

Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences
de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et
Cellulaire



جامعة جيجل

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de Fin d'Etudes pour l'Obtention du Diplôme de
Master en Biologie

Option : *Microbiologie Appliquée*

Thème :

Vu le
06/07/2011
Dr. H. Ouled Haddar
H. Ouled Haddar

**Screening de souche de *Lactobacillus* à
pouvoir d'adhésion sur différents tissus :
poulet, lapin, rat et souris**

Membres du Jury :

- *Président* : Dr H. Ouled haddar
- *Encadreur* : Mme F. Bousdira
- *Examinatrice*: Mme w. Ben hammada

Réalisé par :

- M^{lle} Belhamri Fatima Zohra
- M^{lle} Messaoudene Chérifa

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, la patience et la volonté pour accomplir ce travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude à Mme Bousdira Fathia chargé de notre encadrement. Nous tenons à la remercier vivement pour sa confiance durant ce travail, pour son soutien lors des moments difficiles pour faire évoluer ce projet. Nous la remercions encore pour son encadrement, sa disponibilité, sa pédagogie, ses compétences, sa modestie et son aide précieuse tout au long de ce projet.

Nous adressons également nos s'insères remerciements aux membres de jury Mme W. Ben hammada et Dr H. Ouled haddarh qui ont accepté d'évaluer notre travail.

Nos remerciements vont également à Dr T. Idoui pour nous avoir aidées dans le laboratoire durant ce travail.

Nous adressons nos remerciements à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à notre formation.

Enfin nous remercions profondément nos précieuses familles et nos chères amies à la fois pour leur soutien et leur encouragement.

Table des matières

Table des matières

Sommaire	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Abréviations	
Introduction.....	01

1-Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

I.1.Définition	03
I.2.Principaux caractères des bactéries lactiques.....	03
I.3.Le genre <i>Lactobacillus</i>	04
I.3.1.Définition.....	04
I.3.2.Caractéristiques des <i>Lactobacillus</i>	04
I.3.3.Classification phénotypique des espèces de <i>Lactobacillus</i>	04
I.3.4.Classification génotypique des espèces de <i>Lactobacillus</i>	05
I.3.5.Diversité des habitats.....	06
I.3.6.Propriétés industrielles des <i>Lactobacillus</i>	07

Chapitre II : Les probiotiques

II.1.Historique et définition des probiotiques.....	08
II.2.Critères de sélection des probiotiques.....	08
II.3.Classification des probiotiques.....	09
II.4.Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé de l'hôte.....	10
II.4.1.Effet de probiotique sur traitement des diarrhées	11
II.4.1.1. Traitement associé à la diarrhée aiguë.....	11
II.4.1.2.Traitement de la diarrhée associée aux antibiotiques.....	11
II.4.1.3.Traitement de diarrhées infectieuses de l'enfant.....	11
II.4.2. Traitement de l'infection par <i>Helicobacter pylori</i>	11
II.4.3.Maladies inflammatoires et troubles intestinaux.....	12
II.4.4.Stimulation de l'immunité.....	12
II.4.5.La prévention du cancer du colon et d'autres cancers.....	12
II.4.6.Inhibition des mauvaises bactéries.....	12
II.4.7.Le rôle antitoxique des probiotiques.....	12
II.4.8.Effet sur l'intolérance au lactose.....	12
II.5.Microflore du tube digestif humain.....	13
II.5.1.Structure du système digestif.....	13
II.5.2.La fonction de la muqueuse intestinale.....	14
II.5.3.Composition de la microflore intestinale.....	14
II.5.4.Fonction des bactéries digestives.....	15
II.5.4.1.Fonction métabolique.....	15
II.5.4.2.Fonction de protection.....	15
II.5.4.3.Fonction trophique.....	15

Table des matières

II.5.5.Lactobacillus dans le microbiote intestinal.....	16
II.6.L'adhésion comme critère de sélection des souches probiotiques.....	16
II.6.1.Définition.....	16
II.6.2.La surface des cellules bactériennes.....	16
II.6.3.Rappels sur la structure de la paroi des Lactobacilles.....	17
II.6.3.1.Les constituants protéiques de la paroi de Lactobacillus.....	17
II.6.3.2.Les protéines de la couche .S.....	18
II.6.4.L'adhésion des lactobacilles aux constituants de la muqueuse intestinale.....	18
II.6.4.1.Adhésion de Lactobacillus aux cellules épithéliales.....	18
II.6.4.1.1.Les lignes de cellules intestinales humaines.....	19
II.6.4.2.L'adhésion de Lactobacillus à la mucine.....	19
II.6.5.Principales adhésines de Lactobacillus.....	19

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

I.1. Matériels	21
I.1.1. Matériels biologiques.....	21
I.1.1.1. Les selles d'enfants	21
I.1.1.2. Les souches bactériennes indicatrices	21
I.1.1.3. Les animaux de laboratoire.....	21
I.1.2. Milieux de cultures.....	22
I.1.3. Réactifs	22
I.1.4. Matériels et appareillages	22
I.2. Méthode	23
I.2.1.Analyse des échantillons et techniques des dilutions.....	23
I.2.1.1. Analyse des échantillons.....	23
I.2.1.2. Techniques des dilutions	23
I.2.2. Isolement et purification	23
I.2.2.1. Enrichissement	23
I.2.2.2. Isolement	23
I.2.2.3. Purification	24
I.2.3. Identification des souches de <i>Lactobacillus</i>	24
I.2.3.1. Etude des caractères morphologiques.....	24
I.2.3.1.1. Grammage	24
I.2.3.2. Tests biochimiques	24
I.2.3.2.1.Recherche de la catalase.....	24
I.2.3.2.2. Recherche du type fermentaire	25
I.2.3.2.3. Profil de fermentation des sucres.....	25
I.2.3.2.4. Recherche de l'activité arginine dihydrolase ADH.....	25
I.2.3.3. Test physiologique.....	25
I.2.3.3.1. Température de croissance.....	25
I.2.4. Pouvoir antagoniste des souches	26
I.2.5. Étude de l'activité bactériocinogène	26
I.2.5.1. Préparation du surnageant.....	26
I.2.5.2. Détermination de l'activité bactériocinogène du surnageant.....	27
I.2.6. Evaluation des aptitudes probiotiques in vitro.....	27

Table des matières

I.2.6.1. Croissance sur milieu acide	27
I.2.6.2. Croissance en présence de la bile.....	27
I.2.6.3. Réponse au stimulus stomaco-duodéal lors du passage.....	27
I.2.7. Test d'adhésion de <i>Lactobacillus</i> aux différentes cellules épithéliales.....	28

Chapitre II : Résultats et discussions

II.1. Mesure du pH	29
II.2. Isolement, purification et identification des <i>Lactobacillus</i>	29
II.2.1. Isolement des souches de <i>Lactobacillus</i>	29
II.3 Identification	29
II.3.1. Etude des caractères morphologiques	29
II.3.1.1. Examen macroscopique.....	29
II.3.1.2. Examen microscopique	30
II.3.2. Tests biochimiques	30
II.3.2.1. Recherche de la catalase	30
II.3.2.2. Recherche du type fermentaire	30
II.3.2.3. Profil fermentaire des sucres	31
II.3.2.4. Recherche de l'activité de l'arginine dihydrolase (ADH).....	31
II.3.3. Test physiologique.....	23
II.3.3.1. Croissance à différentes température	32
II.3.4. Identification des espèces.....	34
II.4. Activité antibactérienne	36
II.5. Détermination de l'activité bactériocinogène	38
II.2.5. Evaluation des aptitudes probiotiques in vitro.....	41
II.2.5.1. Croissance sur milieu acide.....	41
II.2.5.2. La résistance à la bile	43
II.2.5.3. Réponse au stimulus stomaco-duodéal lors du passage.....	45
II.2.6. Tests d'adhésion de <i>Lactobacillus</i> aux cellules épithéliales	48
Conclusion.....	50

Références bibliographiques

Annexes

ABRÉVIATIONS

- ADH : Arginine Dihydrolase
- ADN : Acide DéoxyriboNucléique
- ADNr: ADN ribosomal
- ARN : Acide RiboNucléique
- Caco-2 : carcinome du colon
- CO₂: dioxyde de carbone
- DO: Densité Optique
- FAO/OMS: Food and Agriculture Organization / Organisation Mondiale de la Santé
- g, mg: gramme, milligramme
- G+C: Guanine + Cytosine
- GRAS: Generally Regarded As Safe
- h: heure
- H₂O₂ : le peroxyde d'hydrogène (Eau oxygénée)
- HCl : Acide chlorhydrique
- HT-29 : humain tumor colon adenocarcinoma
- Lb, L: *Lactobacillus*
- MEC : matrice extracellulaire
- MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides.
- min : minute
- ml: millilitre
- mm : millimeter
- MRS: Man Rogosa Sharp
- N : Normalité
- NaOH : la soude
- PBS : Phosphate Saline Buffer
- pH: potentiel Hydrogène
- rpm: rotation par minute
- S I : Souche indicatrices
- S : Souche
- T : temps
- T°: Température
- UFC : unité formant des colonies

Liste des tableaux

Tableau 01	habitats des Lactobacilles.	06
Tableau 02	utilisation des bactéries lactiques dans l'alimentaire et exemple des espèces utilisées prédominantes.	07
Tableau 03	Caractéristiques proposées comme critères pour aider à la sélection des micro-organismes potentiellement probiotique.	09
Tableau 04	principales souches reconnues en tant que probiotiques.	10
Tableau 05	Souches bactériennes indicatrices utilisées au cours de ce travail.	21
Tableau 06	valeurs du pH des différents échantillons.	29
Tableau 07	Les principaux caractères des souches sélectionnées.	33
Tableau 08	le nom scientifique des espèces identifiées.	34
Tableau 09	résultats de l'antagonisme microbien <i>Lactobacillus</i> contre <i>Lactobacillus</i> .	36
Tableau 10	les résultats de l'antagonisme bactérien entre les souches de <i>Lactobacillus</i> isolées et les germes tests.	37
Tableau 11	Activité antimicrobienne des surnageant neutralisés et traités par catalase vis à vis de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline.	39
Tableau 12	activité bactériocinogène des surnageants neutralisés et traités par catalase vis-à-vis des germes Gram négatif <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E.coli</i> pathogène et <i>Listeria monocytogenes</i> .	40
Tableau 13	Survie des souches de <i>Lactobacillus</i> à pH 2 et 6,5 après 2 heures d'incubation (Dénombrement sur gélose MRS).	42
Tableau 14	logarithme et taux de survie de <i>Lactobacillus</i> à pH 2 après 2heures d'incubation.	42
Tableau 15	Survie des souches de <i>Lactobacillus</i> à la bile (0.3%) (Mesure de la DO et dénombrement sur gélose).	43
Tableau 16	logarithme et taux de survie de <i>Lactobacillus</i> à pH 2 et 0.3% de la bile après 2heures d'incubation.	44
Tableau 17	la mesure de la DO et la survie des souches de <i>Lactobacillus</i> après l'incubation au temps 0h, 1h, 2h et 3h.	45
Tableau 18	logarithme et le taux de survie des souches de <i>Lactobacillus</i> après l'incubation au temps 0h, 1h, 2h et 3h.	46
Tableau 19	Adhésion des différentes souches de <i>Lactobacillus</i> aux cellules épithéliales de rat, souris, poulet et lapin.	48

Liste des figures

Figure 01	genre <i>Lactobacillus</i> sp.	04
Figure 02	Arbre phylogénétique des principales espèces du genre <i>Lactobacillus</i> basé sur les ARNr 16S.	06
Figure 03	Interaction entre la microflore intestinale, les probiotiques et les cellules intestinales de l'hôte.	11
Figure 04	Structure du système digestif.	13
Figure 05	La muqueuse intestinale.	14
Figure 06	Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflores.	15
Figure 07	Représentation schématique de la paroi de bactéries Gram positif.	17
Figure 08	Les différentes sous familles de protéines exportées chez les bactéries probiotiques du genre <i>Lactobacillus</i> .	18
Figure 09	Morphologie des monocouches de cellules de bien développés Caco-2, HT-29 et INT407 cultures respectivement.	19
Figure 10	Aspect macroscopique des colonies d'une souche de <i>Lactobacillus</i> (B13) isolée et purifiée.	29
Figure 11	Aspect microscopique d'une souche (B13) de <i>Lactobacillus</i> isolée et purifiée.	30
Figure 12	La représentation en pourcentage des espèces de <i>Lactobacillus</i> identifiée.	35
Figure 13	Résultat de l'activité antagonistique des souches de <i>Lactobacillus</i> vis-à-vis <i>Bacillus subtilis</i> .	38
Figure 14	Activité inhibitrice des surnageants neutralisés et traités par catalase vis-à-vis des souches indicatrices (<i>S.aureus</i> , <i>B .subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline).	39
Figure 15	Mesure de l'activité inhibitrice des <i>Lactobacillus</i> vis-à-vis des souches indicatrices (<i>Klebsiella</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E.coli</i>).	41
Figure 16	Le taux de survie log (UFC/UL) de à <i>Lactobacillus</i> sur milieu MRS à pH 2.	42

Liste des figures

Figure 17	Taux de survie log (UFC/ml) de <i>Lactobacillus</i> sur milieu MRS à pH 2 et 0,3% de la bile.	44
Figure 18	Taux de survie log (UFC/UL) de <i>Lactobacillus</i> sur milieu MRS à pH 3 aux différents Intervalles du temps.	46
Figure 19	L'adhésion de la souche (B13) à l'iléon du rat.	49

Introduction

Introduction

L'homme, à l'instar des animaux, vit continuellement avec une population de micro-organismes complexe habitant son tractus gastro-intestinal. L'un des principaux effets bénéfiques émanant de cette alliance est la protection et l'amélioration de la résistance aux maladies infectieuses de l'organisme-hôte. Cependant, la composition de cette flore peut être altérée par divers facteurs alimentaires et environnementaux, qui rendent l'organisme-hôte susceptible aux maladies ou aux désordres de la digestion.

Les effets bénéfiques sur la santé des aliments contenant des probiotiques, et en particulier des produits laitiers, sur les enfants et d'autres groupes de population à haut risque sont de plus en plus vantés par les chercheurs et les professionnels de la santé. Il a été signalé que ces probiotiques peuvent jouer un rôle important dans les fonctions digestives, respiratoires et immunologiques et pourraient avoir un effet sensible en réduisant les maladies infectieuses chez les enfants.

La FAO, et L'OMS, (2002) ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation d'un « probiotique » dans les aliments et formulèrent la définition suivante : « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère ».

Depuis ces dernières années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation des bactéries lactiques à effets bénéfiques pour la santé. Les souches du genre *Lactobacillus* sont les micro-organismes probiotiques les plus en vue par leur association avec les produits laitiers. Dans le corps humain, les lactobacilles sont identifiés comme membres de la flore naturelle intestinale, vaginale et de la bouche. Pour exercer leurs effets positifs, les probiotiques doivent adhérer aux cellules épithéliales de l'hôte.

L'adhésion est un des critères majeur de sélection de ces micro-organismes « santé » mais pour être accepté comme probiotique, une souche microbienne doit répondre à d'autres critères, validés par l'OMS, à savoir, la tolérance à la bile et l'acidité, le pouvoir bactériocinogène, l'innocuité totale et l'origine humaine pour une application en alimentation humaine.

En Algérie et à ce jour, peu ou pas d'études, existent sur les souches de *Lactobacillus* isolées d'origine humaine à caractères probiotiques. De ce fait, et vue l'actualité du sujet, il nous a semblé intéressant de réaliser un travail pratique sur les *Lactobacillus* isolées à partir de selles d'enfants et de tester le profil probiotique de nos souches locales, entre autres, leurs adhésion aux cellules épithéliales de l'iléon de différents animaux.

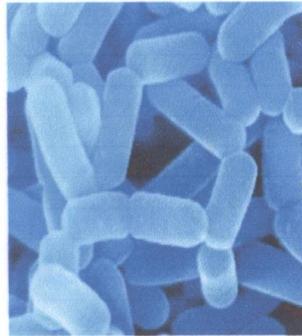
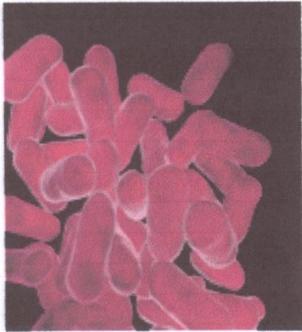
Le choix, de différents régions isolées de Jijel, pour prélever les échantillons de selles n'est pas anodin. Le but était de cibler une variabilité de souches en fonction de la variation des bols alimentaires, en tenant compte que les enfants, dans ces régions, consomment peu ou pas de yaourt, afin d'éliminer les lactobacilles apportés par celui-ci et d'axer, le plus possible, sur les souches de la flore intestinale.

Les objectifs de notre travail sont :

- Isoler et identifier à partir de selles d'enfants, des souches de *Lactobacillus*

Introduction

- Etudier leurs profils probiotiques par la caractérisation de l'adhésion aux cellules épithéliales de l'iléon de différents animaux, le pouvoir antagoniste, la tolérance à l'acidité et aux selles biliaries et la réponse au stimulus stomaco-duodéal.



**Synthèse
bibliographique**

Chapitre I

Les bactéries lactiques

I. Les bactéries lactiques

I.1. Définition :

Les bactéries lactiques sont un vaste ensemble de microorganismes procaryotes qui se rattachent à deux filiations généalogiques, ou phylum :

- Le phylum des Clostridium, dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de guanine+ cytosine inférieur à 50%.
- Le phylum des Actinomycetes, dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de guanine + cytosine supérieur à 50% (**Dacosta, 2000**).

Les bactéries lactiques forment un groupe bactérien phylogénétiquement très hétérogène et bénéficient d'un statut GRAS (Generally Regarded As safe) (**Saad, 2010**).

Concernant les produits métaboliques, le point commun de ces bactéries lactiques est leur capacité à produire de l'acide lactique ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) (**Wee et al., 2006**) suite à la fermentation des glucides par conversion du pyruvate en acide lactique pour régénérer le NAD^+ utilisé dans la glycolyse (**Penaud, 2006 ; Boudjema et al., 2009**).

I.2. Principaux caractères des bactéries lactiques :

- Les bactéries lactiques sont Gram positives, catalase négatives (**Dacosta, 2000**) oxydase négatives, généralement nitrate réductase négatives (**Leveau et Bouix, 1993**). Elles sont généralement mésophiles ; certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes, elles se développent majoritairement à pH 4,0-4,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou pH 3,2 (**Baliarda, 2003**).
- Ils sont chimioorganotrophes, généralement immobiles, asporulés et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Doleyres, 2003**).
- Ce sont des bactéries anaérobies facultatives, microaérophiles, uniquement capables de fermentation en aérobiose (**Leveau et Bouix, 1993**).
- Elles métabolisent les saccharides par deux mécanismes :
 - ✚ Le processus homofermentaire (voie d'Embden-Meyerhof) : production presque exclusive d'acide lactique.
 - ✚ Le processus hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphates) : production d'acide lactique et CO_2 , éthanol ...
- Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).
- Elles sont également impliquées dans les phénomènes d'altération de certaines catégories de denrées alimentaires (**Prescott et al., 2005**).

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents :

Lactobacillus, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (**Dortu et Thonart, 2009**).

I.3. Le genre *Lactobacillus*

I.3.1. Définition

Le genre *Lactobacillus* a été proposé par Beijerinck en 1901 (Pot, 2008). Les lactobacilles appartiennent au groupe des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae*. Ils représentent le groupe le plus important des bactéries lactiques, contenant plus de 120 espèces et 20 sous espèces (Saad, 2010).

Ils ne sont jamais pathogènes, ils contiennent de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique (Guiraud, 2003).

Certaines Souches de *Lactobacillus* sont largement utilisées dans les aliments et l'industrie pharmaceutique en raison de leurs propriétés bénéfiques (Dana Gobadi et al., 2010).



Figure (01) : le genre *Lactobacillus* sp

I.3.2. Caractéristiques des lactobacilles

- Ces bactéries peuvent se développer à des températures basses ou extrêmes comprises entre 2 et 50°C, avec un optimum compris entre 30 et 40°C (Saad, 2010).
- Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO₂ à côté de l'acide lactique :
 - Les lactobacilles homofermentaires obligés (exemple : *L. delbrueckii*) utilisent la voie de la glycolyse ; les pentoses et le gluconate ne sont pas fermentés.
 - Les lactobacilles hétérofermentaires dont certains sont facultatifs (exemple *L. casei*) : ils utilisent la glycolyse ou le cycle des pentoses ; les pentoses et le gluconate sont fermentés par l'intermédiaire de ce dernier. Les hétérofermentaires obligés (exemple *L. brevis*) n'utilisent que le cycle des pentoses (Guiraud, 2003).
- De plus ces microorganismes sont auxotrophes (Saad, 2010), ils exigent pour leur développement des milieux bien adaptés, riches en acides aminés, vitamines et acides gras : ils sont acidophiles, et généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques (Guiraud, 2003).

I.3.3. Classification phénotypiques des espèces de *Lactobacillus*

Les critères phénotypiques restent encore très importants aujourd'hui pour la classification des lactobacilles. Le genre est composé de plus de 120 espèces décrites et est génétiquement assez divers. Le pourcentage en G+C varie entre 32 et 54 %. Une première classification des lactobacilles a été établie selon le profil fermentaire (Penaud, 2006).

Les lactobacilles produisent l'isomère D(+) ou L(-) ou les deux isomères de l'acides lactiques. Ce caractère ainsi que la morphologie et les températures de croissance ont été utilisés très tôt comme marqueurs taxonomiques pour classer les lactobacilles en trois groupes : *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium* (Tailliez, 2004).

- **groupe 1** : les Lactobacilles homofermentaires obligatoires, contenant les espèces du groupe *Thermobacterium* et d'autres espèces nouvellement décrites. Ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance 45°C), leurs cellules sont longues, droites souvent en palissades (Leveau et Bouix, 1993).

La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers, mais un grand nombre a été isolé chez l'homme et les animaux et participe à l'équilibre de la microflore de l'organisme (Pilot et al, 1998). Exemple : *L. acidophilus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. aviarius subsp. Araffinosus*, *L. aviarius subsp. Aviarius*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp. Delbrueckii*, *L. delbrueckii subsp. Lactis*, *L. farciminis*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. jensenii*, *L. johnsonii*, *L. kefiranofaciens*, *L. kefirgranum*, *L. mali*, *L. ruminis*, *L. salivarius subsp. Salicinus*, *L. salivarius subsp. Salivarius*, *L. sharpeae* (Saad, 2010).

-**groupe 2** : ce sont les Lactobacilles homofermentaires facultatifs, formés d'espèces du groupe *Streptobacterium*. La fermentation des hexoses est homofermentaire (mais peut être hétérofermentaire dans certains cas), celle des pentoses et du gluconate est hétérofermentaire avec une production d'acide lactique. Leurs cellules sont courtes, souvent arrangées en filaments (Leveau et Bouix, 1993).

Il est constitué d'une vingtaine d'espèces, majoritairement mésophiles. Elles sont isolées dans les fourrages, les produits laitiers et les produits carnés.

Exemple : *L. acetotolerans*, *L. agilis*, *L. alimentarius*, *L. bif fermentans*, *L. casei*, *L. coryniformis subsp. Torquens*, *L. coryniformis subsp. Coryniformis*, *L. curvatus*, *L. graminis*, *L. hamsteti*, *L. homohiochii*, *L. intestinalis*, *L. murinus*, *L. paracasei subsp. Paracasei*, *L. tolerans*, *L. paraplantarum*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus*, *L. sake* (Saad, 2010).

-**groupe 3** : les Lactobacilles hétérofermentaires obligatoires, regroupant les *Betabacterium* et utilisant la voie des pentoses phosphate pour la fermentation des hexoses et des pentoses. Les cellules sont courtes, droites et séparées (Leveau et Bouix, 1993). C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale (Pilot et al., 1998).

Exemple : *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. collinoides*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus*, *L. hilgardii*, *L. kefir*, *L. malefermentans*, *L. oris*, *L. panis*, *L. parabuchneri*, *L. parakefir*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. sanfrancisco*, *L. suebicus*, *L. vaccinofermentans*, *L. vaginalis* (Saad, 2010).

I.3.4. Classification génotypiques des espèces de *Lactobacillus*

En raison de la diversité des phénotypes et des morphotypes des lactobacilles, l'identification de certaines espèces par l'approche classique reste délicate voire impossible. C'est le cas, en particulier, des espèces apparentées à *L. acidophilus* dont certaines font l'objet de nombreux travaux compte tenu de leur importances dans les domaines des probiotiques.

L'utilisation des outils de taxonomie moléculaire comme l'hybridation quantitative ADN\ADN, les séquences des gènes d'ARNr, 16S ont permis de lever des ambiguïtés et de nommer

précisément les quelques espèces de lactobacilles d'intérêt en santé et en alimentation humaine parmi plus d'une centaine d'espèces de lactobacilles actuellement décrites. (Tailliez, 2004 ; Yin et Zheng, 2005).

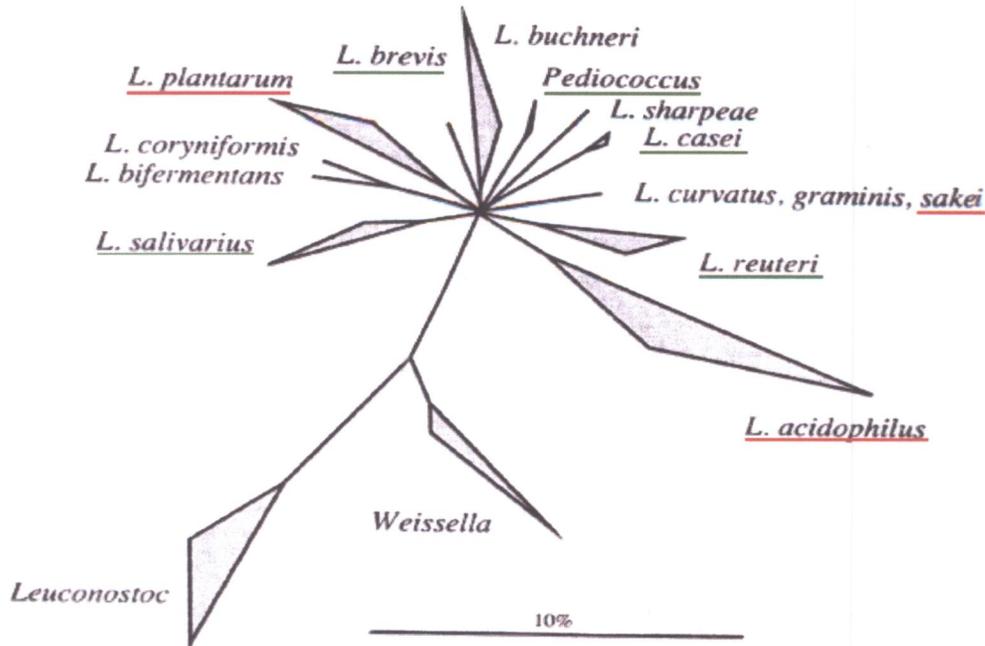


Figure (02) : Arbre phylogénétique des principales espèces du genre *Lactobacillus* basé sur les ARNr 16S. Sont soulignés en rouge, les groupes pour lesquels la séquence d'au moins un génome est disponible, en vert ceux pour lesquels au moins un génome est en cours de séquençage. La barre indique une divergence de séquence estimée de 10%. Adapté de Schleifer et Ludwig (1995) (Penaud, 2006).

I.3.5. Diversité des habitats

Les lactobacilles ont colonisé un nombre important de niches écologiques (tableau 01) et représentent le groupe des BL le plus ubiquitaire dans l'environnement (Penaud, 2006). Chez les humains, ils sont présents dans la bouche, des voies génitales féminines, et tractus gastro-intestinal et constituent un genre important de la flore intestinale (Yagi et al., 2008).

Tableau (01) : habitats des lactobacilles (Penaud, 2006).

Environnement	Exemple
Plantes et produits végétaux	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. fructosus</i>
Sol, eau, eaux usées et compost	<i>L. sharpeae</i> , <i>L. agilis</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. rhamnosus</i>
Aliments fermentés	
Lait	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. kefir</i>
Viande	<i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. halotolerans</i> , <i>L. reutri</i>
Légumes	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. cellobiosus</i>
Produits céréaliers	
Levain (pain)	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i>
Malt	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. brevis</i>
Humains	Example
Cavité orale	<i>L. plantarum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. crispatus</i>
Tractus digestif	<i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. acidophilus</i>
Vagin	<i>L. crispatus</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. acidophilus</i>

I.3.6. Propriétés industrielles des *Lactobacillus*

Les bactéries lactiques (BL) sont très utilisées dans l'industrie agroalimentaire. Elles peuvent fermenter une grande variété de substrats (**Tableau 02**).

Tableau (02) : Utilisations des bactéries lactiques dans l'alimentaire et exemples des espèces utilisées prédominantes d'après McKay et Baldwin (1990) (**Raynaud, 2006**).

Fermentations de végétaux	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
Fermentations de viandes et poissons	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Boissons alcoolisées	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Café et cacao	Bactéries lactiques variées
Sauce de soja	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Pediococcus soyae</i>
Aliments fermentés indigènes	Bactéries lactiques variées
Ensilage	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Probiotiques	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
Pain au levain	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Biscuits	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus leichmannii</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
Produits laitiers fermentés	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>

Les bactéries lactiques (LB) sont la base biologique de la production d'une grande multitude d'aliments fermentés. La contribution la plus importante de ces bactéries aux produits fermentés est de préserver les qualités nutritives de la matière première et d'empêcher la croissance des bactéries d'altération et pathogènes. Cette inhibition peut être due à la production de nombreux métabolites tels que les acides organiques (acide lactique et acétique), le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et bactériocines (**Diop et al., 2007**).

Bien qu'apportant des effets bénéfiques dans l'industrie alimentaire, les bactéries lactiques peuvent aussi être des flores de contamination par la production de saveurs désagréables et de produits toxiques, comme les amines biogènes (**Edima, 2007**).

Chapitre II

Les probiotiques

II.1. Historique et définition des probiotiques

La notion de « probiotique » trouve son origine dans les travaux de Metchnikoff (1907), microbiologiste et prix Nobel de médecine au début du 20^{ème} siècle (Ninane *et al.*, 2009), qui a observé le long de la vie des paysans bulgares, Qui ont consommé des aliments fermentés du lait. Il a suggéré que les lactobacilles pourraient contrecarrer les effets de putréfaction du métabolisme gastro-intestinal (Azizpour *et al.*, 2009).

Le terme «probiotique» vient des mots grecs "pro" (en faveur) et «biotique» (la vie) (Chiquette, 2009). Les définitions du terme « probiotique » ont évolué avec le temps et la réflexion des chercheurs, des industriels et des spécialistes de la communication au grand public (Morteau et Seksik, 2005). Lilley et Stillwell (1965) qui furent apparemment les premiers en 1965 à utiliser le terme choisirent des « facteurs promoteurs de croissance, produits par des micro-organismes » (Chukeatirote, 2003 ; Morteau et Seksik, 2005). En 1974 Parker élargit la notion de probiotiques en «organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore intestinale ». Quinze ans plus tard, Fuller (1989) redéfinit les probiotiques comme étant : « des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire, qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant sa balance microbienne intestinale » (Ninane *et al.*, 2009).

En 1999 Salminen a défini les probiotiques comme « des préparations de cellules microbiennes ou des composants de cellules microbiennes, qui ont un effet bénéfique sur la santé et le bien-être de l'hôte » (Salminen *et al.*, 1999).

En 2001, un comité mixte d'experts FAO/OMS (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture / Organisation mondiale de la santé) définissait les probiotiques comme étant des « microorganismes vivants qui, administrés en quantité adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte » (FAO/OMS, 2001 ; Grajek *et al.*, 2005 ; Kaushik *et al.*, 2009).

II.2. Critères de sélection des probiotiques

Plusieurs critères ont été proposés pour aider les industriels à rationaliser leur sélection des souches de micro-organismes qui auraient les meilleures chances d'avoir les propriétés probiotiques (Morteau et Seksik, 2005). Ces critères sont résumés dans le **tableau 03**.

Tableau (03): Caractéristiques proposées comme critères pour aider à la sélection des micro-organismes potentiellement probiotiques selon (Rousseau, 2004 ; Firzpatrick, 2005 ; Boclé, 2005 ; Kosin et Rakshit, 2006 ; Azizpour *et al.*, 2009).

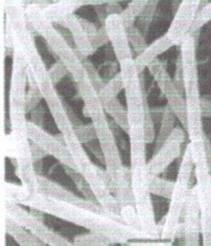
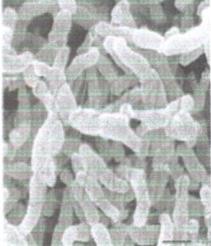
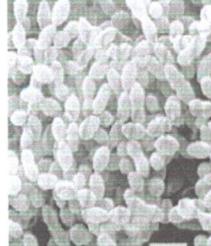
Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> • D'origine humaine (isolé du tractus intestinal d'un homme sain) ou alimentaire (utilisée dans les produits fermentés). • Détermination de la classification par des techniques phénotypiques et génotypiques. • Ces bactéries doivent être sans danger pour l'hôte c'est-à-dire ni pathogènes ni toxiques. • La résistance à l'acidité et à la toxicité de la bile. • Pas de transmission possible de gène de résistance aux antibiotiques et pas de dégradation excessive du mucus.
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> • Tolérance à l'acidité et aux enzymes gastriques. • Tolérance à la bile et aux enzymes digestives. • Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastro-intestinal (la colonisation de l'intestin humain). • Les propriétés de modulation immunitaire. • Production de substances antimicrobiennes (Produire des acides, du peroxyde et de bactériocines) et antagonistes à la croissance des agents pathogènes. • Effets documentés sur la santé.
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Des souches génétiquement stables. • Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini. • Disposer de bonnes propriétés technologiques, de sorte qu'elles puissent être cultivées à grande échelle. • Conservation des propriétés probiotiques après production.

II.3. Classification des probiotiques

Les microorganismes probiotiques les plus sélectionnés : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*.

Le **tableau 04** indique les micro-organismes probiotiques les plus utilisés. Toutefois, des bactéries non lactiques, tels que *Escherichia*, *Bacillus*, mais également des levures telles que *Saccharomyces*, ont fait l'objet d'applications sur le marché du probiotique (Grajek *et al.*, 2005 ; Yin et Zheng, 2005 ; Ingrassia *et al.*, 2005).

Tableau (04) : Les principales souches reconnues en tant que probiotiques (Rousseau, 2004).

Espèces de lactobacilles	Espèces de bifidobactéries	Autres bactéries lactiques	Microorganismes « non-lactiques »
 <p>Lactobacillus bulgaricus</p>	 <p>Bifidobacterium breve</p>	 <p>Streptococcus thermophilus</p>	 <p>Saccharomyces sp.</p>
<p><i>L. acidophilus</i> La5 (Chr Hansen) <i>L. acidophilus</i> NCFM (Danisco) <i>L. casei</i> Shirota (Yakult) <i>L. casei</i> DN-114 001 (Danone) <i>L. reuteri</i> ATCC 55730 (Biogaia) <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038 (Meiji Milk) <i>L. gasseri</i> K7 (ALP) <i>L. johnsonii</i> La1 (Nestlé) <i>L. paracasei</i> CRL431 (Chr. Hansen) <i>L. paracasei</i> F19 (Medipharm) <i>L. plantarum</i> 299V (Probi AB) <i>L. rhamnosus</i> GG (Valio) <i>L. crispatus</i> <i>L. gallinarum</i></p>	<p><i>B. longum</i> BB536 (Mornaga) <i>B. breve</i> Yakult (Yakult) <i>B. lactis</i> Bb 12 (Chr. Hansen) <i>B. lactis</i> HN019 (Danisco) <i>B. animalis</i> DNI 73010 (Danone) <i>B. Infantis</i> 35264 (Procter & Gamble)</p>	<p><i>S. thermophilus</i> 1131 (Meiji Milk) <i>E. faecalis</i> Symbioflor (Symbiopharm) <i>E. faecium</i> SF68 (Cerbios) <i>P. acidilactici</i> Bactocell® (Lallemand)</p>	<p><i>S. boulardii</i> Ultra-levure® (Biocodex) <i>S. cerevisiae</i> <i>E. coli</i> Nissle 1917 (Ardeypharm) <i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i></p>

II.4. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé de l'hôte

Les mécanismes d'action des probiotiques, impliqués dans les effets bénéfiques sur l'hôte, sont complexes (Figure 03), souvent multiples et dépendent de la souche bactérienne considérée (Ait- Belgnaoui, 2006). Il s'agit de la résistance à la colonisation, de la production de substances antimicrobiennes, de l'inhibition de l'adhésion des agents pathogènes, de la dégradation des toxines, de la stimulation de l'immunité locale et périphérique, de la stimulation de l'activité enzymatique, et de la stimulation sécrétoire des IgA (John et Green, 1997).

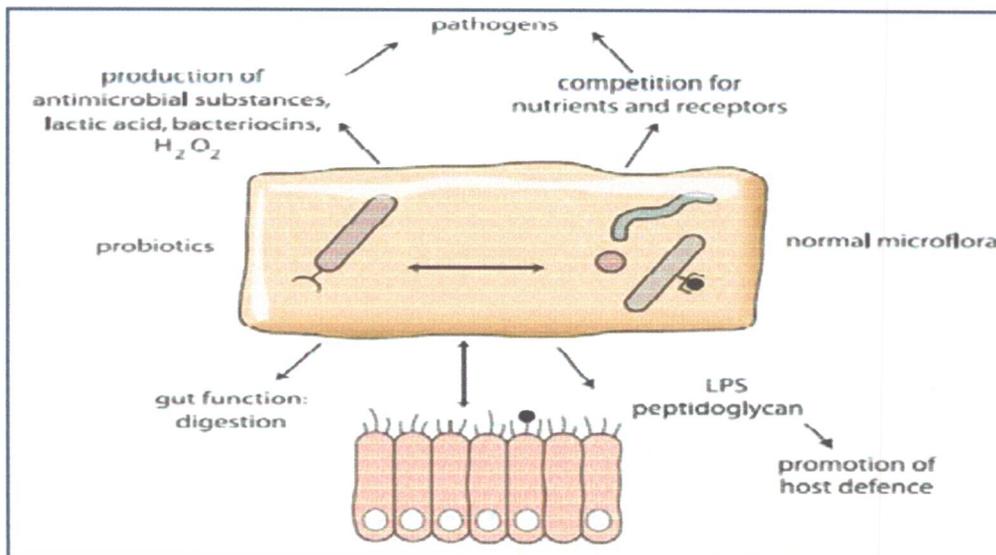


Figure (03) : interaction entre la microflore intestinale, les probiotiques et les cellules intestinales de l'hôte : activités métaboliques, fonction immunitaire et prévention de la colonisation des micro-organismes pathogènes et indésirables (**World Gastroenterology Organisation, 2008**).

II.4.1. Effet de probiotique sur traitement des diarrhées

II.4.1.1. Traitement associé à la diarrhée aiguë

Il a été démontré que l'utilisation des souches probiotiques *L. reuteri* ATCC 55730, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* DN-114 001, réduisait la sévérité et la durée de la maladie diarrhéique aiguë chez l'enfant (**World Gastroenterology Organisation, 2008**).

II.4.1.2. Traitement de la diarrhée associée aux antibiotiques

Le rôle, notamment, de certaines souches probiotiques telles que *L. rhamnosus* GG et *S. boulardii* dans la prévention des diarrhées associées aux antibiotiques a été démontré. Une récente étude a montré l'efficacité de *L. casei* DN-114 001 dans la prévention des diarrhées associées à l'antibiothérapie mais aussi celles provoquées par *Clostridium difficile* (**World Gastroenterology Organisation, 2008**).

II.4.1.3. Traitement de diarrhées infectieuses de l'enfant

Il existe un consensus sur les effets de certains probiotiques étudiés sur la diminution de la durée de la diarrhée à rotavirus et de sa sévérité, avec quelquefois une mise en évidence d'une stimulation des anticorps IgA anti-rotavirus. Le rôle protecteur envers les diarrhées bactériennes est moins établi (**Moreau, 2001**).

II.4.2. Traitement de l'infection par *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori est une bactérie qui colonise l'estomac. Sa présence est associée avec des ulcères de l'estomac et le cancer gastrique (**Kiani, 2006**). Wang *et al.* (2004) ont rapporté que la consommation régulière de yogourt additionné de *Lactobacillus acidophilus* La5 induisait une suppression effective de l'infection due à *H. pylori* (**Food and Nutrition Institute, 2005**).

II.4.3. Maladies inflammatoires et troubles intestinaux

Les maladies intestinales inflammatoires, telles que la pouchite et la maladie de Crohn, ainsi que le syndrome du colon irritable, peuvent être causés ou aggravés par des altérations dans la flore intestinale incluant l'infection (FAO/OMS, 2001). Une étude de Guandalini. (2002) a montré que l'ingestion de *Lactobacillus GG* entraîne une amélioration notable de l'état clinique chez des enfants souffrant de la maladie de Crohn. De même Gosselink et al. (2004) ont observé des effets cliniques bénéfiques chez des patients affectés par une colite ulcéreuse après ingestion de produits fermentés contenant *Lactobacillus GG* ($1-2 \times 10^{10}$ bactéries/jour) (Amrouche, 2005).

II.4.4. Stimulation de l'immunité

La plupart des probiotiques stimulent généralement le système immunitaire de l'hôte de façon non spécifique, en stimulant l'activité phagocytaire et la production d'immunoglobulines A sécrétoires (IgA), qui protège l'hôte contre les micro-organismes entéropathogènes, bloquant l'adhésion, la translocation vers le compartiment systémique, la multiplication virale, neutralisant les entérotoxines ou encore bloquant le passage de macromolécules par la formation d'immun-complexes (Moreau, 2001; Ait Belghnaoui, 2006).

II.4.5. La prévention du cancer du colon et d'autre cancer

La flore intestinale et le système immunitaire jouent un rôle dans la cancérogenèse colique, ces deux paramètres peuvent être eux-mêmes modulés par des probiotiques. Plusieurs études ont montré que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes, la concentration de mutagènes ou d'acides biliaires secondaires dans les selles, qui pourrait être impliqué dans la cancérogenèse colique. Les probiotiques pourraient empêcher la croissance d'autres souches qui transforment les procancérogènes en cancérogènes, réduisant ainsi la quantité de cancérogènes dans l'intestin (Izquierdo, 2009).

II.4.6. Inhibition des « mauvaises » bactéries

L'adhésion et la colonisation des probiotiques semble être essentielle pour le contrôle de la croissance de micro-organismes potentiellement pathogènes d'origine bactérienne, virale ou fongique. Le principal mécanisme impliqué dans l'inhibition de bactéries pathogènes est la production de substances antimicrobiennes, de type bactériocine. Il a également été observé que certains probiotiques réduisent la prolifération des bactéries pathogènes en diminuant le pH intraluminal et en augmentant la production d'acide gras à courte chaîne (Kaushik et al, 2009).

II.4.7. Le rôle antitoxique des probiotiques :

Les probiotiques interviennent très certainement dans la neutralisation des produits toxiques. Ils provoqueraient une atténuation du catabolisme intradigestif et une orientation de la microflore intestinale pour réduire l'absorption des substances toxiques (ammoniac, amines et indoles) et diminuer la bio transformation des sels biliaires et des acides gras en produits toxiques. Les bactéries probiotiques auraient aussi la capacité de produire des métabolites susceptibles de neutraliser in situ certaines toxines bactériennes (Robin et Rouchy, 2001).

II.4.8. Effet sur l'intolérance au lactose

Plusieurs travaux explicatifs ont montré que la lactase de bactéries lactiques participait à la digestion du lactose dans l'intestin. Dans une étude contrôlée, il a été démontré que les sujets déficients en lactase digéraient 90% du lactose contenu dans 400g de yaourt et que environ un cinquième de la quantité de lactase présent dans le yaourt parvenait encore active jusqu'à la toute fin de l'intestin grêle après un repas (Moreau, 2005).

II.5. Microflore du tube digestif humain

II.5.1. Structure du système digestif

Le système digestif est composé successivement de la cavité buccale, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le caecum, le côlon ou gros intestin (côlon ascendant, côlon transversal et côlon descendant) et se termine par le rectum et l'anus (Figure 04) (Watterlot, 2010).

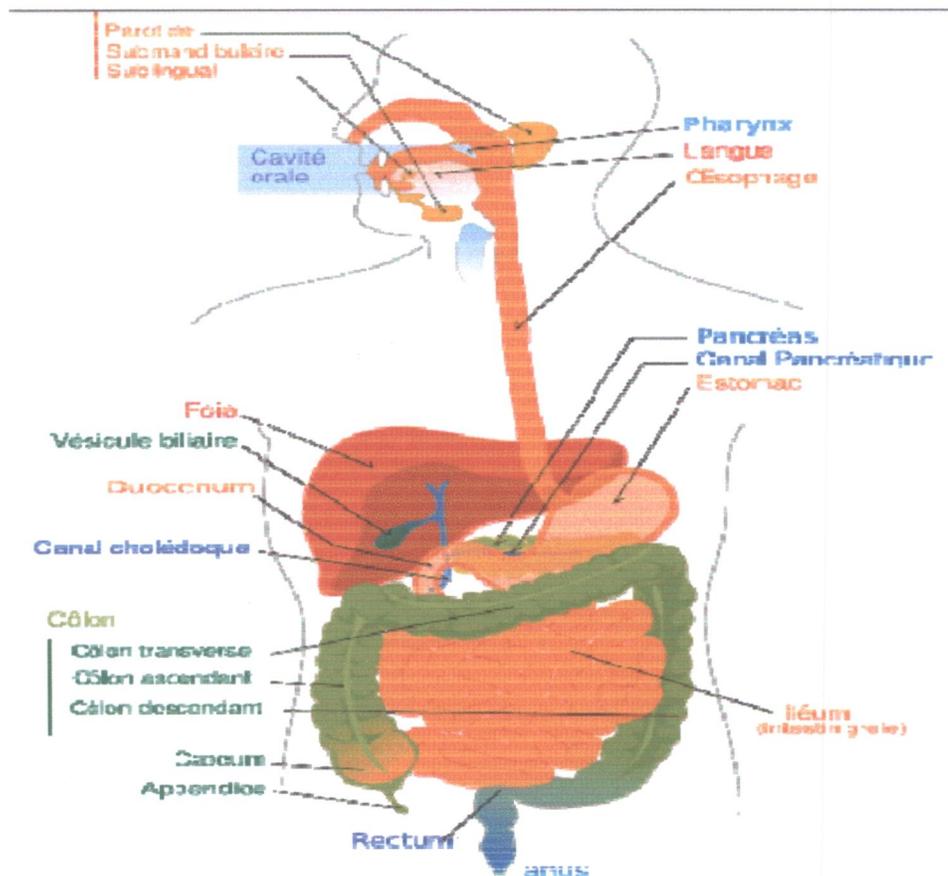


Figure (04): Structure du système digestif (Watterlot, 2010).

La physiologie du tube digestif est constituée de cinq tuniques concentriques situées respectivement de la lumière vers l'intérieur de l'organisme (Figure 05) : La muqueuse, qui comporte un épithélium de revêtement ainsi qu'un tissu conjonctif sous-jacent : le chorion ou lamina propria, qui lui-même contient des tissus lymphoïdes diffus ainsi que des follicules lymphoïdes. La muscularis mucosae, la sous-muqueuse, la musculaire externe comprenant la

partie circulaire interne et longitudinale externe ainsi que la tunique externe constituée par un tissu conjonctif lâche qui la rend solidaire aux organes voisins (Watterlot, 2010).

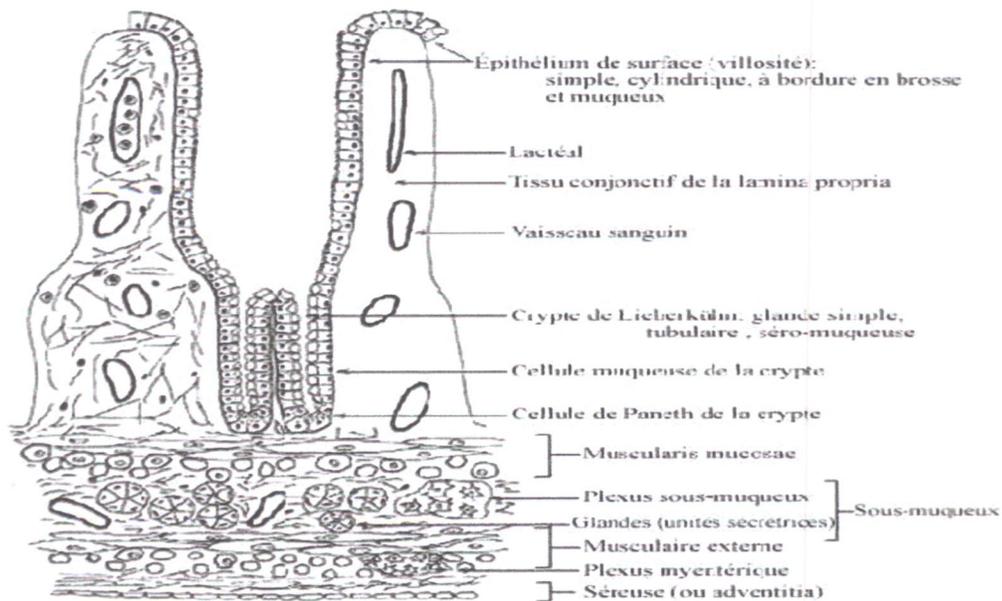


Figure (05): La muqueuse intestinale (Watterlot, 2010).

II.5.2. La fonction de la muqueuse intestinale

Une des fonctions principales de la muqueuse intestinale est la formation d'une barrière physique séparant le milieu extérieur (lumière intestinale) du milieu intérieur (compartiment systémique). La muqueuse intestinale est en contact permanent avec la microflore intestinale résidente et des quantités massives d'antigènes d'origine alimentaire. Pour préserver l'homéostasie, la muqueuse doit développer des stratégies de défense afin d'empêcher les antigènes intestinaux de pénétrer dans le compartiment systémique. Cette protection est assurée par des mécanismes de défense non spécifiques, tels que des facteurs physiques (péristaltisme) et chimiques (métabolites antimicrobiens, acidité stomacale), et par des mécanismes de défense spécifiques avec, entre autres, la production d'anticorps sécrétoires et l'activation du système immunitaire associé à la muqueuse (Prioult, 2003).

II.5.3. Composition de la microflore intestinale

La microflore intestinale est constituée d'une grande diversité d'espèces microbiennes assurant différentes fonctions pour l'hôte. La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de 10^{13} - 10^{14} cellules microbiennes représentant 400 à 500 espèces et sous espèces. Cette microflore représente environ dix fois le nombre total des cellules du corps humain (Amrouche, 2005 ; Moreau, 2005). Les méthodes bactériologiques conventionnelles ont pu mettre en évidence que les bactéries anaérobies (Bactéroïdes, Bifidobactéries, Eubactéries, Streptocoques, Lactobacilles, etc.) sont largement prédominantes. La flore bactérienne est constituée, d'une part, de souches qui ont colonisé le tractus digestif dès la naissance de l'individu et, d'autre part, de souches qui envahissent le tube digestif au cours de l'ingestion d'aliments ou de boissons. Actuellement, il est courant de distinguer la microflore intraluminal de la flore adhérente à la muqueuse (Harish et Varghese, 2006 ; Gossam, 2007). Les populations bactériennes présentes dans la lumière du tube digestif augmentent progressivement de l'estomac jusqu'aux selles (Figure 06) (Ait belgnaoui, 2006).

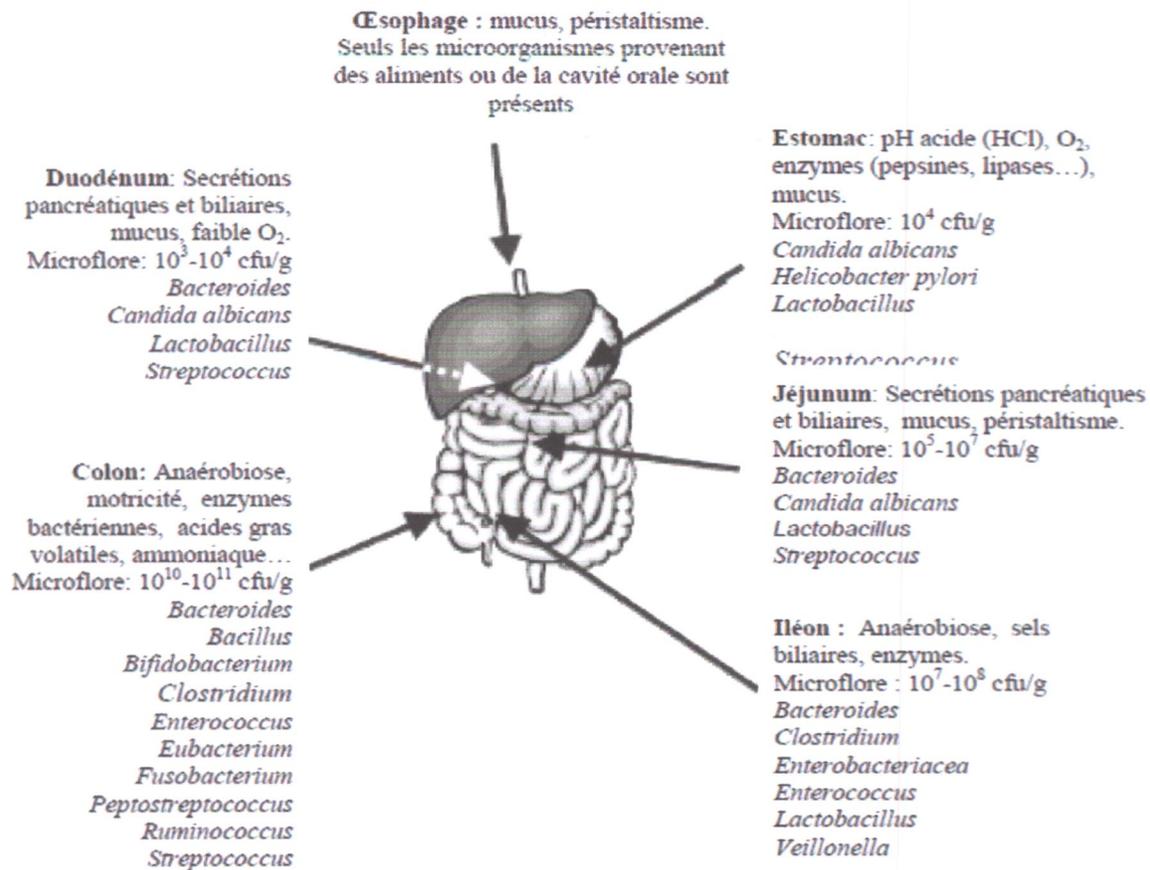


Figure (06): Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflores selon Ouwehand et Vesterlund (2003) (Amrouche, 2005).

II.5.4. Fonctions des bactéries digestives

Les fonctions des bactéries digestives sont de trois types :

II.5.4.1. Fonction métabolique

Une fonction métabolique avec la production des acides gras volatiles à chaînes courtes véritables carburants du colonocyte ; de la vitamine K ; ils facilitent par ailleurs l'absorption des ions, le métabolisme des xénobiotiques, le métabolisme hépatique des lipides et facilitent le transit intestinal de par leur capacité d'effet de masse.

II.5.4.2. Fonction de protection

Une fonction de protection : les bactéries participent aux défenses de la « barrière intestinale » en utilisant des nutriments, en modifiant le pH intraluminal et en occupant des sites potentiels de colonisation. De plus, elles sécrètent au niveau de la surface épithéliale des molécules antimicrobiennes telles les bactériocines, et rentrent en compétition pour l'accès à des récepteurs de l'hôte.

II.5.4.3. Fonction trophique

Une fonction trophique : les bactéries jouent un rôle trophique en facilitant la prolifération et la différenciation épithéliale et en promouvant le système immunitaire. Globalement, on reconnaît

que la flore luminale joue davantage un rôle métabolique et participe à la barrière intestinale alors que la flore adhérente de la muqueuse a plus une fonction trophique (Gossum, 2007).

II.5.5. *Lactobacillus* dans le microbiote intestinal

En raison de leur importante contribution au maintien de l'écosystème intestinal et dans la stimulation du système immunitaire de l'hôte, les lactobacilles sont des membres importants du tractus gastro-intestinal de l'homme (Pennacchia *et al.*, 2006 ; Morita *et al.*, 2007). Ces organismes inhibent la croissance de bactéries nocives et augmentent la résistance à l'infection. Ils sont capables de survivre à pH faible de l'estomac, normalement destructive pour la plupart des microbes (Kaushik *et al.*, 2009). Les *Lactobacillus* résistent au mouvement péristaltique en adhérant à l'épithélium intestinale et/ou mucus (Jakava-Viljanen et Palva, 2007). L'adhérence à la muqueuse intestinale est un critère crucial pour la colonisation et notamment pour le maintien de l'équilibre de la microflore intestinale (Juntunen *et al.*, 2001).

II.6. L'adhésion comme critère de sélection des souches probiotiques

Au fil des années, l'importance de l'adhésion a été clairement démontrée pour les bactéries pathogènes. Celles-ci s'attachent à la surface intestinale, produisent des toxines et, ou, envahissent les cellules épithéliales et de cette façon elles peuvent causer des infections intestinales. Il y a une trentaine d'années, il a été démontré que des bactéries de la flore indigène, telles que les lactobacilles, étaient fortement attachées à la muqueuse intestinale des porcs et à l'estomac des souris, ce qui suggérait une capacité d'adhésion de ces bactéries à certains supports (Izquierdo, 2009). Aujourd'hui, la capacité des souches à adhérer à la muqueuse gastro-intestinale est un des principaux critères pour la sélection des souches probiotiques (Gusils *et al.*, 2003 ; Collado *et al.*, 2006).

II.6.1. Définition

L'adhésion est une action qui se caractérise par l'ensemble des phénomènes physicochimiques et biologiques permettant à une bactérie de s'unir à une surface de façon durable. Elle dépend de :

- L'environnement (température, pH,...) ;
- L'aspect et la rugosité de la surface ;
- L'énergie libre de surface du système bactérie/substrat ;
- Le caractère hydrophile ou hydrophobe des bactéries et du substrat ;
- Les charges de surface ;
- La force ionique du milieu ;
- La présence de structures spécifiques à la surface des bactéries et du substratum (Saad, 2010).

Récemment, Il a été également suggéré que les ions divalents, comme par exemple, le calcium, ont une influence sur la fixation des bactéries par l'augmentation de l'adhérence des souches probiotiques (Larsen *et al.*, 2006).

II.6.2. La surface des cellules bactérienne

Plusieurs facteurs contribuent à l'interaction des lactobacilles avec les tissus de l'hôte, tels que l'hydrophobicité de la surface des cellules, l'autoaggregation et les protéines de surface cellulaire. En effet, il a été démontré que plusieurs protéines de surface cellulaire des lactobacilles probiotiques se lient au mucus, aux cellules épithéliales et / ou à leurs composants de la matrice extracellulaire MEC (Jakava-Viljanen et Palva, 2007).

II.6.3. Rappels sur la structure de la paroi des lactobacilles

L'enveloppe des cellules bactériennes Gram positif tels que les lactobacilles, est constituée d'une membrane cytoplasmique recouverte d'une couche épaisse de peptidoglycane (PG) de 30 nm d'épaisseur environ. Accessoirement, le peptidoglycane est entouré d'une couche secondaire de polymères tels que des polysaccharides (**Figure 07**). Le peptidoglycane forme un exosquelette qui contribue au maintien de la forme des cellules et lui confère sa résistance mécanique et notamment sa capacité à résister aux variations de pression osmotique du milieu externe.

Le PG forme un immense réseau macromoléculaire entourant complètement la cellule bactérienne. Ce réseau de peptidoglycane est recouvert ou traversé à certains endroits par trois types de structures : des acides teichoïques et lipoteichoïques, des polysaccharides et des protéines (**Saad, 2010**).

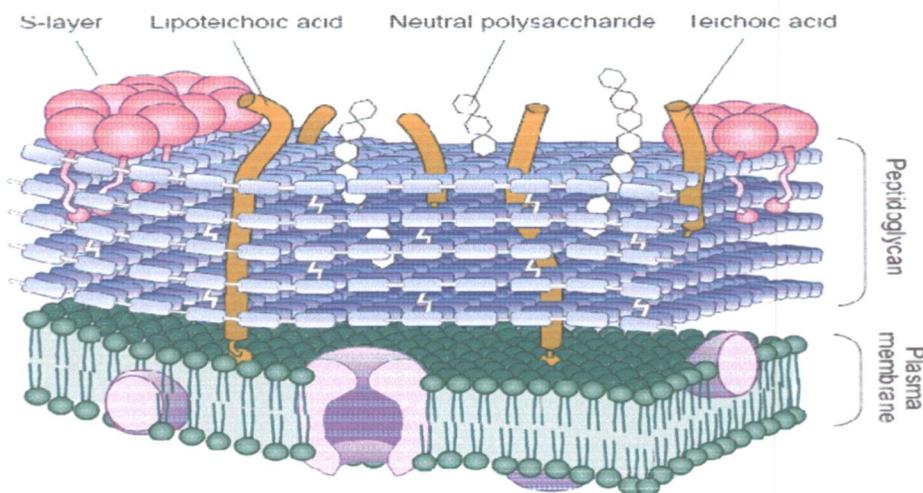


Figure (07) : Représentation schématique de la paroi des bactéries Gram positif. La bicouche lipidique de la membrane plasmique est couverte par une multicouche de peptidoglycane, traversée par des polysaccharides neutres, des acides lipoteichoïques et acides teichoïques, puis entourée par une enveloppe extérieure de protéines de la couche S (d'après Delcour *et al.*, 1999).

II.6.3.1. Les constituants protéiques de la paroi de *Lactobacillus*

En règle générale, les protéines exportées à la surface bactérienne possèdent un peptide signal qui les oriente vers les voies d'exportation et permet ainsi leur migration vers la surface. Certaines de ces protéines contiennent dans leur structure un ou plusieurs domaines, qui sont nécessaires à leur ancrage à la paroi cellulaire ou à la membrane cytoplasmique. Dans le cas d'absence de motif d'ancrage, ces protéines seront sécrétées dans le milieu extérieur. Leur rôle dans l'interaction bactérie/hôte a été largement rapporté. La Figure 8 présente de manière schématique les différentes sous familles de protéines exportées à la surface d'une bactérie à Gram positif tel que *Lactobacillus* (**Saad, 2010**) :

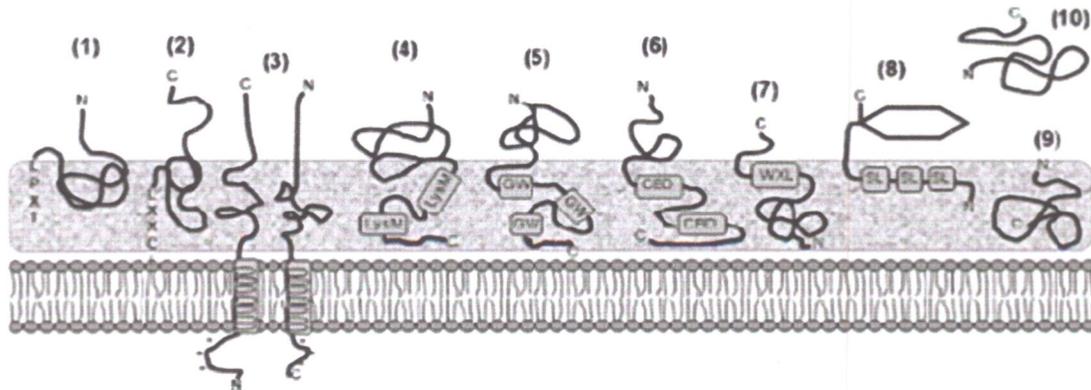


Figure (08) : Les différentes sous familles de protéines exportées chez les bactéries probiotiques du genre *Lactobacillus*. 1: Protéines ancrées à la paroi avec un motif LPXTG, 2: Lipoprotéines ; 3: Protéines avec un domaine N-terminal ou C-terminal en hélice transmembranaire ; 4: LysM protéines, liées au résidu Lys du peptidoglycane ; 5: GW protéines ; 6: Protéines présentant un domaine choline-binding ; 7: WXL protéines ; 8: Protéines de la couche S ; 9: "Anchorless proteins" ou protéines sans peptide signal ni motif d'ancrage à la paroi et 10: Protéines sécrétées d'après Sanchez *et al.* (2008).

II.6.3.2. Les protéines de la couche-S

La surface des bactéries Gram positives est parsemée de protéines spécifiques à la souche pouvant être soit attachées à la surface de la paroi cellulaire, soit étendues à travers la paroi cellulaire et liées à la membrane cytoplasmique sous-jacente. Dans la plupart des cas, ces protéines jouent le rôle d'adhésines nécessaires à l'adhésion de certaines souches probiotiques. Il s'agit des protéines de surface ou couche-S (Izquierdo, 2009).

La couche-S, présente à la surface des *Lactobacillus* est formée par des assemblages monomoléculaires paracrystallins de protéine ou de glycoprotéine (Izquierdo, 2009). Chez certaines bactéries probiotiques, les protéines de la couche S présentent un ou plusieurs domaines N-terminaux (appelés "S layer domains" ou SL), responsables de l'adhésion à d'autres constituants de la paroi tels que les acides teichoïques / lipoteichoïques, ou les polysaccharides (Izquierdo, 2009).

Les séquences de gènes codant pour les protéines de la couche-S chez deux souches *L. brevis*, deux souches de *L. acidophilus*, une souche de *L. helveticus*, une souche de *L. crispatus* et sept souches de *L. gallinarum* sont actuellement connues et déposées dans les bases de données GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) (Jakava-Viljanen et Palva, 2007).

II.6.4. L'adhésion des lactobacilles aux constituants de la muqueuse intestinale

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été liés à la capacité des souches probiotiques à adhérer à la muqueuse intestinale (Ruas-Madiedo *et al.*, 2006).

II.6.4.1. Adhésion de *Lactobacillus* aux cellules épithéliales

L'adhésion des souches probiotiques dans le tractus gastro-intestinal, permet d'empêcher leur élimination immédiate par péristaltisme et fournit un avantage concurrentiel dans cet écosystème (Guglielmetti *et al.*, 2008).

Les difficultés rencontrées lors des études *in vivo*, sur l'adhérence de ces probiotiques, en particulier chez l'homme, ont conduit au développement *in vitro* de modèle d'origine humaine de lignées cellulaires intestinales (Drouault et Corthier, 2001 ; Guglielmetti *et al.*, 2008). Les mécanismes moléculaires par lesquels ces lactobacilles adhèrent à l'épithélium intestinal sont complexes et varient en fonction des souches testées et des lignées cellulaires humaines utilisées (Drouault et Corthier, 2001). Par conséquent, peu de connaissances actuelles existent sur le mécanisme d'adhésion des lactobacilles aux cellules intestinales humaines (Chauvière *et al.*, 1992).

II.6.4.1.1. Les lignes de cellules intestinales humaines

Les lignes de cellules de culture d'origine intestinale de l'homme tel que caco-2, HT-29 et INT-407 sont couramment utilisées pour l'étude de l'adhésion des bactéries (Reid *et al.*, 1992).

Les cellules épithéliales intestinales de la lignée Caco-2 et HT-29 sont isolées à partir d'un adénocarcinome du côlon humain. La lignée caco-2 se différencie en une monocouche de cellules polarisées avec des membranes apicales et basolatérales séparées par des jonctions serrées. La monocouche des cellules Caco-2 ressemble structurellement aux enterocyte différenciés de l'épithélium intestinal (Chauvière *et al.*, 1992 ; Coconnier *et al.*, 1992). La lignée HT-29 est composée de plusieurs types cellulaires dont 95% de cellules non différenciées. Morphologiquement, les cellules indifférenciées se présentent en multicouches et sont non polarisées. Enfin, une troisième lignée identifiée INT-407, isolée à partir d'intestin grêle d'embryon humain a fait l'objet d'une utilisation plus épisodique par rapport aux deux lignées précédentes **Figure (09)**.

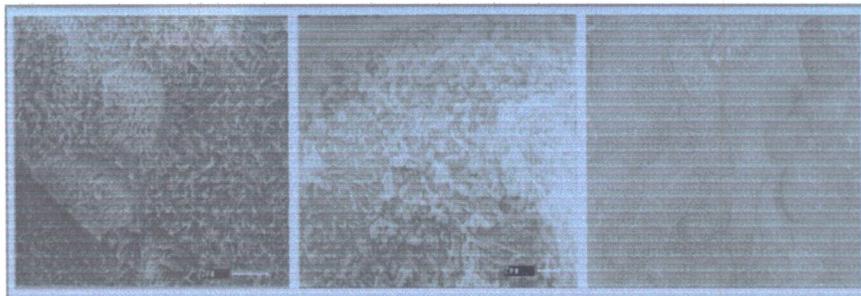


Figure (09). Morphologie des monocouches de cellules de bien-développés Caco-2, HT-29 et INT 407 cultures, respectivement. Les cultures ont été cultivées en milieu de Dulbecco Eagle modifié à 37 ° C dans une atmosphère d'air CO₂/95% et 5% étaient de 21 jours d'après Lewandowska *et al.* (2005) (Grajek *et al.*, 2005).

II.6.4.2. L'adhésion de *Lactobacillus* à la mucine

Les cellules épithéliales intestinales sont recouvertes d'une couche protectrice de mucus, mélange de glycolipides et de protéines de hauts poids moléculaires et fortement glycosylées, appelées mucines (Juntunen *et al.*, 2001). La mucine intestinale a un double rôle : elle peut empêcher l'adhérence des bactéries pathogènes, et sert également de source de nutriments et de matrice pour la colonisation de bactéries probiotiques (Juntunen *et al.*, 2001 ; Ramiah *et al.*, 2007).

II.6.5. Principales adhésines de *lactobacillus*

Les travaux faisant état de l'implication d'adhésines protéiques dans l'interaction *in vitro* de bactéries probiotiques du genre *Lactobacillus* avec des lignées de cellules intestinales sont nombreux. Hynönen *et al.* (2002) dans un travail consacré à *L. brevis* ATCC 8287, ont démontré

que la bactérie adhère aux cellules épithéliales des lignées Caco-2 et Int-407 par le biais d'une protéine de la couche-S ou SLP_A. Ultérieurement, l'implication d'une autre protéine de la couche S de *L. acidophilus* NCFM, dans l'adhésion aux cellules Caco-2, a été identifiée par Buck *et al.* (2005) (Saad, 2010).

Granato *et al.* (2004) ont identifié une forme associée à la paroi du facteur d'élongation EF-Tu chez la souche *Lactobacillus johnsonii* NCC53 (La1). Les auteurs ont montré que cette protéine participe à l'interaction de la bactérie probiotique avec des cellules épithéliales de lignée Caco-2 et HT-29. L'adhésion de *L. johnsonii* La1 aux cellules Caco-2 est pH dépendante avec un maximum à pH acide de 5.

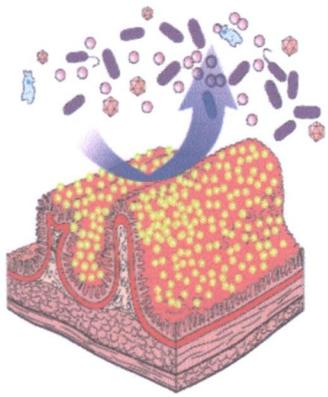
Roos et Jonsson ont caractérisé une protéine de surface de grande taille qui contribue à l'adhésion de *Lactobacillus reuteri* 1063 : la protéine Mub (mucus-binding protein). De même, la protéine de type lectine, spécifique du mannose, Msa, de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 et la protéine Mub de *L. acidophilus* NCFM ont été identifiées comme adhésines du mucus. Ces trois protéines ont le même type de domaine caractéristique des protéines de surface des bactéries Gram positives : un peptide signal N-terminal pour le transport à travers la membrane plasmique et un motif d'encrage C-terminal LPXTG, qui est reconnu par des enzymes appelées sortases, qui le clivent et le liait de façon covalente au peptidoglycane de la paroi bactérienne (Ramiah *et al.*, 2008 ; Izquierdo, 2009).

Une autre protéine sortase-dépendante, caractérisée chez *L. salivarius* UCC118, est la protéine Lsp A. Elle s'est avérée active dans l'adhésion de cette souche au mucus et aux cellules épithéliales (Izquierdo, 2009 ; Ossowski *et al.*, 2010).

Une adhésine classée comme facteur d'élongation (EF-Tu), a été isolée de *L. johnsonii* NCC 533 (La1). EF-Tu facilite le transfert de l'aminoacyl-ARNt au site A du ribosome et en se liant également à la mucine, elle facilite l'adhésion de la souche *L. johnsonii* NCC 533 aux cellules intestinales de l'homme. Le mécanisme par lequel EF-Tu interagit avec la mucine n'est pas bien compris. Une Protéine EF-Tu isolée de *L. plantarum* partagé 84% d'homologie avec la protéine EF-Tu de *L. johnsonii* NCC 533 (Ramiah *et al.*, 2007).

Certaines protéines de la couche-S de *Lactobacillus crispatus* JCM5810 (protéine CbsA), *L. helveticus* ROO52 (protéine Slp), *L. brevis* ATCC8287 (protéine SlpA) et *L. acidophilus* NCFM (protéine SlpA) ont montré des capacités d'adhésion aux cellules épithéliales, aux matrices extracellulaires et aux acides lipoteichoïques d'autres espèces bactériennes. De plus, l'efficacité de certaines de ces protéines dans la prévention de l'adhésion des pathogènes aux cellules épithéliales de l'homme a été démontrée (Izquierdo, 2009).

En dessous de la couche de mucus s'étend la matrice extracellulaire de l'hôte, composée de plusieurs protéines sécrétées telles que la laminine, la fibrine, l'héparine, le collagène et la fibronectine. Certaines probiotiques ont la capacité d'adhérer à cette matrice. Il a été montré que la protéine CnBP (collagen-binding protein) de *L. reuteri* NCIB11951 adhère au collagène de type I de la matrice extracellulaire (Izquierdo, 2009). Une autre protéine de la couche S a été identifiée chez la souche *L. brevis* ATCC 8287, il s'agit de la protéine SLP A associée à la paroi de cette bactérie. Cette protéine est impliquée dans l'adhésion de la souche au collagène ainsi qu'à la fibronectine (Saad, 2010).



Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthode

I. Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté des Sciences de l'Université de Jijel durant une période qui s'étend du mois de février au moi de juin.

I.1. Matériels

I.1.1. Matériels biologiques

I.1.1.1. Les selles d'enfants

La niche écologique utilisée pour l'isolement des bactéries lactiques est constituée de selles d'enfants, âgés de 5 mois à 5 ans. Les échantillons ont été collectés dans quatre régions différentes de la wilaya de Jijel : El Ouana, El Chekfa, Ben Yajis et Texana. Ainsi, l'étude a été conduite sur une totalité de huit échantillons, à raison de deux échantillons par région pour l'obtention d'une collection de *Lactobacillus* d'origine humains.

I.1.1.2. Les souches bactériennes indicatrices

Lors de ce travail, les germes utilisés comme souches indicatrices (souches sur lesquelles est testée l'action antibactérienne) (Izquierdo, 2009), sont référenciées au **tableau (05)** ci-dessous :

Tableau (05) : Souches bactériennes indicatrices utilisées au cours de ce travail.

Souches	Source ou référence
Gram négatif	
<i>Escherichia coli</i>	29522
<i>E. coli</i> pathogène	8404
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Klebsiella</i>	111Kb
Gram positif	
<i>Staphylococcus aureus</i>	29523
<i>Bacillus subtilis</i>	non référencié
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthiciline	non référencié
<i>Listeria monocytogenes</i>	souche de référence institut pasteur

I.1.1.3. Les animaux de laboratoire

Les animaux utilisés au cours de cette étude sont : un lapin, un poulet fermier (race locale), une souris, un rat (Institut Pasteur d'Alger).

I.1.2. Milieux de cultures

Les principaux milieux de croissance utilisés au cours de cette étude sont :

- Milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe) : Milieu sélectif pour la culture des *Lactobacillus* additionné de 1 % de cystéine (préparé au laboratoire).
- Milieu Gibson Abd El Malek : pour la recherche du type fermentaire (préparé au laboratoire).
- Milieu MEVAG sans sucre (milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides) : pour la réalisation des profils de fermentation des sucres. (Institut Pasteur d'Alger).
- Le milieu Moëller à l'arginine (Institut Pasteur d'Alger).
- Gélose nutritive : pour la réalisation de tests de l'activité antibactérienne (Institut Pasteur d'Alger).
- Milieu Muller-Hinton : pour les tests de l'activité antimicrobienne (Institut Pasteur d'Alger, Idéal labo).
- Bouillon nutritif : pour la culture des souches tests (Institut Pasteur d'Alger).

I.1.3. Réactifs et solutions chimiques

Au cours de notre travail, nous avons utilisé les réactifs suivants :

- Colorants de Gram : violet de gentiane, Lugol, alcool, Fushine.
- L'eau oxygénée (H₂O₂).
- L'eau distillée stérile.
- L'eau physiologique.
- HCl (1N), la soude NaOH (5N), acide acétique.
- L'huile à immersion
- Les sucres à 20%: glucose, lactose, galactose, saccharose, xylose, mannose, ribose, salicine, sorbitol, arabinose, tréhalose, cellobiose, à 20% (Institut Pasteur d'Alger).
- Solution Ringer
- Les sels biliaires (Institut Pasteur d'Alger).
- PBS à pH 7
- Le cristal violet.
- Cystéine.

I.1.4. Matériels et appareillages

- pH mètre (Hanna Instruments).
- Bain Marie (Gerhardt, Memmert).
- Etuve de 15, 20, 37 et 46°C (Memmert).
- Microscope optique (Olympus).
- Four Pasteur (Controls).
- Spectrophotomètre (UV Shimadzu).
- Centrifugeuse (Hettich, Sigma).
- Agitateur magnétique chauffant (Bunsen).
- Vortex (Minishaker IKa).
- Réfrigérateur (Condor).
- Balance (Denver).
- Autoclave (Slli).
- Les seringues de 5 ml.

- Filtre millipore (0.22 μ m).
- Papier Watman.
- Lyophilisateur (Christ).
- Compteur de colonies (Funke Gerber).

I.2. Méthode

Pour la facilité du travail et en fonction de la disponibilité des produits, un premier lot de souche de bactéries isolées a été retenu pour la suite de l'étude.

Le but était de faire un screening de souches bactériocinogènes adhérant aux cellules épithéliales parmi ce lot, si résultats négatifs, faire un autre screening parmi un deuxième lot de souches restantes. Le choix des souches retenues a été réalisé de manière à représenter tous les échantillons.

I.2.1. Analyse des échantillons et technique de dilution

I.2.1.1. Analyse des échantillons

Les échantillons des selles d'enfants ont été collectés dans des pots stériles et transportés directement. Une fois au laboratoire, le pH des échantillons a été déterminé par le pH mètre. La moyenne des valeurs des pH mesurés a été calculée pour ajuster le pH du milieu MRS.

I.2.1.2. Techniques des dilutions

La solution mère a été préparée en prélevant 1 g de chaque échantillon (1,2,...,8) et ajouté à 9 ml d'eau distillée stérile. À partir de cette solution mère, des dilutions sériées allant de 10^{-1} à 10^{-7} ont été réalisées.

I.2.2. Isolement et purification

La phase préliminaire obligatoire à toute identification est un isolement suivi d'une purification (Guiraud, 1998).

I.2.2.1. Enrichissement

1ml de chaque dilution est ensemencé dans 5ml de bouillons MRS enrichi à la cystéine, ensuite homogénéisé au moyen d'un vortex et incubé à 37°C.

Il convient de préciser que les lactobacilles ont une relation de sensibilité à l'oxygène, les cultures sont donc incubées dans des conditions particulières, visant à diminuer la tension d'oxygène et créer l'anaérobiose. Il est donc souhaitable de fermer les boîtes de Pétri et les tubes à essai hermétiquement en utilisant le ruban adhésif (Leveau *et al.*, 1991).

I.2.2.2. Isolement

L'isolement est réalisé sur milieu MRS solide, milieu adapté à la recherche spécifique des Lactobacilles. Les cultures sont incubées 24 à 48 heures à 37°C dans des boîtes de Pétri à l'obscurité et en anaérobiose (Labioui *et al.*, 2005).

I.2.2.3. Purification

La purification est effectuée par quatre repiquages successifs sur milieu MRS solide jusqu'à l'obtention des colonies de mêmes tailles, mêmes formes, ce qui renseigne sur la pureté de la souche (Labioui *et al.*, 2005).

De ce fait, le prélèvement et la remise en suspension se portera uniquement sur des colonies bien distinctes, homogènes et bien développées. Pour s'assurer de leur pureté, une coloration différentielle de Gram suivie d'une observation microscopique est réalisée pour chaque souche.

Les souches ainsi purifiées sont alors conservées au réfrigérateur à +4°C jusqu'au moment de leur utilisation.

I.2.3. Identification des souches de *Lactobacillus*

I.2.3.1. Etude des caractères morphologiques

L'étude morphologique est portée sur l'observation macroscopique qui consiste à décrire les colonies obtenues sur milieu solide après incubation (taille, pigmentation, contour, aspect,...) et après coloration de Gram détaillé ci-dessous. L'examen microscopique permet de déterminer la morphologie des cellules bactériennes (Gram, taille, forme et mode d'association) (Hariri *et al.*, 2010).

I.2.3.1.1. Grammage

À partir d'une suspension bactérienne, on réalise une coloration différentielle de Gram. Ce test permet de caractériser la paroi bactérienne selon les étapes de manipulation suivantes :

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec Bunsen ;
- 3- Coloration au violet de Gentiane : tous les éléments sont colorés en violet ;
- 4- procéder au Lavage ;
- 5- Fixation au Lugol : le Lugol fixe le violet sur les structure membranaires des bactéries Gram +;
- 6- Procéder au Lavage ;
- 7- Décoloration à l'alcool : les bactéries Gram positives sont colorées en violet foncé, les autres éléments sont incolores ;
- 8- Lavage ;
- 9- Recoloration du fond à la Fushine : les éléments tissulaires et les bactéries Gram + positives sont toujours colorées en violet.

I.2.3.2. Tests biochimiques

I.2.3.2.1. Recherche de la catalase

L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle 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 (Bekhouche, 2006).



I.2.3.2.2. Recherche du type fermentaire

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est catabolisé.

C'est ainsi que le caractère homofermentaire ou hétérofermentaire est mis en évidence par la méthode classique de Gibson & Abd El Malek. Le milieu une fois stérilisé à 120°C durant 20 min est réparti dans des tubes à essai. Après inoculation par piqure central, 4 ml de gélose blanche sont ajoutées dans chaque tube.

Après 7 jours d'incubation à 37°C, les homofermentaires se développent dans le milieu en utilisant le sucre mais ne produisent pas de gaz. Au contraire, les hétérofermentaires produisent du CO₂ qui se manifeste par un décollement du bouchon de la gélose (Bekhouche, 2006).

I.2.3.2.3. Profil de fermentation des sucres

Ce test permet d'apprécier la capacité des souches purifiées à fermenter quelques sucres (Guiraud, 1998).

L'étude est réalisée sur milieu MEVAG (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides). Une fois régénéré au bain Marie bouillon, le milieu est réparti aseptiquement au niveau de tubes d'Eppendorf stériles dont chacun sera additionné d'un des différents sucres suivants : glucose, saccharose, mannose, xylose, ribose, lactose, galactose, tréhalose, sorbitol, salicine, cellobiose.

Ces tubes une fois ensemencés par piqure centrale sont soumis à une culture de 24 heures à 37°C. La croissance des souches et le virage de l'indicateur coloré traduisent la fermentation du sucre.

I.2.3.2.4. Recherche de l'activité arginine dihydrolase ADH

Pour la détermination de ce caractère, la souche à tester est ensemencée dans un tube d'Eppendorf contenant le milieu Moëller à l'arginine. Le tube est par la suite incubé à 37°C pendant 24 heures.

La culture dans le milieu se manifeste par un virage au jaune du milieu dû au métabolisme de glucose. Si la souche dégrade l'arginine elle produit alors une amine qui va augmenter le pH du milieu et on observe un virage de la couleur au violet (Hariri *et al.*, 2010).

I.2.3.3. Test physiologique

I.2.3.3.1. Température de croissance

Ce test est effectué comme suit : 5 ml de bouillon MRS sont inoculés en double avec les souches étudiées dans des tubes à essai. Ensuite, une série sera incubée à 46°C et une autre à 15°C pendant 24h.

Ce test est important car il permet de différencier les thermophiles, qui peuvent se développer à 46°C, des mésophiles qui poussent à 15°C.

I.2.4. Pouvoir antagoniste des souches

La méthode de confrontation directe de Tadesse *et al.* (2004) (méthode de disques ou portes germes) a été utilisée pour la détermination du spectre d'activité des souches de *Lactobacillus*

isolées et purifiée envers des espèces indicatrices appartenant aux bactéries à Gram négatives (*Escherichia coli* 29522, *E. coli* pathogène 8404, *Klebsiella* 111Kb, *Pseudomonas aeruginosa* 27583), et aux bactéries à Gram positives non sporulées (*Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus* 29523, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline).

Cette méthode consiste selon Tadesse *et al.* (2004) à :

- Inonder en surface les boîtes de Pétri contenant le milieu GN par quelques millilitres de cultures de souches indicatrices.
- Incuber les boîtes pendant 3 heures à 37°C. Après incubation, déposer à la surface de la gélose des disques en papier Watman stérile préalablement imprégnés par la culture des *Lactobacillus* testées.
- Mettre les boîtes à 4°C pendant 4h pour assuré la diffusion des substances responsables de l'interaction. Enfin incuber les boîtes à 37°C pendant 24h.

L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques dont le diamètre est mesuré à partir du centre du disque en mm (Metlef et Dilmi-Bouras, 2009). Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm (Doumandji *et al.*, 2010).

I.2.5. Étude de l'activité bactériocinogène

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection de souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible. La production de bactériocine est détectée par le pouvoir inhibiteur du filtrat du micro-organisme testé sur la croissance du germe cible (Labioui *et al.*, 2005).

I.2.5.1. Préparation du surnageant

Comme les inhibitions peuvent être causées par plusieurs agents tels que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, les phages et les bactériocines, la recherche de la nature de l'agent inhibiteur est devenue indispensable (Mami *et al.*, 2010).

Une culture de souches de *Lactobacillus* supposées bactériocinogènes est réalisée sur bouillon MRS à 1% de glucose pendant 24 heures à 37°C, 20 ml pour chaque souche. Cette étape une fois effectuée, la culture est soumise à une centrifugation à 6000 rpm durant 40 min à 4°C et le surnageant obtenu est filtré sur filtre millipores 0.22 µm.

L'exclusion de toute inhibition de l'organisme indicateur qui pourrait être due à l'effet conjugué des acides organiques (notamment l'acide lactique et l'acide acétique) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été réalisée par un ajustement du pH à 6.5 à 5N et l'addition de quelque goutte de la catalase au surnageant des souches sélectionnées (Ogunbanwo *et al.*, 2003 ; Achemchem *et al.*, 2004 ; Labioui *et al.*, 2005 ; Diop *et al.*, 2007).

Les filtrats peuvent être conservés à +4°C à l'obscurité.

I.2.5.2. Détermination de l'activité bactériocinogène du surnageant

Selon la technique de diffusion en puits de Barefoot *et al.* (1983) in Diop *et al.* (2007), 10 µl d'une culture d'une nuit de germes indicateurs sont ensemencés dans 20 ml de gélose Mueller-

Hinton fondue, Une fois coulée et solidifiée, des puits de 6 mm de diamètres sont creusés stérilement sur cette surface et seront remplis avec 60 μ l du surnageant.

Les boîtes de Pétri sont mise à une température de 4°C durant 2 à 4 heures pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne. Les cultures seront par la suite mises dans leur condition optimum de croissance. La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibitions formées au tour des puits (Doumandji *et al.*, 2010).

I.2.6. Evaluation des aptitudes probiotiques in vitro

I.2.6.1. Croissance sur milieu acide

La technique décrite par Hyronimus *et al.* (2000) a été appliquée.

Pour la réalisation de ce test, une culture jeune de nos souches a été centrifugée à 6000 rpm pendant 10 minutes. Le culot a été reparti sur des tubes contenant du bouillon MRS ajusté à différentes valeurs de pH 2 et 6.5 avec l' HCL (1N).

On procède à la mesure de la Do à 660 nm et au dénombrement des cellules à T= 0h et après 2h d'incubation à 37°C.

Le dénombrement a été réalisé sur cellule de Malassez et observation sous microscope optique avec le grossissement x 40.

I.2.6.2. Croissance en présence de la bile

Ce test est réalisé sur milieu MRS à pH acide selon la technique décrite par Lin *et al.* (2007) :

Pour réaliser ce test, une fraction de bouillon MRS additionnée de 0,3% de la bile et ajuster à pH 2 a été utilisée.

Le bouillon a été réparti en tubes avec un rapport V/9V. Chaque tube est additionné de 1ml d'inoculum d'une culture jeunes de *Lactobacillus*. On procède à la mesure de la Do à 660 nm et au dénombrement des cellules à T=0h et après 2h.

Pour le dénombrement nous avons réalisé une série de dilution jusqu'à 10^{-4} dans des tubes contenant l'eau physiologie, ensuite la gélose a été coulée dans une série de boîtes de Pétri et laissé prendre en masse, puisensemencée par 50 μ l de la dernière dilution de cultures de *Lactobacillus*.

Cette technique est réalisé dans le temps T₀ et après 2heures, puis incubation à 37°C pendant 24h.

I.2.6.3. Réponse au stimulus stomaco-duodéal lors du passage

Le but de cette étude est de sélectionner des souches de *Lactobacillus* qui peuvent résister aux pH stomacal bas, sel biliaire ... lors du passage. La technique décrite par Vizoso *et al.* (2006) a été appliquée.

Les cultures de nuit de nos souches sont diluées de 1/10 dans la solution Ringer avec une mesure de la DO₆₆₀ pour atteindre une concentration de 2×10^8 cellules/ml.

Une quantité de 1 ml d'échantillon à été élevée et diluée dans 10 μ l de bouillon MRS à pH 3, puis on procède à la mesure de la DO à 660 nm et au dénombrement des cellules à T=0h par cellule de Malassez sous le microscope optique avec le grossissement x40.

Après une heure d'incubation à 37°C on ajoute à la culture 4 ml de Sels biliaires reconstitués à raison de 10% et 17 ml d'une sécrétion duodénal synthétique à pH 7 (NaHCO₃ 6.4 g/l, KCL 0.239g/l, NaCL 1.28 g/l).

Le suivi du taux de survie des souches est réalisé par mesure de la DO₆₆₀ et le dénombrement à l'aide de cellule de Malassez sous microscope optique (grossissement x40) à différents intervalles de temps 1h, 2h et 3h.

I.2.7. Test d'adhésion de *Lactobacillus* aux différentes cellules épithéliales

La méthode décrite par Lin *et al.*, 2007 a été appliquée, et réalisée en 3 étapes :

Séparation des cellules épithéliales : un fragment de l'iléon a été prélevé chez le rat : tout d'abord il a été lavé par solution tampon de phosphate salin PBS à PH 7,2 pour le débarrasser de tout son contenu ; il est ensuite placé dans un bain de PBS et soumis à une réfrigération à 4°C pendant 30 min, afin de faciliter la récupération des cellules de la muqueuse, après ce temps d'incubation, la préparation est soumise à 4 lavage dans le PBS, suivis d'un repos pendant 3h à 4°C. La solution obtenue après cette durée d'incubation est la suspension des cellules épithéliales.

Préparation des *Lactobacillus* : une culture âgée d'une nuit est centrifugée à 6000 Tr / 15minutes ; ensuite le culot est récupéré et on lui ajoute 2ml du PBS, à partir de la suspension obtenue, on prépare les dilutions décimales V/9V jusqu'à l'obtention de la dilution 10⁻⁸. A partir de cette dernière on effectue une observation microscopique à l'objectif x 100 pour confirmer que le nombre de cellules des bactéries lactiques est approximativement > 10⁸ cellules/ml.

Adhésion : 1ml de la suspension des souches de *Lactobacillus* ensemencées dans le PBS est mélangé avec 1ml de la suspension des cellules épithéliales, une incubation est réalisée à 37°C pendant 45 minutes. Puis une goutte de ce mélange est colorée avec une goutte du cristal violet additionné d'alcool.

Observation microscopique : Elle est faite à l'objectif x100 après préparation de frottis et coloration au cristal violet. Le test est positif s'il y aura une adhésion au moins de 15 cellules de *Lactobacillus* aux cellules épithéliales.

La même technique est réalisée sur l'iléon du lapin, du poulet et de la souris.

Chapitre II

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

II.1. Mesure du pH

La mesure du pH des différents échantillons de selles est présentée dans le **tableau (06)**.

Tableau (06): Les valeurs du pH des différents échantillons.

N° des échantillons	1	2	3	4	5	6	7	8
valeurs du pH	6,44	6,16	6,49	5,37	6,21	6,31	6,40	5,49

La moyenne du pH = 6.16 a été utilisée pour l'ajustement du pH du milieu MRS.

II. 2. Isolement des souches de *Lactobacillus*

120 souches de bactéries lactiques ont été isolées et purifiées, sur milieu MRS, à partir des différents échantillons de selles d'enfants.

II.3. Identification

L'appartenance ou non, des 120 souches isolées, au genre *Lactobacillus* a été déterminée par des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques.

II.3.1. Etude des caractères morphologiques

II.3.1.1 Examen macroscopique

L'observation macroscopique des colonies, obtenues sur gélose MRS, montre des petites colonies d'environ 1mm de diamètre, de forme lenticulaire de couleur blanchâtre ou laiteuse, avec une surface lisse et un pourtour circulaire régulier. Ceci correspond à la description des colonies des *Lactobacillus* décrites par **Mami et al. (2010)**.



Figure 10 : Aspect macroscopique des colonies d'une souche de *Lactobacillus* (B13) isolée et purifiée

II.3.1. 2.Examen microscopique

L'observation microscopique après coloration de Gram a révélée que sur les 120 souches de bactéries lactiques isolées et purifiées, seules 70 présentaient les caractéristiques des *Lactobacillus*. Elles étaient Gram positif, sous forme de bacilles fins ou coccobacilles, isolées ou en chaînettes plus ou moins longues.

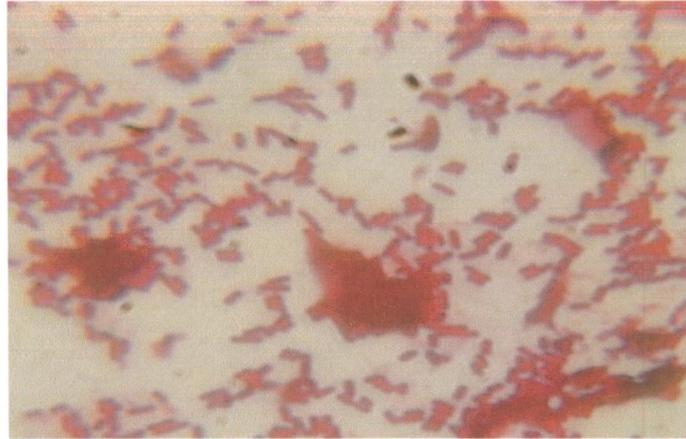


Figure 11 : aspect microscopique d'une souche (B13) de *Lactobacillus* isolée et purifié
(Coloration de Gram, grossissement x100).

II.3.2. Tests biochimiques

II.3.2.1.Recherche de la catalase

Le test de la catalase a révélé que 10 souches étaient catalase positive (dégagement de bulles d'air lors du test), en revanche, les 60 souches restantes étaient catalase négative (pas d'apparition de bulles d'air).

En se référant aux données bibliographiques les *Lactobacillus* sont catalase négative (**Dacosta, 2000 ; Karam et Karam, 2006 ; Hariri et al., 2009; Mami et al., 2010**).

II.3.2.2.Recherche du type fermentaire

Les résultats de la recherche du type fermentaire des 21 souches retenues (sur les 60) montrent que :

- Sur milieu Gibson et Abd El Malek :

Pour 11 souches sur les 21 : aucun déplacement du bouchon de la gélose blanche n'est observé ce qui indique que se sont des homofermentaires.

Pour les 10 souches restantes, le déplacement du bouchon de la gélose blanche est observé, ce qui indique que se sont des hétérofermentaires.

- Sur le lait écrémé : les résultats confirment ceux obtenus avec le test de Gibson & Abd El Malek avec une coagulation en masse (séparation du caillé et du lactosérum) pour les 11 souches homofermentaires et coagulation avec production de gaz pour les 10 souches hétérofermentaires.

Les résultats de l'étude du type fermentaire sont résumés dans le **tableau (07)** :

D'après **Givry (2006)** les *Lactobacillus* se divisent en 03 groupes :

- Groupe I : ces bactéries ont un métabolisme strictement homofermentaires, leur seul produit final étant l'acide lactique .Ils ne métabolisent pas les pentoses et ne dégagent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose ou du gluconate.
- Groupe II : les *Lactobacillus* hétérofermentaires facultatifs peuvent changer de voie en fonction du substrat. Ils métabolisent le glucose en acide lactique grâce à la voie homofermentaire et dégradent les pentoses par la voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose, mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate.
- Groupe III : ces bactéries ont un métabolisme strictement hétérofermentaire, elle fermente le gluconate et les pentoses. elles produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO₂ et de l'éthanol.

II.3.2. 3.Profil fermentaire des sucres

Les résultats de l'attaque des sucres par les souches de *Lactobacillus* étudiées sont résumés dans le **tableau (07)**.

Le profil fermentaire des sucres, constitue un critère important pour l'identification des souches des lactobacilles, il est utilisé avec d'autres tests dans la galerie CH 50 pour la mise en évidence des bactéries lactiques.

Une souche apte à fermenter un ou plusieurs sucres mis en test, conduit à une acidification du milieu qui se traduit par un virage de l'indicateur de pH (test positif), dans le cas contraire, il y'a aucun changement du milieu (test négatif).

Les souches ayant un métabolisme lent vis-à-vis des sucres donnent un changement partiel du milieu de culture (résultat variable).

II.3.2. 4.Recherche de l'activité de l'arginine dihydrolase (ADH)

D'après nos résultats, 12 souches sur les 21 étudiées était ADH négative ce qui explique leur capacité à décomposer l'arginine et libérer l'ammoniac par le système de l'arginine dihydrolase. Les résultats du test sont mentionnés dans le **tableau (07)**.

D'après **Larpent et Larpent, (1997)** :

- Les homofermentaires obligatoires sont à ADH négative en majorité, c'est l'exemple de : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbruekii* subsp *bulgaricus*.
- Les hétérofermentaires facultatifs sont à ADH négative en majorité, c'est le cas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* et *Lactobacillus plantarum*.
- Les hétérofermentaires obligatoires sont à ADH positive en majorité, c'est le cas de *Lactobacillus fermentum*.

II.3.3. Test physiologique

II.3.3.1. Croissance à différentes températures

Nos résultats montrent que parmi les 21 souches sélectionnées, il y'a seulement 11 souches qui ont la capacité de pousser à 46°C, se sont des thermophiles, alors que les 10 souches restantes se développent à 15°C, se sont des mésophiles **tableau (07)**.

D'après **Badis et al. (2005)** les *Lactobacillus* sont répartis en 3 groupes :

- Le groupe des lactobacilles thermophiles et homofermentaires strictes.
- Le groupe des lactobacilles majoritairement mésophiles et homofermentaires facultatifs.
- Le groupe des lactobacilles mésophiles ou thermophiles et hétérofermentaires stricts.

Le test de croissance à différentes températures est important pour l'identification des espèces de *Lactobacillus*.

Tableau (7) : Les principaux caractères des souches sélectionnées.

Strain	Saccharose	Glucose	Mannose	Xylose	Ribose	Lactose	Galactose	Tréhalose	Sorbitol	Arabinose	Salicine	Cellobiose	ADH	T°	GAM
1	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	15	Hétéro
2	±	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	15	Hétéro
3	+	+	±	±	±	+	-	-	-	±	±	+	-	46	Homo
4	-	+	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	46	Homo
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	-	15	Hétéro
6	±	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	15	Hétéro
7	-	+	-	-	-	-	+	-	-	±	-	±	-	46	Homo
8	+	+	+	±	-	-	+	+	-	+	±	+	+	46	Homo
9	+	+	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	46	Homo
10	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	46	Homo
11	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	15	Hétéro
12	+	+	+	-	+	+	±	+	+	±	+	+	-	15	Hétéro
13	+	+	+	+	-	±	±	+	+	+	+	±	-	46	Homo
14	+	+	+	±	+	+	+	-	-	+	-	-	-	46	Homo
15	-	+	-	-	±	-	+	±	+	+	+	+	±	15	Hétéro
16	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	15	Hétéro
17	-	+	-	±	-	+	±	-	+	-	-	-	-	46	Homo
18	+	+	+	+	+	±	+	±	±	+	-	±	-	15	Hétéro
19	-	+	+	-	+	-	+	±	-	+	-	-	+	46	Homo

+ : Résultat positif ; - : Résultat négatif ; ± : Résultat variable

II.3.4. Identification des espèces

Les tests biochimiques et physiologiques appliqués sur les souches de *Lactobacillus*, en comparaison avec la bibliographie, ont permis d'établir une banque de 21 souches appartenant à 6 espèces (Dacosta, 2000) (Voir annexe). Les espèces du genre *Lactobacillus* identifiés sont illustrées dans le tableau (08).

Tableau (08) : le nom scientifique des espèces identifiées :

Code	Le nom scientifique de souche	Le groupe
A21	<i>L. plantarum</i>	<i>Streptobacterium</i>
D6	<i>Lactobacillus</i> ssp	-
B5	<i>Lactobacillus</i> ssp	-
F4	<i>L. casei</i> subsp <i>tolerans</i>	<i>Streptobacterium</i>
B13	<i>L. plantarum</i>	<i>Streptobacterium</i>
A3	<i>L. bavaricus</i>	<i>Streptobacterium</i>
B16	<i>L. casei</i> subsp <i>tolerans</i>	<i>Streptobacterium</i>
B11	<i>Lactobacillus</i> ssp	-
A1	<i>L. gasseri</i>	<i>Thermobacterium</i>
A20	<i>Lactobacillus</i> ssp	-
I2	<i>L. mucosae</i>	<i>Betabacterium</i>
A12	<i>L. plantarum</i>	<i>Streptobacterium</i>
A9	<i>L. plantarum</i>	<i>Streptobacterium</i>
A23	<i>Lactobacillus</i> ssp	-
F12	<i>L. plantarum</i>	<i>Streptobacterium</i>
G4	<i>L. casei</i> subsp <i>tolerans</i>	<i>Streptobacterium</i>
G6	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Streptobacterium</i>
H7	<i>Lactobacillus</i> ssp	-
F1	<i>Lactobacillus</i> ssp	-
H8	<i>Lactobacillus</i> ssp	-
H5	<i>Lactobacillus</i> ssp	-

Selon les résultats montrés dans le **tableau (08)** les espèces de *Lactobacillus* identifiées appartiennent majoritairement soit au groupe I: *Thermobacterium*, soit au groupe II: *Streptobacterium*.

Les 09 souches restantes ont été identifiées comme *Lactobacillus spp* en raison de la différence d'un ou deux caractères par rapport aux souches types répertoriés et de la difficulté connue à classer les espèces de ce genre et par conséquent recourir aux techniques de la biologie moléculaire par PCR et identification du gène codant pour l'ARNr 16S.

En s'appuyant sur les travaux de **Prioult (2003)** et **Kimura et al. (2010)**, les espèces retrouvées dans notre étude sont d'origine humaine.

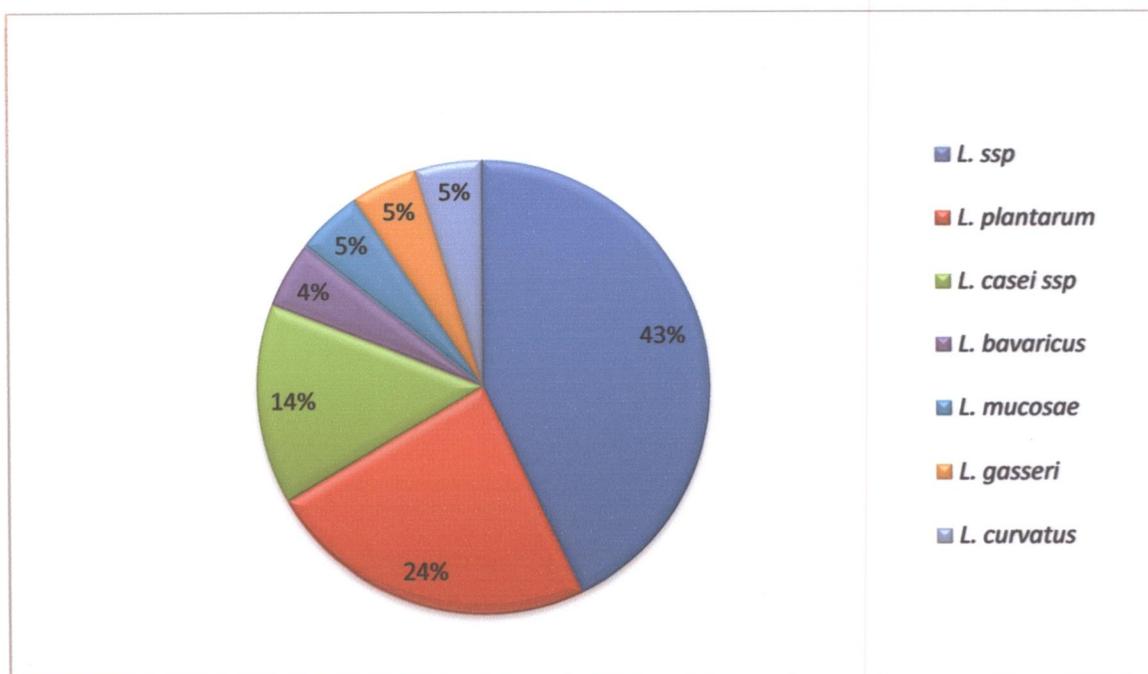


Figure 12 : la répartition en pourcentage des espèces de *Lactobacillus* identifiées.

II.4. Activité antibactérienne

Les résultats obtenus au cours de ce test, visant à mettre en évidence une éventuelle production de substance inhibitrices par notre collection de *Lactobacillus* humain envers les différentes souches indicatrices, sont résumés dans le **tableau (09)** :

Tableau (09) : les résultats de l'antagonisme microbien *Lactobacillus* contre *Lactobacillus*

SI \ ST	(1)	(2)	(3)	(4)
F12	+	+	+	+
G6	+	+	-	+
A20	+	+	+	+
B13	+	+	+	+
A21	+	+	+	+
A12	+	+	+	+
G4	+	+	+	+
A23	+	+	+	+
B5	+	+	+	+
A9	+	+	+	+
ST : Souches tests SI : Souches indicatrices + : Résultat positif- : Résultat négatif				

Les souches indicatrices portant le code (1), (2), (3), (4) correspondent aux souches : *L.gasseri*, *L. delbrueckii*, *L.plantarum*, *L. acidophilus* respectivement (souches isolées et identifiées au laboratoire de microbiologie de notre faculté par le Docteur Idoui).

la présence d'une zone d'inhibition claire indique l'absence de croissance de la souche indicatrice.

Selon **Mami et al. (2010)** la confrontation entre les mêmes espèces lactiques permet de détecter la présence d'une interaction antagoniste par la présence d'une zone d'inhibition autour des colonies productrices, ce qui nous oriente vers la présence d'une substance proche des bactériocines.

Résultats et discussion

Tableau (10) : les résultats de l'antagonisme bactérien entre les souches de *Lactobacillus* isolées et les germes tests :

SI ST	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	SARM	<i>Klebsiella</i>	<i>E. coli</i> pathogène
F1	+	-	-	-	+	-
H7	+	-	-	+	+	-
H8	-	-	+	+	+	-
H5	-	-	+	+	+	-
B13	+	+	+	+	+	+
F12	-	+	-	+	+	-
G4	-	+	+	+	+	-
G6	-	+	+	+	+	-
A3	+	+	-	+	+	-
A9	+	+	+	+	+	-
A23	+	-	-	-	+	-
A12	+	-	-	+	+	-
B5	-	-	-	+	-	-
A21	-	-	-	+	-	-
A20	-	-	-	+	-	-
I2	-	-	-	-	-	-
A1	-	-	-	-	-	-
D6	-	-	-	-	-	-
B11	-	-	-	-	-	-
F4	-	-	-	-	-	-
B16	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	+	-
2	+	-	+	-	+	-
3	-	-	+	-	+	-



Figure (13) : Résultat de l'activité antagonistique des souches de *Lactobacillus* vis-à-vis *Bacillus subtilis*.

Les 25 souches sélectionnés et soumises au test de l'activité antimicrobiennes (**tableau 10**), seules 17 d'entre elles ont manifestés un antagonisme plus au moins prononcé vis-à-vis des germes tests. Il s'agit des souches portant le code : A20, A21, A12, B13, A9, G4, G6, F12, B5, A23, F1, H7, H8, 1, 2, 3,4.

Selon **Dacosta, (2000)** le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques dont les *Lactobacillus* provient de différentes causes :

- Production d'acides organiques, essentiellement de l'acide lactique, dont le pouvoir antimicrobien repose sur l'abaissement du pH (qui ne nuit nullement aux bactéries lactiques) ;
- Production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ;
- production de bactériocines.

A ce stade de notre travail, nous ne pouvons pas déterminer qu'elle est la cause de l'antagonisme des souches de *Lactobacillus* isolées vis-à-vis des germes tests.

Les souches présentant les meilleurs profils d'inhibition lors de ce test sont codées F12, G4, G6, A23, B5, B13, A20, A9, A21, A12. Elles ont été retenues pour l'essai de l'activité bactériocinogène.

II.5.Détermination de l'activité bactériocinogène

Les résultats de l'activité antimicrobienne des surnageant neutralisés et traités par catalase vis à vis de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline sont résumés dans le **tableau (11)**.

Tableau (11): activité antimicrobienne des surnageants neutralisés et traités par catalase vis à vis de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

Souche \ SI	A20	A9	A12	A21	B13	G6	G4	B5	F12	A23
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	30	29	29	30	30	28	24	25	27
SARM	30	31	31	27	25	28	25	26	30	25
<i>Bacillus subtilis</i>	30	30	25	30	29	26	30	25	30	25

Les zones d'inhibition sont mesurées en mm

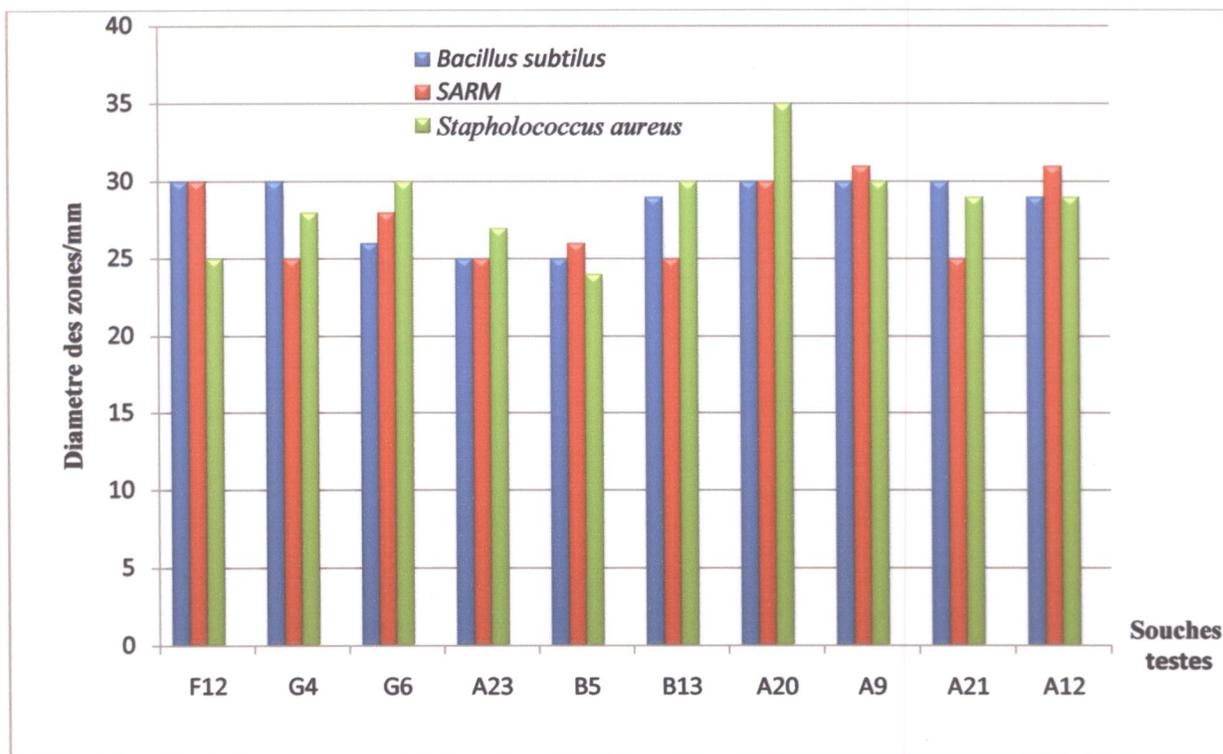


Figure 14 : activité inhibitrice des surnageants neutralisés et traités par catalase vis-à-vis des souches indicatrices (*S.aureus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline).

D'après le **tableau (11)** et la **figure (14)**, on remarque que toutes nos souches présentent de bons profils d'inhibition vis-à-vis des germes tests Gram positifs *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

Plusieurs auteurs ont rapporté que l'effet des bactériocines est dirigé généralement vers les bactéries Gram positive à cause de la constitution de leurs parois. Par ailleurs, des études récentes ont montré que certaines bactériocines ont un spectre d'activité assez large et ils agissent aussi bien sur les Gram positifs que sur les Gram négatifs (**Lachance, 2000 ; Naghmouchi, 2007 ; Dortu et thonart, 2009**).

Les souches B13, A20, A21 et A9 ont été retenues pour le test de l'essai bactériocinogène vis-à-vis des germes Gram négatif à savoir *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* pathogène et l'espèce pathogène Gram positif *Listeria monocytogenes* redoutable contaminant des produits alimentaires. Les résultats sont indiqués dans le **tableau (12)**.

Tableau (12): activité bactériocinogène des surnageants neutralisés et traités par catalase vis-à-vis des germes Gram négatif : *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* pathogène et *Listeria monocytogenes*

Souche SI	B13	A9	A20	A21
<i>Klebsiella</i>	10 mm	14 mm	10 mm	13 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21 mm	6 mm	15 mm	14 mm
<i>E. coli</i> pathogène	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Listeria monocytogenes</i>	17 mm	13 mm	15mm	/

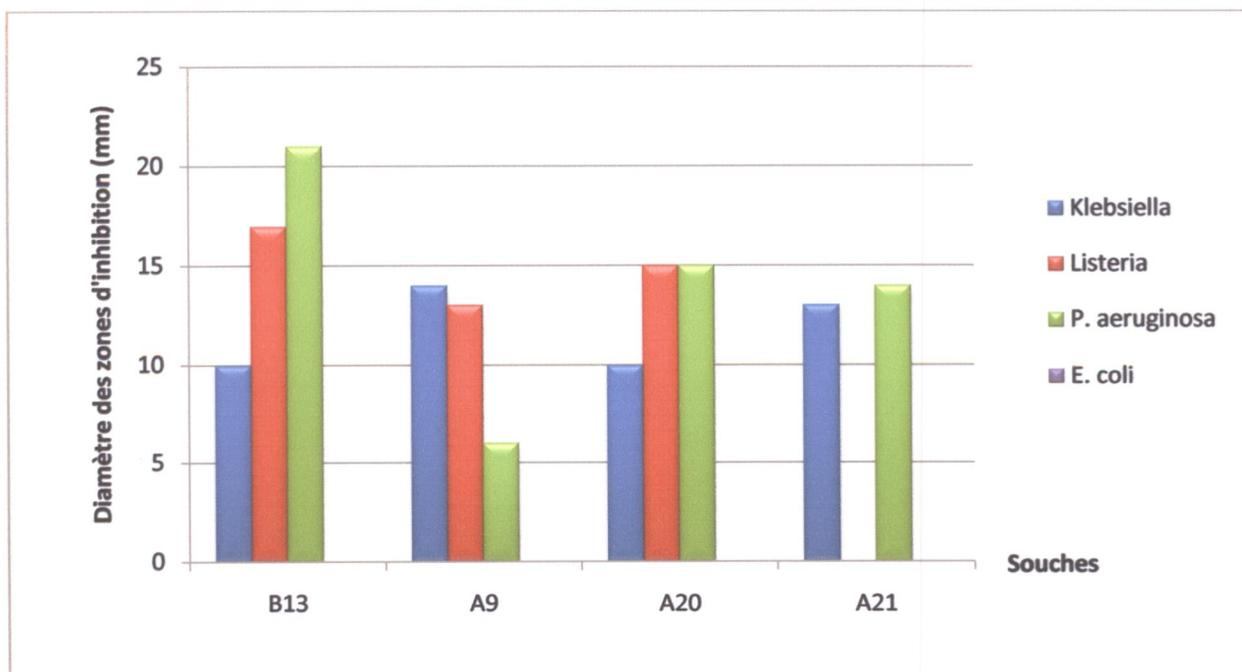


Figure (15) : Mesure de l'activité inhibitrice des lactobacilles vis-à-vis des souches indicatrices (*Klebsiella*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*)

D'après les résultats montrés dans le tableau et l'histogramme, on remarque que les surnageants neutralisés et traités par catalase des souches B13, A9, A20, et A21 exercent une activité antibactérienne vis-à-vis des germes Gram négatifs à l'exception d'*E. coli*. Des résultats similaires ont été rapportés par certains auteurs tels que **Allouche (2010)** ; **Khaoua (1997)** ; **Achemchem et al. (2004)**.

Nos résultats **tableau (11)** et **tableau (12)** montrent que les surnageants neutralisés et traités par catalase des souches B13, A9, A20, et A21 exercent une activité antibactérienne vis-à-vis des germes indicateurs, aussi bien Gram positif que Gram négatif. Les surnageants ont montré également une forte inhibition de la croissance de la bactérie pathogène *Listéria monocytogenes* (exception faite du surnageant de la souche A21). Ceci suggère que l'activité des surnageants des souches testées est à large spectre.

L'inhibition par l'acide lactique et l' H_2O_2 est exclue par neutralisation du pH du surnageant et l'ajout de la catalase, par conséquent, l'activité antimicrobiennes des surnageants des souches de *Lactobacillus* B13, A9, A20, et A21 est probablement due à des substances de nature peptidique tels que bactériocines. (**Yang et al., 1992**).

II.2.5. Evaluation des aptitudes probiotiques in vitro

II.2.5.1. Croissance sur milieu acide

Les résultats de la résistance des souches de *Lactobacillus* A20 A21 et B13 en milieu acide, à pH 2 et pH 6,5 au temps 0 et après 2 heures d'incubation sont représentés dans les **tableaux (13), (14)** et la **figure (16)**.

Résultats et discussion

Tableau (13) : Survie des souches de *Lactobacillus* à pH 2 et 6,5 après 2 heures d'incubation

Souches	p H : 2		pH : 6,5	
	UFC x 10 ⁷ au T ₀	UFC x 10 ⁷ au T _{2H}	UFC x 10 ⁷ au T ₀	UFC x 10 ⁷ au T _{2H}
A20	34	nd	46	60
A21	66	60	48	55
B13	69	50	45	80

nd : non déterminé

Tableau 14 : logarithme et taux de survie de *Lactobacillus* à pH 2 après 2heures d'incubation

Souches	p H : 2		
	Log (UFC/ml) au T ₀	Log (UFC/ml) au T _{2H}	Taux de survie (%) à T _{2H}
A21	8.81	8.77	99.54
B13	8.83	8.69	98.41

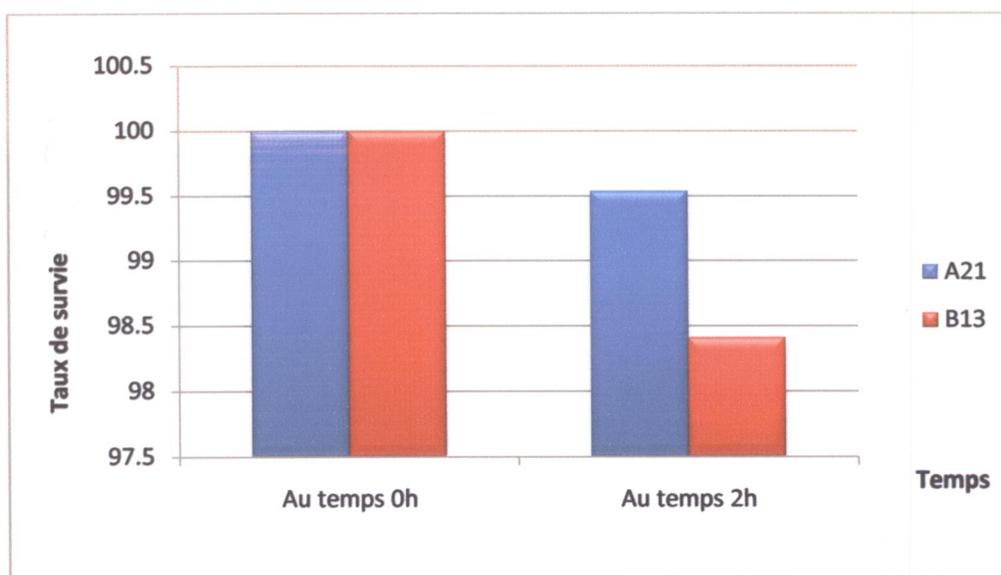


Figure (16): le taux de survie en pourcentage de *Lactobacillus* sur milieu MRS à pH 2

D'après les résultats obtenus, le taux de viabilité des trois souches de *Lactobacillus* testées, présente une grande variabilité entre le pH 6,5 et pH 2 (**tableau 14**). Le nombre des cellules viables diminue considérablement à pH 2,0 après deux heures d'incubation. La souche A21 montre la plus grande résistance à pH 2, après 2 heures d'incubation. Les souches se développent mieux à pH 6,5 valeur optimum des *Lactobacillus*.

Les différentes régions du tractus gastro-intestinal présentent différents niveaux d'acidité. L'estomac et les régions après l'estomac ont la plus forte acidité et le pH de ces zones peut diminuer très bas que pH 1,5. **Pan et al. (2009)** considère que l'acidité est le facteur le plus nuisible qui affecte la croissance et la viabilité de *Lactobacillus*, par ce que leur croissance diminue au dessous du pH 4,5.

Une des caractéristiques importantes des *Lactobacillus*, retenus comme probiotiques en santé ou en alimentation humaine, est leur capacité à survivre à travers les conditions acides de l'estomac et le tractus gastro-intestinal humain.

Selon **Desai (2008)** la survie de souches bactériennes dans le suc gastrique humain est une indication précise de leur capacité à survivre au passage dans l'estomac, pour atteindre leur site d'action et exercer leurs effets bénéfiques en tant que probiotiques.

Les souches B13 (*Lactobacillus plantarum*) et surtout la souche A20 (*Lactobacillus spp*) montrent une bonne résistance à l'acidité. Certains auteurs ont rapportés que les souches sensibles sont inhibées totalement à pH 2 après 2 heures d'incubation, par contre les souches résistantes, malgré la diminution de leur taux de croissance, persistent lors de leur passage à travers l'estomac, cas par exemple de *Lactobacillus plantarum* qui résiste aux conditions acides de l'estomac humain **Pato et al. (2005)**.

II.2.5.2. La résistance à la bile

Les résultats de l'étude de la tolérance des *Lactobacillus* à la bile sont illustrés dans les **tableaux (15, 16)** et la **figures (17)**.

Tableau (15) : Survie des souches de *Lactobacillus* à la bile (0.3%) (Mesure de la DO et dénombrement sur gélose).

Souches	p H : 2			
	DO	UFC x 10 ⁷	DO	UFC x 10 ⁷
	T ₀	T ₀	T _{2H}	T _{2H}
A20	0.666	1.8	0.641	0.2
A21	0.685	8.74	0.614	1.58
B13	0.755	14	0.680	2.56

Résultats et discussion

Tableau (16) : logarithme et taux de survie de *Lactobacillus* à pH 2 et 0.3% de la bile après 2heures d'incubation.

Souches	p H : 2			
	Log (UFC/ml) au T ₀	Log (UFC/ml) au T _{2H}	Taux de survie (%) à T _{0H}	Taux de survie (%) à T _{2H}
A20	7.27	6.30	100	86.89
A21	7.94	7.17	100	90.55
B13	8.14	7.40	100	90.90

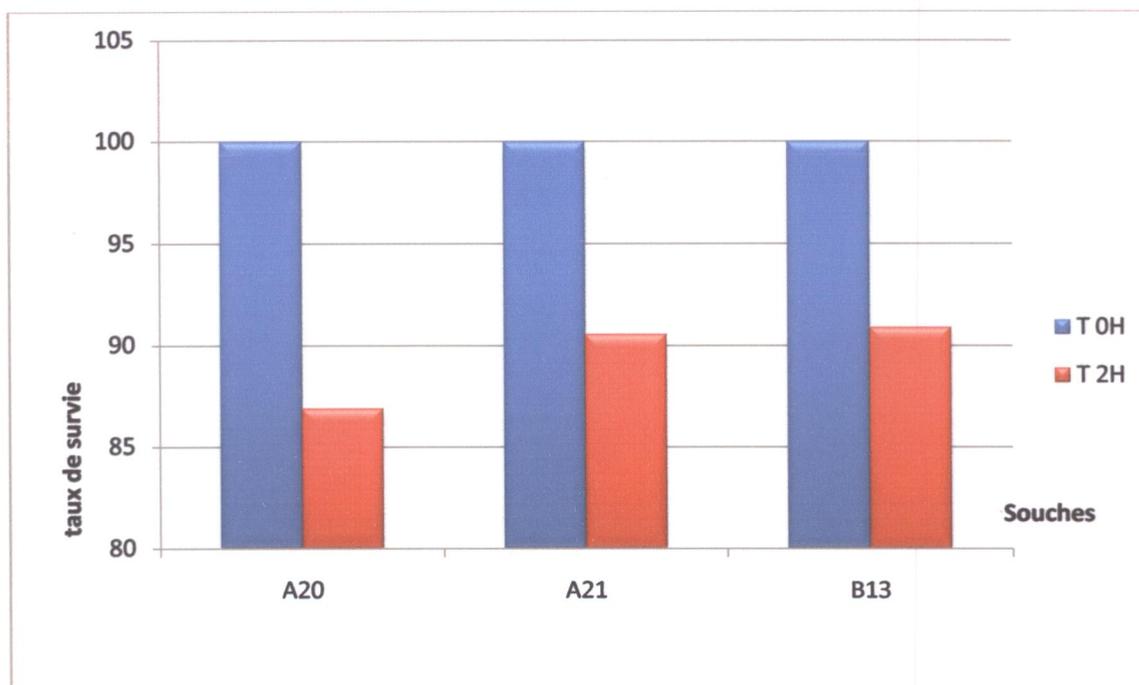


Figure (17) : taux de survie en pourcentage de *Lactobacillus* sur milieu MRS à pH 2 et 0.3% de la bile.

D'après nos résultat, on remarque qu'il y'a une diminution de la densité optique traduisant un déclin de la biomasse des souches de *Lactobacillus* qui est du à leur sensibilité vis-à-vis de la bile.

Les souches, B13 et A21 montrent les meilleurs taux de croissance qui s'étend de $90,90 \pm 9,1$ à $99,55 \pm 9,45$ respectivement sur milieu MRS à pH 2 additionnée de 0,3% de la bile.

On peut conclure que les souches B13 et A21 résistent bien à l'action combinée de l'acidité et la bile. Selon **Hamon *et al.* (2011)** la résistance à ces deux conditions combinées augmente la durée de survie des souches bactériennes dans l'estomac et le jus intestinale.

D'après la littérature et les travaux de **Hyronimus *et al.* (2000)**, on considère la résistance aux sels biliaire comme un critère important pour les souches prévues comme probiotiques. Cependant, il n'y a toujours aucune valeur de la concentration précise à laquelle la souche choisie devrait être tolérante.

II.2.5.3. Réponse au stimulus stomaco-duodéal lors du passage :

La réponse au stimulus stomaco-duodéal lors du passage à travers l'estomac est mesurée par la DO et le dénombrement sur gélose MRS. Les résultats sont mentionnés dans les tableaux (17) et (18)

Tableau (17) : la mesure de la DO et la survie des souches de *Lactobacillus* après l'incubation au temps 0h, 1h, 2h et 3h

Souches	Temps : 0H		Temps : 1h		Temps : 2h		Temps : 3H	
	DO	UFC x 10 ⁷						
A20	1.490	72	1.312	68	1.280	60	0.958	50
A21	1.231	66	1.112	64	1.054	52	0.970	50
B13	1.438	68	1.382	66	1.245	60	0.770	38

Tableau (18) : logarithme et le taux de survie des souches de *Lactobacillus* après l'incubation au temps 0h, 1h, 2h et 3h

Souches	Temps : 0H		Temps : 1h		Temps : 2h		Temps : 3H	
	Log (UFC/ml) au T ₀	Taux de survie (%)	Log (UFC/ml) au T _{1H}	Taux de survie (%)	Log (UFC/ml) au T _{2H}	Taux de survie (%)	Log (UFC/ml) au T _{3H}	Taux de survie (%)
A20	8.85	100	8.83	99.77	8.77	99	8.69	98.19
A21	8.81	100	8.80	99.88	8.71	98.86	8.69	98.63
B13	8.83	100	8.81	99.77	8.77	99.32	8.57	97.05

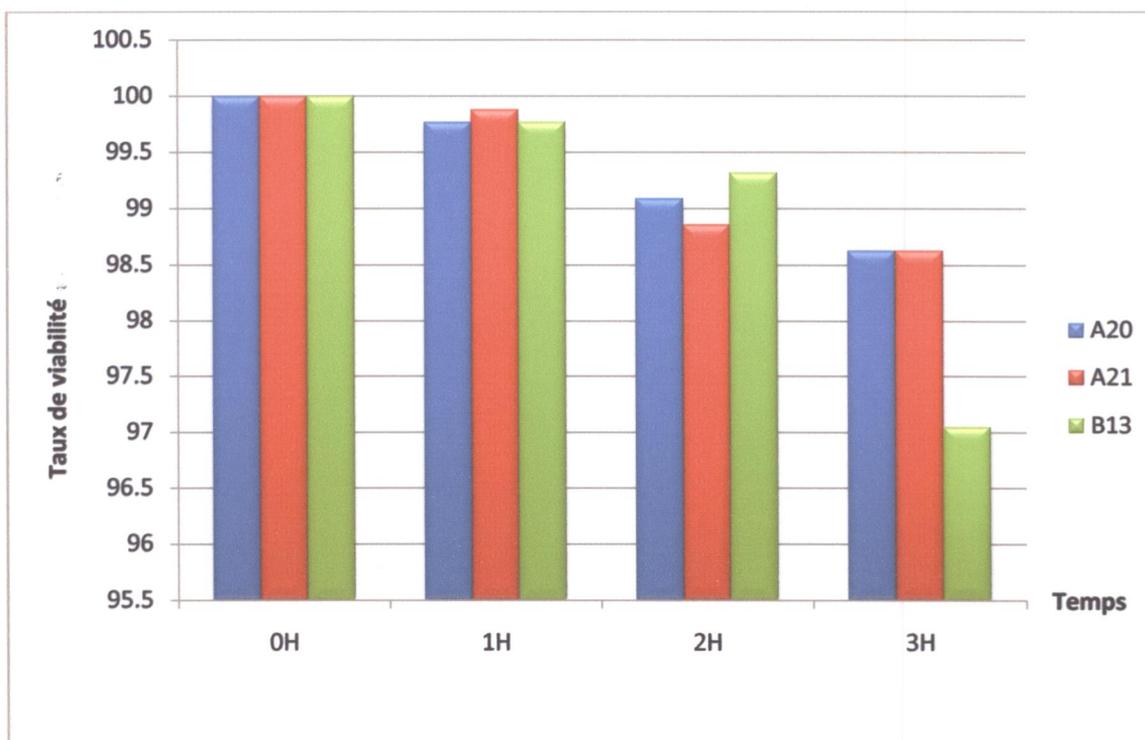


Figure (18) : taux de survie en pourcentage de *Lactobacillus* sur milieu MRS à pH 3 aux différents intervalles du temps.

La présence de la bile et les conditions acides et la sécrétion duodénale synthétique ont significativement affecté le taux de viabilité des souches de *Lactobacillus* testées.

D'après les résultats cités dans le **tableau (18)** et illustrés par la **figure (18)**, on constate que le taux de survie, après une heure d'incubation (du moment de l'addition du jus duodénum artificiel et des sels biliaries) pour les trois souches de *Lactobacillus* testées est d'environ 99%, ce taux diminue progressivement avec le temps, il baisse de 2% après 3 heures d'incubation.

Ces résultats montrent que les souches A20, A21 et B13 résistent aux conditions du passage gastro-intestinal à savoir la résistance au jus de duodénum et aux sels biliaries.

C'est la souche A21 (*L. plantarum*) qui présente le meilleur taux de survie, ces résultats concordent avec ceux retrouvés par **Vezoso et al. (2006)**.

II.2.6. Tests d'adhésion de *Lactobacillus* aux cellules épithéliales :

Les résultats de l'adhésion des souches de *Lactobacillus* aux cellules de l'iléon prélevés chez le lapin, la souris, le poulet et le rat sont présentés dans le **tableau (19)**.

Tableau (19) : Adhésion des différentes souches de *Lactobacillus* aux cellules épithéliales de rat, souris, poulet et lapin.

Animal \ Souches	Rat	Souris	Poulet	Lapin
<i>Lactobacillus</i> ssp (A20)	+	++	+	+
<i>L. plantarum</i> (A21)	+	++	+	+
<i>L. plantarum</i> (A9)	+	++	+	+
<i>L. plantarum</i> (B13)	++	++	++	++
<i>L. plantarum</i> (F12)	++	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> ssp (H7)	+	++	+	++
<i>Lactobacillus</i> ssp (H5)	+	++	+	+
<i>L. casei</i> sub sp <i>tolerans</i> (G4)	++	+	++	+
<i>Lactobacillus curvatus</i> (G6)	++	+	+	+
<i>L. plantarum</i> (A12)	+	++	+	+
<i>Lactobacillus</i> ssp (A23)	+	++	+	++
<i>L. bavaricus</i> (A3)	+	+	++	+
<i>Lactobacillus</i> ssp (B5)	++	+	++	++

+ Quinze cellules de *Lactobacillus* adhérees

++ Plus de quinze cellules de *Lactobacillus* adhérees

La capacité d'adhésion a été déterminée par microscopie optique (grossissement x100) après une coloration au cristal violet. Le test d'adhésion est considéré comme positif si le nombre de cellules adhérees est égal ou supérieur à 15.

Toutes les souches adhèrent aux cellules épithéliales des différents animaux par ailleurs les souches : *L. plantarum* (F12), *L. plantarum* (B13), *L. curvatus* (G6), *L. casei* sp *tolerans* (G4) ont montrés une excellente adhésion aux cellules épithéliales de rats, alors que les souches :

Lactobacillus ssp (B5), (H7), (A21) et *L. plantarum* (B13) ont une excellente adhésion sur les cellules épithéliales de la souris.

Les souches : *L. plantarum* (A21), (B13), *Lactobacillus* ssp (B5), *L. casei* sub sp *tolerans* (G4), *Lactobacillus curvatus* (G6) montrent une excellente adhérence chez le poulet, ce qui concerne le lapin, les souches qui montre une meilleur adhésion sont : *L. plantarum* (B13), *Lactobacillus* ssp (H7), (A21) et (B5).

C'est la souche *L. plantarum* (B13) qui montre le meilleur profil d'adhésion à tous les cellules épithéliales de l'iléon des animaux mis en test.

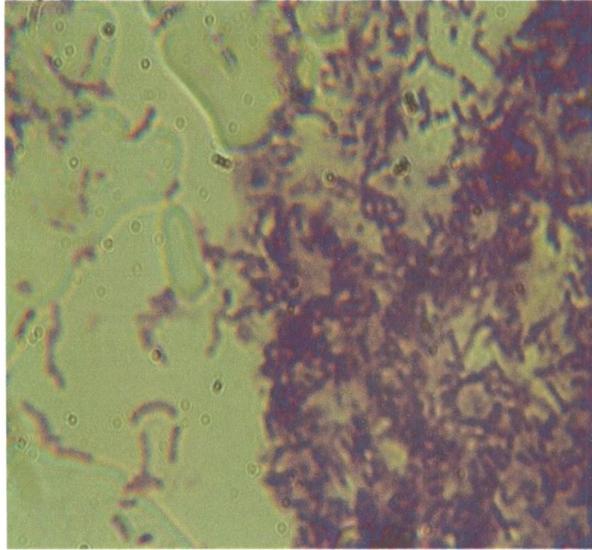


Figure 19 : Observation microscopique de l'adhésion de la souche (B13) a l'iléon du rat (grossissement x100)

La microflore est essentiellement situé dans les parties terminales de l'intestin grêle (l'iléon) et surtout dans le colon, alors que l'estomac et les parties haute de l'intestin grêle sont très faiblement colonisés par les bactéries commensales. C'est dans la partie ascendante du colon et dans l'iléon ou certains bactéries comme *Lactobacillus*, pourraient être plus abondantes (Moreau, 2005).

L'adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou mucus de l'hôte constitue un des critères fonctionnels de choix des probiotiques Pan *et al*, (2009) ; FAO/OMS, 2000. En effet, pour pouvoir exercer leurs effets bénéfiques sur la santé, les probiotiques doivent s'adhérer aux cellules épithéliales ou à la mucine intestinale.

Certains souches probiotiques adhèrent plus ou moins fortement et par mécanismes variés aux cellules épithéliales, cette propriété diffère entre les souches elles mêmes. D'après la littérature et les travaux de Saad, (2010), l'aptitude du probiotique à s'adsorber sur différents éléments de l'épithélium intestinal est dépendante des propriétés physicochimiques de surface des cellules de celui-ci et de la présence d'entités moléculaires qui peuvent assurer le rôle d'adhésines.

Conclusion

Conclusion

Le premier objectif de notre travail, était de sélectionner des souches de *Lactobacillus* d'origine humaine et de tester leur adhérence à des tissus épithéliaux de différents animaux : souris, rat, lapin et poulet. Le caractère d'adhésion est un critère majeur dans la colonisation des cellules épithéliales de l'intestin et à l'exercice d'effets bénéfiques, par un probiotique, sur la santé de l'hôte. Néanmoins, ce n'est pas un critère isolé, et pour être considéré comme probiotique, d'autres propriétés sont exigées à savoir : l'origine humaine, la résistance à la bile et l'acidité, l'innocuité totale et le pouvoir bactériocinogène.

L'isolement et la purification des souches, à partir des selles prélevés chez l'enfant, collectées de différentes régions de la wilaya de Jijel (El ouana, El chekfa, Ben yajis et Texanna) ont conduit à un total de cent vingt (120) souches de bactéries lactiques. L'identification, selon le profil morphologique, biochimique et physiologique, a conduit à 21 souches appartenant à 6 espèces réparties sur :

05 souches de *Lactobacillus plantarum*, 03 souches de *Lactobacillus casei ssp tolerans*, une souche de *Lactobacillus bavaricus*, une souche de *Lactobacillus mucosae*, une souche *L.gasseri*, une souche de *L. curvatus* et 09 souches *Lactobacillus spp*.

L'évaluation de l'adhésion et des autres aptitudes probiotiques des souches de *Lactobacillus* a fait ressortir que :

-Toutes les souches testées adhèrent aux cellules épithéliales des différents animaux avec un meilleur profil pour la souche B13.

-Par rapport aux autres tests à savoir : la tolérance à l'acidité et aux selles biliaries, la réponse au stimulus gastroduodéal et l'activité bactériocinogène, sommairement, 03 souches présentent des aptitudes probiotiques intéressantes : il s'agit des souches *L.plantarum* (B13), *L.plantarum* (A21) et *Lactobacillus ssp* (A20).

Notre étude n'est qu'un travail préliminaire. Par ailleurs, le profil probiotique que présentent les trois souches de *Lactobacillus* sélectionnées : B13, A21, A20 justifie l'intérêt de reconduire le travail par des recherches plus approfondies et complémentaires. C'est dans cette perspective que les trois souches ont été conservées par lyophilisation.

D'autre part, ce travail nous a permis de connaître les effets bénéfiques des probiotiques et leur intérêt sur la santé et par conséquent de tester et mettre en évidence certaines de leurs propriétés, ce qui a changé notre regard vis-à-vis de la consommation des produits alimentaires avec probiotiques et nous sensibiliserons, à partir de ce jour, notre entourage à les consommer.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Achemchem F., Abrini J., Martinez-Bueno M., Valdivia E et Maqueda. (2004).** Purification et caractérisation d'une bactériocine anti *Listeria* produite par *Enterococcus faecium* F-420 isolé à partir de lait cru de chèvre. Congrès International de Biochimie, Marrakech, Maroc, 3-6 Mai 2004, pp. 384-388.
- Ait- Belgnaoui F. (2006).** Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. France.
- Allouche F. N., Hellal A et Laraba A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. Nature & Technologie, n°3, pp. 13-20.
- Amrouche T. (2005).** Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des Bifidobacteries : analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliquées. Thèse de Doctorat. Université Laval. Canada.
- Azizpour K., Bahram beygi S and Azizpour A. (2009).** History and Basic of Probiotics. Research journal of biological sciences, 4(4), pp. 409-426.
- Badis A., Sellami L., Guetarmi D., Kihal M et Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». Sciences & Technologie C-n°23, pp. 30-37.
- Baliarda A. (2003).** Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactique appartenant aux Genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approches physiologiques et génétiques. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux, France.
- Bekhouche F. (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et identification biochimique. 2. Evaluation et optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de Doctorat. Université de Mentouri, Constantine.
- Boclé J.C. (2008).** Effet des probiotiques et Prebiotique sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. Agence Française de sécurité sanitaire des Aliments, pp. 1-128.
- Boudjema K., Fazouane F., Hellal A., Mechakra A. (2009).** Optimisation et modèle de production d'acide lactique par *Streptococcus thermophilus* sur lactoserum. Science & technologie C-N°29, pp.80-90.
- Chauvière G., Coconnier M. H., Kerneis S., Fourniat J and Servin A. L. (1992).** Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte like Caco-2 cells. Journal of General Microbiology, 138, pp. 1689-1696.
- Chiquette J. (2009).** The role of probiotics in promoting Dairy production. WCDs Advanced in Dairy Technology, Vol (21), pp. 143-157.
- Chukeatirote E. (2003).** Potential use of Probiotics. Songklanakarin J. Sci. Technol, 25 (2), pp. 275 -282.

- Coconnier M. H., Klanhammer T. R., Kernéis S., Bernat M. F and Servin A. L. (1992).** Protein-Mediated Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on Human Enterocyte and Mucus-Secreting Cell Lines in Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 58, pp. 2034 - 2039.
- Collado M. G., Jalonen L., Meriluoto J and Salminen S. (2006).** Protection mechanism of probiotic combination against human pathogens: *in vitro* adhesion to human intestinal mucus. *Asia Pac J Clin Nutr*, 15 (4), pp. 570 -575.
- Dacosta Y. (2000).** La bio-protection des aliments. YVES DACOSTA. Paris, pp. 14-23.
- Dana Gobadi M ., Salmanian A. H., Yakhchali B and Rastegar F. (2010).** High Folate Production by naturally occurring *Lactobacillus sp.* with probiotics potential isolated from dairy products in Ham and Lorestan provinces of Iran. *African Journal of Biotechnology*, vol 9 (33), pp. 383-391.
- Desai A. (2008).** Strain identification, viability and Probiotics properties of *Lactobacillus casei*. Doctor of Philosophy. Victoria University. Australia.
- Diop M. B., Dauphin R. D., Tine E., Ngom A., Destain J and Thonart P. (2007).** Bacteriocin producers from traditional food products. *Biotechnol Agron Soc Environ*,11(4), pp. 275-281.
- Diop M.B. (2008).** Sélection et caractérisation de souches bactériennes aptes à améliorer la technique de conservation du poisson par salaison au Sénégal. Thèse de Doctorat. Université de Gembloux. Belgique.
- Dolveres. Y. (2003).** Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la thechnologie des cellules immobilisées. Thèse de Doctorat. Université Laval. Canada.
- Dortu C., Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environn.* 13(1), pp. 143-154.
- Doumandji A., Hellal A et Saidi N. (2010).** Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11. *Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol (4), pp. 25-47.
- Drouault S et Corthier G. (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. Institut National de la Recherche Agronomique INRA, pp. 101 – 112.
- Edima H. C. (2007).** *Carnobacterium maltaromaticum* : Caractéristiques et physiologiques et potentialités en technologie fromagerie. Thèse de Doctorat. Université de Ngaoundéré, Cameroun.
- FAO/OMS Rapport d’expert. (2001).** Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
- Firzpatrick K.C. (2005).** Probiotiques. Direction santé Canada, pp. 1-31.
- Food and Nutrition Institute. (2005).** Probiotic, INNS. 2556 8203.

- Givry S. (2006).** Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*. Thèse de Doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne. France.
- Gossum A.V. (2007).** Probiotiques et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Nutrition clinique et métabolisme, 21, pp. 81-84.
- Grajek W., Olejnik A and Sip A. (2005).** Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. Acta Biochimica Polonica, Vol 52, pp. 665-671.
- Guglielmetti S., Tamagnini I., Mora D., Minuzzo M., Scarafoni A., Arioli S., Hellman J., Karp M and Parini C. (2008).** Implication of an Outer Surface Lipoprotein in Adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 Cells. Applied and Environmental Microbiology, Vol 74, pp. 4695-4702.
- Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris, pp. 91-92.
- Gusils C., Oppezzo O., Pizarro R., and González S. (2003).** Adhesion of probiotic lactobacilli to chick intestinal mucus. Can. J. Microbiol, 49, pp. 472-478.
- Hamon E., Horvatovich P., Izquierdo E., Bringel F., Marchioui E., Aoudé-Werner D and Ennahar S. (2011).** Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. BMC Microbiology. 11(63), pp. 1471-2180.
- Hariri A., Ouis N., Sahnouni F et Djilali B. (2009).** Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. Microbiol. Ind. San et Environn, pp. 37-55.
- Harish K and Varghese T. (2006).** Probiotic in humans. Review; Calicut Medical Journal, 4 (4): e3.
- Hyronimus B., Le Marrec C., Hadj Sassi A and Dechamps A. (2000).** Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. International journal of food microbiology, 61, pp. 193-197.
- Ingrassia I., Leplingard A and Parfeuille mechaud A. (2005).** *Lactobacillus casei* DN-114001 Inhibits the ability of Adherent-Invasive *Escherichia coli* isolated from crhn's disease patients to adhere to an invade intestinal epithelial cells. Applied and Environnemental Microbiology, Vol 71, pp. 2880-2887.
- Izquierdo A. E. (2009).** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique, Thèse de doctorat. Université de Strasbourg. France.
- Jakava-Viljanen M. J and Palva A. (2007).** Characterization of porcine specific surface (s-) layer protein carrying Lactobacillus species, s-layer proteins and the adhesion of *Escherichia coli* F18 fimbriae. doctoral thesis. University of Helsinki. Finlande.
- John A. C., N.D. and Green L. (1997).** Microbial Ecology and Probiotics in Human Medicine (Part II). Alternative Medicine Review, Vol 2(4), pp. 296-305.
- Juntunen M., Kirjavainen P.V., Ouwehand A.C., Salimen S.J and Isolauri E. (2001).** Adherence of Probiotic Bacteria To Human Intestinal Mucus in Healthy infants and during Rotavirus Infection. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Val 8, pp. 293-296.

- Karam H. Z et Karam N. E. (2006).** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura*, 24(3), pp. 153-156.
- Kaushik K. K., Kumar A., Duary R.K., Mohamty A.K., Grover S and Batish V.K. (2009).** Functional and Probiotic Attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *Plosong*, vol 4, issue/2.
- Khaoua S., Elhaloui N.E et Lefebvre G. (1996).** Caractérisation et détermination de la structure partielle d'une bactériocine de la souche *Lactococcus lactis* C16. *Actes Inst.Agron. Vet.* 17(1), pp. 15-25.
- Kiani L. (2006).** Bugs in Our Guts – Not All Bacteria Are Bad: How Probiotics Keep Us Healthy. *CSA Discovery Guides*, pp. 1- 20.
- Kimurak K., NishioT., Mizoguchii C and Koizumi A. (2010).** Analysis of the Composition .of Lactobacilli in Humans. *Bioscience Microflora Vol*, 29 (1), pp. 47–50.
- Kosin B and Rakshit S. K. (2006).** Microbial and Processing Criteria for Production of Probiotics. *Food Technol.Biotechnol*, 44(3), pp. 371-379.
- Labioui H., El moualdi L., El ychioui M et Ouhssine M . (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm*, 144, pp. 237-250.
- Lachance M. (2000).** Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* MJC15. Mémoire de maître ès sciences. Université Laval. Canada.
- Larpent J.P et Larpent M. L. (1997).** Memeto technique microbiologie. 3ème Edition. Toc et Doc, Lavoisier, Pari
- Larsen N., Nissen P., Willats G. T. W. (2006).** The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus* ssp. and *E. coli* O138. *International Journal of Food Microbiology*, 114, pp. 113–119.
- Leveau J. Y et Bouix M. (1993).** Bactérie lactiques in : « *Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industrielle* ».1993. Edition, collection science et technique agroalimentaire. Paris, pp. 170-192.
- Lin W. H, Yu B, Jang S. H. (2007).** Antimicrobial susceptibility: Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Elsevier, Anaerobe* 13: 107 – 113.
- Mami A., Hamedi A. R., Henni J. E., Kerfouf A and kihal M. (2010).** Activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis à vis de *Staphylococcus aureus*. *Les technologies de laboratoire*, vol (5), pp. 26-33.
- Metlef S et Dilmi-Bouras A. (2009).** Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrémophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Nature et Technologie*, n°1, pp. 33-44.
- Moreau M. C. (2005).** Bactéries lactiques probiotiques et immunité. in « *Bactéries lactiques et probiotiques* ». Luquet F., Corrieu G. 2005. Edition, Tec & Doc. Lavoisier. Paris, pp. 211- 253.
- Moreau M. C. (2001).** Les probiotiques: des microorganismes bénéfiques pour notre système immunitaire?. Institut National de la Recherche Agronomique INRA. France.

- Morita H., Shiratori C., Murakami M., Takami H., Kato Y., Endo A., Nakajima F., Takagi M., Akita H., Okada S and Masaoka T. (2007).** *Lactobacillus hayakitensis* sp. Nov., isolated from intestines of healthy thoroughbreds. International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology, 57, pp. 2836-2839.
- Morteau P et Seksik P.** Probiyique et alcaliments. In : « Bactéries lactiques et probiotiques ». Luquet F., Corrieu G. (2005). Edition, Tec & Doc. Lavoisier. Paris, pp. 256-289.
- Naghmouchi K. (2007).** Divergicine M35, une nouvelle bactériocine produite par *Carnobacterium divergens* M35 : Caractérisation moléculaire du mécanisme d'action antimicrobien et du phénomène de résistance. Thèse de Doctorat. Université Laval. Canada.
- Ninane V., Mukandayam baje R et Berben G. (2009).** Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : Le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du Kéfir. Biotechnol .Soc environ, 13(3), pp. 459-466.
- Ogunbanwo S. T., Sanni A.I and Onilude A. A. (2003).** Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. Afr J Biotechnol. 2(8), pp. 219-227.
- Ossowski I., Reunanen L., Satokari R., Vesterlund S., Kankainen M., Huhtinen H., Tynkkynen S., Salminen S., Willem M and Palva A. (2010).** Mucosal Adhesion Properties of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED Pilin Subunits. Applied and Environmental Microbiology, Vol 76, pp. 2049–2057.
- Pan X., Chen F., Wu T., Tang H and Zhao Z. (2009).** The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. Food control, 20, pp. 598-602.
- Pato U., Ali M., Abdul K and Parlindungan A. K. (2005).** Taurocholate Deconjugation and Cholesterol Binding by Indigenous Dadih Lactic Acid Bacteria. Hayati, September. Vol. 12, pp. 103-107.
- Penaud S. (2006).** Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *L.delbrueckii ssp.bulgaricus ATCC11842*.Thèse de Doctorat. Institut Nationale Agronomique de Paris-Grignon, France.
- Pennacchia C., Vaughan E. E and Villani F. (2006).**Potential Probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their Probiotic properties .ELSEVISER, 73, pp. 90-101.
- Pilet M.F., Magras C et Federighi M. (1998).** Bactéries lactiques in « Manuel de bactériologie alimentaire ». Sutra L., Frederichi M et Jouve J. L. (1998). Edition, Polytechnica. Paris. pp. 235 – 259.
- Pot B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria in bactéries lactiques De la génétique aux ferments. Corrieu G ; Luquet F.M. 2008. TEC& DOC-Lavoisier. Paris. pp 4.
- Prescott L. M ., Harley J. P et Klein D. A. (2005).** Les bactéries : les Gram positive pauvre en GC in : « Microbiologie ». 2^{ème} édition Française .Paris, pp. 517-531.
- Prioult G. (2003).** Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la B lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanisme d'action. Thèse de Doctorat. Université Laval, Canada.

- Ramiah K., Reenen C. A and Dicks L. M. T. (2007).** Expression of the mucus adhesion genes Mub and MapA, adhesion-like factor EF-Tu and bacteriocin gene plaA of *Lactobacillus plantarum* 423, monitored with real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 116, pp. 405–409.
- Raynaude. (2006)** .Régulation métaboliques et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de Doctorat. Université Paul Sabatier Toulouse. France.
- Reid G., Bruce A.W., Mc groarty J. A., Cheng K.J and costertion J. W. (1992).**Is there a role for *Lactobacillus* in prevention of urogenital and intestinal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol 3, pp. 335-344.
- Robin J.M et Rouchy. (2001).**Les probiotiques. Centre d'étude et de développement de la nutrithérapie.
- Rousseau V. (2004).**Evaluation d'oligo saccharides a effet Prebiotique Vis-à-vis de la microflore vaginale. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse-France.
- Ruas-Madierdo P ., Gaermonde M., Marggolles A., Clara G., Reyes-Gavilan and Salminen S. (2006).** Exopolysaccharides Produced by Probiotic Strains Modify the Adhesion of Probiotics and Enteropathogens to Human Intestinal Mucus. *Journal of Food Protection*, Vol 69, pp. 2011–2015.
- Saad N. (2010).**Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v avec l'hôte : approche in vitro. Thèse de Doctorat .Université de Limoges, France.
- Salminen S., Ouwhand A., Benno Y and Lee Y.K. (1999).** Probiotic: how should they be defined? .*Trends in Food science & Technology*, 10, pp. 107-110.
- Tailliez P. (2004).** Les Lactobacilles : propriétés, habitat, rôle physiologique et intérêt en santé humain. *Antibiotiques*, 2004 .Masson, Paris, 6, pp. 35-41.
- Vizoso P., Maria G., Charles M. A. P. F., Ulrich S and Wilhelm H. H. (2006).** *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, Vol (2), pp. 205-214.
- Watterlot L. (2010).**Analyse des effets de souches Probiotiques anti-inflammatoires .Thèse de Doctorat. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement Paris. France.
- Wee Y., Kim H. O., Yun J. S and Ryu H. W. (2006).** Pilot-scale lactic Acid production via Batch culturing of *Lactobacillus sp.RKY2* using corn steep liquor As a Nitrogen Source. *Food Technol Biotechnol.* 44 (2), pp. 293-298.
- Williams R.A.D. (2011).** Cell Wall Composition and Enzymology of *Lactobacilli*. *International and American Associations for Dental Research*. Vol 50, pp. 1104 – 1971.
- World Gastroenterology Organisation. (2008).** Probiotiques et Prébiotiques. World Gastroenterology Organisation Organisation mondiale de Gastroentérologie, pp. 1- 17.
- Yagi S., Akaike M ., Fujimura M., Ise T ., Yoshida S. , Sumitomo Y., Ikeda Y., Iwase T ., Aihara K ., Azuma H., Kurushima A., Ichikawa Y., Kitagawa T., Kimura T., Nishiuchi T et Matsumoto T. (2008).** Infection Endocarditis caused by *Lactobacillus*, *International medicine*, pp. 1113-1116.

Yang R., Monty C. J and Ray B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 58 (10), pp. 3355-3359.

Yin Q and Zheng Q. (2005). Isolation and identification of the dominant *Lactobacillus* in Gut and faces of ligs using carbohydrate fermentation and 16S ADN analysis. *Journal of Bioengineering*. Vol 99, pp. G8-71.

Annexes

Annexe I

Milieux d'identification :

MRS (Man, Rogosa et Sharpe) (bouillon et gélose)

• Peptone.....	10 g
• Extrait de viande.....	8 g
• Extrait de levure.....	4 g
• Acétate de sodium.....	5 g
• Phosphate dipotassique.....	2 g
• Citrate d'ammonium.....	2 g
• Sulfate de magnésium.....	2 g
• Sulfate de manganèse.....	0,05 g
• Glucose.....	20 g
• Tween 80.....	1 ml
• Agar (dans le cas de gélose).....	15 g
• Cystéine.....	1 g
• Eau distillée qsp.....	1000 ml

pH = 6,2

M.E.V.A.G sans sucre

• Extrait de viande.....	3 g
• Chlorure de potassium.....	5 g
• Rouge de phénol.....	20 mg
• Agar.....	15 g

Milieu GIBSON ABDELMALEK

• Extrait de levure.....	2,5 g
• Glucose.....	50 g
• Jus de tomate.....	100 g
• Lait	50 ml
• Gélose nutritive ordinaire.....	200 ml

pH = 5,6

Arginine dihydrolase (ADH)

Le milieu de base est le suivant :

- Peptone.....5 g
- Extrait de viande.....5 g
- Pérydoxal.....0,005 g
- Solution aqueuse de pourpre de promocréol à 2%.....5 m
- Glucose.....0,5 g
- Eau distillée qsp.....1000 ml

Gélose Mueller Hinton

- Infusion de viande de bœuf.....300 ml
- Peptone de caséine.....17,5 g
- Amidon de maïs.....1,5 g
- Agar.....17 g

pH = 7,4

Lait écrémé stérile à 10%

- Lait écrémé stérile en poudre.....10 g
- Eau distillée.....100 ml

Bouillon nutritif

- Peptone.....10 g
- Extrait de viande.....5 g
- Chlorure de sodium (facultatif selon la formule).....2 g

pH = 7,2

Annexe II

Tampon pour les aptitudes probiotique

pH = 6,4

Milieu PBS

- Na_2HPO_4 (anhydrous).....10,9 g
- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (anhydrous).....3,2 g
- NaCl90 g
- Eau distillée.....1000 ml

pH = 7,4

Solution de Ringer

- NaCl9 g
- KCl0,42 g
- CaCl_20,48 g
- NaHCO_30,2 g

pH = neutre

Sécrétion duodéna

- NaHCO_36,4 g
- KCl0,239 g
- NaCl1,28 g

Annexe III

Réactifs

-Violet de gentiane

- violet de gentiane.....1 g
- Ethanol à 90%.....10 ml
- Phénol2 g
- Eau distillée.....100 ml

-Fuchine de Ziehel

- Fushine basique1 g
- Alcool éthylique à 90%.....10 ml
- Phénol 5 g
- Eau distillée.....100 ml

-Lugol

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

-Soude Dornic : soude N/9

- Soude pure.....4,4 g
- Eau distillée.....100 ml

Annexe VI

Tableau 01 : la dilution des Lactobacilles par la solution de Ringer pour le test stimulus stomaco-duodéal lors du passage à travers de l'estomac par mesure de la DO et dénombrement à l'aide de cellules de Malasseze.

Souches	A20	A21	B13
DO	0,592	0,460	0,415
Dénombrement UFC/ μ l	29×10^7	26×10^7	28×10^7

Résumé

L'isolement et la purification des souches, isolées à partir de selles d'enfants, collectés de différentes régions de la wilaya de Jijel (El ouana, El chokfa, Ben yajis et Texana) ont conduit à un total de 120 souches de bactéries lactiques. L'identification, selon le profil morphologique, biochimique et physiologique, a conduit à 21 souches appartenant à 6 espèces réparties sur : 05 souches de *Lactobacillus plantarum*, 03 souches de *Lactobacillus casei ssp tolerans*, une souche de *Lactobacillus bavaricus*, une souche de *Lactobacillus curvatus*, une souche de *Lactobacillus mucosae*, une souche *L. gasseri* et 09 souches *Lactobacillus spp.*

L'évaluation des aptitudes probiotiques montre que les 21 souches identifiées adhèrent aux cellules épithéliales de l'iléon des différents animaux et 03 parmi elles présentent des profils probiotiques intéressants par rapport à la totalité des tests appliqués. Il s'agit des souches *L. plantarum* (B13), *L. plantarum* (A21) et *Lactobacillus ssp* (A20)

Mots clés : *Lactobacillus*, probiotique, adhésion.

Abstract

The isolation and purification of strains isolated from faeces of children, collected from different regions of the wilaya of Jijel (El ouana, El chekfa, Ben yajis and Texana), led to a total of 120 strains of lactic acid bacteria. The identification, according to morphological, biochemical and physiological profile, resulted in 21 strains belonging to six species distributed on : 05 strains of *Lactobacillus plantarum*, 03 strains of *Lactobacillus casei ssp tolerans*, one strain of *Lactobacillus bavaricus*, one strain of *Lactobacillus curvatus*, one strain of *Lactobacillus mucosae*, and one strain of *L. gasseri* and 09 strains of *Lactobacillus spp.*

Evaluating probiotic properties, shows that 21 strains identified, adhere to the epithelial cells of the ileum of different animals and 03 among them have interesting probiotic profiles compared to all the tests used. These strains are *L. plantarum* (B13), *L. plantarum* (A21) and *Lactobacillus ssp* (A20).

Keywords : *Lactobacillus*, probiotic, adhesion

المخلص :

سمحت عملية عزل و تنقية سلالات بكتيرية، مأخوذة من براز أطفال يقطنون مناطق مختلفة من ولاية جيجل (العوانة، الشقفة، بنى ياجيس و تاكسنة)، من الحصول على ما يعادل 120 سلالة من البكتيريا اللبنية.