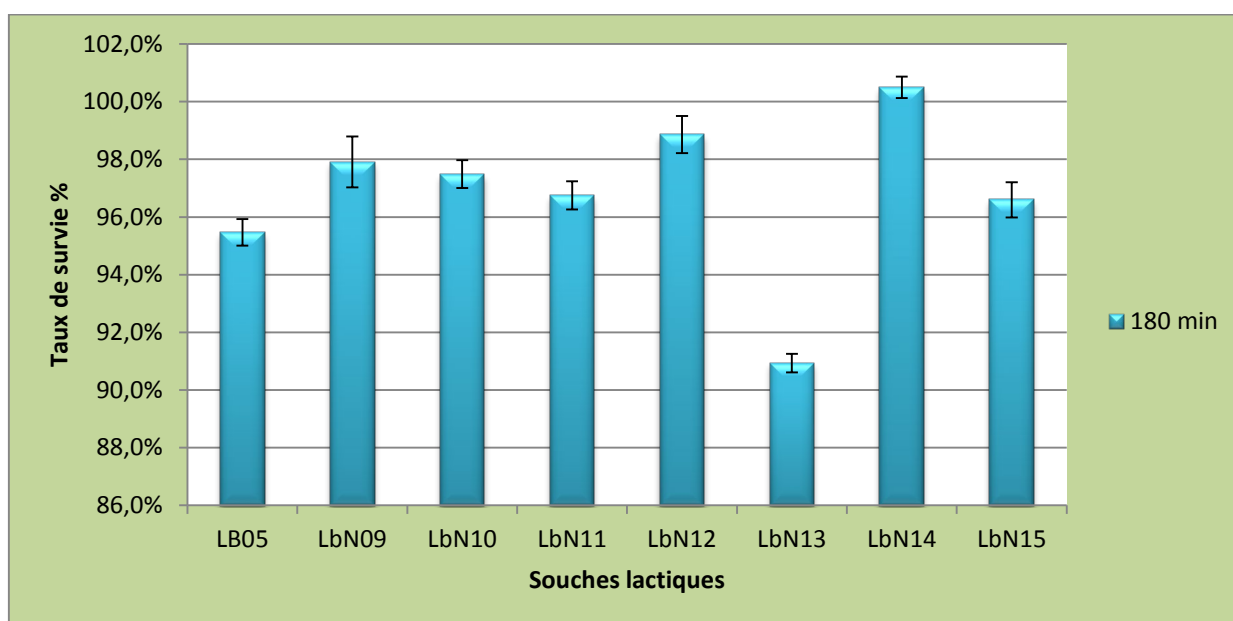


Figure 9 : Taux de survie des souches sous l'action de l'alpha amylase salivaire après 180 min d'exposition

II.2. L'effet du Lysozyme sur la survie des souches lactiques:

Les Résultats obtenus sont représentées par les figures 10 elles montrent clairement une certaine stabilité chez les souches LbN12 et LbN05 à $102 \pm 1.1\%$ à T 30min et T 120 min d'exposition alors que les souches LbN09; LbN10; LbN13 et Lb15 ont diminués de 3% en 2h

de temps par rapport à T30min, et les souches LbN11 et LbN14 démontrent une augmentation du taux de survie de 1%, 2% respectivement avec les charge bactérienne respectives: $5.07 \cdot 10^8$ ufc/l; $5.3 \cdot 10^8$ ufc/l. Ces résultats expriment quand même une bonne tolérance à l'activité enzymatique du lysozyme malgré la baisse de croissance enregistré.

Nos résultats sont en accords avec plusieurs recherches qui ont montré un effet actif du lysozyme sur les bactéries lactiques Gram positif. En effet le lysozyme hydrolyse les liaisons covalentes entre l'acide N-acétyl-muramique avec le 4e atome de carbone du N-acétyl-glucosamine, qui constituent le peptidoglycane (**Wu et al.,2018**).

Par ailleurs, des lysozymes peuvent aussi couper des polysaccharides naturels (ex : chitine) ou synthétique (ex : poly NAG). Aussi, deux modes d'action antibactériens non-enzymatiques (c'est à dire non catalytique et non hydrolytique) du lysozyme ont été proposés. En effet, de nombreux auteurs ont montré que la réduction ou l'élimination de l'activité enzymatique du lysozyme par des traitements dénaturants (chaleur et dithiothréitol, DTT) ou par mutagenèse dirigée ne réduisait pas nécessairement l'activité bactéricide du lysozyme (**Masschalck et Michiels, 2003**).

La résistance de certaines bactéries contre le lysozyme peut s'expliquer par le fait que certaines bactéries aient développé des systèmes de défense leur procurant un avantage sélectif sur les autres. La présence de tels mécanismes peut aider à comprendre les phénomènes de colonisations persistantes (**Dommett et al.,2005**).

Bien que le principe de ces modes de défense ai été proposé depuis de nombreuses années, ce n'est que depuis peu que les mécanismes moléculaires responsables de cette résistance commencent à être identifiés. De ces mécanismes de résistance, 3 catégories de fonctions ont été identifiées (**Hebert Laurent, 2008**) :

✓ l'inhibition de l'action lytique du lysozyme: Certaines bactéries produisent du PG résistant aux muramidases. Les principales modifications connues sont la O-acétylation du NAM et la dé-N-acétylation du NAG. Ces changements provoquent une modification du site de reconnaissance du lysozyme envers son substrat entraînant une réduction de son activité lytique (**Hebert Laurent, 2008**).

l'inhibition de l'action non lytique du lysozyme : Le mode d'action non lytique du lysozyme semble être provoqué soit par l'activation de l'autolyse bactérienne soit par la perturbation de la membrane plasmique. Dans ces deux cas, la première étape consiste en l'attraction

électrostatique du lysozyme chargé positivement par les acides teichoïques et lipoteichoïques et/ou les phospholipides (chargés négativement) de la surface bactérienne. Les mécanismes de défense mis en place par les bactéries ont pour but d'empêcher cette attraction en modifiant la charge ionique pariétale (**Peschael, 2002**).

l'inactivation du lysozyme: certaines bactéries ont la capacité de produire des agents inhibants son action. A ce jour, seuls deux inhibiteurs protéiques ont été clairement identifiés, chez E. coli. le gène "orphelin" (**Monchois et al., 2012**).

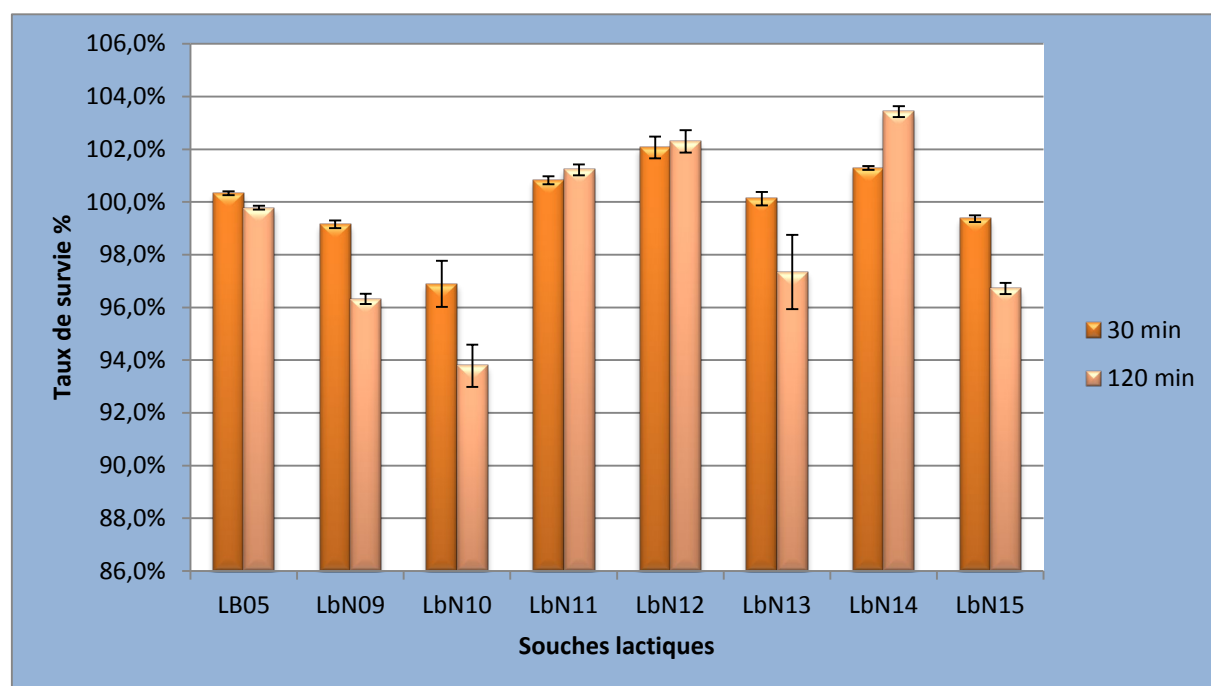


Figure 10 : Taux de survie des souches en présence du lysozyme (100mg/ml) pendant 30min et 2h d'exposition

II.3. L'effet de la Trypsine :

Les Résultats obtenus sont représentés par la figure 11 et expriment une tolérance modérée et différent selon la souche considérée. En effet, les souches LbN09, LbN10 et LbN12, ont affichés des taux de survie de 95.3%; 95.4%; et 95.7% respectivement ce qui représente une diminution de presque 4.3% par rapport au T0. La souche Lb13 ont enregistré une diminution de 5.3% par rapport au temps zéro, avec une charge de $4,5 \cdot 10^8$ ufc/l. Les taux les plus élevés entre [96%-98%] sont enregistrés chez les souches LbN15, LbN14 et LbN05 selon un ordre croissant.

Nos résultats, montrent une très bonne viabilité des souches en présence de la trypsine malgré la baisse enregistré mais qui n'a pas dépassé les 5%, sauf pour la souche LbN11 qui a affiché un taux de survie de 90% ($1.4 \cdot 10^8$ UFC/L) qui reste considérable malgré la baisse de 10%.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs auteurs qui ont enregistré une bonne viabilité des souches lactiques dans différentes conditions intestinale en utilisant des fluides de compositions différentes afin de mimer les différentes parties du tractus intestinale (**Charteris et al.,1998; Musikasang et al.,2009**).

En effet, l'étude de **Bei Zhang et al.(2016)**, ont démontré une très bonne viabilité de 22 souches parmi 69 souches de Lactobacilles isolées à partir de fromage traditionnel du lait du yak tibétain ou les taux de survies enregistrées étaient entre 88% et 98%.

L'intestin grêle est le site principal de l'action des probiotiques et diverses enzymes, acides biliaires et autres substances présentes dans le suc de l'intestin grêle inhibent également la croissance des probiotiques. Par conséquent, la tolérance GIT est un critère important pour la sélection de probiotiques potentiels. Dans la présente étude, lors des tests de tolérance GIT, presque toutes les souches ont montré une meilleure tolérance au suc intestinal simulé que le suc gastrique simulé du fait de la diminution du pH (**Bei Zhang et al.,2016**).

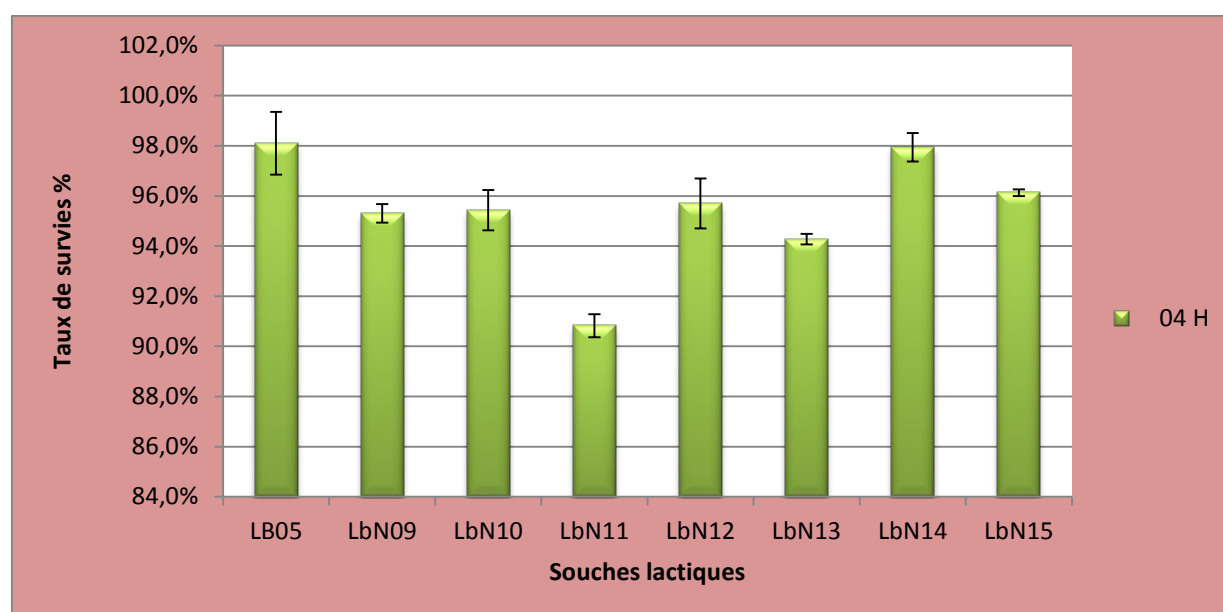


Figure 11 : le taux survie des souches en présence de la trypsine pendant 4h d'exposition

II.4. L'effet de la Pancréatine:

Les Résultats obtenus sont représentés par la figure 12 et expriment une tolérance modérée et différent selon la souche considérée. Toutes les souches expriment une tolérance plus ou moins importante, vu que les taux de survie étaient e94%, le taux de survies le plus élevé est affiché par la souche LbN14 avec de 102% où le dénombrement bactérien a atteint $(4,5 \cdot 10^8$ UFC/L) par rapport au T0. Le taux le plus bas est de 94% enregistré pour la souche LbN11.

Ces résultats restent toujours remarquables et se rapprochent de nombreuses autres études qui ont révélé une bonne viabilité des bactéries lactiques encapsulées ou non, vis-à-vis des fluides pancréatiques *in vitro* (Ziar.,2013; Ziarno *et al.*,2007). De plus, Bao *et al.* (2010) ont rapporté que le liquide pancréatique n'avait pas d'incidence significative sur la survie des bactéries en laboratoire.

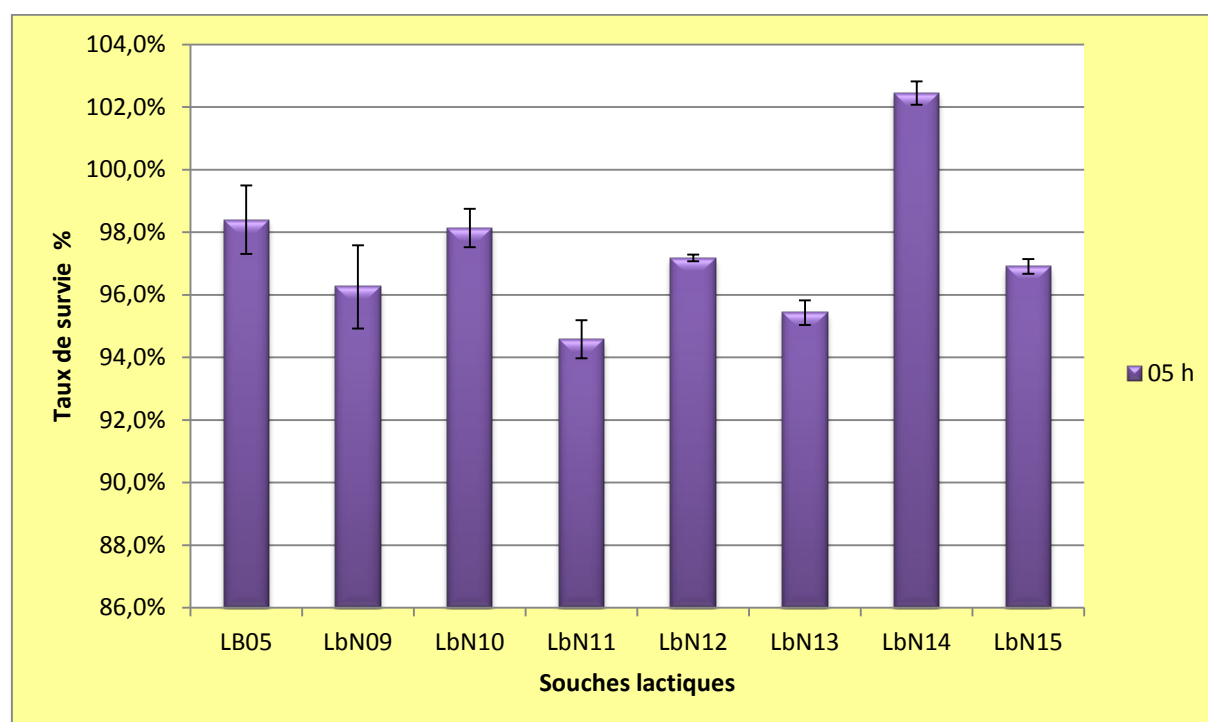


Figure 12 : le taux survie des souches en présence de la pancréatine après 5h d'exposition

En effet, la sécrétion pancréatique est indispensable à la digestion. Le suc pancréatique permet de tamponner le chyme acide par sa sécrétion alcaline (sécrétion de bicarbonates) favorable à l'action des enzymes digestives qu'il sécrète : les protéases ; la trypsine; la chymotrypsine, l'élastase et les carboxypeptidases A et B; l'amylase, et les lipases : la triglycéride lipase, la cholestérol hydrolase, la phospholipase A2 (Domitille Lardeur,2018).

Conclusion

Conclusion:

La digestion concerne l'ensemble des processus au cours desquels les aliments ingérés, sont réduits par hydrolyse enzymatique en nutriments utilisables. Elle met en jeu des enzymes de structures différentes selon la nature chimique des aliments ingérés: protéines, lipides ou hydrates de carbone (glucides). La plupart des études concernant les mécanismes impliqués sont relatives aux mammifères. En effet, les probiotiques sont confrontés à cette barrière digestive, c'est pourquoi nous avons essayé d'évaluer in vitro la survie de quelques souches, 08 exactement, de *Lactobacillus plantarum* en présence des différentes enzymes digestives:

L'effet de l'alpha amylase salivaire n'a pas vraiment influencé la viabilité des souches testées puisque les taux de survie étaient importants entre [97% à 106%]. La souches LbN10 son taux de survie à augmenter de 4% de 30min à 2h pour atteindre une charge de $6.5 \cdot 10^8$ UFC/ L, la souche LbN09 de 3% ($4.30 \cdot 10^8$ UFC/L) , et les souches LbN14 et LbN15, ont montrées une élévation de 1% pour atteindre respectivement [4.10; 4.8] 10^8 UFC/L , par contre les souches LbN12 et LbN05 sont resté presque stables alors que la souche LbN13 à présenter une diminution de 1% avec une charge de ($3,30 \cdot 10^8$ UFC/L).

De même pour l'alpha amylase pancréatique (5h d'exposition), les taux ont diminué de 5 à 10% chez presque toutes les souches et cela peut s'expliquer par l'action combiné à la pepsine par le passage de 03h dans uns suc gastrique simulé (pH=2.5; Pepsine 0.3%), ou les souches étaient confronté non seulement à l'action de la pepsine, mais aussi à l'acidité du milieu ce qui peut déjà être une première barrière gastrique (estomac). les Taux de survies étaient variables selon la souche considéré, et n'ont pas atteint les 100% sauf la souches LbN14 qui a affiché un taux de 100.5% avec une charge bactérienne de $9 \cdot 10^7$ ufc/l.

Les Résultats obtenus avec l'effet du lysozyme expriment aussi une bonne tolérance des souches à l'activité enzymatique malgré la baisse de croissance enregistrée. Les souches LbN12 et LbN05 restent stable avec un taux de survie égale à $102 \pm 1.1\%$ à T 30min et T 120 min d'exposition alors que les souches LbN09; LbN10; LbN13 et Lb15 ont diminués de 3% en 2h de temps par rapport à T30min, et les souches LbN11 et LbN14 démontrent une augmentation du taux de survie de 1%, 2% respectivement avec les charge bactérienne respectives: $5.07 \cdot 10^8$ UFC/l; $5.3 \cdot 10^8$ UFC/l.

Ensuite sous l'effet de la Trypsine, les souches expriment une tolérance modéré et différent selon la souche considéré. En effet, les souches LbN09, LbN10 et LbN12, ont affiché des taux de survie de 95.3%; 95.4%; et 95.7% respectivement ce qui représente une diminution de presque 4.3% par rapport au T0. La souche Lb13 ont enregistré une diminution

de 5.3% par rapport au temps zéro, avec une charge de $4,5 \cdot 10^8$ UFC/l. Les taux les plus élevés entre [96%-98%] sont retrouvés chez les souches LbN15, LbN14 et LbN05 selon un ordre croissant, et le taux le plus bas de 90% ($1.4 \cdot 10^8$ UFC/L) est affiché par la souche LbN11 mais qui reste considérable.

Par ailleurs, toutes les souches expriment une tolérance plus au moins importante sous l'effet de la pancréatine, vu que les taux de survie étaient e94%, le taux de survies le plus élevé est affiché par la souche LbN14 avec T=102% où le dénombrement bactérien a atteint ($4,5 \cdot 10^8$ UFC/L) par rapport au T0. Le taux le plus bas est de 94% enregistré pour la souche LbN11.

Enfin Les résultats obtenus par l'identification de MALDI-TO/MS révèlent la présence de souche de *Lactobacillus Plantarum*, La comparaison des résultats avec l'identification moléculaire démontre clairement la fiabilité de cette technique de spectrométrie MALDI-TOF utilisée et démontre bien que les souches sont pures.

Les souches ont présenté des résultats considérables qui les placent comme des candidates probiotiques de choix et en perspectives, ces souches peuvent être engagées dans d'autres travaux complémentaires pour en explorer les potentialités probiotiques:

- Amélioration de la viabilité par certains systèmes d'encapsulation, ou d'aliments vecteurs,
- Essai in vitro dans des systèmes de tube digestif artificiels,
- Essai in vivo pour évaluer l'effet santé.

Références bibliographiques

A

- **Ahren, I.L., Jie, X., O' nning, G., Olsson, C., Ahrne', S., Molin, G., (2014).** Antihypertensive activity of blueberries fermented by *Lactobacillus plantarum* DSM 15313 and effects on the gut microbiota in healthy rats. *Clin. Nutr.*, 1–14.
- **Arasu, M.V., Kim, D.H., Kim, P.I., Jung, M.W., Ilavenil, S., Jane, M., Lee, K.D., Al-Dhabi, N.A., Choi, K.C., (2014).** In vitro antifungal, probiotic and antioxidant properties of novel *Lactobacillus plantarum* K46 isolated from fermented sesame leaf. *Ann. Microbiol.* 64 (3), 1333–1346.
- **Abrams CK, Hamosh M, Lee TC, Ansher AF, Collen MJ, Lewis JH, et al.** Gastric lipase : localization in the human stomach. *Gastroenterology* (1988) ; 95 : 1460-4.

B

- **Bahri Fatiha., (2014).** isolement et caractérisation des souches De lactobacilles a caracteres probiotiques A partir de selles d'enfants Université Constantine.
- **2014 Reid et al.,** 2003, Hsieh et Versalovic, 2008 ; Vasiljevic et Shah, 2008.
- **Bergey et Boone, (2009).** *Lactobacillus plantarum*: An overview with emphasis in biochemical and healthy propertie.
- **Bizzini A., Greub G. (2010).** MALDI-TOF MS, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect.* 16:1614-9.
- **Brinques, G.B., Ayub, M.A.Z. (2011).** Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering* 103, 123-128.
- **Botes, M., van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. (2008).** Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastrointestinal model with infant milk formulations as substrate. *International Journal of Food Microbiology* 128, 362-370.
- **Ben Ali, Y., R. Verger and A. Abousalham (2012).** "Lipases or esterases: does it really matter? Toward a new bio-physico-chemical classification." *Methods Mol. Biol.* 861: 31-51.
- **Badis A., Laouabdia-sellanti N., GUetarine D., Kihal M. et Ouzrout R.(2005)**

Caractérisation phénotypique des bactéries lactique isolées a partir de lait cru de chèvre de deux population caprines locales ‘ Arabia et Kabyles’’. Sci et Technol23 : 30-37.

- **Bruno Ebel,(2014)** Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz.

C

- **Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT. & Danziger LH. (2005).** Pathogenic relevance of *Lactobacillus* : a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin microbiol infect Dis.*24 ,31-40.
- **Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK (1998).** Antibiotic susceptibility of Potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food. Prot.* 61: 1636–1643.
- **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.
- **Chiu, Y.-H., Lu, Y.-C., Ou, C.-C., Lin, S.-L., Tsai, C.-C., Huang, C.- T., Lin, M.-Y., (2013).** *Lactobacillus plantarum* MYL26 induces endotoxin tolerance phenotype in Caco-2 cells. *BMC Microbiol.* 13, 190.
- **Claesson M. J., van Sinderen D and O'Toole P. W.(2008).** *Lactobacillus* phylogenomics – towards a reclassification of the genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 58 (12): 2945-2954
- **Conway P.L. Conway, S.L. Gorbach, B.R. Goldin,** Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells, *Journal of Dairy Sciences* 70 (1) (1987)1-12.

D

- **Delgado A., Dulce B., Pedro F., Cidalia P.J. et Fegueiredo M. (2001).** Antimicrobial activity of *L. plantarum* isolated from a traditional lactic fermentation of table olives *Lait* 81 : 203-215.
- **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.
- **De Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M., de Vos, W.M. (2006).** Lactobacillus plantarum—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal.* 16, 1018-1028
- **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.
- **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
- **Dimitrovski, D., Cencic[✓], A., Winkelhausen, E., Langerholc, T., (2014).** Lactobacillus plantarum extracellular metabolites: in vitro assessment of probiotic effects on normal and cancerogenic human cells. *Int. Microbiol. J.* 39 (2), 293–300.
- **Dubois D., Leysse D., Chacornac J.P., Kostrzewa M., Schmit P.O., Talon R. et al.(2010).** Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 941–945.
- **Doyle P and Meng J. (2006).** Bacteria in Food and Beverage Production. Chapter 3.5. Prokaryotes. 1: 797:811.
- **Dommett, R., M. Zilbauer, J. T. George, et M. Bajaj-Elliott. (2005).** Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. *Mol. Immunol.* **42**:903-912.
- **Domitille Lardeur., (2018).** L'intérêt de l'utilisation des probiotiques dans certaines affections de la petite enfance Faculté de Pharmacie de Lille Année Universitaire 2017/2018.
- **Dufresne M. Physiologie du pancréas exocrine. (2012),** EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) –Hépatologie article 7-007-A-40 9p.
- **Dupin H. (1992)** Alimentation et nutrition humaines (Editions : ESF).

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.
- **Forsythe, P., Chew, M.V., Escaravage, E., Savignac, H.M., Dinan, T.G., Bienenstock, J. and Cryan, J.F. (2011)** Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 16050-16055

G

- **Ganzele G, Michael, Alexndra Holtzel, Jens Walter, Gunther Jung, Et Walter P, Hammes. (2000)**. Characterization of Rentericyclin Product By *Lactobacillus Reuter* Lth 2584. *Appl And environ, Microbiol.* 4325-4333.
- **Guessas B. et Kihal M., (2004)**. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African J. Biotechnol.* 3(6) : 339-342
- **Godward, G., K. Sultana, K. Kailasapathy, P. Peiris, R. Arumugaswamy and N. Reynolds (2000)**. "The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods " *Milchwissenschaft* 55(8): 441-445.
- **Golowyc et al. (2010)** Michida et al., 2006; Jiménez-Pranteda et al., 2011.

H

- **Hofmann AF, Borgstrom B (1963)**. Hydrolysis of long-chain monoglycerides in micellar solution by pancreatic lipase. *Biochim Biophys Acta*; 70: 317-31.

I

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

J

- **Jamaly N, Benjouad A, Bouksaim M.** (2011). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from known popular traditional Moroccan dairy products. *British microbiology research Journal*. 1(4) 79-94.

K

- **Kandler O. et Weiss N.** (1986). genus *lactobacillus*. In : Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée. Université d'Oran. 1- 156p. Edité par. Mami A.
- **Kannahi, M. and Viji, N.** (2014) Isolation and Characterization of Bacteriocin Producing Lactobacilli from Dairy Butter Sample. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* , 29, 183-186.
- **Khelili kaoutar, (2015).** Application des outils biomoléculaires 16S, MALDI-TOF et métagénomique pour la détermination des variantes taxonomiques bactériennes telluriques Université des frères Mentouri Constantine p 12.
- **KECHAOU Noura (2012).** Identification de nouvelles souches probiotiques à propriétés immuno-modulatrices et anti-oxydantes, L'Université Paris Sud
- **Kleerebezem, M., Hugenholtz, J.** 2003. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (2), 232-237.
- **Ku, H.-K., Lee, H., Choi, I.D., Ra, J.-H., Kim, T.-Y., Jeong, J.-W., Kim, S.-H., Sim, J.-H., Ahn, Y.-T.,** (2014). Immuno-stimulatory effect of *Lactobacillus plantarum* HY7712 via toll-like receptor 2 signaling pathway. *Cytokine* 70 (1), 52.
- **Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G., 2008a.** Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresour. Technol.*, **99**; 2364–2372.
- **Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R., Bhalla T.C., 2008b.** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.*, **3**(12); 661–672.

L

- **Liu, C., Zhang, Z.-Y., Dong, K., Yuan, J.-P., Guo, X.-K., (2009).** Antibiotic Resistance of Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Marketed Foods and Drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*. 22, 401-412

- **Li, C., Nie, S.-P., Ding, Q., Zhu, K.-X., Wang, Z.-J., Xiong, T., Gong, J., Xie, M.-Y.,** (2014). Cholesterol-lowering effect of *Lactobacillus plantarum* NCU116 in a hyperlipidaemic rat model. *J. Funct. Food* 8, 340–347.
- **Laurent Hébert, (2008).** Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Caen, 2008. Français. tel-00787051
- **Laurent beaugerie et Harry sokol ., (22 octobre 2014).** CDU-HGE, la Collégiale des universitaires en hépato-gastro-entérologie. les fondamentaux de la pathologie digestive, Editions Elsevier-Masson.

M

- **Maier T., Klepel S., Renner U., Kostrzewa M. (2006).** Fast and reliable MALDI-TOF MS based microorganism identification. *Nat. Methods*. 3
- **Marteau P., Minekus M., Havenaar R., Huis In't Veld J.H.J.,** Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80, 1031-1037
- **Martiny D., Dediste A., Debruyne L., Vlaes L., Ben Haddou N., Vandamme P.** (2010). Accuracy of the API Campy System, the Vitek 2 *Neisseria Haemophilus* (NH) Card and the matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS) for the identification of *Campylobacter* and related organisms. *Clin. Microbiol. Infect.* 17: 1001-6.
- **Maitre M., Blicklé J.-F.** Métabolismes hépatiques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), hépatologie, 7-005-B-10, 2008.
- **Masuda, T., N. Ide, and N. Kitabatake. (2005).** Structure-sweetness relationship in egg white lysozyme: role of lysine and arginine residues on the elicitation of lysozyme sweetness. *Chem. Senses* 30:667-681.
- **Mariadhas Valan Arasu , un Naif Abdullah Al-Dhabi , un Soundharrajan Ilavenil , b Ki Choon Choi , b, et Srisesharam Srigopalram b (2015).** Importance *in vitro* de *Lactobacillus plantarum* probiotique en relation avec le domaine médical.
- **Margaret E. Smith, doctorante en sciences , Dion G. Morton (2010),** docteur en sciences , dans *The Digestive System* (Deuxième édition) .

- **Marteau, P. and F. Shanahan. 2003.** Basic aspects and morphology of probiotics: An overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. Baillieres's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology 17:725- 740
- **Malinen E,(2002).** Molecular methods for detection of probiotics and intestinalmicrobiota and evaluation of lactobacillus brevis as a potentiel probiotic dieataryadjunct.University of Helsinki. 65p.
- **Masschalck, B., et C. W. Michiels,(2003).** Antimicrobial properties of lysozyme in relation toFoodborne vegetative bacteria. Crit. Rev. Microbiol. **29**:191-214.
- **Maier T., Klepel S., Renner U., Kostrzewa M. (2006).** Fast and reliable MALDI-TOF MSbasedmicroorganism identification. *Nat. Methods.* **3**: i-ii.
- **Monchois, V., C. Abergel, J. Sturgis, S. Jeudy, and J.-M. Claverie. (2001).** *Escherichia coli ykfE* ORFan gene encodes a potent inhibitor of C-type lysozyme. J. Biol. Chem. **276**:18437-18441.
- **Melgar-Lalanne Lactobacillus plantarum:** An overview with emphasis in biochemical and healthy Properties.
- **Molin G et al. (1993)** Numerical taxonomy of Lactobacillus spp associated with health and diseased mucosa of the human intestines. J. Appl. Bacteriol.74 (3) : 314-23).
- **Moreau H, Laugier R, Gargouri Y, Ferrato F, Verger R. Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. Gastroenterology 1988 ; 95 : 1221-6.**
- **Murofushi, Y., Villena, J., Morie, K., Kanmani, P., Tohno, M., Shimazu, T., Aso, H., Suda, Y., Hashiguchi, K., Saito, T., Kitazawa, H., (2015).** The toll-like receptor family protein RP105/ MD1 complex is involved in the immunoregulatory effect of exopolysaccharides from Lactobacillus plantarum N14O. Mol. Immunol. 64 (1), 63–75.
- **Mala B. Rao , Aparna M. Tanksale , Mohini S. Ghatge et Vasanti V. Deshpande., (Septembre 1998).** Aspects moléculaires et biotechnologiques des protéases microbiennes. 62 (3): 597 à 635..
- **Mokhtar Benreguieg et Fatiha Dalache, et Bouabdelah Gacemi (2019).** Characterization of Antibacterial Activity and Potential as Probiotic of Lactic Acid Bacteria Isolated from Goat's Milk in Algeria. August 2013, Vol. 7, No. 8, pp. 802-813 Journal of Life Sciences, ISSN 1934-7391, USA.

O

- **Ouwehand AC, Nermes M, Collado MC, Rautonen N, Salminen S, Isolauri E :** Specific probiotics alleviate allergic rhinitis during the birch pollen season. *World J Gastroenterol* ; 2009 Jul 14 ; 15(26) : 3261-8.

P

- **Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G.E., Torriani, S., 2010.** Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology*. 144, 270-279.
- **Payan et al, (1997)** . Structure of a pancreatic α -amylase bound to a substrate analogue at 2.03 Å resolution; *Protein Sci*. Volume 6, pp 2285-2296.
- **Perry JJ, Staley JT, Lory S (2004).** Bactéries Gram-Positives : Firmicutes et Actinobacteria. *In: « Microbiologie »*. Dunod éd., Paris. France. pp. 471-50
- **Percival M. (1997).** Choosing a probiotic supplement. *Clin. Nutr. Insights.*, 6(1), 9100.
- **Prescott LM, JP Harley et DA Klein. (2003).** Les bactéries lactiques : les Gram – positifs pauvres en GC. Dans : microbiologie, 2eme éd.francaise.Prescott, L.M.,M-P-Harley,D.A.Klein (eds). De Book Université,Bruxelles,Belgique.,5A-535
- **Pelmont J., 1995.** Enzymes : catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. pp. 7; 621; 652–654.
- **Peschel, A. (2002).** How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* 10:179-186.
- **Perry JJ, Staley JT, Lory S (2004).** Bactéries Gram-Positives: Firmicutes et Actinobacteria. *In: « Microbiologie »*. Dunod éd., Paris. France. pp. 471-50.
- **Proctor, V. A., and F. E. Cunningham. 1988.** The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 26:359-395.
- **Phillips, D. C. 1966.** The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci. Am.* 215:78-90.

R

- **Ramasubbu N., Rangunath C., Mishra P.J. (2003).** Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase.in *J.Mol.Biol.* n°325 pages 1061-1076.

- **Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**; 597–635.
- **Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK (2003).** Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clin. Micro. Rev.* 16(4): 658–672.

S

- **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., 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.
- **Siezen, R., van Hylckama Vlieg, J. (2011).** Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum* a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories.* 10, 1-13.
- **Stevenson, C., Blaauw, R., Fredericks, E., Visser, J., Roux, S., (2014).** PP137-SUN: randomized clinical trial: effect of *Lactobacillus plantarum* 299V on symptoms of irritable bowel syndrome. *Clin. Nutr.* 33 (1), S7.
- **Sternby B, Nilsson A, Melin T, Borgstrom B. (1991)** Pancreatic lipolytic enzymes in human duodenal contents. Radioimmunoassay compared with enzyme activity. *Scand J Gastroenterol* ; 26 : 859-66.

T

- **Tailliez P. (2001).** Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait*, 81 : 1-11
- **Tahlaiti hafida (2019).** Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté. universite abdelhamid ibn badis mostaganem

- **Todorov, S.D., (2009).** Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. *Brazilian Journal of Microbiology.* 40, 209-221
- **Todorov, S.D., Ho, P., Vaz-Velho, M., Dicks, L.M.T. (2010).** Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Science.* 84, 334-343.

V

- **Verger, R., Moreau, H., Gargouri, Y., Laugier, R., Bernadac, A., Moulin, A., Ferrato, F., Rogalska, E., Carrière, F., Ransac, S. and Rivière, C. (1989)** Lipases of the digestive tract: Biochemical and physiological aspects. *Biol Chem Hoppe-Seyler,* 370, 989-990.

W

- **Wang, Q., Cai, R.-P., Ye, L.-P., Hu, J.-T., Zhou, J.-Y., Wang, C.- F., Li, Y., (2014).** Immunoprotection against influenza virus H9N2 by the oral administration of recombinant *Lactobacillus plantarum* NC8 expressing hemagglutinin in BALB/c mice. *Virology* 464–465,166–176
- **Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Dong, M., (2014).** Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *Int. J. Biol. Macromol.* 63, 133–139
- **Woo, J.-Y., Gu, W., Kim, K.-A., Jang, S.-E., Han, M.J., Kim, D.-H., (2014).** *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 ameliorates memory impairment and inflammaging in a D-galactose-induced accelerated aging mouse model. *Anaerobe* 27, 22–26. Shi, S.-H., Yang, W.-T., Yang, G.-L., Cong, Y.-L., Huang, H.-B.,
- **Welker M., Moore E.R.B. (2011).** Applications of whole-cell matrix-assisted laserdesorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst.Appl. Microbiol.* 34: 2–11.
- **Wunwissa K, Bhesh B, et Hilton D. (2003):** Evaluation of encapsulation techniques of Probiotics for yoghurt. *Inter Dairy J.* 13: 3-13.
- **Whitcomb DC, Lowe ME. 2007.** Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci* 52:1–17.

- **Widmaier E-P., Raff. H, Strang.K-T. (2013).** Physiologie humaine VANDER - Les mécanismes du fonctionnement de l'organisme.
- **Wu, X., H. Yang, D.W. Waugh, C. Orbe, S. Tilmes, and J.-F. Lamarque, (2018).** Spatial and temporal variability of interhemispheric transport times. *Atmos. Chem. Phys.*, **18**, 7439-7452, doi:10.5194/acp-18-7439-2018.

Z

- **Zago M, Fornasari M. E., Carminati D, Burns P, Suárez V, Vinderola G, Reinheimer J and Giraffa G. (2011).** Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantaru*
- **Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K., Gill, H.S., (2005).** Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 98, 211-217.
- **Zhu, H., Hart, C.A., Sales, D., Roberts, N.B.,(2006).** Bacterial killing in gastric juice – effect of pH and pepsin on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 55, 1265-1270
- **Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K., Gill, H.S.,(2005).** Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 98, 211-217.
- **Ziar.,(2013)** contribution à l'amélioration de la survie bactéries lactiques d'intérêt assimilatrices de cholestérols.
- **Ziarno M., Bartosz P (2007).** Investigation into cholesterol binding by yoghurt bacteria in model intestinal juice. { ywno[, (in press).

ANNEXE :

Composition des milieux de cultures et solutions

Milieu MRS

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, 7 H ₂ O	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H ₂ O	0.5g
Agar	15g
Eau distillée.....	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

(pH 6.5)

Gélose Nutritive

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCL	15g
Glucose	10g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml

Autoclavage 15min à 120°C

Tampon phosphate PBS

Na ₂ HPO ₄	17,81g/l
KH ₂ PO ₄	13,697g/l
Eau distillée	1000 ml

Stérilisation à 120 pendant 20mn

Ph = 7 ±0.2

L'eau physiologique

Chlorure de sodium..... 8.5g
Eau distillé1000ml

Ph=7

Stérilisation à 120 pendant 20mn

Solution NaCl 9‰ :

NaCl 9g

Eau distillée 1000ml

Stérilisation par autoclave à 120°C pendant 15 minutes

Suc gastrique

Glucose..... 3.5g

NaCl2.05g

KH₂PO₄.....4 0.6g

CaCl₂ 0.11g

KCl0.37g

Pepsine13.3g

L'eau distillée1000ml

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:

La présente étude vise à évaluer in vitro l'effet des enzymes digestives du tractus gastro-intestinal (à savoir: l' α -amylase salivaire et pancréatique, le lysozyme, la trypsine et la pancréatine), contre la survie de 08 souches de *Lactobacillus plantarum* (LbN05, LbN09, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14, et LbN15) isolées localement à partir du lait de vache, dans le but de leur attribuer le potentiel probiotique. Les souches ont exprimé des taux de survie importants en présence des différentes enzymes testées, ils étaient variables selon la souche considérée, et le taux le plus élevé à été enregistré chez la souche LbN14 ($T \geq 100 \pm 2\%$). Les souches ont également fait l'objet d'une seconde identification par une nouvelle technique protéomique, la spectrométrie de masse MALDI-Tof, dans le but est de s'assurer de la pureté des souches revivifiées.

Mots clés: Bactéries lactiques, *Lactobacillus plantarum*, Probiotique, Enzymes digestives, Tractus gastro-intestinale, Digestion.

Abstract:

The present study is about in vitro evaluation of the effect of gastrointestinal tract digestive enzymes (named: salivary and pancreatic α -amylase, lysozyme, trypsin and pancreatic) on the survival of 08 strains of *Lactobacillus plantarum* (LbN05, LbN09, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14 and LbN15) isolated locally from cow's milk, for determination of the strains probiotic potential. The survival rates were important and variable according to the strain; the best survival rate is attributing to the LbN14 strain with: ($T \geq 100 \pm 2\%$). The strains were also the subject of a second identification by a new proteomic technical, the MALDI-Tof mass spectrometry, in order to ensure the purity of the revived strains.

Key words: Lactic bacteria, *Lactobacillus plantarum*, Probiotic, Digestive enzymes, gastrointestinal tract, Digestion.

الملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم تأثير الإنزيمات الهاضمة في الجهاز الهضمي ومن بين هذه الإنزيمات: (إنزيم ألفا أميلاز اللعابي و البنكرياسي، الليزوزيم، التربسين و البنكرياتين)، على تعايش 08 سلالات من *Lactobacillus plantarum* (LbN05, LbN09, LbN10, LbN11, LbN12, LbN13, LbN14, LbN15) المعزولة محليا من حليب البقر، وذلك لتحديد إمكانياتها البروبيوتكية. و لقد تم تسجيل معدلات مهمة ومنغيرة وفقا لمقاومة كل سلالة، وسجل أعلى معدل على عند السلالة LbN14 (حيث بلغ معدلها $\leq 100 \pm 2\%$). وكانت السلالات أيضا موضوع تحديد ثاني بواسطة تقنية بروتينية جديدة، هي مقياس الطيف الكتلي MALDI-TOF وذلك من جل ضمان نقاء السلالات التي تم تنشيطها من جديد.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية، *Lactobacillus plantarum*، البروبيوتيك، الإنزيمات الهاضمة، الجهاز الهضمي، الهضم.