

01
21

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

M.M.B. 02/15

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل -
Université Mohamed Saddik Ben yahia- Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie Appliqué et
Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و علوم التغذية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme :

Master Académique en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Evaluation de l'action lipolytique d'une association de souches
de *Lactobacillus*.**

Membres de jury :

Présidente : M^{me}. BENHAMADA Wahiba

Examineur : D^r. SIFOUR Mohamed

Encadreur : M^r. KHENNOUF Tarek

Présenté par :

M^{elle}. HELOULOU Amina

M^{elle}. SELLAH Nawel



Année Universitaire 2014 - 2015

Table des matières

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Introduction.....	01

Partie I: Synthèse Bibliographique

Chapitre I: Bactéries lactiques

I.1.Définition des bactéries lactiques.....	02
I.2.Propriétés générale.....	02
I.3.Origine et Habitat des bactéries lactiques.....	03
I.4.Les domaines d'application des bactéries lactiques.....	03
I.4.1.Dans l'industrie alimentaire.....	03
I.4.2.Dans le domaine thérapeutique.....	04
I.5.Classification des bactéries lactiques.....	05
I.6. Genre <i>Lactobacillus</i>	05
1.6.1. Les Lactobacilles homofermentaires stricts.....	05
1.6.2. Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts.....	05
1.5.3. Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs.....	07
1.7. L'activité lipolytique des bactéries lactiques.....	07

Chapitre II: Les probiotiques

II.1. Définition et Historique.....	08
II.2.Caractéristiques souhaitables des probiotiques.....	08
II.3. Les micro-organismes probiotiques.....	09
II.3.1. Les bactéries.....	09
II.3.1.1. Les <i>Lactobacillus</i>	09
II.3.1.2. Les <i>Bifidobacterium</i>	09
II.3.1.3. Autre bactéries probiotiques.....	10
II.3.2. Les levures et moisissures.....	10
II.4. Les principaux effets bénéfiques des Probiotiques.....	10
II.4.1. L'amélioration de la digestibilité de lactose.....	10
II.4.2. Des effets sur l'activité du système immunitaire.....	11
II.4.3. Maladies inflammatoires chronique intestinales.....	11
II.4.4. L'abaissement du taux de cholestérol sanguin.....	11
II.4.5. Activités antibactérien.....	12

Table des matières

II.4.6. Prévention contre le Cancer de colon.....	12
II.4.7. Prévention contre l'allergie.....	12
II.4.8. Prévention contre l'infection par <i>Helicobacter pylori</i>	13

Partie II: Partie expérimentale

Chapitre III: matériel et méthode

III.1. Matériel.....	14
III.2. Méthode.....	14
III.2.1. Isolement et purification des souches de <i>Lactobacillus</i>	14
III.2.2. Recherche de la catalase.....	15
III.2.3. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH).....	15
III.3. Screening de l'activité lipolytique des souches.....	15
III.3.1. Activité estérase.....	15
III.3.2. Activité Lécithinase.....	15
III.3.3. Activité lipase.....	16
III.4. études d'autres activités.....	16
III.4.1. Etude de l'activité protéolytique.....	16
III.4.2. Etude de l'activité amilolytique.....	16
III.4.3. Etude de la production des éxopolysaccharides.....	16
III.4.4. L'auto-agrégation.....	16
III.4.5. l'hydrophobicité.....	17
III.5. L'étude <i>in vivo</i>	17

Chapitre IV: Résultats et discussions

IV.1. Isolement et purification des souches de <i>Lactobacillus</i>	18
IV.2. Etude de l'activité lipolytique.....	19
IV.3. Etude de l'activité protéolytique.....	20
IV.4. Etude de l'activité amilolytique.....	20
IV.5. Etude de la production des éxopolysaccharides.....	21
IV.6. L'auto-agrégation.....	21
IV.7. L'hydrophobicité.....	22
IV.8. Etudes <i>in vivo</i>	24
IV.8.1. Paramètres plasmatiques.....	24
IV.8.2. Poids des organes.....	24
IV.8.1. Poids des animaux.....	25

Table des matières

Conclusion.....	27
Références bibliographiques.....	28
Annexe	

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	les genres des bactéries lactiques, leurs type fermentaire et produits....	07
Tableau 02	exemples des souches utilisées comme probiotiques.....	09
Tableau 03	Caractéristiques des 14 souches de <i>Lactobacillus sp.</i>	18
Tableau 04	Caractéristiques de la souche <i>Lactobacillus satsumensis</i> 13.	19
Tableau 05	Les caractéristiques des quatorze souches productrices d'enzymes et d'EPS.....	21
Tableau 06	Les pourcentages d'auto-agrégation des souches de <i>Lactobacillus</i>	Annexe
Tableau 07	Les pourcentages de l'hydrophobicité des souches de <i>Lactobacillus</i> .	Annexe
Tableau 08	concentration des paramètres plasmatiques et poids des organes et animaux.....	Annexe

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Figure 01	Les différents domaines d'application des bactéries lactiques.....	04
Figure 02	Voies de dégradation du glucose par les bactéries lactiques.....	06
Figure 03	La dégradation de l'amidon par les <i>Lactobacillus</i>	20
Figure 04	Les pourcentages d'auto-agrégation des souches de <i>Lactobacillus</i>	22
Figure 05	Les pourcentages d'hydrophobicité des souches de <i>Lactobacillus</i>	23
Figure 06	concentration des paramètres plasmatiques.....	24
Figure 07	poids des animaux.....	24
Figure 08	poids des organes.....	25

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ATP : Adénosine Triphosphate.

EPS : Exopolysaccharides.

% G+C : % de Guanine + Cytosine.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

L : *Lactobacillus*.

MRS: Man-Rogosa and Sharp.

NaCl : Chlorure de sodium.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

FAO: Food and Agriculture Organisation.

TG: Triglyceride.

HDL: High Density Lipoprotein

PBS: Phosphate Buffered Saline.

rpm : rotation par minute.

ufc : Unité Formant Colonie.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ATP : Adénosine Triphosphate.

EPS : Exopolysaccharides.

% G+C : % de Guanine + Cytosine.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

L : *Lactobacillus*.

MRS: Man-Rogosa and Sharp.

NaCl : Chlorure de sodium.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

FAO: Food and Agriculture Organisation.

TG: Triglyceride.

HDL: High Density Lipoprotein

PBS: Phosphate Buffered Saline.

rpm : rotation par minute.

ufc : Unité Formant Colonie.

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles sont des bactéries à Gram+ qui appartiennent à divers genres comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus* et *Carnobacterium* (Dortu et Thonart, 2009).

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis longtemps de façon consciente ou non pour leurs activités technologiques. Elles ne se réduisent pas à leur importance économique, mais jouent un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé (Idoui et al, 2009).

Les bactéries lactiques interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires: saumurage des légumes, boulangerie, fabrication du vin, saurissage des poissons, des viandes et des salaisons...etc. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques (Labioui et al, 2005).

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont consommées quotidiennement et en grande quantité par des populations très importantes. Dans les yaourts, par exemple, deux espèces de bactéries lactiques (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) sont présentes à 10^8 - 10^9 germes par gramme. En plus de leur intérêt dans la fabrication et la préservation des produits alimentaires, certaines souches de bactéries lactiques ont été décrites comme ayant des effets bénéfiques sur la santé humaine. Des travaux de plus en plus nombreux montrent ou suggèrent en effet les effets bénéfiques de ces bactéries. Un certain nombre d'études cliniques chez l'homme ou sur des modèles animaux ont notamment confirmé l'effet bénéfique des laits fermentés et des yaourts dans le cas d'intolérance au lactose, de diarrhées virales ou de diarrhées associées à la prise d'antibiotiques. Les mécanismes par lesquels les bactéries lactiques exercent leurs effets bénéfiques sont multiples (Drouault et Corthier, 2001).

Dans notre étude, nous avons étudié l'activité lipolytique des bactéries lactiques et plus spécifiquement les souches du genre *Lactobacillus* isolées à partir du beurre et de rumen de chèvre *in vitro* et *in vivo*.

I.1. Définition des bactéries lactiques

Avant le vingtième siècle, le terme bactéries lactiques (*Lactic acid bacteria*) a été utilisé pour signifier les organismes du lait acidifié (*Milk-souringorganisms*). Significativement, la première culture pure de ces bactéries était celle de *Bacterium lactis* (probablement *Lactococcus lactis*) obtenu par J. Lister en 1873. Des progrès importants dans la classification de ces bactéries ont été apparus quand les similarités entre les bactéries du lait acidifié et les autres bactéries productrices d'acide lactique à partir d'autres sources étaient reconnues (Axelsson, 2004).

Le groupe des bactéries lactiques, a été décrit pour la première fois par Orla Jensen en 1914 et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter des glucides en produisant de l'acide lactique (Kandler, 1983 ; Novel, 1993), dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Bifidobacterium* (Bermúdez-Humarán et Langella, 2009).

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles forment un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilles produisant de l'acide lactique comme produit majeur du métabolisme (Badis et al, 2005 ; Dortu et Thonart, 2009), dont la classification fonctionnelle de bactéries non pathogènes et non toxigènes (Mayo et al, 2010). Elles se rattachent à deux arbres phylogénétiques ou embranchement. L'embranchement des *Clostridium*, dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de G+C inférieure à 50%, comprend le groupe des bactéries lactiques au sens strict. L'embranchement des *Actinomycètes*, dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de G+C supérieure à 50%, comprend des genres apparentés qu'on range souvent au sens large sous l'appellation de bactéries pseudo-lactique (Dacosta, 2000).

I.2. Propriétés générale

Les bactéries lactiques sont généralement définies comme un groupe de bactéries sous forme de coques ou de bâtonnets à Gram positif, généralement immobiles, jamais sporulées, elles sont dépourvues de nitrate réductase et de cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions) (Axelsson, 2004 ; Mayo et al, 2010 ; Pringsulaka et al, 2011), généralement catalase négative mais parfois une pseudo-catalase est détectée dans des cultures sur une faible concentration en sucre (Pot, 2008). Elles sont aéro-anaérobie facultatives ou micro-aérophiles (Kandler, 1983), à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5 (Axelsson, 2004). Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides (Larpent, 1989 ; Novel, 1993). Ce sont les bactéries les plus largement utilisées comme ferments pour la transformation industrielle des produits laitiers, la viande, les légumes, le vin, les poissons, les charcuteries, le pain au levain et les produits céréaliers fermentés (Badis et al, 2005).

En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutérine, le dioxyde de carbone et les bactériocines (Pilet et al, 1998 ; Dortu et Thonart, 2009).

Les bactéries lactiques sont, selon la voie qu'elles empruntent pour fermenter les hexoses, sont dites «homofermentaires» car elles produisent majoritairement de l'acide lactique (Fooks et Gibson, 2002), par la voie de la glycolyse (Embden-Meyerhof-Parnas) (Novel, 1993), alors que d'autres sont dites «hétérofermentaires» et produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate, éthanol et CO₂) (Fooks et Gibson, 2002) par la voie 6-phosphogluconate/phosphokétolase (6-pg/pk) (Novel, 1993). Cependant, quelques espèces sont considérées comme hétérofermentaires facultatifs. (Axelsson, 2004 ; Jozalaet *al*, 2005). Certaines bactéries homofermentaires sont aussi capables de fermentation hétérolactique dans des conditions de croissance non optimales ou selon la nature de sucre utilisé (Novel, 1993).

I.3. Origine et habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont largement répandues dans la nature et sont généralement associées aux habitats riches en nutriments où les carbohydrates, les protéines, les vitamines sont habituellement abondantes et sont aussi associées aux nutriments faiblement oxygénés (Mayo *et al*, 2010 ; Lopez-Diaz *et al*, 2000). Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, les viandes, les boissons, les surfaces des végétaux, les fruits, les eaux et les eaux usées (König et Fröhlich, 2009 ; Monnet *et al*, 2005), mais d'autres sont aussi membres de la flore normale de la bouche, les régions gastro-intestinales et urogénitales des humains et des animaux (Lopez-Diaz *et al*, 2000 ; Navarro *et al*, 2000 ; El Shafeiet *al*, 2000 ; Matharaetal, 2004) et aussi sur la surface de la peau (Badis *et al*, 2005), sans pour autant lui provoquer des maladies, à l'exception de quelques cas causés par les *Streptococcus* et certains *Lactobacillus* (König et Fröhlich, 2009), par exemple des infections dues à *Streptococcus pneumoniae* (Monnet *et al*, 2005). Les bactéries lactiques constituent aussi la flore microbienne dominante responsable de la fermentation des céréales et des plantes fourragères ensilées (Carr *et al*, 2002 ; Kotelnikova et Gelfand, 2002). Même si elles se développent dans une variété d'habitats, elles exigent des carbohydrates fermentescibles, des acides aminés, des peptides, des acides gras, des sels et des vitamines pour leur croissance (Shihata et Shah, 2000 ; Björkroth et Holzappel, 2003 ; Hammes et Hertel, 2003). Elles se développent aussi avec la levure dans le vin, la bière et le pain (Hassan et Frank, 2001).

I.4. Les domaines d'application des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent des intérêts dans l'industrie que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique, qui leurs sont acquis depuis fort longtemps (Desmazeaud, 1996).

I.4.1. Dans l'industrie alimentaire

Ces bactéries ont un rôle dans la préservation des aliments par l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent, telles que les bactériocines qui jouent un rôle majeur dans la conservation des produits laitiers fermentés et contribuent à l'inhibition des germes contaminants. Elles ont aussi un rôle dans la prévention d'empoisonnement, l'augmentation de la valeur nutritive et l'amélioration de la qualité organoleptique des produits fermentés (Dortu et Thonart, 2009).

Leur utilisation est apparue, depuis des millénaires, dans la fabrication des aliments comme les fromages (par exemple les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* sont

utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés) (Yateem et al, 2008), les charcuteries, les boissons fermentés, le pain au levain, les sauces, les saumures, les légumes fermentés, les ensilages, saurissage des poissons...etc (Badis et al, 2005). Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques (Labioui et al, 2005). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères: absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Hassan et Frank, 2001).

I.4.2. Dans le domaine thérapeutique

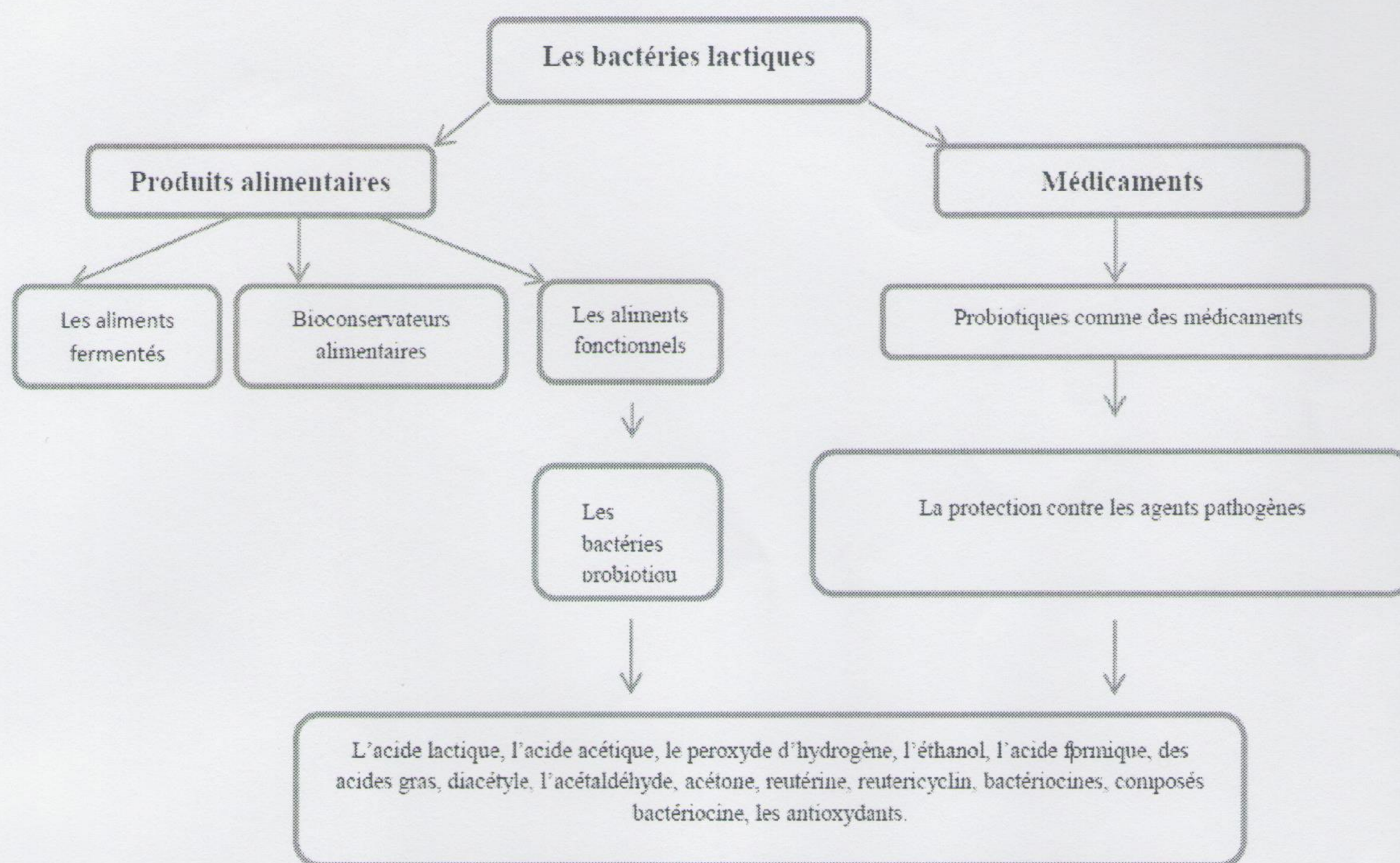


Figure 01 : Les différents domaines d'application des bactéries lactiques (Abriouel et al, 2012).

Étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem et al, 2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées, Mkrtchyan et al, 2010 et El-Ghaish et al, 2011, ont cité la capacité des bactéries lactiques de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique, aussi les souches de *Lactobacillus crispatus*, sont utilisées sous forme de suppositoires pour 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 (Uehara et al, 2006 ; Bermúdez-Humarán et Langella, 2009), ont démontré également la capacité d'utiliser les bactéries lactiques comme vecteurs vaccinaux (figure 01).

I.5. Classification des bactéries lactique

La monographie d'Orla-Jensen (1919) constitue la référence pour l'étude des bactéries lactiques. Orla Jensen utilise les caractéristiques suivantes comme base de classification: morphologie (cocci ou bâtonnets, formation tétrade), mode de fermentation du glucose (homo ou hétérofermentation), la croissance à certaines températures cardinales (ex: 10°C et 45°C), les types de sucres utilisés. Ces caractéristiques sont toujours très importantes dans la classification des bactéries lactiques (Axelsson, 2004). Selon la dernière édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2009), les bactéries lactiques sont classées dans l'embranchement des Firmicutes, la classe des *Bacilli* et l'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles (DeVos et al 2009). Douze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Fooks et Gibson, 2002).

I.6. Genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* a été décrit par Beijerinck en 1901. Les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes, elles sont homofermentaires ou hétérofermentaires, aéro-tolérantes mais elles peuvent aussi croître sous des conditions d'anaérobiose, généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Elles sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C à 53°C. Les thermophiles sont incapables de se développer à moins de 15°C (Salminen et al, 2004).

Le genre *Lactobacillus* rassemble plus de 120 espèces depuis *acetotolerans*, *acidophilus*, *brevis*, *casei*, *delbrueckii* ou *bulgaricus*, *fermentum*, *helveticus*, *plantarum*, *reuteri*, *rhamnosus*, jusqu'à *zymae*...etc. Chaque espèce comprend de plus un certain nombre de sous-espèces et un grand nombre de souches spécifiques (Antoine, 2011).

Orla-Jensen (1919) a proposé de diviser le genre *Lactobacillus* en trois sous genres: *Thermobacterium*, *Betabacterium*, *Streptobacterium*.

I.6.1. Les Lactobacilles homofermentaires stricts

Regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Thermobacterium*, qui dégradent les hexoses en acide lactique (figure 02) (tableau 01).

I.6.2. Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts

Regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Betabacterium*, fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO₂. Ils dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique. Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate (figure 02) (tableau 01).

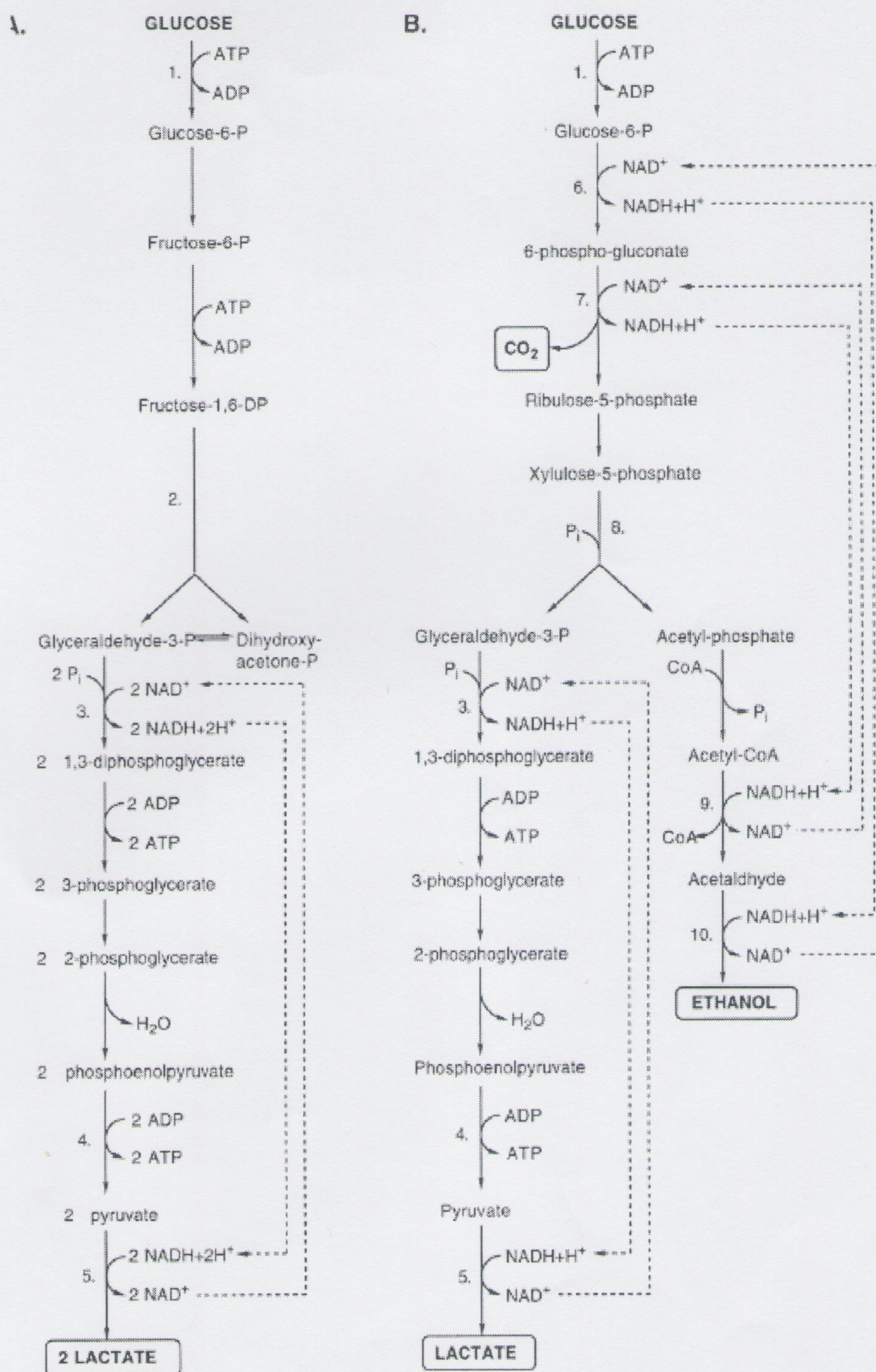


Figure 02: Voies de dégradation du glucose par les bactéries lactiques (Salminen et al, 2004).

I.6.3. Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs

Regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Streptobacterium*, métabolisent les hexoses en acide lactique et dégradent aussi les pentoses. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate (Stiles et Holzappel, 1997) (figure 02) (tableau 01).

Tableau 01: les genres des bactéries lactiques, leurs type fermentaire et produits (Kandler, 1983).

Genre(Subgenre)	Type de fermentation	Produit essentiel
<i>Streptococcus</i>	homofermentaire	Lactate
<i>Pediococcus</i>	homofermentaire	Lactate
<i>Lactobacillus</i>	homofermentaire	Lactate
<i>Thermobacterium</i>	homofermentaire	Lactate
<i>Streptobacterium</i>	homofermentaire	Lactate
	hétérofermentaire	Lactate: acétate
<i>Betabacterium</i>	hétérofermentaire	Lactate : acétate : CO ₂
<i>Leuconostoc</i>	hétérofermentaire	Lactate : acétate : CO ₂
<i>Bifidobacterium</i>	hétérofermentaire	Lactate : acétate

I.7. Activité lipolytique des bactéries lactiques

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites par les bactéries à Gram positif que par des bactéries à Gram négatif. Les bactéries lactiques sont considérées comme faiblement protéolytiques et lipolytiques par comparaison avec d'autres espèces bactériennes telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ou *Flavobacterium*. Donc exigent des acides aminés, des purines, des pyrimidines et des vitamines pour leur croissance (Fickers et al, 2008 ; Karam et al, 2012).

II.1. Définition et Historique des probiotiques

Le professeur Ellie Metchnikoff, directeur de l'Institut Pasteur et prix Nobel de médecine en 1908, est avant tout un chercheur, il émet l'hypothèse que la longévité reconnue de certaines peuplades comme les bulgares, les turcs et les arméniens, pourrait être due à une particularité de leur alimentation. En effet, ces peuples consomment au quotidien de grandes quantités de lait fermenté, ancêtre du yoghourt (il identifiera dans ce lait fermenté deux bactéries, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, auxquelles il attribuera ces bienfaits de « longue vie ») (Metchnikoff, 2004).

Le terme «probiotique» fut d'abord introduit en 1965 par Lilly et Stillwell, par contraste avec les antibiotiques, et les probiotiques furent définis comme facteurs de croissances produits par microorganismes stimulant la croissance des autres organismes (Lilly et Stillwell, 1965). En 1989, Roy Fuller a mis l'accent sur la demande de viabilité des probiotiques et introduisit l'idée qu'ils avaient un effet bénéfique sur l'hôte (Fuller, 1989). Lors d'une réunion de travail sur le sujet organisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la définition suivante est acceptée « *Les probiotiques sont, des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate capables de produire des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte* » (FAO/OMS, 2002).

Les probiotiques peuvent être utilisés sous la forme de médicaments (en général sous une forme lyophilisée) mais peuvent aussi être présents dans des aliments, notamment les produits laitiers fermentés ou dans des compléments alimentaires (Marteau et Seksik, 2004; Singh et al, 2011).

II.2. Caractéristiques souhaitables des probiotiques

Les probiotiques reconnus actuellement appartiennent pour la plupart à la famille très répandue des bactéries lactiques que l'on trouve naturellement sur de nombreux produits alimentaires: les produits laitiers mais aussi sur la viande, le saucisson, les légumes, le poisson... etc.

Parmi la vingtaine de critères proposés pour caractériser ces micro-organismes particuliers reconnus comme ayant un effet probiotique, on peut citer les suivantes:

- L'origine humaine ;
- Être un habitant naturel de l'intestin;
- Être capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier ;
- Être tolérants à l'acide et à la bile: ils doivent pouvoir survivre lors de leur passage dans l'appareil digestif;
- Résistance aux procédés technologiques, aux temps de conservation et la possibilité de la production en grande échelle ;
- Des effets bénéfiques pour la santé avérés;
- L'adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduire l'adhésion des pathogènes ;
- Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H₂O₂, bactériocines...);
- Non invasif, non carcinogène et non pathogène ;
- Être capable de co-agréger pour former une flore normale équilibrée ;

- Possibilité de cryoprotection (Quillien, 2001; Singh et al, 2011).

II.3. Les micro-organismes probiotiques

Les probiotiques peut être des bactéries, des champignons et des levures. Mais la pluparts des probiotiques sont des bactéries. Parmi les bactéries probiotiques, les bactéries lactiques sont les plus populaires (Singh et al, 2011) (tableau 02).

Tableau 02:exemples des souches utilisées comme probiotiques (Normand et al, 2006).

Espèces de <i>Lactobacillus</i>	Espèces de <i>Bifidobacterium</i>	Autre bactéries lactiques	Autres bactéries	Levures et moisissures
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>En. faecium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. pintolopesii</i>
<i>Lb. paracacei</i>	<i>B. breve</i>	<i>P. acidilactici</i>		<i>A. niger</i>
<i>Lb. plantarum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>S. thermophilus</i>		
<i>Lb. reuteri</i>	<i>B. lactis</i>			
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>			
<i>Lb. salivarius</i>				
<i>Lb. farciminis</i>				

II.3.1. Les bactéries

Les microorganismes probiotiques sont en majorité des bactéries lactiques Gram (+), utilisées dans la production des produits laitiers fermentés. Les bactéries lactiques considérées majoritairement comme probiotiques sont de genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Heyman et Heuvelin, 2006).

II.3.1.1. Les *Lactobacillus*

Les lactobacilles sont les microorganismes Gram positif, non sporulés et généralement non mobiles, peuvent se présenter sous la forme des bâtonnets longs et fins, ou très courts. Ils sont importants pour l'industrie alimentaire, notamment dans les fermentations lactières (Tailiese, 2004). Chez l'homme, les lactobacilles sont présents dans l'écosystème microbien intestinal, mais en quantité faible et très variable en fonction des individus (0 à 10^6 ufc/g) (Heyman et Heuvelin, 2006).

II.3.1.2. Les *Bifidobacterium*

Les bifidobactéries sont des bâtonnets aux formes variées (bifide ou ramifié) dont la caractéristique principale est une forme en Y. Ce sont des bactéries Gram +, non sporulées, immobiles, catalase - et anaérobies. Les espèces les plus utilisées comme probiotiques sont *Bifidobacterium lactis* et *Bifidobacterium longum* (Gomes et al, 1999).

Les bifidobactéries sont la flore dominante dans l'écosystème microbien intestinal ($>10^8$ ufc/g), bien que les espèces soient différentes en fonction de l'âge de l'individu. Les nouveaux nés sont rapidement colonisés par *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium infantis*, surtout s'ils sont

allaités, alors que les adultes hébergent plutôt *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum* et *Bifidobacterium longum* (Heyman et Heuvelin, 2006).

II.3.1.3. Autres bactéries probiotiques

Il existe aussi d'autres bactéries lactiques utilisées comme probiotiques, ces bactéries sont des espèces de *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* et *Enterococcus* (Sreeja et Prajapati, 2013). On a aussi quelques souches d'*E. coli* et de *Bacillus* utilisées comme probiotiques (Normand et al, 2006).

II.3.2. Les levures et moisissures

Des levures peuvent être aussi utilisées comme probiotiques, ces levures sont des espèces de genre *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces boulardii*) (Sreeja et Prajapati, 2013). Parmi les microorganismes utilisés comme probiotiques aussi, les champignons filamenteux tel que *Aspergillus* sp. (Normand et al, 2006).

II.4. Les principaux effets bénéfiques des Probiotiques

Un certain nombre d'effets sur la santé est associé à l'utilisation des probiotiques. Il y a différents degrés de preuves à l'appui de la vérification de ces effets, et la consultation reconnaît qu'il y a des rapports montrant que certaines souches probiotiques n'ont aucun effet clinique dans certaines situations. L'utilisation des microorganismes probiotiques pour leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte doit indiquer les doses et la durée d'utilisation comme le recommande le fabricant de chaque souche ou de chaque produit sur la base de preuves scientifiques, et comme il a été approuvé dans le pays de vente (FAO/OMS, 2001).

II.4.1. L'amélioration de la digestibilité de lactose

Les personnes qui possèdent l'intolérance au lactose ne possèdent pas la capacité de digérer adéquatement le lactose (Stanley et Gilliland, 2001). Le lactose doit être hydrolysé par β -galactosidase ou la lactase pour donner deux monomères, glucose et galactose avant de pouvoir être absorbé dans la circulation sanguine (Fung et al, 2011). Une mauvaise digestion du lactose pourrait causer des symptômes tels que des douleurs abdominales, diarrhées, gonflements. Ces symptômes suivent généralement la consommation de lait par ces personnes. Quand l'enzyme β -galactosidase est insuffisant dans l'intestin grêle, il est possible de fournir cet enzyme par l'alimentation, alors que l'inclusion de β -galactosidase dans le régime alimentaire est assez cher et la survie de l'enzyme au cours du passage à travers de l'estomac est probable serait diminuée. Donc la présence des ferments lactiques viables dans le yogourt peut être bénéfique pour l'intolérance au lactose, parce que à l'intérieur des cellules bactériennes l'enzyme β -galactosidase est protégée au cours du passage à travers de l'estomac (Stanley et Gilliland, 2001).

Quelques souches de bactéries lactiques, telles que *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* et d'autres lactobacilles dans les produits du lait fermenté, peuvent soulager les symptômes de l'intolérance au lactose par fourniture de la lactase bactérienne dans l'intestin et l'estomac. Et quand l'intolérance au

lactose touche près de 70% de la population mondiale, la consommation de ces produits laitiers peut être un bon moyen pour traiter les personnes qui ayant l'intolérance au lactose (Singh et al, 2011).

II.4.2. Des effets sur l'activité du système immunitaire

La plupart des probiotiques stimulent généralement le système immunitaire de l'hôte de façon spécifique et non spécifique, probablement en stimulant de l'activité phagocytaire, et la production d'immunoglobulines A et l'augmentation des sécrétions des cytokines. Malgré des essais limités chez l'Homme, ces résultats peuvent être particulièrement importants chez les personnes âgées, qui peuvent être bénéficié par renforcement de leur réponse immunitaire. Les effets des probiotiques sur le système immunitaire doivent améliorer la réponse immunitaire spécifique et non spécifique, inhibent la croissance des pathogènes et la translocation, et réduire les chances d'infection par des agents pathogènes courants(*Salmonella*, *Shigella*) (Singh et al, 2011).

II.4.3. Maladies inflammatoires chronique intestinales

L'intestin peut être le siège de maladies inflammatoires chroniques, telles que la pochite et la maladie de crohn, ainsi que la rectocolite hémorragique(RCH).A l'aide de modèles animaux chez lesquels on induit une colite (à l'aide de composés chimiques administrés par voie orale), différentes souches de *Lactobacilles*, de *Bifidobacterium* de et *Propionibacterium* ont montré des effets clairement bénéfiques sur la pathologie. Chez l'homme, les études cliniques rapportant des effets bénéfiques portent surtout sur la RCH et la pochite. A titre d'exemple, le cocktail vsl#3 (8souches de bactéries lactiques et bifides), *S.boulevardii* et *E.coli* Nissle 1917 ont montré une diminution importante de risque de récurrence de la pochite. (Normand et al, 2006).

II.4.4. L'abaissement du taux de cholestérol sanguin

Le cholestérol agit comme un facteur de risque dans différentes maladies cardio-vasculaires telles que, le cancer du côlon et hypercholestérolémie. Les résultats des travaux récemment publiés indiquent que la réduction des niveaux excessifs de cholestérol dans le sang diminue les risques de ces maladies. Certains micro-organismes de l'intestin humain sont bénéfiques en termes d'abaissement de cholestérol de sérum (Mahrous et al, 2011).Les espèces étudiées ayant des effets d'abaissement de taux de cholestérol sanguin sont les genres, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* ou *Bifidobacterium*. Les probiotiques qui ont été proposés pour réduire le cholestérol par l'intermédiaire de divers mécanismes celui n'impliquent pas nécessairement la transformation du cholestérol par les souches probiotiques, par exemple la déconjugaison enzymatique des acides biliaires par les sels biliaires hydrolases des probiotiques, l'assimilation du cholestérol, la co-précipitation de cholestérol à partir de la bile déconjugée, la liaison de cholestérol aux parois cellulaires des probiotiques, l'incorporation de cholestérol dans les membranes cellulaires lors de la croissance des probiotiques, la production d'acides gras à courte chaîne durant la fermentation par les probiotiques en présence de prébiotiques et la conversion de cholestérol en coprostanol (García et al, 2012). *L. acidophilus* réduit le cholestérol sanguin par la résolution directe de cholestérol et la déconjugaison des sels biliaires (Mahrous et al, 2011).

II.4.5. Activités antibactériennes des probiotiques

Les probiotiques doivent particulièrement maintenir de bonnes conditions sanitaires au niveau du tractus intestinales, il est donc important qu'elles soient capables d'inhiber le développement des germes pathogènes soit :

- Par la production des substances inhibitrices, tels que les bactériocines, les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène.
- En empêchant l'adhésion des germes pathogènes aux cellules de la paroi intestinale.

Les substances inhibitrices telles que peroxyde d'hydrogène, bactériocines et les acides organiques comme l'acide lactique et l'acide acétique sont produits par *Lactobacillus* sp, *Bifidobacterium* sp, *Enterococcus* sp, *E. coli*, *Leuconostoc* sp, *Pediococcus* sp, *S. cerevisiae* et *Streptococcus* sp, sont efficaces dans l'inhibition de la croissance des pathogènes alimentaires. L'aptitude de l'adhésion à la surface de la muqueuse est un facteur important dans l'exclusion compétitive des bactéries pathogènes, comme la colonisation du tractus gastro-intestinal est basée sur leur aptitude à adhérer à l'épithélium intestinal. Cependant, toutes les bactéries ont la capacité d'adhérer aux cellules intestinale. Les probiotiques tels que les lactobacilles et les bifidobactéries présentent des propriétés adhésives. L'adhésion à la muqueuse intestinale aussi stimule le système immunitaire de l'intestin (Fung et al, 2011).

II.4.6. Prévention contre le Cancer de colon

Il a déjà été démontré que les microorganismes probiotiques peuvent prévenir ou retarder l'apparition de certains cancers. Cela vient de la connaissance que les membres de la microflore intestinale peuvent produire des cancérogènes tels que les nitrosamines. Par conséquent, l'administration de lactobacilles et de bifidobactéries pourrait théoriquement modifier la flore, réduisant les niveaux de β -glucuronidase et des cancérogènes. En outre, il y a des preuves que la réapparition du cancer sur d'autres sites, par exemple la vésicule urinaire peut être réduite par l'instillation intestinale de probiotiques dont *L. casei* Shirota. Des études *in vitro* avec *L. rhamnosus* GG et des bifidobactéries et une étude *in vivo* utilisant des souches de *L. rhamnosus* GG et LC-705 ainsi que *Propionibacterium* sp, ont montré une diminution dans la disponibilité d'aflatoxines cancérogènes dans la lumière intestinale. Toutefois, il est trop tôt pour tirer des conclusions cliniques concernant l'efficacité des probiotiques dans la prévention du cancer (FAO/OMS, 2001).

II.4.7. Prévention contre l'allergie

Les probiotiques peuvent exercer un effet bénéfique sur la réaction allergique en améliorant la fonction de la barrière muqueuse. En outre, la consommation des probiotiques par des jeunes enfants peut être développée leur système immunitaire. Les probiotiques tels que *Lactobacillus* GG peuvent être utilisés pour soulager une partie des symptômes d'allergies alimentaires, comme l'allergie à protéines de lait. La consommation de probiotiques peut être donc un moyen pour la prévention primaire d'allergie chez les personnes sensibles (Singh et al, 2011).

II.4.8. Prévention contre l'infection par *Helicobacter pylori*

Concernant les applications des probiotiques, on a également découvert qu'ils sont actifs contre *Helicobacter pylori*, un agent pathogène Gram négatif responsable de la gastrite de type B, d'ulcères peptiques et du carcinoïde gastrique. Les données *in vitro* et sur les animaux indiquent que les bactéries lactiques peuvent inhiber la croissance des agents pathogènes et diminuer l'activité des uréases nécessaire pour que l'agent pathogène reste dans le milieu acide de l'estomac. Les données concernant l'homme sont limitées, mais il y a des preuves d'un effet induit par *L. johnsonii* La1 (FAO/OMS, 2001). Certains probiotiques (essentiellement des souches de lactobacilles) pourraient augmenter le taux d'éradication d'*H. pylori* en combinaison avec le traitement antibiotique spécifique, diminuer les effets secondaires des antibiotiques prescrits en traitement d'éradication, et diminuer l'intensité de la gastrite à *H. pylori*. Les probiotiques seuls ne sont cependant pas capables de l'éradiquer (Piquet et al, 2007).

On a aussi d'autres effets bénéfiques d'utilisation des probiotiques dans la protection de la santé telle que, prévention de la diarrhée due à certaines bactéries ou à certains virus pathogènes, constipation, troubles de l'appareil génito-urinaire comme (vaginose bactérienne, candidose vaginale, infections urinaires), prévention de syndrome du côlon irritable...etc. (FAO/OMS, 2001).

III.1. Matériel

III.1.1. Milieux de culture et tampons

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

- **Les géloses:**
- MRS (de Man-Rogosa et Sharp);
- Hypersaccharosée;
- gélose PCA;
- amidon;
- gélose nutritive.
- **Les bouillons:** MRS
- **Tampon:** Tampon PBS (pH 7.4).

III.1.2. Appareillages:

- L'appareillage utilisé est le suivant :
- Autoclave (pbibrand) ;
- Bain Marie (Gerhardt Bonn) ;
- Balance (AKERN);
- Balance analytique (AKERN) ;
- Centrifugeuse électrique (Hettich);
- Etuves (Memmert);
- Micropipettes (SMART);
- Microscope optique (Motic);
- pH mètre (Hanna instruments);
- Plaque chauffante ;
- Réfrigérateur (ENIEM);
- Spectrophotomètre (Ultrospec 100 pro) ;
- Vortex électrique (MS2 Mini shaker);

III.1.3. Souche bactérienne

La souche bactérienne *Lactobacillus satsumensis* 13 utilisée lors de la réalisation de l'étude *in vivo* à été fournie par monsieur Khenouf, cette souche à été isolée à partir de rumen de chèvre (Tableau 04).

III.2.Méthode

III.2.1. Isolement et purification des souches de *Lactobacillus*

Les souches ont été isolées à partir du beurre de chèvre, l'échantillon du beurre a étéensemencé sur milieu MRS, milieu adapté à la recherche spécifique des Lactobacilles.

Sur gélose (isolement à partir de la solution mère du beurre de chèvre suivi d'un étalement) et sur bouillon (isolement directe à partir du beurre de chèvre). Les cultures ont été incubées 24h à 37°C.

Des colonies de couleur blanchâtre ou laiteuse ont été récupérées au hasard purifiées par des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS, avec une incubation à 37°C pendant 24h, jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches. Des tests préliminaires comprenant la coloration de Gram (annexe), le test de catalase et l'ADH ont été réalisés. Seules les souches bacilles Gram positif, catalase négative ont été prises en considération (Idoui et al, 2009).

III.2.2. Recherche de la catalase

La catalase est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Mathara et al, 2004).

III.2.3. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, le bouillon Moeller à arginine a été ensemencé par les cultures à tester. Après une incubation à 37°C pendant 24h, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du glucose. La dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac se manifeste par le virage du milieu au violet (Mathara et al, 2004).

III.3. Screening de l'activité lipolytique des souches

III.3.1. Activité estérasique

Selon la méthode de Rainy et Oren, 2011, l'activité estérase des souches de *Lactobacilles* a été recherchée sur gélosé à base de tween 80 dont la composition est la suivante (dans 1L d'eau distillé): peptone, 10g ; NaCl, 5g ; CaCl₂.2H₂O, 0.1g ; et agar, 9g ; pH 7.4. Après autoclavage et refroidissement de milieu de base on a ajouté le Tween 80 stérile dans la gélose pour donner une concentration finale de 1%. Le milieu de culture a été ensemencé par les souches sous forme des spots, en suite incubé à 37°C pendant 7 jours. L'activité estérase se manifeste par l'apparition d'une précipitation autour des colonies.

III.3.2. Activité Lécithinase

Deux milieux de cultures à base de jaune d'œuf, de composition différente ont été utilisés pour l'étude de l'activité Lécithinase des souches de *Lactobacillus*:

- Le premier milieu (dans 1L d'eau distillée): tryptone, 5 g ; extrait de levure, 2.5 g ; glucose, 1 g ; et agar, 15 g.

Mélanger 100 ml de 5% de jaune d'œuf avec 900 ml de milieu de base, après autoclavage couler sur boîtes de pétries.

Les souches ont été ensemencées sous forme des spots sur gélose, ces cultures ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48 h.

- Le deuxième milieu est de composition suivante : (dans 1L d'eau distillé): tryptone, 40 g ; Na₂HPO₄, 5 g ; NaCl, 2 g ; MgSO₄ .7H₂O, 0.01 g ; glucose, 2 g ; et agar, 10 g ; pH 7.6.

Après autoclavage on a ajouté aseptiquement 2 ml de jaune d'œuf dans des tubes qui contiennent 20 ml de milieu de base, après agitation le milieu est coulé dans des boîtes de pétrie, et les souches sont ensemencées sous forme des spots, incubé 3 jours à 37°C, après l'incubation, l'activité Lécithinase est révélée par l'apparition des zones claires autour des colonies (**Rainy et Oren, 2011**).

III.3.3. Activité lipasique

La lipolyse est mise en évidence sur gélose nutritive avec 1% de triglycéride stérile, Cette dernière a été coulée et solidifiée. Des disques de papier Wattman stérile ont été déposés en surface de cette gélose, puis chaque disque reçoit quelques gouttes d'une culture jeune. Après une incubation à 37°C pendant 24h une solution saturée de sulfate de cuivre a été ajoutée sur boîtes, après un court temps rejeté l'excès. La lipolyse est révélée par une zone verte entourée d'un dépôt autour des disques (**Guiraud, 2003**).

III.4. études d'autres activités

III.4.1. Etude de l'activité protéolytique:

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques, la gélose PCA additionnée de lait écrémé à 10% a été coulée, solidifiée et séchée puis des disques de papier Wattman stérile ont été déposés en surface de la gélose. Chaque disque reçoit quelques gouttes d'une culture jeune. Après une incubation à 37° C pendant 24h, Le résultat attendu est un halo clair de protéolyse autour des disques, dont on mesure le diamètre pour évaluer l'intensité de cette action (**Lebbofe et Pierce, 2012**).

III.4.2. Etude de l'activité amilolytique:

Dans cette étude les souches bactériennes sont ensemencées sur gélose à base d'amidon sous forme des spots, après une incubation à 37°C pendant 24h, une détection de la dégradation de l'amidon s'effectue par l'ajout de Lugol à la surface de la culture. L'activité amilolytique se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (**Lebbofe et Pierce, 2012**).

III.4.3. Etude de la production des exopolysaccharides :

Dans cette étude les souches à tester ont été ensemencées en stries sur gélose hypersaccharosée déjà coulée et solidifiée. Après incubation à 37°C pendant 24h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes (**Schilardi et al, 2006**).

III.4.4. L'auto-agrégation

Les essais d'auto-agrégation ont été réalisés selon **Kos et al, 2003**. Les bactéries ont été cultivées à 37°C pendant 24h dans le bouillon MRS. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5000 rpm pendant 15 min, lavées deux fois et remises en suspension dans le PBS et standardisées pour obtenir une DO de 0.25nm (pour donner le nombre de cellules viables d'environ 10^8 ufc. ml⁻¹). Quatre ml de la suspension cellulaire est mélangé au vortex pendant 15 s et l'auto-agrégation est déterminée pendant 3h d'incubation à la température ambiante.

Chaque heure 0,1ml de la suspension supérieure a été transférée dans un autre tube avec 3,9 ml de PBS et l'absorbance (A) a été mesurée à 600 nm. Le pourcentage d'auto-agrégation est exprimé sous

la forme : $1 - (A / A_0) \cdot 100$, où A représente l'absorbance au temps $t = 1, 2, \text{ ou } 3 \text{ h}$ et l'absorbance A_0 à $t = 0$.

III.4.3. l'hydrophobicité

L'adhésion microbienne à des solvants a été mesurée selon la méthode de **Kos et al, 2003**. Les bactéries ont été récoltées dans la phase stationnaire par centrifugation à 5000 rpm pendant 15min, lavées deux fois et remises en suspension dans le PBS pour obtenir une DO de 0.25nm. L'absorbance de la suspension cellulaire a été mesurée à 600 nm (A_0). Un millilitre de solvant a été ajouté à 3 ml de suspension cellulaire. Après une pré-incubation de 10 min à température ambiante, les deux phases ont été mélangé par vortex pendant 2 min, la phase aqueuse a été retirée au bout de 20 min d'incubation à température ambiante, son absorbance (A_1) a été mesurée à 600 nm.

Le pourcentage de l'adhésion bactérienne au solvant a été calculée par la formule suivante : $1 - (A_1 / A_0) \cdot 100$. Trois solvants différents ont été testés dans cette étude: le xylène, qui est un solvant apolaire, chloroforme, un solvant monopolaire acide et de l'acétate d'éthyle, un solvant basique monopolaire.

Seule l'adhésion bactérienne au xylène reflète l'hydrophobicité de la surface cellulaire ou hydrophilie.

III.5. L'étude *in vivo*

Dans l'étude *in vivo* nous avons utilisés des rats Wistars albinos parvenus de l'institut pasteur d'Alger. Les animaux ont été répartis en quatre lots:

Lot 1: animaux témoins non traités (trios rats);

Lot 2: animaux recevant un aliment athérogénique (aliment de base plus le jaune d'œuf et l'huile de noix de coco) pendant 50 jours (trios rats);

Lot 3: animaux recevant un aliment athérogénique pendant 50 jours, après cette période les animaux sont traités par lait fermenté (5 ml) de pH 4.76 – 5.98 et nombre de cellules de *Lactobacillus satsumensis* 13 de $3 \cdot 10^{11}$ à $60 \cdot 10^{11}$ ufc/ml par voie orale pendant huit jours (Cinq rats) ;

Lot 4: animaux recevant un aliment standard pendant 50 jours, après cette période les animaux sont traités par lait fermenté 5 ml par gavage pendant huit jours (Cinq rats).

Durant la première semaine, l'aliment athérogénique est constitué d'un mélange de 100g de l'aliment standard, d'un jaune d'œuf et 2 ml de l'huile de noix de coco. Dans la deuxième semaine, le mélange contient trois jaunes d'œuf. A partir de la troisième semaine le mélange contient cinq jaunes d'œuf.

Les animaux sont pesés avant alimentation, avant traitement et après traitement, et nous avons prélevé le sang à partir du sinus orbital, ensuite les rats sont sacrifiés, le foie et le cœur sont immédiatement prélevés et rincés par l'eau physiologique puis pesés.

Les lipides plasmiques (TG, HDL, cholestérol total) sont évalués en utilisant les méthodes enzymatiques colorimétriques décrites par le fabricant, (pour les TG et le Cholestérol: (LINEAR CHEMICALS S.L., Barcelona, Spain) et pour le Cholestérol HDL: (BioSystems S.A., Barcelona Spain).

IV.1. Isolement et purification des souches de *Lactobacillus*

Un total de quatorze souches ont été isolées et purifiées sur milieu MRS. Sur gélose, les isolats sont apparus de petite taille, à pourtour régulier et de couleur blanchâtre. Sur bouillant, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques. L'observation microscopique a révélé une seule forme de cellules qui est la forme bacille. L'analyse de ces résultats a montré que tous les isolats se sont avérés à Gram positif et catalase négative ce qui est caractéristique des *Lactobacillus sp*. Treize isolats de *Lactobacillus sp* (X1, X2, X3, 11, 21, 22, 31, 42, 43, 44, 51, 61, 62) sont ADH⁻ et un isolat de *Lactobacillus sp* (12) n'hydrolyse pas l'arginine (ADH⁺). (Tableau 03)

Tableau03 : Caractéristiques des 14 souches de *Lactobacillus sp*.

Caractéristiques Souches	Gram	Forme	Catalase	ADH
<i>L.sp</i> X1	+	Bacilles	-	-
<i>L.sp</i> X2	+	Bacilles	-	-
<i>L.sp</i> X3	+	Bacilles	-	-
<i>L.sp</i> 11	+	Bacilles	-	-
<i>L.sp</i> 12	+	Bacilles	-	+
<i>L.sp</i> 21	+	Bacilles	-	-
<i>L.sp</i> 22	+	Bacilles	-	-
<i>L.sp</i> 32	+	Bacilles	-	-
<i>L.sp</i> 42	+	Bacilles	-	-
<i>L.sp</i> 43	+	Bacilles	-	-
<i>L.sp</i> 44	+	Bacilles	-	-
<i>L.sp</i> 51	+	Bacilles	-	-
<i>L.sp</i> 61	+	Bacilles	-	-
<i>L.sp</i> 62	+	Bacilles	-	-

Tableau04 : Caractéristiques de la souche *Lactobacillus satsumensis* 13.

Caractéristique	Gram	Forme	Catalase	oxidase	Croissance à 10°C	Croissance à 45°C	ADH	Type Fermentaire	Survie a pH 2 (%)	Survie a pH 3 (%)	Survie a pH 4 (%)	Sels biliaires 0.3%	Phénol pH 0.4%	Produits antagonistes
<i>L. satsumensis</i> 13	+	Bacilles	-	-	+	+	-	Homo	6.13±0.58	23.06±0.16	97.37±1.63	17.88±0.24	6.38±0.22	+

Badis et al, 2005, ont été étudiées la distribution qualitative des bactéries lactiques dans le lait cru de chèvre de deux populations caprines algériennes (Kabyle et Arabia). Cette distribution montrée que le genre *Lactobacillus* est nettement prédominant dans la population Kabyle (61.48 %); suivi de, *Lactococcus* (22.9%), *Streptococcus* (8.88%), *Leuconostoc* (5.92%) et de loin de *Pediococcus* (0.74 %), alors que les deux genres *Leuconostoc* et *Lactococcus* sont représentés de façon presque similaire dans la population Arabia (32.64 % et 31.02 % respectivement), ainsi que *Lactobacillus* (15.27 %), *Streptococcus* (14.82 %) et *Pediococcus* avec une faible représentation (6.25 %).

IV.2. Etude de l'activité lipolytique

D'après l'observation des boîtes, aucune zone de précipitation n'est obtenue sur gélose à base de Tween 80, aucune zone de lipolyse sur les deux géloses à base de jaune d'œuf et aucune zone verte autour des colonies sur gélose à base de TG. Donc les souches de *Lactobacillus sp* étudié sont dépourvues de l'activité lipolytique que ce soit l'activité estérasique, l'activité lécithinase ou l'activité des lipasique.

Selon la littérature les bactéries lactiques sont peu lipolytique, nos résultats sont en accords avec ceux obtenus par Smit et al, 2005, qui ont montré que les bactéries lactiques possèdent une faible activité lipolytique. Selon Medina et al, 2002, ont montré que les bactéries lactiques sont faiblement lipolytiques par comparaison avec les autres groupes bactériens comme *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Achromobacter*. Ces résultats sont aussi en accords avec ceux obtenus par Crow et al, 1994, qui ont montré que les Lactocoques possèdent une faible activité lipolytique. Par contre Oliszewski et al, 2006, ont obtenus des souches de *Lactobacillus fermentum* ETC1, *L. bulgaricus* ETC2, *L. rhamnosus* ETC14, *Pediococcus pentocaseus* ETC5, *L. plantarum* ETC11 et *Enterococcus faecium* ETC9, possèdent une activité estérase mais avec une intensité variable. Egalement

Padmapriya et al, 2011, ont trouvé que *Lactobacillus sp* (KMCCCB303) à une forte activité lipolytique en comparaison avec *Bacillus sp* (KMCCCB302) et *Pseudomonas sp* (KMCCCB301). Donc l'activité lipolytique des bactéries lactiques diffère d'une souche à l'autre.

IV.3. Etude de l'activité protéolytique

D'après les résultats obtenus lors de la réalisation de ce test, toutes les souches étudiées présentent une croissance sans activité protéolytique.

Selon Karam et al, 2012, la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm, par comparaison à cette donnée, nos souches ne sont pas protéolytiques, dont aucune zone de protéolyse n'est apparue.

Nos résultats non pas en accord avec ceux obtenus par Idoui et Karam, 2008, qui ont trouvé que les bactéries lactiques, isolées à partir du beurre de vache traditionnel de la région de Jijel, présentent un caractère protéolytique, également, Selon Shihata et Shah, 2000, les bactéries de yaourt (*S. thermophilus* et *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus*) ont une forte activité protéolytique en comparaison avec les bactéries probiotiques (*L. acidophilus* et *Bifidobacterium spp*).

IV.4. Etude de l'activité amilolytique

Dans ce test, seules les souches de *Lactobacillus sp* (11, 12, 22) qui ont la capacité de dégradées l'amidon, cette dégradation ce manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies. Les résultats sont présents dans la figure 03.

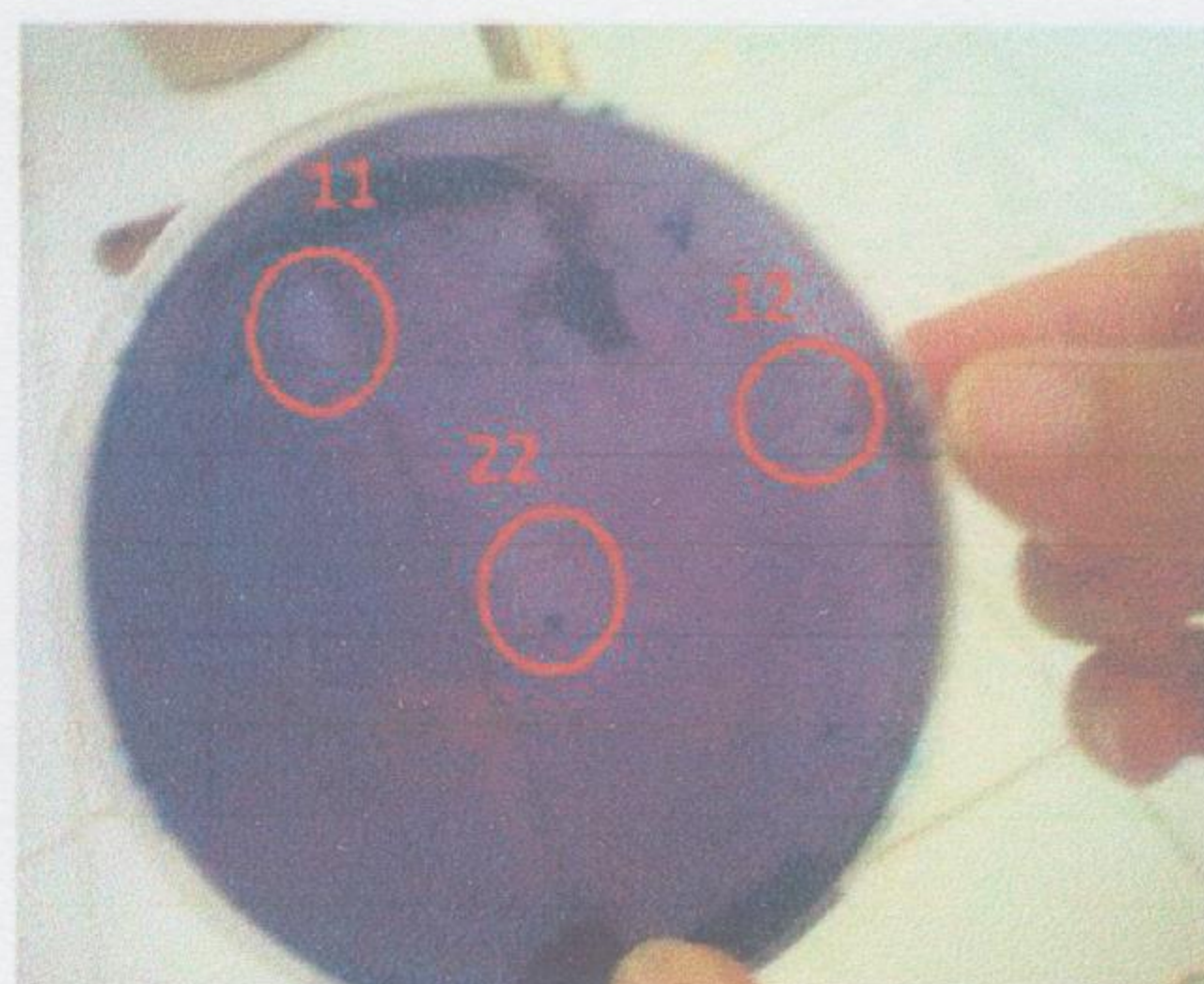


Figure 03 : La dégradation de l'amidon par les *Lactobacillus sp* (11, 12, 22).

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Songré-Ouattara et al, 2008, dont deux souches de *L. plantarum* (4.4 et 6.1) et trois souches de *L. fermentum* (11.11.2, 3.7, 7.4) ont la capacité de produire l' α -amylase mais avec une faible activité amilolytique chez les deux souches de *L. plantarum*. Aussi Guo et al, 2010, sont montrés qu'à partir de 485 bactéries lactiques isolées de la matière fécale de porc, seules trois isolats ont une activité amilolytique.

IV.5. Etude de la production des exopolysaccharides

Ce test a montré que toutes les souches étudiées sont capables de se développer sur un milieu hypersaccharosé en formant des colonies à aspect plus ou moins gluant témoignant une production d'un agent épaississant, les exopolysaccharides. La production des polysaccharides par les bactéries lactiques est démontrée par plusieurs auteurs, **Smitinont et al, 1999**, démontrent que, sur 22 souches de *Pediococcus pentosaceus* de vin Argentinian ont été testées pour leurs capacités de produire les EPS. Il trouve que seules deux souches capable de produire les EPS (souche E₂ p et 12p). **Habibi et al, 2011**, aussi. Ont trouvé que les souches de *L. deibruekiispp Bulgaricus* isolées à partir de Kefir ont la meilleure production des EPS et un maximum de production des polysaccharides à 37C° avec l'addition de 6% de lactose et 2% de peptone caséine. De plus *Lactococcus lactis* et *Enterococcus facium* ont la capacité de produire les EPS en présence de galactose et glucose respectivement et aucun production des EPS observé avec les levures et *Acetobacter*. Les exopolysaccharides (EPS) produits par les bactéries lactiques possèdent une répercussion positive sur la texture, saveur, arôme et la stabilité de la fermentation des aliments (**Minervini et al, 2010**).

Tableau05 : Les caractéristiques des quatorze souches productrices d'enzymes et d'EPS

Souche	Activités					
	Estérase	Lécithinase	Lipase	Amilolytique	Protéolytique	Production des EPS
<i>L.sp</i> X1	-	-	-	-	-	+
<i>L.sp</i> X2	-	-	-	-	-	+
<i>L.sp</i> X3	-	-	-	-	-	+
<i>L.sp</i> 11	-	-	-	+	-	+
<i>L.sp</i> 12	-	-	-	+	-	+
<i>L.sp</i> 21	-	-	-	-	-	+
<i>L.sp</i> 22	-	-	-	+	-	+
<i>L.sp</i> 31	-	-	-	-	-	+
<i>L.sp</i> 42	-	-	-	-	-	+
<i>L.sp</i> 43	-	-	-	-	-	+
<i>L.sp</i> 44	-	-	-	-	-	+
<i>L.sp</i> 51	-	-	-	-	-	+
<i>L.sp</i> 61	-	-	-	-	-	+
<i>L.sp</i> 62	-	-	-	-	-	+

IV.6. L'auto-agrégation

L'adhésion de cellule est un processus concernant un contact entre la membrane de la cellule bactérienne et les surfaces d'interactions. La capacité d'adhésion aux cellules épithéliales et les surfaces des muqueuses a été suggérée d'être une propriété importante de plusieurs souches bactériennes utilisées comme probiotique (**Kos et al, 2003**). L'auto-agrégation ou la formation d'un

biofilm entre les micro-organismes de la même souche, est l'un des mécanismes proposé pour expliquer le rôle protectif des bactéries probiotiques dans l'écosystème intestinal de l'hôte, donc former une barrière afin d'empêcher les bactéries pathogènes de se fixer sur les cellules de la muqueuse (Juarez Tomas et al, 2005).

L'auto-agrégation est évaluée par le taux de la sédimentation. D'après nos résultats les pourcentages d'auto-agrégation des souches de *Lactobacillus sp*, augmentent avec le temps (trois heures), des pourcentages qui varient entre 91.30% - 99.70% (après 3h), (figure 04) (tableau 05, annexe).

L'étude similaire réalisée par Kos et al, 2003, montre que deux souches de *L. acidophilus* (M92, ATCC4356), ont un pouvoir d'auto-agrégation variant entre 35% - 71.30%.

Ahmadovaet al, 2013 ont évalué l'auto-agrégation d'*Enterococcus faecium* AQ71 et certaine souches de *Listeria monocytogenes* isolées à partir de fromage.

Le pourcentage d'auto-agrégation de la souche d'*Enterococcus faecium* AQ71 est 55% et les pourcentages d'auto-agrégation des souches de *Listeria monocytogenes* varient entre 31 à 43%.

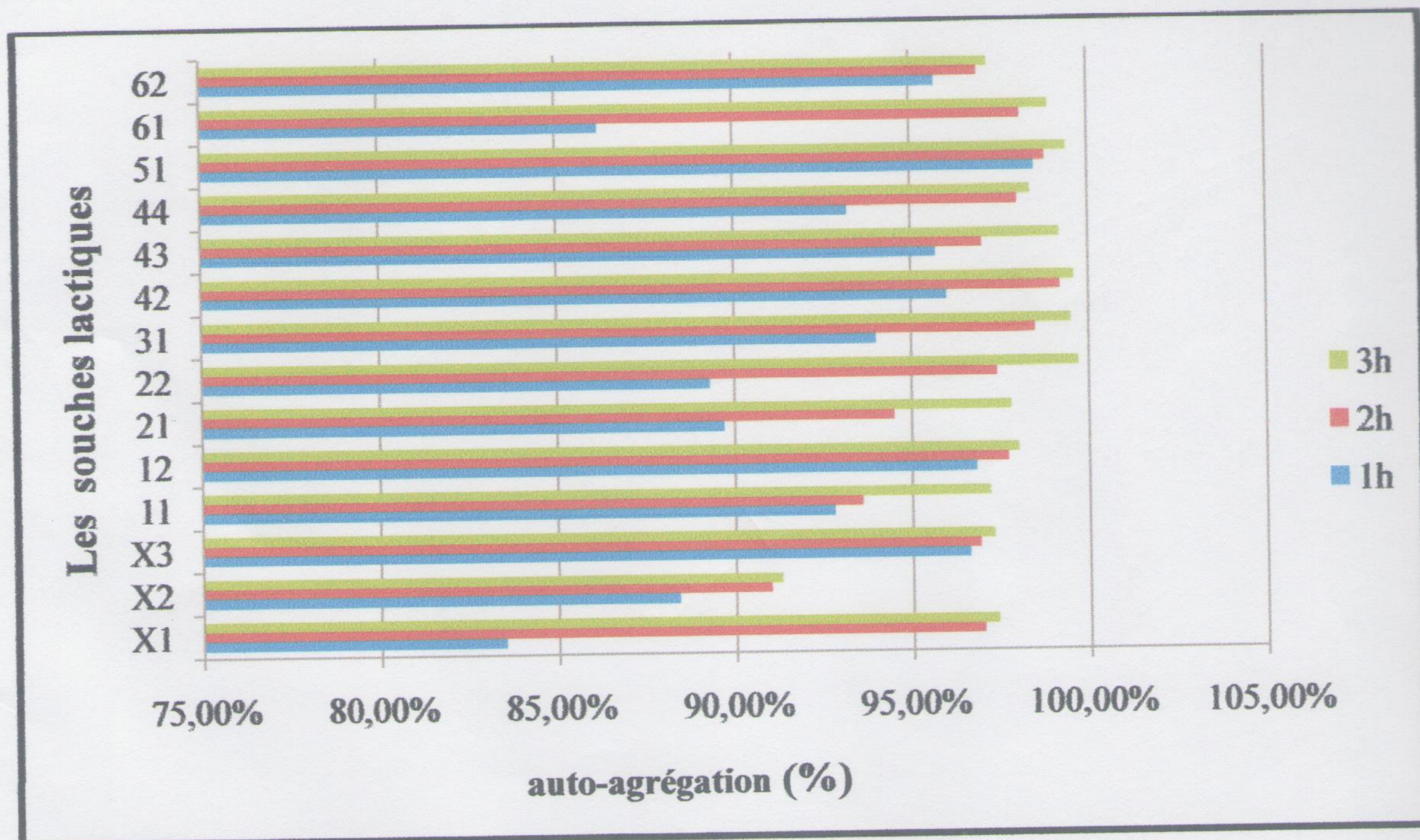


Figure04: Les pourcentages d'auto-agrégation des souches de *Lactobacillus sp*.

IV.7. L'hydrophobicité

Ce test permet d'évaluer l'hydrophobicité de la surface cellulaire des *Lactobacillus sp* vis-à-vis du xylène, chloroforme et acétate d'éthyle qui peut refléter le potentiel de colonisation des *Lactobacillus sp* (figure 05) (tableau 07, annexe).

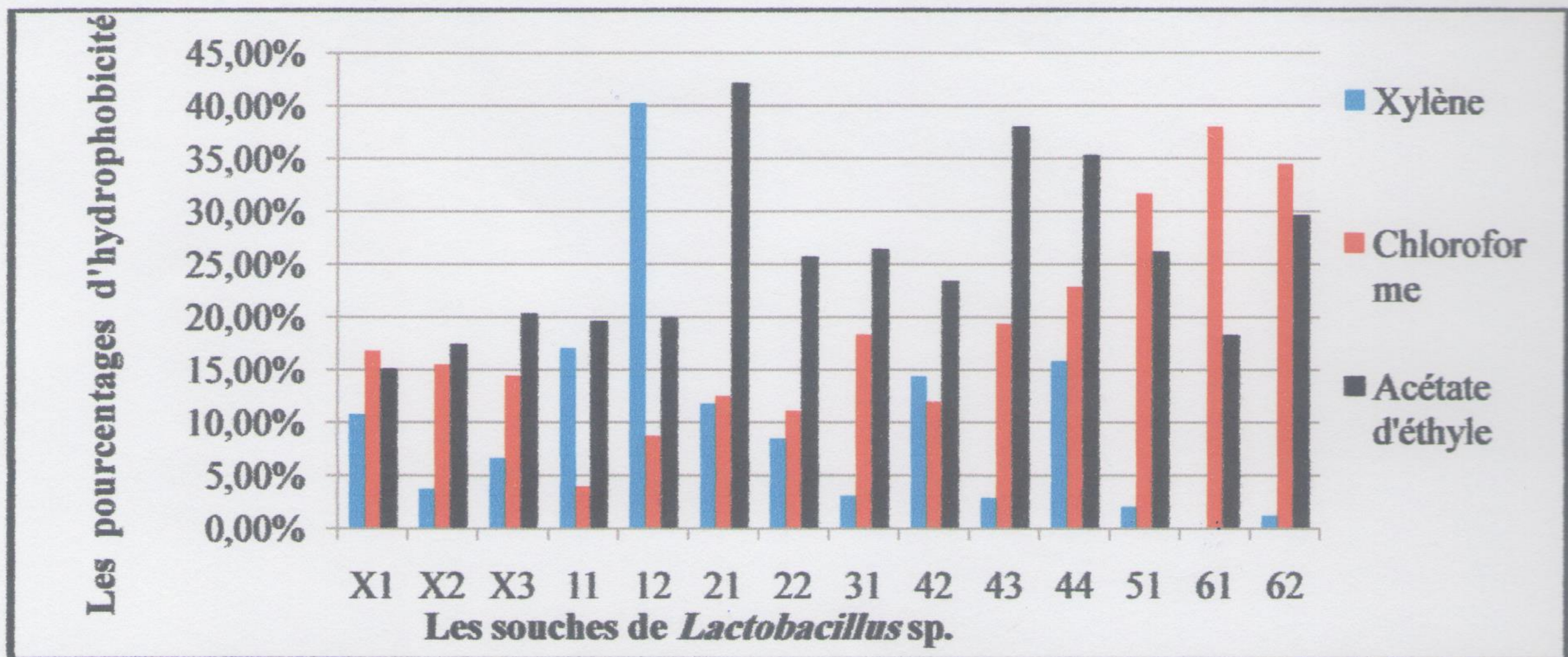


Figure05: Les pourcentages d'hydrophobicité des souches de *Lactobacillus sp.*

Les résultats présentés dans la figure montrent que l'hydrophobicité des souches se diffère d'une souche à l'autre.

Concernant l'adhésion des cellules bactériennes avec le xylène, un solvant apolaire, la valeur la plus élevée (40.30%) est enregistrée avec la souche *Lactobacillus sp.12* démontre que cette souche a une surface cellulaire hydrophobique. Tandis que la souche *Lactobacillus sp.61* était plutôt hydrophile, avec un pourcentage d'hydrophobicité nul au xylène. De plus les souches de *Lactobacillus sp.*(X1, X2, 31,43, 44, 51, 61, 62) sont plus hydrophiles et ont une bonne affinité au chloroforme. Dans un autre coté la souche lactique 21 possède une bonne affinité à l'acétate d'éthyle (42.20%).

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Kos et al, 2003, qui ont trouvé une hydrophobicité de 70.96% pour la souche *L. acidophilus* M92. Tandis que les souches (*L. plantarum* L4 et *Enterococcus. faecium* L3) se sont plutôt hydrophiles. Kapila et al, 2012, ont trouvés que la souche *L. casei* (NCDC-17) possède une maximum affinité au xylène (90.95 ± 4.4 %) suivi par les deux souches de *L. helveticus* (NCDC 292, NCDC 288) avec une hydrophobicité de 34.45 et 33.96 %. On peut dire que dans la même espèce les caractéristiques de la surface des bactéries diffèrent également d'une souche à l'autre.

IV.8. Etudes *in vivo* de l'activité hypolipémiante de la souche *L. satsumensis*13

IV.8.1. Paramètres plasmatiques

D'après les résultats mentionnés dans la figure 06, la concentration des lipides plasmatiques des rats athéro-probiotiques est moins que les rats témoins. Alors que la concentration des lipides plasmatiques des rats probiotiques est plus que les rats témoins. Donc la souche *L. satsumensis* 13 a un effet sur les rats athéro-Probiotiques et n'a pas un effet sur les rats probiotiques.

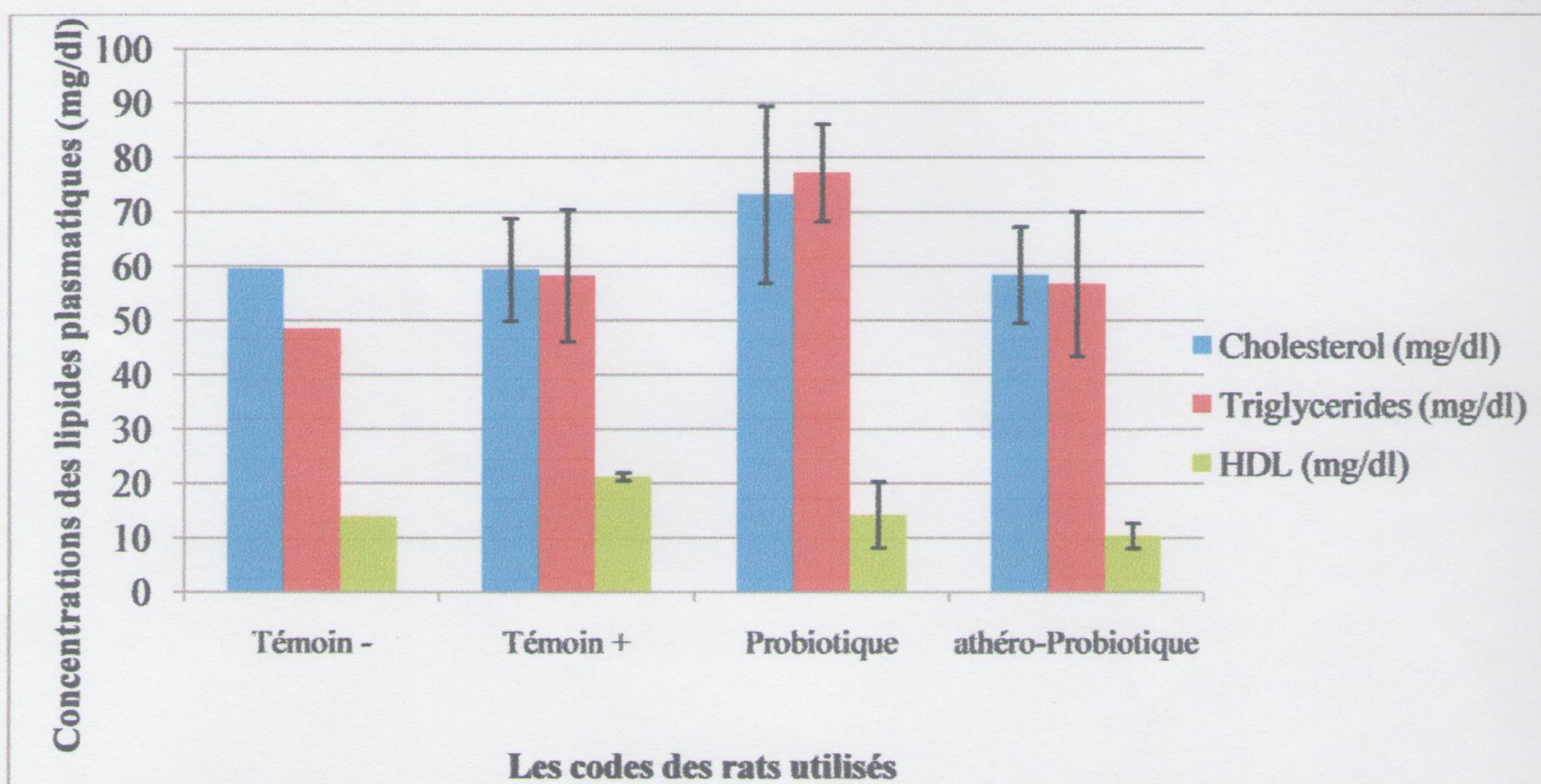


Figure 06: concentration des paramètres plasmatiques

IV.8.2. Poids des animaux

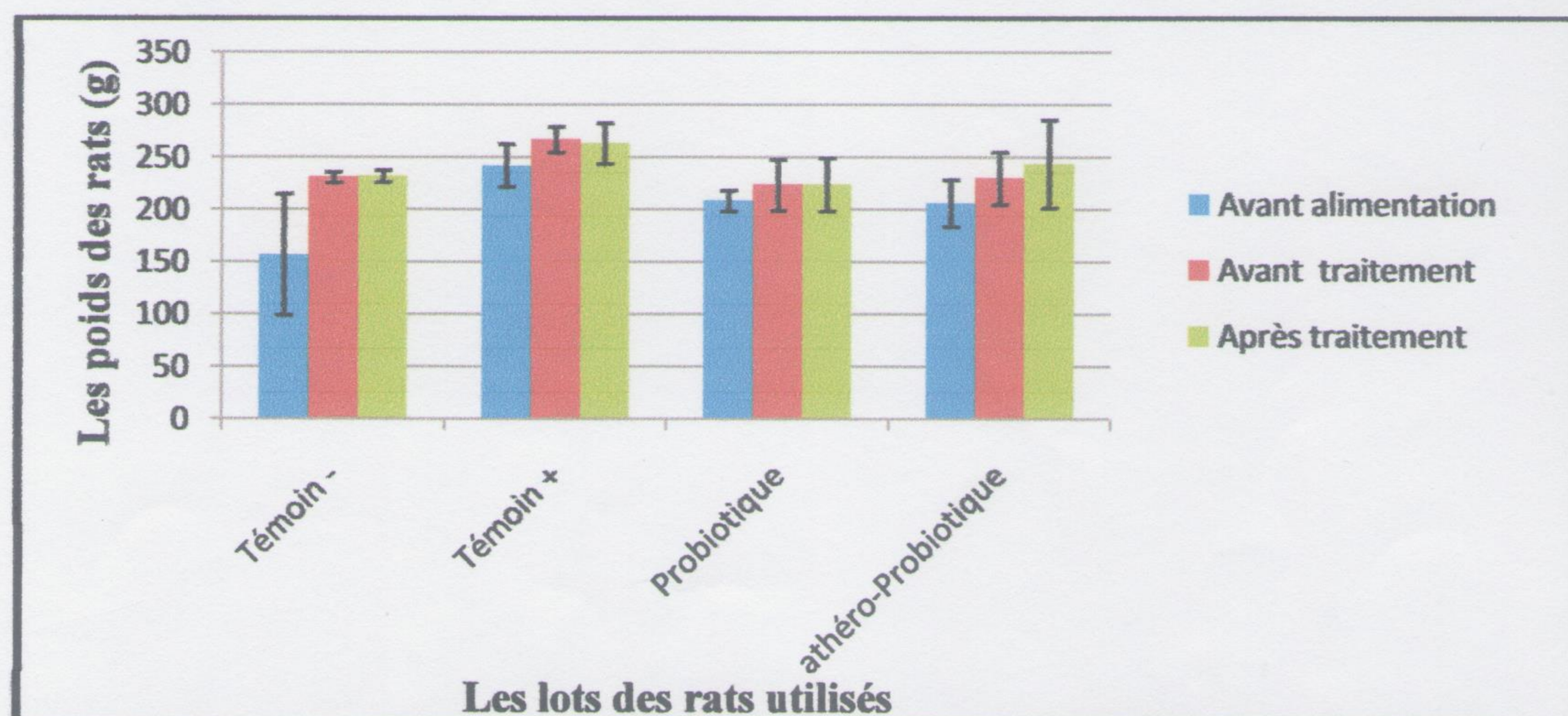


Figure 07: poids des animaux.

D'après la figure 07 le poids des rats témoins négatif est augmenté d'avant alimentation (157 g), au avant traitement (230.80 g) et jusqu'à l'après de traitement (332 g). Alors que le poids des rats témoins positif est augmenté d'avant alimentation (242.20 g) au avant traitement (267.13 g), puis il est diminué après traitement (263.40 g).

Le poids des rats probiotiques est augmenté d'avant alimentation (208.60 g) au avant traitement (223.84 g), et jusqu'à l'après de traitement (224 g). Aussi le poids des rats athéro-probiotiques est augmenté d'avant alimentation (206.20 g) au d'avant traitement (230.20 g), et jusqu'à l'après de traitement (243.80 g).

IV.8.3. Poids des organes

Les poids des cœurs des rats témoins négatif (0.87 g) sont supérieures aux poids des cœurs des rats probiotiques (0.82 g) et athéro-probiotiques (0.85 g). Alors que le poids de foie de témoins négatif (8.34 g) est supérieure de probiotique (8.07 g) et inférieure de athéro-probiotique (9.71 g). Concernant le poids de cœur et de foie des rats témoins positif (0.93 g, 10.69 g) sont supérieures des poids de cœurs et des foies des rats probiotiques (0.82 g, 8.07 g) et athéro-probiotiques (0.85 g, 9.71g).



Figure 08: poids des organes.

Plusieurs études ont montrées l'effet bénéfique des bactéries lactiques sur les lipides plasmatiques, Haroun et al, 2013, indique que la souche *L. plantarum* NRRL B-4496 possède la capacité d'abaissement de taux de cholestérol, de triglycérides, de LDL et de HDL dans tous les sujets traités par rapport au témoin négatif qui non traité, également, Wang et al, 2014, sont montrés que les souches de bactéries lactiques B0006, B0007 et B0022 isolées à partir de la moutarde fermenté ont la capacité de réduire des concentrations élevées de cholestérol (plus de 153 µg/mL). Tsai et al,

2014, a montré qu'un produit probiotique (PROBIO S-23) avait la capacité de diminuer la concentration de cholestérol, LDH et TG dans le sérum dans une étude *in vivo*.

D'après les résultats mentionnés dans la figure 07, les poids des rats traités ne sont pas diminués après traitement par la souche *L. satsumensis 13*, donc cette souche n'a pas un effet sur le poids des rats traités.

D'après la figure 08, la diminution du poids des cœurs et des foies des rats traités est à cause de la dégradation des graisses accumulées dans ces organes par la souche *L. satsumensis 13*.

Les probiotiques sont des microorganismes vivants capables de produire des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte. Elles sont utilisées pour leurs effets nutritionnels et thérapeutiques.

D'après les résultats des études utilisées dans ce travail. Nous avons isolée et purifiées quatorze souches de *Lactobacillus* à partir du beurre de chèvre originaire de la Wilaya de Jijel (Est d'Algérie).

Les résultats obtenus suggèrent que nos souches purifiées, ne possèdent pas l'activité lipolytique et protéolytiques, capables de produire des exopolysaccharides, trois souches (11, 12,22) possèdent l'activité amilolytique. Aussi le pourcentage d'auto-agrégation de nos souches été élevé et la souche 61 possède une hydrophobicité de 40.30%.

Les résultats de l'étude *in vivo* indiquent que la souche *Lactobacillus satsumensis* 13 possède une très faible capacité de réduire le taux de cholestérol, de triglycérides et HDL chez les rats testés.

D'autres études seront nécessaires pour déterminer le mécanisme qui soutient l'effet hypocholestérolémiant. Il sera également nécessaire de tester *in vivo* sur des animaux, en utilisant des doses variables de bactéries sur des durées plus longues, pour évaluer le potentiel probiotique à long terme de *L. satsumensis* 13.

Références bibliographiques

- Abriouel H., Benomar N., Cobo A., Caballero N., Fuentes M.A.F., Pulido R.P. and Galvez A., 2012.** Characterization of lactic acid bacteria from naturally fermented *Manzanilla Aloreña* green table olives. *Food Microbiology*, 32: 308-316.
- Ahmadova A., Todorov S.D., Choiset Y., Hanitra Rabesona H., Zadi T.M., Kuliyeu A., Melo Franco B.D.G., Jean-Marc Chobert J.M. and Haertlé T., 2013.** Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*, 30: 631-641.
- Antoine J.M., 2011.** Les ferments lactiques et les laits fermentés: nature et effets. *Phytothérapie*, 9: 76-81.
- Axelsson L.T., 2004.** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: **Salminen S., Wright A-V., and Ouwehand A.,** Lactic Acid Bacteria - Microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New York. U.S.A, 1-66.
- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarnie D., Kihal M. et Ouzrout R., 2005.** Caractérisation phénotypiques des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sciences et Technologie*, 23: 30-37.
- Bermúdez-Humarán L.G. et Langella P., 2009.** Utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vaccinaux. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 417: 79-89.
- Björkroth J. and Holzappel W., 2006.** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *Prokaryotes*, 4: 267-319.
- Carr F.J., Chill D. and Maida N., 2002.** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28: 281-370.
- Crow V.L., Holland R., Pritchard G.G. and Coolbear T., 1994.** The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid bacteria. *International Journal of Dairy Science*, 4: 723-742
- Dacosta Y., 2000.** La Bio-Protection des aliments : l'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologiques. Rue Guersant. Paris, 1.
- DeVos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. and Whiteman W.B., 2009.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes*. Springer. New York, 1-26.
- Desmazeaud M., 1996.** Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine: utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, 5: 331-343.

- Dortu C. et Thonart P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires *Biotechnology Agronomy Society and Environment*, 13: 143-154.
- Drouault S. et Corthier G., 2001.** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*, 32: 101-117.
- El Shafei H.A., Abd El-Sabour H., Ibrahim N. and Mostefa Y.A., 2000.** Isolation, screening and characterisation of the bacteriocin-producing Lactic and bacteria isolated from traditional fermented food. *Microbiological Research*, 154: 321-331.
- El-Ghaish S., Ahmadova A., Hadji-Sfaxi I., El-Mecherfi K.E., Bazukyan I., Choiset Y., Rabesona H., Sitohy M., Popov Y.G., Kuliev A.A., Mozzi F., Chobert J.M. and Haertlé T., 2011.** Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 509-516.
- Fickers P., Destain J. et Thonart P., 2008.** Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnology Agronomy Society and Environment*, 12: 119-130.
- Fooks L.J. and Gibson G.R., 2002.** Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88: S39-S49.
- Fuller R., 1989.** Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.
- Fung Y.W., Lye S.H., Lim J.T., Kuan Y.C. and Liong T.M., 2011.** Roles of Probiotic on Gut Health. In: **Liong M.T.**, Probiotics Biology, Genetics and Health Aspects. Springer. New York, 140-160.
- García J.L., Uhía I. and Galán B., 2012.** Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microbial Biotechnology*, 5: 679-699.
- Gomes A.M.B. and Malcata F.X., 1999.** *Bifidobacterium* spp., and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 139-157.
- Guo X.H., Kim J.M., Nam H.M., Park S.Y. and Kim J.M., 2010.** Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16: 321-326.
- Habibi N., Soleimani-Zad S. and Zeinoddin M.S., 2011.** Exopolysaccharides produced by Pure Culture of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and Yeast Isolated from Kefir Grain by Microtiter Plate Assay: Optimization and Comparison. *World Applied Sciences Journal*, 12: 742-750.
- Hammes W.P. and Hertel C., 2006.** The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes*, 4: 320-403.

- Haroun B.M., Refaat B.M., El-Waseif A.A., El- Menoufy H.A., Amin H.A., 2013.** Hypolipidemic Activity of the Probiotic *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 and their Prebiotic Exopolysaccharide *In Vitro* and *In Vivo*. Journal of Applied Sciences Research, 9(1): 1015-1020.
- Hassan A.N. and Frank J.F., 2001.** Starter Cultures and their use. In: Marth E.H. and Steele J.L. Applied Dairy Microbiology. Seconde Edition. Marcel Dekker, Inc., New York. U.S.A, 151-206.
- Heyman M. and Heuvelin E., 2006.** micro-organismes probiotiques et regulation immunologique: the paradox. Nutrition clinique et métabolisme, 20: 85-94.
- Idoui T. et Karam N.E., 2008.** Lactic acid bacteria from Jijel's butter: isolation, identification and major technological traits. grasas y aceites, 59: 361-367.
- Idoui T., Boudjerda D., Leghouchi E. and Karam N., 2009.** Activite probiotique de lactobacillus plantarum: etuderealisee chez le poulet de chair isa 15. Huitièmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo., 317-320.
- Jozala A.F., Novaes L.C.L., Cholewa O., Moraes D. and Penna T.C.V., 2005.** Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. African Journal of Biotechnology, 4: 262-265.
- Juarez Tomas M.S., Wiese B. and Nader-Macias M.E., 2005.** Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. Journal of Applied Microbiology, 99: 1383-1391.
- Kandler O., 1983.** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 49: 209-224.
- Kapila R., Kapila S., Kapasiya M., Pandey D., Dang A. and Saliganti V., 2012.** Comparative Evaluation of Oral Administration of Probiotic Lactobacilli-fermented Milks on Macrophage Function. Probiotics and Antimicrobials Proteins, online publication, DOI 10.1007/s12602-012-9107-x, 1-7.
- Karam N.E., Dellali A. and Zadi-Karam H., 2012.** Activité lipolytique chez les bactéries lactiques Lipolytic Activity from Lactic Bacteria. Rencontre Recherches Ruminants, 19: 415.
- König H. et Fröhlich J., 2009.** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kos B., Suskovic J., Vukovic S., Simpraga M., Frece J. and Matosic S., 2003.** Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. Journal of Applied Microbiology, 94: 981-987.
- Kotelnikova E.A. and Gelfand M.S., 2002.** Bacteriocin Production by Gram-Positive Bacteria and the Mechanisms of Transcriptional Regulation. Russian Journal of Genetics, 38 (6): 628-641.

- Labioui H., Elmoualdi L., EL Yachioui M. and Ouhssine M., 2005.** Sélection De Souches De Bactéries Lactiques Antibactériennes. Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux, 144: 237-250.
- Larpent J.P., 1989.** Les bactéries lactiques, Les microorganismes de fermentations. In: **Bourgeois C.M. et Larpent J.P.** Microbiologie alimentaire. Aliments fermentés et fermentations alimentaires, Tome 2. Techniques et Documentation, Lavoisier. Paris, 3-33.
- Leboffe M.J .and Pierce B.E., 2012.** Microbiology laboratory theory and application. second edition. Morton Publishing Company. U.S.A, 293-303.
- Lilly D.M. and Stillwell R.H., 1965.** Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. Science, 147: 747-748.
- Lopez-Diaz T.M., Alonso C., Roman C., Garcia-Lopez M.L. and Moreno B., 2000.** Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. Food Microbiology, 17: 23-32.
- Mahrous H., Shaalan U.F. and Ibrahim A.M., 2011.** The role of some probiotic lactic acid bacteria in the reduction of cholesterol on mice. International Research Journal of Microbiology, 2: 242-248.
- Marteau P. and Seksik P., 2004.** Place des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées post-antibiotiques. Revue Française des Laboratoire, 368: 1-4.
- Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K. and Holzapfel W.H., 2004.** Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of *kulenaoto*: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. International Journal of Food Microbiology, 94: 269-278.
- Mayo B., Aleksandrak-Piekarczyk T., Fernández M., Kowalczyk M., Álvarez Martín P. and Bardowski J., 2010.** Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: **Mozzi F., Raya R.R. and Vignolo G.M.,** Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications. Blackwell Publishing. U.S.A, 3-34.
- Medina R.B., Katz M.B., Gonzalez S. and Oliver G., 2002.** Determination of Esterolytic and lipolytic Activities of Lactic Acid Bacteria. In: **Spencer J.F.T and Ragout de Spencer A.L.,** Methods in Molecular Biology, Public Health Microbiology: Methods and Protocols. Humana Press Inc., U.S.A, 268: 465-470.
- Metchnikoff E., 2004.** The Prolongation of Life. Springer. New York. U.S.A.
- Minervini F., De Angelis M., Surico R.F., Di Cagno R., Gänzle M. and Gobbetti M., 2010.** Highly efficient synthesis of exopolysaccharides by *Lactobacillus curvatus* DPPMA10 during growth in hydrolyzed wheat flour agar. International Journal of Food Microbiology, 141: 130-135.
- Mkrtchyan H., Gibbons S., Heidelberger S., Zloh M. and Limaki H.K., 2010.** Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by

Références bibliographiques.

- Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain Narine. International Journal of Antimicrobial Agents, 35:1-29.
- Monnet C., Latrillé É., Béal C. et Corrieu G., 2005.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In: **Luquet F.M. et Corrieu G.** Bactéries lactiques et probiotiques. Techniques et Documentation, Lavoisier. Paris, 511-611.
- Navarro L., Zarazaga M., áenz J.S., Ruiz-Larrea F. and Torres C., 2000.** Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. Journal of Applied Microbiology, 88: 44-51.
- Normand M., Roland N., Richoux R. et Kerjean J.R., 2006.** Propriétés probiotiques des bactéries propioniques laitières. Programme nutrition santé en Bretagne, 1-46.
- Novel G., 1993.** Les bactéries lactiques. In: **Leveau J.Y. et Bouix M.,** Microbiologie industrielle: les microorganismes d'intérêt industriel. Techniques et Documentation, Lavoisier. Paris, 170-374.
- Oliszewski R., Medina R.B., Gonzalez S.N. and Perez Chaia A.B., 2006.** Esterase activities of indigenous lactic acid bacteria from Argentinean goats' milk and cheeses. Food Chemistry, 101: 1446-1450.
- Padmapriya B., Rajeswari Th., Noushida E., Sethupalan D.G. and Venil C.K., 2011.** Production of Lipase Enzyme from *Lactobacillus* spp. and Its Application in the Degradation of Meat. World Applied Sciences Journal, 12: 1798-1802.
- Pilet M.F., Magras C. et Federighi M., 1998.** Bactéries lactiques. In: **Sutra L., Federighi M. et Jouver J.L.** Manuel de bactériologie alimentaire. polytechnica, Lavoisier. Paris, 235-260.
- Piquet M.A., Gloro R., Justum A.M. et Reimund J.M., 2007.** Les probiotiques, des outils thérapeutiques pour moduler les effets biologiques de la flore intestinale: une introduction. Obes, 2: 227-233.
- Pot B., 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. In: **Corrieu G. and Luquet F.M.** Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Techniques et Documentation, Lavoisier. Paris, 1-152.
- Pringsulaka O., Thongam N., Suwannasai N., Atthakor W., Pothivejkul K. and Rangsiruji A., 2011.** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. Food Control, 23: 547-551.
- Quillien G., 2001.** Les probiotiques. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 147: 2-16.
- Rainey F. and Oren A., 2011.** Methods in Microbiology: Taxonomy of Prokaryotes. Volume 38. Academic Press. U.S.A, 1-5.

Report of a Joint **FAO/WHO** Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Amerian Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina 1-4 October, **2001**.

Report of a Joint **FAO/WHO** Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada April 30 and May 1, **2002**.

Salminen S., Wright A. V. and Ouwehand A., 2004. Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspect, third ed, Mrcel Dekker, Inc, New York, USA.

Schiraldi C., Valli V., Molinaro A., Carteni M. and De Rosa M., 2006. Exopolysaccharides production in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* exploiting microfiltration. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33: 384-390.

Shihata A. and Shah N.P., 2000. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. International Dairy Journal, 10: 401-408.

Singh K., Kallali B., Kumar A.A. and Thaker V., 2011. Probiotics: A review. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, S287-S290.

Smit G., Smit B.A. and Engels W.J.M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS Microbiology Reviews, 29: 591-610.

Smitinont T., Tansakul C., Tanasupawat S., Keeratipibul S., Navarini L., Bosco M. and Cescutti P., 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. International Journal of Food Microbiology, 51: 105-111.

Songré-Ouattara L.T., Mouquet-Rivier C., Icard-Vernière C., C. Humblot C., Diawara B. and Guyot J.P., 2008. Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (bensaalga) of functional interest in nutrition. International Journal of Food Microbiology, 128: 395-400.

Sreeja V. and Prajapati J.B., 2013. Probiotic Formulations: Application and Status as Pharmaceuticals-A Review. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 5: 81-91.

Stanley E. and Gilliland S.E., 2001. Probiotics and Prebiotics. In: **Marth E.H. and Steele J.L.,** Applied Dairy Microbiology. Second Edition. Marcel Dekker. Inc., New York: 327-344.

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

Tailiez P., 2004. Les lactobacilles: propriétés, habitat, rôle physiologiques et intérêt en santé humaine. Antibiotiques, 6: 35-41.

Tsai C.C., Lin P.P., You-Miin Hsieh Y.M., Zi-yi Zhang Z.Y., Wu H.G. and Chun-Chih Huang C.C., 2014. Cholesterol-Lowering Potentials of Lactic Acid Bacteria Based on Bile-Salt Hydrolase Activity and Effect of Potent Strains on Cholesterol Metabolism *in vitro* and *in vivo*. The ScientificWorld Journal, 1-10.

Uehara S., Monden K., Nomoto K., Seno Y., Kariyama R. and Kumon H., 2006. A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. International Journal of Antimicrobial Agent ,28: 30-34.

Wang S.C., Chang C.K., Chan S.C., Shieh J.S., Chiu1 C.K. and Duhp. P.D., 2014. Effects of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on lowering cholesterol.Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 4(7): 523-528.

Yateem A., Balba M.T., Al-Surrayai T., Al-Mutairi B. and Al-Daher R., 2008. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk.International Journal of Dairy Science, 1-6.

Annexe

Annexe 1 : Composition des bouillons, des géloses et tampons.

MRS (Bouillon et gélose)

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	8g
Extrait de levure.....	4g
Acétate de sodium.....	5g
Phosphate bipotassique.....	2g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O.....	2g
Sulfate de manganèse, 4H ₂ O.....	0.05g
Glucose.....	20g
Tween 80.....	1ml
Agar (dans le cas de la gélose).....	15g
Citrate d'ammonium.....	2g
Eau distillée.....	1000ml

pH : 6,2 et 5,4

Autoclaver 15 min à 120 °C

Gélose amidon

Extrait de viande.....	3.0g
Amidon en poudre.....	10.0g
Agar.....	12.0g
Eau distillée.....	1000ml

pH 7.3–7.7 à 25°C

Autoclaver 15 min à 120 °C

Gélose PCA

Peptone.....	6g
Extrait de levure.....	3g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

pH 7.2

Autoclaver 15 min à 120 °C

Gélose hypersaccharosée

Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	3g
Peptone.....	2.5g
Saccharose.....	150g
K ₂ HPO ₄	2g
NaCl.....	1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

pH 6.8

Autoclaver à 120°C pendant 20 min.

Tampons PBS

K ₂ HPO ₄	0.24g
NaH ₂ PO ₄	1.44g
KCl.....	0.2g
NaCl.....	8g
Eau distillée.....	1000ml

pH 7.4

Autoclaver 15 min à 120 °C

Annexe 2: Coloration de Gram

La réalisation de la coloration de Gram passe par les étapes suivantes :

- ✦ Préparation du frottis: étalement de l'aliquote bactérien sur une lame puis fixation par la chaleur ;
- ✦ Première coloration avec le violet de Gentiane durant environ 1 minute. Tous les éléments sont colorés en violet ;
- ✦ Laver à l'eau;
- ✦ Faire agir le mordant, c'est la solution de Lugol durant environ 30 secondes. Le Lugol fixe le violet sur les structures membranaires des bactéries Gram +. Tous les éléments sont colorés en noir;
- ✦ Laver à l'eau;
- ✦ Décolorer par la solution éthanol 90°C; Les bactéries Gram + sont colorées en violet foncé, les autres éléments sont incolores;
- ✦ Laver à l'eau;
- ✦ Colorer à la fuchsine et laisser agir de 1 à 2 minutes;
- ✦ Les éléments tissulaires et les bactéries Gram - sont colorés en rose. Les bactéries Gram + sont toujours colorées en violet ;

✦ Observer après séchage à l'immersion (objectif × 100) et à pleine lumière.

Annexe 3: Colorants et réactifs

Fushine :

Fushine basique.....	1g
Alcool éthylique a 90%.....	10ml
Phénol.....	5g
Eau distillée.....	100ml

Lugol :

Iode.....	1g
Iodure de potassium.....	2g
Eau distillée.....	300ml

Violet de gentiane :

Violet de gentiane.....	1g
Ethanol a 90%.....	10ml
Phénol.....	2g
Eau distillée.....	100ml

Annexe 4 : Tableaux des résultats

Tableau 06 : Les pourcentages d'Auto-agrégation des souches de *Lactobacillus*.

souche	Auto-agrégation t1	Auto-agrégation t2	Auto-agrégation t3
X1	83,5	97,00	97,4
X2	88,4	91	91,3
X2	96,9	96,6	97,3
11	92,8	97,2	93,6
12	96,8	98	97,7
21	89,7	94,5	97,8
22	89,3	97,4	99,7
31	94	98,5	99,5
42	96	99,2	99,6
43	95,7	97	99,2
44	93,2	98	98,4
51	98,5	98,8	99,4
61	86,2	98,1	98,9
62	95,7	96,9	97,2

Tableau 07 : Les pourcentages de l'hydrophobicité des souches de *Lactobacillus*.

Souches	Xylène	Chloroforme	Acétated'ethyle
X1	10.8	16.8	15.2
X2	3.8	15.5	17.5
X3	6.6	14.5	20.4
11	17.1	4	19.7
12	40.3	8.7	20
21	11.8	12.5	42.2
22	8.5	11.1	25.8
31	3.1	18.4	26.5
42	14.4	12	23.5
43	2.9	19.4	38.1
44	15.9	22.9	35.4
51	2.1	31.7	26.3
61	0	38	18.4
62	1.3	34.5	29.7

Tableaux 08: concentration des paramètres plasmatiques et poids des organes et animaux.

	Témoin -	Témoin +	Probiotique	Cho-Probiotique
Cholesterol	59.52	59.38 ± 9.499	73.23±16.249	58.41±8.831
Triglycerides	48.50	58.28±12.157	77.24±8.921	56.76±13.304
HDL	13.92	21.23±0.728	14.24±6.122	10.37±2.323
Poids du cœur	0.87	0.93±0.092	0.82±0.135	0.85±0.121
Poids du foie	8.34	10.69±1.087	8.07±1.055	9.71±1.740
Poids des animaux				
Début d'étude	157.00±57.983	242.20±20.278	208.60±9.813	206.20±22.399
Début de traitement	230.79±5.105	267.13±12.267	223.84±24.262	230.19±24.996
Fin du traitement	232.00±5.657	263.40±19.476	224.00±25.318	243.80±42.157

<p>Présenté par : M^{elle}. Sellah Nawel M^{elle}. Heloulou Amina</p>	<p>Membres du Jury Présidente: M^{me}. Benhamada Wahiba Examineur: D^r. Sifour Mohamed Encadreur: M^r. Khennouf Tarek</p>
<p><u>Thème</u></p> <p>Evaluation de l'action lipolytique d'une association de souche de <i>Lactobacillus</i>.</p>	
<p style="text-align: center;"><u>Résumé</u></p> <p>Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le principal caractère en commun est la production de l'acide lactique comme produit finale de la fermentation des carbohydrates, utilisées comme probiotiques pour leurs effets bénéfiques.</p> <p>Notre étude a conduit à l'isolement de quatorze souches de <i>Lactobacillus</i> à partir du beurre de chèvre de la région de Jijel, et l'étude de leur activité lipolytique, activité protéolytique, amilolytique et de la production des exopolysaccharides (EPS), aussi de leurs hydrophobicité et leurs auto-agrégations d'une part on fait une autre étude <i>in vivo</i> sur des rats par le dosage de leurs lipides plasmatiques (TG, HDL, Cholestérol totale).</p> <p>Les résultats obtenus montre que nos souches dépourvues de l'activité lipolytique, de l'activité protéolytique et ont la capacité de produire les EPS, trois souches (<i>Lactobacillus</i> 11, 12, 22) ont la capacité de dégrader l'amidon et toutes nos isolats ont un pourcentage élevé d'auto-agrégation et une hydrophobicité élevé (40.30%) avec le xylène chez une seule souche. Un effet faible de la souche <i>Lactobacillus satsumensis</i> 13 pour réduire le taux de cholestérol, de HDL et de TG chez les rats traités.</p> <p>Mots clés: Bactéries lactiques, Activité lipolytique, <i>Lactobacillus</i>, Cholestérol, rats, <i>L. satsumensis</i> 13.</p>	
<p style="text-align: center;"><u>Abstract</u></p> <p>Lactic acid bacteria are a group of heterogeneous species whose main common character is the production of lactic acid as a final product from the carbohydrates fermentation. They are used as probiotic for their benefits healths.</p> <p>Our study has led to the isolation of fourteen <i>Lactobacillus</i> strains from goat butter of Jijel region and the study of their lipolytic activity, proteolytic activity, amilolytic and the production of exopolysaccharides (EPS), as their hydrophobicity and auto-aggregation, in another part <i>in vivo</i> study is made in rats by measurement of plasma lipid (TG, HDL, total cholesterol).</p> <p>The results showed that our strains have note the lipolytic activity, proteolytic activity and have the ability to produce the EPS, three strains (<i>Lactobacillus</i> 11, 12, 22) have the ability to degrade starch, and all our isolates have a high percentage of auto-aggregation and high hydrophobicity (40.30%) with the xylene in a single strain. A low effect of <i>Lactobacillus satsumensis</i> 13 strain to reduce cholesterol, HDL and TG in treated rats.</p> <p>Key words: Lactic acid bacteria, lipolytic activity, <i>Lactobacillus</i>, Cholesterol, rats, <i>L. satsumensis</i> 13.</p>	
<p style="text-align: center;"><u>ملخص:</u></p> <p>بكتيريا حمض اللبن هم مجموعة من الأنواع غير المتجانسة التي تشترك في خاصية رئيسية وهي إنتاج حمض اللبن كمنتجات نهائية لتخمير الكربوهيدرات والتي تستعمل كبروبيوتيك لخصائصها الجيدة لصحة.</p> <p>قمنا في هذه الدراسة بعزل سلالات بكتيرية من زبدة الماعز من منطقة جيجل. وقد أدت دراستنا إلى عزل أربعة عشر سلالة و قمنا أيضا بدراسة نشاطهم في تحليل الدهون، هدم البروتين، وكذا النشا، إنتاج السكريات المتعددة الخارجية (EPS)، auto-aggregation، hydrophobicité. وأجرينا كذلك دراسة حية على الفئران لقياس تأثير السلالة <i>L. sisnemustas</i> 13 على هدم دهون البلازما (TG، HDL، والكولسترول الكلي).</p> <p>وأظهرت النتائج أن السلالات تفتقر إلى نشاط تحليل الدهون، هدم البروتين، ثلاث سلالات (11، 12، 22) لديها القدرة على تحليل النشا وكل العزلات لها القدرة على إنتاج EPS، كذلك لديهم نسبة عالية من autoagregation و hydrophobicite عالية مع سلالة واحدة بنسبة (40.30%). وهناك تأثير ضعيف من السلالة <i>L. sisnemustas</i> 13 في خفض الكولسترول، HDL و TG لذا الفئران المعالجة.</p> <p>الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللبن، تحليل الدهون، <i>Lactobacillus</i>، الكولسترول، الفئران، <i>L. sisnemustas</i> 13.</p>	