

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Boussouf hichem

Université de Jijel
Faculté des Science Exactes et
Science de la Nature et de la Vie
Département de la Biologie
Moléculaire et Cellulaire

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 1630

جامعة جيجل
كلية العلوم الدقيقة و
علوم الطبيعة و الحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية
و الخلوية

Mémoire de Fin D'étude Pour L'obtention Du Diplôme D'ingénieur D'état
en Biologie

Option : Contrôle de Qualité et Analyses

Intitulé

L'étude de quelques aptitudes technologiques des souches de Lactobacillus à caractères
probiotiques

Membre de Jury :

Président : Boussouf L.
Examineur : Bekka F.
Encadreur : M^{me} Bousdira F.



Présenté par :

Askri Aicha
Laredj Zahia
Lotmani Hanane

Année Universitaire : 2009/20

"الحمد لله الذي هدانا لهذا وما

كنا لنهتدي لولا أن هدانا الله"

"ربنا لا تدعنا نصاب بالغرور إذا

نجبنا ولا باليأس إذا فشلنا"

"اللهم إنا نسألك إيماننا دائماً

وقلبنا خاشعاً وعلمنا نافعاً"

"آمين"

Remerciements

Nous remercions Allah qui nous a dotés du courage, de la patience et de la volonté pour être sur le bon chemin.

Nous tenons à formuler notre gratitude et nos sincères remerciements à notre compétent encadreur M^{eme} Bousdira Fathia pour son encadrement précieux, sa confiance, sa grande patience, sa disponibilité et l'aide précieuse qu'elle nous a toujours apporté avec bienveillance.

Nous somme très reconnaissantes envers docteur Idoui Tayeb pour ses précieux aides et conseils.

Nos remerciements vont également aux membres de jury qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail.

Toutes nos gratitudes vont aussi à nos chers parents pour Leur soutien tout au long de nos études et durant ce mémoire.

A toute personne, qui nous a aidé à la finition de notre travail, de près ou de loin, nous disant merci.

Aicha, Hanane et Zahia

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH : Arginine DiHydrolase.

LDH : Lactate DésHydrogénase.

EPS: ExoPolysaccharide.

H : Hydrogène.

H₂O : Eau.

HCl : Acide chlorhydrique.

H₂O₂ : Le peroxyde d'hydrogène (Eau Oxygénée)

CO₂ : Dioxyde de carbone.

NaOH : La soude.

M.E.V.A.C : Milieu D'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides.

MRS : Man Rogosa Sharp.

S : Souche

LB : Bactérie Lactique.

Lb : *Lactobacillus*.

C : *Carnobacterium*.

St : *Streptococcus*.

E : *Enterococcus*.

Lc : *Lactococcus*.

Pc : *Pediococcus*.

Ln : *Leuconostoc*.

V/V : Volume par Volume

T: Temps.

h : heure.

mn : minute

B₃, B₈, B₉, et K : Nicotinamide, Biotine, Acide folique et phyloquinone

MII : Maladies Inflammatoires Intestinales.

Caco2 : human Caucasian Colon adenocarcinoma

UFC : Unité Formant une Colonie.

DL : Dextrogyre / Lévoxyre

D : Dextrogyre

L(+) ou **L** : Lévoxyre

pH : potentiel d'Hydrogène.

°C : degré Celsius.

°D : degré Dornic.

% : pourcentage.

G+C % ou **GC %** : pourcentage en Guanine et Cytosine.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les différents genres de bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques	5
Tableau II : les critères différentiels de trois groupes de <i>Lactobacillus</i>	14
Tableau III : La participation des <i>Lactobacillus</i> aux produits fermentés	16
Tableau IV : Les principaux rôles des <i>Lactobacillus</i> dans les aliments	18
Tableau V : Les micro-organismes employés comme probiotiques chez l'homme ou chez animaux d'élevage	21
Tableau VI : La détection dans l'intestin de micro-organismes exogènes ingérés	22
Tableau VII : Quelques critères technologiques dans la sélection de cultures probiotiques utilisées dans la production laitière	24
Tableau VIII : Les probiotiques – Bienfaits potentiels pour la santé	27
Tableau IX : Pourcentages d'inhibition par des <i>Lactobacillus acidophilus</i> LB, à la dose de 2.10^9 UFC/ml, de la fixation de six souches entérovirulentes sur des cellules caco-2 cultivées in vitro	28
Tableau X : Profil biochimique des souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées	53
Tableau XI : Le profil fermentaire des sucres	54
Tableau XII : le nom scientifique des espèces identifiées	55
Tableau XIII : Les noms scientifiques des souches étudiées et leurs pourcentages	56
Tableau XIV : Densité optique (D.O) des souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées	57
Tableau XV : Résultats de la croissance sur les milieux à deux pH différents (pH 3 et pH 4)	58
Tableau XVI : Les résultats de la résistance des souches de <i>Lactobacillus</i> à la bile	59
Tableau XVII : Résultat de la croissance des <i>Lactobacillus</i> en présence d'antibiotiques	60
Tableau XVIII : Résultats de l'activité antibactérienne des souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées sur des germes tests	61
Tableau XIX : les effets du surnageant natif et neutre sur les germes tests	63
Tableau XX : L'adhésion des souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées aux cellules épithéliales	64
Tableau XXI : Résultats de l'évolution de l'acidité Dornic et du pH des souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées	66
Tableau XXII : les résultats de l'activité protéolytique des souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées.	68
Tableau XXIII : production d'exo polysaccharides par les <i>Lactobacillus</i> étudiées	70
Tableau XXIV : la résistance des souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées aux arômes industriels	72
Tableau XXV : L'effet coagulant des souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées sur le lait	75
Tableau XXVI : Les pourcentages des deux composants résultant de la coagulation	76

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : les voies métaboliques des bactéries lactiques	2
Figure 02 : schéma succinct les principales voies fermentaires des <i>Lactobacillus</i>	12
Figure 03 : adhésion de diverses bactéries au mucus humain en provenance de diverses catégories d'âge, valeurs en pourcentages de cellules adhérant après lavage	23
Figure 04 : Mécanismes d'action possible des bactéries probiotiques pour améliorer la résistance aux bactéries pathogènes	28
Figure 05 : Divers mécanismes pourraient expliquer l'action bénéfique des LAB	34
Figure 06 : Schéma succinct les différentes étapes de la coagulation	37
Figure 07 : Répartition des espèces en pourcentage	56
Figure 08 : Histogramme des quantités de l'acidité Dornic produite par les <i>Lactobacillus</i> à différentes concentrations de l'arome à T = 0 h.	73
Figure 09 : Histogramme des quantités de l'acidité Dornic produites par les <i>Lactobacillus</i> à différentes concentrations de l'arome à T = 2h.	73
Figure 10 : Histogramme des quantités de l'acidité Dornic produites par les <i>Lactobacillus</i> à différentes concentrations de l'arome à T = 4 h..	73
Figure 11 : Histogramme des quantités de l'acidité Dornic produites par les <i>Lactobacillus</i> à différentes concentrations de l'arome à T = 6 h..	74
Figure 12 : Histogramme des quantités de l'acidité Dornic produites par les <i>Lactobacillus</i> à différentes concentrations de l'arome à T = 24 h.	74
Figure 13 : Courbes représentatives de différents produits de coagulation	75

LISTE DES PHOTOS

Photo 01 : Le genre <i>Bifidobacterium</i>	6
Photo 02 : Le genre <i>Leuconostoc</i>	7
Photo 03 : Le genre <i>Pediococcus</i>	7
Photo 04 : Le genre <i>Lactococcus</i>	8
Photo 05 : Le genre <i>Enterococcus</i>	8
Photo 06 : Le genre <i>Streptococcus</i>	9
Photo 07 : Le genre <i>Carnobacterium</i>	9
Photo 08 : Le genre <i>Lactobacillus</i>	10
Photo 09 : Aspect macroscopique des colonies d'une souche de <i>Lactobacillus</i>	50
Photo 10 : Aspect microscopique de La souche <i>Lactobacillus</i> (coloration de Gram, observation à grossissement x100)	51
Photo 11 : Evaluation de type fermentaire sur milieu Gibson Abd Elmalek	52
Photo 12 : Effet antagonisme d'une souche étudiée vis-à-vis les <i>Salmonella</i> .	62
Photo 13 : Effet antagonisme d'une souche étudiée vis-à-vis les <i>Staphylococcus aureus</i>	62
Photo 14 : Effet de surnageant natif sur <i>Klebsiella</i>	64
Photo 15 : L'adhésion des bactéries <i>Lactobacillus</i> étudiées aux cellules épithéliales de l'hélium du rat	65
Photo 16 : L'effet protéolytique d'une souche de <i>Lactobacillus</i> étudiées sur gélose MRS à 10 % de lait	68
Photo 17 : L'effet protéolytique des souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées additionnée de 2 % de lait	59
Photo 18 : La production d'exopolysaccharide par les souches de <i>Lactobacillu</i> étudiées	71

Sommaire

Introduction	1
Partie I : Etude bibliographique	
Chapitre I : les bactéries lactiques	
I.1. Définition	2
I.2. Propriétés générales	2
I.3. Habitat	4
I.4. Classification	4
I.4.1. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	6
I.4.2. Le genre <i>Leuconostoc</i>	7
I.4.3. Le genre <i>Pediococcus</i>	7
I.4.4. Le genre <i>Lactococcus</i>	7
I.4.5. Le genre <i>Enterococcus</i>	8
I.4.6. Le genre <i>Streptococcus</i>	8
I.4.7. Le genre <i>Carnobacterium</i>	9
I.4.8. Le genre <i>Lactobacillus</i>	10
I.5. Le rôle des bactéries lactiques	10
I.6. Les Lactobacilles	10
I.6.1. Définition	10
I.6.2. Habitat	11
I.6.3. Caractéristiques des <i>Lactobacillus</i>	11
I.6.4. Classification des <i>Lactobacillus</i>	13
I.6.5. Rôle des <i>Lactobacillus</i>	14
I.6.5.1. Produits alimentaires	15
I.6.5.1.1. rôle positif ou technologique	15
A. Produits laitiers	15
B. Produits végétaux	15
C. Produits carnés	16
D. Panification	16
I.6.5.1.2. Rôle négatif	16
A- Altérations liées à la production d'acide lactique	17
B- Altérations liées à la production des polysaccharides	17
C- Altérations liées à la production des gaz	17
D-Altérations liées à la production de peroxyde d'hydrogène	17
I.6.5.2. Hommes	18
Chapitre II : les probiotiques	
II.1. Historique et définition	19
II.2. Les principaux groupes de probiotiques	19
II.2.1. Les bactéries lactiques	19
II.2.2. Les bifidobactéries	20
II.2.3. Levures	20
II.2.4. Les autres bactéries sporulées	20
II.3. Probiotiques et alicaments	21
II.4. Propriétés et critère de sélection des probiotiques	22

II.4.1. Résistance aux conditions rencontrées au cours du transit digestif	22
II.4.2. Colonisation du tractus digestif et adhésion aux cellules intestinales	23
II.4. 3. Activité antimicrobienne	23
II.4. 4. Origine humaine	24
II.5. Propriétés technologiques	24
II.6. Mécanisme d'action des probiotiques	25
II.6.1. Effets nutritionnels	25
II.6.1.1. Amélioration de la digestibilité de la ration alimentaire	25
A. le lactose	25
B. les protéines	25
C. la matière grasse	26
D. les minéraux et les vitamines	26
II.6.1.2. Neutralisation des produits toxiques	26
II.6.2. Effets sanitaires	26
II.6.2. 1. Effet des probiotiques sur la flore intestinale	27
II.6.2.2. L'inhibition des bactéries indésirables	27
II.6.2.3. Infection par <i>Helicobacter pylori</i> et complications	29
II.6.2.4. Influence sur la réponse immunitaire	29
II.6.2.5. L'allergie	30
II.6.2.6. Le cancer	30
II.6.2.7. La constipation	30
II.6.2.8. Prévention de la diarrhée infectieuse	31
II.6.2.9. Les maladies inflammatoires et troubles intestinaux	31
II.6.2.10. Maladies cardiovasculaires	32
II.6.2.11. Vaginose bactérienne	32
II.6.2.12. Infections urinaires	32
II.6.2.13. Vers une utilisation de probiotiques chez les grands brûlés	33
II.6.2.14. Un probiotique contre les douleurs articulaires	33
II.6.2.15. Un probiotique exerce un effet cariogène chez le rat	33
II.6.3. Utilisation des probiotiques chez des sujets par ailleurs sains	34
II.7. Les sources naturelles de probiotiques	35

Chapitre III : les aptitudes technologiques de *Lactobacillus*

III.1. pouvoir acidifiant	36
III.2. Pouvoir texturant ou épaississants	37
III.3. Pouvoir aromatisant	38
III.4. Pouvoir protéolytique	39
III.5. Aptitude antagoniste	39
III.5.1. Activité antimicrobienne due à la production d'acides organiques	39
III.5. 2. Activité antimicrobienne due à la production de bactériocines	40
III.5.3. Activité antimicrobienne due à la production de peroxyde d'hydrogène	40
III.5.4. Activité antimicrobienne due à la production de gaz	41
III.5.5. Activité antimicrobienne due à la production de diacétyl	41
III.5.5. Activité antimicrobienne due à la production de reutérine	41

Partie II : Etude expérimentale

I. Matériels et méthodes	43
I.1. Matériels	43
I.1.1. Matériels biologiques	43

I.1.2. Milieux de culture	43
I.1.3. Les réactifs	43
I.1.4. Appareillages	43
I.2. Méthodes	44
I.2.1. Revivification	44
I.2.2. Purification	44
I.2.3. Identification	44
I.2.3.1. Etude des caractères morphologiques	44
I.2.3.1.1. Examen macroscopique	44
I.2.3.1.2. Grammage	44
I.2.3.2. Tests biochimiques et physiologiques	45
I.2.3.2.1. Tests biochimiques	45
A. Recherche de la catalase	45
B. Recherche du type fermentaire	45
C. Profil fermentaire des sucres	45
D. Recherche de l'activité arginine dihydrolase ADH	45
I.2.3.2.2. Tests physiologiques	46
A. Croissance à différentes températures	46
I.2.4. Evaluation des aptitudes probiotiques in vitro	46
I.2.4.1. Estimation de la croissance	46
I.2.4.2. Croissance sur milieu acide	46
I.2.4.3. Croissance en présence de la bile	46
I.2.4.4. Résistance aux antibiotiques	46
I.2.4.5. Activité antibactérienne	47
I.2.4.6. Effet des surnageants sur les entérobactéries	47
I.2.4.7. Test d'adhésion des bactéries <i>Lactobacillus</i> aux cellules épithéliales	47
I.2.5. Etude de quelques aptitudes technologiques des <i>Lactobacillus</i>	48
I.2.5.1. Etude de pouvoir acidifiant	48
I.2.5.2. Etude de pouvoir protéolytique	49
I.2.5.3. Etude de pouvoir texturant	49
I.2.5.4. Résistance aux arômes industriels	49
I.2.5.5. Test de coagulation	49
II. Résultats et discussion	50
II.1. Purification	50
II.2. Identification	50
II.2.1. Etude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques	50
II.2.1.1. Examen macroscopique	50
II.2.1.2. Examen microscopique	50
II.2.2. Tests biochimiques et physiologiques	51
II.2.2.1. Recherche de la catalase	51
II.2.2.2. Recherche du type fermentaire	51
II.2.2.3. Croissance à différentes températures	52
II.2.2.4. Recherche de l'activité arginine dihydrolase ADH	53
II.2.2.5. Profil fermentaire des sucres	54
II.2.3. Identification des espèces	55
II.3. Etude de quelques aptitudes probiotiques	57
II.3.1. Estimation de la croissance	57
II.3.2. Croissance sur milieu acide	58
II.3.3. Croissance en présence de la bile	58
II.3.4. La résistance aux antibiotiques	60
II.3.5. Activité antibactérienne	61

II.3.6. Effet de surnageant natif et neutre	62
II.3.7. L'adhésion des bactéries <i>Lactobacillus</i> aux cellules épithéliales	64
II.4. Etude de quelques aptitudes technologiques des <i>Lactobacillus</i>	66
II.4.1. Etude du pouvoir acidifiant des lactobacilles	66
II.4.2. Etude du pouvoir protéolytique	67
II.4.3. Etude du pouvoir texturant	69
II.4.4. Effet des arômes industriels sur l'acidification	71
II.4.5. Test de coagulation	74
Conclusion Générale	
Références bibliographiques	
Annexes.	



Introduction

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

Dans le secteur des industries agroalimentaires, les bactéries lactiques sont utilisées comme auxiliaires technologiques pour élaborer des aliments fermentés. Elles constituent un groupe hétérogène qui rassemble des bactéries capables de produire de l'acide lactique par un métabolisme fermentaire. L'acidification et les procédés enzymatiques, accompagnant leur développement, influencent les qualités organoleptiques et la préservation de nombreux aliments.

Les bactéries lactiques sont également retrouvées dans d'autres secteurs d'application entre autre la santé humaine et animale. Elles sont utilisées comme probiotiques. Le genre *Lactobacillus* constitue le bon exemple. En effet plusieurs de ses espèces et sous espèces sont utilisés comme tels.

Les probiotique sont des micro-organismes vivants, qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte (Luquet et Corriau, 2005).

Les effets bénéfiques sur la santé des aliments contenant des microbes vivants (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 professionnels de la santé. Il a été signalé que ces probiotiques peuvent jouer un rôle important dans les fonctions immunologiques, digestives et respiratoires et pourraient avoir un effet sensible en réduisant les maladies infectieuses chez les enfants (Farineau, 2001).

Dans notre pays, il existe peu ou pas de travaux sur l'étude des *Lactobacillus* à cratères probiotiques d'origine humaine ainsi que leurs aptitudes technologiques.

Vu l'actualité et l'importance du sujet, il nous a semblé intéressant de réaliser un travail pratique sur les probiotiques qui s'intitule : L'étude des aptitudes technologiques des souches de *Lactobacillus* à caractère probiotique d'origine humaine.

Le choix de ce thème est accentué par le fait que les souches de *Lactobacillus* s'adaptent à l'alimentation de l'individu et par conséquent celles isolées dans notre pays pourraient être différentes des souches déjà isolées dans le monde.

Notre travail a pour objectifs :

- ✓ d'apporter une information sur les aptitudes technologiques des *Lactobacillus* probiotiques utilisés en industrie alimentaires ;
- ✓ d'étudier les critères probiotiques, *in vitro*, des souches de *Lactobacillus* isolées à partir de selles d'enfants ;
- ✓ d'évaluer, en pratique, quelques aptitudes technologiques des souches de *Lactobacillus* étudiées.



Partie I
Etude bibliographique



Chapitre I
Les bactéries lactiques

I.1. Définition

Le groupe des bactéries lactiques a été définie pour la première fois par ORLA-JENSEN en 1919, il est appelé : les bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique dont elles peuvent avoir des formes de coques ou de bâtonnets (Leveau et Bouix, 1993.a.).

Les bactéries lactiques sont très ubiquistes, regroupées par l'homme dans un ensemble dont le nom est en lui évocateur de la caractéristique principale de leur métabolisme : la production d'acide lactique. Cette aptitude confère à ces espèces, outre l'intérêt primordial dans les domaines de la transformation et de la conservation des aliments, la capacité de se développer en constituant la voie majeure de production d'énergie (Corriau et Luquet, 2008.a.).

Ce groupe bactérien est un vaste ensemble de micro-organismes procaryotes qui se rattachent à deux phylums :

- le phylum des *Clostridium* ; dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de G+C inférieur à 50 % ;
- le phylum des *Actinomycetes*; dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de G+C supérieur à 50 % (Dacosta, 2000).

I.2. Propriétés générales

Les bactéries lactiques sont principalement caractérisées par leur capacité à fermenter les glucides en produisant des quantités importantes d'acide lactique, accompagné dans certains cas d'autres métabolites (éthanol, CO₂, autres acides organiques) (Sutra et al., 1998; Leveau et Bouix, 1993.a.). La figure 01 illustre les voies métaboliques des bactéries lactiques.

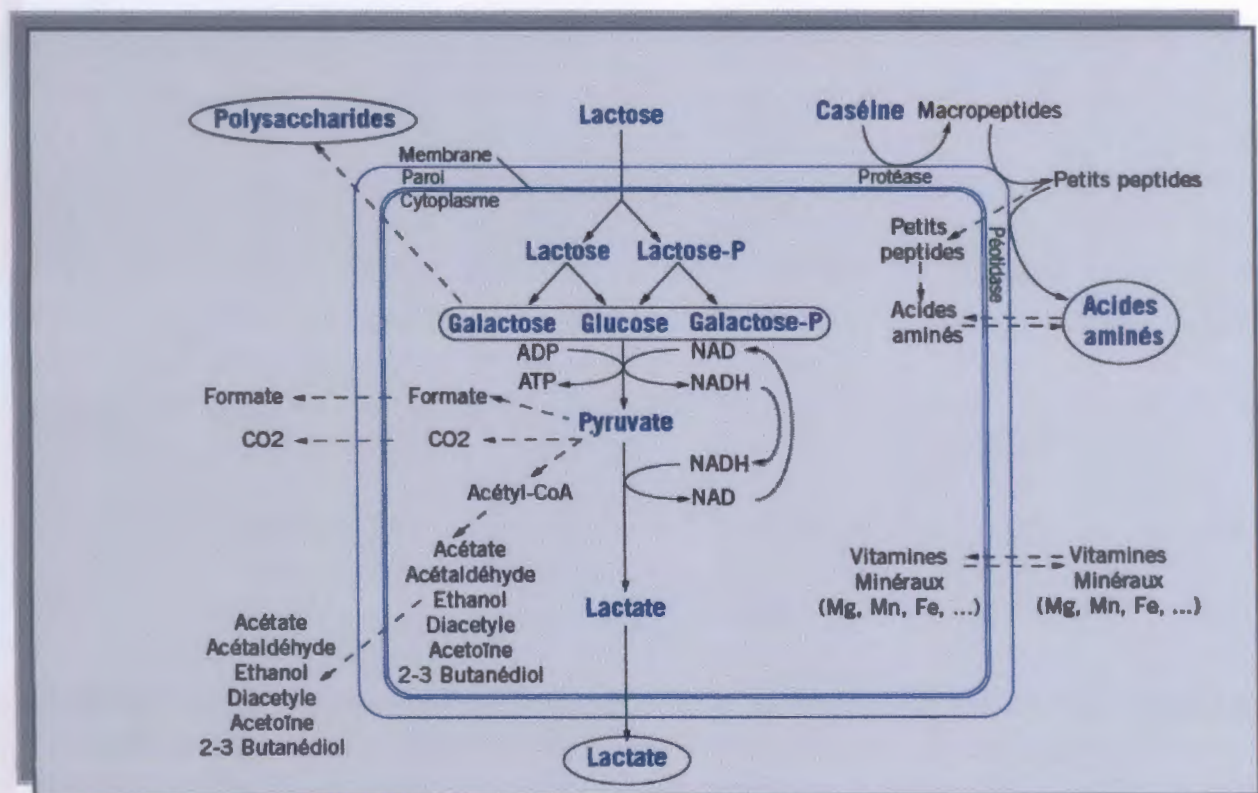


Figure 01 : les voies métaboliques des bactéries lactiques (Soustre, 2009).

Selon le mode de fermentation obligatoire ou préférentiel utilisé, les bactéries de l'acide lactique sont dites :

- homofermentaires : la fermentation des hexoses et du lactose aboutissant à la production presque exclusive d'acide lactique (90 % au moins) ; c'est la voie suivie par la plupart des bactéries lactiques (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* du groupe I) ;
- hétérofermentaires : la fermentation des glucides conduisant à la production d'acide lactique (environ 50 %) et d'autres composés divers comme le gaz carbonique (environ 25 %), l'éthanol, le glycérol et d'autres acides organiques (en particulier de l'acide acétique); cette voie est suivie strictement ou facultativement par :
 - ❖ les bactéries du genre *Leuconostoc* ;
 - ❖ les *Lactobacillus* appartenant au groupe II (hétérofermentaires facultatifs) et III (hétérofermentaires stricts) ;
 - ❖ les bactéries du genre *Carnobacterium* (hétérofermentaires facultatives) (**Leveau et Bouix, 1993.a. ; Dacosta, 2000**).

Certaines bactéries homofermentaires ont la capacité de suivre une fermentation hétérolactique dans des conditions de croissance non optimales ou selon la nature du sucre utilisé (**Leveau et Bouix, 1993.a.**). Cependant, la plupart des bactéries de l'acide lactique participent à l'élaboration de nombreuses denrées alimentaires fermentées en jouant plusieurs rôles relatifs aux caractères organoleptiques, nutritionnels et sanitaires de l'aliment, elles sont aussi impliquées dans l'altération de certaines catégories de produits alimentaires. Alors que leur caractère pathogène est extrêmement réduit puisque seules certaines espèces de genre *Streptococcus* et, dans certaines conditions, *Enterococcus* peuvent être impliquées dans des infections humaines (**Sutrat et al., 1998**).

Les bactéries lactiques présentent d'autres caractéristiques communes :

- ce sont Gram positif généralement immobiles, asporulés, catalases et oxydases négatives, elles ne réduisent pas les nitrates en nitrites sauf certaines d'entre elles quand le pH n'est pas trop acide (**Leveau et Bouix, 1993.a. ; Dacosta, 2000**).
- leur capacité de biosynthèse est faible (c'est pourquoi elles sont considérées comme des organismes « fastidieux » (**Perry et al., 2004**), elles possèdent de ce fait une exigence élevée en facteur de croissance (polyoxotrophie) : acides aminés, acides gras, vitamines, bases nucléiques... ainsi elles sont dépourvues de cytochromes et en conséquence inaptes à toute respiration aérobie ou anaérobie ;
- ce sont des bactéries anaérobies facultatives ou aérotoles : microaérophiles, uniquement capables de fermentation en anaérobie comme en aérobie (**Leveau et Bouix, 1993.a. ; Sutrat et al., 1998; Dacosta, 2000 ; Prescott et al., 2007**).

Malgré leurs capacités métaboliques réduites et leurs besoins nutritionnels complexes, les bactéries lactiques ont bien survécu dans des environnements spécifiques, en raison de leur spécialisation en fermentation des sucres (**Perry et al., 2004**).

I.3.Habitat

Très largement répandues, les bactéries lactiques se développent dans tous les habitats où elles disposeront de glucides en abondance de produits de dégradation des protéines, d'acides nucléiques et de vitamines (**Leclerc, 1994**). Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore humaine ou animale (**Dortu et Thonart, 2009**).

I.4.Classification

La production d'acide lactique dans la fermentation anaérobies des sucres est un caractère biochimique important dans la classification des bactéries lactiques, ainsi que leur morphologie (**Leveau et al., 1991**).

La classification de Bergey (**Bergey1994**) sépare le monde bactérien en 35 groupes. Les bactéries lactiques se trouvent dans les groupes : 17 (coques) 19 (bâtonnet réguliers) et 20 (bâtonnet irréguliers) (**Vignola, 2002.a.**). Le tableau (I), récapitule les différents genres de bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques.

Tableau I : les différents genres de bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques (Leveau et al., 1991 ; Pilet et al, 2005).

Genre	Morphologie	Fermentation	Caractéristiques principales	Habitats principaux
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaires ou Hétérofermentaires	Thermophiles ou mésophiles	Homme, produits laitiers, carnés, végétaux
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaires	Psychrotrophes, peu acidotolérants	Produits carnés, poissons, produits laitiers
<i>Lactococcus</i>	coques	Homofermentaires	Mésophiles, croissance à 10 °C et non à 45 °C	Produits laitiers, végétaux
<i>Streptococcus</i>	coques	Homofermentaires	Thermophiles	Produits laitiers.
<i>Enterococcus</i>	coques	Homofermentaires	Mésophiles, croissance à 45 °C et non à 10 °C, thermorésistantes	Intestin de l'homme et des animaux, produits laitiers
<i>Pediococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles, halotolérants	Bière, produits végétaux, saucissons
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles, halophiles	Saumures
<i>Leuconostoc</i>	coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produits végétaux, produits laitiers
<i>Oenococcus</i>	coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	vin
<i>Bifidobacterium</i>	Formes irrégulières	Acides acétiques et lactiques	Mésophiles	Intestin de l'homme et des animaux

Actuellement, selon **Dortu et Thonart, (2009)**, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents :

Lactobacillus, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*,
Lactococcus, *Streptococcus*, *Enterococcus*,
Pediococcus, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*,
 et *Vogococcus*.

D'après **Orla-Jensen**, sept genres principaux constituent les groupes des bactéries lactiques (**Leveau et Bouix, 1993.a.** ; **Sutra et al., 1998**) à savoir :

- *Lactobacillus* (Lb) ;
- *Carnobacterium* (C) ;
- *Streptococcus* (St) ;
- *Enterococcus* (E) ;
- *Lactococcus* (Lc) ;
- *Pediococcus* (Pc) ;
- *Leuconostoc* (Ln).

Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme un genre de bactéries lactiques (**Sutra et al., 1998**).

I.4.1. Le genre *Bifidobacterium*

Les bifidobactéries (anciennement *Lactobacillus bifidus*) sont des bâtonnets non sporulants, non mobiles, de formes variées, légèrement incurvées ou en forme de massue (**Prescott et al., 2007.a.**).

Ce sont des bactéries anaérobies, mésophiles montrant une température de croissance optimale entre 37 °C et 41 °C. Elles ne supportent pas les pH acides 5,0-4,5 (**Leveau et Bouix, 1993.a.**). Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur G+C % élevé et la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase. Celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique (rapport 3 : 2), ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et d'autres acides organiques (**Sutra et al., 1998**).

Ce genre se trouve dans la bouche et le tractus digestif des vertébrés à sang chaud, dans les égouts et chez les insectes (**Prescott et al., 2007.a.**).



Photo 01 : Le genre *Bifidobacterium* (**Carip, 2008**).

L4.2. Le genre *Leuconostoc*

Il rassemble les coques lenticulaires en paires ou en chaînettes, mésophiles qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Certaines espèces sont capables de fermenter le citrate ce qui leur confère une activité aromatique importante. D'autres synthétisent des dextrans en présence de saccharose (Leveau et Bouix, 1993 ; Sutra et al., 1998).

Les *Leuconostoc* sont généralement capsulés ; cette propriété entraîne fréquemment l'apparition d'une viscosité dans le milieu. Ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes. Ce sont des contaminants fréquents qui produisent des accidents de fabrication dans les produits acides et sucrés ou les végétaux (Guiraud, 2003 ; Guiraud et Rosec, 2004). Ces bactéries peuvent être isolées de plantes, de fourrage ensilé et de lait. Elles sont utilisées dans la production de vin, dans la transformation des légumes et dans la fabrication des produits laitiers (Prescott et al., 2007.a.).



Photo 02 : Le genre *Leuconostoc* (Carip, 2008.a.).

L4.3. Le genre *Pediococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires, en paires ou en tétrades, caractérisés par la production d'acide lactique L(+) ou DL (Larpent et Larpent, 1997 ; larpent, 2000). Ils sont saprophytes, majoritairement acidophiles et osmophiles. Ils peuvent être nuisibles en brasserie, comme le nom de *Pediococcus damnosus*, car ils peuvent interférer avec les levures de la fermentation alcoolique normale en produisant des substances indésirables provenant de la fermentation lactique (Perry et al., 2004).

Les *Pediococcus* causent aussi des altérations (viscosité) dans les produits végétaux et parfois les viandes et les poissons,... ils sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les choucroutes (Pilet et al, 2005).

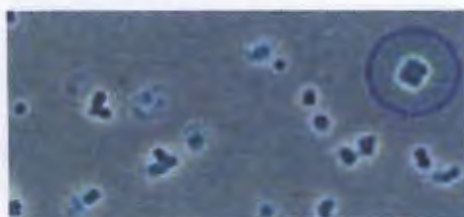


Photo 03 : *Pediococcus* sp. (Illustration : tétrade de *P. pentosaceus*) (Bunte, 2009)

L4.4. Le genre *Lactococcus*

Il représente les streptocoques dits : "lactiques", car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Ils sont mésophiles mais se développent jusqu'à 10 °C. Ces bactéries se trouvent principalement dans les produits

végétaux mais elles sont aussi largement présentes dans les produits laitiers (Sutra et al., 1998; Pilet et al., 2005).

Les streptocoques mésophiles appartiennent au groupe N de l'Ancefield, ils abaissent le pH en transformant le lactose en acide lactique ; cette acidification intervient comme facteur de la coagulation du lait et de la synérèse des caillés (Larpent, 1996).

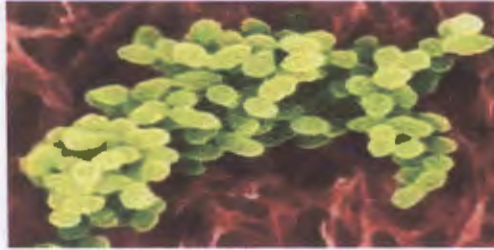


Photo 04 : Le genre *Lactococcus*

L4.5. Le genre *Enterococcus*

Les *Enterococcus* sont des coques homofermentaires, regroupés par paires ou en chaînettes et caractérisés par la production d'acide lactique L(+) (Larpent et Larpent, 1997 ; Larpent, 2000). Ils sont, souvent capsulés, chimioorganohétérotrophe à métabolisme habituellement fermentatif où les sucres sont consommés sans formation des gaz (Singleton, 2005).

Ce genre rassemble la plupart des espèces du groupe sérologique D et comprend notamment les espèces anciennement désignées sous le terme "streptocoques fécaux". Ils se caractérisent par leur développement à 10 et 45 °C, leur aptitude à croître en présence de 6,5 de Na Cl, et à pH 9,6, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement. Leur habitat est très varié : intestin de l'homme et des animaux, produits végétaux, sol, produits laitiers (Sutra et al., 1998; Pilet et al., 2005).

Au sein des bactéries lactiques, les *Enterococcus* sont parfois utilisés comme indicateur de contamination fécale dans les aliments (Pilet et al., 2005).



Photo 05 : Le genre *Enterococcus* (Sutra et al., 1998).

L4.6. Le genre *Streptococcus*

Les bactéries de ce genre sont des cellules ovoïdes, sphériques ou quelquefois allongées en fuseaux ; elles se divisent sur un seul plan pour former des paires ou des chaînettes. Elles fermentent les glucides en produisant presque exclusivement de l'acide lactique dextrogyre (leclerc, 1994). Ce genre comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *St. pyogene* et *St. agalactie* ; d'autres sont impliqués dans la formation de la plaque dentaire (*St. mutans*) (Sutra et al., 1998; Pilet et al., 2005).

Les *Streptococcus* comprennent les streptocoques des groupes A et B ainsi que les pneumocoques, leur classification peut recourir à deux types de critères :

- selon l'hémolyse induite par les cultures dans un milieu enrichi en sang ;
- selon la structure antigénique du polysaccharide C de la paroi (Carip, 2008.a).

L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (produits laitiers), et son caractère non pathogène. Du fait de ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme appartenant aux bactéries lactiques (streptocoques lactiques) (Sutra et al., 1998; Pilet et al., 2005).



Photo 06 : Le genre *Streptococcus* (Carip, 2008).

1.4.7. Le genre *Carnobacterium*

Le genre *Carnobacterium* hétérofermentaire (bien que *C. divergens* soit considéré comme homofermentaire), produit de l'acide lactique L (+). La croissance est possible à 0 °C et 10 °C mais pas à 45 °C (Larpent, 1991).

Les *Carnobacterium* isolés à partir des produits carnés sont des bactéries lactiques décrites comme des *Lactobacillus* atypiques, peu acidifiants et psychrotrophes. Une étude taxonomique de ces différentes souches a permis de les regrouper après hybridation ADN-ADN dans ce nouveau genre. Morphologiquement proches des *Lactobacillus* (parfois bacilles très courts), ils se différencient par leur tendance psychrotrophe et leur production majoritaire de l'isomère L de l'acide lactique. De même, leur peptidoglycane est constitué d'acide méso-diaminopimélique alors qu'il est caractérisé par le dipeptide Lys-Asp. chez la plupart des *Lactobacillus*.

Ce groupe comprend quatre espèces, *C. piscicola*, *C. mobile*, *C. divergens* et *C. gallinarum*. Ils sont isolés de produits carnés ou de produits de la mer, mais également du contenu intestinal ou tissu rénal des salmonidés (Sutra et al., 1998; Pilet et al., 2005).

Certains ont également été isolés des fromages. Les *Carnobacterium* n'interviennent pas dans les fermentations alimentaires, ils tolèrent difficilement un pH inférieur à 5, en revanche, ils sont souvent producteur des substances inhibitrices (Pilet et al., 2005).



Photo 07 : Le genre *Carnobacterium* (Sutra et al., 1998).

I.4.8. Le genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* a été décrit en 1901 pour regrouper des bactéries à Gram positif isolées de produits laitiers et à métabolisme fermentaire. Ces bactéries possèdent la capacité de produire de l'acide lactique comme métabolite final, et sont classées dans le groupe des bactéries lactiques (ADIV/OFIVAL, 2004).

I.5. Rôle et intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques possèdent un statut GRAS (Generally Recognized As Safe) qui autorise officiellement leur usage dans les applications alimentaires et qui témoigne de leur parfaite innocuité. Elles sont utilisées pour la préservation des aliments ainsi que pour l'amélioration de leurs qualités structurales et organoleptiques (Rigaux, 2008).

Cependant, l'importance des bactéries lactiques est considérable, aussi bien en alimentaire que dans la santé pour plusieurs raisons (Dolyers, 2003) :

- Production d'acide et abaissement du pH qui favorise la conservation ;
- Protection des produits alimentaires par l'inhibition des bactéries de putréfaction en milieu acide, par production des facteurs antimicrobiens tel que les bactériocines, les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène ;
- Etablissement des conditions physicochimiques favorables aux diverses transformations dans l'industrie laitière et fromagère : égouttage de caillé ;
- Fermentation lactique avec aromatisation du produit ; permettant l'obtention des produits acides ayant une saveur recherchée tel que les crèmes, les beurres et les yaourts ;
- Production d'agents épaississants qui donnent au produit une certaine viscosité, c'est le cas des yaourts brassés ;
- Contribution à la protéolyse des produits ; particulièrement lors de l'affinage des fromages ;
- Production industrielle d'acide lactique ;
- L'utilisation de certaines souches comme probiotiques.

I.6. Les lactobacilles

I.6.1. Définition

Le nom *Lactobacillus*, a été proposé par Beijerinck en 1882 (German et Lambin, 1969 ; Perry et al., 2004). C'est le genre le plus grand de l'ordre de *Lactobacillales*. Il constitue aussi le principal genre de la famille *Lactobacillaceae* avec près de 80 espèces qui sont des agents de fermentation lactiques intervenant dans beaucoup d'industries et qui sont aussi rencontrés comme contaminants (Prescott et al., 2007.a).



Photo 08 : Le genre *Lactobacillus*

I.6.2. Habitat

Les *Lactobacillus* se trouvent à la surface des plantes, dans les produits laitiers, les viandes, l'eau, la bière (Singleton, 1999 ; Prescott et al., 2007.a. ; Dellaglio et Felis, 2008). Ils sont présents naturellement chez l'homme et l'animal et constituent la flore autochtone dominante de la partie supérieure du tractus intestinal (ADIV/OFIVAL, 2004 ; Dellaglio et Felis, 2008).

Par exemple, il a été trouvé dans :

- ✓ la cavité orale : *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus* et *Lb. brevis*.
- ✓ le tractus intestinal : *Lb. acidophilus*, *Lb. Casei*, *Lb. plantarum* (homme).
- ✓ le vagin : *Lb. acidophilus*, *Lb. salivarius*, *Lb. casei rhamnosus*, *Lb. cellobiosus*.
- ✓ les produits laitiers : fromages (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*), fromages à pâte cuite (*Lb. helveticus* et *Lb. lactis*).
- ✓ Les laits fermentés : yaourt (*Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus*), kéfir (*Lb. cellobiosus*, *Lb. brevis*).
- ✓ plantes : ensilage (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*), légumes fermentés (*Lb. plantarum* et *Lb. brevis*).
- ✓ boissons : fermentation malolactique (*Lb. hilgardii*)
- ✓ produits fermentés du soja : *Lb. acidophilus*, *Lb. cellobiosus* et *Lb. plantarum* (Larpent, 1985).

I.6.3. Caractéristiques des *Lactobacillus*

Les *Lactobacillus* sont caractérisés avant tous par la fermentation lactique. Selon cette caractéristique, ils peuvent être classés en deux catégories selon qu'ils convertissent le glucose en quasiment en acide lactique ou en proportion équivalente avec d'autres métabolites : les homofermentaires et les hétérofermentaires (Leclerc, 1994).

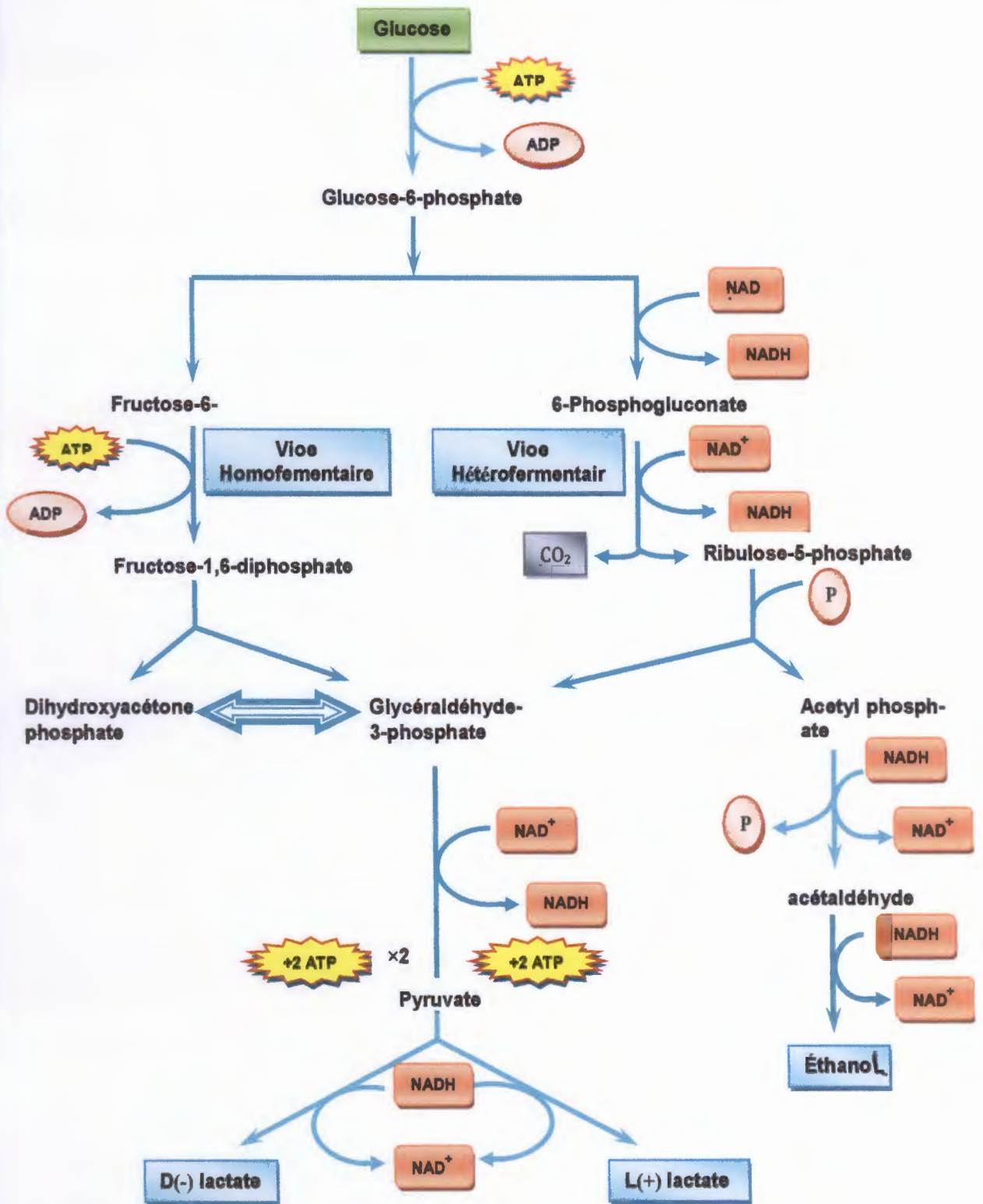


Figure 02 : schéma succinct des principales voies fermentaires des *Lactobacillus* (Larpent, 1991; Perry et al.,2004)

Les *Lactobacillus* sont très saccharolytiques, certaines espèces sont amylolytiques, libérant de l'acide lactique D, L ou DL (Larpent et Larpent, 1997) ; dont la forme optique est déterminée par la stéréospecificité de l'enzyme : lactate déshydrogénase (LDH) et par la présence (ou l'absence) d'un lactate racémase (Leclerc, 1994). Ils sont acidophiles, généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques (Guiraud, 2003; Guiraud et Rosec, 2004). Ils ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, acides gras, vitamines, nucléotides, peptides et glucides (Leclerc, 1994; Prescott et al., 2007.a.); ces exigences, souvent spécifiques à l'espèce, sont mises à profit pour le dosage des facteurs de croissance dans les produits alimentaires (Leclerc, 1994).

Les *Lactobacillus* ont des aspects variés : bacilles longs et fins, bâtonnets courts ou légèrement, flexueux coccobacilles fréquemment en chaînettes (Leclerc, 1994; Larpent et Larpent, 1997; Larpent, 2000; Singleton, 2005). Ils sont Gram positifs, non sporogènes, indole et H₂S négatifs, ils ne réduisent généralement pas les nitrates, ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent ni catalase ni cytochrome (Leclerc, 1994; Larpent et Larpent, 1997; Larpent, 2000; Joffin et Leyral, 2001; Singleton, 2005). Ils sont pourtant capables d'oxydation limitée grâce à leurs enzymes flavoprotéiniques et produisant du peroxyde d'hydrogène en anaérobiose.

Les *Lactobacillus* sont habituellement immobiles ou quelquefois mobiles par cils péritriches (Leclerc, 1994), microaérophiles et leur croissance en surface sur les milieux solides est favorisée en anaérobiose ou par une pression d'oxygène réduite et par une concentration de 5 à 10 % de CO₂ (Leclerc, 1994; Larpent et Larpent, 1997). Ils sont mésophiles ou thermophiles modérés mais certaines espèces comme *Lb. viridescence* et *Lb. plantarum* peuvent se multiplier lentement à température de réfrigération, ils se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40 °C (Leclerc, 1994). Ces bactéries croissent à des pH plus bas que les streptocoques ; elles ne se développent pas pendant les premiers stades de la fermentation, mais seulement quand le pH atteint 5,5 à 6,0. À leur tour elles continuent à produire de l'acide lactique et abaisser le pH au dessous de 5,0. Ceci élimine efficacement le genre *Streptococcus* (Perry et al., 2004), leur GC % est compris entre 32 et 53 selon les espèces (Leclerc, 1994).

L6.4. Classification des *Lactobacillus*

L'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S montre que Les *Lactobacillus* sont étroitement apparentés à d'autres genres de bactéries lactiques comme les *Pediococcus*, les *Leuconostoc* et les *Streptococcus*. Ils sont par contre faiblement apparentés à d'autres *Lactobacillus* atypiques isolés de la viande de poulet et rassemblés actuellement dans le genre *Carnobacterium*. De gros progrès sont encore à attendre pour qu'une classification cohérente soit établie en tenant compte à la fois des données phylogénétiques et des caractéristiques de fermentation. En attendant la classification d'Orla-Jensen (1943) modifiée par Kandler et Weiss (1986) reste en vigueur. Elle est basée sur la fermentation lactique et ses variantes métaboliques (Leclerc, 1994).

Le genre de *Lactobacillus* est divisé en trois sous-genres, les *Thermobacterium* (groupe I), les *Streptobacterium* (groupe II) et les *Betabacterium* (groupe III) (Leclerc, 1994; Larpent et Larpent, 1997; Sutra et al., 1998). Le premier groupe est très recherché sur le plan technologique pour diriger la fermentation, baisser le pH des produits et pour sécuriser les produits fermentés. Contrairement aux deux autres groupes qui sont à l'origine des altérations (ADIV/OFIVAL, 2004); à savoir :

▪ **Le groupe I** : comprend les espèces strictement homofermentaires qui produisent plus de 85 % d'acide lactique à partir du glucose et qui sont incapables de fermenter les pentoses ou le gluconate (Leclerc, 1994; Larpent et Larpent, 1997; Sutra et al., 1998; Guiraud, 2003; Guiraud et Rosec, 2004). Elles possèdent un fructose 1,6-diphosphate aldolase et une phosphofruktokinase (Larpent et Larpent, 1997). Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces dont la plupart sont présentes chez l'homme et les animaux et participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme (Sutra et al., 1998); les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont : *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. lactis*, *Lb. leichmanii*... (Guiraud, 2003; Guiraud et Rosec, 2004).

▪ **Le groupe II** : est celui des espèces à métabolisme fermentaire facultatif et majoritairement mésophiles qui se développent à 15 °C (Larpent, 1996; Sutra et al., 1998; Guiraud, 2003; Guiraud et Rosec, 2004); elles ont une forte activité fructose 1,6-diphosphate et une 6-phospho-gluconate déshydrogénase (Larpent et Larpent, 1997). Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus* et *Lb. plantarum*, isolées dans les fourrages, les produits laitiers et les produits carnés (Sutra et al., 1998).

▪ **Le groupe III** : héberge les espèces hétérofermentaires obligées qui forment des quantités équimolaires de CO₂, d'acide lactique, d'acide acétique et / ou d'éthanol. Les pentoses sont fermentés en acides lactique et acétique par la voie de la phosphocétolase (Leclerc, 1994); car ces bactéries possèdent une phosphocétolase mais pas d'aldolase (Larpent et Larpent, 1997).

Il rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco* qui font partir de la flore des levains de panification, et *Lb. kefir* isolé de grains de kéfir (Pilet et al., 2005). 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 (Sutra et al., 1998). Le tableau ci-après montre les critères différentiels de trois groupes de *Lactobacillus*.

Tableau II : les critères différentiels de trois groupes de *Lactobacillus* (Larpent, 1991; Larpent et Larpent, 1997; Corriau et Luquet, 2008).

	<i>Thermobacterium</i>	<i>Streptobacterium</i>	<i>betabacterium</i>
ADH	-	±	+
Glucose (gaz)	-	-	+
Glucosides	±	+	-
Gluconate (gaz)	-	+	+
Aldolase	+	+	-
Pentose	-	±	±
Acide lactique	DL ou L	D ou DL	DL
G + C %	34,7-50,8	33-46,5	35-53,4

I.6.5. Rôle des *Lactobacillus*

L'acidification qui suit leur multiplication est antagoniste pour les autres espèces, exception faite d'autres bactéries lactiques ou des levures ; en ce sens ils constituent des flores de barrière chez l'homme ; ils sont aussi d'une aide précieuse dans la technologie des aliments (Leclerc, 1994).

L6.5.1. Produits alimentaires

Les *Lactobacillus* sont recherchés en technologie alimentaire pour leurs propriétés acidifiantes et leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des micro-organismes pathogènes ou d'altération (Larpen et Larpen, 1997). Ils interviennent aussi bien dans la production que dans l'altération de nombreux produits alimentaires (Leclerc, 1994). Selon leurs activités métaboliques.

L6.5.1.1. Rôle positif ou technologique

Il s'exerce principalement dans les produits fermentés avec des conséquences sur l'ensemble des facteurs de qualités (Sutra et al., 1998).

A- Produits laitiers

Les *Lactobacillus* sont utilisés comme starter pour la fabrication fermentative des laits fermentés et des fromages (Leclerc, 1994; Larpen et Larpen, 1997; Carip, 2008). En effet, ils participent à l'élaboration de l'arôme et de la texture du produit (Larpen et Larpen, 1997); les exopolysaccharides synthétisés par lesquels participent à la viscosité du yaourt et des autres produits laitiers fermentés. En France, *Lb. bulgaricus* est, avec *Streptococcus thermophilus* la seule souche admise comme agent de fermentation du yaourt (Carip, 2008.a.). Dans les fromage à pâte cuite, les *Lactobacillus* importants sont *Lb. lactis* et *Lb. helveticus* (Sutra et al., 1998; Larpen et Larpen, 1997). Les souches utilisées (*Lb. fermentum*, *Lb. buchnerii*) génèrent des métabolites de fermentation hétérolactique qui contribuent aux qualités organoleptiques des fromages (ester éthylique de l'emmental) et /ou favorisent la protéolyse des protéines du lait (fromage de brebis ou de chèvre) (Carip, 2008.a.).

B- Produits végétaux

Les *Lactobacillus* interviennent dans la fermentation lactique de nombreux végétaux (Larpen et Larpen, 1997). Par exemple, dans la fermentation des cornichons, ceux-ci sont placés dans une cuve avec une petite quantité de sel et d'aromates. Ils sont alors recouverts de l'eau et incubés à température ambiante. Au début, les organismes aérobies et aérobies facultatifs se développent, et à cause de la respiration aérobie ils éliminent l'oxygène libre de l'eau de la cuve. En peu de temps, la jarre devient anaérobie, et les sucres des plantes commencent à se fermenter.

La fermentation initiale est réalisée par le genre *Streptococcus* car il se développe à des valeurs de pH plus élevées que le genre *Lactobacillus*, le pH est abaissé par ce groupe jusqu'à atteindre 5,5 à 6,0, niveau à partir duquel Les *Lactobacillus* ssp. Commencent à croître. Ils fermentent les sucres restant, et abaissent encore d'avantage le pH, jusqu'à 4,5. Tant que les conditions restent anaérobies, le matériel végétal est parfaitement conservé grâce au faible pH de l'acide lactique. Le même protocole est suivi par les fabricants de choucroute (Perry et al., 2004).

De même en agriculture, l'ensilage, la méthode traditionnelle de conservation du fourrage (Singleton, 1999), est réalisé par *Lb. plantarum* (Larpen et Larpen, 1997; Carip, 2008.a.). Cette méthode consiste à placer le foin à un taux d'humidité appropriée, dans des silos ou, plus récemment dans de très grands sacs en plastique pour empêcher l'accès du l'air et à le laisser fermenter (Perry et al., 2004). L'acide lactique produit abaisse rapidement le pH, inhibant ainsi les organismes (en particulier *Clostridium* spp.) qui, sans cela, provoqueraient

de la putréfaction ; l'acidité aide aussi à inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes* (Singleton, 1999).

C- Produits carnés

Les *Lactobacillus* interviennent comme agent de fermentation dans les préparations des viandes salées, épicées et ne subissant aucun traitement thermique d'assainissement, comme les saucisson (Sutra et al., 1998), dont Les espèces importantes sont *Lb. sake*, *Lb. curvatus* et *Lb. plantarum* (Larpen et Larpen, 1997; Sutra et al., 1998). Des *Lactobacillus* font partie de la surface des carcasses, ils se développent peu sur la viande fraîche par apport aux autres bactéries contaminantes (Sutra et al., 1998), mais ils deviennent la flore dominante des viandes conservées sous vide (Larpen et Larpen, 1997).

D- Panification

Le goût caractéristique du pain au levain est du à la fermentation lactique bactérienne (Perry et al., 2004; Prescott et al., 2007.b.), qui permet aussi l'amélioration de leur saveur; le CO₂ produit lors de la fabrication du pain le rend moelleux et léger (Godet et al., 2007). Les levains de panification sont constitués d'une flore sauvage issue de la farine. Elle comprend des levures qui assurent la fermentation, mais également une flore bactérienne variée, au sein de laquelle les bactéries lactiques sont largement représentées. Les *Lactobacillus* sont majoritaires, avec les espèces *plantarum*, *brevis*, *casei* ou *sanfransisco* (Sutra et al., 1998). Le tableau suivant récapitule la participation des *Lactobacillus*, à coté des bactéries lactiques, aux produits fermentés.

Tableau III : la participation des *Lactobacillus* aux produits fermentés (Sutra et al., 1998).

Produit		<i>Lactobacillus</i>	Principales activités	Origine
Laits fermentés	yaourt	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	acidification, texture, arômes (acétaldéhyde)	ferment
	kéfir	<i>Lb. brevis</i>	acidification, texture, arômes	flore naturelle
fromages	A pâte pressée cuite (gruyère, emmental)	<i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Acidification, production d'acide lactique utilisé par les bactéries propioniques / protéolyse	ferment
Produits carnés : saucisson		<i>Lb. sake</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i>	acidification, arômes	ferment
Levains de panification		<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. brevis</i>	acidification (acide lactique et acétique)	flore naturelle
Choucroute et légumes fermentés		<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. brevis</i>	acidification	flore naturelle

I.6.5.1.2. Rôle négatif

Il se traduit essentiellement par l'altération des denrées concernées, qu'elles soient ou non fermentées, par la production des métabolites (Sutra et al., 1998).

A- Altérations liées à la production d'acide lactique

Le lait, est facilement contaminé par les *Lactobacillus* au cours de son traitement, peut s'altérer au cours d'un stockage prolongé (Leclerc, 1994). Les altérations se manifestent dans le lait cru, en cas de maintien à température ambiante ou rupture de la chaîne de froid.

L'acidification qu'elle soit trop poussée ou trop lente, est à l'origine de défaut de qualité de certains produits fermentés :

- l'acidification trop marquée : est nuisible à l'affinage de certains fromages et à la qualité de yaourt par exemple ;
- l'acidification trop faible ou trop lente provoque notamment pour les fromages un égouttage insuffisant, un risque de contamination par d'autres flores ou un excès de lactose avec un risque de post-acidification ; entraînant des conséquences sur les qualités technologiques, organoleptiques et sanitaires du produit fini.

Pour les produits carnés sous vide ou saumurés, l'acidification très poussée, ou non contrôlée, contribue au développement de goûts et d'odeurs acides, et d'accident de fabrication lors de la production des saucissons.

B- Altérations liées à la production des polysaccharides


Des *Lactobacilles* produisent des polysaccharides qui sont responsables de la formation de films muqueux en surface des produits carnés conservés sous vide ou de produits de salaison comme le jambon. Des dextrans ou glucanes synthétisés pendant la fermentation malolactique sont également à l'origine d'altération du vin en lui conférant un aspect filant et huileux (Sutra et al., 1998). De même une forte production de polysaccharides masque la saveur et les arômes et peut produire un yogourt filamenteux (Bergmaier, 2002).

C- Altérations liées à la production des gaz

Cette production est caractéristique des *Lactobacillus* hétérofermentaires (Sutra et al., 1998; Vignola, 2002.a.), son effet sur l'altération peut être sensible dans le cas des viandes conservées où la production de CO₂ par ces bactéries provoque des défauts d'aspect (gonflement de conditionnement).

D-Altérations liées à la production de peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit par les *Lactobacilles* hétérofermentaires peut s'accumuler dans certaines conditions et réagir avec les pigments de la viande pour former une porphyrine, il s'en suit un verdissement observé sur des produits conservés sous vide (Sutra et al., 1998). Le tableau ci-dessous résume les principaux rôles des *Lactobacillus* dans les aliments.



Chapitre II
les probiotiques

II. Les probiotiques

II.1. Historique et définition

Depuis au moins 4000 ans, l'homme utilise des microorganismes pour transformer ses aliments afin d'en modifier la valeur et de mieux les conserver. Ce n'est qu'à l'époque pasteurienne qu'il a pris conscience du monde bactérien et que Metchnikoff écrivait en 1907 que le yaourt prolongeait la durée de la vie humaine (Roberfroid et al., 2008).

Le terme probiotique est proposé par Parker (1974) pour désigner des préparations à base de microorganismes vivants, consommées par voie orale par l'homme ou les espèces animales, exerçant une influence favorable sur la santé du consommateur et sur sa flore digestive (Arian et al., 2003).

Le mot "probiotique" dérive des deux mots grecs « pros » et « bios » qui signifient littéralement « pour la vie » contrairement au terme antibiotique signifiant « contre la vie » (Amrouche, 2005).

Les définitions du terme probiotique ont évolué avec le temps et en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. Le mot probiotique n'a été inventé qu'en 1965 par Lilly et Stillwell et à partir des travaux de Teissier, en 1906 et de Metchnikoff, en 1908, l'idée que des bactéries ingérées vivantes pouvaient avoir un effet bénéfique a été développée.

En 1974, Parker choisit d'élargir la définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». Cependant, Fuller (1991) reprocha à cette nouvelle définition d'inclure potentiellement les antibiotiques et proposa alors : « des microorganismes ajoutés à l'alimentation et influençant de manière bénéfique l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » (Luquet et Corriau, 2005).

La définition retenue par la FAO en 2001, précise que se sont des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte ».

Dans le cadre d'un aliment probiotique, la définition devient : « un aliment contenant des microorganismes vivants en quantité suffisante, jusqu'à la fin de la durée de conservation du produit, exerçant des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte » (Luquet et Corriau, 2005).

II.2. Les principaux groupes de probiotiques

Les bactéries productrices d'acide lactique comme *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les principales espèces présentes sur le secteur des probiotiques alimentaires, mais la levure *Saccharomyces cerevisiae* et quelques espèces de *E. coli* et de *Bacillus* sont également utilisées comme probiotiques (Guarner et al., 2008; Fioramonti, 2006).

Il existe 4 grands groupes de probiotiques :

II.2.1. Les bactéries lactiques

Depuis très longtemps, les bactéries lactiques sont consommées dans les produits fermentés (produits dérivés du lait, de la viande et du poisson, le vin, la bière, le pain, les produits

Tableau V : les micro-organismes employés comme probiotiques chez l'homme ou chez les animaux d'élevage (Dacosta, 2001).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques ou pseudo-lactiques	Bactéries non Lactiques, levures et moisissures
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Lb. gallinarum</i>	<i>B. thermophilus</i>		
<i>Lb. gasseri</i>			
<i>Lb. johnsonii</i>			
<i>Lb. lactis</i>			
<i>Lb. paracasei</i>			
<i>Lb. plantarum</i>			
<i>Lb. reuteri</i>			
<i>Lb. rhamnosus GG</i>			
<i>Lb. salivarius</i>			

II.3. Probiotiques et alicaments

Les néologismes « alicament » désigne la contraction d'aliment et médicament et son équivalent « nutraceutique » désigne la contraction de nutriment et pharmaceutique (Fulet et al., 2008; Branger et al., 2007).

Le terme d'aliment est toute substance ou produit, traité ou brut, destiné à être ingéré par l'homme, intégré dans un aliment ou isolé comme un complément de l'alimentation courante (Branger et al., 2007). Ce terme a été introduit à la fin du XXe siècle pour désigner des aliments ou composants alimentaires ayant des propriétés curatives ou préventives de certaines maladies (Marteau et Sksik, 2005)

II.4. Propriétés et critères de sélection des probiotiques

Le tractus intestinal humain contient une série de lactobacilles et de bifidobactéries adaptés à son écosystème. Quand ces bactéries sont utilisées pour l'acidification du lait, elles parviennent sous une forme viable dans le tractus intestinal, n'y sont pas endommagés par les sels biliaires et peuvent déployer leur activité métabolique, c.-à-d. avoir une action probiotique (Zdenko, 2008).

Selon la définition donnée aux probiotiques ; ceux-ci doivent être vivants dans le produit consommé. Ils doivent donc :

- ✓ survivre aux traitements technologiques que va subir le produit vecteur ;
- ✓ rester stables lors de la conservation du produit.

Selon la FAO les tests clefs utilisés in vitro pour étudier la potentialité des souches probiotiques sont : (Normand et al., 2006).

- ✓ la résistance à l'acidité gastrique ;
- ✓ la résistance à la bile ;
- ✓ adhésion au mucus ou aux cellules épithéliales à réduire l'adhésion pathogène ;
- ✓ activité antimicrobienne contre des bactéries potentiellement pathogènes ;
- ✓ activité d'hydrolyse des sels biliaires ;
- ✓ activité immunomodulatrice.

II.4. 1. La résistance aux conditions rencontrées au cours du transit digestif

Les bactéries probiotiques, pour être efficaces doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin, et donc résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte.

Les bactéries étant administrées par voie orale, il est nécessaire qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif, ainsi elles doivent donc résister aux enzymes présents dans la cavité buccale dont le principale est le lysozyme, à l'acidité de l'estomac et aux sucs pancréatiques, aux concentrations de bile et aux mucus présentes dans l'intestin grêle (Farineau, 2001).

Le tableau suivant (VI), renseigne sur la détection dans l'intestin de micro-organismes exogènes ingérés.

Tableau VI : la détection dans l'intestin de micro-organismes exogènes ingérés (Dacosta, 2001)

Micro-organismes	Jéjunum	Iléon	Fèces
<i>Streptococcus thermophilus</i>	+	-	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	+	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	+	+
<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	+		+
<i>Bifidobacterium spp</i>	++	++	++
<i>Enterococcus faecium</i>	+		+
<i>Saccharomyces boulardii</i>			+

II.4.2. Colonisation du tractus digestif et adhésion aux cellules intestinales

La capacité des souches à adhérer à la muqueuse gastro-intestinale est un des principaux critères de sélection des bactéries probiotiques. Il est largement accepté que plus une bactérie passe du temps dans le tractus gastro-intestinal plus elle aura de chance d'exercer un effet pour l'hôte.

L'adhésion est importante pour l'immunomodulateur, car seul les bactéries adhérentes sont en contact avec les cellules immunes de l'épithélium. Elle est également importante pour l'amélioration de la cicatrisation de la muqueuse gastrique, effet pour lequel la colonisation est nécessaire, ainsi que pour le déplacement et l'inhibition des pathogènes (Metlef, 2009).

Il est intéressant que les souches probiotiques puissent adhérer aux cellules de la paroi intestinale, ceci facilitait une bonne colonisation du tube digestif par les probiotiques (Farineau, 2001).

La figure 03 représente l'adhésion de diverses bactéries au mucus humain en provenance de diverses catégories d'âge, valeurs en pourcentages de cellules adhérant après lavage (Dubach A., 2002).

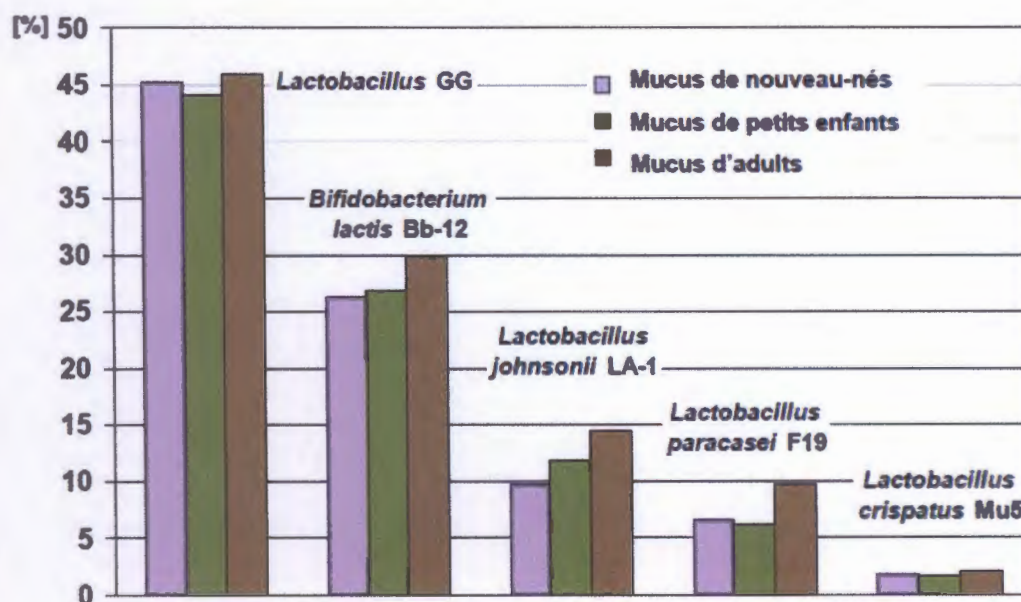


Figure 03 : adhésion de diverses bactéries au mucus humain en provenance de diverses catégories d'âge, valeurs en pourcentages de cellules adhérant après lavage. ((Dubach A., 2002).

II.4.3. Activité antimicrobienne

Il est important que Les bactéries probiotiques soient aptes à inhiber le développement des germes indésirables soit :

- ✓ par la production de substances antagonistes de type bactériocines ou autres tels que les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène ;
- ✓ en empêchant l'adhésion des germes pathogènes aux cellules de la paroi intestinale ; l'emploi des probiotiques réduit la colonisation du tractus digestif par les *Clostridium jejenum*

II.4.4. Origine humaine

Ce paramètre fait encore l'objet de nombreuses discussions parmi les scientifiques.

Les bactéries, comme n'importe quel autre être vivant, sont bien adaptées à leur environnement spécifique.

Les cultures lactiques par exemple, connaissent une croissance optimale à une température comprise entre 40°C et 42 °C, ne résistent pas au passage dans l'estomac, sont tuées par les sels biliaires, et sont incapable de s'établir dans le tube digestif. A l'opposé, les souches d'origine humaine poussant à 37°C, sont résistantes aux acides et aux sels biliaires, et en générale pouvant s'établir au moins transitoirement dans l'intestin humain (*codex alimentarius commission*).

II.5. Propriétés technologiques

L'ajout de probiotiques aux aliments représente un certain nombre de défis. Tout d'abord, il faut bien choisir la souche. Outre le choix de la vertu santé en soi, ce choix repose sur plusieurs critères technologiques (Vignola, 2002).

Le tableau (VII) ci-après présente quelques critères technologiques dans la sélection de culture probiotique.

Tableau VII : Quelques critères technologiques dans la sélection de cultures probiotiques utilisées dans la production laitière (Vignola, 2002).

Critères	produits
Stabilité des cultures sous forme congelée ou lyophilisée.	Culture pour tous les produits.
Croissance dans le lait.	Fromage, lait « Acidophilus », yogourt.
Production à large échelle (cuves à ferment).	Produits fabriqués dans des usines à grand volume, comme les fromageries.
Compatibilité avec les cultures lactiques « technologique ».	Tous les produits laitiers fermentés.
Stabilité durant l'entreposage en conditions acides.	Fromage, lait « Acidophilus », yogourt.
Stabilité durant l'entreposage dans des laits non fermentés.	lait « Acidophilus » doux.
Résistance aux bactériophages.	Tous les produits fermentés.
Survie à la congélation dans des mélanges laitiers.	Crème glacée, yogourt glacé.
Stabilité durant l'entreposage à -20°C	Crème glacée, yogourt glacé.
Propriétés sensorielles.	Tous les produits.
Tolérance à l'O ₂ .	Tous les produits.
Faible activité métabolique à 15°C.	Tous les produits frais.
Croissance à 15°C.	Certains fromages affinés.

II.6. Mécanisme d'action des probiotiques

Les probiotiques affectent les bactéries intestinales en augmentant le nombre de bactéries anaérobiques bénéfiques et en diminuant la population des microorganismes potentiellement pathogènes. Ils affectent l'écosystème intestinal, les mécanismes immunitaires de la muqueuse en stimulant les mécanismes non immunitaires par une compétition de pathogène potentiellement antagonistes (De vuyst, 2004 ; Guarner *et al.*, 2008).

Les effets des probiotiques seraient d'ordre :

- ✓ nutritionnel et métabolique (amélioration de la digestion des glucides et des protéines, apport minéraux et vitaminique) ;
- ✓ prophylactique et thérapeutique (effet hypocholestérolémiant, prévention des diarrhées infantiles et des cancers coliques) (Bousseboua, 2005).

II.6.1. Effets nutritionnels

II.6.1.1. Amélioration de la digestibilité de la ration alimentaire

Les probiotiques permettent d'améliorer la digestibilité de nombreux nutriments. Leur rôle essentiel est de garantir une bonne hygiène digestive en favorisant la dégradation et l'adsorption de certains aliments (Robin et Rouchy, 2001. Monnol et Richmond, 2007).

A. Le lactose

Le premier effet démontré avec un haut niveau de preuve a été l'amélioration de l'intolérance au lactose et de la malabsorption de ce sucre par des bactéries lactiques. Les premiers essais ont montré que les sujets intolérants au lactose toléraient le plus souvent le yaourt qui pourtant contient bien du lactose.

Trois explications sont possibles à cet effet clinique :

- ✓ une action de la lactase véhiculée par les probiotiques dans l'intestin ;
- ✓ une stimulation de la lactase intestinale humaine résiduelle par les probiotiques en transit ;
- ✓ Un ralentissement du transit intestinal ou de la vidange gastrique permettant une meilleure digestion du lactose humaine résiduelle (Drouault et Corthier, 2001; Luquet et Corriau, 2005 ; Bolcé et thomann, 2005).

B. Les protéines

Le yaourt est plus digeste que le lait non fermenté et contient deux fois plus d'acides aminés libres. Cette propriété résulte du traitement thermique, de l'acidification, et de l'activité protéolytique des bactéries (Jeantet, 2008). Les probiotiques permettent aussi d'améliorer l'assimilation des acides aminés essentiels pour l'hôte en inhibant l'action destructrice des désaminase et des décarboxylases bactériennes excrétés par la microflore du tube digestif. De même, les probiotiques peuvent synthétiser des acides aminés essentiels (Robin et Rouchy, 2001).

Chez l'homme sain volontaire, un lait fermenté (yaourt) retarde, par rapport à un lait non fermenté, la vidange gastrique de l'azote sans modifier le haut niveau d'hydrolyse des protéines ni le taux d'absorption de N15 ni la sécrétion intestinale endogène d'azote. Le retard de vidange gastrique et de l'apport d'azote peut être néfaste chez le sujet âgé, chez lequel il faut au contraire apporter le maximum d'azote le plus vite possible, pour des problèmes d'accélération digestive et de montée rapide des acides aminés sériques (Cristoph et Thomann, 2005).

C. La matière grasse

Bien que l'activité lipolytique des bactéries lactiques soit peu élevée, il y a une augmentation significative de la teneur en acides gras libres dans le yaourt (Jeantet, 2008).

D. Les minéraux et les vitamines

Il semblait que la biodisponibilité des minéraux notamment celle du calcium, du fer, du zinc, du manganèse, du cuivre et du phosphore soit augmentée dans les produits laitiers fermentés par rapport à celle du lait. Les *Lactobacillus* sont capables, dans certains cas, de synthétiser des vitamines (B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12). Les produits fermentés contiennent donc une quantité élevée de vitamine et de minéraux facilement assimilables par l'organisme (Robin et Rouchy, 2001).

II.6.1.2. Neutralisation des produits toxiques

Le rôle des probiotiques a été démontré dans la neutralisation des produits toxiques. Ils provoqueraient une atténuation du catabolisme intradigestif et une orientation de la microflore intestinale pour réduire l'adsorption des substances toxiques (ammoniac, amines et indoles) et diminuer les biotransformation 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 certains toxiques bactériens (Robin et Rouchy, 2001).

II.6.2. Effets sanitaires

Suivant le rapport de la FAO : « les effets bénéfiques sur la santé pour lesquels les probiotiques peuvent être impliqués comprennent les infections gastro-intestinales, certains troubles intestinaux, l'allergie et les infections génito-urinaires, dont souffre une grande partie de la population mondiale ». Les probiotiques n'apportent pas forcément une amélioration directe de la santé par contre leur absence ou la faiblesse de leur nombre peut permettre à des agents pathogènes de coloniser tout ou partie de notre tube digestif (Farineau, 2001).

Les effets santé des probiotiques sont souvent immédiats contre certaines maladies répandues, dont le syndrome du colon irritable, la neutralisation de la virulence de plusieurs organismes pathogènes, la lutte contre les diarrhées et les flatulences en plus d'une action immunostimulante. Certaines y voient également des applications pour les soins corporel, incluant le traitement des caries dentaires, de la transpiration et de certaines affections cutanées (Macouze et Champagne, 2007).

Le tableau(VIII) illustre quelques effets bénéfique des probiotiques sur la sante.

Tableau VIII : Les probiotiques – Bienfaits potentiels pour la santé (Patterson, 2008).

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autres effets
Contrôle des troubles suivants : -Mauvaise digestion du lactose ; -Diarrhée ; -Syndrome du côlon irritable ; -Constipation ; -Infection par <i>Helicobacter pylori</i> ; -Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle ; -Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (colite ulcéreuse et maladie de Crohn) ; -Prévention de l'entérocolite nécrosant du nouveau-né.	-Modulation immunitaire ; -Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation ; -Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>).	Réduction du risque de : -Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein) ; -Coronaropathie ; -Maladie des voies urinaires ; -Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes ; -Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle.

II.6.2.1. Effet des probiotiques sur la flore intestinale

Les probiotiques modulent la composition et l'activité de la flore intestinale ; Ils ont une action protectrice en (Pallardy, 2006)

- limitant la colonisation, la reproduction et l'adhérence de bactéries pathogènes ;
- stabilisation de la flore intestinale par compétition avec des bactéries pathogènes ;
- stabilisation de la fonction barrière de la muqueuse intestinale ;
- modification de l'écologie intestinale ;
- diminution des diarrhées associées aux antibiotiques, diminution des diarrhées à rotavirus.

II.6.2.2. L'inhibition des bactéries indésirables

L'inhibition des bactéries indésirables ou pathogènes par les probiotiques peut se faire de différentes façons.

La production d'acides organiques (acide lactique ou acide acétique), abaisse le pH ce qui freine le développement des *Escherichia coli* et des *Salmonella*, la diminution de la concentration des bactéries coliformes dans le tube digestif serait due au pH très bas, obtenu grâce à l'apport de lait acidifié par de l'acide lactique.

En milieu humide, les lactobactéries produisent du peroxyde d'hydrogène inhibiteur de nombreuses souches bactériennes pathogènes, mais respectant l'écosystème des bactéries elles-mêmes. De plus, l'acidification favoriserait la régulation du transit intestinal.

Les probiotiques pourraient également limiter la croissance des bactéries pathogènes en produisant des substances antimicrobiennes, de type bactériocines. De même, certaines souches

utilisées comme probiotiques possèdent la capacité de déconjuguer les sels biliaires. Les formes déconjuguées ont un pouvoir inhibiteur plus important sur le développement des bactéries.

Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif par ailleurs ils entrent en compétition avec les pathogènes pour les sites d'adhérence. (Robin et Rouchy, 2001).

Le tableau (IX) résume les pourcentages d'inhibition par des *Lactobacillus acidophilus* LB, à la dose de 2.10^9 UFC/ml, de la fixation de six souches entérovirulentes sur des cellules caco-2 cultivées in vitro :

Tableau IX : pourcentages d'inhibition par des *Lactobacillus acidophilus* LB, à la dose de 2.10^9 UFC/ml, de la fixation de six souches entérovirulentes sur des cellules caco-2 cultivées in vitro : (Dacosta, 2001)

Souches entérovirulentes	% d'inhibition de la fixation
<i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes H10407	65%
<i>Escherichia coli</i> d'adhésion diffusec-1845	80%
<i>Escherichia coli</i> entéropathogènes jpN15	90%
<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1344	51%
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	80%
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> YPIII	95%

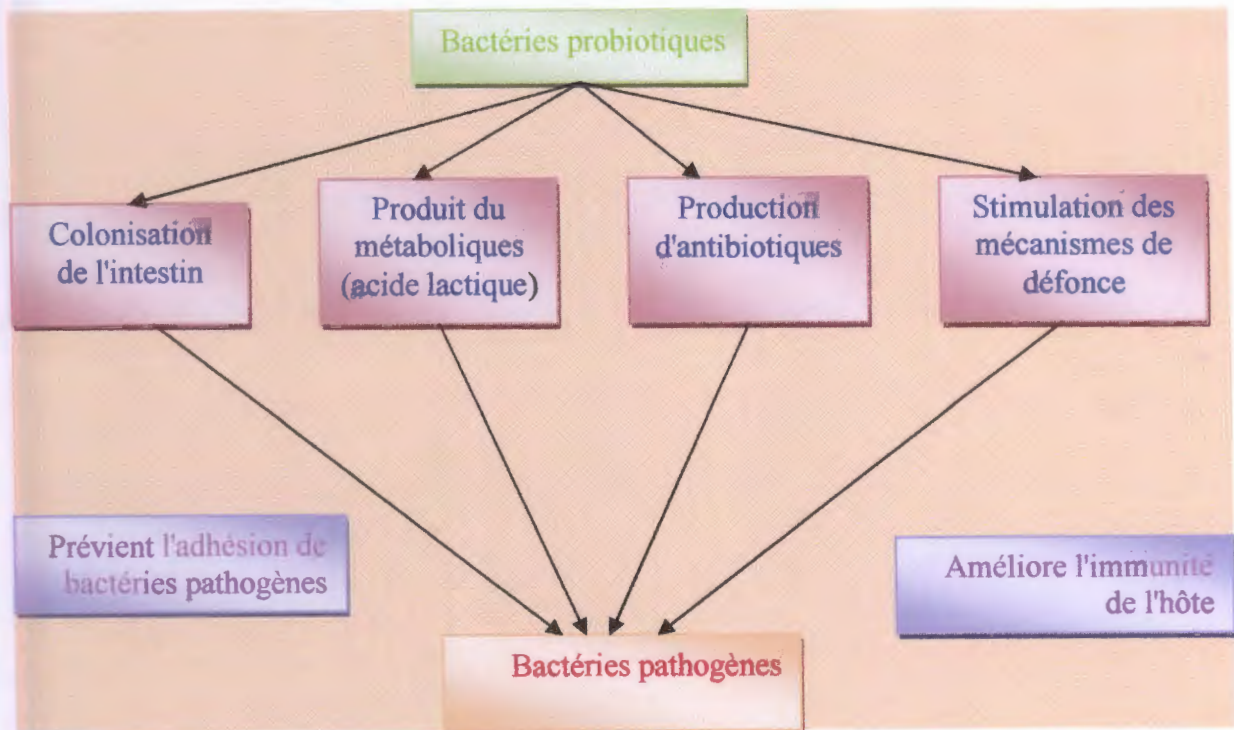


Figure 04 : Mécanismes d'action possible des bactéries probiotiques pour améliorer la résistance aux bactéries pathogènes (Anonyme, 2004).

II.6.2.3. Infection par *Helicobacter pylori* et complications

Récemment, on a découvert que les probiotiques sont actifs contre *Helicobacter pylori*, un agent pathogène Gram négatif responsable de la gastrite de type B, d'ulcères peptiques et du carcinome gastrique. Les données *in vitro*, des études sur les animaux indiquent que les bactéries lactiques peuvent inhiber la croissance des agents pathogènes et diminuer l'activité des uréases nécessaires pour que l'agent pathogène reste dans le milieu acide de l'estomac. Les données concernant l'homme sont limitées, mais il y a des preuves d'un effet induit par *L. johnsonii* La1 (Farineau ; 2001)

Plusieurs souches de lactobacilles et de Bifidobactéries tout comme *Bacillus clausii*, semblent réduire les effets secondaires des thérapies antibiotiques (Guarner et al, 2008). Elles agissent sur la viabilité de la bactérie et sur son adhérence aux cellules de la muqueuse intestinale (Allinset, 2007).

L'administration des souches de *Lactobacillus* les plus efficaces à des souris infectées par la bactérie *H. pylori* a permis d'observer une réduction de la quantité de bactéries infectieuses *H. pylori* dans l'estomac et un recul des gastrites engendrées par ces bactéries. (Proeuhealth et Propath, 2004).

II .6.2.4. Influence sur la réponse immunitaire

Ingérer des micro-organismes à activité probiotique n'est pas sans effet pour le système immunitaire. En condition physiologique (homme sain) et pour de nombreuses souches, la plus part des études - allons de la cellule isolée à l'essai clinique- montre un effet immunomodulateur. Dans certaines conditions pathologiques certains probiotiques exercent un effet anti inflammatoire dont le mécanisme reste à élucider (Bolcé et Thomann, 2005).

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), néanmoins quelques études suggèrent une diminution de la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, les bactéries présentes dans la lumière intestinale sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales, de libérer des composés dans la lumière intestinale susceptibles d'être absorbés par l'épithélium intestinal et d'agir sur les cellules immunitaires (Moreau, 2005; Ait Belgnaoui, 2006).

Des épreuves montrent que des micro-organismes probiotiques peuvent renforcer l'activité des cellules NK chez les personnes âgées. La stimulation des IgA et de neutrophiles aux sites d'action des probiotiques, et l'absence de libération de cytokines inflammatoires ou de l'élévation immunoglobulines périphériques également a été reconnu dans certaines situation (Farineau, 2001 ; Mercenier, 2001 ; Roberfroid et al, 2008)

Le *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* sont des probiotiques favorables à la construction du système immunitaire. *Bifidobacterium* peut également avoir un rôle « barrière » en diminuant la concentration de genre bactérien de putréfaction (*Clostridium*, *Bacteroides* et *Salmonella typhimurium*) (Majamaa et Isolauri, 1997).

II.6.2.5. L'allergie

Les probiotiques montrent une efficacité remarquable autant pour enrayer la maladie allergique et les prévenir. Ils agissent en modifiant la microflore intestinale en faveur de la fermentation (Majamaa et Isauri, 1997). C'est ainsi qu'il a été montré qu'une nutrition riche en probiotiques *Lactobacillus rhamnosus GG* chez les femmes enceintes prédisposées à développer des allergies, et chez leur nouveau né durant les premiers mois après la naissance, diminuait de 50% l'incidence des dermatites atopiques chez les enfants (Farineau, 2001. Guarner et al, 2008. Roberfroid et al, 2008).

L'eczéma, tout comme la rhinite allergique ou l'asthme, sont des réactions allergiques causées par une hypersensibilité d'origine héréditaire. Des études montrent l'impact favorable des probiotiques sur les troubles atopiques car ils améliorent nos capacités de tolérance et exercent une action anti-inflammatoire sur la muqueuse intestinale (Majamaa et Isauri, 1997).

II.6.2.6. Le cancer

Le cancer colorectal est le cancer le plus directement influencé par l'alimentation et il a fait l'objet de très nombreuses études ; études cas-témoin, études prospectives et études d'intervention, essentiellement prévention des adénomes colorectaux (Boutron-Ruault, 2006).

La flore endogène et le système immunitaire jouent tout deux un rôle dans la modulation de la cancérogenèse colique, ces paramètres peuvent être influencés par des probiotiques.

Plusieurs auteurs ont montrés que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes de mutagènes ou des acides biliaires secondaires dans les selles qui pourraient chacun être impliqués dans la cancérogenèse colique (Robin et Rouchy, 2001 ; Marteau et Sksik, 2005).

Plusieurs travaux ont mis en évidence une association inverse entre la consommation de produits laitiers fermentés, en particulier de yaourt, et le risque de tumeurs colorectales, cancers ou adénomes. Plusieurs études chez le rat, la souris et quelques-unes chez l'homme suggèrent que les bactéries lactiques pourraient avoir un effet bénéfique et à plusieurs niveaux sur la réduction du risque de cancer du côlon. Ainsi, chez l'homme et sur des modèles animaux, l'ingestion de bactéries lactiques diminue la concentration d'enzymes responsables de la libération d'agents mutagènes dans le côlon (Allinset, 2007). L'étude SYNCAN a testé l'effet de l'oligofructose avec deux souches de probiotiques sur des patients à risque de développer un cancer de colon. Les résultats de l'étude suggèrent qu'une préparation symbiotique peut diminuer l'expression des biomarqueurs pour le cancer colorectal (Guarner et al, 2008).

Deux essais randomisés contrôlés Japonais ont montré que l'administration orale de *L. casei*, souche *biolactis* diminuait de manière significative le risque de récurrence de tumeur superficielle de la vessie chez l'homme (Marteau et Sksik, 2005).

II.6.2.7. La constipation

La constipation est un problème fréquent chez le sujet âgé. Les probiotiques ayant été désignés comme potentiellement capables d'améliorer la motilité intestinale, l'équipe de S. Salminen de l'Université de Turku en Finlande a testé cette hypothèse chez des sujets âgés (environ 80 ans), en bonne santé, souffrant de constipation et séjournant en centre de soins.

L'étude montrait que la consommation du mélange de probiotiques puisse d'une part soulager la constipation, et d'autre part, diminuer les activités de certaines enzymes fécales supposées intervenir dans la cancérogenèse colique, cependant, la réduction de ces activités demeure faible et sa réelle signification biologique n'est pas connue (Salminen, 2003).

L'administration même en faible dose des lactobacilles améliore le transit intestinal et permet de réduire l'utilisation de laxatif. Les laxatifs ont l'inconvénient majeur d'éliminer, en plus du bol fécal, différentes substances essentielles à l'organisme comme les acides aminés, les minéraux... ; les bactéries lactiques modifient l'équilibre de la flore microbienne intestinale provoquant de ce fait une excitation de la muqueuse et des muscles (Bonnet, 2000 ; Robin et Rouchy, 2001)

II.6.2.8. Prévention de la diarrhée infectieuse

Les diarrhées infectieuses peuvent être bactériennes, virales, ou encore parasitaires. Liée à l'âge :

- Elles sont chez l'enfant, aiguës, infectieuses, virales ou bien avec un risque important de déshydratation chez les enfants en bas âge.
- Chez les sujets âgés, la déshydratation doit toujours être prévenue ; elle peut être source de complications neurovasculaires survenant secondairement (Reberfroid et al., 2008).

Des études démontrent que l'utilisation des probiotiques aide à réduire la durée de la diarrhée virale infectieuse chez les nouveau-nés. La diarrhée virale est habituellement traitée par réhydratation, mais de plus en plus, des données appuient l'utilisation des probiotiques comme traitement complémentaire. On sait que certaines souches ou des mélanges précis de probiotiques permettent d'écourter de deux jours une telle infection, ce qui représente un effet significatif (Braegger et Zurich, 2002 ; Bresson, 2002 ; Patterson, 2008).

II.6.2.9. Les maladies inflammatoires et trouble intestinaux

Les maladies intestinales inflammatoires (MII) touchent de plus en plus de gens, surtout dans les pays développés. Les deux principales formes reconnues de MII sont la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Comme ces maladies sont causées par un dérèglement de la réponse immunitaire normale, leur apparition peut dépendre de plusieurs facteurs, comme des anomalies génétiques chez des individus, le stress, l'alimentation, une altération de la microflore bactérienne intestinale, les habitudes de vie, l'environnement immédiat et la pollution (Muller-marín et Rieutord, 2004).

La colite ulcéreuse : ou (RCH) est une inflammation érosive non spécifique colorectale caractérisé par une inflammation de la muqueuse, des érosions et des ulcères du colon et du rectum.

La maladie de Crohn : une affection inflammatoire chronique pouvant toucher tout le tractus digestif.

La pochite : dans certains cas de RCH, l'ablation totale du colon doit être pratiquée avec la mise en place d'une poche iléo-anale. La pochite est une inflammation non spécifique de ce réservoir (Reberfroid et al., 2008).

Les principaux symptômes des MII vont des selles anormales en nombre et en volume à la diarrhée chronique, associée à des douleurs abdominales, la fièvre et une atteinte inflammatoire des articulations, de la peau et d'autres organes (Drouault et Corthier, 2001).

L'administration de probiotiques a provoqué des rémissions plus longues associées à une moindre expression de marqueurs inflammatoires ex-vivo et une augmentation de la sécrétion d'IgA, et cela conduit à une diminution de la consommation de médicaments et à une qualité de vie globalement supérieure (Allinset, 2007).

II.6.2.10. Maladies cardiovasculaires

Il a déjà été démontré que l'emploi de Lactobacilles probiotiques et des sous-produits de leur métabolisme a des effets bénéfiques sur le cœur, il est utile pour la prévention et la thérapie de diverses cardiopathies ischémiques et abaisse le cholestérol sérique.

Il est nécessaire de poursuivre les travaux de recherche et particulièrement les études sur l'homme avant de pouvoir affirmer que les probiotiques exercent des effets bénéfiques sur l'appareil cardiovasculaire (Farineau, 2001).

Des études préliminaires ont révélé que la consommation de yaourt ou de lait fermenté contenant des probiotiques entraîne une diminution du taux de cholestérol dans le sang.

In vitro, certaines souches de *Lactobacillus* ont la capacité d'assimiler le cholestérol. Dans des études de laboratoire, les niveaux sériques de cholestérol de rats alimentés avec du lait riche en *Lactobacillus* mélangé à leur nourriture étaient plus faibles que ceux d'animaux témoins. Les souches de *Lactobacillus* semblaient éliminer directement le cholestérol (allinset, 2007).

Des acides biliaires, synthétisé par le foie à partir de cholestérol, sont « recyclés » et utilisé en moyenne trois fois pendant un même repas. L'hydrolyse des sels biliaires conjugués rend nécessaire la synthèse des sels biliaires supplémentaires. Ce qui conduirait à une réduction du cholestérol (Drouault et Corthier, 2001; Drouault et Corthier, 2001; Alerge, 2009).

II.6.2.11. Vaginose bactérienne

La vaginose bactérienne est une maladie d'étiologie inconnue attribuable au développement excessif de diverses espèces de bactéries anaérobies et associée à la disparition des lactobacilles qui dominent normalement dans le vagin.

De nombreuses femmes souffrant de vaginose bactérienne. Elles peuvent être asymptomatiques mais risquent de plus graves complications telles que l'endométriose, les infections pelviennes et les complications de l'accouchement, y compris l'accouchement prématuré. Certaines preuves cliniques laissent à penser que l'administration par voie orale ou vaginale de lactobacilles peut éradiquer la vaginose bactérienne asymptomatique (Reid et al., 2001) et symptomatique. On a eu recours à l'administration orale de *Lactobacillus acidophilus* et de yogourt dans la prévention et la thérapie de la candidose vaginale, bien qu'aucune donnée sur son efficacité n'ait encore été fournie. On a supposé que les lactobacilles devraient produire du peroxyde d'hydrogène, mais étant donné que ces microorganismes sont plus sujets à être tués par les spermicides, l'association de deux souches ou plus, dont une produisant du peroxyde d'hydrogène et l'autre résistant aux spermicides, pourrait être plus thérapeutique. (Farineau, 2001).

II.6.2.12. Infections urinaires

Plusieurs centaines de millions de femmes sont touchées chaque année par des infections urinaires. L'uropathogène *Escherichia coli* qui se développe dans l'intestin est responsable jusqu'à 85 % des cas. La bactériurie asymptomatique est également commune chez la femme et

est parfois suivie d'infections urinaires symptomatiques. Il y a des preuves, y compris des données randomisées et contrôlées, qui indiquent que des gélules vaginales de souches de *Lactobacillus* GR-1 et B-54 lyophilisées appliquées une fois par semaine préparées avec adjonction de lait écrémé et l'ingestion une fois par jour par voie orale d'une capsule de souches de *Lactobacillus* GR-1 et RC-14 (Reid et al., 2001), peuvent restaurer une flore vaginale dominée par les lactobacilles et réduire le risque de réapparition des infections urinaires. En créant dans le vagin une barrière de lactobacilles. On estime que moins d'agents pathogènes arriveront dans la vessie, bloquant ainsi le processus infectieux. (Farineau, 2001).

II.6.2.13. Vers une utilisation de probiotiques chez les grands brûlés

Certaines souches probiotiques ont montré une capacité à renforcer la barrière intestinale chez des individus affaiblis ; dans cette optique, l'effet éventuel de probiotiques en cas de brûlure cutanée a été évalué chez le rat. Chez des animaux sévèrement ébouillantés sur 30 % de la surface corporelle, la consommation d'un mélange de probiotiques a diminué la translocation bactérienne et réduit l'atrophie intestinale dans les 24 heures suivant la brûlure. Ce résultat met en lumière une nouvelle application thérapeutique potentielle pour les bactéries probiotiques : le traitement des grands brûlés (Léonil et Lortal, 2006)

II.6.2.14. Un probiotique contre les douleurs articulaires

Le syndrome de l'intestin irritable s'accompagne souvent d'arthralgie qui se manifeste par des douleurs articulaires sans lésion apparente. Chez des patients atteints de la maladie de Crohn et de colites ulcéreuses et souffrantes d'arthralgie, la consommation du mélange de probiotiques VSL#3 pendant trois mois dans un essai ouvert sans groupe témoin a diminué les douleurs articulaires ressenties. Cette étude pilote permet d'espérer que le probiotique peut améliorer les conditions de vie de ces patients. Ce résultat doit cependant être confirmé par des études randomisées en double aveugle (Léonil et Lortal, 2006).

II.6.2.15. Un probiotique exerce un effet cariogène chez le rat

L'innocuité des probiotiques chez l'homme est en général bien acceptée et confirmée par l'absence d'effet indésirable. Cependant, une étude chez le rat démontre que la souche *L. salivarius* LS 1952R favoriserait la carie dentaire. Cette conclusion suggère d'étudier plus précisément l'éventuelle apparition de cet effet secondaire chez l'homme et appelle à la prudence lors de la consommation de cette espèce probiotique (Léonil et Lortal, 2006).

La figure 05 résume Divers mécanismes pourraient expliquer l'action bénéfique des LAB.

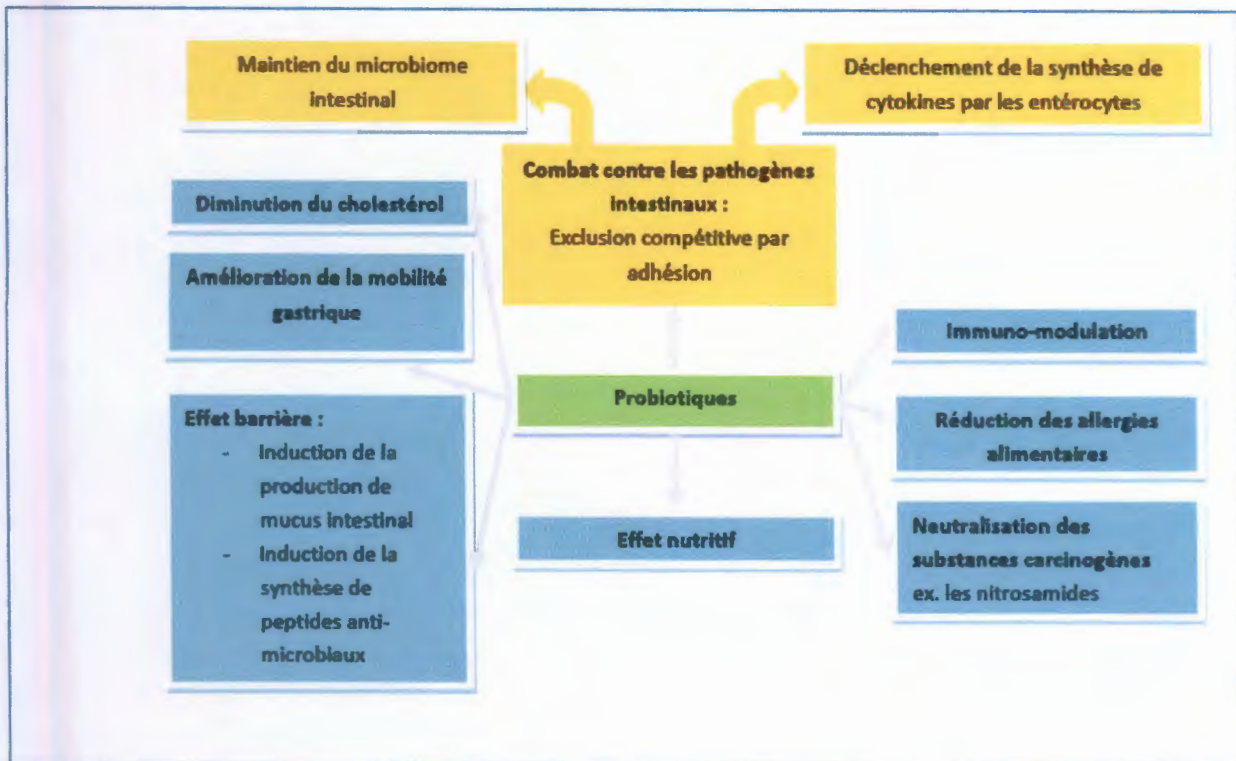


Figure 05 : Divers mécanismes pourraient expliquer l'action bénéfique des LAB (Holzapfel W., 2006)

II.6.3. Utilisation des probiotiques chez des sujets par ailleurs sains

De nombreux produits probiotiques sont utilisés par les consommateurs qui, par ailleurs, se considèrent en bonne santé. Ils le font en supposant que les probiotiques peuvent maintenir leur santé et leur bien-être et réduire les risques à long terme de maladies des intestins, des reins, des voies respiratoires et du cœur. Il y a lieu de faire plusieurs remarques sur cette hypothèse et ses implications. La consultation a reconnu que l'emploi des probiotiques ne saurait remplacer des habitudes saines de vie quotidienne et une alimentation équilibrée chez des sujets par ailleurs sains (Farineau, 2001).

En conclusion (Robin et Rouchy, 2001)

- ❖ Les probiotiques trouvent leurs principales indications dans les troubles gastro-intestinaux : infections digestives bactériennes et virales, intolérance au lactose, diarrhées, gaz, ballonnements, constipations... Ils devraient être utilisés pour réensemencer la flore intestinale après une antibiothérapie.
- ❖ Une probiothérapie serait utile en traitement adjuvant de l'ulcère gastroduodéal et de la cirrhose.
- ❖ Une supplémentation appropriée en probiotiques peut aboutir à des modifications vasculaires dans le système hépatique et donc améliorer les fonctions du foie. Elle pourrait avoir un intérêt en prévention des cancers du colon, chez les sujets prédisposés aux adénomes coliques.

- ❖ Les probiotiques sont à consommer de préférence soit au moins 1/2 heures avant le repas, soit bien après le repas. Leur consommation est à répartir en plusieurs prises au cours de la journée

II.7. Les sources naturelles de probiotiques

Il existe une interrelation étroite entre l'environnement (et donc la nourriture) et «l'écosystème» intestinal.

Des études (sur le Kimchi : un lait fermenté chez les Massaïs, qui est un plat traditionnel coréen...) ont montré que les sources les plus intéressantes de probiotiques sont les nourritures fermentées animales ou végétales crues non cuisinées car elles contiennent une grande diversité d'espèces de lactobacilles.

L'étude plus particulièrement du lait fermenté Massaï a montré que les souches de lactobacilles qu'il contient résistent aux diverses conditions rencontrées dans le système gastro-intestinal (enzymes, pH...). Leur activité est multifonctionnelle (Holzapfel, 2006).

Yaourts, laits fermentés ou végétaux (légumes et céréales) n'apportent pas toujours en quantité suffisante les ferments probiotiques nécessaires pour agir sur la flore intestinale. Des poudres de ferments lactiques présentent alors un réel intérêt. Rigoureusement sélectionnées, elles concentrent sous un faible volume un très grand nombre de ferments probiotiques qui agissent en synergie pour restaurer l'équilibre de la flore intestinale (Thiès A. 2006).

Le kéfir, un lait fermenté traditionnel, véhicule la réputation d'être bénéfique à la santé. Fondée sur des expériences personnelles, cette réputation est relayée par des professionnels de la santé, tant dans sa région d'origine qu'au delà. L'utilisation quotidienne de kéfir est servi à titre "d'activateur de la santé" dans des hôpitaux russes et y est utilisé comme agent thérapeutique pour certaines infections (Ninane et al., 2009).

Lactibiane est un complexe de ferments probiotiques, développé par le laboratoire PiLeJe. Avec 10 milliards de ferments probiotiques par sachet de 2,5 g, ce complément alimentaire bénéficie de toutes les qualités d'un vrai probiotique (Thiès A. 2006).

Actuellement, un médicament à base de probiotique est mis sur le marché Algérienne appelé « Ultrabiotique ». composé de : *Lactobacillus acidophilus* (75 %), *Bifidobacterium lactis* (15 %), *Lactobacillus plantarum* (5 %), *Bifidobacterium breve* (5 %). Il est présenté sous forme de gélules. Dont le distributeur exclusif : SARL COMPLEMENTAL. Alger.





Chapitre III
les aptitudes technologiques

Les aptitudes technologiques sont les critères ou les rôles technologiques recherchés pour la fabrication des produits fermentés qui peuvent être liés à une aromatisation très spécifique, à la texturation d'un produit et à la production de métabolites. Ils constituent les caractéristiques d'une souche en terme de pouvoir technologique (Branger et al., 2007.a.).

III.1.pouvoir acidifiant

Le métabolisme principal des bactéries lactiques y compris les *Lactobacillus*, a pour effet une production importante de l'acide lactique (Pilet et al., 2005) conduisant à une acidification rapide et durable. Cette acidification va amener un abaissement de pH du produit se caractérisant par des odeurs et goûts surs, pouvant aller jusqu'à la coagulation si on atteint le point isoélectrique de 4.6 (Vignola, 2002.a.). A ces valeurs de pH, le développement de la plupart des flores d'altération et des flores pathogènes est inhibé ce qui participe à la stabilité et la conservation des produits fermentés (Dortu et Thonart, 2008).

Au cours de l'acidification du lait, des modifications physico-chimiques importantes ont lieu au sein de l'organisation de la micelle de caséine et de son environnement (Grogennenc et al., 2007).

La micelle est constituée de fractions protéiques qui sont reliés entre elles par des nanoclusters (phosphate de calcium). Les fractions les plus phosphorylées se trouvent au centre de la micelle tandis que les fractions les moins phosphorylées sont positionnées à la surface de la micelle (Branger et al., 2007.a.).

Lors de la régression d'ionisation du citrate et du phosphate, les sels de calcium solubles sont dissociés (phosphate et citrate essentiellement) et le déplacement des équilibres minéraux du lait qui conduit à une solubilisation du phosphate de calcium, colloïdal. Ce dernier passe de la micelle vers le lactosérum (le calcium n'est plus retenu par les groupements carboxyliques des acides aminés) (Grogennenc et al., 2007).

Durant le pH 6,8 du lait, où les groupements carboxyliques des acides aminés sont sous forme dissociée, il existe donc des liaisons ioniques entre le calcium micellaire et les groupement carboxylique des acides aminés phosphorylées servant de point de fixation aux nanoclusters (les groupements phosphorylés) (Branger et al., 2007.a.). Jusqu'à pH 5.4, la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal perturbe peu l'organisation de la micelle ce qui entraîne un début de séparation des sub-micelles (Vignola, 2002.a. ; Grogennenc et al., 2007).

A pH entre 5.2 et 5.3, il y a déstabilisation de la caséine et début de précipitation provoquée par la libération du calcium fixé aux phosphosérine. Ceci entraîne une désintégration progressive de la micelle de caséines, qui perd sa forme sphérique (Grogennenc et al., 2007). Par ailleurs, un pic caséine soluble (majoritairement la caséine β) et atteint entre pH 5,5 et 5,2.

Lors que charge des surfaces des micelles s'annule (pH 5,2), leur distribution jusque là homogène devient inhomogène. Les micelles de caséine désintégrées forment des agrégats de quelques μm dispersés dans le sérum, qui à partir de pH 5,0 s'associent par l'intermédiaire des caséines solubilisées (contraction du gel) pour former un réseau gélifié englobant entre ces mailles la totalité de la phase aqueuse (Grogennenc et al., 2007).

A un pH entre 4,6 et 4,7, atteint le point isoélectrique de la caséine, il y a alors une précipitation complète de la caséine.

L'acidification modifie la structure de la caséine en rendant le caille beaucoup plus hydrophile que ainsi, on observe une plus forte adsorption de l'eau par les diverses protéines (Vignola, 2002.a.).

Les quatre schémas ci-dessous représentent le mécanisme de coagulation (Cuvillier, 2007)

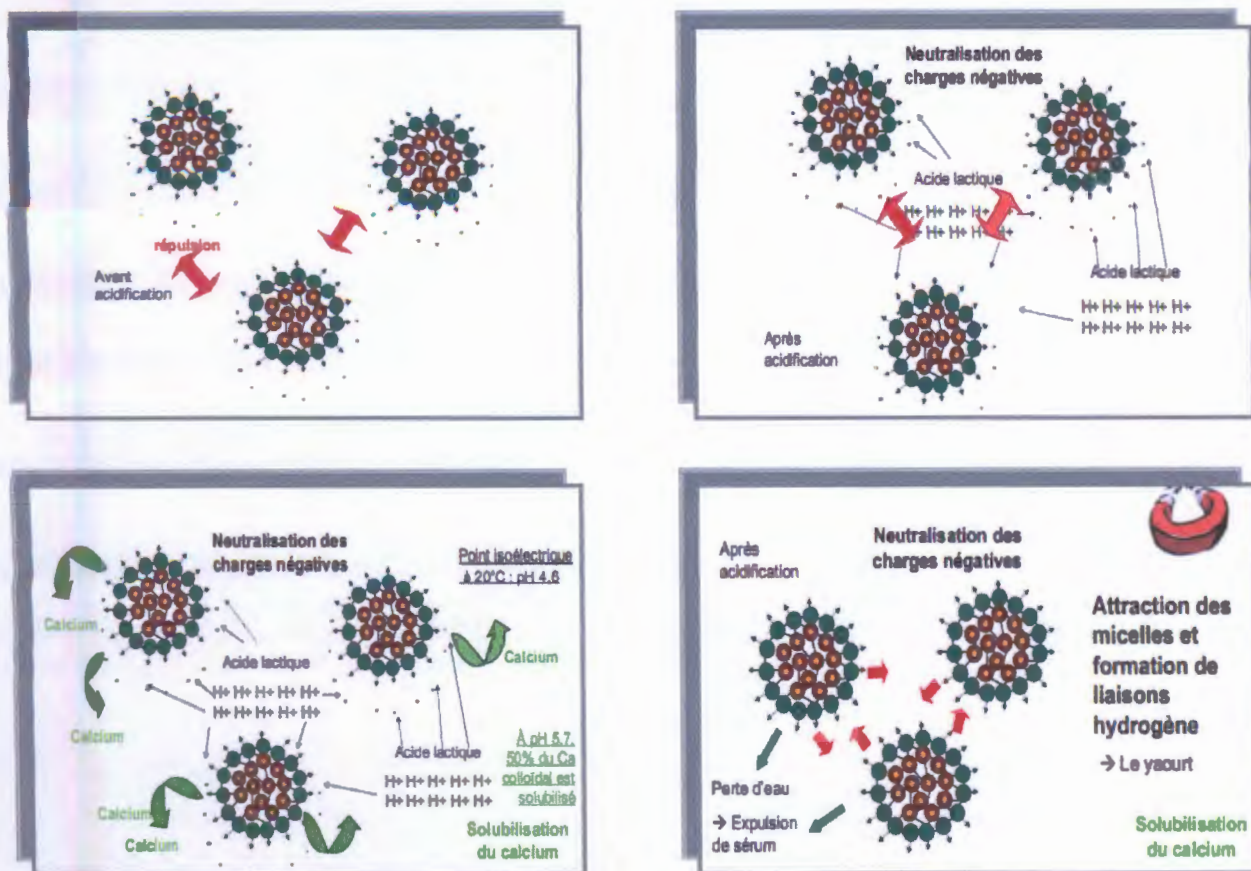


Figure 06 : Schéma succinct les différentes étapes de la coagulation (Cuvillier, 2007)

III.2. Pouvoir texturant ou épaississant

La texture est un élément important en fermentation par ce qu'elle influe les capacités diffusionnelles de l'eau au sein d'un produit (Branger et al., 2007.a.). Elle est due surtout à la production des molécules plus grosses et plus longues tels que les polysaccharides en utilisant les sucres du lait par certains micro-organismes dont les *Lactobacillus* (Vignola, 2002.b.).

La plupart des microorganismes synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être classés selon leur localisation dans la cellule. Certains se trouvent à l'intérieur de la cellule, dans le cytoplasme, où ils sont utilisés par la bactérie comme source d'énergie. D'autres sont des composants de la paroi tels que les peptidoglycanes et les acides téichoïques. Enfin, un troisième groupe de polysaccharides est excrété à l'extérieur de la cellule. Le polysaccharide peut soit être excrété dans le milieu environnant, soit resté lié à la surface de la cellule sous forme de capsule (Bergmaier, 2002 ; Dupont, 1998).

Les *Lactobacillus*, en raison de leurs caractères technologiques, nutritionnels et éventuellement thérapeutiques, jouent un rôle central dans le traitement du lait afin d'obtenir des produits fermentés comme les fromages et les yogourts (Bergmaier, 2002). La production d'exopolysaccharides est affectée par la température, le pH, et la composition du milieu de culture (Vignola, 2002.b.).

Le principal intérêt de l'utilisation des souches de *Lactobacillus*, productrices de polysaccharides lors de la production de laits fermentés, est l'amélioration de la texture et la diminution de la synérèse. En effet, les polymères produits permettent d'augmenter la viscosité et l'onctuosité du produit, et ont la capacité de retenir les molécules d'eau, diminuant ainsi la séparation du lactosérum et des caséines coagulées du lait (Dupont, 1998 ; Bergmaier, 2002 ; Vignola, 2002.b.). Dans le cas des yogourts brassés additionnés de fruits, la présence de polysaccharides empêche que ceux-ci ne se déposent au fond (Bergmaier, 2002).

Les polysaccharides sont synthétisés par une voie métabolique secondaire en générale activée lors d'une limitation en substrat. L'ajout de glucose au lait est un facteur favorisant la synthèse de polysaccharide au cours de ce métabolisme secondaire, toute fois certaines souches du « yaourt » sont très sensibles à une diminution de l'aw induite par l'ajout de glucose (Branger et al., 2007.b.).

La production de polysaccharides extracellulaires (exopolysaccharides) est un caractère désirable et recherché. La majorité des études est porté sur la production d'EPS par des souches de *Lactobacillus bulgaricus*, de *Streptococcus thermophilus*, de *Lactococcus lactis* ou encore par des mélanges de plusieurs souches. L'intérêt s'est depuis peu tourné vers les souches de *Lb. casei* et de bifidobactéries. Ces souches sont considérées comme probiotiques : ce qui est une qualité de plus en plus recherchée par les consommateurs (Dupont, 1998).

III.3. Pouvoir aromatisant

L'utilisation des ferments aromatiques fait appel aux quelques règles liées au fonctionnement du ou des métabolismes impliqués que l'on peut décomposer en trois phases :

- ✓ La transformation du substrat dans la cellule ;
- ✓ Les enzymes impliquées ;
- ✓ Les conditions physicochimiques du milieu (Branger et al., 2007.a.).

Les saveurs typiques de laits fermentés viennent principalement de l'ensemble des composés suivants : l'acide lactique, les composés carbonés (l'acétaldéhyde, l'acétone, l'acétate et le diacétyl), les acides non volatiles (les acides pyruviques, oxalique et succinique), les acides volatiles (les acides acétique, formique et propionique) et les produits prévenants de la dégradation thermique des protéines, des graisses ou du lactose.

La proportion des composés carbonés variera selon les souches bactériennes présentes et selon la qualité du lait (Vignola, 2002.b.). Elles contribuent à l'élaboration des caractéristiques organoleptiques de certains produits fermentés (kéfir, yaourt, beurre).

Tous ces composés sont des produits issus de l'utilisation des hydrates de carbone et du citrate par les bactéries lactiques hétérofermentaires. Des starters de bactéries lactiques possédant une faible activité protéinase et une forte activité peptidase contribuent à réduire l'amertume du lait et à améliorer sa texture (Yao A et al., 2009 ; Vignola, 2002.b.). Cette production dépend du pH du milieu, de la présence d'hydrogène, de l'agitation du milieu, de la teneur en citrate et de certains facteurs de croissance (oligoéléments par exemple).

Les *Lactobacillus* (*Lb. helveticus*, *Lb. bulgaricus*) synthétisent de l'acétaldéhyde dont la teneur est à la fois fonction de son degré de synthèse et du rythme de sa dégradation (Vignola, 2002.b.).

III.4. Pouvoir protéolytique

Les *Lactobacillus* exigent plusieurs acides aminés pour leur permettre de se développer (cela explique pourquoi les milieux commerciaux destinés à la culture des ferments contiennent des peptones ou des extraits de levure) (Vignola, 2002.b.).

Les *Lactobacillus* possèdent un système protéolytique complexe qui assure leur croissance dans des milieux à faibles concentrations en acides aminés libres et oligopeptides comme le lait (Vignola, 2002.b.; Roudj et al., 2009). Ce système comprend des protéases situées à la surface cellulaire et une large gamme de peptidases intracellulaires. Ces enzymes peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire par l'autolyse bactérienne liée à l'âge de la cellule ou aux conditions physiologiques défavorables qui activent les autolysines capables d'hydrolyser les peptidoglycanes de la paroi. Les enzymes bactériennes, lorsqu'elles sont libérées dans le caillé fromager participent efficacement à l'affinage du fromage. Les lactobacilles montrent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques. Toutefois, si les mécanismes enzymatiques empruntés par les deux genres bactériens semblent relativement proches, les enzymes rapportées chez les lactobacilles sont plus diversifiées, en particulier en ce qui concerne les peptidases (Roudj et al., 2009).

III.5. Aptitude antagoniste

Les propriétés antimicrobiennes des lactobacilles peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques (l'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), diacétyl, et bactériocines (Vignola, 2002.b.; Dortu et Thonart, 2008).

Deux possibilités s'offre pour l'utilisation des bactériocines : l'ensemencement en ferments sélectionnés pour produire in situ les composés inhibiteurs ou l'incorporation dans les produits des inhibiteurs seuls, cette second voie paraissant mieux adaptée à l'utilisation dans les aliments non fermentés (Mathot et al., 1996).

III.5.1. Activité antimicrobienne due à la production d'acides organiques

Les acides organiques sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires. Grâce à cette production, les *Lactobacillus* diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe (Mathot et al., 1996 ; Dortu et Thonart, 2008).

Leur compétitivité est améliorée étant donné leur grande tolérance aux pH bas extra et intra cellulaires (Dortu et Thonart, 2008). Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (Sutra et al., 1998; Pilet et al., 2005; Dortu et Thonart, 2008).

Les acides organiques sont un des agents classiques de préservation des aliments et sont reconnus comme des additifs alimentaires. Les acides couramment utilisés sont les acides benzoïque, sorbique, acétique, fumarique, propionique et lactique. Ils sont utilisés pour

prévenir ou retarder la croissance des bactéries dégradant la nourriture. Le principal problème consécutif à leur utilisation est la haute concentration nécessaire pour inhiber les bactéries pathogènes ou indésirables et qui est parfois inacceptable pour le consommateur (Dortu et Thonart, 2008).

III.5. 2. Activité antimicrobienne due à la production de bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produits par certaines souches de bactéries lactiques (Pilet et al., 2005; Dortu et Thonart, 2009), dont beaucoup ont une activité contre les bactéries altérant ou pathogènes tel que *Listeria monocytogenes* (Dortu et Thonart, 2009). Ils sont généralement thermorésistants (Adrian et al., 2003 ; Pilet et al., 2005) doués de propriétés bactéricides ou bactériostatiques pour divers bactéries étrangères grâce à des sites cellulaires spécifiques de liaison (Adrian et al., 2003) en affectant l'intégrité de la fonction de la membrane cellulaire (Prescott et al., 2007.b). Ils sont actifs uniquement sur des bactéries à Gram positif, avec un spectre d'activité étroit (Pilet et al., 2005

Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Dortu et Thonart, 2009). Ils se distinguent des antibiotiques par la nature des souches productrices, les modalités de production et de leur nature chimique, en particulier leur capacité à être hydrolysées par de nombreuses protéases (pepsine, trypsine) (Adrian et al., 2003).

La nisine est l'une des premières bactériocines mise en évidence chez une souche de *Lactococcus lactis*, elle exerce ses effets inhibiteurs vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* ou *Clostridium tyrobutyricum* (Pilet et al., 2005; Prescott et al., 2007.b).

D'autres bactériocines produits par certaines souches de *Lactobacillus*, sont utilisés pour la fabrication des yaourts qui lui confère un effet antagonisme supplémentaires, par exemple l'acidophilucine A, la lactocidine et les lactacines B et F de *Lb acidophilus*, Bulgaricine de *Lb bulgaricus* (Pelmont, 1995).

Il existe d'autres bactériocines produit par d'autres souches de *Lactobacillus* (Adrian et al., 2003) :

- les sakarines A et P de *Lb. sake* ;
- la microcine et la caséucine B de *Lb. casei* ;
- les plantaricines A, S, T, C₁₉ de *Lb. plantarum*.
- la lactacine 27 et l'helvécicine J de *Lb. helveticus*,
- les lacticines A et B de *Lb. delbrueckii* ;
- la gasséricines B de *Lb. gasseri*.

Les bactériocines sont thermorésistants (de l'ordre de 30 minutes à 1 heure à 100°C), grâce à la stabilisation de leur structure par les cycles. Par contre, ils sont instables en milieu basique (Mathot et al., 1996).

III.5.3. Activité antimicrobienne due à la production de peroxyde d'hydrogène

En 1951 Wheater et al., mettent en évidence l'inhibition de *Staphylococcus aureus* par *Lactobacillus lactis* et l'attribuent à une « lactobacilline ». Dès 1952 ils ont montré que l'agent inhibiteur est en fait le peroxyde d'hydrogène produit par le lactobacille (Mathot et al., 1996).

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Dortu et Thonart, 2008).

Certaines bactéries lactiques peuvent néanmoins se protéger contre le peroxyde d'hydrogène qu'elles produisent par la synthèse de catalase hexamérique ou métamérique contenant du manganèse et qui sont parfois décrites comme étant des pseudocatalases (Dacosta, 2000; Dortu et Thonart, 2008). La concentration de peroxyde d'hydrogène produite par des *Lactobacilli* varie entre 0,001 et 8 mM, en fonction de l'espèce, de la souche et des conditions de cultures. Son action se manifesterait aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux qui sont indispensables au bon déroulement de la fermentation. Il est donc rarement utilisé pour son activité inhibitrice. D'autre part, son action oxydante peut avoir un effet néfaste sur la santé humaine (Dortu et Thonart, 2008)

En culture dans du lait stérilisé, *Lactobacillus bulgaricus* inhibe par production d' H_2O_2 une souche de *Pseudomonas fragi* (Mathot et al., 1996).

III.5.4. Activité antimicrobienne due à la production de gaz

Le dioxyde de carbone est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (Dortu et Thonart, 2008).

III.5.5. Activité antimicrobienne due à la production de diacétyl

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. et *Pediococcus* sp. Le diacétyl ($C_4H_6O_2$) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries à Gram-négatif et les bactéries à Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles.

Les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm, et sont supérieures à celles présentes dans le beurre et susceptibles de provoquer son arôme (2 à 7ppm) (Mathot et al., 1996 ;Dortu et Thonart, 2008).

III.5.5. Activité antimicrobienne due à la production de reutéline

Axilsson et al., (1989) ont mis en évidence l'action inhibitrice d'une substance produite par *Lactobacillus reuteri*. Cette substance (reutéline) a été purifiée et identifiée (Mathot et al., 1996).

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldehyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium*. La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord déshydraté par une « glycerol deshydratase » pour former de la reutéline qui sera ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydoréductase. Cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose.

La reutérine s'accumule alors dans le microorganisme producteur. A haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes.

La reutérine a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les procaryotes (Gram-positif ou Gram-négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine **médical** que dans le domaine alimentaire (**Dortu et Thonart, 2008**). Sont utilisation en tant que conservateur où l'ensemencement par des lactobacilles producteurs associé à un ajout de glycérol ont été expérimentés (**Mathot et al., 1996**).



Partie II
Etude expérimentale



Matériels et méthodes

I. Matériels et méthodes

L'intégration de ce travail a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université de Jijel durant la période avril – juin de l'année 2010.

I.1. Matériels

I.1.1. Matériels biologiques

- souches de *Lactobacillus* lyophilisées (20 souches) isolés par nos collègues durant l'année universitaire 2008 – 2009, à partir de selles d'enfants ;
- germes tests : *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus* (isolées en médecine humaine).
- bile d'origine humaine collectée à l'hôpital de Jijel.

I.1.2. Milieux de cultures

Dans notre travail, les milieux utilisés sont :

- Gélose MRS (MAN-ROGOSA-SHARP) ;
- Gélose hypersaccharosée (préparée au niveau de laboratoire) ;
- Gélose GIBSON ABDEL MALEK ;
- Gélose MRS additionnée de lait écrémé (10 %) ;
- Gélose M.E.V.A.C sans sucre ;
- Gélose Hektoen ;
- Bouillon MRS : (préparée au niveau de laboratoire) ;
- Bouillon nutritif ;
- Bouillon nutritif additionné d'une dose de 2% du lait écrémé ;
- Milieu Muller- à arginine.

I.1.3. Les réactifs

Nous avons utilisé les réactifs suivants

- Violet de gentiane ;
- Lugol ;
- Fuschine ;
- Alcool ;
- l'eau oxygénée (H₂ O₂) ;
- Phénol phtaléine ;
- Soude Dornic (N/9) ;
- HCl ;
- disques d'antibiotiques commercialisés par l'institut Pasteur : Pénicilline G, Oxacilline, Streptomycine (10 µg) ; Ampicilline (10 µg) ; Tétracycline (30 µg) ; Sulfamides (200 µg)
- L'arôme de banane
- Sucres: Saccharose, Ribose, Xylose, Galactose, Mannose. Lactose

I.1.4. Appareillage

- Bain Marie ;

- Balance ;
- Agitateur magnétique ;
- Etuve (37°C, 46°C et 15°C) ;
- Four Pasteur ;
- Microscope optique ;
- Réfrigérateur (ENIEM) ;
- Burette, béchers, tubes à essai, flacons, lames ;
- pH mètre ;
- Boite de Pétri ;
- Pipettes Pasteur et l'anse de platine ;
- Micropipette et embouts ;
- Epindoffs ;
- Bec bensun ;
- Papier buvard ;
- Papier WATMAN.

I.2. Méthodes

I.2.1. Revivification

Les 20 souches lyophilisées ont été revivifiées par leur ensemencement sur bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 24 heures.

II.2.2. Purification

Pour la purification, on a utilisé la méthode de repiquages successifs sur bouillon et gélose MRS jusqu'à l'obtention des colonies de mêmes tailles, mêmes formes et bien distinctes ; ce qui renseigne sur la pureté des souches.

Pour s'assurer de leur pureté, une coloration de Gram suivie d'une observation microscopique a été réalisée.

I.2.3. Identification

L'identification des souches a été réalisée par les techniques classiques de microbiologie : études des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques (**Carip, 2008**).

I.2.3.1. Etude des caractères morphologiques

I.2.3.1.1. Examen macroscopique

L'étude morphologique a été réalisé par observation macroscopique des colonies obtenues sur milieu solide après incubation (taille, pigmentation, contour, aspect,...) (**Hariri et al., 2009**).

I.2.3.1.2. Grammage

L'observation microscopique permet la caractérisation routinière de la morphologie et du mode de regroupement et la distinction entre les Gram positif et les Gram négatifs (**Bousseboua, 2002 ; Carip, 2008 ; Hariri et al, 2009**). Elle est basée sur la différence de structure de la paroi

et selon la composition et la perméabilité.

La coloration de Gram a été réalisée comme suit (Joffin et Leyral, 2006)

- réaliser le frottis et le fixer à la chaleur ;
- Colorer au violet de gentiane durant environ 1 minute ;
- Laver à l'eau ;
- Faire agir la solution de Lugol durant environ 30 seconds ;
- Laver à l'eau ;
- faire couler l'éthanol goutte à goutte sur la lame jusqu'à décoloration ;
- Laver à l'eau ;
- Colorer à la fushine durant quelques secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Observer, après séchage sur des papiers, à l'immersion (objectif $\times 100$) et à pleine lumière.

I.2.3.2. Tests biochimiques et physiologiques

I.2.3.2.1. Tests biochimiques

A. Recherche de la catalase

A partir de la gélose MRS, une öse de culture a été prélevée et mise en contact avec une goutte d'eau oxygénée sur une lame. (Guillaume, 2004).

B. Recherche du type fermentaire : ou test de différenciation des *Lactobacillus* types homo et hétérofermentaires : test de Gibson Abdel Malek (Guillaume, 2004).

L'ensemencement des souches étudiées, a été réalisé par piqûre centrale, dans Le milieu de Gibson Abdel Malek préalablement fondu, refroidi et solidifié en position verticale, puis l'écoulement en surface d'un bouchon de la gélose blanche stérile. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 5 à 7 jours.

C. Profil fermentaire des sucres

Le profil fermentaire a été étudié sur le milieu M.E.V.A.G additionné des sucres suivants : lactose, galactose, xylose, ribose, mannose et saccharose, puis solidifié.

L'ensemencement a été fait par piqûre centrale et L'incubation à 37°C pendant 24 heures.

D. Recherche de l'activité arginine dihydrolase ADH

Pour réaliser ce test, une série de tubes contenant le milieu Moëller additionné de 0,5-1% d'arginine et d'un indicateur de couleur a été ensemencée, à partir d'une culture jeune de *Lactobacillus*. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures. (Hariri et al, 2009).

I.2.3.2.2. Tests physiologiques

A. Croissance à différentes températures

Deux séries de tubes contenant le bouillon MRS ont étéensemencées par des cultures jeunes (24 heures) des différentes souches de *Lactobacillus*. Les tubes ont été incubés pendant 24heurs à 48heurs dont une série à 15°C et l'autre à 46°C.

I.2.4. Evaluation des aptitudes probiotiques in vitro

I.2.4.1. Estimation de la croissance

Une série de tubes contenant le milieu MRS a étéensemencé par des cultures jeunes (de 20 heures) de *Lactobacillus* avec un rapport de V/9V puis incubée à 37°C pendant 4 heures.

La croissance a été estimée par mesure de l'absorption (densité optique DO) à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm (Hariri et al, 2009).

I.2.4.2. Croissance sur milieu acide

Ce test a été réalisé sur la gélose MRS acide selon la technique suivante :

Le pH de La gélose fondue et refroidie, a été ajusté par l' HCl 3N (la moitié de la gélose à pH 3 et l'autre à pH 4), ensuite la gélose a été coulée dans deux séries de boîtes de Pétri (une série pour chaque pH) et laissée prendre en masse, puisensemencée par les cultures jeunes de *Lactobacillus* par la méthode d'inondation.

Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24heurs.

I.2.4.3. Croissance en présence de la bile

Pour réaliser ce test, deux fractions de bouillon MRS ont été utilisées. La première est dépourvue de la bile et la deuxième est additionnée de 0,3% de la bile. Ensuite les deux fractions ont été réparties en tubes. Chaque tube est additionné de 1ml d'inoculum d'une souche de *Lactobacillus*. Les tubes ont été ensuite incubés à 37°C où la croissance des ferments a été contrôlée par dénombrements sur boîtes de Pétri après quatre heures (Metlef et Dilmi- Bouras, 2009).

I.2.4.4. Résistance aux antibiotiques

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode des disques comme suit :

Les cultures bactériennes ont étéensemencées par inondation sur la surface de la gélose MRS et laissées séchées. Des disques préimprégnés d'antibiotique sont déposés ensuite sur la surface de la gélose. (Joffin et Leyral, 2006 ; Carip, 2008)

Dans notre étude le choix des antibiotiques étudiés n'est pas anodin mais justifié par leur utilisation dans notre pays.

I.2.4.5. Activité antibactérienne

- **Préparation des souches test**

Les souches cibles Entérobactéries (*Klebsiella*, *E.coli*, *Salmonella*), *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) ont étéensemencées sur bouillon nutritif et incubées à 37°C pendant 24 heures puis repiquées sur la gélose Hektoen pour les entérobactéries et Mueller-Hinton pour *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Les boites ont été incubées à 37°C pendant 24

- **Préparation des cultures indicatrices**

Cinq séries de boites de Pétri ont été réalisées, à raison de trois boites par série. Les trois premières séries ont été coulées par la gélose Hektoen fondue et refroidie à 45 °C et laissée prendre en masse. Chaque série de boites gélosés estensemencée par inondation d'une souche d'entérobactérie et laissée séchée.

La même technique est réappliquée pour les deux autres séries coulées par la gélose de Mueller-Hinton. Une série est inondée par la souche de *Staphylococcus aureus* et l'autre par celle de *Pseudomonas aeruginosa*.

- **Application**

Quatre puits ont été réalisés par boîte de Pétri de 5 mm de diamètre et chaque puits a été rempli par 20 µl d'une culture jeune de *Lactobacillus*.

Les boites ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

I.2.4.6. Effet des surnageant sur les entérobactéries

La méthode de Dilmi-Bouras, (2009) a été appliquée

- **Préparation du surnageant**

A partir de cultures jeunes des *Lactobacillus* en milieu MRS liquide, un volume de 4 ml a été centrifugé pendant 15min à 6 000 tours/min. puis le surnageant a été récupéré (représente la fraction extracellulaire) et divisé en deux fractions, une a été ajustée à pH6 et l'autre resté natif.

- **Technique**

Les géloses Hektoen et Mueller-Hinton fondues et refroidies à 45°C ont été coulées dans deux séries de boites de Pétri et laissées prendre en masse. Pour Chaque série de biotes nous avons appliqué la même technique déjà citée en II.2.4.5.

Des disques imbibes par 50 µl du surnageant natif de chaque souche de *Lactobacillus* ont été déposés sur les boites gélosées déjàensemencées à raison de quatre disques par boite. La même technique a été appliquée pour le surnageant neutre (pH6).

I.2.4.7. Test d'adhésion des bactéries *Lactobacillus* aux cellules épithéliales

La méthode décrite par Lin et al., (2007) a été appliquée.

- **Séparation des cellules épithéliales**

- Pour cette raison un fragment bien choisi de l'iléum du rat a été utilisé :
- ce fragment a été lavé, de tout son contenu, à l'aide d'une seringue stérile par une solution du PBS (tampon phosphate salée) (pH 7.2) ;
- il a été ensuite placé dans un bain de PBS et soumis à une réfrigération (4 °C/30 min), afin de faciliter la récupération des cellules de la muqueuse ;
- Après ce temps d'incubation, la préparation a été soumise à trois lavages successifs dans le PBS,
- les cellules ont été ensuite grattées sur une lame et mis en tube ;
- Des dilutions ont été préparées afin d'obtenir une concentration des cellules épithéliales de 5×10^4 cellules/ml approximativement.

- **Préparation de la culture bactérienne**

-Les cultures de *Lactobacillus* âgées de 20 heures ont été centrifugées pendant 15min à 6 000 tours/min. ensuite le culot a été récupéré et on lui a ajouté 1.5 ml du PBS,

À partir de la suspension obtenue, les dilutions décimales (V/9V) ont été préparées jusqu'à la dilution 10^{-8} .

- A partir de cette dernière une coloration simple a été réalisée avec de Violet de Gentiane additionné d'alcool suivi d'une observation microscopique pour confirmer que le nombre des cellules des *Lactobacillus* est approximativement $>1 \times 10^8$ cellules/ml.

- **Adhésion**

Une série de tubes a été utilisée dont 1 ml de chaque suspension des *Lactobacillus* a été ajouté puis mélangé avec 1 ml de la suspension des cellules épithéliales. Les tubes ont été ensuite incubés à 37°C pendant 45 min.

- **Préparation des frottis**

Sur une lame, un frottis a été préparé à partir d'une goutte d'un mélange de cellules (*Lactobacillus* + cellules épithéliales) et une goutte du cristal violet à 0.5 % pendant 5min.

L'observation microscopique a été faite à l'objectif $\times 100$.

I.2.5. Etude de quelques aptitudes technologiques des *Lactobacillus*

I.2.5.1. Etude de pouvoir acidifiant

La technique décrite par Simon et al, 2002 a été utilisée

Le dosage de l'acidité lactique par degré Dornic correspond à la neutralisation de l'acide par la solution de soude Dornic en présence d'un indicateur de couleur : la phénolphthaleine (5 goutte/10 ml).

- Une série de flacons stériles contenant 100 ml de lait écrémé à 9 % a été stérilisé etensemencé par les souches de *Lactobacillus*. Elle a été ensuite incubée à 37°C.
- Au cours de l'incubation et à des intervalles du temps de 2h, 4h, 6h, et 24h ; 10 ml du lait ont été prélevés et titrés par la soude Dornic (N/9) jusqu'au virage de couleur au rose.

L'acidité est donnée par la formule :

$$\text{Acidité } [D^0] = V_{(\text{NaOH})} \times 10.$$

$V_{(\text{NaOH})}$: Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique.

- Pour mesurer le pH des échantillons, un pH mètre a été utilisé.

I.2.5.2. Etude de pouvoir protéolytique

Deux techniques décrites par **Vuillemard, 1986** ont été utilisées

Pour la première technique

- Une série de boîtes Pétri contenant la gélose MRS additionnée de 10 % de lait écrémé (à 200 ml de lait écrémé dans 800 ml de gélose) a été préparée, coulée et solidifiée.

- Sur chaque boîte quatre disques de papiers buvard stérilisés ont été déposés sur la gélose et puis chaque disque a été imbibé de 20 μ l d'une culture jeune de *Lactobacillus*
Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

Pour la deuxième technique

Une série de 12 tubes de bouillon nutritif et une autre série de 12 tubes de bouillon nutritif additionnée du lait écrémé à 2% ont étéensemencées par des cultures jeunes de *Lactobacillus* sur des bouillons MRS-Lait (2%), puis ont été incubées à 37°C pendant 24heurs.

I.2.5.3. Etude de pouvoir texturant

La technique décrite par **Leveau et al, (1991)** a été utilisée

Une série de boîtes Pétri contenant la gélose hypersaccharosée, déjà coulée et solidifiée, a étéensemencée, en stries avec les différentes cultures de *Lactobacillus*.
L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24heurs.

I.2.5.4. Résistance aux arômes industriels

-20 flacons contenant chacun 100 ml de lait écrémé ont été additionnés par l'arôme de banane, à raison de deux doses 0,25 ml/L et 0,35 ml/l (dix flacons pour chaque dose).

- chaque flacon a étéensemencé par 1 ml d'une culture jeune de *Lactobacillus* et incubé à 37°C.
- La mesure de l'acidité et du pH a été effectuée aux temps suivants : T= 0h, T= 2h, T= 4h, T= 6h, T= 24h.

I.2.5.5. Test de coagulation

La technique décrite par **Guiraud, 2003** a été utilisée

- Dix flacons de 100 ml de lait écrémé stérile ont été préparés. Chacun a étéensemencé par 1 ml d'une culture jeune de *Lactobacillus* puis incubé dans l'étuve à 37°C.
-L'examen des flacons a été fait chaque deux heurs pour noter le temps nécessaire à la coagulation.



Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

II.1. Purification

La purification des vingt souches lyophilisées des bactéries lactiques sur la gélose MRS, nous a permis d'obtenir 27 souches pures.

Une souche pure retenue est celle dont les colonies sur boîte de Pétri étaient de même taille et de même couleur ce qui témoigne de sa pureté (Hariri et al, 2009).

II.2. Identification

II.2.1. Etude des caractères morphologiques

II.2.1.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique, des colonies obtenues sur gélose MRS, montre qu'elles sont circulaires ou lenticulaires, de couleur blanche, de taille variable à surface lisse, plus ou moins bombées et à contour régulier ou irrégulier.

Selon Hariri et al. (2009), les colonies des *Lactobacillus* présentent les mêmes caractéristiques retrouvées dans notre étude.



Photo 09: Aspect macroscopique des colonies d'une souche de *Lactobacillus*.

II.2.1.2. Examen microscopique

L'examen microscopique après coloration de Gram, a révélé que toutes les souches bactériennes présentaient la couleur bleue violacée de violet de gentiane, ce qui indique qu'il s'agit de bactéries à Gram positif.

En ce qui concerne la forme et la disposition des cellules, l'examen microscopique révèle deux formes: des bacilles et des coccobacilles, isolés ou en chaînettes plus ou moins longues.

Nos résultats concordent avec la littérature en ce qui concerne la couleur, la forme et la disposition des colonies de *Lactobacillus* (Hariri et al, 2009).



Photo 10 : Aspect microscopique de La souche *Lactobacillus*
(coloration de Gram, observation à grossissement x100)

II.2.2. Tests biochimiques et physiologiques

Les résultats des tests biochimiques et physiologiques sont illustrés dans le tableau X.

II.2.2.1. Recherche de catalase

L'étude de la catalase a révélé que seize souches étaient à catalase négative (pas d'apparition de bulles d'air), en revanche les onze restantes sont catalase positive (dégagement des bulles d'air).

Selon la littérature les *Lactobacillus* sont catalase négative par conséquent nous avons retenu que les seize souches qui étaient à catalase négative

II.2.2.2. Recherche du type fermentaire

Nos résultats montrent que:

- sur le milieu Gibson Abdel Malek, il n'y a aucun déplacement du bouchon de la gélose blanche pour les seize souches, ce qui indique que se sont des homofermentaires avec un pourcentage de 100 % (la photo 11) ;
- sur le milieu à lait écrémé, une coagulation en masse est obtenue dans tous les tubes ceci confirme le test précédent et révèle que les seize souches étudiées sont des homofermentaires.

Selon Euzéby (2010), les souches de *Lactobacillus* sont divisées en trois groupes :

- Les homofermentaires obligatoires qui dégradent les hexoses en acide lactique (exclusivement par la voie homofermentaire d'Emden Meyerhof) ;
- Les hétérofermentaires facultatifs qui métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire d'Emden Meyerhof et qui dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate ;

- Les hétérofermentaires obligatoires qui fermentent les hexoses en acide lactique, acide acétique ou éthanol et CO₂ et qui dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique.

Selon **Hariri et al. (2009)**, Les souches isolées chez l'homme sont généralement homofermentaires.



Photo 11 : Evaluation de type fermentaire sur milieu Gibson Abd Elmalek

II.2.2.3. Croissance à différentes températures

Nos résultats montrent que parmi les seize souches, il y a sept seulement qui ont la capacité de pousser à 46 °C, ce sont des thermophiles, alors que le reste ne le fait pas donc ce sont des mésophiles (se développent à 15 °C). Par contre les deux groupes se développent à 37 °C.

Selon **Euzéby (2010)**, La température optimale de croissance des *Lactobacillus* est généralement comprise entre 30 et 40 °C. Mais, selon les espèces, une culture peut être observée pour des températures variant de 2 à 53 °C.

D'après **Pilet et al., (2005)**:

- Les homofermentaires obligatoires se développent seulement à 45 °C ;
- Les hétérofermentaires facultatifs se développent à 15 °C et/ou 45 °C ;
- Les hétérofermentaires obligatoires se développent à 15 °C ;

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

II.2.2.4. Recherche de l'activité arginine dihydrolase ADH

D'après nos résultats, toutes les souches (100%) étaient ADH négatives ce qui explique leur incapacité à décomposer l'Arginine et libérer l'ammoniac par le système de l'arginine dihydrolase. Le test négatif se traduit par une couleur jaune du milieu de culture.

D'après Corriau et Luquet (2008):

- Les homofermentaires obligatoires sont ADH négatif ;
- Les hétérofermentaires facultatifs majoritairement ADH négatif ;
- Les hétérofermentaires obligatoires sont ADH positif ;

Selon la littérature, les *Lactobacillus* sont généralement ADH négatif

Tableau X : Caractères biochimiques et physiologiques des souches de *Lactobacillus* étudiées.

Souches	Forme	Gram	Catalase	Croissance		ADH	Types fermentaire
				15°C	45°C		
S1	CB	+	-	+	-	-	Homo
S2	B	+	-	+	-	-	Homo
S3	CB	+	-	+	-	-	Homo
S4	CB	+	-	+	-	-	Homo
S5	CB	+	-	-	+	-	Homo
S6	CB	+	-	-	+	-	Homo
S7	B	+	-	-	+	-	Homo
S8	B	+	-	-	+	-	Homo
S9	B	+	-	-	+	-	Homo
S11	B	+	-	-	+	-	Homo
S12	B	+	-	-	+	-	Homo
S13	B	+	-	+	-	-	Homo
S15	CB	+	-	+	-	-	Homo
S16	CB	+	-	+	-	-	Homo
S17	CB	+	-	+	-	-	Homo
S18	CB	+	-	+	-	-	Homo

CB : coccobacilles, B : bacilles, + : positif, - : négatif, Homo : homofermentaires

II.2.2.5. Profil fermentaire des sucres

Le profil fermentaire des sucres, des souches de *Lactobacillus* étudiées, est résumé dans le tableau (XI).

Tableau XI : Profil fermentaire des sucres.

Sucres Souches	Ribose	Mannose	Xylose	Galactose	Lactose	Saccharose
S1	-	-	-	+	+	-
S2	-	-	-	+	+	-
S3	+	+	V	+	+	+
S4	+	+	-	+	V	+
S5	-	+	-	+	+	+
S6	-	+	-	+	+	+
S7	-	-	-	-	+	-
S8	-	V	-	+	+	-
S9	-	V	-	+	+	-
S11	-	+	-	V	+	+
S12	-	+	-	+	+	+
S13	+	+	-	+	V	+
S15	+	+	V	+	+	+
S16	-	-	-	+	+	-
S17	-	-	-	+	+	-
S18	-	-	-	+	+	-

+ : Résultat positif, - : Résultat négatif, V : Résultat variable.

Une souche apte à fermenter le sucre mis au test, conduit à un virage de la couleur du milieu au jaune (test positif), celle inapte ne produit pas d'acide à partir de ce substrat et ne provoque aucun changement du milieu (test négatif), alors que celle ayant un métabolisme long vis-à-vis du substrat donne un changement partiel du milieu de culture (résultat variable).

Selon le tableau, la quasi totalité des souches de *Lactobacillus* étudiées est apte à fermenter le galactose et le lactose. En revanche, elle est incapable d'utiliser le xylose et le ribose. L'utilisation des deux sucres restants est variable selon les espèces.

Selon Joffin et Leryal (2006), L'utilisation d'un glucide signifie que le microorganisme possède:

- la capacité de faire pénétrer à l'intérieur de cytoplasme (perméase) le glucide, ou ses produits d'hydrolyse en cas d'hydrolyse extracytoplasmique ;

- les enzymes assurant son hydrolyse, si celle-ci est nécessaire ;
- les enzymes assurant la transformation en un ose directement assimilable par le métabolisme intermédiaire (glucose, fructose...) du / des glucides.

Le métabolisme des sucres va conduire notamment à la production de l'acide lactique et à un fort abaissement du pH, ce qui est recherché pour la fabrication des produits alimentaires. (Desmazaud, 1998).

II.2.3. L'identification des espèces

Les tests physiologiques et biochimiques appliqués sur les souches de *Lactobacillus* ont permis d'établir une banque de seize souches appartenant à sept espèces, et cela après d'avoir comparé les résultats obtenus à la bibliographie (Dacosta, 2000) (annexe V).

Les espèces du genre *Lactobacillus* identifiés sont illustrées dans le tableau (XII).

Tableau XII : le nom scientifique des espèces identifiées.

Souches	Nom scientifique d'espèce	Groupe
S1	<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	Streptobacterium
S2	<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	Streptobacterium
S3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Streptobacterium
S4	<i>Lactobacillus casei subsp casei</i>	Streptobacterium
S5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Thermobacterium
S6	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Thermobacterium
S7	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>	Thermobacterium
S8	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Thermobacterium
S9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Thermobacterium
S11	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis</i>	Thermobacterium
S12	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Thermobacterium
S13	<i>Lactobacillus casei subsp casei</i>	Streptobacterium
S15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Streptobacterium
S16	<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	Streptobacterium
S17	<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	Streptobacterium
S18	<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	Streptobacterium

Selon les résultats montrés par le tableau 12, toutes les souches des *Lactobacillus* étudiées appartiennent soit au groupe I : *Thermobacterium*, soit au groupe II : *Streptobacterium*, et aucune souche n'appartient au groupe III : *Betabacterium*.

Les espèces retrouvées dans notre étude en s'appuyant sur les données bibliographique montrent qu'elles sont d'origine humaine (Larpent et Larpent, 1985). Le tableau ci-dessous représente les noms scientifiques des souches étudiées et leurs pourcentages

Tableau XIII : Les noms scientifiques des souches étudiées et leurs pourcentages.

Nom scientifique d'espèce	Nombre	Code	Pourcentage (%)
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	5	Lb.1	31,25
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3	Lb.2	18,75
<i>Lactobacillus helveticus</i>	2	Lb.3	12,5
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	Lb.4	12,5
<i>Lactobacillus casei subsp casei</i>	2	Lb.5	12,5
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>	1	Lb.6	6,25
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis</i>	1	Lb.7	6,25

La répartition des espèces de *Lactobacillus* en pourcentage est illustrée par la figure ci-dessous.

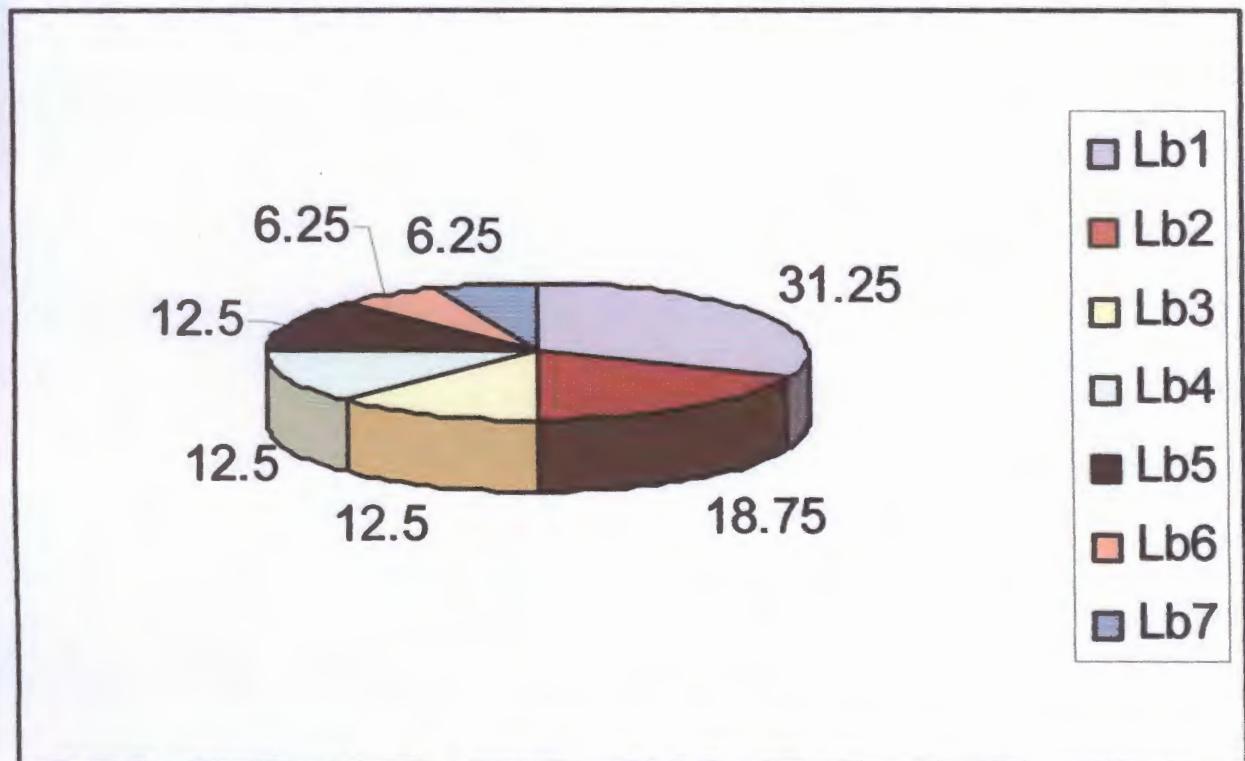


Figure 07 : Répartition des espèces en pourcentage

II.3. Etude de quelques aptitudes probiotiques

II.3.1. Estimation de croissance

Les résultats obtenus de la mesure de la densité optique (D.O) des souches de *Lactobacillus* sont portés dans le tableau (XIV).

Tableau XIV: Densité optique (D.O) des souches de *Lactobacillus* étudiées.

Espèces	Code	D.O
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S1	2.5013
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S2	2.5013
<i>Lactobacillus plantarum</i>	S3	2.5013
<i>Lactobacillus casei subsp casei</i>	S4	2.5013
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	S5	2.5013
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	S6	2.2692
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>	S7	2.5276
<i>Lactobacillus helveticus</i>	S8	2.4350
<i>Lactobacillus helveticus</i>	S9	2.2546
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis</i>	S11	2.5050
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	S12	2.5013
<i>Lactobacillus casei subsp casei</i>	S13	2.1754
<i>Lactobacillus plantarum</i>	S15	1.9050
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S16	2.3004
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S17	2.3339
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S18	2.4754

Les souches codées: S1, S2, S3, S4 et S5 représentent la même densité optique, et les autres souches restantes possèdent des densités optiques très proches.

Selon Carip .b. (2008), l'estimation de la croissance bactérienne diffère d'une espèce à une autre voir même d'une souche à une autre.

Les résultats obtenus sont justifiés par le dysfonctionnement de l'appareil de la spectrophotométrie utilisée au niveau de notre laboratoire.

II.3.2. Croissance sur milieu acide

Les résultats de la croissance, des souches de *Lactobacillus* étudiées, sur les milieux à deux pH différents (pH 3 et pH 4) sont représentés dans le tableau (XV).

Tableau XV: Résultats de la croissance sur les milieux à deux pH différents (pH 3 et pH 4)

Souches	pH 3	pH 4
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i> (S1,S2, S16, S17et S18)	+	++
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (S5, S6 et S12)	+	++
<i>Lactobacillus helveticus</i> (S8 et S9)	+	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> (S3 et S15)	+	++
<i>Lactobacillus casei subsp casei</i> (S4etS13)	+	++
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i> (S7)	+	++
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis</i> (S11)	+	++

D'après les résultats obtenus, il apparaît que les souches sont sensibles au milieu à pH 3 mais tolère mieux la gélose à pH 4. Il a été remarquable qu'il ya une réduction de nombre des colonies de *Lactobacillus* au fur et à mesure que le milieu devient acide.

Nos résultats sont en accord avec les données bibliographiques dont l'étude de l'effet du pH sur la croissance des souches de *Lactobacillus* a montré que ces dernières ont la capacité de croître sur les milieux acides (Guiraud et Rosec, 2004).

Les souches de *Lactobacillus* étudiées tolèrent les pH acides, par conséquent elles sont probablement capables de passer à travers l'estomac pour regagner leur site d'action.

II.3.3. Croissance en présence de la bile

Les résultats de l'étude de la tolérance des *Lactobacillus* à la bile sont illustrés dans le tableau (XVI).

Tableau XVI: les résultats de la résistance des souches de *Lactobacillus* à la bile

Souches	Après 4 h d'incubation à 37°C			
	Témoin		+ 0.3 % S.B	
	DO	U.F.C ×10 ⁷	D.O	U.F.C ×10 ⁷
S1	2.3553	1680	1.9099	392
S2	2.2986	2448	1.9478	980
S3	2.3075	1624	1.9639	464
S4	2.3079	2640	1.8954	2000
S5	2.2329	1976	1.6753	460
S6	2.1375	336	1.2971	In
S7	2.3977	2678	2.0701	1216
S8	2.2645	3248	1.6312	2800
S9	2.1826	678	1.7823	In
S11	2.3453	180	1.8340	464
S12	2.4205	3336	2.1669	832
S13	3.1140	3920	2.4702	928
S15	2.3553	4000	1.8652	1472
S16	2.4974	720	2.0648	In
S17	2.4325	63	2.1388	In
S18	2.3977	4176	2.0916	1056
In : indéterminée				

La diminution de la densité optique mesurée et du nombre de colonies dénombrées sur gélose MRS en présence de 0.3 % de la bile se traduit par la diminution de la biomasse des souches de *Lactobacillus*.

la présence de la bile inhibe plus ou moins la croissance des souches de *Lactobacillus*, ce qui conduit à une perte de la biomasse indiquant ainsi la sensibilité des souches vis-à-vis de la bile. Néanmoins, la présence de la bile n'inhibe pas totalement la croissance des souches dont le nombre reste supérieur à 10⁷ UFC.

Les souches qui présentent une meilleure tolérance à la bile après 4 heures d'incubation sont : S8, S4, S15, S7 et S18.

Selon Robin et Rochy (2001), il a été rapporté que la valeur commerciale d'un produit de santé naturelle ne dépend pas seulement du type de probiotiques utilisé, mais dépend aussi de sa concentration qui doit être suffisante et de son activité métabolique, ainsi lors de l'évaluation des

probiotiques, il est nécessaire de déterminer leur capacité à résister aux effets des sels pancréatiques et biliaires. Les souches dont les valeurs de la DO n'ont pas été déterminées ont été éliminées pour le reste de l'étude.

II.3.4. La résistance aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme sont illustrés dans le tableau (XVII).

Tableau XVII: Résultat de la croissance des *Lactobacillus* en présence d'antibiotiques.

Antibiotiques Souches	OX	P5	S10	T	AM	G20
S1	R	R	S	R	R	R
S2	R	S	R	R	R	R
S3	R	S	R	S	R	S
S4	R	S	R	S	S	R
S5	R	R	R	R	R	R
S7	R	R	R	S	R	S
S8	R	S	R	S	R	S
S11	R	S	R	S	R	R
S12	R	S	R	S	R	S
S13	R	R	R	R	R	R
S15	R	R	R	R	R	R
S18	S	R	R	S	R	S
OX : Oxaciline, P : Pénicilline, S : Streptomycine, T : Tétracycline, AM : Ampicilline, G : Sulfamide						
R : Résistantes, S : Sensibles.						

Les résultats obtenus montrent que:

- les souches S5, S13 et S15 sont résistantes à tous les antibiotiques utilisés, dont le diamètre d'inhibitions est supérieur à 15 mm. En revanche, chacune des autres souches présente une sensibilité à un, deux ou trois antibiotiques ;
- Toutes les souches présentent une résistance vis-à-vis de l'oxacilline, sauf la souche S18 ;
- Toutes les souches présentent une résistance vis-à-vis de streptomycine, sauf la souche S1 ;
- Toutes les souches présentent une résistance vis-à-vis de ampicilline, sauf la souche S4.

Parmi les critères biotechnologiques de sélection des probiotiques, la résistance à certains antibiotiques constitue un facteur important (Dacosta, 2006).

Selon Hamilton-Miller, les souches probiotiques qui sont résistantes aux antibiotiques sont intéressantes dans les traitements des maladies infectieuses nécessitant une antibiothérapie comme les diarrhées infectieuses et l'infection à *Helicobacter pylori*. Par contre, les autres souches sensibles sont utilisées par exemple dans le cas de l'intolérance au lactose.

Selon la littérature, les souches : S5, S13 et S15 montrant un profil de résistance intéressant sont primordial dans le traitement des maladies infectieuses nécessitant une antibiothérapie.

Pour les diamètres d'inhibition (annexe V).

II.3.5. Activité antibactérienne

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne des souches de *Lactobacillus* étudiées, sur les germes tests, sont résumés dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII: Résultats de l'activité antibactérienne des souches de *Lactobacillus* étudiées sur des germes tests.

Souches cibles Souches indicatrices		<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>
		<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S1	10	13	10	12	9
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S2	11	15	10	8	13		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	S3	9	15	11	12	10		
<i>Lactobacillus casei subsp casei</i>	S4	10	28	9	13	9		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	S5	11	15	11	8	15		
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>	S7	15	13	28	29	15		
<i>Lactobacillus helveticus</i>	S8	10	12	7	28	13		
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis</i>	S11	10	10	12	12	12		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	S12	8	11	16	12	14		
<i>Lactobacillus casei subsp casei</i>	S13	10	15	10	13	12		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	S15	10	15	30	11	11		
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S18	10	16	15	10	15		

D'après les résultats obtenus, il en ressort que la plupart des souches de *Lactobacillus* inhibent la croissance d'*E. coli* avec des zones d'inhibitions importantes surtout pour la souche S7 et S15 qui présentent des diamètres de 30 et 28 respectivement. Par ailleurs, les souches S7, S13, S15 et S18 présentent des profils d'inhibitions intéressants aussi bien pour les espèces tests Gram positives *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* que sur les bactéries tests Gram négatives.

Les photos 12 et 13 montrent les zones d'inhibitions résultant de l'action des souches de *Lactobacillus* sur les *Salmonella* et les *Staphylococcus aureus*.

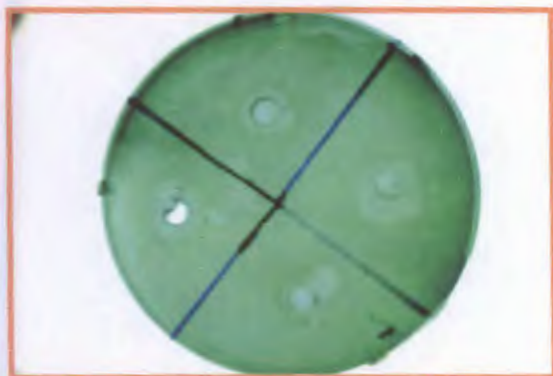


Photo 12 : Effet antagonisme d'une souche étudiée vis-à-vis les *Salmonella*.

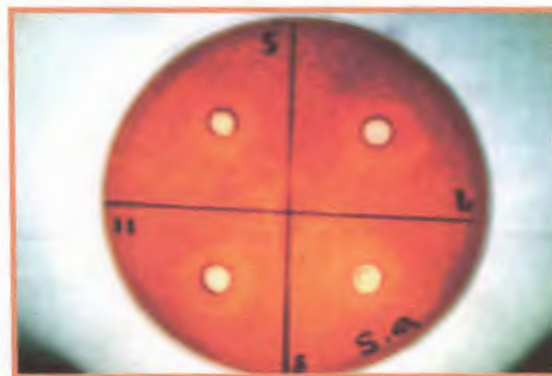


Photo 13 : Effet antagonisme d'une souche étudiée vis-à-vis *Staphylococcus aureus*.

Selon Metlef et Dilmi-Bouras (2009), les souches lactiques ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis des espèces tests; elles montrent des variations plus ou moins importantes qui dépendent de la souche cible elle-même et de la souche lactique (indicatrice).

Le pouvoir antimicrobien des *Lactobacillus* repose, entre autre, sur la production majoritaire de l'acide lactique qui provoque un abaissement du pH jusqu'à 4.5 – 4.8. Celui-ci ne nuit nullement aux bactéries lactiques mais il nuit aux autres germes sensibles aux pH acides (Dacosta, 2006).

Selon Servin (2003), il est très évident que les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium* colonisant l'intestin, développent des activités antimicrobiennes qui participent à la défense du système gastro-intestinal de l'hôte.

II.3.6. Effet de surnageant natif et neutre

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne du surnageant (natif et neutre) des souches de *Lactobacillus*, sur les germes tests, sont résumés dans le tableau (XIX).

Tableau XIX : les effets du surnageant natif et neutre sur les germes tests.

Souches cibles Souches indicatrices		pH natif				pH neutre			
		<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>
		Diamètre d'inhibition en mm							
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S1	20	10	13	11	14	10	10	13
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S2	12	12	10	14	0	0	10	10
<i>Lactobacillus plantarum</i>	S3	14	13	12	14	10	12	0	9
<i>Lactobacillus casei subsp casei</i>	S4	14	12	11	14	12	12	9	9
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	S5	15	14	10	9	10	12	12	11
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>	S7	12	11	10	13	0	10	11	12
<i>Lactobacillus helveticus</i>	S8	11	16	11	12	12	14	5	11
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis</i>	S11	13	15	10	12	10	12	9	9
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	S12	16	13	11	14	12	0	11	0
<i>Lactobacillus casei subsp casei</i>	S13	20	13	12	9	10	10	10	8
<i>Lactobacillus plantarum</i>	S15	15	11	13	14	20	15	12	7
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S18	12	13	13	9	15	10	12	7

D'après ces résultats, on constate la présence d'une variation répandue et importante, et l'activité des surnageants natifs n'étant pas semblable envers la collection des souches cibles. Les zones d'inhibition sont plus ou moins intéressantes dont les diamètres sont situés entre: 9 et 20 mm.

Par ailleurs, les surnageants neutres ne montrent pas tous une activité inhibitrice sur tous les germes tests, par exemple pour la souche 2 on remarque, que contrairement au surnageant natif, le surnageant neutre est inactif sur les bactéries Gram négatifs *E coli* et *Klebsiella* ceci explique que l'activité antibactérienne de cette souche est due à l'acide lactique et pas aux autres métabolites tels que les bactériocines.

Ces résultats montrent que les substances actives présentes dans les deux surnageants n'ont pas la même efficacité envers la collection des souches cibles.

Selon la littérature, l'activité du surnageant natif est due à l'action des métabolites synthétisés par les *Lactobacillus* (acide lactique, bactériocines, peroxyde d'hydrogène...). Par contre, l'action du surnageant neutre (neutralisation de l'acidité de l'acide lactique par la soude) est due aux bactériocines ou aux autres métabolites.

Selon Pilet et al., (2005), des substances antimicrobiennes synthétisées par les probiotiques ne sont pas toutes élucidées.

L'utilisation du surnageant des *Lactobacillus* contre la collection des entérobactéries et de *Staphylococcus aureus* fait partie des tests d'appréciation des aptitudes probiotiques. Les souches de *Lactobacillus* S1, S5, S8, S13 et S15 présentent une activité inhibitrice intéressante.

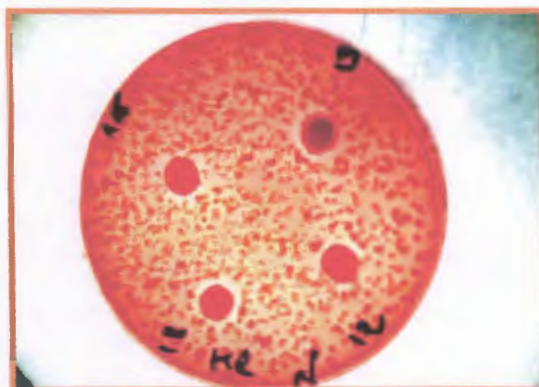


Photo 14 : Effet de surnageant natif sur les *Klebsiella*

II.3.7. L'adhésion des souches *Lactobacillus* aux cellules épithéliales

La méthode appliquée pour cette étude est celle décrite par Lin et al. (2007). Elle nous a permis d'avoir les résultats portés dans le tableau (XX).

Tableau XX : L'adhésion des souches de *Lactobacillus* étudiées aux cellules épithéliales

Souches	Code	Test	Lecture
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S1	+	Adhésion
<i>Lactobacillus casei subsp casei</i>	S4	++	Excellente adhésion
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	S5	+	Adhésion
<i>Lactobacillus helveticus</i>	S8	+	Adhésion
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis</i>	S11	+	Adhésion
<i>Lactobacillus casei subsp casei</i>	S13	+	Adhésion
<i>Lactobacillus plantarum</i>	S15	+	Adhésion
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	S18	++	Excellente adhésion

Toutes les souches de *Lactobacillus* étudiées ont la capacité d'adhérence aux cellules épithéliales du l'iléum du rat comme le montre la photo 15 prise pour deux souches étudiées.

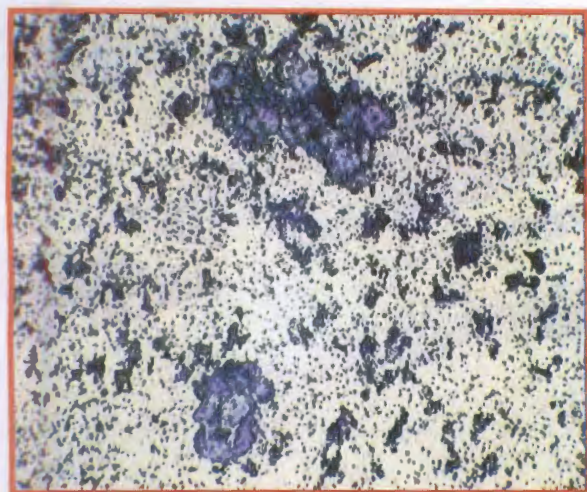


Photo 15 : L'adhésion de deux souches de *Lactobacillus* étudiées aux cellules épithéliales du l'iléum du rat.

D'après les résultats, il apparaît que les deux souches S4 et S18 présentent une excellente adhésion caractérisée par un nombre assez important de cellules de *Lactobacillus* fixées sur les cellules épithéliales. Alors que les autres souches présentent une adhésion modérée.

Par ailleurs, **Dunne et al. (2001)** ont étudié cette propriété dans l'intestin humain et ils ont aboutis à des résultats confirmant la bonne adhésion de *Lactobacillus* en comparant avec *Lb. rhamnosus*, bien qu'un faible degré d'adhérence marqué avec les souches de *Bifidobactérium*.

Selon **Alerge, (2009)**, l'adhérence aux cellules épithéliales de l'intestin de l'hôte constitue un critère primordial dans le choix d'une souche probiotique. En effet, le mécanisme d'action des probiotiques, pour l'inhibition des bactéries pathogènes et la stimulation du système immunitaire, implique leur adhésion sur l'épithélium intestinal de l'hôte.

D'après **Robin et Rouchy (2001)**, les bactéries probiotiques devraient être capables de survivre en grand nombre aux conditions acides de l'estomac et aux sels biliaires de l'intestin lors de la consommation de produit, puis d'adhérer aux cellules épithéliales de l'intestin afin de produire les effets bénéfiques désiré le plus longtemps possible.

II.4. Etude de quelques aptitudes technologiques des *Lactobacillus*

II.4.1. Etude du pouvoir acidifiant

Les résultats de l'étude du pouvoir acidifiant par la mesure de l'acidité Dornic et de pH sont mentionnés dans le tableau (XXI).

Tableau XXI: Résultats de l'évolution de l'acidité Dornic et du pH des souches de *Lactobacillus* étudiées.

Souches \ Temps	T= 0h		T= 2h		T= 4h		T= 6h		T= 24h	
	pH	°D	pH	°D	pH	°D	pH	°D	pH	°D
S1	6.60	15	6.53	20	6.41	24	6.34	26	5.45	60
S2	6.54	15	6.53	20	6.43	21	6.34	32	5.75	57
S3	6.52	20	6.49	27	6.43	28	6.31	35	5.68	69
S4	6.54	15	6.55	17	6.45	21	6.29	35	5.92	70
S5	6.54	20	6.50	27	6.43	28	6.33	30	5.80	53
S7	6.59	16	6.48	24	6.44	30	6.22	32	5.50	65
S8	6.55	15	6.46	19	6.41	31	6.21	32	5.30	75
S11	6.53	18	6.50	20	6.46	31	6.31	35	5.40	72
S12	6.65	15	6.50	19	6.44	26	6.28	32	5.23	81
S13	6.54	19	6.52	20	6.50	27	6.41	28	5.75	58
S15	6.54	25	6.48	28	6.44	30	6.25	32	5.53	67
S18	6.54	25	6.47	28	6.44	30	6.37	32	5.64	69

Les mesures effectuées sur les douze souches montrent une variation modérée de l'acidité produite le long de la durée de la croissance.

Selon ces résultats, il apparaît clairement qu'il y a une hétérogénéité dans la production de l'acide lactique au sein des souches.

Dans un premier temps, deux heures après l'incubation les valeurs du pH varient entre 6,46 et 6,53. En parallèle, les valeurs de l'acidité se situent dans l'intervalle [17, 28]. Cela est dû au commencement de l'adaptation avec le milieu et l'assimilation du lactose par les souches de *Lactobacillus*.

Dans un deuxième temps et au cours de la fermentation, le pH a connu une chute modérée pour atteindre une valeur de 5,23 avec une valeur d'acidité de 81.

Les résultats du même tableau, montre que la souche possédant une forte activité acidifiante est *Lb. acidophilus* codée S12 qui produise une quantité de 8,1g d'acide lactique par 1L de lait, la souche qui produit une quantité moyenne de 6,7g d'acide lactique par 1L de lait est la souche

Lb. Plantarum codée S15. En revanche, il apparait que la souche *Lb. acidophilus* codée S5 est la moins performante par une production de 5,3 g d'acide lactique par 1L de lait.

Les résultats obtenus autorisent à dire qu'il existe une relation étroite entre le pH et le degré Dornic c-à-d une diminution du pH est accompagnée d'une augmentation de la quantité d'acide lactique.

L'abaissement du pH est dû à la production de l'acide lactique par l'hydrolyse de lactose de lait par la Beta-galactosidase, le glucose et le galactose ainsi libéré seront fermentés pour produire des composés acides, cette production amène a un abaissement du pH et pouvant aller jusqu'à la coagulation (Prescott et al., 2003.b).

L'activité acidifiante est un important critère de sélection des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Le processus étroitement associé à la croissance bactérienne se traduit par l'accumulation progressive d'acide lactique dans le milieu de culture, pour cela et pour des objectifs technologiques notamment en laiterie et en fromagerie il est très intéressant de préciser le pouvoir acidifiant des souches lactiques (Corriau et Luquet, 2008).

La vitesse d'acidification du lait dépend de la composition plus ou moins adaptée à la croissance des bactéries lactiques, du taux d'ensemencement, de l'activité des ferments, de la présence éventuelle d'inhibiteurs ou de bactériophages et de la conduite de la fermentation (Luquet et Corriau, 2005).

La quantité d'acide lactique produite par les bactéries lactiques est variable selon la tolérance des souches au pH bas et aussi selon leurs performances, cette production est très importante en transformation alimentaire car l'acide lactique permet la stabilisation microbienne de nombreux produits (Branger, 2004).

II.4.2. Etude du pouvoir protéolytique

Le tableau (XXII) illustre les résultats d'hydrolyse des protéines par les souches de *Lactobacillus*.

Tableau XXII: les résultats de l'activité protéolytique des souches de *Lactobacillus* étudiées. .

Souche	Activité protéolytique			
	Sur bouillon nutritif			Sur gélose MRS+ lait écrémé
	T= 5 h	T= 20 h	T= 24 h	Diamètre (cm)
S1	+++	++++	+++++	6.5
S2	++	+++	+++++	6
S3	+++	++++	+++++	4.5
S4	+	+++	+++++	6
S5	-	++	++++	5
S7	+	+++	++++	5.5
S8	+++	++++	+++++	5.5
S11	+++	++++	+++++	6
S12	+++	+++	+++	5.8
S13	+	+	+++	6.5
S15	+++	++++	+++++	7
S18	-	++	++++	5.5

Les résultats obtenus sur le milieu MRS additionné du lait écrémé à 10 % montrent que nos souches présentent des zones d'hydrolyse de diamètre allant de 4.5 cm à 7 cm. La photo 16 montre l'effet protéolytique d'une souche de *Lactobacillus* étudiée sur gélose MRS à 10% de lait

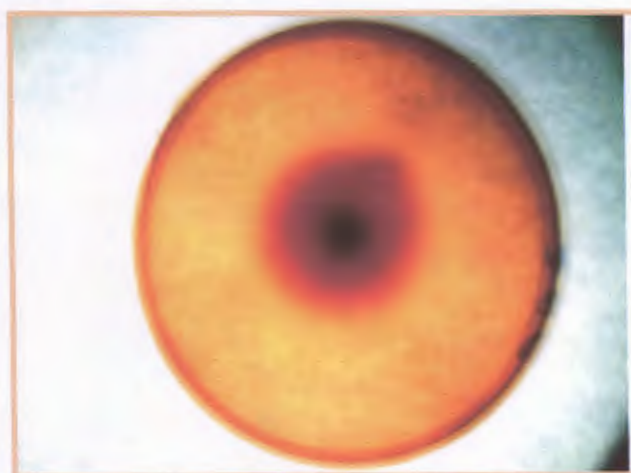


Photo 16: L'effet protéolytique d'une souche de *Lactobacillus* étudiées sur gélose MRS à 10% de lai.

Selon **Vuillemand, (1986)**, la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre, sur gélose MRS, comprise entre 5 mm et 15 mm. Donc toutes nos souches ont un pouvoir protéolytique très intéressant.

Sur les milieux liquides, un culot blanchâtre au fond des tubes a été observé.

Selon le même auteur, l'observation d'un culot blanchâtre au fond du tube et la clarification des milieux témoignent de la présence d'une bonne activité protéolytique. Ce qui confirme les résultats observés sur le milieu MRS additionné du lait (photo 17).



1



2

Photo 17 : L'effet protéolytique des souches de *Lactobacillus* étudiées sur bouillon nutritif additionné de 2% de lait. En (1) une comparaison entre le témoin et une souche positive. En (2) test positif des souches

D'après **Leveau et al., 1991**, l'aptitude protéolytique est liée à la présence de gène codant pour cette activité car les propriétés technologiques des bactéries lactiques sont portées par les plasmides. Elle est recherchée pour l'amélioration de la qualité organoleptique de l'aliment surtout le fromage et yaourt.

Selon la littérature, les *Lactobacillus* sont peu protéolytiques par ailleurs nos résultats montrent que les souches étudiées sont très protéolytiques ceci montre la particularité de nos souches locales.

II.4.3. Etude du pouvoir texturant

Les résultats de la production des polysaccharides par les souches de *Lactobacillus* étudiées sont présentés dans le tableau (XXIII).

Tableau XXIII : production d'exo polysaccharides par les *Lactobacillus* étudiées

Souches	Evaluation du test	Observation	Signification
S1	+	Colonies peu gluantes	Croissance avec production de polysaccharides
S2	+	Colonies peu gluantes	Croissance avec production de polysaccharides
S3	+	Colonies peu gluantes	Croissance avec production de polysaccharides
S4	++	Colonies large, gluantes avec aspect brillant	Croissance avec production de polysaccharides
S5	++	Colonies large, gluantes avec aspect brillant	Croissance avec production de polysaccharides
S7	+++	Colonies large, gluantes avec aspect brillant	Croissance avec production de polysaccharides
S8	++	Colonies large, gluantes avec aspect brillant	Croissance avec production de polysaccharides
S11	++	Colonies large, gluantes avec aspect brillant	Croissance avec production de polysaccharides
S12	+++	Colonies large, gluantes avec aspect brillant	Croissance avec production de polysaccharides
S13	+++	Colonies large, gluantes avec aspect brillant	Croissance avec production de polysaccharides
S15	++	Colonies large, gluantes avec aspect brillant	Croissance avec production de polysaccharides
S18	++	Colonies large, gluantes avec aspect brillant	Croissance avec production de polysaccharides

Au vu de nos résultats, des colonies larges et gluantes ont été observées sur la gélose hypersaccharosée avec un pourcentage de 75%.

Le pouvoir texturant d'une bactérie lactique se traduit par la production d'exopolysaccharides. Le résultat positif se traduit par l'apparition de colonies larges et gluantes avec aspect brillant sur la gélose hypersaccharosée.

En générale, la composition, la structure et la taille d'EPS est relativement fixe pour une souche donnée ainsi, seule la quantité produite est réellement variable selon les conditions de culture des souches (Luquet et corriau, 2005).

Nos souches ont un pouvoir texturant avec une production plus remarquable pour les souches *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus*, *Lb. Acidophilus* et *Lb. casei subsp casei* codées S7, S12, S13 respectivement.

D'après les résultats du même tableau, il apparaît que l'activité texturante varie entre les souches de même espèce. Par exemple, la souche *Lb. casei subsp tolerans* codée S18 possède un pouvoir filant plus remarquable que celles codées S1 et S2.

Le pouvoir filant ou épaississant dépend d'un nombre de facteurs, notamment de la nature des souches et des conditions de culture, ainsi il a été montré que la production des polysaccharides est un caractère plus ou moins instable chez certains souches de bactéries lactiques mésophile où il est porté sur un plasmide (Luquet et Corriau, 2005).

L'aptitude texturante des *Lactobacillus* est l'un des facteurs les plus importants dans l'industrie laitière, par l'apport des propriétés technologiques recherchées. L'utilisation des souches de *Lactobacillus* productrices d'EPS augmente la viscosité du produit en reformant sa texture et son comportement rhéologique (Leveau et Bouix, 1993).

De ce fait on suppose que nos souches codées S7, S12 et S13 peuvent être destinées pour la fabrication du yaourt en améliorant leur onctuosité

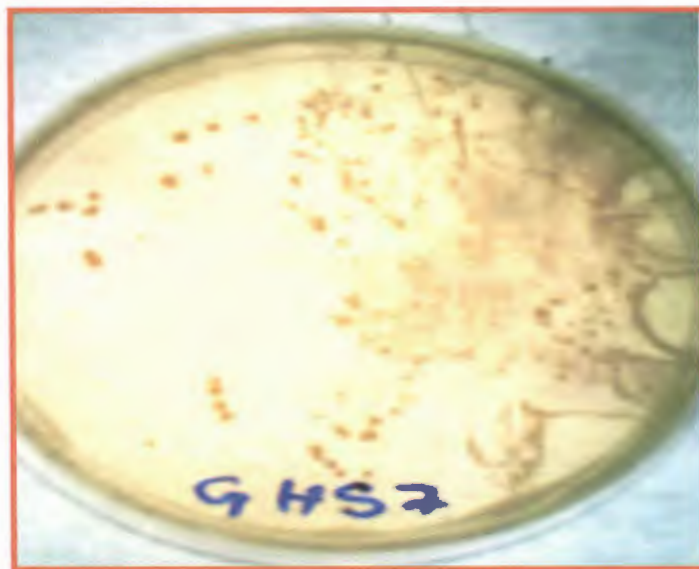


Photo 17 : production d'exopolysaccharide par une souche de *Lactobacillus* étudiées

II.4.4. Effet des arômes industriels sur l'acidification

Les résultats de l'effet de l'arôme banane sur le pouvoir acidifiant des *Lactobacillus* sont représentés dans le tableau (XXIV).

Tableau XXIV : la résistance des souches de *Lactobacillus* étudiées aux arômes industriels

		T= 0h		T= 2h		T= 4h		T= 6h		T= 24h	
		pH	°D	p	°D	pH	°D	pH	°D	pH	°D
S1	0.25	6.72	24	6.58	27	6.56	28	6.56	28	5.76	65
	0.35	6.70	25	6.59	27	6.58	28	6.50	32	5.71	75
S3	0.25	6.75	20	6.60	21	6.58	22	6.53	27	5.70	70
	0.35	6.86	19	6.58	21	6.55	22	6.50	25	5.60	78
S4	0.25	6.86	17	6.58	20	6.54	22	6.49	27	5.78	40
	0.35	6.90	17	6.60	19	6.53	25	6.49	28	5.68	55
S5	0.25	6.86	18	6.57	22	6.52	25	6.48	27	5.65	60
	0.35	6,90	15	6.61	21	6.51	25	6.50	25	5.74	75
S8	0.25	6.88	18	6.61	20	6.48	22	6.48	23	6.10	28
	0.35	6.88	18	6.62	20	6.50	26	6.49	26	5.90	30
S11	0.25	6.87	17	6.59	18	6.50	20	6.49	20	5.82	47
	0.35	6.87	15	6.59	20	6.50	23	6.48	24	5.86	45
S12	0.25	6.89	16	6.61	25	6.48	27	6.48	27	5.94	35
	0.35	6.90	18	6.60	24	6.51	26	6.50	27	5.96	35
S13	0.25	6.90	16	6.59	21	6.51	23	6.49	24	5.91	40
	0.35	6,87	20	6.59	21	6.48	25	6.48	25	5.93	40
S15	0.25	6.85	20	6.56	21	6.51	22	6.51	25	5.62	55
	0.35	6.90	18	6.58	20	6.50	25	6.50	25	5.72	60
S18	0.25	6.90	21	6.56	27	6.50	29	6.49	30	5.92	45
	0.35	6.88	20	6.59	21	6.51	23	6.50	25	5.93	42

D'après nos résultats on constate que :

- le pH des laits fermentés a connu une diminution lente au cours de temps de l'incubation ;
- l'adjonction de l'arôme n'influence pas vraiment l'acidité et le pH de lait ;
- pour certaines souches, l'acidité et le pH sont peu influencés par la dose d'arome. La fermentation en présence d'une dose de 0.35 ml/L est un peu plus rapide que celle en présence d'une dose de 0.25 ml/L.

Une souche utilisée dans l'industrie du yaourt doit résister à l'action des arômes.

D'après nos résultats on remarque que les souches de *Lactobacillus* ont été généralement peu influencées par l'effet de l'arôme de banane quelque soit la dose. Les souches les plus résistantes sont : S3, S4, S5 et S15.

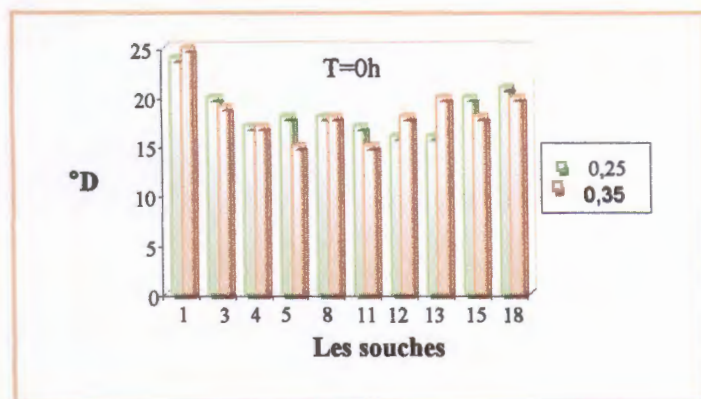


Figure 08 : Histogramme des quantités de l'acidité Dornic produite par les *Lactobacillus* à différentes concentrations de l'arôme à T = 0 h.

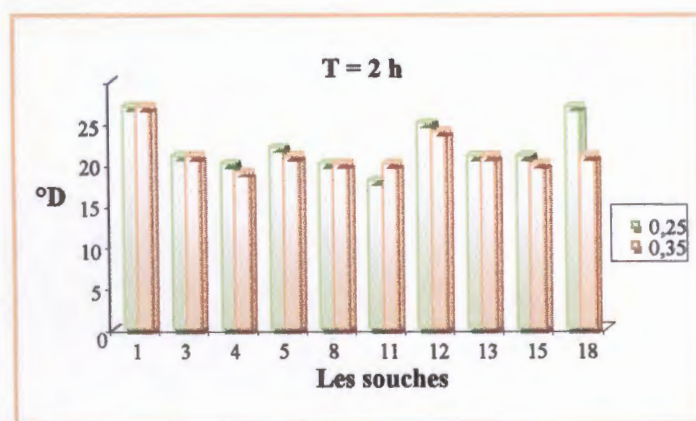


Figure 09 : Histogramme des quantités de l'acidité Dornic produites par les *Lactobacillus* à différentes concentrations de l'arôme à T = 2h.

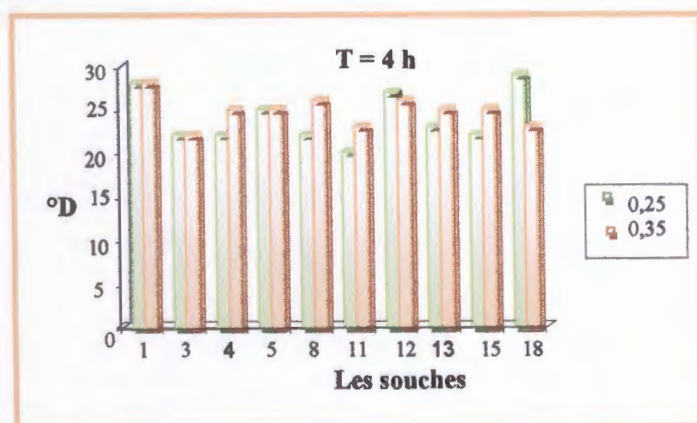


Figure 10 : Histogramme des quantités de l'acidité Dornic produites par les *Lactobacillus* à différentes concentrations de l'arôme à T = 4 h..

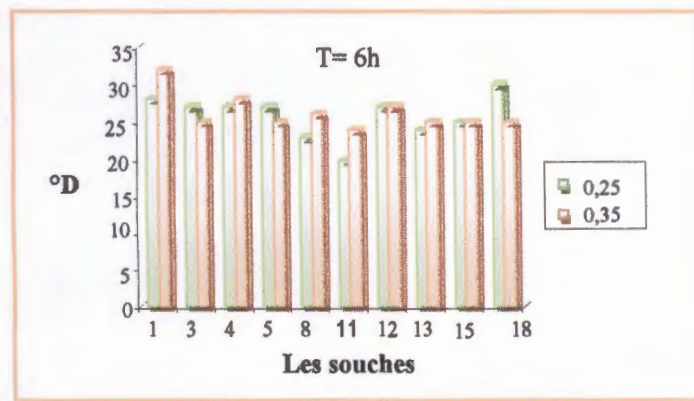


Figure 11 : Histogramme des quantités de l'acidité Dornic produites par les *Lactobacillus* à différentes concentrations de l'arome à T = 6 h..

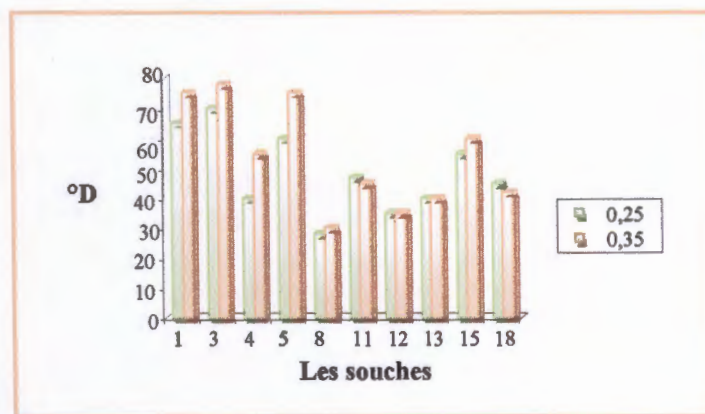


Figure 12 : Histogramme des quantités de l'acidité Dornic produites par les *Lactobacillus* à différentes concentrations de l'arome à T = 24 h.

II.4.5. Test de coagulation

Les résultats du test de la coagulation du lait par les souches de *Lactobacillus* étudiées sont résumés dans le tableau (XXV).

Tableau XXV : L'effet coagulant des souches de *Lactobacillus* étudiées sur le lait.

Souches	Coagulation après 24h d'incubation	Poids de lactosérum	Poids de coagulum	La consistance du coagulum
S1	+	52.84	43.26	Friable
S3	+	79.39	28.27	Friable
S4	+/-	/	/	/
S5	+	77.21	28.87	Friable
S8	+	46.04	50.98	Tenace
S11	+	62.17	42.51	Friable
S12	+	51.50	48.38	Friable
S13	+	43.60	60.16	Tenace
S15	+	53.54	54.94	Tenace
S18	+	39.34	68.24	Tenace

+ : Test positif, +/- : coagulation incomplète

Après le temps d'incubation toutes les souches de *Lactobacillus* étudiées, sauf la souche codée S4, présentent un pouvoir coagulant qui varie d'une souche à une autre.

On remarque que les souches codées S8, S13, S15 et S18 produisent les quantités de coagulum les plus intéressantes avec les valeurs de 50.98g, 60.16g, 54.94g et 68.24g respectivement; ce coagulum est caractérisé par une consistance tenace. Par contre il est friable avec les autres souches.

Le tableau ci-dessous présente les pourcentages du lactosérum et ceux du coagulum produits lors de la coagulation.

Tableau XXVI : Les pourcentages des deux composants résultant de la coagulation.

Souches	Lactosérum (%)	Coagulum (%)
S1	54.98	45.01
S3	73.74	26.25
S4	/	/
S5	72.78	27.22
S8	47.45	52.54
S11	59.39	40.61
S12	51.56	48.44
S13	42.02	57.98
S15	49.36	50.64
S18	36.57	63.43

La figure 13 montre les pourcentages des différentes parties issues de la coagulation

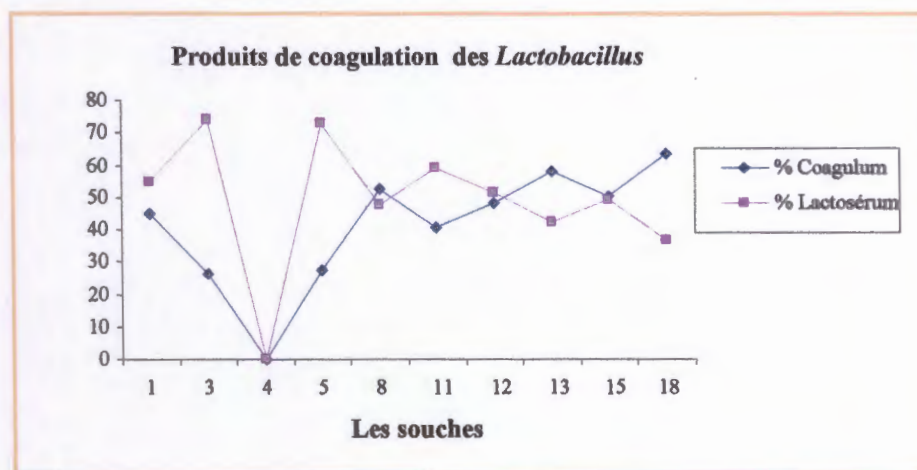


Figure 13: Courbes représentatives de différents produits de coagulation

L'intérêt de la coagulation est de permettre la concentration des constituants du lait, par la séparation du caillé (concentré) et du lactosérum (très riche en eau). Cette coagulation est la principale fonction des bactéries lactiques. Elle correspond à la précipitation des protéines rendues insolubles par l'abaissement du pH dû à l'acide lactique (Desmazeaud, 1998)

Généralement la coagulation du lait est dû à l'effet de l'acide lactique qui précipite la caséine entière déminéralisée ; ce mode de coagulation, ou de floculation, est peu utilisée par la fromagerie. Il donne un caillé friable (Alais et Linden, 1997) par contre il est utilisé dans d'autres produits laitiers

Les souches codées S8, S13, S15 et S18, produisant des quantités intéressantes de coagulum, présentent un intérêt industriel.



Conclusion

Lors de cette étude et dans un premier temps, les souches lyophilisées de *Lactobacillus* ont été revivifiées, purifiées et identifiées au moyen des tests physiologiques et biochimiques.

Ainsi, une banque de 16 souches de *Lactobacillus* a été mise en place et dénommée : *Lactobacillus casei subsp tolerans*, *Lactobacillus casei subsp tolerans*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei subsp casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp lactis*. a été codées : S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S11, S12, S13, S15, S16, S17 et S18 en raison de l'absence de identification par logiciel API LAB.

Le deuxième temps a été axé sur l'évaluation de quelques aptitudes technologiques des souches de *Lactobacillus*, ainsi que de leurs aptitudes probiotiques.

L'étude de quelques aptitudes technologiques des souches de *Lactobacillus*, à savoir l'aptitude acidifiante, l'aptitude texturant et celle protéolytique, a montré que :

- la majorité de nos souches sont faiblement acidifiantes avec un maximum de 7.8 g d'acide lactique / L de lait produit par la souche S3 après 24h d'incubation à 37 °C.
- les souches étudiées ont la capacité de synthétiser les polysaccharides et d'exercer un potentiel protéolytique très intéressant avec un pourcentage de 100 %. Ce qui contribue à modifier la texture des produits laitiers.

L'étude des aptitudes probiotiques des souches de *Lactobacillus* a montré que :

- la majorité des souches résiste aux conditions hostiles du tube digestif *in vitro* à savoir la présence de sels biliaires à une dose de 0,3 %. Cette résistance s'est traduite par une croissance des souches lors de leur incubation ;
- nos souches sont globalement résistantes aux antibiotiques ;
- l'activité inhibitrice de ces souches vis- a-vis des entérobactéries, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* est remarquable avec des zones d'inhibition très variable d'une espèce à l'autre. Cependant, il apparaît que les surnagent natifs et neutres exercent une inhibition très variables envers les souches de la même collection avec mais avec des spectres moins importants ;
- nos souches possèdent un pouvoir adhésif très remarquable avec une très aptitudes de souches : S4 et S18.

À l'instar des résultats obtenus au cours de notre étude expérimentale, 10 souches répondent aux critères de sélection des probiotiques selon les tests appliqués. Les souches identifiées présentent des de ce fait des intérêts technologiques et probiotiques.

Ce travail était une bonne occasion pour l'amélioration de nos connaissances sur les *Lactobacillus*, leur action probiotique, leur effet sur la santé et aussi leur utilisation en biotechnologie.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Adrian J., Potus J. et Frangne A., 2003.** La science alimentaire de A à Z (dictionnaire). 3^{ème} édition. *TEC & DOC, Lavoisier*. Paris : 66, 67, 291,41
2. **Ait Belgnaoui A., 2006.** Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. Thèse de doctorat. Toulouse : 15-22.
3. **Alais C. et Linden G., 1997.** laits et produits laitiers in : « *Biochimie alimentaire* ». 4^{ème} édition. *Masson*. Paris: 167-188.
4. **Alerge E.L., 2009.** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de doctorat N° 136 : 7-49.
5. **Allinset, 2007.** Les probiotiques de nombreux effets préventifs et curatifs. **15** : 1- 12.
6. **Anonyme, 1991.** Commission directive of 14 May 1991 on infant formula and follow-on formulae. *Off. J. Eur. comm*, **34 (L175)** :35-49
7. **Ashraf M., Arshad M., Siddique M. et Muhammad G., 2009.** Sélection in vitro, et isolés localement des espèces de *Lactobacillus* pour propriétés probiotiques. *Vet Pakistan*. Thèse de doctoat : 186- 190
8. **Baliarda A., 2003.** Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approches physiologiques et génétiques. Thèse de doctorat N° 2747. Bordeaux : 17- 23.
9. **Bergmaier D., 2002.** Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lb. rhamnosus* rw-9595m d'un milieu à base de perméat de Lactosérum. Thèse de doctorat. *QUEBEC* : 2-10.
10. **Bernet-Cmarad M.F., Lievin V., Brassart D., Neeser J.R., Servin A.L. et Hudault S., 1997.** The human *Lactobacillus acidophilus* strain secrets on bacteriocin antibacterial substances active in vivo and in vitro. *Appl. Environ. Microbiol*, **63**: 2747-2753.
11. **Bolcé J-k. et Thomann C., 2005.** Effets de probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. **20** : 44- 45.
12. **Bonnet J., 2000.** Prébiotiques et probiotiques : Facteurs clé de l'équilibre intestinal. N°9 : 1-6.
13. **Bousseboua H., 2002.** Techniques d'étude des bactéries in : « *Éléments de Microbiologie* ». 2^{ème} édition. Algérie : 145-157.
14. **Boutron-Ruault M.C., 2006.** Probiotiques et cancer colorectal. Inserm ERI-20. roussy : 1-11.
15. **Braegger C. et Zurich, 2002.** Le rôle des probiotiques dans la prévention et le traitement de la gastro-entérite aiguë chez l'enfant. Vol.13 N° 6 : 50-53.
16. **Branger A., Madebine R.M. et Roustel S., 2007.** Fermentation, ferment et stratégie in : « *Microbiologie et alimentation* ». *EDUCAGRI*. Dijon : 169- 210.

17. (a). **Branger A., Madebine R.M. et Roustel S., 2007.** Aliment et Fermentation, techniques et technologie in : « *Microbiologie et alimentation* ». EDUCAGRI. Dijon : 213-235.
18. (b). **Branger A., Madebine R.M. et Roustel S., 2007.** L'aliment à l'aliment in : « *Microbiologie et alimentation* ». EDUCAGRI. Dijon : 311-320.
19. **Bresson J.L., 2002.** Président de la Mission Scientifique un symposium sur le yaourt et les laits fermentés. Paris, 10 : 1-6.
20. **Bunte, 2009.** Fermentation malolactique : métabolisme bactérien et altérations. Mise au point sur les amines biogènes in « *Rencontres œnologiques, altération microbienne et déviations organoleptiques associées* ». HORSHOLM. Danemark : 19
21. (a). **Carip C., 2008.** Physiologie bactérienne in : « *Microbiologie Hygiène, bases microbiologiques de la diététique* ». TEC & DOC, Lavoisier. Paris : 27-60.
22. (b). **Carip C., 2008.** Taxonomie et pathogénie bactérienne in : « *Microbiologie Hygiène, bases microbiologiques de la diététique* ». TEC & DOC, Lavoisier. Paris : 61-114.
23. **Chevallier L., 2005.** Nutrition, principes et conseils. 2^e édition. MASSON. Paris : 209.
24. (a). **Corriau G. et Luquet F.M., 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques in : " *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments*". TEC & DOC, Lavoisier. Paris : 512- 594.
25. (b). **Corriau G. et Luquet F.M., 2008.** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques in : " *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments*". TEC & DOC, Lavoisier. Paris : 661-766.
26. **Cuvillier D., 2007.** La fermentation lactique. Techno IAA : 1-24.
27. **Dacosta Y., 2000.** La bioprotection des aliments. YVES DACOSTA. Paris : 1-2.
28. **Dacosta Y., 2001.** Vue d'ensemble sur les probiotiques et les prébiotiques in : « *Probiotiques et prébiotiques en alimentation humaine les points de connaissances actuelles* ». YVES DACOSTA. Paris: 25-66.
29. **Dellaglio F., and Felis G.E. 2008.** Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* 8: 44-61.
30. **Deniel M. et Butel J.M., 2009.** Prébiotiques, probiotiques, futur élaboration des aliments santé : lettre nutrition santé N° 20. Paris : 1-4.
31. **Desmazeaud M., 1998.** Bactéries lactiques et qualité des fromages. INRA Jouy-en-Josas : 1-3.
32. **De Vuyst L., 2004.** Les probiotiques, allies d'une bonne santé intestinale. Institut DANONE. Bruxelles : 1-11.
33. **Dortu C., 2008.** Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse de doctorat. Belgique : 5-38.

34. **Dortu C. et Thonart P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques, caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Belgique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, **13** (1): 143-154
35. **Dolyers, 2003.** Production en continu des ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules Cimmobilisées. Thèse de doctorat, *QUEBEC* : 1-148.
36. **Drouault S. et Corthier G., 2001.** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *INRA .Vet. Res.* **32** : 101-117
37. **Dubach A., 2002.** Aperçu scientifique sur *Lactobacillus GG*. 6032 Emmen : 1-36.
38. **Dunne C., O'Mhony L., Murphy L., Thorunton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G.C., Shanahan F. et Collins J.K., 2001.** In vitro selection criteria for probiotic bacteria oh human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr, American Society for Clinical nutrition, USA*, **73(suppl)**:386s-392s.
39. **Dupont L., 1998.** Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ses souches. Thèse de doctorat. Canada : 3- 11.
40. **El-Nezami H., Mykkänen H., Kankaanpää P., Salminen S. et Ahokas J., 2000.** Ability of *Lactobacillus* and Probionobacterium strains to remove aflatoxin B1 from chicken duodenum. *J.Food.protect*, **63** : 579- 552.
41. **Euzéby J.P., 2010.** Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. Belgique : 1- 4.
42. **Farineau F.K., 2001.** Rapport Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes. *CORDOBA*. Argentine : 1-20.
43. **Fredot E., 2006.** Lait et produits laitiers in : « *Connaissance des aliments, bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique* ». *TEC & DOC, Lavoisier*. Paris : 9-65.
44. **Fulet J. P., Relano P. et corthier G., 2008.** Aliments ou compliments alimentaires in : « *Aliments fonctionnels* » 2^e édition. *Tec et Doc, Lavoisier*. Paris : 77-104.
45. **Jeantet R., Groguenec T. et Brulé G., 2007.** du lait aux produits laitiers in : « *Science des aliments, Biochimie- microbiologie- procédés-produits* ». Tom 2. *TEC & DOC, Lavoisier*. Paris : 7-60.
46. **Joffin J.N. et Leyral G., 2006.** Microbiologie technique. Tom1. Dictionnaire des techniques. 4^{ème} édition. *TEC & DOC, Scèrén CRDP AQUITAINE*. Espagne : 101- 102, 138- 139, 238- 239, 289- 291.
47. **Joffin J.N. et Leyral G., 2001.** Microbiologie technique. 2^{ème} édition. *TEC & DOC, Scèrén CRDP AQUITAINE*. France : 11-12.
48. **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. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Algérie : 37-55.

49. **Holzapfel W., 2006.** Les sources naturelles de probiotiques. Cité in <http://www.criigen.org/content/view/55/105/>: 1-9.
50. **Idoui T., Boudjerda D., Leghouchi E. et Karam Nouredine, 2009.** Activité probiotique de *Lactonacillus plantarum*: étude réalisée chez le poulet de chair ISA 15. Algérie : 1-4.
51. **Gaon D., Garcia H., Winter L., Rodiriguez N., Quintas R., Gonzalez S-N. et Oliver G., 2003.** Effet de *Lactobacillus* et *Saccharomyces boulardii* sur la diarrhée. 63. N° 4 : 293-298.
52. **Gérard B., 2003.** Impact de l'évolution des technologies de production et de transformation sur la qualité des produits laitiers. France : 20- 23.
53. **Gille L, Reid G., Richardson D.P. et Mater D., 2007.** Référence probiotique, yaourt et lait fermenté, lettre de la mission scientifique de syndifrais. N°31 : 1-8.
54. **Godet E., Nicolle J., Pottier J., Royer M. et Dubois N., 2007.** Dossier nano : Plus c'est petit, plus c'est mignon ? La dérive des continents, des ferments dans votre assiette, les cellules souches des promesses bridées. 7^e édition : 7
55. **Guarner F., Khan A. G. Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A. Krabshuis J., Ton Le Mair., 2008.** Probiotiques et prébiotiques. World Gastroenterology Organisation : 1-23.
56. **Guillaume, 2004.** Microbiologie, tests de microbiologie.12 :1-8.
57. **Guillouardi L, Lim E-M., Guchte M. V., Grimaldi C., Penaud S., Maguin E., 2004.** Tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. France: 1-6.
58. **Guiraud J., 2003.** Techniques d'étude et d'identification microbiens in : « *Microbiologie alimentaire* ». DUNOD, Paris : 219-334.
59. **Guiraud J-P. et Rosec J-P., 2004.** Autres flores in : « *Pratique des normes en microbiologie alimentaire* ». ISBN, AFNOR. France : 237-256.
60. **Labioui H., Elmoualdi L., Elyachioui M. et Ouhssine M., 2005.** Sélection des souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bordeaux .144: 239- 241.
61. **(a).Lambin S. et German A., 1969.** Examen microscopique des bactéries lactiques in : « *Précis de microbiologie* ». Tome 1. 2^{ème} édition. MASSON. Paris : 116- 168.
62. **(b).Lambin S. et German A., 1969.** Etude de l'activité biochimique des bactéries in : « *Précis de microbiologie* ». Tome 1. 2^{ème} édition. MASSON. Paris : 169-207.
63. **Larpent J.P., 1991.** Les ferments microbiens dans les industries agroalimentaires, produits laitiers et carnés. MASSY, CDIUPA : 6, 44-45.
64. **Larpent J.P., 1996.** Les bactéries lactiques in « *Microbiologie alimentaire, Aliments fermentés et fermentation alimentaires* ». Tom 2. 2^{ème} édition. TEC & DOC. Paris : 4- 32
65. **Larpent P.J., 2000.** Introduction à la nouvelle classification bactérienne, les principaux groupes bactériens. TEC & DOC. Paris : 166.

66. **Larpent J.P. et Larpent M.G., 1985.** Les cocci Gram positif in : « *Elément de la microbiologie* ». HERMANN. Paris : 241-246, 300, 326, 358
67. **Larpent J.P. et Larpent M.G., 1997.** Les microorganismes procaryotes in : « *Memento technique de la microbiologie* ». 3^{ème} édition. TEC & DOC, Lavoisier. Paris : 255- 631.
68. **Leclerc H., 1994.** Les grands groupes de bactéries in : « *Microbiologie générale la bactérie et le monde microbien* ». DOIN. Paris : 331-392.
69. **Leclerc H., 1994.** Croissance et nutrition in : « *Microbiologie générale la bactérie et le monde microbien* ». DOIN. Paris : 117-153.
70. **Léonil J. et Lortal S., 2006.** Yaourt et lait fermentés, santé – nutrition - flore, veille scientifique - bactéries lactiques vivantes - probiotiques : Quid des peptides bioactifs produits lors de la fermentation du lait par les bactéries lactiques probiotique, science et technologie du lait et de l'oeuf, *INRA*. N° 26 : 1- 6.
71. **Leveau J.Y., Bouix M. et Deroissart M., 1991.** La flore lactique, technique d'analyse et de contrôle dans les I.A.A.O, Tome 3. 2^{ème} édition. TEC & DOC. Lavoisier : 2-40.
72. (a). **Leveau J.Y. et Bouix M., 1993.** Bactéries lactiques in : « *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel, collection science et technique Agroalimentaire* ». CEDEX. Paris : 170-331.
73. (b). **Leveau J.Y. et Bouix M., 1993.** Bifidobacterium in : « *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel, collection science et technique Agroalimentaire* ». CEDEX. Paris : 375-386.
74. **Lin W.H., Yu B., Jang S.H. et Tsen H.Y., 2007.** Antimicrobial suseptibility: Different probiotic properties for *Lactococcus fermentum* strains isolated from swine and poultry. Elsevier, *Anaerobe* 13: 107-113.
75. **Luquet F. M. et Corriau G., 2005.** Lait et produits laitier frais in : « *Bactéries lactiques et probiotiques* ».Edition TEC & DOC.Lavoisier.Paris :1-30.
76. **Macouzet M. et Champagne C.P., 2007.** Les bactéries probiotiques : innovations et tendances de développement technologique. BIOVALLE: 1- 4.
77. **Majamaa H. et Isolauri E., 1997.** Probiotics a novel approach in the management of food allergy. 99 (2):179-185.
78. **Manthieu J., 1998.** Initiation à la physicochimie du lait, guide technologiques des IAA. Tec et Doc, Lavoisier : 206.
79. **Marteau P et Seksik P., 2005.** Probiotiques et alicaments in: « *Bactéries lactiques et probiotiques* ». Tec et Doc, Lavoisier. Paris : 255-282.
80. **Marteau M.C., 2005.** Probiotiques et immunité in: « *Bactéries lactiques et probiotiques* ». Tec et Doc, Lavoisier. Paris : 211-246.
81. **Mathot A.G,Béliard E et Thuault D., 1996.** propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques in :« *Microbiologie alimentaire, Aliments fermentés et fermentation alimentaires* ». Tom 2. 2^{ème} édition. Technique et Documentation. Paris : 432-447.

82. **Médart J., 2005.** Les troubles digestifs la symbiose in : « *Manuel pratique de nutrition l'alimentation préventive et curative* ». 1^{er} édition. Boeck et Larcier. Paris : 161-184.
83. **Meyer A, Deiana J, Leclerc H., 1999.** Cours de microbiologie générale, nouveau programme. Doin éditeur, Paris. 114- 118.
84. **Midobet P.D., Lambert J.R., Hull R., Lou F. et Grayson M.L., 2005.** In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol*, 79: 475-479.
85. **Mercivier A., 2001.** Laboratoire de bactériologie des écosystèmes. Institut Pasteur de Lille.17 : 86-91.
86. **Metlef S. et Dilmi-Bouras A., 2009.** Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. Algérie. N° 1: 33-44.
87. **Morge S., 2004.** Guide techniques pour l'accident de fromagerie à la ferme, « défauts d'acidification », technologie lactique et PPNC. France: 1-43.
88. **Muller-marin k. et Rieutord D., 2004.** 3^{ème} Convention Internationale sur les Probiotiques. Paris: 1-3.
89. **Ninane V., Mukandayambaje D. 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. Agron. Soc* 13(3) : 459-466.
90. **Normand M., Roland N., Richoux R. et Karjeau J.R., 2006.** Propriétés probiotiques des bactéries propioniques laitier .Britagne : 2-10.
91. **Patterson C.A., PHD., et PAg., 2008.** Probiotiques: bienfaits au de la des fonctions nutritionnelles de base. AAFC NO. 10076E : 1-4.
92. **Perry J.J., Staley J.T. et Lory S., 2004.** Microbiologie, cours et questions de révision PCEM•PCEP•1^{er} cycle/Licence•2^e cycle/Master. *DUNOD* : 161, 479- 478.
93. **Pilet F.M., Magras C. et Federighi M., 2005.** Bactéries lactiques in : « *Bactériologie alimentaire:compendium d'hygiène des aliments* ». 2^{ème} édition. *ECONOMICA*. Paris : 219- 239.
94. (a). **Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A., 2007.** Les bactéries : les Gram- positive pouvre en GC in « *Microbiologie* ». 2^e édition française. Paris : 517-533.
95. (b). **Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A., 2007.** La microbiologie alimentaire in « *Microbiologie* ». 2^e édition française. Paris : 963-990.
96. **Proeuhealth – Propath, 2004.** Découverte de nouveaux composés contre les bactéries nocives.30 :1-2
97. **Rapport final ADIV/OFIVAL, 2004.** Altérations microbiennes liées aux bactéries lactiques hétérofermentaires dans le jambon cuit supérieur : 6- 7.

98. **Rigaux P., 2008.** Evaluation des propriétés immunomodulatrices de la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 dans le cadre de l'allergie aux acariens. Thèse de Doctorat : 7-45.
99. **Roberfroid M., 2007.** Prébiotiques, probiotiques, symbiotique et inflammation intestinale. Institut DANONE. France. N°85: 1-12.
100. **Robin M.J. et Rouchy A., 2001.** Les probiotiques. NUTRANEWS Science, Nutrition, Prévention et Santé. 12 : 1-4.
101. **Rolfe, 2000.** In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as a possible probiotic for the urogenital tract. International Dairy Journal, 98: 92-134.
102. **Roudj S., Bekheir K., Karam H.Z. et Karam N.E., 2009.** Protéolyse et autolyse chez deux *Lactobacilles* isolés de lait. Algéria. Vol 34.N° 2: 218-227.
103. **Salminen S., 2003.** Probiotique et cancer colorectal. Turku, Finlande. 14 : 4.
104. **Schmidt j.l. et Senoir j ., 1972.** Contribution à l'étude des entérocoques et de leurs aptitudes technologiques. Paris-crignon. (I.n.r.a.) N° 518 : 536-557.
105. **Serra P. et Carel Y., 2000.** Nutriments, la flore intestinale, science, nutrition, prévention et santé : 1-12.
106. **Servin A.L. et Coconnier M.H., 2003.** Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best pract Res Chin Gastroenterol*, 17:741-754.
107. **Simon D., François M. et Dudez P., 2002.** Transformer les produits laitiers frais à la ferme. Édition educagri. Paris : 54-55,84-85,154-155.
108. **Simonet M., 1994.** Le pouvoir pathogène : mécanisme in : « *Microbiologie générale la bactérie et le monde microbien* ». DOIN. Paris : 466-44.
109. **Singleton P., 1999.** Bactériologie. 4^{ème} édition. DUNOD. Paris : 273,287.
110. **Singleton P., 2005.** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6^{ème} édition. DUNOD. Paris : 374-386, 517.
111. **Soustre Y., 2009.** 30 questions sur Les bactéries lactiques. *Dr ès Sciences* : 5
112. **Steene S.V., Malavaud S., 2006.** Hygiène et prise en charge des dispositifs médicaux en gynécologie dans les établissements de santé, guide de bonnes pratiques. Thèse de doctorat. Bordeaux : 8.
113. **Sutra L., Federighi M. et Jouve L., 1998.** Les bactéries lactiques in : « *Manuel de bactériologie alimentaire* ». Polytechnica. Paris : 235-259.
114. **Thiès A., 2006.** Echos de la micronutrition .Dossier : Le confort digestif grâce aux probiotiques. N° 13. Paris: 1-6.
115. **Tredez M.L.H., 2008.** Méta-analyse des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogenèse colorectale chez les rongeurs. Thèse de doctorat. TOU 3 - 4050 : 37-45.

- 116.(a). **Vignola C.M., 2002.** Microbiologie du lait in : « *Science et technologie de lait. Transformation du lait* ». *EDITRICES SCIENTIFIQUES*. Canada : 75-141.
- 117.(b). **Vignola C.M., 2002.** Produits laitiers fermentés in : « *Science et technologie de lait. Transformation du lait* ». *EDITRICES SCIENTIFIQUES*. Canada : 443-469.
118. **Vuillemard G.C., 1986.** Microbiologie des aliments, volume 3, évaluation de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. *TEC & DOC*. Lavoisier : 1-65.
119. **Yaakoubi K., Ammor S., Haydersah J. Et Chevallier L., 2006.** Activités antibactériennes des bactéries lactiques isolées d'ateliers fermiers de salaison. Enita Clermont : 1-2.
120. **Yao A. A., Egounlety M., Kouame L. P. et Thonart P., 2009.** Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylicés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest: leur utilisation actuelle, Belgique, Bénin. *153*: 54-65.
121. **Zehntner U., 2008.** Comportement de la souche probiotique *Lactobacillus gasseri* K7 dans le fromage à pâte mi-dure affiné. *Revue Suisse Agric*: 187



Annexes

Annexe I

Milieux d'identification

* MRS (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, 7H ₂ O.....	2 g
• Sulfate de manganèse.....	0,05 g
• Glucose.....	20 g
• Tween 80.....	1 ml
• Agar(dans le cas de gélose).....	15 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 ml
• 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 ml
- Glucose..... 0,5 g
- Eau distillée qsp..... 1000 ml

pH=6,4

Annexe II

Milieux pour les aptitudes probiotiques

* Gélose Hektoen

• protéose _peptone.....	12 g
• Extrait de levure.....	3 g
• Chlorure de sodium.....	5 g
• Sels biliaires.....	9 g
• citrate de fer ammoniacal.....	1,5 g
• Salicine.....	2 g
• Lactose.....	12 g
• Saccharose.....	12 g
• Fuchine acide.....	0,1 g
• Bleu de bromothymol.....	65 mg
• Gélose.....	13 mg

* Gélose de Chapman

• Extrait de viande.....	1 g
• Chlorure de sodium.....	75 g
• peptone.....	20 g
• Mannitol.....	10 g
• Phénolsulfonephtaléine.....	0,025 g
• Gélose.....	20 g
• Eau distillée qsp.....	1000 ml

pH= 7,4

Annexe III

Milieux pour les aptitudes technologiques

* Milieu YMA (Yeast Milk Agar)

• Peptone.....	5 g
• Extrait de levure.....	3 g
• Lait écrémé.....	1 g
• Agar.....	15 g
• Eau distillée qsp.....	1000 ml

pH= 7,1

Stérilisation à 120 °C pendant 20mn.

* Milieu hyperesaccharosé

• Extrait de viande.....	10 g
• Extrait de levure.....	3 g
• Bactropeptone.....	2,5 g
• Saccharose.....	150 g
• K ₂ HPO ₄	2 g
• NaCl.....	1 g
• MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,2 g
• Agar.....	1,5 g
• Eau distillée qsp.....	1000 ml

pH= 6,8-7

Stérilisation à 120°C pendant 20mn

* Lait écrémé stérile à 10 %

• Lait écrémé stérile en poudre.....	9 g
• Eau distillée	100 ml

*** Bouillon nutritif**

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

pH= 7,2

Annexe IV

Réactifs

* Violet de gentiane

- Violet de gentiane.....1 g
- Ethanol à 90 %.....10 ml
- Phénol.....2 g
- Eau distillée100 ml

* Fushine de Ziehel

- Fushine basique.....1 g
- Alcool éthylique à 90 %.....10 ml
- Phénol.....5 g
- Eau distillée100 ml

* Lugol

- Iode.....1 g
- Iodure de potassium.....2 g
- Eau distillée300 ml

* Soude Dornic : soude N/9

- Soude pure.....4.4g
- Eau distillée100 ml

Annexe V

Tableau (I) : les diamètre des halos résulte de l'activité des antibiotiques su les souches de *Lactobacillus* étudiées.

antibiotique	OX	P5	S10	TE	G20	AM
Souches						
1	10 mm	/	20 mm	/	/	9mm
2	10 mm	16 mm	/	12 mm	/	10mm
3	12 mm	16 mm	/	17 mm	16 mm	12mm
4	12 mm	17 mm	/	16 mm	/	16mm
5	10 mm	13 mm	10 mm	12 mm	/	13mm
6	13 mm	/	/	20 mm	16 mm	12mm
7	9 mm	10 mm	8 mm	21 mm	17 mm	9mm
8	12 mm	25 mm	/	20 mm	10 mm	/
9	16 mm	30 mm	6 mm	22 mm	16 mm	9mm
11	10 mm	18 mm	12 mm	27 mm	10 mm	11mm
12	12 mm	25 mm	10 mm	25 mm	20 mm	9mm
13	/	/	/	/	/	/
15	/	/	/	/	/	/
16	/	/	/	/	/	/
17	16 mm	20 mm	15 mm	30 mm	30 mm	14mm
18	16 mm	8 mm	11 mm	20 mm	20 mm	9 mm

Présenté par : Askri Aicha Laredj Zahia Lotmani Hanane	Encadré par : M ^{me} Bousdira F.	Soutenu Le : 06-07-2010 A 14 :00
---	--	--

Le thème : Etude de quelques aptitudes technologiques des souches de *Lactobacillus* à caractères probiotiques.

Résumé :

Notre étude à été menée sur quelques aptitudes technologiques des souches de *Lactobacillus* à caractères probiotiques, isolées localement des selles d'enfant.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que nos souches ont une bonne résistance aux conditions hostiles *in vitro*, ainsi qu'elles sont aptes à se fixer sur le tissu intestinal.

Les souches de *Lactobacillus* ont montré un potentiel technologique intéressant. Elles sont des bonnes texturantes et protéolytiques malgré notre savoir que ceux-ci sont peu protéolytiques. Cependant, elles sont modérément résistantes aux aromes industriels, et faiblement acidifiantes.

Mots clefs : Bactéries lactiques, *Lactobacillus*, probiotiques, aptitudes technologiques

Abstract :

Our study was conducted on some technological properties strains of *Lactobacillus* with probiotic characters, locally isolated from stool of children.

According to the results, it appears that our strains have good resistance to hostile conditions *in vitro*, and they are able to bind to the intestinal tissue.

The strains of *Lactobacillus* have shown a potential technological interest. They are good texturing and proteolytic despite our knowledge that they are not proteolytic. However, they were moderately resistant to industrial aromas and slightly acidifying.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, probiotics, technological properties.

ملخص :

تمت دراستنا حول بعض الكفاءات التكنولوجية لسلاسل العصي اللبنية ذات الخاصية من اجل الحياة و المعزولة محليا من براز الأطفال. حسب النتائج المحصلة، يتضح أن سلاتنا تملك مقاومة جيدة للظروف العدائية في المختبر، كما أنها قادرة على التثبيت بالنسيج المعوي.

أظهرت سلاسل العصي اللبنية مصلحة تكنولوجية مهمة، لها قدرة نسيجية جيدة، و هي ممتازة في تحليل البروتينات رغم معرفتنا بأنها ضعيفة القدرة التحليلية للبروتينات. بينما هي معتدلة المقاومة للنكهات الاصطناعية و ضعيفة الحمضية.

الكلمات المفتاح : البكتيريا اللبنية، العصي اللبنية، من اجل الحياة الخصائص التكنولوجية.