

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 BIOLOGIE

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDE

Présenté par

MANSOURI CHAREF ET BOUHARIS HICHAM

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité: Microbiologie Appliquée**

THÈME

*Résistance Des Bactéries Lactiques Isolées a  
partir De Sardina Pilchardus Aux Conditions  
Digestives Simulées*

Soutenu publiquement le 02/07./2019

DEVANT LE JURY

Président	M. Djibaoui Rachid	professeur	U. Mostaganem
Encadreur	Mlle Yahla Imene	MCB	U. Mostaganem
Examinatrice	Mme. Kouadri boudjelthia Nacima	MAA	U. Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire De Microbiologie N°01*

## Table des matières

Dédicace .....	I
Remerciements .....	II
Résumé .....	III
Listes tableaux.....	IV
Liste des figures.....	V
Liste des abréviations.....	VI
Introduction .....	01

### Partie 1 : Synthèse bibliographique

#### Chapitre I :

#### Les Bactéries Lactiques

1. Généralité .....	02
2. Origine et habitat .....	02
3. Taxonomie des bactéries lactiques.....	03
4. Métabolisme des bactéries lactiques.....	05
4.1 La voie homofermentaire ou voie d'Embden Meyerhoff Parnas (EMP) .....	06
4.2 La voie hétérofermentaire .....	06
5. Propriétés technologiques des bactéries lactiques .....	07
5.1 Aptitude acidifiante .....	07
5.2 Dans le domaine thérapeutique .....	08
5.3 Aptitude Antagonistes .....	08

#### Les probiotiques

1. Généralité .....	09
1. Classification des probiotiques .....	09
2.1 Les bactéries lactiques .....	09
2.2 Les bactéries non lactiques .....	09
2.3 Les levures .....	09
3. Les critères de sélection .....	10

4. Résistance des probiotiques aux sécrétions gastriques et bilio-pancréatiques .....	12
5. L'adhésion aux cellules épithéliales .....	12
6. Utilisation des probiotiques en santé humain .....	13

## **Chapitre II :**

### **Biologie de la sardine (*Sardina pilchardus*)**

II.1 Taxonomie .....	14
II.2 Répartition .....	14
II.3 Morphologie et comportement .....	15
II.4 Distribution géographique .....	16
II.5 Croissance.....	16
II.6 Reproduction .....	17
II.7 Régime alimentaire .....	17

## **.Chapitre III :**

### **Tractus gastro-intestinal**

III.1. Généralités .....	18
III.2. Flore intestinale .....	18
III.3. Composition du tractus digestif de l'homme .....	19
III.4. Facteurs influençant la microflore intestinale au cours de la vie.....	20
III.5. Mucus et défensives .....	22
III.6. Les enzymes digestives .....	22
III.7. Système immunitaire intestinal .....	22
III.8. Alimentation .....	23
III.9. Rôle du tractus digestif et sa microflore .....	23

## **Partie II : études expérimentale**

### **Chapitre iv : matériels et méthodes :**

IV.1. L'objectif du travail.....	24
IV.2. Lieu du travail .....	24
IV.3. Matériels utilisés .....	24
IV. 3.1. Les milieux de culture .....	24

IV.3.2. Les réactifs chimiques.....	24
IV.3.4. Appareillage utilisé.....	24
IV.4. Méthodes .....	24
IV.4.1.échantillonnage .....	24
IV.4.2. Isolement des bactéries lactiques .....	25
IV. 4.2.1 Purification des souches .....	25
IV.4.3 Pré-identification des isolats .....	25
IV.4.3.1 Caractérisation macroscopique.....	25
IV.4.3.2 Caractérisation microscopique .....	25
IV.4.3.3.Test de la catalase .....	26
IV.4.3.4. Conservation des isolats .....	26
IV.4.3.4.1 Conservation de courte durée .....	26
IV.4.3.4.2 Conservation de longue durée .....	26
IV. 5. Réactivation des souches .....	26
IV. 6. Survie aux conditions digestives simulées.....	27
IV. 6.1 Effet de l'α amylase salivaire .....	27
IV. 6.2. Mesure de la tolérance des souches vis-à-vis du jus gastrique et du pancréas et de la bile.....	27
IV. 6.2.1. Compartiment Estomac .....	27
IV.6.2.2 Compartiment Pancréas .....	27
IV. 6.2.3 Compartiment Intestin .....	28
IV.7. Identification Biochimiques La galerie API 20 A .....	28
<b>Chapitre v : résultats et discussion</b>	
V.1. Pré identification des isolats .....	29
V.1.1. Caractérisation macroscopique .....	29
V.1.2. Caractérisation microscopique .....	29
V.2. Tests physiologiques .....	30
V.2.1.Recherche de catalase .....	30
V.3. Survie aux conditions digestives simulées .....	30
V.3.1. Effet de l'α- amylase salivaire .....	30

V.3.2. Mesure de la tolérance des souches testées vis-à-vis du jus gastrique, de la pancréatine et de la bile .....	32
V.3.2.1. Compartiment Estomac .....	32
V.3.2.2. Compartiment Pancréas .....	33
V.3.2.3. Compartiment Intestin .....	34
Conclusion .....	35
Annexes.....	
Références bibliographiques .....	

# *Dédicace*

*C'est avec immense fierté et respect que je dédie ce modeste travail :  
A ceux qui donnent un sens à mon existence, à la lumière de mes yeux  
en témoignage de votre affection et de votre amour, pour votre  
patience et votre soutien pendant les moments que j'ai traversé,  
A ma très chère **mère** et Mon très cher **père**.  
J'espère Que dieu vous protège et vous garde.*

*A mes très chers frères et sœurs ali, benaouda, khadidja, safaa,*

*A mon binôme : mansouri charef*

*A ma chère amie , Ahlem*

*A mes meilleurs amis qui m'ont toujours ouvert les portes de l'espoir :*

*Houcine, Walid, Soufiane, karim, Hamid ali.*

*A mes ami(e)s de la promotion de master Microbiologie Appliquée*

*A tous ceux qui ont pris place dans mon coeur et à tous ceux qui  
m'ont aidé de près ou de loin*

***Hicham***

# *Dédicace*

*C'est avec immense fierté et respect que je dédie ce modeste travail :  
A ceux qui donnent un sens à mon existence, à la lumière de mes yeux  
en témoignage de votre affection et de votre amour, pour votre  
patience et votre soutien pendant les moments que j'ai traversé,*

*A ma très chère **mère** et Mon très cher **père**.*

*J'espère Que dieu vous protège et vous garde.*

*A mes très chers frères : Habib, Djilali, Kacem*

*A mon binôme : Bouharis Hicham.*

*A mes meilleurs amis qui m'ont toujours ouvert les portes de l'espoir :*

*Houcine, Walid, Soufiane, karim, Hamid, Al.Fatima, Sabah, Maria,*

*Lilia, Yasmin, Soltana.*

*A mes ami(e)s de la promotion de master Microbiologie Appliquée*

*A tous ceux qui ont pris place dans mon coeur et à tous ceux qui*

*m'ont aidé de près ou de loin*

***Charef***

## ***Remerciements***

*Je tiens à présenter mes sincères remerciements à mon Professeur consultant : **Dr. yahla Imène** pour son aide précieuse et ses conseils constructifs apportés au cours de l'élaboration de ce projet de fin d'étude, ainsi qu'à tous les professeurs du département de Biologie qui ont contribué à ma formation durant ce cycle.*

*Nous remercions **M. Djibaoui.R** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous remercions également **Mme. Kouadri boudjelthia Nacima** d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Enfin, je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail dans de meilleures conditions.*

**« Merci »**

***Charef et Hicham***

## Résumé

L'objectif de ce travail, est l'évaluation in vitro de la survie de ces deux souches lactiques, la souche S1 isolée à partir de *Sardina pilchardus* et la souche probiotique Bb12, dans des conditions digestives simulées à savoir : la salive, l'acidité, suc gastrique (pepsine 0.3 % p/v), la pancréatine 0.1%, et présence de sels biliaires à 0.3%. Les résultats fournis par l'étude in vitro de la survie de ces deux souches S1 et Bb12 dans les différentes conditions digestives, sont intéressants. Les bactéries lactiques testées ont affiché une résistance remarquable vis-à-vis des conditions hostiles de tractus gastro-intestinal : acidité, pepsine, sels biliaires. La souche S1 présente un taux de viabilité supérieur à 100% par rapport à la souche Bb12.

**Mots clé :** Bactéries lactiques, *Sardina pilchardus*, alpha amylase, suc gastrique, sels biliaires, tractus gastro-intestinal.

## Abstract

The aim of this work is the in vitro evaluation of the survival of two lactic strains, the strain S1 isolated from the marine fish *Sardina pilchardus* and the probiotic strain Bb12 under simulated digestive conditions, namely: saliva, acidity, gastric juice (pepsin 0.3% w / v), pancreatin 0.1%, and the presence of bile salts with 0.3%. The results provided by both the two strains S1 and Bb12 under different digestive conditions are interesting. The tested lactic acid bacteria has shown a remarkable resistance against the hostile conditions of the gastrointestinal tract: acidity, pepsin, bile salts, the S1 strain has a good resistance to these digestive conditions by a viability rate greater than 100% compared to the Bb12 strain.

**Key words:** Lactic bacteria, *Sardina pilchardus*, alpha amylase, digestive tract, biliary salts gastrointestinal tract.

## المخلص:

الهدف من هذا العمل هو المتابعة في المختبر لنمو سلالتين من بكتيريا حمض اللبن سلالة S1 و سلالة Bb12 معزولة من سمك السردين *Sardina pilchardus* في شروط هضمية محفزة : كالعاب , الحموضة , عصير المعدة , (الببسين 0.3%) , البنكرياتين (0.1%).

النتائج المتحصل عليها من دراسة هذه السلالتين سلالة S1 و سلالة Bb12 في مختلف الشروط الهضمية مهمة جدا.

البكتيريا المدروسة سجلت لنا مقاومة ملحوظة ضد الظروف الغير الملائمة في الجهاز الهضمي : حموضة , الاملاح الصفراوية. السلالة S1 سجلت نسبة عالية فاقت (100%) في استمرارية و قابلية الحياة مقارنة مع السلالة Bb12.

**الكلمات المفتاحية :** بكتيريا حمض اللبن , *Sardina pilchardus* , الحموضة. عصير المعدة , الاملاح الصفراوية , الجهاز الهضمي.

### Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	les Principaux micro-organismes utilisés comme agents probiotiques.	10
Tableau 02	critères de sélection des probiotiques.	11

## Liste des Figures

Figure	Titre	Page
Figure 01	Arbre phylogénique des bactéries lactiques avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i> .	05
Figure 02	les principales voies métaboliques chez les bactéries lactiques.	06
Figure 03	voies métaboliques homofermentaire, hétéro fermentaire et bifide de la dégradation du glucose.	07
Figure 04	Les différentes étapes du mécanisme d'adhésion aux cellules épithéliales	13
Figure 05	Morphologie générale de la sardine, <i>Sardina pilchardus</i> .	15
Figure 06	Répartition géographique de <i>Sardina pilchardus</i> .	16
Figure 07	Anatomie du tube digestif humain.	19
Figure 08	Aspect macroscopiques de bactéries lactiques isolées a partir de poisson sardina pilchardus sur milieu MRS solide a 37 °C	29
Figure 09	Aspect microscopiques des coques lactiques après une coloration de Gram (Gx100).	30
Figure 10	résultat du test de catalase.	30
Figure 11	Survie des souches S1 et Bb 12 après 4 heures d'incubation à 37°C+ pH= 5.6 en présence d'α-amylase salivaire.	31
Figure 12	Survie de S1 et Bb12 sous conditions gastriques simulées (3g/L pepsine + pH 2).	32
Figure 13	Survie de S1 et Bb12 sous conditions Pancréatiques simulées (1g/L pancréatine + pH 8).	34
Figure 14	Survie de S1 et Bb12 sous conditions Intestinale simulées (3g/L de la bile + pH8).	35

### Liste des Abréviations

<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique.
<b>ARN :</b>	Acide Ribonucléique.
<b>ARN<sub>16S</sub> :</b>	ARN Ribosomique 16 s.
<b>ADH :</b>	Arginine Di Hydrolase.
<b>ATP :</b>	Adénosine-5'-triphosphate.
<b>BL :</b>	Bactéries lactiques.
<b>BN :</b>	Bouillon nutritif.
<b>C ° :</b>	Degré Celsius.
<b>DO :</b>	Densité Optique.
<b>EMP :</b>	Embden Meyerhoff Parnas
<b>FAO:</b>	Food and Agriculture Organization.
<b>g :</b>	Gramme.
<b>g/l :</b>	Gramme par litre.
<b>G :</b>	Grossissement.
<b>GC%:</b>	Pourcentage en guanine et cytosine.
<b>GRAS:</b>	Generally Recognized As Safe.
<b>Iga :</b>	Immunoglobuline A.
<b>Log :</b>	Logarithme.
<b>MRS :</b>	Man, Rogosa et Sharpe.
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé.
<b>PBS:</b>	Tampon phosphate salin.
<b>Sp :</b>	Sous espèce.
<b>ssp :</b>	Subspecies.
<b>T/min :</b>	Tour pour minute.
<b>t :</b>	Temps.
<b>UFC :</b>	Unité formant colonies.
<b>µL :</b>	Microlitre.
<b>VPP :</b>	Voie Pentoses Phosphate.

# **Introduction**

### Introduction

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées **Mozzi et al, (2010)**. ainsi qu'une place prépondérante dans le groupe des bactéries « **GRAS** » (Generally recognized as safe).

Le statut « probiotique » est accordé à de nombreuses bactéries lactique, ce qui les implique à manifester diverses propriétés bénéfiques pour la santé de l'homme **Heyman et Heuvelin, (2006)**.

Les bactéries lactiques sont généralement sélectionnées pour leurs propriétés technologiques **Drouault et Corthier, (2001)**, mais depuis les théories de Metchnikoff (1907) sur leurs effets bénéfiques sur la santé, l'attention s'est portée sur ces microorganismes **Bouhnik, (1998)**, et d'autres propriétés sont prises en compte, telles que la survie et la persistance dans l'environnement dans lequel ils doivent agir. C'est pourquoi de nombreuses études visent à sélectionner des souches capables de tolérer l'acide gastrique et les sels biliaires, d'adhérer aux cellules épithéliales et de produire plusieurs substances antimicrobiennes **Drouault et Corthier, (2001)**. Ceci permet d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes **Ross et Jonsson, (2002)**, tels que *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherischia coli*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus* et *Yersinia* **Dunne et al, (2001)**, et ainsi d'assurer une bonne conservation des aliments **Paul Ross et al, (2002)**.

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

L'objectif de notre modeste travail est la mise en évidence in vitro de la survie des souches de BL isolées à partir d'un poisson marin *Sardina pilchardus*, dans les conditions digestives simulées (alpha amylase, pepsine, pancréatine et sels biliaires).

# **Chapitre I**

## **Les Bactéries Lactiques Et Probiotiques**

## CHAPITRE I : LES BACTERIES LACTIQUES

### 1. Généralité

Les bactéries lactiques, de très anciens micro-organismes, utilisées pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans (**Dridier et Prevost, 2009**). Ce n'est qu'à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini, plus précisément en 1919 par Orla-Jensen. Il a réuni plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Tredez, 2008**). Les bactéries lactiques appartiennent au groupe des bactéries bénéfiques, qui se trouvent partout dans la nature ainsi que dans le système digestif de l'homme. Depuis des millénaires, elles sont utilisées dans l'alimentation humaine. Elles occupent une place importante dans les fabrications agroalimentaires (**Dortu et Thonart, 2009 ; Moraes et al, 2010**), elles sont utilisées le saumurage des légumes, les salaisons des viandes et des poissons, et dans la fabrication du vin, ainsi qu'en boulangerie, elles disposent généralement du statut GRAS (**Vescovo et al, 1996**).

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes, à Gram positifs, immobiles, en forme de bâtonnet ou coque, asporulées, catalase négative, oxydase négative, nitrate réductase négative. Ce sont des bactéries anaérobies mais aérotolérantes, ne liquéfient pas la gélatine, et ne produisent-ni de l'indole ni de l'hydrogène sulfureux (**Desmazeaud, 1983 ; Guiraud et al, 2003**). Leur ADN présente un pourcentage de G + C compris entre 30 et 60 % **Stiles & Holzapfel, (1997)** et une taille de génome comprise entre 1.8 et 3.3 Mpb.

Les bactéries lactiques se caractérisent par de faibles activités protéolytiques et lipolytique, et sont très exigeantes en acides aminés, vitamines, acides gras, peptides, glucides fermentescibles et en sels. (**Guiraud, 1998**).

### 2. Origine et habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques (**Mechai, 2009**). Elles sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (**Makhloufi, 2012**).

Les espèces du genre *Streptococcus*, *Lactococcus* sont présents chez l'homme et chez les animaux d'où elles sont isolées à partir de la peau et des matières fécales. (Dellaglio et al. 1994). Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que les genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weissella*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*. D'une façon générale, les bactéries lactiques sont présentes partout où il y a de fortes concentrations de glucides, de produits de dégradation des protéines, de vitamines et peu d'oxygène (Marteau, 2007).

### **3. Taxonomie des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des firmicutes, à la classe des Bacilli et à l'ordre des Lactobacillales (De Vos et al. 2009). Cet ordre comporte 33 genres repartis entre six familles qui sont: Lactobacillaceae, Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae et Streptococcaceae classées en se basant sur les analyses phylogénétiques des séquences de l'ARNr16s (Ludwig et al. 2009).

Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans le domaine de la biotechnologie, il s'agit de :

***Aerococcus*** : de forme ovoïde (1-2µm de diamètre), α-hémolytiques, non-gazogènes, arginine(-), pouvant croître à une concentration de 6.5% de NaCl, la division se déroule sur deux plans formant ainsi des tétrades. Des cellules isolées ou en paires peuvent être observées au milieu de la phase exponentielle.

***Carnobacterium*** : Ce genre est constitué de bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en paires, pouvant se développer à pH 9 et incapables de croître à 8% de NaCl ; quelques espèces sont catalase (+).

***Enterococcus*** : Cellules ovoïdes, isolées en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles et d'autres possèdent une pseudocatalase. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, un pH 9.6 et un intervalle de température compris entre 10°C et 45°C, avec un optimale de croissance de 35°C à 37°C.

***Lactobacillus*** : Ce sont soit des bacilles longs (incurvés) ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Acidophiles et peuvent croître à un

pH optimum variant de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, **Lactococcus** : De formes sphériques ou ovoïdes, isolées en paires, ou en chaînes. De type mésophiles, leur température optimale est comprise entre 10 et 40°C, mais sont incapables de se développer à 45°C. Celles-ci se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrête lorsque le pH du milieu atteint 4,5.

**Leuconostoc** : Ce genre comprend 10 espèces fastidieuses dans leurs exigences nutritionnelles, de forme ellipsoïdales à sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH optimum de croissance égal à 6.5. Concernant la température optimale est comprise entre 20°C et 30°C. Capables de produire du dextrane en milieu concentré en saccharose.

**Oenococcus**: Immobiles, asporulantes de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Exigeantes quant au milieu de culture qui doit être riche en acides aminés et en facteurs de croissance, leur pH optimum étant de 6 à 6,8 et la température optimale de 20°C à 30°C.

**Pediococcus** : Immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent en deux directions perpendiculaires formant ainsi les tétrades mais jamais les chaînes. Les cellules sont acidophiles à pH : 5, la température optimale de croissance est comprise entre 25°C à 35°C.

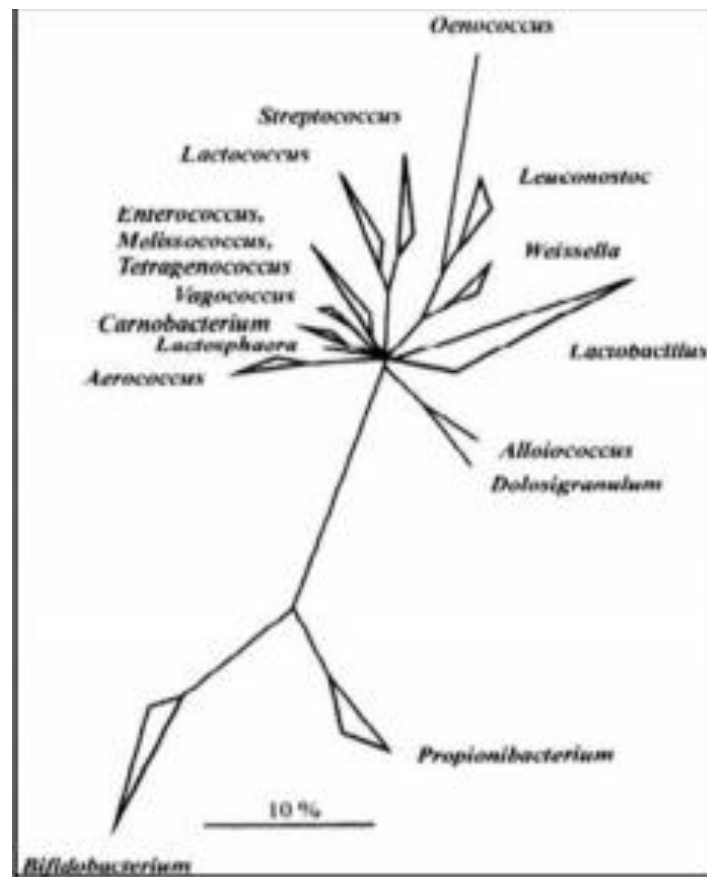
**Streptococcus** : Immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm en paires ou en chaînes longues. La fermentation des glucides produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à un pH 9.6.

**Vagococcus** : Ovoïdes isolées, en paires ou en chaînes. La plupart des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Elles sont capables de croître à 10°C mais non à 45°C sans production de gaz ni d'arginine dihydrolase (ADH).

**Tetragenococcus**: Cellules sphériques ou ovoïdes avec un diamètre de 0.5-1.0 µm, immobiles, formant des tétrades, comme elles peuvent être isolées ou en paires. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C et ne peuvent pas croître à 10°C et à 45°C.

**Weissella** : Ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes et sont immobiles. Leur température optimale de croissance est de 15°C, mais

quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C. Parmi tous les genres cités, seulement *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* répondent aux caractéristiques générales d'une bactérie lactique proprement dit (Salminen et al. 2004).



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

Les programmes FASTA et BLAST permettent de comparer une séquence nucléotidique d'une souche inconnue avec les banques de séquences, qui vont par la suite retenir les séquences les plus proches (Altschul et al. 1997).

#### 4. Métabolisme des bactéries lactiques

Comme toute cellule vivante, les bactéries lactiques métabolisent les matières organiques présentes dans les milieux d'environnements afin d'assurer leur croissance.

Les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres, il s'agit des voies homofermentaire (Embden -Meyerhoff- parnas EMP) et hétérofermentaire (voie pentoses-phosphate).

4.1 La voie homofermentaire ou voie d'Embden Meyerhoff Parnas (EMP) :

Elle est généralement associée aux bactéries des genres *streptococcus* , *lactococcus* , *pediococcus* et *lactobacillus* , celles-ci utilisent la glycolyse pour dégrader les hexoses. En conditions optimales de croissance, cette voie produit deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée .d'autres sucres que le glucose peuvent également être fermentés via cette voie (Thompson & Gentry-Weeks, 1994). Dans les conditions défavorables, ces bactéries lactiques homofermentaires peuvent présenter un métabolisme mixte, caractérisé par la production de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'éthanol, de l' d'acide formique et/ou de CO2 (Cocaign-Bousquetet al ;1996 ; Mozzi et al ; 2010). (Figure 03).

4.2 La voie hétérofermentaire :

Les principaux groupes des bactéries présentent ce type de métabolisme sont les *leuconostocs* et certaines *lactobacillus*.Ces bactéries utilisent la voie des pentoses phosphate qui permet l'obtention en plus d'une molécule d'acide lactique, de CO2, d'une molécule d'ATP et d'une molécule d'éthanol ou de l'acétate, à partir d'une molécule de glucose (Thompson & Gentry-Weeks, 1994 ; Salminen et al ; 2004) ( Figure 02).

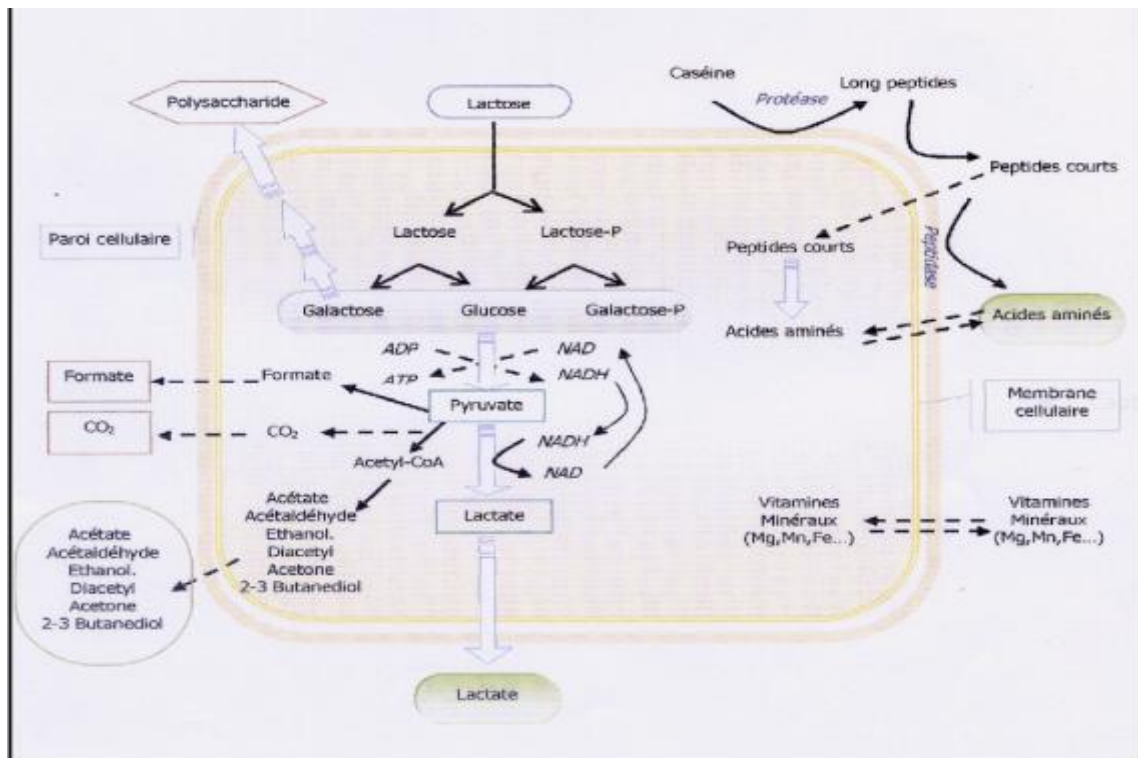
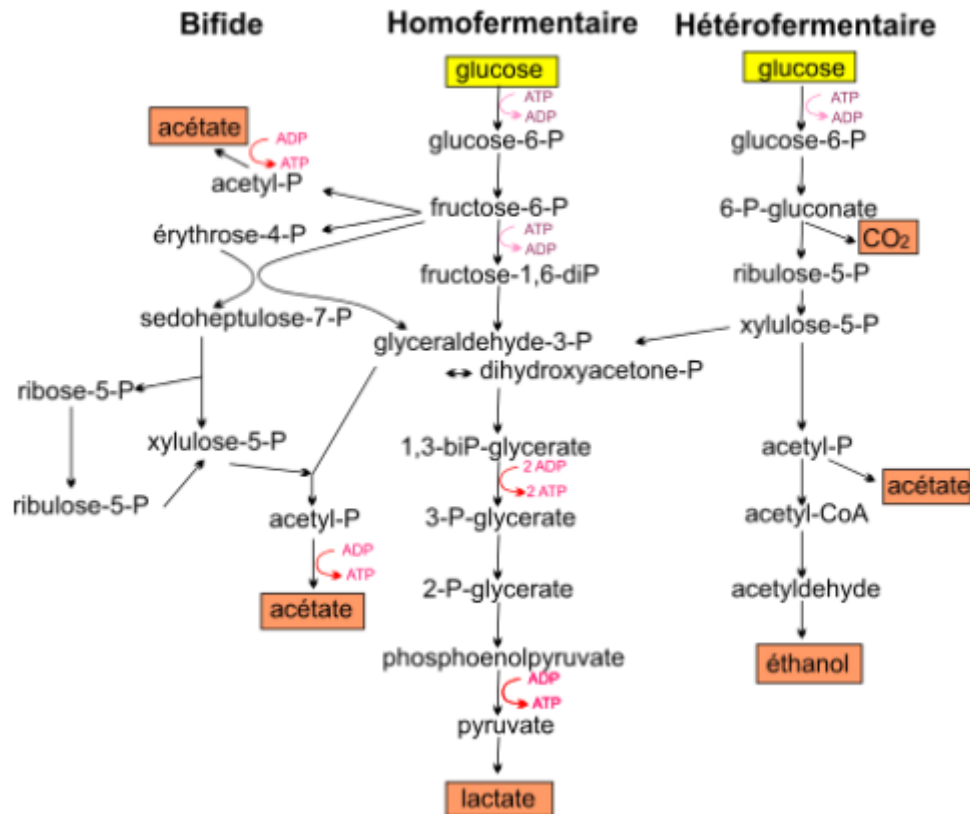


Figure 2 : les principales voies métaboliques chez les bactéries lactiques. (Cathy et Coste, 2014).

Enfin, le métabolisme du genre *bifidobacterium* est assez particulier, en effet il s'agirait de la voie de la fructose-6-P phosphocétolase (FPC), le fructose-6-P est scindé par le fructose-6-P phospho-cétolase en érythrose-4-phosphate et en acétyl-phosphate et du glycéraldéhyde-3-phosphate afin de former de l'acétyl-phosphate et du glycéraldéhyde-3-phosphate (**figure 03**)(Drideret Et al, 2009).



**Figure 03** : voies métaboliques homofermentaire, hétéro fermentaire et bifide de la dégradation du glucose (Drider *et al*, 2009).

## 5. Propriétés technologiques des bactéries lactiques :

L'utilisation maîtrisée des bactéries lactiques dans l'industrie nécessite la connaissance de leurs principaux processus métaboliques, de leurs interactions entre elles et avec les autres microorganismes, en fait, les bactéries lactiques remplissent plusieurs propriétés technologiques qui peuvent être résumées en :

### 5.1 Aptitude acidifiante :

L'implication des bactéries lactiques dans la fermentation et la bio conservation des aliments est connue depuis la nuit des temps. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des

laits fermentés (**Yateem et al. 2008**). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain sont entre autres des produits de fermentation des bactéries lactiques (**Yvette Soustre, 2009**). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et par conséquent augmenter la durée de leur conservation sans pour autant utiliser de conservateurs chimiques, et ce grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles produisent (**Dortu et Thonart, 2009**). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou d'activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, innocuité, facilité de culture, de conservation, et maintenance des propriétés désirables lors du stockage (**Marth et Steele, 2001**).

### **5.2 Dans le domaine thérapeutique :**

Les bactéries lactiques, considérées comme tant des probiotiques, confèrent des bénéfices à l'hôte en maintenant l'équilibre de la microflore intestinale (**Yateem et al., 2001**). Différentes études ont démontré aussi bien le rôle préventif que curatif de ces bactéries sur différents types de diarrhées (**Mkrtchyan et al., 2010**). D'autres ont cité leur capacité à diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (**El-Ghaish et al. 2011**). Cependant depuis quelques années l'usage des bactéries lactiques dans d'autres écosystèmes (vaginal, mammaire) est évalué, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques (contre les métrites ou les mammites) (**Bouchard, 2013**), également dans l'élaboration des vaccins (**Calvez et al. 2009**). **Uehara et al. (2006)** ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires à empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie, ainsi que des problèmes liés aux infections urinaires.

### **5.3 Aptitude Antagonistes :**

Ce terme a été utilisé pour la première fois en 1964 par de nombreux auteurs, et il englobe les peptides et les protéines produites par des gènes bactériens et ayant une activité antimicrobienne bactéricide au bactériostatique (**Garneau et al, 2002**). De plus, ces substances, ainsi que les bactéries lactiques qui les produisent, sont tolérées par les consommateurs qui les considèrent comme des substances naturelles, ce qui est un atout supplémentaire pour les industriels (**Montville et Winkowski, 1997**).

Les bactéries lactiques sont connues et utilisées pour les influences antagonistes qu'elles développent (Schaack et Marth, 1988 ; Daeschel, 1989).

## **Les probiotiques**

### **1. Généralités**

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs " pros" et " bios" qui signifient littéralement "pour la vie", Ce terme a été introduit pour la première fois par Ferdinand Vergin (1954) pour décrire des substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes.

Depuis les travaux de Metchnikoff sur les BL et leurs effets sur la longévité des Bulgares, l'idée de consommer des BL ayant un « effet santé » sur la santé du consommateur a été reprise par les scientifiques et par les industriels pour mieux faire connaître ces « bactéries santé » (Kingsley C. Anukam 2007; Vasiljevic 2007).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit les probiotiques comme des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé au-delà des effets nutritionnels traditionnels (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 and Bienenstock 2010; Bron, van Baarlen et al. 2011).

### **2. Classification des probiotiques**

Les probiotiques sont constitués de bactéries ou de levures naturellement présents chez l'homme, notamment au niveau de la flore digestive. Trois grands groupes de microorganismes probiotiques peuvent être distingués (Lignon et Chiny, 2013).

#### **Les bactéries lactiques:**

Les plus représentées. Elles sont capables de digérer le lactose et de le convertir en acide lactique, qui constitue leur principal produit du métabolisme glucidique et diminue le pH environnemental.

#### **Les bactéries non lactiques (*Bacillus*):**

Étaient utilisées dans la prévention et le traitement des diarrhées mais, devant l'absence d'essais de leur efficacité, ces bactéries ont été délaissées.

*Les levures:*

Telle que la souche *Saccharomyces cerevisiae var boulardii*.

Les principaux microorganismes probiotiques sont regroupés dans le tableau I: ((**Ouwehand Et al. 2002**))

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

**Tableau 1 :** Principaux micro-organismes utilisés comme agents probiotiques (**Ouwehand et al. 2002**).

### 3. Les critères de sélection

De façon plus spécifique, pour qu'un microorganisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes (**Salminen et al., 1996 ; Tannock, 1999 ; Stanton et al. 2001**) :

- Etre un habitant naturel de l'intestin humain.
- Etre capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier.
- Adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des pathogènes.

- Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, Peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bactériocines,...).
- Non invasif, non carcinogène et non pathogène et Absence de toxicité.
- Etre capable de Co-agréger pour former une flore normale équilibrée.
- Résistance à la bile et au mucus intestinal (l'acide

Critères de sécurité
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identification taxonomique précise</li> <li>- Origine humaine pour l'utilisation chez l'humain</li> <li>- Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques</li> <li>- Historique de son pathogénicité et non invasion des épithéliums</li> <li>- Pas de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques.</li> </ul>
Critères fonctionnels
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tolérance à l'acidité, à la bile et aux enzymes digestives</li> <li>- Adhésion aux cellules intestinales et persistance au niveau des muqueuses</li> <li>- Production de substances antimicrobiennes et antagonisme envers les pathogènes</li> <li>- Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé.</li> </ul>
Critères technologiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stabilité au cours des procédés de production</li> <li>- Conservation des propriétés probiotiques après production</li> <li>- Non modification des propriétés organoleptiques du produit fini.</li> </ul>

**Tableau 2** : critères de sélection des probiotiques. (Reid G, 2005; Iaconelli C et al, 2005).

**4. Résistance des probiotiques aux sécrétions gastriques et bilio-pancréatiques**

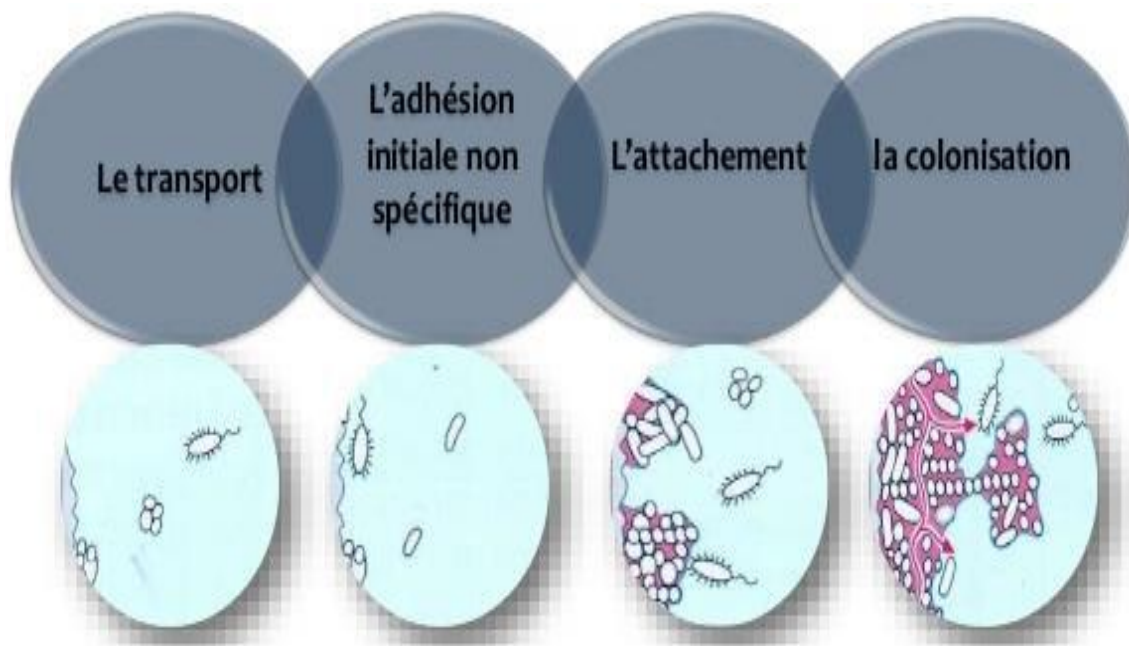
L'acidité gastrique et les sécrétions bilio-pancréatiques constituent les principaux mécanismes endogènes d'inactivation des bactéries ingérées. La protection contre l'acidité Gastrique peut se faire par un passage rapide dans l'estomac ou en protégeant les bactéries par le pouvoir tampon de l'aliment vecteur ou par des systèmes galéniques de protection tels que la micro-encapsulation.

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

La résistance des probiotiques aux sels biliaires et leur survie dans l'environnement digestif sont très variables en fonction de la souche. De nombreuses souches de bifidobactéries et de lactobacilles survivent bien pendant le transit intestinal pour arriver en grande quantité dans les fèces (**Lignon et Chiny, 2013**).

**5. L'adhésion aux cellules épithéliales**

La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale est une propriété importante des probiotiques ; elle est considérée comme une condition préalable à la colonisation et à la Croissance; l'adhérence des microorganismes aux cellules muqueuses intestinales Augmentent l'effet probiotique de ces derniers. Toutefois, il y a peu d'évidence que les probiotiques exogènes administrés puissent le faire. Il semble qu'ils passent dans les fèces Sans avoir adhéré ou s'être multipliés, L'adhésion constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes, Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests *in vitro* puis *in vivo* en utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine (**Palomares et al. 2007 ; Reyes-Gavilan et al., 2011; Hadeef Sawssen**).



**Figure 4 :** Les différentes étapes du mécanisme d'adhésion aux cellules épithéliales  
(Crittenden *et al.* 2005).

## 6. Utilisation des probiotiques en santé humain

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques. Ils participent à (Kalliomaki *et al.*, 2001 ; Mercenier *et al.*, 2002 ; Gourbeyre *et al.*, 2011) :

- l'amélioration de la digestion de lactose (sécrétion de lactase).
- la réduction des produits du catabolisme éliminés par le foie et le rein.
- l'augmentation de la valeur nutritionnelle (bonne digestion et absorption des minéraux et vitamines).
- l'influence positive sur la flore intestinale.
- la bonne croissance et au bien-être.
- la régulation de la motilité intestinale (constipation, syndrome d'irritation intestinale).
- la prévention de l'ostéoporose, du cancer, de hypertension et l'athérosclérose.
- réduction du taux de cholestérol et la modulation du système immunitaire.
- réduction de l'inflammation ou des réactions allergiques.



# **Chapitre II**

## **Biologie De La sardine**

---

**CHAPITRE II : BIOLOGIE DE LA SARDINE***Sardina pilchardus***II.1 Taxonomie**

La sardine appartient à un groupe taxonomique complexe qui regroupe les poissons pélagiques osseux marins ou dulçaquicoles comme les aloses, les harengs (**Lavoué et al. 2007**). Les deux principaux genres de sardines se répartissent dans les différentes zones d'upwellings du monde, où les eaux sont froides à tempérées et où la production primaire est importante (**Whitehead, 1985; Parrish et al. 1989**). Dans le genre *Sardina*, il n'existe qu'une seule espèce, *Sardina pilchardus* (**Walbaum, 1792**), ou sardine européenne. Dans la suite de notre travail, pour des raisons de commodité, nous utiliserons le nom de sardine ou *Sardina pilchardus*.

**Embranchement** Vertébrés

**Classe** Ostéichthyens

**Sous-classe** Actinoptérygiens

**Ordre** Clupéiformes

**Classe** Clupéidés

**Famille** Clupeidae

**Genre** *Sardina*

**Espèce** *pilchardus* (**Walbaum, 1792**).

**II.2 Répartition**

Ce clupéidé fait partie des espèces les plus importantes en terme de biomasse ichtyologique et représente une part importante des débarquements en Méditerranée (**FAO, 2007**). La sardine est une espèce commune dans le bassin occidental, rare dans le bassin oriental, sauf dans l'Adriatique. Elle vit essentiellement sur le plateau continental, ne dépassant guère l'isobathe des 150 mètres (**Schwartzlose et al. 1999 ; Cury et al. 2000**). L'aire de répartition de la sardine le long des côtes africaines s'étend du détroit de Gibraltar au Sud de la Mauritanie, soit sur environ 2100 km. Sa répartition et son abondance sont très influencées par les conditions hydroclimatiques.

### II.3. Morphologie et comportement :

La sardine possède un ventre argenté brillant et un dos bleuté (Figure 04) Elle se caractérise par des écailles sessiles qui se détachent facilement du corps, un opercule strié, et les deux derniers rayons de la nageoire anale sont plus allongés que les précédents. Elle possède une série de taches sombres le long des flancs supérieurs (**Whitehead 1985**).



**Figure 05 :** Morphologie générale de la sardine, *Sardina pilchardus* (**Walbaum, 1792**)

La sardine est une espèce pélagique grégaire dont la répartition est conditionnée surtout par la température et notamment par la richesse en plancton et l'hydrologie (**Forest, 2001**). Elle forme des bancs parfois très importants qui peuvent être composés d'individus d'âge et de sexe différents mais de taille similaire (**Furnestin, 1943; Lee, 1961 ; Forest, 2001**). Par contre si la sardine est moins importante, les bancs peuvent être composés de plusieurs espèces de petits pélagiques tels que les anchois (**Cury et al, 2000 in Chlaida 2009**).

Généralement la sardine est présente à des profondeurs de 30 à 55 m la journée et remonte à 15 à 35m de profondeur la nuit (**Whitehead, 1985**). Ces déplacements verticaux sont conditionnés par la luminosité et la quantité de nourriture suivant la migration nyctémérale du zooplancton (**Giannoulaki et al. 1999 in Chlaida 2009**). Elle effectue aussi des déplacements horizontaux de faible amplitude en fonction des saisons où elle migre du large vers les côtes durant le printemps et des côtes vers le large à la fin de l'automne (**Furnestin, 1943; Dalouche, 1980**). Elle réalise aussi des déplacements le long des côtes qui sont probablement conditionnés par l'âge des individus, la reproduction, la température et la disponibilité de la nourriture (Lee, 1961; Forest, 2001).

#### II.4. Distribution géographique

*Sardina pilchardus* possède une aire de répartition assez large. Elle est rencontrée en Méditerranée, en Mer Noire, et en Atlantique nord où elle s'étend depuis le Dogger-bank en mer du Nord jusqu'à la côte saharienne en Mauritanie (Forest, 2001). Elle est abondante en mer Méditerranée et en mer Adriatique et rare dans l'est méditerranéen et la mer Noire (Figure 05); (Whitehead, 1985; Froese & Pauly, 2011). Ce poisson vit au-dessus du plateau continental à des profondeurs de 150 mètre. Sa répartition et son abondance sont influencées par les conditions hydro-climatiques et ses limites sont reliées à la température moyenne de l'eau avec un isotherme situé entre 10 à 25°C (Furnestin, 1943 ; Whitehead, 1985 ; Forest, 2001).



Figure 06 : Répartition géographique de *Sardina pilchardus* (Kaschner et al. 2013 in AquaMaps.org).

#### II.5. Croissance

L'étude de la croissance de la sardine *Sardina pilchardus* a fait l'objet de plusieurs études en Algérie (Bouchereau, 1981 ; Mouhoub, 1986 ; Bedairia et Djebbar, 2009). D'après les données théoriques, la croissance de la sardine ne se fait pas de façon régulière tout au long de l'année ; rapide au printemps, elle est ralentie ou même interrompue au cours de l'hiver. La sardine présente un cycle de vie qui se caractérise essentiellement par une croissance rapide, une durée de vie courte, une taille petite, une maturation rapide associée à une grande fécondité et une mortalité élevée surtout en phase larvaire (Rochet, 2000 ; Rose et al. 2001 ; Silva et al. 2006). La taille de la sardine peut atteindre 27 cm dont 90 % est atteinte durant la première année de son cycle. La croissance durant les années qui suivent est beaucoup plus

faible malgré une longévité, qui peut aller jusqu'à 14 ans (**Whitehead, 1985**). Dans la région du Nord-Ouest Africain, la taille de la sardine augmente du nord au sud (**FAO, 2007**) ceci est probablement en relation avec une richesse trophique du milieu et la température engendrée par l'upwelling auquel sont soumises ces côtes. La sardine atteint sa maturité sexuelle à 14,8 cm de longueur totale durant les deux premières années de sa vie (**Abad et Giráldez, 1993**). La croissance et la maturité sexuelle présentent de larges variations tout au long de l'aire de répartition (**Monteiro et Jorge, 1982 ; Pérez et al. 1985 ; Alemany et Alvarez, 1993 ; FAO, 2001**).

### **II.6. Reproduction**

L'habitat de reproduction de la sardine est fortement corrélé avec leur préférence environnemental initiant la ponte. Les pontes maximales sont observées dans des eaux de mélange, dans une gamme de températures comprises entre 11.5°C et 14°C, et pour une salinité de 37,6 à 38‰ (**Aldebert et Tournier, 1971**). La sardine préfère donc les eaux froides hivernales, non directement soumises aux écoulements fluviaux (**Palomera et al., 2007**) pour se reproduire. De la fin de l'automne au début du printemps, les sardines sont groupées au large au-dessus des fonds de 50 à 100 m. Durant cette période va s'effectuer la ponte ; celle-ci a lieu près du fond et débute avec la chute brusque de la température qui passe de 19°C en octobre à 14°C en décembre (valeurs moyennes). Cette ponte reste très active jusqu'au mois de mars et diminue ensuite avec le réchauffement des eaux (**Bouchereau, 1981**). On notera que la première maturation des gonades intervient au cours de la seconde année pendant les mois d'été et que la ponte commence dès l'hiver qui suit. La sardine pond principalement entre septembre et juin sur les côtes Atlantiques européennes et en Méditerranée, et d'octobre à juin sur les côtes Africaines (**Whitehead, 1985 ; Ettahiri et al. 2003 ; Amnezoui et al. 2006**). En Méditerranée, la ponte se prolonge également sur 6 mois avec un maximum en hiver (**Abad et Giraldéz, 1993 ; Ganiás et al. 2007**). Les sardines possèdent une forte fécondité, chaque femelle peut libérer jusqu'à 35 000 oeufs pélagiques (**Whitehead, 1985**). Cependant, la mortalité des larves est importante et influence fortement le recrutement (**Chlaida, 2009**).

### **II.7. Régime alimentaire**

Les sardines se nourrissent de zooplancton, principalement de copépodes, cladocères, larves de crustacés, euphausiidae (krill) et de phytoplancton. Ce dernier, représenté entre autres par des Diatomées, est surtout abondant dans les contenus stomacaux des larves et des jeunes individus (**Varela et al. 1988 ; Garrido et al. 2006**).

# **Chapitre III**

## **Tractus Gastro-intestinal**

---

## CHAPITRE III : TRACTUS GASTRO-INTESTINAL

### III.1. Le Tractus digestif

#### III.1.1. Généralités

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. De par sa surface totale (muqueuse) estimée à 200- 300 m<sup>2</sup>, il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement (**Jedidi, 2015**) ; et constitue un principale habitat naturel pour les bactéries lactiques ainsi que d'autre microorganismes, du fait qu'il fournit un environnement stable et un approvisionnement continu en éléments nutritifs, sous forme d'aliments ingérés ou sécrétés par l'hôte (**De Roissart.,1994**) .

Les interactions entre les microorganismes et l'hôte peuvent être de trois types : symbiose, commensalisme et pathogénicité (**Hooper et Gordon, 2001**). L'hôte est protégé contre la microflore intestinale pathogène par les barrières chimiques et physiques formées par l'épithélium gastro-intestinal (**Kagnoff et Eckmann, 1997**).

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

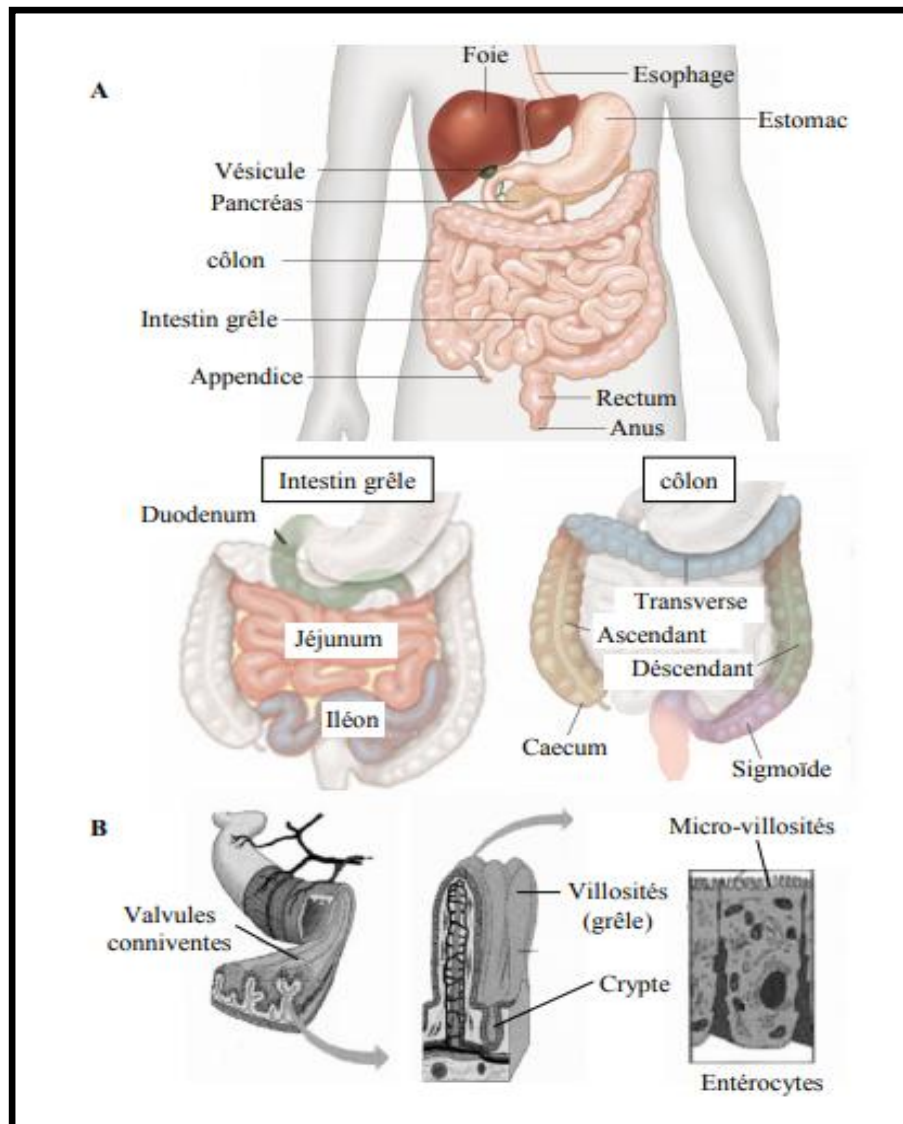
La principale action du tube digestif réside dans la digestion des aliments, qui débute dans la cavité buccale, ces nutriments vont subir des transformations progressives pour les réduire en substances absorbables et utilisables par l'organisme hôte, et ces transformations sont de deux ordres : mécanique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

. Au niveau de l'intestin grêle on trouve des cryptes et des villosités alors que le côlon est constitué que de cryptes. (D'après **EncyclopediaBritanica ; Marieb 1999**).

#### III.2. Flore intestinale

Selon la définition d'**Isolauri et al. (2002)**, la flore intestinale normale est une collection complexe et en équilibre de microorganismes qui habitent normalement le tractus gastro-intestinal et remplissant un rôle dans la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire de l'hôte. Après une colonisation complète, la microflore intestinale est

considérée comme un organe acquis après la naissance. Il est constitué d'une grande diversité d'espèces microbiennes assurant différentes fonctions (Amrouche, 2005).



**Figure 07:** Anatomie du tube digestif humain. A/ L'intestin est divisé en deux parties, l'intestin grêle et le côlon. Au niveau du grêle on retrouve successivement le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le côlon est également divisé en plusieurs segments, le caecum, puis les côlons ascendant, transverse, descendant et sigmoïde. B/ Les différents niveaux de repliement de l'intestin offrent une surface d'échange optimale

### III.3. Composition du tractus digestif de l'homme

L'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions très différentes pour la survie des différents microorganismes, (Bouchebra, 2012).

**La bouche :** où se passe la mastication des aliments.

**L'estomac** : où les aliments s'accumulent, c'est un réservoir (~1,3 L) dans lequel le chyme alimentaire est brassé et imprégné par les sucs gastriques. Le jus stomacal est constitué de mucus, de pepsinogène (converti en pepsine), d'acide chlorhydrique, de facteur intrinsèque et de gastrine (Wilson 2008).l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acidotolérants, Gram positif et anaérobies facultatifs comme les lactobacilles et les streptocoques (Ait-Belgnaoui, 2006).

**Les intestins** : Les sécrétions intestinales maintiennent un pH légèrement basique ( $7 < \text{pH} < 8$ ) et la quantité d'oxygène diminue. Les sels biliaires, le suc pancréatique et les enzymes (protéases, lipases et amylases) permettent la digestion du chyme alors que les composés non digérés (fibres, amidon résistant, quelques peptides et lipides) passent dans le gros intestin (Walter and Ley 2008). On retrouve :

- L'intestin grêle (6 à 8 m de long) composé d'un duodénum qui est un carrefour important où vient confluer les sucs biliaires et pancréatiques et du jéjunum et l'iléon, où s'opère la plus grande partie des actions digestif qui permettent l'utilisation des aliments (Taglang., 2005).la microflore est constituée essentiellement de bactéries anaérobies facultatives à Gram négatif apparaissant à côté des espèces à Grampositif, telles que les lactobacilles (*L. acidophilus*, *L. planturum*, *L. casei* et *L. rhamnosus*), les Streptocoques, les entérobactéries et anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies (Farnworth, 2008; Cummings et al. 1989).

- Le gros intestin (1,40 à 1,70 m de long) composé d'un cæcum (peu développé), côlon où le contenu intestinal prend un caractère fécal, et le rectum (Taglang., 2005).C'est le dernier compartiment, dépourvu d'oxygène. La microflore du colon est très complexe et dominée par les bactéries anaérobies strictes et comprenant à la fois les bactéries à Gram positif et Gram négatif (Bactéroïdes spp, Clostridium spp, Bifidobacterium : *B. longum*, *B. bifidum* et *B. infantis*) (Farnworth, 2008).

#### III.4. Facteurs influençant la microflore intestinale au cours de la vie

La composition et les fonctions de la microflore du tractus gastro-intestinal sont influencées par divers facteurs liés au changement des conditions physiologiques de l'hôte, de la composition du régime alimentaire et des circonstances environnementales (contamination par les pathogènes, antibiothérapie, chimiothérapie, climat, stress, hygiène ...) (Mitsuoka, 1989; Hopkins et al. 2002).

Les facteurs majeurs influençant la microflore gastro-intestinale sont :

**a. L'âge**

A la naissance, le tube digestif, stérile in utero, est colonisé par contamination maternelle et environnementale. En effet, le nouveau-né absorbe les bactéries fécales, vaginales, cutanées de la mère lors de l'accouchement, ainsi que toutes les bactéries du milieu environnant. La microflore intestinale des personnes âgées et des jeunes adultes évolue et devient plus complexes (AFSSA, 2005). Ce phénomène est étroitement lié à la modification de pH des fèces. Les Bifidobacterium et Ruminococcus deviennent sous-dominantes au profit des entérobactéries, des lactobacilles, des clostridies et des Bactéroïdes (Hulm, 2002).

**b. Les variations du pH**

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

**A. Au niveau de l'estomac :** La prolifération microbienne est fortement réduite (inférieure à  $10^3$  UFC /g) à cause de la présence d'oxygène apporté par la déglutition et de la forte acidité. De ce fait, l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acido-tolérants et anaérobies facultatifs comme les lactobacilles, streptocoques, levures, etc. Le pH est légèrement acide ( $1,5 < \text{pH} < 5$ ) (Wilson., 2008).

**B. Au niveau de l'intestin grêle :** On observe une variation quantitative (duodénum  $10^3$ -  $10^4$  UFC/g, jéjunum  $10^4$ - $10^6$  UFC/g, iléon  $10^6$ - $10^8$  UFC/g) et qualitative : diminution progressive des bactéries aérobies au profit des bactéries anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies. Il y a peu de bactéries dans l'intestin grêle où elles ne jouent pratiquement aucun rôle (Gournier-Château., 1994 et Dacosta., 2001). Les sécrétions intestinales maintiennent un pH légèrement basique ( $7 < \text{pH} < 8$ ) et la quantité d'oxygène diminue. C'est au niveau de l'intestin grêle que les composés alimentaires sont dégradés en sucres simples, acides aminés et acides gras qui vont être absorbés. Les sels biliaires, le suc pancréatique et les enzymes (protéases, lipases et amylases) permettent la digestion du chyme alors que les composés non digérés (fibres, amidon résistant, quelques peptides et lipides) passent dans le gros intestin (Walter and Ley., 2011).

**C. Au niveau du colon :** (absence d'oxygène), le transit, très fortement ralenti, est à l'origine d'une stase d'où l'augmentation importante de la population bactérienne (de  $10^9$  à  $10^{11}$  UFC/g). C'est une véritable chambre de fermentation, siège de très nombreuses

biotransformations des aliments non assimilés au niveau du grêle. Le côlon est la seule zone colonisée de façon permanente : la flore microbienne essentiellement anaérobie est dense et active, produisant localement de nombreux métabolites (**Rastall., 2004**). Le pH est légèrement acide ( $5 < \text{pH} < 7$ ) dans la partie proximale du gros intestin et augmente progressivement jusqu'à la neutralité (**Fonty and Chaucheyras-Durand 2007**).

### **III.5. Mucus et défensives**

Le mucus forme une réelle barrière physique entre la lumière et les cellules épithéliales de l'estomac, de l'intestin grêle et du côlon, mais concentre aussi de nombreuses substances antimicrobiennes comme les immunoglobulines, la lactoferrine, la lactoperoxydase et le lysozyme. Il a également la capacité de fixer les micro-organismes grâce à ses sucres qui miment les récepteurs bactériens. La diminution de la sécrétion de ces polymères de mucopolysaccharides, par le jeûne et l'alimentation parentérale totale, entraîne une prolifération microbienne. Les défensines synthétisées par les cellules de Paneth sont des peptides antimicrobiens. Leur action se base sur la destruction des membranes bactériennes des espèces suivantes : *E. Coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* et *C. albicans* (**Affsa, 2005**).

### **III.6. Les enzymes digestives**

Les sécrétions digestives constituent aussi une condition physiologique très importante et influencent sur la survie des microorganismes probiotiques et c'est dans la partie intestinale que les enzymes digestives sont plus redoutable. En effet, la digestion se poursuit au niveau de la lumière intestinale sous l'action de cinq enzymes protéolytiques d'origine pancréatique : la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase, la carboxypeptidase A et la carboxypeptidase B (**Van Dyke., 1989**). Les enzymes pancréatiques sont synthétisées et libérées par les cellules acineuses du pancréas sous forme de zymogènes inactifs (**Van Dyke., 1989**). La bordure en brosse de l'intestin grêle contient plusieurs peptidases qui participent à la phase finale de la digestion. Ces enzymes sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux et sont transportées à travers l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane de la bordure en brosse (**Van Dyke., 1989; Erickson & Kim, 1990**).

### **III.7. Système immunitaire intestinal**

La diminution des IgA provoque un développement important d'infections intestinales récurrentes. Les IgA sont connues non seulement pour inhiber la prolifération bactérienne,

mais aussi pour empêcher son adhésion à l'épithélium de la muqueuse. Cela prouve encore une fois le lien fort qui existe entre le GALT (Gut-associated lymphoid tissue = tissu lymphoïde associé au tube digestif), la muqueuse intestinale et la flore résidente (**Rimbaud et al. 2004**).

### **III.8. Alimentation**

Un des facteurs les plus étudiés à ce jour est la nutrition infantile par le lait maternel ou le lait infantile ; le premier a une composition plus propice à la colonisation par les bifidobactéries tandis que le second favorise l'implantation d'une flore plus diversifiée mais moins protectrice (**Piquepaille, 2013**). Chez l'adulte, Un régime carné augmente la flore de putréfaction, entraînant une augmentation de volume de la partie distale du côlon, alors qu'un régime sucré sur-développe la flore de fermentation, gonflant la partie proximale du côlon (**Seignalet, 2004**).

### **III.9. Rôle du tractus digestif et sa microflore :**

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

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

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

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

La flore intestinale joue aussi un rôle important dans la maturation et la stimulation du système immunitaire intestinal de l'hôte (**Macpherson and Harris., 2004; Mazmanian et al. 2005**). Enfin, il a été démontré que les gènes impliqués dans les réponses immunitaires et le métabolisme sont principalement régulés par le microbiote intestinal dans l'intestin grêle, et notamment l'iléon (**Hooper et al. 2001; Larsson et al. 2011**).



:

# **CHAPITRE IV**

## **MATERIEL ET METHODE**

## CHAPITRE IV : MATERIELS ET METHODES

### IV.1. L'objectif du travail

Le but de cette étude est l'évaluation in vitro de la résistance de la souche lactique (S1) isolée à partir de l'intestin de la sardine et une souche probiotique de référence (Bb12) aux conditions gastriques simulées.

### IV.2. Lieu du travail

L'isolement et l'identification biochimique de la souche lactique (S1) a été réalisé au laboratoire de Microbiologie 1 Université Abedalhamid Ibn Bdis Mostaganem (le site ITA), et les tests de résistance aux conditions digestives simulées ont été réalisés au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments fonctionnels et de la Santé (LMBFAS) entre février et avril 2019.

### IV.3. Matériels utilisés

#### IV. 3.1. Les milieux de culture

- ❖ **Bouillon MRS:** utilisé pour la réactivation des bactéries lactiques.
- ❖ **Milieu MRS gélosé :** utilisé pour la culture et le dénombrement des bactéries lactiques.
- ❖ **Eau physiologique**

#### IV.3.2. Les réactifs chimiques

Eau Oxygénée, alpha amylase, sels biliaires, pepsine, pancréatine, tampon acétate de sodium, tampon phosphate salin (PBS), tampon HCL-KCL

- ❖ **Les Colorants de coloration de Gram:** Bleu de Méthylène, violet de gentiane, fuchsine, lugol. L'huile d'immersion, Alcool, eau distillée.

#### IV.3.4. Appareillage utilisé

Spectrophotomètre UV-Visible double faisceau (JENWAY 7305 UV/VIS), Chambre D'observation UV « 264/3645 nm »(VILBERCOURMAT), Bain Marie (KOTTERMANN), Etuve universelle de 5 à 220°C, Agitateur magnétique (VELP scientifica), vortex (Stuart), Balance (KERN) Max 421g d= 0.01g, Balance (KERN) Max 6100g d= 0.1g PH mètre (WTW pH 330), Micro pipette (Smart) « 100 -1000 µl », Micro pipette (Unique) « 10 – 50 µL », Centrifugeuse (ROTOFIX 32 A),.

### IV.4. Méthodes

#### IV.4.1.échantillonnage

09 spécimens de la sardine *sardine pilchardus*, de taille et sexe confondus ont été échantillonnés à partir de port de la wilaya de Mostaganem.

#### **IV.4.2. Isolement des bactéries lactiques**

Les poissons ont été disséqués dans des conditions d'asepsie. L'intestin a été prélevé et broyé dans un mortier stérile, puis homogénéisé. 1 g de l'homogénat a été dissout dans 9ml d'eau physiologique stérile. Une série de dilutions a été préparée à partir de l'homogénat puis les dilutions adéquates ont été étalées sur des boîtes de gélose MRS (**De Man et al., 1960**). L'incubation a été faite dans une jarre d'anaérobiose à 30°C pendant 48-72 h (**Fitzsimmons et al., 1999**).

##### **IV. 4.2.1 Purification des souches**

La purification des souches sur milieu MRS a été faite par la méthode de stries. L'incubation a été faite à 30 °C pendant 24 et 48 h, puis l'observation microscopique a été réalisée (**Dunod (1998)**).

#### **IV.4.3 Pré-identification des isolats :**

##### **IV.4.3.1 Caractérisation macroscopique**

Une observation macroscopique a permis de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité, couleur).

##### **IV.4.3.2 Caractérisation microscopique**

L'observation microscopique avec l'objectif à immersion (G x 100) a permis de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 1996**).

##### **Coloration de Gram:**

- 1) Préparer un frottis.
  - Nettoyer une lame à l'alcool.
  - Déposer une goutte d'eau sur la lame.
  - Prélever une colonie à l'aide d'une anse de platine stérile.
  - Frotter la colonie dans la goutte d'eau.
  - Laisser sécher à l'air.
  - Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.
  - Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis fixé et laisser agir 1 minute.
  - Jeter l'excès de colorant.
  - Déposer quelques gouttes de lugol sur le frottis et Laisser agir 1 minute.
  - Jeter la solution de Lugol.

- Déposer quelques gouttes de l'alcool pendant 10 secondes.
- Rincer à l'eau.
- Contre-colorer en déposant la solution de safranine pendant 1 minute.
- Rincer à l'eau.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope grossissement (G x 100) avec une goutte d'huile à immersion.

#### IV.4.3.3. Test de la catalase

La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée, sa présence est mise en évidence en déposant, à l'aide d'une pipette Pasteur, quelques gouttes d'eau oxygénée à 10% sur une colonie isolée (Guiraud et *al.*, 2003). La décomposition de l'eau oxygénée se traduit par un dégagement de bulles de gaz selon la réaction suivante:



#### IV.4.3.4. Conservation des isolats

Diverses techniques peuvent être utilisées pour la conservation des souches pures :

##### IV.4.3.4.1 Conservation de courte durée (quelques semaines)

Chaque souche est ensemencée sur gélose MRS inclinée en tube. Après incubation à 37°C, et dès l'apparition d'une bonne croissance bactérienne, les tubes sont placés à 4°C. Un repiquage périodique est nécessaire (Saidi et *al.*, 2002).

##### IV.4.3.4.2 Conservation de longue durée (quelques mois à plusieurs années)

-La conservation se fait à -20°C mais dans du milieu MRS additionné de glycérol 40% (V/V) pour une durée prolongée (Samelis et *al.*, 1994; Herrero et *al.*, 1996).

#### IV. 5. Réactivation des souches

Les 2 souches S1 et BB12 ont été réactivées dans des bouillons MRS à partir des cultures conservées à 4°C sur Gélose MRS, ensuite, elles ont été incubées à 37°C entre 16 à 18h pour l'obtention des cultures jeunes.

## IV. 6. Survie aux conditions digestives simulées

### IV. 6.1 Effet de l'α-amylase salivaire (Haider et Hussain, 2008).

- Préparer une solution stérile (filtres Whatman polysulfoné, 0.22 μm) d'α-amylase à raison de 75 UE dans le tampon acétate de sodium (0.1 M, pH =5.6).
- Faire incuber 4 h à 37°C, 1 mL d'une culture bactérienne (concentration finale 1 à 5.10<sup>10</sup> UFC/mL) dans 9 mL de la solution enzymatique.
- Après incubation, prendre 100 μL du milieu réactionnel et le faire étalé sur milieu MRS.
- Dénombrer les cellules viables après 24 et 48 h d'incubation à 37°C en anaérobiose.
- Mesurer la densité optique de ces solutions enzymatiques à t= 0 min et t=4h des souches à une longueur d'onde 600 nm.

### IV. 6.2. Mesure de la tolérance des souches vis-à-vis du jus gastrique et du pancréas et de la bile

#### IV. 6.2.1. Compartiment Estomac

Afin de déterminer la capacité de survie des deux souches S1 et Bb12 au passage de l'estomac :

- Préparer les conditions simulées de l'estomac avec de la pepsine 0.3% dans le tampon HCL-KCL pH= 2 stérilisé sur filtres millipores (0.22μm).
- Centrifuger les cultures issues du test d'α-amylase (IV.6.1) à 5000 T/min pendant 10 min.
- Prendre 100 μl du culot bactérien et mélanger avec la préparation gastrique simulée.
- Evaluer la survie des bactéries aux conditions hostiles de l'estomac aux intervalles de temps suivants : 0, 30, 60 et 120 min en mesurant les densités optiques
- Dénombrer les cellules viables après 24 et 48 h d'incubation à 37 °C.

#### IV.6.2.2 Compartiment Pancréas

- Préparer les conditions simulées des enzymes pancréatiques en ajoutant 1% de pancréatine au tampon PBS pH= 6.5 stérilisé sur filtres millipores (0.22μm)
- Ajouter 100 μl du culot bactérien issu de la partie (IV. 6.2.1) à la préparation enzymatique, homogénéiser et mesurer la DO a t=0 min a une longueur d'onde de 600 nm.
- Evaluer la survie des bactéries après 120 min par dénombrement (méthode des spots) et par mesure de la densité optique à 600nm
- Dénombrer les cellules viables après 24 et 48 h d'incubation à 37 °C.

**IV. 6.2.3 Compartiment Intestin**

- Préparer les conditions simulées de l'intestin avec de la bile (0.3%, p/v dans le tampon phosphate à pH = 8 , stérilisée sur filtres millipores 0.22 µm).
- Prendre 100 µL du culot bactérien issu de **IV.6.2.2** ayant accompli les 120min de séjour, et le mélanger avec la préparation intestinale simulée.
- Incuber à 37 °C pendant 16 h.
- Evaluer la survie des bactéries aux conditions intestinales par dénombrement sur milieu gélosé (méthode des spots) et par mesure de la densité optique à 600 nm.

**IV.7. Identification Biochimiques La galerie API 20 A****Principe :**

La galerie API 20 A comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

**Inoculation des galeries:**

Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une micropipette de 100 µL stérile dans les 20 tubes de la galerie:

- Incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation.
- Eviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le coté de la cupule.
- Lorsque les tubes doit être inoculés, les cupules sont remplie avec de l'huile de paraffine stérile.
- Incuber les galeries à 37°C pendant 24 a 48 h. Durant la période d'incubation, la fermentation des sucres est indiquée par une couleur jaune.



**CHAPITRE V**

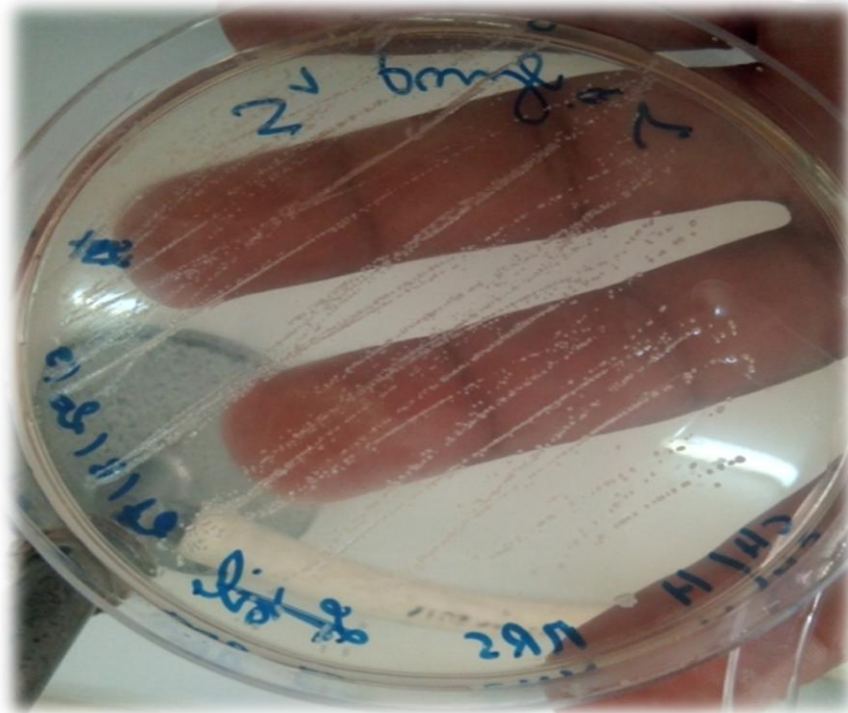
**RESULTATS ET DISCUSSION**

## CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

### V.1. Pré identification des isolats

#### V.1.1. Caractérisation macroscopique

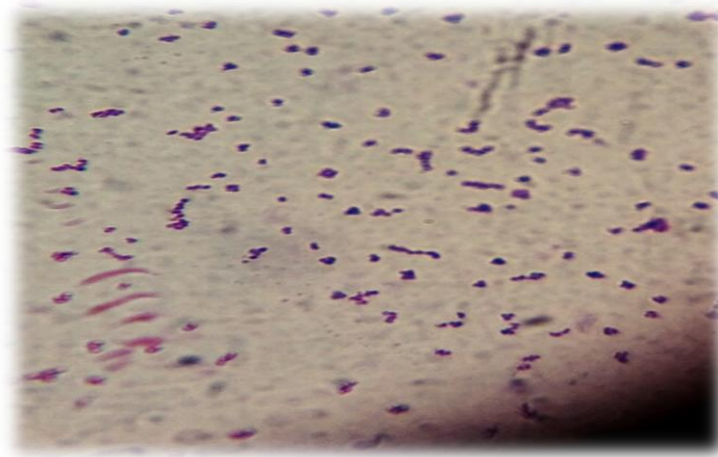
L'aspect macroscopique, permet de décrire les colonies obtenues sur milieu solide après incubation, les comparant ainsi aux critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (contour, taille, pigmentation, aspect...) (Ana BelenFlorezet *al .*, 2006), pour les isolats testés, on a observé sur milieu solide des petites colonies d'environ 0.5 a 1 mm de diamètre, de forme circulaire de couleur blanchâtres ou laiteuses, sur bouillon, la souche présente un trouble surmonté d'une zone claire qui Caractérise le groupe des bactéries lactiques.



**Figure 08 :** Aspect macroscopiques de bactéries lactiques isolées a partir de poisson sur milieu MRS solide a 37 °C pendant 48 h d'incubation.

#### V.1.2. Caractérisation microscopique :

L'observation microscopique après la coloration de Gram a révélé une forme de cellules coque. Les coques sont déposées en diplocoques, petites chainettes, en amas, parfois isolées.



**Figure 09 :** Aspect microscopiques des coques lactiques après coloration de Gram (Gx100).

## V.2. Tests physiologiques

### V.2.1. Recherche de catalase

Le résultat de ce test a révélé que la souche isolée est catalase négative.



**Figure 10 :** résultat du test de catalase.

## V.3. Survie aux conditions digestives simulées

### V.3.1. Effet de l' $\alpha$ - amylase salivaire

$\alpha$ -amylase ou ptyaline, découverte en 1826 par Tiedemann et Gmelin, est l'enzyme la mieux représentée dans la salive (environ 10 % des protéines salivaires, 30 % des protéines parotidiennes). L'homme sécrète environ 1.6 g (équivalent à un litre) d'amylase par 24 h (40 % dans la salive, 60 % dans le pancréas). L'amylase salivaire, assez proche de celle du pancréas ou de l'urine, est différente des  $\beta$ -amylases végétales ou bactériennes (**Kashket et al. 1988**).

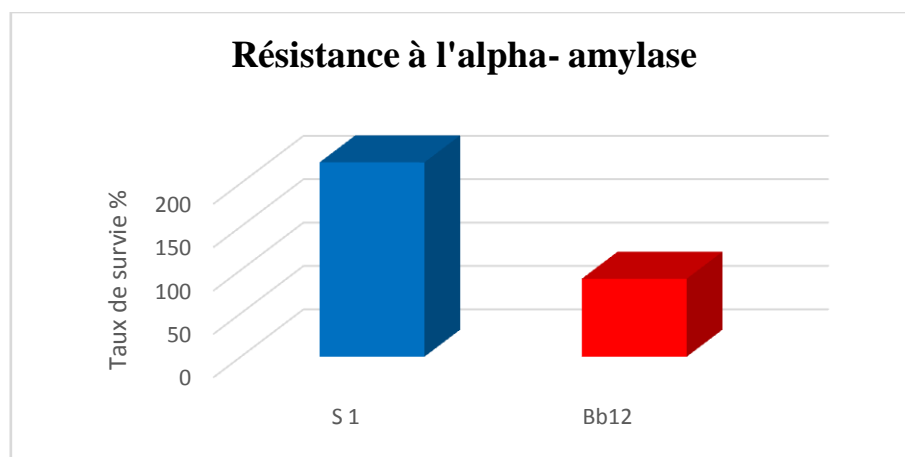
Selon **Kashket et al, (1988)**, les proportions de cette enzyme dans la salive seraient plus élevée à raison de 1.6g par 24 heures. Bien que très active au niveau buccal (pH entre 5 et 7), cette enzyme se limite à ce niveau en raison du pH gastrique de 2 qui la dénaturerait (**Rosenblum et al, 1988**).

Les résultats de la résistance des deux souches testées S1 et Bb12 à l' $\alpha$ -amylase sont exprimés sur la (**figure 11**). Les souches S1 et Bb 12 utilisées ont montré leur résistance pendant leur passage à la cavité buccale (la salive) avant d'arriver au niveau de l'estomac. Ces deux souches ont montré un accroissement du taux de la survie.

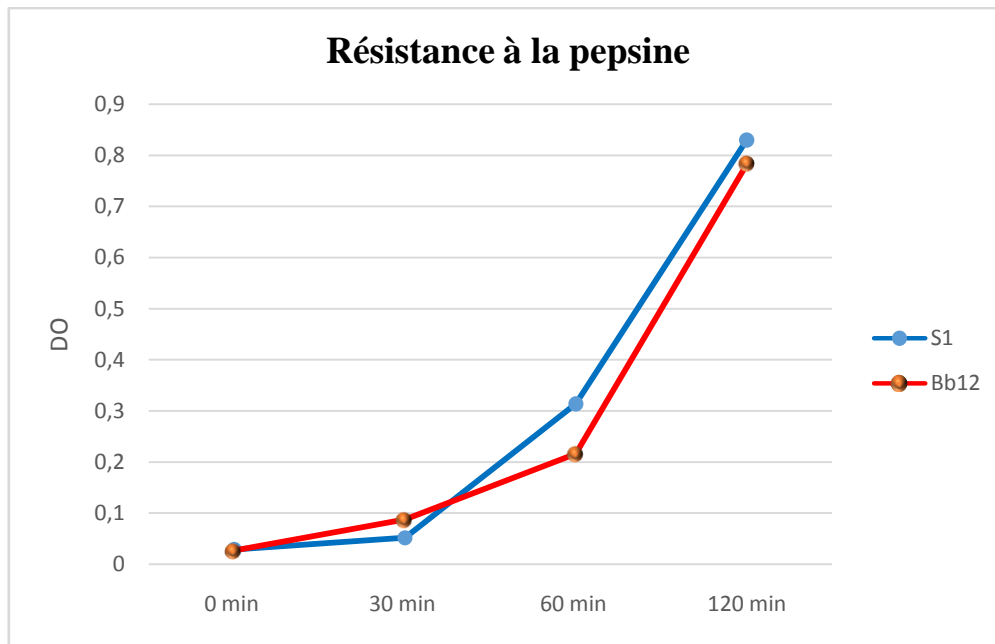
Au début la souche S1 a affiché un taux de survie très important jusqu'à 224 %, par rapport à la souche Bb12 qui affiché un taux de survie de 89.9 % (**figure 11**).

Sous l'effet de l' $\alpha$  amylase, nous avons constaté une faible diminution de taux de survie (89.9%) pour les cellules de la souche Bb12, contrairement à la souche S1 qui affiche un taux élevé après l'action de l' $\alpha$  amylase, Ceci reflète la bonne tolérance de cette souche aux conditions buccales.

Nos résultats se concordent d'une part avec les nombreux travaux qui démontrent une très bonne résistance chez les bactéries lactiques à l' $\alpha$ -amylase salivaire (**Reid et al (2007)**).



**Figure 11:** Survie des souches S1 et Bb 12 après 4 heures d'incubation à 37°C+ pH = 5.6 en présence d' $\alpha$ -amylase salivaire.



**Figure 12 :** Survie de S1 et Bb12 aux conditions gastriques simulées (3g/L pepsine + pH 2).

### V.3.2. Mesure de la tolérance des souches testées vis-à-vis du jus gastrique, de la pancréatine et de la bile

#### V.3.2.1. Compartiment Estomac

La pepsine est une enzyme de suc gastrique qui joue un rôle dans la digestion des protéines. Après avoir subies l' $\alpha$  amylase salivaire, les souches S1 et Bb12 ont été mises sous l'action de la pepsine (3g/L) associée à une acidité de pH 2 simulant les conditions gastriques. Les effets de ces conditions sur les souches bactériennes ont été suivis à des intervalles de temps de 0, 30, 60 et 120 min. Les résultats obtenus sont représentés sur la (**figure 12**) exprimés en densité optique.

A 0 minute d'exposition, les deux souches Bb12 et S1 ont montré des taux de survie similaires et stables.

A 30 min les deux souches testées ont exprimé des taux de survie (0.1) pour Bb12 et (0.05) pour S1, Ces résultats révèlent que les deux souches (Bb12 et S1) sont tolérantes à ces conditions hostiles de l'estomac.

Après 1h d'incubation les souches testées ont exprimé des taux de survie qui dépassent le 0.2 pour Bb12 et 0.3 pour S1. Ces résultats révèlent que la souche S1 est plus résistante à ces conditions hostiles par rapport à la souche Bb12 qui a été la plus sensible.

A 120 min les deux souches testées Bb12 et S1 ont exprimé des taux de survie proches de 0.79, 0.82 respectivement, Cette durée reflète la moyenne du temps passé par les aliments dans l'estomac (Argyri et al, 2013).

Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisée par (Rahli. 2013), qui ont prouvé une résistance remarquable des souches étudiées additionnées de 3mg /ml de la pepsine à pH 3 pendant 3h. D'une autre part, (Tokath et al. 2015), ont rapporté que les taux de survie de *Lb .plantarum* et *Lb .breve* exposées aux mêmes conditions étaient importante sauf pour la souche *Lb. breve* MF343.

#### V.3.2.2. Compartiment Pancréas

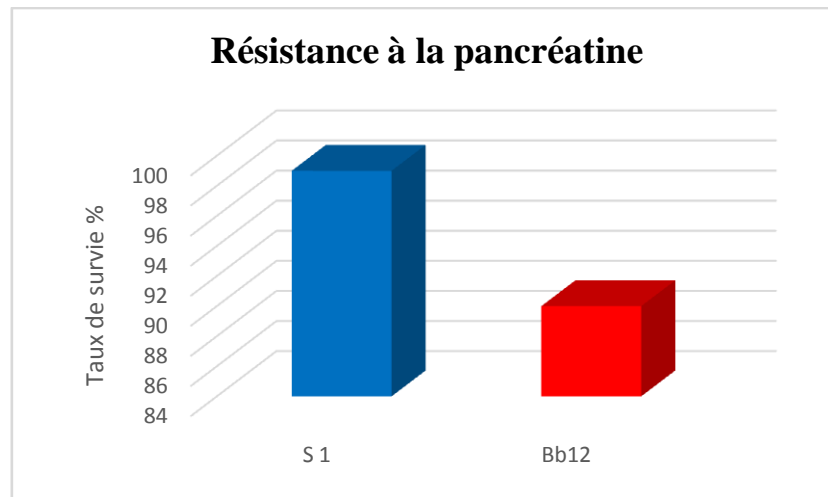
L'influence des sécrétions digestives sur la survie des bactéries lactiques ingérées n'a pas encore été clairement démontrée in vivo. Des modèles in vitro existent cependant et ont permis des études préliminaires (Charteriset al. 1998), (Marteau et al. 1997).

Après avoir traversé les barrières buccales et gastriques, les souches étaient transférées aux conditions pancréatiques simulées sous l'action de la pancréatine (0.1%) pendant 2 h.

Les résultats affichés par les souches testées vis-à-vis de la pancréatine sont représenté sur la (figure 13), exprimés en taux de survie (%).

Les résultats obtenus dans cette partie par les souches de BL testées (Bb12, S1) ont montré une bonne tolérance à la pancréatine pour S1 (99%) par rapport à la souche Bb12 qui représente (90%) du taux de survie à ces conditions.

La résistance au suc pancréatique de différentes souches de lactobacilles a été déterminée après exposition d'une suspension cellulaire lavée dans un suc intestinal (pH 8, 37 °C) contenant de la pancréatine (1 g·L<sup>-1</sup>) et du chlorure de sodium (5 g·L<sup>-1</sup>) [20]. La majorité des souches testées sont intrinsèquement résistantes au suc pancréatique reconstitué et ne montrent aucune réduction de la viabilité après 4 h d'incubation. Certaines souches sont au contraire très sensibles et subissent une très rapide réduction en viabilité (plus de 1,5 log CFU·mL<sup>-1</sup> en 4 h). Là aussi ces résultats mettent en évidence des différences de viabilité entre souches.



**Figure 13 :** Survie de S1 et Bb12 sous conditions pancréatiques simulées (1g/L pancréatine + pH 8).

### V.3.2.3. Compartiment Intestin

Après avoir traversé les barrières buccales et gastriques, les souches étaient transférées aux conditions intestinales simulées sous l'action de la bile (0.3%, p/v) pendant 16 heures, Les sels biliaires sont l'une des barrières à franchir par les bactéries probiotiques pour gagner leur site d'action, de ce fait la résistance des souches de Bb12 et S1 en présence de 0,3% des sels biliaires a été testée, ensuite la proportion de cellules viables a été évaluée.

Les résultats de ce test sont représentés sur la (**figure 14**), exprimés en taux de survie (%).

Les résultats obtenus dans cette partie par les souches de BL testées (Bb12 , S1) ont montré une bonne tolérance aux sels biliaires pour S1 (122%) par rapport à la souche Bb12 dont le taux est de 50 %, donc on note une perte cellulaire pour la souche Bb12

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Boonklao et al. (2006)**, où les souches de *Lactobacillus thermotolerans* isolées de la matière fécale de poulet tolèrent 0,3% de sels biliaires.

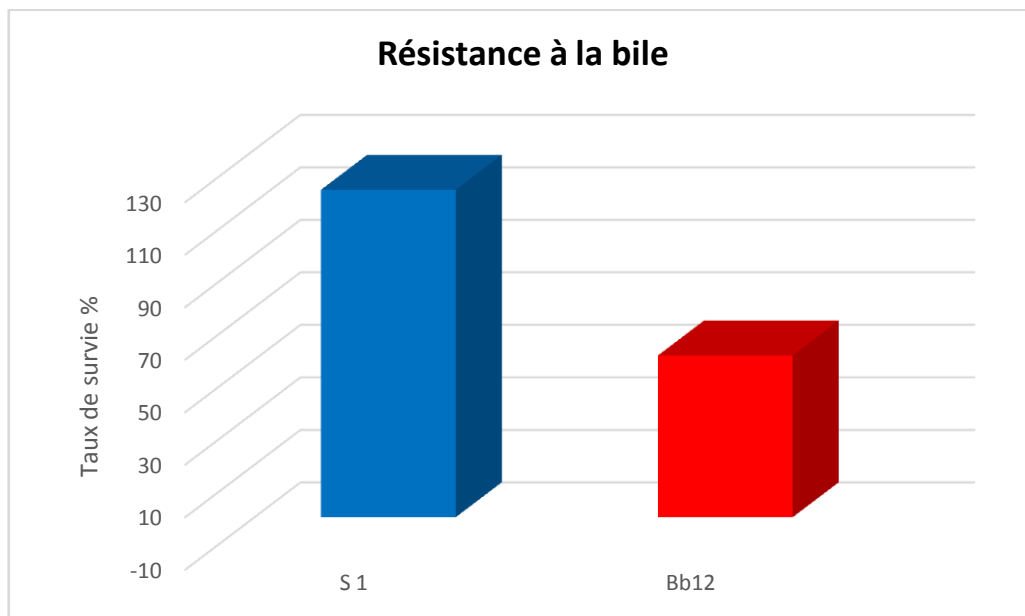
Des résultats publiés par **Burns et al. (2008)**, ont montré que la plus part des souches de *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* et *Lb. delbrueckii* sp. *lactis* sont sensibles aux sels biliaires. Alors que nos résultats montrent le contraire.

**Sukumar et Ghosh (2010)**, ont rapporté que les souches de *Pediococcus* isolées à partir des produits alimentaires fermentés d'origine indiens ont montré une tolérance significative aux sels biliaires.

Une étude récente de **Tokath et al. (2015)**, a montré que les souches de *Lb. plantarum* et *Lb. brevis* (isolées de cornichons) ont présenté une résistance à 0,3% de sels biliaries après 4 heures d'exposition, alors aucune des souches de *Pediococcus* examinées étaient capables de résister à cette concentration après ce temps d'incubation.

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

D'après l'étude réalisée par (**Marteau et al. 1997**), qui a clairement démontré, in vitro, que les sels biliaries avaient un effet bactéricide. De la même manière que pour l'acidité gastrique, cette étude démontre une différence dans la sensibilité aux sels biliaries entre les espèces bactériennes *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus* ont un pourcentage de survie très faible par rapport aux taux affichés par *Lb. acidophilus* et *B. bifidum*. Les sels biliaries auraient un effet détergeant sur les membranes cellulaires résultant en une augmentation de la perméabilité cellulaire.



**Figure 14 :** Survie de S1 et Bb12 sous conditions intestinale simulées (3g/L de la bile + pH8).



# **Conclusion**

### Conclusion

Au cours de cette étude, une souche lactique (S1) a été isolée, purifiée et pré-identifiée à partir des échantillons du poisson marin *Sardina pilchardus*. Les objectifs fixés étaient d'évaluer la résistance de cette souche ainsi que la souche probiotique de référence aux conditions digestives simulées.

Les résultats obtenus montrent que les souches sélectionnées ont présenté une très forte résistance aux différentes conditions digestives hostiles lors de cette étude in vitro.

Les résultats du dénombrement de la croissance sur milieu MRS pour le test d'Alpha amylase (Ph=5.6), indiquent une forte résistance pour la Souche S1 contre ces conditions hostiles simulées avec une valeur de 224%, par rapport au souche Bb12 qui présente une faible résistance a ces conditions avec une valeur de 89.9%.

Le potentiel de résistance des souches a été montré pour les autres tests ; de pepsine, de pancréatine ; et de bile. Tous les résultats montrent que la souche S1 a une forte résistance aux ces conditions digestives et présente un taux de survie supérieur à 100%. Toutefois, la souche Bb12 a démontré un taux de survie de 90 %.

Nos résultats permettent de placer cette souches lactique comme candidate probiotique et qui doit être engagée dans un parcours expérimental complémentaire visant à en explorer d'autres propriétés qui leurs permettraient de remplir les nombreux critères requis pour l'acquisition du statut probiotique.

Pour conclure la souche sélectionnée pourrait être considérée comme une bactérie à potentiel probiotique. Cependant le travail effectué est insuffisant pour confirmer ces résultats.

# **Annexes**

# **Annexes**

# **Références Bibliographiques**

## Références bibliographiques

### « A »

1. **Abad R. et Giráldez A. (1993):** Reproducción, factor de condición tya lla de primera madurez de la sardina, *Sardina pilchardus* (Walb.), del litoral de Málaga, Mar de Alborán (1 989 a 1992). *Bol. Inst. Esp. Oceanog.* 8(2): 145-155.
2. **Afssa. (2005).** Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. 128p.
3. **Ait Belgnaoui A. (2006).** Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière. Thèse de Doctorat. Institut national polytechnique de toulouse.191p.
4. **Aldebert Y., Tournier H. (1971) :** La reproduction de la sardine et de l'anchois dans le golfe du Lion. *Revue des travaux de l'Institut des Pêches Maritimes.* 35(1): 57-75.
5. **Alemaný F., Álvarez F. (1993) :** Growth differences among sardine (*Sardina pilchardus* Walb.) populations in western Mediterranean. *Sci. Mar .* 57 : 229 – 234.
6. **Amar Sidi Mohamed El Yacine (2015).** Effet préventif et curatif de certains aliments fonctionnels sur le développement du cancer colorectal.
7. **Amenzoui K., Tachinanate F.F., yahyaoui A., Kifani S and Mesfioui H. (2006):** Analysis of the cycle of reproduction of *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) off Moroccan Atlantic coast. *C.R.Biologies.* 329: 892-901.
8. **Amrouche T. (2005).** Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de Doctorat. Université Laval, Québec.155p.
9. **Argyri AA, Georgia Z, Kimon-Andreas G, Effie T, George-John EN, Efstathios Z, Parragou et Chrysoula CT. (2013).** Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro test. *Food Microbiol.* 33, 282-291.
10. **Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects .** 3e. Édité par S Salsinen, A.V Wright, & A. Ouwehand. Vol. 633. New York, USA: Marcel Dekker,.

« B »

11. **Boonklao P, kongthong P et Assavaning A. (2006).** Acid and bile tolerance on *Lactobacillus thermotolerans* a novel species isolated from chicken feces. *Kasetsart J Naturel Science.* 40, 13-17.
12. **Bouchefra A. (2012).** Yaourts probiotiques algériens et ferments commerciaux utilisés dans leur fabrication : contrôle de qualité et de l'étiquetage. Thèse de Magister. Université Mentouri de Constantine. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro- Alimentaires. 118p.
13. **Bouchereau J. (1981).** Contribution à l'étude de la biologie et de la dynamique de la population exploitée de *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) dans la baie d'Oran (Algérie). Thèse Doct.3ème Cycle, Univ. Aix-Marseille II, 239 p.
14. **Bouhnik Y. (1998).** Probiotiques, bactéries probiotiques, levains: Survie et effets chez l'homme des bactéries ingérées dans les laits fermentés. Elsevier INRA. 73, 241-247.
15. **Burns P, Vinderola G, Binetti A, Quiberoni A, Gavilan CG et Reinheime RJ. (2008).** Bil-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *Int J Dairy.* 18, 377-385.
16. **Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K (1998).** Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract, *J. Appl. Microbiol.* 84 759- 768.
17. **Chlaida M. (2009) ;** Variabilité Allozymique Associée au Flux Migratoire des Populations de Sardine, *Sardina pilchardus* le Long de la Côte Nord Ouest Africaine. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences. Université Mohammed V – Agdal. Rabat.

« C »

18. **Cummings J.H., Gibson G.R. et Macfarlane G.T. (1989).** Quantitative estimates of fermentation in the hind gut of man. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 86: 76-82.
19. **Cury P., Bakun A., Crawford R.J.M., Jarre A., Quiñones R.A., Shannon L.J., Verheye H.M. (2000):** Small pelagics in upwelling systems: patterns of interaction and

structural changes in "waspwaist" ecosystems. *Ices Journal of Marine Science*. 57: 603-618.

### « D »

20. **Dacosta Y(2001)**. Probiotiques et prébiotiques en alimentation humaine, Lavoisier, Paris, De Roissard H et Luquet FM. (1994). Bactéries lactiques .,Lorica Uriage.1, 25-116.
21. **De Vos P, Garrity G M, Jones D, Krieg N R, Ludwig F A, Schleifer K-H et Whitman W B. (2009)**. Bergey's manual De Vos P, Garrity G M, Jones D, Krieg N R, Ludwig F.
22. **Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. et Janssens, C. (1994)** In : Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologiques, 1 : 25-114.
23. **Desmazeaud M.J ; (1983)** :L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le Lait*, 249-280.
24. **Dortu, C, (2009)**, and p Thonart. « Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et. » *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 13: 143-154.
25. **Dridr et Prevost, (2009)**. Bactéries Lactiques Physiologie, Métabolisme, Génomique et applications industrielles.
26. **Drouault S et Corthier G. (2001)**. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet Res*. 32, 101-117.
27. **Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G et Daly C. (2001)**. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of Bibliographie 178 human origin: correlation with in vivo findings. *The American J of Clinical Nutrition*.73 Suppl 2: 386-392.

### « E »

28. **Ettahiri O., Berraho A., Vidy G., Ramdani M., Do chi T. (2003)**: Observation on the spawning of *Sardina* and *Sardinella* off the south Moroccan Atlantic coast (21-26°N). *Fisheries Research*. 60: 207-222.

« F »

29. **FAO. (2001):** Sardine otolith workshop. FAO Fish. Rep., 685, 49pp.
30. **FAO. (2007):** Regional review on aquaculture development. 5. Central and Eastern European region – 2005. FAO Fisheries Circular. No. 1017/5. Rome. 84pp.
31. **Farnworth E.R. (2008).** Kefir: from folklore to regulatory approval. Journal Nutraceuticals Functional Medicine Foods. 1 pp: 57-68.
32. **Fonty G. et Chaucheyras-Durand F. (2007).** Les écosystèmes digestifs. Tec & Doc. Paris: Lavoisier. XIX-311 p.
33. **Froese R., PaulyD. (2011):** FishBase. World Wide Web electronic publication. URL: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) [http://:www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) (version 08/2011).

« G »

34. **Ganias K., Somarakis S., Koutsikopoulo, C., Machias A. (2007):** Factors affecting the spawning period of sardins in tow highly oligotrophic Seas. *Mar. Biol.* 4: 1559-1569.
35. **Garrido S., Cunha, M.E., Oliveira P.B., van der lingen C.D. (2006).** Diet composition and feeding behaviour of Iberian sardine (*Sardine pilchardus*). *ICES Document C.M.* 2006/ f: 1, 33 pp.
36. **Giannoulaki M., A. Machias et N. Tsimenides (1999) :** Ambient luminance and vertical migration of the sardine *Sardina pilchardus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 178: 29-38.
37. **Gibson G. R. et Roberfroid M. B. (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Jornal. of Nutrition.* Thèse doctorat. Université de Laval. Québec, 125 pp: 1401-1412.
38. **Gournier-Chateau N, Larpent JP, Castellanos MI, et Larpent JL. (1994).** Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Lavoisier Tec&Doc. Paris. 192p.
39. **Guiraud Joseph- Pierre (1998) :** Microbiologie Alimentaire Techniques d'analyses microbiologiques. *ED. Dunod,* paris, 651p.

40. **Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.

### « H »

41. **Heyman M et Heuvelin E. (2006).** Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique le paradoxe. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 20, 85-94.
42. **Holzapfel W. H., Haberer P., Snel J. et Schillinger U., (1998).** Overview of gut flora and Probiotiques. *International Journal of Food Microbiology* 41(2).
43. **Hooper L.V. et Gordon J. I. (2001).** Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*. 292: 1115-1118.
44. **Hopkins M. J., Sharp R. et Macfarlane G. T. (2002).** Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and Liver Diseases*. 34 : 12-18.
45. **Hulm F. (2001).** La santé de l'intestin. Rapport de synthèse de Fair-Flow Europe concernant l'impact des pro- et prébiotiques sur la santé. Institut National de la Recherche Agronomique. France.

### « I »

46. **Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC (2004).** Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18:299-313.
47. **Isolauri G., Majamaa H., Arvola T., Rantala I., Virtanen E. et Arvilommi H. (1993).** Lactobacillus casei train GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology*.105: 1643- 1650.

### « J »

48. **Jedidi H. (2015).** Potentiel prébiotique des acides linoléiques conjugués d'origine laitière: analyse in vitro et effets sur l'écosystème gastro-intestinal. Thèse de Doctorat en sciences et technologie des aliments. Philosophiae Doctor. Québec, université LAVAL. Canada.151p.

### « K »

49. **Kagnoff M. F. et Eckmann L. (1997).** Epithelial cells as sensors for microbial infection. *Journal of Clinical Investigation*. 100: 6-10.

« L »

50. **Lee N.K (2001)** : Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal”, *Food Microbiol.* 18 (1): 17-24.
51. **Ludwig W, Schleifer K-H et Whitman X B. (2009). Order: Lactobacillales. In De Vos P, Garrity G M, Jones D, Krieg N R, Ludwig W, Rainey F A , Schleifer K-H ET Witman W B. (2009). Bergey’s manual of systematic bacteriology, Second Edition Volume three : the Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London New York : 464p.**

« M »

52. **Makhloufi K.M. (2011).** Caractérisation d’une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza, Thèse : Microbiologie .Biochimie, Ecole doctorale iViv, Université Pierre et Marie Curie, France, p 05-07, 18 , 20, 79.
53. **Marteau P. et Seksik P., (2005).** Place des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées postantibiotiques. *Re. Fran. Lab.* 73-76.
54. **Marteau P., Minekus M., Havebaar R., Huis in’t Veld J.H., (1997)** ; Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and effects of bile, *J. Dairy Sci.* 80 1031-1037.
55. **Mechai A. (2009).** Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques, Thèse : Faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar- Annaba, Algérie, p 05, 12, 13, 92-95.
56. **Mitsuoka T. (1989).** *Microbes in the intestine.* Ed. Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan.
57. **Monteiro C., Jorge I.M. (1982).** Age and growth of *Sardine pilchardus* (Walb.) From the Portuguese coast (ICES Div.IXa). *ICES Document C.M.* 1982/H: 19.
58. **Mouhoub R. (1986).** Contribution à l’étude de la biologie et de la dynamique de la population exploitée de la sardine (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792) des côtes algéroises. *Thèse de Magister, USTHB* ,Alger.

59. **Mozzi F, Raya RR et Vignolo GM. (2010).** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell publishing, Singapore, pp. 3-7.

### « P »

60. **Parrish R.H., Serra R. et Grant W.S. (1989) :** The monotypic sardines, sardina and sardinops: their taxonomy, istribution, stock structure and zoogeography. *Canandian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 46 : 2019-2036.
61. **Paul Ross R, Morgan S et Hill C. (2002).** Preservation and Fermentation: present and future. *Int J Food Microbiol.* 79, 3-16.
62. **Pérez-Alvarez José Ángel et Fernández-López Juana (2012) :** Chemical and Biochemical Aspects of Color in Muscle Foods *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*, Second Edition. Edited by Leo M. L. Nollet.
63. **Perlemuter L., Quevanvilliero g., Perlemuter G., Z Amer B. Et Aubert I. C., (1998).** Anatomie et physiologie pour les souris infirmiers. Ed : MASSON, Paris.
64. **Piquepaille C. (2013).** Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de limoges *Progress in oceanography.* 74: 377-396.

### « R »

65. **Rahli F, Saidi N et Kihal M. (2013).** Evaluation of the factors affecting the variation of the physicochemical composition of Algerian camel's raw milk during different seasons. *Adv Environ Biol.* 7 Suppl 14 : 4879-4884.
66. **Rambaud J., Buts J., Corthier G. et Flourié B. (2004).** Flore microbienne intestinale. PARIS: John Libbey Eurotext.
67. **Rastall R. (2004).** Bacteria in the gut: Friends and foes and how to alter the balance. *Jornal of Nutrition.* Québec. pp : 2022-2026.
68. **Rochet M.-J. (2000).** A comparative approach to life- history strategies and tactics among four orders of teleost fish. *ICES J.Mar.Sci.*, **57**: 228-239.

69. **Roos S et Jonsson H. (2002).** A high-molecular mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*. 148, 433-442.
70. **Rose C. and McLoughlin K. (2001):** Review of Shark Finning in Australian Fisheries. Final Report to Fisheries Resources Research Fund. DOAFF Australia.

### « S »

71. **Seignalet, J. (2004).** L'alimentation ou la troisième médecine. Paris: François-Xavier de Guibert.
72. **Silva A., Santos M.B., Caneco B., Pestana G., Porteiro C., Carrera P. et Stratoudakis Y (2006):** Temporal and geographic variability of sardine maturity at length in the northeastern Atlantic and the western Mediterranean. *ICES J Mar Sci* . 63:663–676.
73. **Stiles, M.E, and W .H Holzapfel. (1997) ;** « Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. » *Int J Food Microbiol* 36: 1-29.
74. **Sukumar G et Ghosh AR. (2010).** *Pediococcus* spp a potential probiotic isolated from Khadi (an Indian fermented food) and identified by 16S rDNA sequence analysis. *Af J of Food Science* 4 Suppl 9: 597–602.

### « T »

75. **Taglang S., (2005) ;** .Cours de physiologie de l'appareil digestif. [http : // frank paillard.chez.tixali.fr/infirmier digestif.htm](http://frankpaillard.chez.tixali.fr/infirmier_digestif.htm).
76. **Tannock GW, (1999);** Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. [Review] [33 refs]. *Trends In Biotechnology* 15:270-274.
77. **Thompson, j, and C.R, (1994).** Gentry-Weeks. *Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques* . Dans : *bactéries lactiques* Edited by H De Roissart ,& F.M Luquet. Vol .1.Lorica, Tokath M, Gulgör G, Elmac SB, EGleyen NA et Ozçelik F. (2015). In Vitro Properties of Potential Probiotic Indigenous Lactic Acid Bacteria Originating from Traditional Pickles. *Int BioMed Research*. 315819,8p.

78. **Tredez M et Louise H. (2008)**. Méta- analyse des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogenèse colorectale chez les rongeurs. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE. P 38-39.

« V »

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

80. **Varela L, Larranaga A ; Costas F ; et Rodriguer B. (1988)** : contenido estomacal de la sardina (*sardina pilchardus*) durante la campana saracus 871 en las plataformas cantabrica y de Galicia en febrero de 1987. *bol inst Esp oceanogr.* 5 ; 17-28.

81. **Varela M., Larranaga A., Costas E. et Rodriguez B. (1988)** : Contenido estomacal de la sardina (*Sardina pilchardus*, Walbaum) durante la campana Saracus 871 en las plataformas Cantabrica y de Galicia en Febrero de 1987. *Bol Inst Esp Oceanogr.* 5:17–28.

82. **Vescovo , M, S Torriani, C Orsi, F Macchiarolo, and G Scolari. (1996)**, « Application of antimicrobialproducing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. » *Journal of Applied Bacteriology* 81: 113-119.

« W »

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

84. **Whitehead P.J.P. (1985)**. FAO species catalogue. Vol 7. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei). Part 1. Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. *United Nations Development Program, Rome.* -X-Y-Z- Bibliographie 210.