

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

المعهد الوطني للبحوث  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
المكتبة  
رقم الجرد : 1601

Université de Jijel



Am Javorab  
BOUSSOUF  
Saliha  
جامعة جيجل

Faculté des Sciences Exactes et Sciences

De la Nature et de La vie

Département de Biologie Moléculaire

et Cellulaire

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

*Mémoire De Fin D'études Pour L'obtention du Diplôme  
Des Etudes supérieures en Biologie*

**Option : Microbiologie**

*Evaluation des aptitudes probiotiques des souches  
de Lactobacillus d'origine humaine*

*Membre de jury :*

*Examinatrice : M<sup>elle</sup> BOUSSOUF L.*

*Encadreur : M<sup>me</sup> BOUSDIRA F.*

*Réalisé Par :*

**BRADAI SALIHA**

**TOBBI KAOUKEB**

*Année Universitaire : 2009- 2010*

# Remerciements

*Nous remercions DIEU le tout puissant qui nous a donné la force, la volonté et le courage pour élaborer ce travail.*

*Au terme de ce travail, nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadreur M<sup>me</sup> : BOUSDIRA FATHIA, pour nous avoir permis de bénéficier de son grand savoir dans la matière, pour sa pédagogie, ses compétences, sa modestie et son aide précieuse tout au long de ce projet même pendant les moments les plus difficiles. Vraiment merci pour une qualité d'encadrement si sérieuse et si consistante....*

*Nous remercions encore notre jury M<sup>lle</sup> BOUSOUF L pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de juger ce travail.*

*Nos remerciements les plus cordiaux s'adressent au Dr: IDOUI TAYEB, pour sa disponibilité, son aide, ses conseils précieux et ses critiques constructives.*

*Nous ne manquerons pas l'occasion de remercier M<sup>lle</sup> LINDA le responsable du laboratoire et toute l'équipe technique de laboratoire pour leur incontestable contribution à l'accomplissement de notre projet, leur caractère accueillant qui nous a offert une ambiance très motivante et encourageante au travail.*

s

*Que la paix de Dieu soit toujours avec vous !*

*Merci.....*

*Salîha, Kaoukeb*

# *Sommaire*

Introduction.....	01
-------------------	----

## **I-Synthèse bibliographique**

### **Chapitre I: les probiotiques.**

I-1-Historique.....	03
I-2-Définition.....	03
I-3-Classification des probiotiques.....	04
I-3-1- les bactéries lactiques.....	04
I-3-1-1- les coques.....	04
I-3-1-2- les bacilles.....	04
I-3-2-les Bifidobactéries.....	05
I-3-3-les levures.....	05
I-4-Les propriétés et les critères de sélection des probiotiques.....	06
I-5-Mécanisme d'action des probiotiques.....	07
I-5-1-Maladies inflammatoires et troubles intestinaux.....	08
I-5-2-Infection par <i>Helicobacter pylori</i> et complication.....	09
I-5-3-Le rôle antitoxique des probiotiques.....	09
I-5-4-Effet sur le système immunitaire.....	09
I-5-5-Effet sur l'intolérance au lactose.....	09
I-5-6-Traitement des diarrhées.....	10
I-5-7-L'activité anticancérogène.....	10
I-5-8-Inhibition des mauvaises bactéries.....	10
I-5-9-Effet sur la formation de cholestérol.....	11
I-5-10-Amélioration de la digestibilité de la ration alimentaire.....	11

### **Chapitre II: les *Lactobacilles* :**

II-1-Définition.....	12
II-2-Classification de <i>Lactobacillus</i> .....	12
II-3-Habitat.....	13
II-4-Propriété générale de <i>Lactobacillus</i> .....	13
II-4-1-Morphologie.....	13

II-4-2-Caractère biochimiques.....	14
II-5-Techniques d'identification de <i>Lactobacillus</i> .....	14
II-5-1-Technique classique.....	14
II-5-2-Méthode moléculaire.....	14
II-6-Le rôle de <i>Lactobacillus</i> .....	15
II-6-1-Le rôle de <i>Lactobacillus</i> sur la santé.....	15
II-6-2-Le rôle de <i>Lactobacillus</i> dans les aliments.....	15
II-6-3-Le rôle de l'acide lactique et de pH.....	15
II-6-4-Production des bactériocines.....	16

### **Chapitre III : la microflore de tube digestif humain**

III-1-Le tube digestif humain.....	17
III-2-La microflore de tube digestif.....	18
III-2-1-L'estomac.....	18
III-2-2-L'intestin grêle.....	19
III-2-3-Le jéjunum.....	19
III-2-4-Les selles.....	19

## **II-Partie expérimentale**

### **I- Matériel et méthodes.**

I-1-Matériel.....	20
I-1-1-Souches bactériennes.....	20
I-1-2-Milieus de culture.....	20
I-1-3- Réactifs et Matériel .....	20
II-2-Méthodes.....	21
I-2-1-Revivification.....	21
I-2-2-Isolement et purification.....	21
I-2-3-Identification.....	21
I-2-3-1-Examen macroscopique.....	22
I-2-3-2-Examen microscopique.....	22
I-2-3-3-Recherche de la catalase.....	22
I-2-3-4-Test de croissance à différentes températures.....	23

I-2-3-4-Test de croissance à différentes températures.....	23
I-2-3-5-Type fermentaire.....	23
I-2-3-6-Profil fermentaire des sucres.....	23
I-2-3-7-Recherche de l'arginine di-hydrolase (ADH).....	23
I-2-Evaluation des aptitudes probiotiques in vitro.....	24
I-2-1-Croissance sur milieu acide.....	24
I-2-2-Estimation de la croissance.....	24
I-2-3-Resistance aux antibiotiques.....	24
I-2-4-Activités antibactériennes.....	24
I-2-5-Effet de surnagent sur les entérobactéries.....	25
I-2-6-Tolérance aux sels biliaires.....	25
I-2-7-Test d'adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliale.....	26

## **II-Résultats et discussion**

II-1-Purification.....	27
II-2-Identification.....	27
II-2-1-Etude des caractères morphologiques.....	27
II-2-1-1-Examen macroscopique.....	27
II-2-1-2-Examen microscopique.....	27
II-2-2-Tests physiologiques et biochimiques.....	28
II-2-2-1-Test de catalase.....	28
II-2-2-2-Test de croissance à différentes températures.....	28
II-2-2-3-Test de l'ADH.....	28
II-2-2-4-Recherche de type fermentaire.....	29
II-2-2-5-Fermentation des sucres.....	32
II-2-3-Identification des souches.....	33
II-3-Evaluation des aptitudes probiotiques.....	36
II-3-1- Croissance sur milieu acide.....	36
II-3-2-Estimation de la croissance.....	37
II-3-3-Résistance aux antibiotiques.....	38
II-3-4-La tolérance de <i>Lactobacillus</i> aux sels biliaires.....	39

II-3-5-Activité antibactérienne.....	41
II-3-6-Activité inhibitrice de surnageant.....	43
II-3-7-Test d'adhésion des Lactobacillus aux cellules épithéliales.....	45
<b>Conclusion.....</b>	<b>47</b>

**Références bibliographiques**

**Annexes**

## Introduction

L'idée d'ingérer des millions de bactéries par jour peut sembler difficile à avaler. Et pourtant, si certaines ont la réputation de rendre malades, d'autres cachent bien des vertus nutritionnelles. Ce sont les probiotiques dont l'OMS, l'organisation mondiale de la santé les définit « comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte. »

Si l'industrie du yaourt est l'une des premières à s'intéresser à ces micro-organismes aux bienfaits nutritionnels, c'est que ce produit fermenté en contient naturellement. Dès la fin du XIXe siècle, Elie Metchnikoff, élève de Louis Pasteur, émet l'hypothèse que la longévité de certains peuples (bulgares, turcs ou arméniens) serait due à leur consommation quotidienne de lait (OMS, 2009).

Le terme probiotique dérive des deux mots grec "pros" et "bios" qui signifient littéralement " pour la vie " contrairement au terme antibiotique qui signifie contre la vie (Catanzaro J A et Green L, 1997).

Les probiotiques sont aujourd'hui largement utilisés et reconnus dans le domaine de la nutrition humaine depuis que les scientifiques ont cherché à expliquer leur mécanisme d'action et que des sociétés ont commercialisé à grand renfort de marketing des produits laitiers fermentés par des souches probiotiques (OMS, 2009).

Les effets bénéfiques de souches probiotiques comme *Lactobacillus* sur la santé du consommateur, notamment l'amélioration de la digestion de lactose, l'équilibration de la microflore intestinale, la prévention de ou le raccourcissement de la durée de diarrhée, l'inhibition des bactéries pathogènes et la stimulation de système immunitaire n'ont toutefois été démontrés que pour un nombre limité des souches.

Les microorganismes probiotiques sont sélectionnés selon plusieurs critères entre autres la résistance aux acides et à la bile, l'adhésion aux surfaces des muqueuses intestinales la présence d'un ou des effets sur la santé cliniquement documentés et une innocuité totale (Szajewska R et al, 2001).

L'une des conclusions évidentes à l'issue des différentes recherches est la certitude renouvelée que chaque souche de probiotique est unique. Les bénéfices obtenus avec une souche microbienne ou un mélange spécifique de souches ne peuvent pas être étendus à d'autres probiotiques. Certaines études présentées réalisées avec des probiotiques différents ont donné



## I. Les probiotiques

### I-1-historiques:

Depuis plus d'un siècle, on a nourri une hypothèse selon laquelle l'ajout d'organisme lactique dans les produits laitiers pourrait agir positivement sur la santé et sur le vieillissement (OMS, 2009).

Metchnikoff et Tissier ont été les premiers à avancer dans leurs travaux des propositions scientifiques au sujet de l'utilisation probiotique des bactéries. Par ailleurs le mot "probiotique" n'a été forgé qu'en 1960, pour désigner des substances produites par des microorganismes qui favorisaient la croissance d'autres microorganismes.

Le terme "probiotique" est un mot relativement nouveau qui signifie "en faveur de la vie" et qui est actuellement utilisé pour désigner des bactéries associées à des effets bénéfiques chez l'homme et les animaux (FAO/ OMS, 2001).

Le concept probiotique a donc été considéré comme scientifiquement non démontré et il n'a guère suscité d'intérêt pendant des décennies, mis à part quelques recherches concernant l'alimentation des animaux afin de trouver des substituts sains des anabolisants. Au cours des vingt dernières années toute fois, la recherche dans le domaine probiotique a fait des progrès considérables en ce qui concerne la sélection et la caractérisation des cultures probiotiques spécifiques et la justification des allégations santé liées à leur consommation (FAO/OMS, 2001).

### I-2- Définition :

Selon FAO (Food and Agricultural organisation the United Nations) et OMS (organisation mondiale de la santé) : les probiotiques sont définis comme " des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte au delà de l'effet nutritionnel premier" (OMS, 2009).

Les probiotiques peuvent être consommés soit comme un aliment ou comme une préparation non alimentaire (Denis R et al, 2006).

### I-3-Classification des probiotiques:

Il existe trois grands groupes des probiotiques:

#### I-3-1- les bactéries lactiques:

Les bactéries lactiques regroupent des bactéries à coloration de Gram positive, généralement immobiles, asporulées, dépourvues de catalase et de cytochromes oxydases. Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du xx<sup>e</sup> siècle, elles constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Ce sont par ailleurs des bactéries dépourvues de nitrate réductase, anaérobies ou aérotoles, exigeantes en facteurs de croissance: acide aminés, bases nucléiques, acides gras vitamines (Michel F, 2005). Elles sont utilisées pour la conservation de nombreux aliments, et sont présentes naturellement dans le tube digestif de l'homme et des animaux (Denis C, 2009).

##### I-3-1-1 les coques:



Figure 01 : Les coques.

Les *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* sont des coques sphériques ou ovoïdes, en paires, en chaînette ou en tétrades généralement immobiles.

Les métabolismes fermentaires donne à partir des glucides de l'acide lactique ou pour les *Leuconostoc*, un mélange d'acide lactique formique de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> ([www.univ-rouen.fr/ABISS/L3CAB/probiotique/index.htm-1k](http://www.univ-rouen.fr/ABISS/L3CAB/probiotique/index.htm-1k)).

##### I-3-1-2- les bacilles:

Le *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactiques intervenant dans de nombreuses industries qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles souvent allongé, Gram+, asporulés, parfois groupés en paires ou en chaînettes, généralement immobiles, ils sont catalase-, microaérophiles ou anaérobioses (Guiraud J P, 1998).

### I-3-2- Les Bifidobactéries:



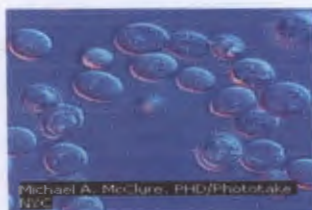
**Figure 02 : Les Bifidobactéries (Leveau J Y et Bouix M, 1993).**

*Bifidobacterium* (anciennement *Lactobacillus bifidus*) est un bacille présent dans la flore intestinale du nouveau-né. Se sont des bactéries réalisant une fermentation hétéro-lactique de type particulier dont la caractéristique essentielle est le caractère non gazogène (Guiraud J P, 1998).

Se sont des bactéries bâtonnets de morphologie variées, cellule courte ramifié, spatulées, disposées en grappe de raisin ou en palliasent, se sont des Gram positives, non acido-résistant, non sporulés, immobiles, se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur G+C à % élevé, et la présence d'une enzyme, le fructose-6-phosphate phosphocétolase (Scardovi V, 1986 cité dans Michel, 2005). Celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique, ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et d'autre acide organique. Leur température optimale de croissance est comprise entre 37 °C et 41 °C, ils se développent à pH supérieure à 5 (Michel F, 2005).

Certaines Bifidobactéries survivent bien au transit intestinal et peuvent être retrouvées à une concentration de plus de  $10^6$  UFC. ml<sup>-1</sup> au niveau iléal. Dans les fèces, de nombreuses souches ont une bonne capacité de survie et la consommation continue de produits contenant ces micro-organismes augmente significativement leurs concentrations fécales (Baelde D et al, 2005).

### I-3-3- les levures:



**Figure 03 : Les levures (Leveau J Y et Bouix M, 1993).**

Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par leurs caractères et l'absence de vrai mycélium. Les colonies sont généralement blanches et régulières, les cultures en milieu liquide agité donnent un trouble uniforme.

Elles sont aérobies et celles qui possèdent un métabolisme fermentaire ne peuvent se développer en anaérobiose stricte qu'en présence d'ergostérol et d'acide oléique. Se multipliant à des pH compris entre 3 et 7,5 et à des températures optimales voisines de 25-28°C.

Les levures assimilent de nombreux substrats carbonés. La voie oxydative conduit à la formation de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. La voie fermentaire qui n'existe que chez certaines espèces conduit à la formation d'éthanol et de CO<sub>2</sub>.

Les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à la fabrication de nombreux produits (brasserie, fromagerie) mais aussi à la valorisation des déchets agricoles et industriels et à la production des protéines. Leur rôle est fondamental dans les industries de fermentation: les levures transforment les substrats sucre ou amylicés en produits riches en alcool (saccharomyces).

La présence de levures est fréquente dans beaucoup d'aliments et de nombreux industriels sont amenés à les manipuler (**Guiraud J P, 1998**).

Les levures utilisées en tant que probiotiques sont des souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **I-4- propriétés et critères de sélection des probiotiques:**

Plusieurs critères ont été proposés pour aider les industriels à rationaliser leur sélection des souches qui auraient les meilleures chances d'avoir des propriétés probiotiques (**Saarela et al, 2000; Morelli, 2000**).

Les critères habituels étant les suivants :

**-Être d'origine humaine si elle est destinée à l'alimentation humaine :** les souches d'origine humaine poussent à 37 °C, sont résistantes aux acides et aux sels biliaires, et en général peuvent s'établir au moins transitoirement dans l'intestin humain.

**-Supporter l'acide et la bile:** plusieurs bactéries probiotiques d'origine intestinale ont des mécanismes pour résister à l'action détergente des sels biliaires et acquérir la capacité de les transformer. Cette activité enzymatique est la déconjugaison des sels biliaires grâce à la bile Salt

hydrolase (BSH), qui est aussi appelée cholyglycine hydrolase. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des sels biliaires conjugués avec la glycine ou la taurine en résidus d'acides aminés et en sels biliaires libres. La plupart des bactéries probiotiques proposées comme produits de santé naturels peuvent posséder cette activité **(Denis R et al, 2006)**.

L'acidité gastrique et les sécrétions bilo-pancréatiques constituent les principaux mécanismes endogènes d'inactivation des bactéries ingérées. La protection contre l'acidité gastrique peut se faire par un passage rapide dans l'estomac ou en protégeant les bactéries par le pouvoir tampon de l'aliment vecteur ou par des systèmes galénique de protection tels que la micro-encapsulation (probiotiques commercialisés sous formes de gélules) **(Baeld D et al, 2005)**.

**-Adhérer aux surface muqueuse dans divers modèles systématiques:** La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale est un des critères de sélection les plus importants des probiotiques parce qu'elle est considérée comme une condition préalable à la colonisation et la croissance; l'effet probiotiques serait maximal si les organismes adhèrent aux cellules muqueuses intestinales **(Denis R et al, 2006)**.

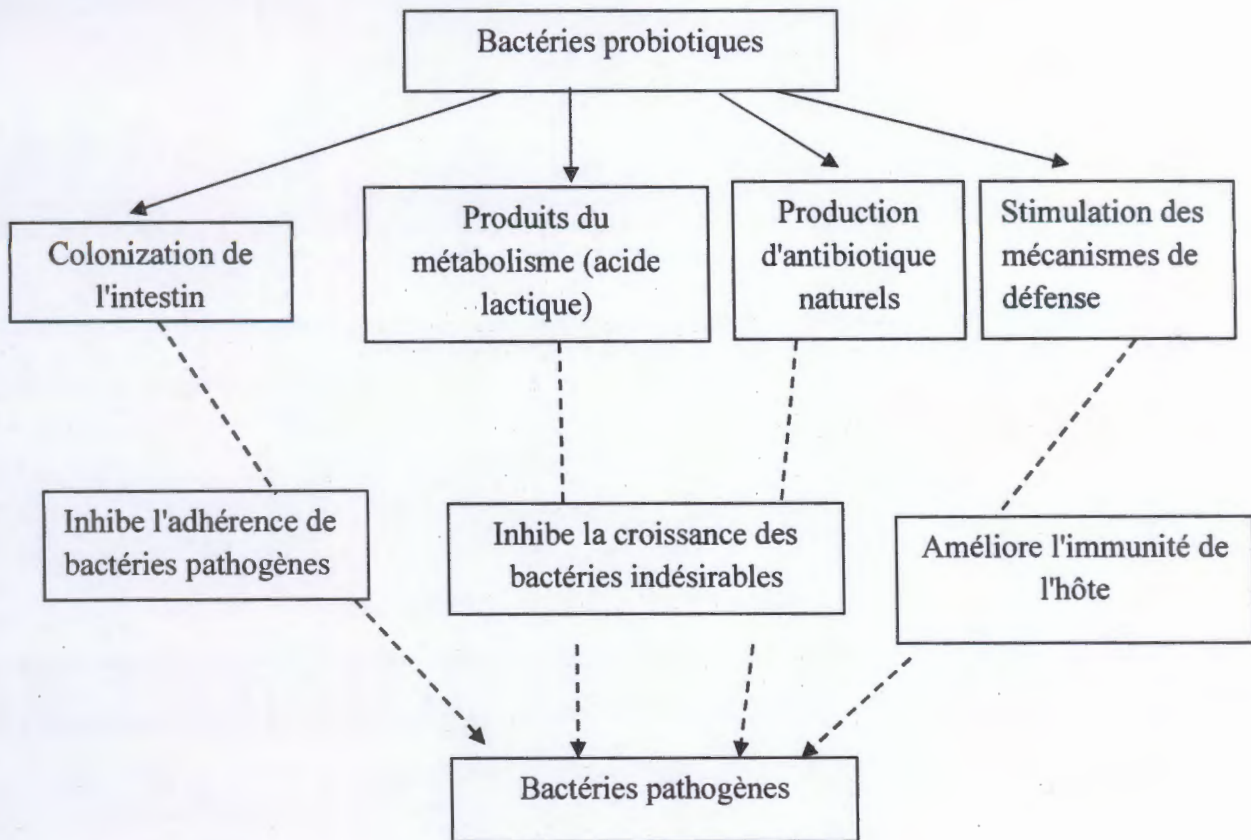
**-Ne présenter aucun danger pour l'alimentation:** Les probiotiques considérés comme des compléments alimentaires bactériens vivants qui affectent de manière bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore microbienne intestinal ne doivent présenter aucun danger pour celui-ci. Dans ce cas le régime alimentaire repose sur des produits laitiers fermentés contenant des cultures vivantes d'organismes considérés comme bénéfiques **(Salminen S et al, 1998)**.

**-Rester longtemps viable:** l'aptitude à rester viable sur le site cible et à être efficace devrait être vérifiée pour chaque souche potentiellement probiotique **(FAO/OMS, 2001)**.

**-Exercer des effets sur la santé:** Le choix et la sélection des souches probiotiques repose aussi sur l'élaboration d'un ou des produits possédant un effet santé démontré **(Luquet F M et Corrieu G, 2005)**.

#### **I-5- Mécanisme d'action des probiotiques:**

Certain nombre de mécanisme biologique plausible a été suggéré pour expliquer les effets bénéfiques sur la santé. Les plus vraisemblables sont résumés dans la figure suivante :



**Figure 04** : mécanisme d'action possible des bactéries probiotiques (Lessard M, 2004).

#### I-5-1-Maladies inflammatoires et troubles intestinaux:

Les maladies intestinales inflammatoires telles que la pochite et la maladie de Crohn, ainsi que le syndrome du colon irritable, peuvent être causés ou aggravés par des altérations dans la flore intestinale incluant l'infection (Shanahan, 2000 cité dans FAO/OMS, 2001). Il ya de nouveaux champs d'investigation, bien qu'il soit prématuré d'affirmer que les probiotiques agissant efficacement dans ces conditions. Selon certains études, les probiotiques pourraient jouer un rôle dans la thérapie et la prophylaxie et des combinaisons de souche pourraient avoir un rôle à jouer dans le traitement thérapeutique. La microflore intestinale joue probablement un rôle décisif en cas d'inflammation de l'intestin et les probiotiques pourraient y remédier à la microflore (Gionchetti et al, 2000 cité dans FAO/OMS, 2001).

**I-5-2 infection par *Helicobacter pylori* et complications:**

*Helicobacter pylori* joue un rôle majeur pour favoriser les risques d'ulcère du duodénum et de l'estomac et de certains cancers et lymphomes gastriques. Plusieurs travaux ont bien montré l'existence d'un antagonisme in vitro entre certaines souches probiotiques, notamment des *Lactobacillus* et *Helicobacter pylori*. Dans un essai mené en double aveugle, Felley et al, ont montré que l'administration orale du probiotique LA1 à des sujets porteurs d'une gastrite due à *Helicobacter pylori* entraînait une diminution significative de l'inflammation gastrique et de l'intensité de l'infection gastrique par le pathogène (FAO/OMS, 2001).

**I-5-3 le rôle antitoxique des probiotiques:**

Les probiotiques interviennent très certainement dans la neutralisation de produit toxique. Ils provoqueraient une atténuation du catabolisme intra-digestif et une orientation de la microflore intestinale pour réduire l'absorption des substances toxiques (ammoniac, amines et indoles) et diminuer les biotransformations des sels biliaires et des acides gras en produit toxique. Les bactéries probiotiques auraient aussi la capacité de produire des métabolites susceptibles de neutraliser certaines toxines bactériennes (Robin J M et Rouchy A, 2001).

**I-5-4 Effet sur le système immunitaire:**

De nombreuses études ont démontrées que la colonisation bactérienne influence le développement des fonctions immunitaires intestinales et systémiques. Les mécanismes par lesquels les micro-organismes influencent la réponse immunitaire du tissu intestinal ne sont pas très bien connus. Cependant, il est établi que les bactéries commensales (sans danger pour l'hôte) et pathogènes, sont toutes deux capables de moduler cette réponse en affectant la production des différentes populations immunitaire. Les cytokines alors produites par les différentes populations des cellules immunitaires peuvent avoir d'importantes répercussions sur les mécanismes de défense mis en place pour combattre l'infection et ainsi avoir des conséquences importantes sur l'évolution de la maladie (Lessard M, 2004).

**I-5-5 Effet sur l'intolérance au lactose:**

Plusieurs travaux explicatifs ont montré que la lactase de bactéries lactiques participait à la digestion du lactose dans l'intestin. Un travail quantitatif a montré que les sujets déficients en lactase digéraient 90 % du lactose contenu dans 400 g de yaourt et que environ un cinquième de la quantité de lactase présent dans le yaourt parvenait encore active jusqu'à la toute fin de l'intestin grêle après un repas (Luquet F M et Corrieu G, 2005).

de la fièvre aphteuse, certains champignons comme le *Candida albicans* ou certaines bactéries comme *E coli*, *Clostridium*, *Pseudomonas* spp, *Salmonella*. Les probiotiques pourraient également réprimer la croissance des bactéries pathogènes par production de substance antimicrobiennes de type bactérien **(Robin J M et Rouchy A, 2001)**.

#### **I-5-9: Effet sur la formation de cholestérol:**

Des études préliminaires ont révélé que le yaourt ou du lait fermenté contenant des probiotiques entraînent une diminution du taux de cholestérol dans le sang. In vitro, certaines souches de *Lactobacillus* ont la capacité d'assimiler le cholestérol **(Robin J M et Rouchy A, 2001)**.

#### **I-5-10- 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'absorption de certains aliments. Les probiotiques améliorent aussi l'utilisation de la ration alimentaire de manière indirecte en agissant sur la microflore intestinale ou au niveau des cellules épithéliales du tube digestif de l'hôte. Les probiotiques stimulent l'activité enzymatique des microorganismes endogènes permettant ainsi une meilleure assimilation des aliments. Ils stimulent également l'activité de lactase, invertase et maltase des cellules épithéliales du tractus digestif. Les probiotiques permettent aussi d'améliorer l'assimilation des acides aminés essentiels pour l'hôte en inhibant l'action destructrice des désamidonnages et des décarboxylases bactérienne excrétées par la microflore du tube digestif **(Robin J M et Rouchy A, 2001)**.



*Chapitre II:*  
*Les Lactobacillus*

## II. Les Lactobacilles.

### II-1-Définition:

Le genre *Lactobacillus* a été décrit en 1901 pour regrouper des bactéries à Gram positive 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 (**Freyney J et al, 2000**).

### II-2-Classification de *Lactobacillus* :

Règne : Bacteria.

Division : Firmicutes.

Classe : Bacilli.

Ordre : Lactobacillales.

Famille : *Lactobacillaceae*.

Genre : *Lactobacillus*.

La classification remaniée par **Kandler et Weiss, 1986** les subdivise en 3 groupes selon leur type fermentaire :

#### Groupe I : " *Thermobacterium* "

Il comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces généralement thermophiles, comme *Lactobacillus delbrueckii* et *Lactobacillus helveticus* qui participent à la fermentation des produits laitiers, et *Lactobacillus acidophilus* issu de la flore intestinale de l'homme (**Michel F, 2005**).

#### Groupe II " *Streptobacterium* "

Ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire à partir du gluconate. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces majoritairement mésophiles dont *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* et *Lactobacillus plantarum*, intervenant dans la fermentation des produits carnés et céréaliers, et *Lactobacillus casei* utilisé pour ses propriétés probiotiques (**Michel F, 2005**).

### Groupe III "Beta -bacterium"

Il est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sanfransiscensis* et *Lactobacillus kefir* (Michel F, 2005).

#### II-3- Habitat :

Les *Lactobacillus* sont des bactéries classiques du yaourt (en association avec *Lactococcus*) dénuées de pathogénicité. Ces bactéries interviennent d'ailleurs dans d'autres produits alimentaires comme le saucisson (sorte de viande), la choucroute. Les *Lactobacillus* sont présents également chez l'homme et l'animale et constituent la flore autochtone dominante de la partie supérieure du tractus intestinal; *Lb. reuteris* et *Lb. salivarius* sont les espèces les plus fréquemment trouvées en population sous dominante dans la flore colique humaine (Denis F et al, 2007).

#### II-4-Propriété générale de *Lactobacillus*:

##### II-4-1-Morphologie:

Leur morphologie microbiologique varie d'une espèce à une autre : de coccobacilles aux bacilles fins et allongés avec des extrémités arrondies, de largeur 0,9 à 1,2  $\mu\text{m}$ . Se sont de Gram+, non sporulés, immobiles (Guiraud J P, 1998).



Figure 05 : les *Lactobacillus* (Leveau J Y et Bouix M, 1993).

#### II-4-2- Caractères biochimiques :

Les *Lactobacillus* sont des catalase-, microaérophiles ou anaérobies, ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique, certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> à côté de l'acide lactique. Les *Lactobacillus* exigent pour leur développement des milieux bien adaptés, riche en acide aminé, vitamines et acides gras. Ils sont acidophiles, généralement peu protéolytiques et peu lipolytique (Guiraud J P, 1998).

#### II-5-Techniques d'identification de *Lactobacillus* :

##### II-5-1-Technique classique :

Les *Lactobacillus* se multiplient mal sur les milieux ordinaires et nécessitent des conditions semi-anaérobies. Le milieu de culture le plus connu est le milieu MRS (Man-Rogosa-Sharp), qui contient du tween 80 et un pH ajusté à 6,2 ou 6,5.

Les tests biochimiques effectués sur les espèces de genre *Lactobacillus* sont :

- La coloration de Gram.
- L'activité catalytique met en évidence la présence de gaz.
- Type fermentaire : Permet de classer les espèces en Homofermentaires ou hétérofermentaires
- Croissance aux différentes températures : 15°C, 45°C.
- Hydrolyse de l'arginine.
- Croissance sur les milieux hostiles : pH 3,9 à 4.
- Production de dextrines.
- Fermentation des sucres.
- Production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

(Guiraud JP, 1998).

##### II-5-2-Méthode moléculaire :

La caractérisation et la différenciation des souches de *Lactobacillus* sont effectuées à l'aide des méthodes génétiques :

- L'électrophorèse par champs pulsée (RECP) est utilisée pour séparer de longs fragments d'ADN générés par l'utilisation d'enzymes de restriction utiles pour différencier les souches.
- Le profil de bandes générées permet de comparer les souches entre elles.
- Le profil plasmidique aussi est utilisé pour essayer de relier la production de polysaccharides et le caractère mucoïde à la présence d'un ou de plusieurs plasmides.
- Le ribotypage : méthode utilisée pour la caractérisation des sous espèces *Lb. delbrueckii*.

-L'identification rapide des souches de *Lactobacillus* à été réalisée en utilisant des oligonucléotides complémentaires à une région de l'ADN r 23 spécifiques pour *Lb. casei*.

( Dupont I, 1998).

## II-6-Rôle de *Lactobacillus* :

**II-6-1-Rôle de *Lactobacillus* sur la santé :** De nombreuses applications des lactobacilles dans le domaine des probiotiques sont proposées mais seuls quelques résultats sont clairement démontrés (traitement de l'intolérance au lactose, prévention et réduction de la durée des diarrhées à rotavirus chez l'enfant par exemple).

L'action du *Lactobacillus* dans l'absorption intestinale du cholestérol est maintenant démontré; il en diminue le taux et réduit ainsi les risques de trouble cardiaques. Il permet le traitement de certains troubles intestinaux ([www. Anostose. com](http://www.Anostose.com)).

## II-6-2-Le rôle de *Lactobacillus* dans les aliments :

Plusieurs espèces du genre *Lactobacillus* utilisées comme probiotiques jouent un rôle important dans la technologie alimentaire.

Les *Lactobacillus* sont très utilisées dans l'industrie : en laiterie, fromagerie, dans la fabrication de choucroute et de yaourt. Divers lactobacilles (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. buvheri*) interviennent pendant l'affinage des végétaux fermentés (Guiraud JP, 1998).

*Lb. sakei* et *Lb. plantarum* sont utilisées en tant que ferments protecteurs dans les produits carnés. Ils assurent un rôle inhibiteur de la croissance de bactéries indésirables ou potentiellement pathogènes (Freyney et al, 2000).

Les Lactobacilles contaminent fréquemment les produits alimentaires et sont des agents de surissement. Ils ne sont jamais pathogènes. Dans les viandes, les Lactobacilles provoquent le verdissement par action de  $H_2O_2$  qui transforme l'hémoglobine en choléglobine, ou de  $H_2S$  qui forme de la sulfomyoglobine. *Lb brevis*, *casei* et *plantarum* ont une action défavorable dans la bière ainsi que dans d'autres fermentations de grains pour la production d'alcool. Dans les produits conservés par des acides (pH 3,5-3,8) *Lb acidotolérants* et d'autres lactobacilles (*plantarum*, *buchneri*, *brevis*...) peuvent résister et causer des altérations (Guiraud JP, 1998).

## II-6-3-Rôle de l'acide lactique et de pH :

Les lactobacilles produisent de nombreux métabolites à propriété antibactérienne tels que l'acide lactique. C'est le principale ou l'unique produit de fermentation chez de nombreux membres de l'ordre des lactobacillales , ces germes réalisent la fermentation homolactique

suivant la voie d'Embden – Meyerhof ou la fermentation hétéro-lactiques suivant la voie des pentoses phosphates. L'acide lactique permet une acidification importante au milieu, de plus inhibe la croissance des flores d'altération ou pathogène (**Dubus M, 2009**).

### **II-6-3-Production des bactériocines :**

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaires, elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Leur spectre d'action est généralement étroit, la plus part ont une activité contre des pathogène (**Dortir C et Thounart P H, 2009**).

L'espèce de *Lb sakei* produit de sakacin P. Une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de production peut être variable (**Moretro et al, 2000**).

Les conditions de culture influencent fortement la production des bactériocines, en effet, l'optimalisation de la croissance ne résulte pas nécessairement en l'optimalisation de la production de bactériocines (**Parente et al 1999**).

*Chapitre III:*  
*La microflore de*  
*tube*  
*Digestif humain*

### III. LA MICROFLORE DE TUBE DIGESTIF HUMAIN

#### III-1-Le tube digestif humain :

Le tube digestif est un long tube, Il mesure environ 9 m, appelé aussi canal alimentaire qui s'ouvre à l'extérieur par l'intermédiaire de la bouche et de l'anus, il est formé par l'ensemble des organes qui permettent la dégradation, la transformation et l'absorption des nutriments, ces organes sont : la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin et l'anus (Silverthorn D U et al, 2007). (Ramé A et Thérond S, 2005).

La structure de base de la paroi du tube digestif est sensiblement la même, à quelques variations près, dans l'estomac et les intestins. Elle comprend quatre couches : une muqueuse interne du côté de la lumière du tube, une sous muqueuse, des couches de muscles lisses dont l'ensemble forme la musculature externe, et un tissu conjonctif de recouvrement, appelé l'acéreuse (Silverthorn D U et al, 2007).

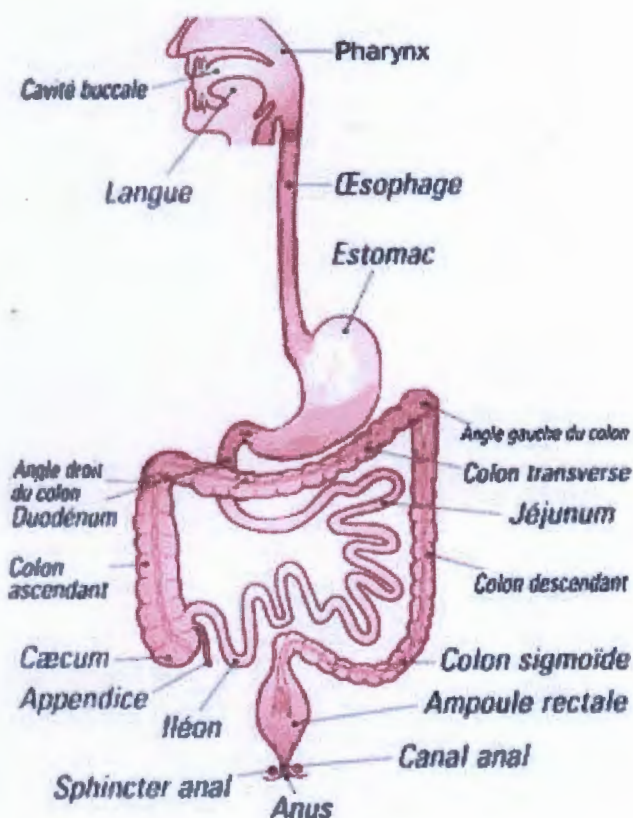


Figure 06 : Le tube digestif humain.



Le tube digestif est caractérisé par deux fonctions:

La première fonction est de faire progresser la nourriture depuis la bouche jusqu'à l'anus et provoquer un broyage de la nourriture permettant d'obtenir un ensemble homogène de petites particules. Ce brassage permet un meilleur contact des particules avec les enzymes en augmentant leur surface.

La deuxième fonction est la défense contre des organismes étrangères, le tube digestif doit en permanence assurer l'absorption de l'eau et des nutriments, tout en empêchant la pénétration des bactéries, des virus et autres agents pathogènes dans l'organisme (**Silverthorn D U et al, 2007**).

### III-2-La microflore de tube digestif :

Le nouveau né humain, est rapidement colonisé par une flore microbienne provenant du contact humain. A deux mois le nourrisson héberge une flore dont la complexité semble proche de celle de l'adulte, mais dont les fonctions sont différentes suggérant ainsi la lente maturation du microbiote.

La population bactérienne du tube digestif peut être évaluée à plusieurs centaines de milliards de germes, le nombre total étant estimé à  $10^{14}$ , un nombre dix fois plus élevé que celui des cellules de notre organisme. Cette énorme biomasse de bactéries joue un rôle important en formant avec leur hôte un système écologique dont l'équilibre est indispensable à la santé de l'individu (**Frexinos J et Buscail L, 2003**).

La flore bactérienne d'appareil gastro-intestinal est complexe, elle varie selon les espèces, l'âge, le régime alimentaires, la culture ambiante et l'utilisation des antibiotiques (**Mandell et al, 2005**).

#### III-2-1-L'estomac :

L'estomac possède une flore très pauvre du fait de son acidité (**Denis F et al, 1998**), elle contient habituellement moins de 10 bactéries viables par ml de fluide gastrique. Ce sont surtout des représentants des germes *Streptococcus*, *Lactobacillus*, et des levures.

Des modifications de la microflore gastrique surviennent s'il ya un accroissement du pH gastrique suivie a une obstruction intestinal (**Lansing M et al, 2003**).

### III-2-2- L'intestin grêle :

La partie la plus longue du tube digestif se nomme l'intestin grêle, ces intestins abritent des bactéries comme les *Lactobacillus* et les *Entérocoque* (Mandell et al, 2005).

### III-2-3-Le jéjunum :

Dans le jéjunum on retrouve occasionnellement *Enterococcus fecalis* et *Lactobacillus*, et la levure *Candida albicans* (Lansing M et al, 2003).

### III-2-5-Les selles :

La microflore fécale est considérée par certains comme représentative de la microflore colique dans son ensemble, les microorganismes dominant de la microflore fécale humaine sont pour les Gram négatives les bacilles du genre *bacteroides*, pour les Gram positives les bacilles non sporulés et les bacilles sporulés, et représentés fréquemment par les genres de *Lactobacilles* (Ronboud J S et al, 2004).

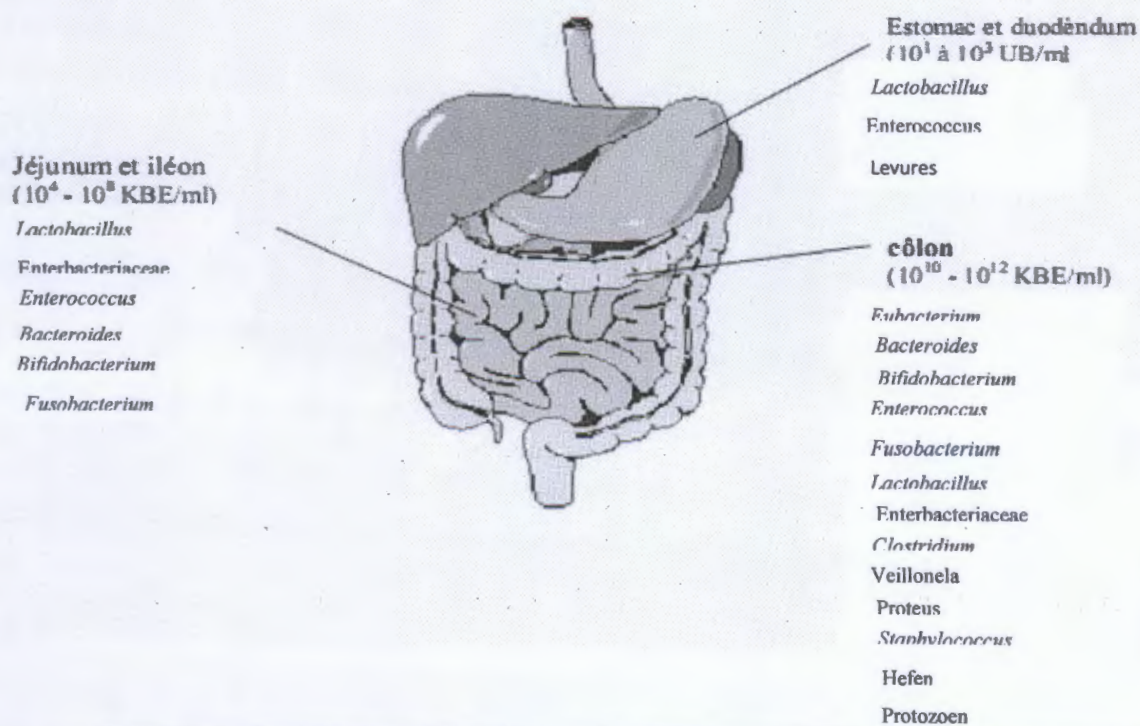


Figure 07 : composition de la flore intestinale humaine dans les diverses portions du tube gastro-intestinal (d'après Holzapfel et al., 1998, modifié)

# *Partie expérimentale*

# *Matériel et méthodes*

**I-Matériel et méthodes :**

**I-1-Matériel:**

Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Jijel entre la période avril – juillet 2010.

**I-1-1-Souches bactériennes :**

- 20 souches de bactéries lactiques isolées et conservées sur bouillon MRS par nos collègues de l'année 2008-2009 ont été étudiées.
- germes tests : *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* et *Staphylococcus aureus*

**I-1-2-Milieus de cultures :**

Au cours de notre étude, nous avons utilisé les milieux suivants :

- Milieu MRS (MAN, ROGOSA, SHARP) liquide et gélose, utilisés pour la culture de Lactobacilles.
- Milieu GIBSON ABDEL-MALEK : pour la recherche de type fermentaire.
- Milieu Hektoen : pour les entérobactéries.
- Milieu M.E.V.A.G sans sucre (Milieu d'étude de la voie d'attaque des Glucides) pour la réalisation des profils de fermentation des sucres.
- Milieu de Moëller à l'arginine pour la recherche de l'arginine dehydrolase (ADH).
- Milieu Chapman : pour la culture de staphylocoque.
- Milieu Muller Hinton : pour l'étude de l'activité antibactérienne.

**I-1-3-Réactifs et matériel :**

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

- bile humaine;
- tampon phosphate salin PBS à pH : 7.2
- Violet de gentiane, fushine, lugol, alcool ;
- La soude (NaOH) N/9 ;

-HCl ;

-Eau oxygénée;

-Lactose, xylose, saccharose, mannose, glucose, galactose ;

-Papier filtre, papier WATMAN N°4.

-pH mètre, four Pasteur, Réfrigérateur, bain marie, spectrophotomètre

## **I-2- Méthodes :**

### **I-2-1- Revivification :**

Cette étape permet de revivifier et multiplier les souches des bactéries lactiques conservées à froid sur milieu MRS.

On ensemence 1ml de chaque souche de bactéries lactiques sur milieu MRS liquide et on incube à 37c° pendant 24h.

### **I-2-2- Isolement et purification :**

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

L'isolement et la purification des lactobacilles est effectuée par repiquages successives sur milieu MRS solide jusqu'à l'obtention des colonies de même taille, même forme et qui renseignent sur la pureté des souches.

Le prélèvement et la remise en suspension se portera uniquement sur des colonies bien distinctes, homogènes et bien développées.

Pour s'assurer de leur pureté, une coloration de Gram suivi d'une observation microscopique est réalisée pour chaque souche. Les souches ainsi purifiées sont alors conservées au réfrigérateur jusqu'à moment d'utilisation.

### **I-2-3-Identification:**

L'identification est établie en se basant sur l'application de différents tests morphologiques, physiologiques et biochimiques, c'est-à-dire on appliqué les techniques de microbiologie classique. (Sharpe M E et al, 1966)

**I-2-3-1-Examen macroscopique:**

L'étude morphologique est portée sur l'observation macroscopique qui consiste à décrire les colonies obtenus sur milieu solide après incubation de 37°C pendant 24h (taille, forme, pigmentation, contour, aspect,.....)(**Hariri et al, 2009**).

**I-2-3-2-Examen microscopique :**

L'examen microscopique permet de déterminer la morphologie des cellules bactériennes, cette examen est révélé par la coloration de Gram utilisée pour différencier les bactéries à Gram positif et Gram négatif (**Hariri et al, 2009**).

La technique de coloration de Gram est la suivante: (**Leyral et Vierling, 2001**).

Préparation du frottis: étalement de l'inoculum bactérien puis fixation par la chaleur;

- Première coloration avec le violet de gentiane durant environ 1 minute.
- Laver à l'eau;
- Faire agir le mordant, c'est la solution de lugol durant environ 30 secondes;
- Laver à l'eau:
- Décolorer par la solution d'éthanol 90 c°
- Laver à l'eau;
- Colorer à la fushine et laisser agir 1 minute;
- Laver à l'eau;

Observer après séchage à l'immersion (objectif\*100) et à pleine lumière;

**I-2-3-3-Recherche de la catalase:**

La catalase ayant la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène, c'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne.

La technique consiste à prélever une partie de colonie et à l'émulsionner dans une goutte d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Une réaction positive est révélée par le dégagement de bulles gazeuses.

(**Guiraud J P, 1998**).

Etude expérimentale

Si la souche dégrade l'arginine elle produit une amine (ammoniac) qui va augmenter le pH du milieu et on observe un virage de la couleur au violet (Hariri et al 2009).

**I-2-Evaluation des aptitudes probiotiques in vitro:**

**I-2-1-Croissance sur milieu acide :**

Pour réaliser ce test, on abaisse le pH de la gélose MRS à différentes valeurs à savoir : PH 3 et PH 4 par l'acide acétique, puis on ensemence le milieu de culture à partir de la dilution  $10^{-3}$  par étalement et on incube à 37°C pendant 24 à 48 H.

La résistance aux acides se traduit par une pousse des colonies sur le milieu de culture.

**I-2-2-Estimation de la croissance :**

Pour réaliser ce test on prépare des cultures jeunes (âgées de 20h) en ensemencant le bouillon MRS par des cultures jeunes âgées de 24h (de la veille) avec un rapport de V/9V.

-La croissance est 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-2-3-Résistance aux antibiotiques :**

Pour réaliser ce test on coule la gélose MRS dans des boîtes de Pétri et on laisse prendre en masse, puis chaque boîte est inondée par l'inoculum des souches testées, le surplus de la suspension bactérienne est récupéré par une micropipette. Les boîtes sont séchées à température de laboratoire. Après séchage de la gélose on dépose dans chaque boîte 6 disques d'antibiotiques: tétracycline, ampicilline, streptomycine, oxacilline, pénicilline, sulfamide.

Après l'incubation à 37°C pendant 24h on apprécie la sensibilité des souches par rapport aux antibiotiques par mesure des zones d'inhibition (Guiraud J P, 1998).

Les antibiotiques testés dans notre étude sont les plus utilisés en Algérie.

**I-2-4-Activité antibactérienne :**

Pour l'étude de l'effet des *Lactobacillus* sur les germes tests on applique la technique suivante : (Shillinger et Lucke, 1989).

La gélose est coulée dans les boîtes de Pétri stériles et laissée prendre en masse, 50µl du bouillon nutritif contenant les souches tests est étalé en surface et laisser sécher.



-Pour *Staphylococcus aureus* on utilise la gélose Muller Hinton, et pour *E. coli*, *Salmonella* et *Klebsiella* on utilise la gélose Hektoen.

-Des disques de papier Wattman stérile (de 5mm de diamètre) sont déposées sur la gélose, puis a l'aide de micropipette 20µl d'une souche de *Lactobacillus* sont déposés sur les disques.

- Après incubation des boites à 37C° pendant 24h, on mesure le diamètre des zones d'inhibition. L'antagonisme entre les lactobacilles et les germes tests est traduit par la présence des zones d'inhibition.

#### **I-2-5-Effet de surnagent sur les entérobactéries :**

Pour l'étude de l'effet des *Lactobacillus* sur les germes tests on applique la technique suivante : **(Tagg et al, 1976).**

Préparation de la culture jeune des souches de *Lactobacillus* par ensemencement de bouillon MRS par des cultures âgées de 24h (de la vielle) à raison de V/9V.

-Le surnagent natif est obtenu après une centrifugation des cultures jeunes des souches de *Lactobacillus* en bouillon MRS à 6000tr/30min. La moitié du volume récupéré est ajusté à pH 6 c'est le surnageant neutre (on neutralise l'acide lactique).

-La gélose Hektoen fondue et refroidie est coulée dans des boites de Pétri puis chaque boite est ensemencée par étalement de 20µl d'une souche d'entérobactéries.

-Des disques de papier Wattman stérile (de 5mm de diamètre) sont déposés sur la gélose, puis a l'aide de micropipette 20µl d'une souche de *Lactobacillus* sont déposés sur les disques.

-Après incubation des boites à 37C° pendant 24h, un résultat positif est caractérisé par apparition de zones d'inhibition autour des disques.

#### **I-2-6-Tolérance à la bile :**

La bile ne contient pas d'enzymes, mais des sels biliaires dont le précurseur est le Cholestérol **(Lin et al, 2007).**

La technique décrite par Lin et al, 2007 a été appliquée. Préparation de la culture jeune des souches de *Lactobacillus* par ensemencement de bouillon MRS par des cultures âgées de 24h (V/9V).

L'ensemencement se fait en double séries : la première série de tubes sert de témoin, la douzième série contient le facteur inhibiteur, la bile à raison de 0,3%. On procède à la mesure de la DO à 620 nm à T=0h et après 4h d'incubation à 37°C. Un dénombrement a été réalisée sur gélose MRS également après 24 heure d'incubation.

### **I-2-7-Test d'adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales :**

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

**Séparation des cellules épithéliales :** Une portion de l'iléum du rat a été utilisée : tout d'abord ce fragment est lavé par solution du PBS (pH : 7.2) pour le débarrasser de tout son contenu ; il est ensuite placé dans un bain de PBS et soumis à une réfrigération à 4°C pendant 30min, afin de faciliter la récupération des cellules de la muqueuse. Après ce temps d'incubation, la préparation est soumise à 4 lavages dans le PBS, suivis d'un repos pendant 3h à 4°C. La solution obtenue après cette durée d'incubation est la suspension des cellules épithéliales.

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

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

**Observation microscopique :** Elle est faite à l'objectif\*100 après préparation de frottis et coloration au cristal violet. Un test positif : adhésion au moins de 15 cellules de *Lactobacillus* /cellule épithéliale.

## *Résultat et discussion*

## **II-Résultats et discussion:**

### **II-1-Purification :**

Notre travail a abouti à l'obtention d'une collection de 34 souches de bactéries lactiques pures à partir des souches conservées à froid sur bouillon MRS.

### **II-2- Identification :**

#### **II-2-1-Etude des caractères morphologiques**

##### **II-2-1-1-Examen macroscopique:**

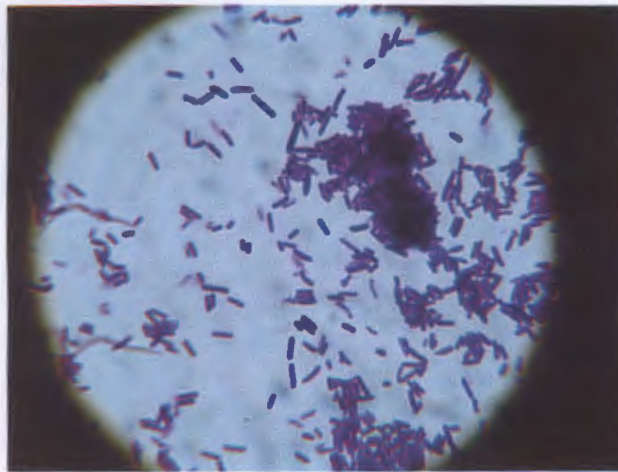
L'observation macroscopique (à l'œil nu) montre que les souches cultivées sur gélose MRS donnent des colonies bien isolées, de différentes tailles, de couleur blanchâtre, jaunâtre et brillante. Après purification, sur chaque boîte, on a remarqué des colonies bien distinctes de même taille et de même couleur témoignant de la pureté des souches (figure 08).



**Figure 08 : Aspect macroscopique des colonies de la souche *Lactobacillus***

##### **II-2-1-2-Examen microscopique:**

Après coloration de Gram, les observations microscopiques révèlent que toutes les souches retiennent la couleur violette, ce qui indique qu'il s'agit de Gram positif. Ces observations microscopiques ont permis aussi de déterminer le mode de regroupement et la forme dominante: isolées ou en chaînettes, bacilles ou coccobacilles (figure 08).



**Figure 09: *Lactobacillus*, observation après coloration de Gram**

Les *Lactobacillus* sont des bacilles ou coccobacilles à Gram positif, isolés ou en chainettes (Hariri et al, 2010). Ceci est en accord avec les résultats obtenus dans notre étude.

#### **II-2-2-Tests physiologiques et biochimiques :**

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques sont portés dans le tableau (I).

##### **II-2-2-1-Test de catalase:**

Toutes les souches testées sont catalase négative.

##### **II-2-2-2-Test de croissance à différentes températures :**

Le test de croissance à différentes températures a montré que toutes les souches sont thermophiles se développant bien à 45°C.

##### **II-2-2-3-Test de l'ADH :**

Pour la recherche de l'enzyme ADH (figure 10), après incubation, on a remarqué que seulement la souche 13 (S13) qui donne un résultat positif, ce qui explique sa capacité à dégrader l'arginine par l'enzyme de l'arginine dehydrolase soit un pourcentage 4%, mais le reste des souches donnent des résultats négatifs avec un pourcentage de 96%.(figure 10)



**Figure 10 : Test de l'ADH.**

**II-2-2-4-Recherche de type fermentaire:**

Pour la recherche de type fermentaire sur le milieu GIBSON-ABDELMALEK, on a constaté que tout la collection des souches est homofermentaire avec un pourcentage de 100% car il n'y a pas déplacement du bouchon de la gélose blanche. Elles donnent comme seul produit de l'acide lactique.

Tableau I : Profil biochimique des souches de bactéries Lactiques étudiées.

Souches	Gram	Forme	Catalase	Croissance à différent température		ADH	Type fermentaire
				45°C	15°C		
S1	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S2	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S3	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S5	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S7	+	Coccobacille	-	+	-	-	Homo
S9	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S10	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S11	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S12	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S13	+	Bacille	-	+	-	+	Homo
S15	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S17	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S18	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S19	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S20	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S21	+	Coccobacille	-	+	-	-	Homo
S24	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S25	+	Coccobacille	-	+	-	-	Homo
S26	+	Coccobacille	-	+	-	-	Homo
S27	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S28	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S30	+	Coccobacille	-	+	-	-	Homo
S31	+	Coccobacille	-	+	-	-	Homo
S32	+	Bacille	-	+	-	-	Homo
S34	+	Bacille	-	+	-	-	Homo

+ : Test positif ; - : Test négatif ; Homo : Homofermentaire

Après l'étude des caractères biochimiques et physiologiques, vingt Cinq (25) souches seulement, présentées dans le tableau I, ont été retenues sur trente quatre (34). Les souches non retenues ne correspondaient pas au profil des *Lactobacillus*. Elles ont éliminées au fur et à mesure de l'étude.

Les *Lactobacillus* sont catalase (-), généralement ADH (-), ce qui concorde avec nos résultats. Le test de croissance à différentes températures montre que les souches retenues sont mésophiles et selon le profil fermentaire sont des homofermentaires.

Selon (**Michel F, 2005**) les *Lactobacillus* se divisent en 03 groupes :

- Les homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ce groupe est constitué généralement de thermophiles, comme *Lactobacillus delbrueckii* et *Lactobacillus helveticus* qui participent à la fermentation des produits laitiers, et *Lactobacillus acidophilus* issu de la flore intestinale de l'homme

- Les hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire à partir du gluconate. Il est constitué de mésophiles dont *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* et *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*

- Les hétérofermentaires obligatoires c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sanfransiscensis* et *Lactobacillus kefir*.



## II-2-2-5-Fermentation des sucres :

Les résultats des profils biochimiques des 25 souches étudiées sont résumés dans le tableau II

**Tableau II** : Profils fermentaires des sucres des souches de bactéries lactiques étudiées.

Souches	Lactose	Saccharose	Xylose	Ribose	Mannose	Galactose
S1	+	+	-	-	-	+
S2	+	-	-	-	+	+
S3	+	-	-	-	-	-
S5	+	-	-	-	-	+
S7	+	+	-	-	+	+
S9	+	-	-	-	-	+
S10	+	-	-	-	-	+
S11	+	-	-	-	-	+
S12	+	-	-	-	-	-
S13	+	+	-	-	-	+
S15	+	-	-	-	-	-
S17	+	-	-	-	-	+
S18	+	-	-	-	+	+
S19	+	-	-	-	+	+
S20	+	-	-	-	-	-
S21	+/-	+	-	-	+	+
S24	+	+	-	-	-	-
S25	+	-	-	-	-	+
S26	+	-	-	-	-	+
S27	+	+	-	-	-	+
S28	+	-	-	-	-	+
S30	+	+	-	-	-	+
S31	+	-	-	-	-	+
S32	+	-	-	-	-	-
S34	+	-	-	-	-	-

**+** : Résultat positif ;    **-** : Résultat négatif ;    **+/-** : Résultat variable ;

Le test positif de la fermentation d'un sucre par une souche de lactobacille se traduit par un virage de milieu du rouge au jaune (figure 11).



**Figure 11 : Résultats de la fermentation des sucres par les *Lactobacillus*.**

Les résultats du tableau, révèlent qu'il y a une petite variabilité entre les souches vis-à-vis de sucre mis au test.

Le profil fermentaire des sucres permet d'identifier les groupes et les espèces des lactobacilles.

### **II-2-3-Identification des souches:**

Les résultats des profils fermentaires des sucres ainsi que les autres tests biochimiques ont été traités au niveau du laboratoire de Microbiologie, de l'université de JIJEL, afin d'identifier le nom des espèces des souches *Lactobacillus*.

Tableau III : Identification des espèces de *Lactobacillus*.

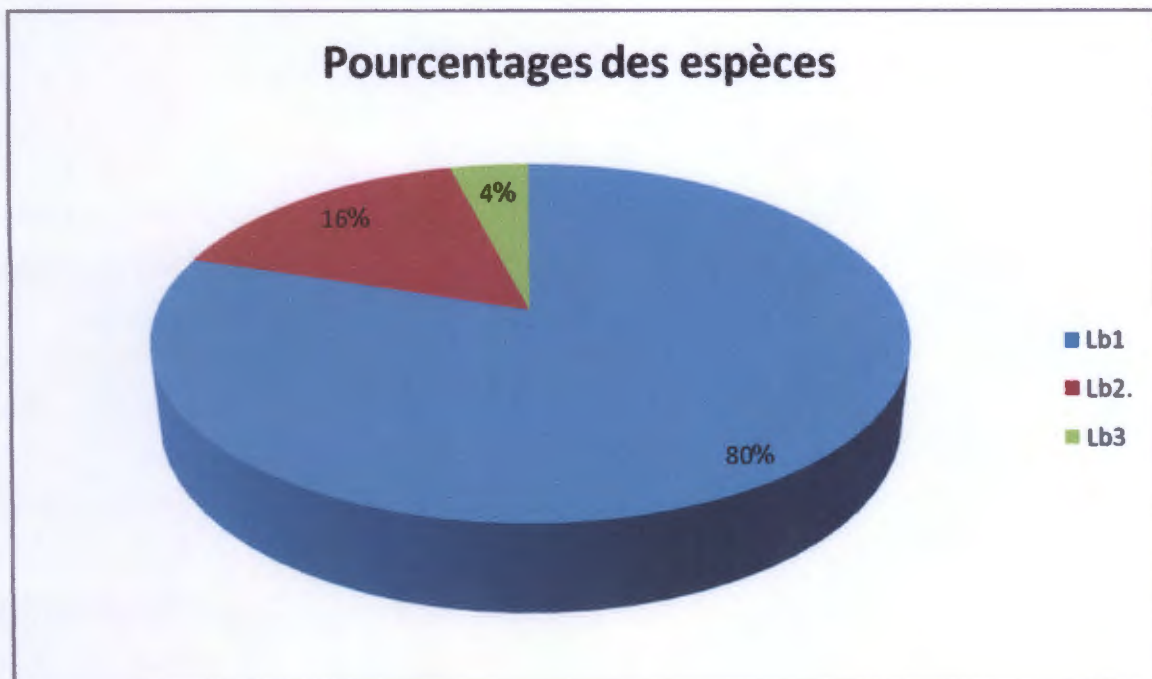
Codes	Espèces identifié
S1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
S2	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S3	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S5	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S7	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
S9	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S10	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S11	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S12	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S13	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
S15	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S17	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S18	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S19	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S20	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S21	<i>Lactobacillus gasseri</i>
S24	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S25	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S26	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S27	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
S28	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S30	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
S31	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S32	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>
S34	<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>

Selon la littérature (Prescott L M et al, 2002), les espèces retrouvées dans notre études sont des espèces d'origine humaine, elles sont représentées selon les pourcentages suivants (tableau IV)

Tableau IV : pourcentages des espèces identifiées.

Nom d'espèce	Nombre	Code	%
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i>	20	Lb1	80%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4	Lb2	16%
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1	Lb3	4%

La souche la plus dominante est *Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus* avec 80% et l'espèce *Lactobacillus gasseri* ne représente que 4% (figure 12).



Lb1: *Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus*.

Lb2: *Lactobacillus acidophilus*.

Lb3: *Lactobacillus gasseri*.

Figure 12 : Répartition des espèces en pourcentage.

## II-3-Evaluation des aptitudes probiotiques :

## II-3-1- Croissance sur milieu acide :

Les résultats de degré de résistance des souches en milieu acide testées à pH 3 et à pH 4, sont représentés dans le tableau V.

**Tableau V** : Croissance des souches de *Lactobacillus* étudiées à différents pH

Souches	pH <sub>3</sub>	pH <sub>4</sub>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (S1)	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S2)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S3)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S5)	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (S7)	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S9)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S10)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S11)	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S12)	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (S13)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S15)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S17)	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S18)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S19)	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S20)	-	+
<i>Lactobacillus gasseri</i> (S21)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S24)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S25)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S26)	-	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (S27)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S28)	-	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (S30)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S31)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S32)	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S34)	-	+

+: Résultats positif

- : Résultats négatif

D'après les résultats cités dans le tableau V, nous constatons que les souches de *Lactobacillus* étudiés ont la capacité de se développer à des pH bas, donc ils peuvent résister ultérieurement aux conditions d'acidité de l'estomac.

Les souches 1, 5, 7, 11, 12, 17 et 19, montrent une résistance à pH 3 et pH 4 Par ailleurs les souches restantes sont sensibles à pH 3

Seules les souches qui ont résistés au pH 3 ont été retenues pour le test suivant.

La résistance à l'acidité constitue l'un des critères de choix des probiotiques par conséquent, les souches retenues dans notre études selon ce critères auront la capacité de traverser l'estomac sans être inhiber par le jus estomacal.

### II-3-2-Estimation de la croissance:

Cette partie a été réalisée par la calcule de la densité optique (DO) des souches en utilisant la méthode spectrophotomètre. Les résultats obtenus relatifs à la mesure de la DO de la population bactérienne correspondante sont portés dans le tableau VI.

**Tableau VI** : Mesure de la densité optique des souches de *Lactobacillus* étudiées.

Souches	DO (620nm)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (S1)	0,8513
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S5)	0,4200
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (S7)	0,2678
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S11)	0,9518
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S12)	0,3082
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S17)	1,9181
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S19)	0,9850

D'après les résultats obtenus, chaque espèce de *Lactobacillus* a une DO spécifique. En effet nos résultats montrent que les souches appartenant à la même espèce présentent approximativement la même DO (Duchuzrau R et al, 1986). Exemple les souches 11 et 19 de *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus*.

## II-3-3-Résistance aux antibiotiques :

Les résultats du test d'antibiogramme sont résumés dans le tableau VII et illustrés dans la figure 13.

Tableau VII : Résistance aux antibiotiques.

ATB Souches	Strepto- mycine	Pénici- lline G	Ampicilline	Oxaci- lline	Sulfa- mide	Tétracycline
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (S1)	R	S	R	S	R	S
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S5)	R	S	R	S	R	S
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (S7)	R	S	R	R	R	S
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S11)	R	S	R	R	R	S
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S12)	R	S	R	R	R	S
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S17)	R	S	R	S	R	S
<i>Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S19)	R	S	R	R	R	S

R : Résistant

S : Sensible

D'après nos résultats nos souches sont toutes résistantes à la Streptomycine, Ampicilline Sulfamide, par contre elles sont sensibles à la Pénicilline G et la Tétracycline avec des zones d'inhibition variant entre 15mm et 20mm.

Enfin, pour l'Oxacilline, on trouve que les souches *Lactobacillus acidophilus* (S7), *Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus* 11, 12 et 19 sont résistantes et le reste des souches sont sensibles.

Selon Hamilton-Miller les données bibliographiques, 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 traitement dans les maladies infectieuses nécessitant une antibiothérapie.



Figure 13 : Résultats de l'antibiogramme.

#### II-3-4-La tolérance de *Lactobacillus* aux sels biliaries :

Dans cette étude nous avons utilisé des sels biliaries à 0,3 % pour l'étude de la tolérance de *Lb* à la bile ; les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Résistance des souches de *Lactobacillus* à la bile humaine.

Souches	Témoin		avec bile (0,3%)	
	DO	UFC $\times 10^7$	DO	UFC $\times 10^7$
<i>Lb. acidophilus</i> (S1)	2,0938	2612	1,0571	532
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S5)	2,2158	1396	1,3220	662
<i>Lb. acidophilus</i> (S7)	2,1929	2660	1,6458	656
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S11)	2,1608	728	1,2007	208
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S12)	2,1608	600	1,0684	412
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S17)	2,1405	536	1,1959	256
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S19)	2,1307	1353	1,2688	1040



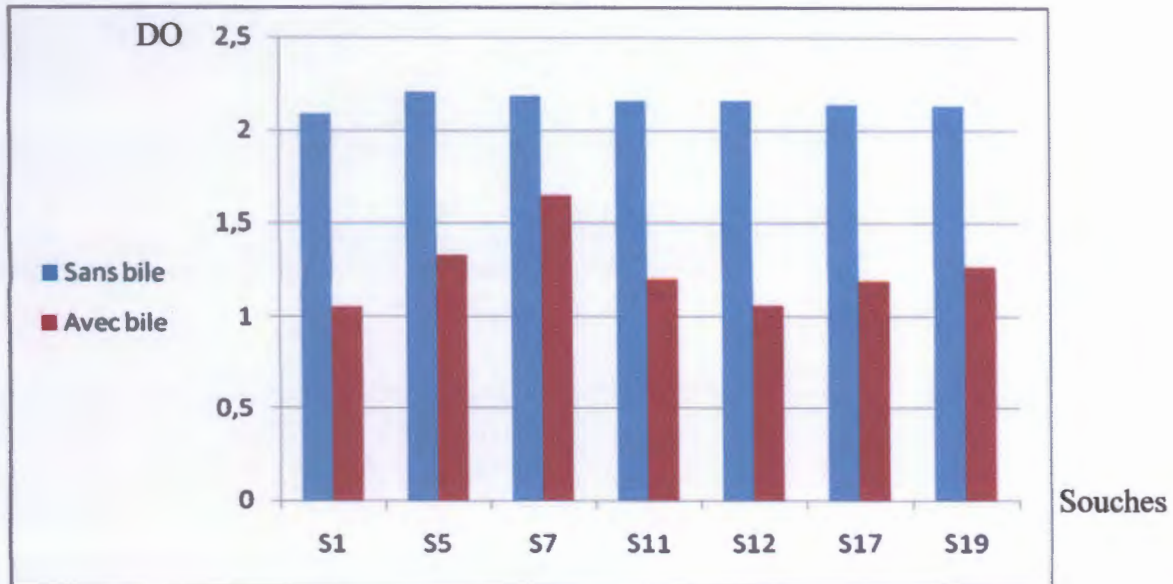


Figure 14 : Mesure de la densité optique en présence et en absence de la bile.

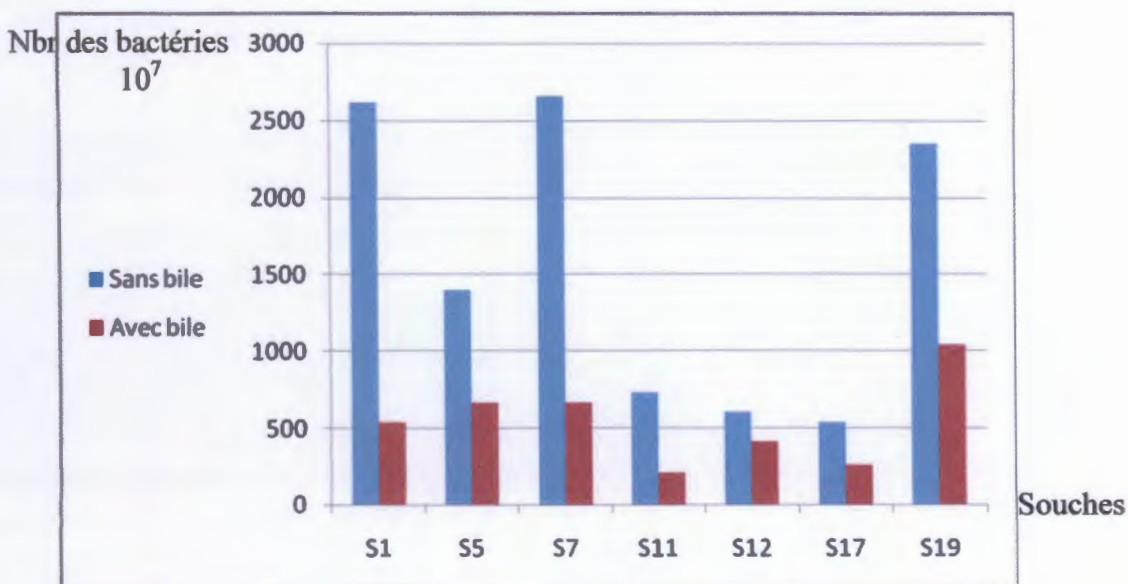


Figure 15 : Dénombrement de *Lactobacillus* en présence et en absence de la bile.

Les résultats montrent que la présence de la bile perturbe la croissance de la plus part de nos souches et la dose utilisée conduit à une perte de croissance.

Après la comparaison des différents résultats à la tolérance de notre souche à la bile, on remarque qu'il y a une différence entre les souches de même espèce comme la souche *Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus* (S19) est plus résistante que celle codé (S5), par ailleurs les souches 1 et 7 de l'espèce *Lb. acidophilus* représentent presque la même résistance aux sels biliaries.

Cependant, la lecture des résultats nous laisse constater que les souches 19,12 et 17 représentées par l'espèce *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus* sont les plus résistantes de la collection.

Pour le choix d'un probiotique, il est indispensable que la souche soit résistante à la bile en concentration importante afin d'avoir un effet sur la santé de l'hôte (Lessard M, 2004).

### II-3-5-Activité antibactérienne:

Ce test va mettre en évidence les caractéristiques que possèdent, certaines souches *Lactobacillus* à stimuler ou inhiber d'autres souches. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IX et illustrés dans la figure 16.

**Tableau IX :** Activité inhibitrice des *Lactobacillus* sur les germes tests.

Germes tests	<i>E. coli</i>	klebsiella	<i>Salmonella</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Pseudomonas</i>
	Diamètre d'inhibition en mm				
<b>Souches</b>					
<i>Lb. acidophilus</i> (S1)	10mm	in	15mm	14mm	10mm
<i>Lb.delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S5)	9mm	in	14mm	12mm	12mm
<i>Lb. acidophilus</i> (S7)	9mm	in	10mm	13mm	13mm
<i>Lb.delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S11)	12mm	in	7mm	12mm	13mm
<i>Lb.delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S12)	11mm	in	7mm	10mm	12mm
<i>Lb.delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S17)	10mm	in	11mm	11mm	12mm
<i>Lb.delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S19)	10mm	in	10mm	13mm	11mm

in : indéterminé

Il est clair, d'après les résultats que les souches étudiées manifestent un antagonisme plus au moins prononcé vis-à-vis des germes tests.

La présence des zones d'inhibition est les résultats d'un antagonisme exercé par les *Lactobacillus* envers les souches de germes tests. Les diamètres de zones d'inhibitions sont entre 7 à 15mm dont

les souches codées S1: *Lb. acidophilus* et S5 : *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus* présentent les zones d'inhibition les plus larges vis à vis de *St. aureus*.



**Figure 16** : Effet de *Lactobacillus* sur l'espèce *Staphylococcus aureus*.

Les travaux de Karska W et al, 2010 ont rapportés que les bactériocines produites par *Lactobacillus acidophilus* développent une activité positive vis-à-vis de *Salmonella choleraesuis*, respectivement *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Enfin, Itoh et al, 1995, Tahara et Kanatani, 1996 ont montré qu'il est également possible que la souche *Lactobacillus acidophilus* exerce uniquement une activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries taxonomiquement proches de la souche productrice.

## II-3-6-Activité inhibitrice de surnageant:

Concernant ce test, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant:

**Tableau X :** effet du surnageant natif sur les germes tests.

Souches	Germes tests			
	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S.aureus</i>
	Diamètre d'inhibition en mm			
<i>Lb. acidophilus</i> (S1)	0mm	30mm	28mm	0mm
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S5)	30mm	28mm	28mm	0mm
<i>Lb. acidophilus</i> (S7)	0mm	32mm	25mm	0mm
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S11)	22mm	32mm	27mm	0mm
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S12)	35mm	32mm	30mm	0mm
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S17)	28mm	30mm	0mm	0mm
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S19)	0mm	38mm	26mm	0mm

D'après les résultats enregistrés dans le tableau X, on remarque que les surnageants de *Lactobacillus* ont un effet inhibiteur plus intéressant via les entérobactéries, par exemple le surnageant de la souche *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus* (05) est plus efficace que le germe lui-même.

En effet, et à titre d'exemple, le surnageant natif de la souche *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus* (5, 11,12) inhibe 03 parmi les 04 germes soumis au test avec des diamètres d'inhibition de 22 à 32 mm dont la souche la plus sensible est *Klebsiella* avec un zone d'inhibition: 38mm.

En remarque que *klebsiella* est la plus sensible via les métabolites de *Lactobacillus*, cependant, le *Staphylococcus* ne représente aucune sensibilité.

La technique utilisée pour l'obtention de surnageant neutre nous a permis de récupérer les métabolites cellulaires de *Lactobacillus* et éliminer l'effet de l'acide lactique par neutralisation. Par conséquent l'effet combiné ou d'une de ces substances est à l'origine de cette activité inhibitrice. Toutes fois des études complémentaires sont nécessaires de déterminer la nature de celles ci.

D'après la littérature (**Larpen J P, 1996**) les substances antimicrobiennes synthétisées par les probiotiques ne sont pas toutes élucidées. On connaît actuellement entre autres les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène et l'acide lactique, toute fois le spectre d'action antimicrobien diffère d'une souche à une autre et dépend de la souche cible elle même.

Tableau XI : effet du surnagent neutre sur les germes tests.

Germes tests	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S.aureus</i>
<i>Lactobacillus</i>	Diamètre d'inhibition en mm			
<i>Lb. acidophilus</i> (S1)	0mm	0mm	20mm	0mm
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S5)	0mm	28mm	25mm	0mm
<i>Lb. acidophilus</i> (S7)	0mm	25mm	15mm	0mm
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S11)	0mm	0mm	10mm	0mm
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S12)	0mm	9mm	12mm	0mm
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S17)	18mm	22mm	20mm	0mm
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S19)	12mm	0mm	0mm	0mm

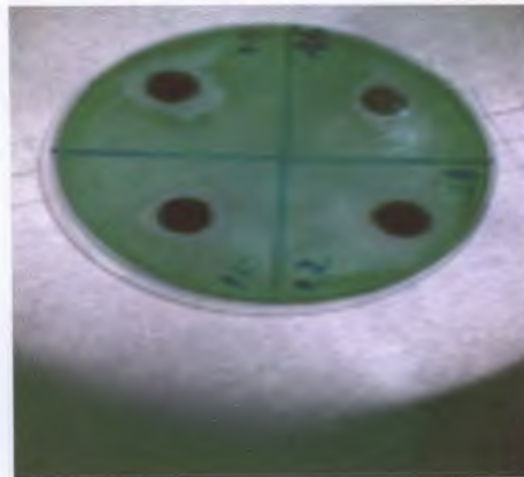


Figure 17 : effet du surnageant neutre sur les entérobactéries.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau (12) et par comparaison avec ceux obtenus avec les surnageant natifs (tableau 12) on remarque que l'action des surnageant neutres est plus faible.

Après la neutralisation des acide organiques et particulièrement l'acide lactique il y a eu lieu de constaté une disparition presque totale de l'activité inhibitrice de surnageant et cela nous laisse supposer que le facteur d'inhibition est représenté par les acide organique produit par nos souches *Lactobacillus*.

La présence des zones d'inhibition est liée à la présence des métabolites ayant une action antimicrobienne sur les souches entérobactéries, alors qu'après élimination des acides organique par l'ajustement de pH, l'inhibition qui persiste est due aux autres substances telles que les

bactériocines, les antibiotiques, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et autres substance. Il apparaît que les surnagent neutres de *Lb. acidophilus* (S7), *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus* : 5 et 7 sont les plus actif sur cette collection.

### II-3-7-Test d'adhésion de *Lactobacillus* aux cellules épithéliales:

Les résultats de l'adhésion des *Lactobacillus* aux cellules épithéliales du rat sont résumés dans le tableau XII et exprimé dans la figure 18.

**Tableau XII** : résultats de l'adhésion des *Lactobacillus* aux cellules épithéliale.

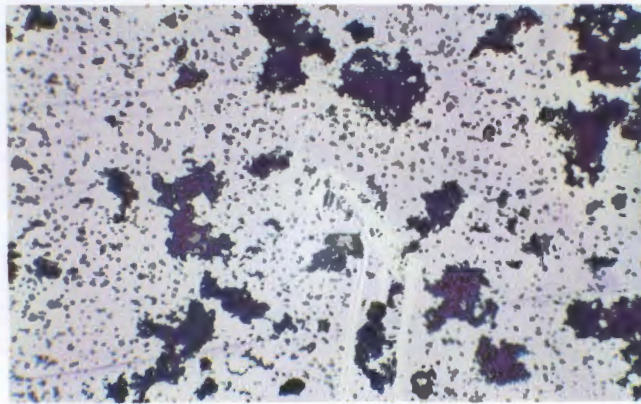
Souches	Pouvoir adhésif
<i>Lb. acidophilus</i> (S1)	++
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S5)	+++
<i>Lb. acidophilus</i> (S7)	+
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S11)	+
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S12)	+
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S17)	++
<i>Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S19)	+

+:adhésion positive

Après avoir testé l'aptitude de notre collection de *Lactobacillus* à adhérer aux cellules épithéliales de l'iléum du rat, il apparaît clairement que la quasi-totalité des souches présente cette propriété probiotique.

Les souches codées *Lb. acidophilus* (1), *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus* (5, 17) manifestent un excellent pouvoir d'adhésion pour lequel le comptage des bactéries fixées aux cellules était à un nombre assez important.

La figure ci-dessous, illustrent la capacité des espèces codées 05 (figure18) a adhéré aux cellules épithéliales.



**Figure 18** : adhésion d'une souche de *Lactobacillus* aux cellules épithéliales

La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale est un des critères de sélection les plus importants des probiotiques parce qu'elle est considérée comme une condition préalable à la colonisation et la croissance; l'effet probiotiques serait maximal si les organismes probiotiques adhèrent aux cellules muqueuses intestinales (Denis R et al, 2006).

# *Conclusion*



La conservation des bactéries lactiques sur milieu MRS pendant une période plus ou moins longue (une année dans notre étude) nous a permis d'isoler et d'identifier des souches de *Lactobacillus* qui ont gardé leur vitalité et probablement conservé leurs propriétés probiotiques pour les souches probiotiques.

L'identification selon leur profil biochimique et physiologique a conduit aux espèces suivantes : *Lactobacillus gasseri* (4 %), *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus*, avec une répartition de 4 %, 16 % et 80 % respectivement. Ces souches sont isolées chez l'homme.

L'évaluation des aptitudes probiotiques a conduit à une sélection des souches intéressantes via l'ensemble des critères :

- Toutes les souches ont la capacité de se développer à des pH bas (pH 4) par ailleurs les souches 1, 5, 7, 11, 12, 17 et 19, montrent une résistance à pH 3 et pH 4, ceci laisse à suggérer qu'elles peuvent résister ultérieurement à l'acidité de l'estomac.
- La majorité des souches résiste également à la bile humaine, composante importante du contenu de tube digestif. Cette résistance est plus forte chez des souches S12 et S19.

L'étude de la résistance aux antibiotiques a montré que la majorité des souches de *Lactobacillus* est résistante aux antibiotiques, surtout les souches S7, S11 et S12. Généralement les souches résistantes aux antibiotiques sont utilisées comme adjuvant dans le traitement des maladies infectieuses et les diarrhées résultantes d'une antibiothérapie.

L'activité inhibitrice des souches de *Lactobacillus* vis-à-vis des germes pathogènes varie d'une espèce à une autre avec des diamètres de zone d'inhibition allant de 10 à 15 mm. Cependant, le surnageant natif - surtout des souches 12 et 19 - montre une activité inhibitrice plus importantes que les germes eux-mêmes sur les bactéries tests.

Le surnageant neutre, son activité inhibitrice est plus faible que le surnageant natif. Il apparaît que les surnageants neutres de *Lb. acidophilus* (S7), *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus* (5) sont les plus actifs.

Le test d'adhésion des souches *Lactobacillus* aux cellules épithéliales, a montré que nos souches surtout : S1, S5 et S17 possèdent un pouvoir adhésif très remarquable.

## Conclusion

---

Sommairement, les souches *Lb. acidophilus* (S7), *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus* (S19) présentent les profils probiotiques les plus intéressants selon les tests appliqués.

En conclusion, ce travail nous permet d'une part, d'acquérir des connaissances nouvelles sur les probiotiques et d'autre part de contribuer modestement dans la recherche sur ce sujet, qui reste malgré, son importance, très mal connus dans notre pays.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1-Baelde D, Brassart D, Corthier G, Doré J, Heyman N, Martrau P, Matuchansky C, et Michel C, 2005.** Effet des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte (Rapport). P: 19.
- 2-Catanzaro J A et Green, 1997.** Microbiol ecology and probiotics in humain medicine. Rev Alternative medicine, **4**, p: 11-15.
- 3-Denis C, 2009.** Meta-analyse des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogenèse, Thèse d'état, P: 66-68.
- 4-Denis F, Montril H et Avril J S, 1998.** *Bactériologie clinique*, 2<sup>ème</sup> éd Marketing, Paris, P: 144-145.
- 5-Denis F et Cecile Ploy M, 2007.** Bactériologie médicale in : *Techniques usuelles*. 2<sup>ème</sup> éd Masson, P : 148-152.
- 6-Denis R, Amiot J, Boutin Y, Lamouneux M et Delcenserie V, 2006.** Innocuité, qualité et efficacité des probiotiques, AISA(Rapport), Université LAVAL, **08-31**, P : 01.
- 7-Dortir C et Thauart P, 2009.** Caractéristique pour la bioconservation des produits alimentaires Biotechol. Agron. SOC, Environ : **13(1)**, P : 143-152.
- 8-Dubus M, Abfilboux M et Ronon M, 2009.** *Dietitique et nutrition*, 7<sup>ème</sup> éd Masson, p : 145.
- 9-Ducluzeau R, Ladire M et Laplace J P, 1986.** Evaluation de la flore microbienne caecale après isolement chirurgical du gros intestin chez le proc (Article). *Annales de l'institut pasteur. Microbiologie*, **137(1)**, P: 123-128.
- 10-Dupont I, 1998.** Identification moléculaire des souches de *Lactobacillus* productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'EPS par trois souches. Thèse d'état. Université Laval, P: 53.
- 11-FAO/OMS Rapport d'experts, 2001.** Health and nutritional properties of probiotics In food including powder milk with live lactic acid bacteria.
- 12-Frexinos J et Buscail L, 2003.** Pour le praticien in : *Hépto-gastroentérologie proctologie*, 5<sup>ème</sup> éd Masson. ISBN, P: 217.

- 13-Freyney J, Renaud F, Hansen W, and Bollet C, 2000.** *Précis de bactériologie clinique*. éd ESKA, P: 19.
- 14-Guiraud J. P, 1998.** Microbiologie intervenant dans l'industrie alimentaire in : *Microbiologie alimentaire*. 1<sup>ère</sup> éd DUNOD. Paris, P: 90-393.
- 15-Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Bigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, et Miglioli M, 2000.** Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A Double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterol (Rapport)*, **119**, p: 309.
- 16-Hariri A, Owis N, Sahnouni F et Djilali B, 2000.** Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. Thèse d'état. Université d'Oran Es-Senia, Bp 1524, P: 43.
- 17-Holzappel W H, Habber P, Schillinger and Huis in't Veld J H J, 1998.** Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol*, **41(02)**, p: 101.
- 18-Itoh T, Fujimoto Y, Kawai Y, et Satto T, 1995.** Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocin from *Lb.gasseri*. *Lett. Appl. Microbial*, **12**, P: 18.
- 19-Kandler O and Weiss N, 1986.** In : *Bergey's Manual of systématiques bacteriology*, Williams et Wilkins, éd Baltimore, P: 1208-1234.
- 20-Karska W, Bazaa M, Smoragiewicza W, 2001.** Antibacterial activity of *Lb. acidophilus* et *Lb. casei* agasei against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Microbiological research* Available online, P: 18.
- 21-Lansing M, Prescott P, Harley L, Douald A, Klein, Chair M. Colberg B et Dusant J, 2003.** *Microbiologie*. 2<sup>ème</sup> éd éditeur de Boeck université, P: 702.
- 22-Larpent J P et Gourgaud, 1997.** Les microorganismes procaryotes in : *Mémento technique de microbiologie*. 3<sup>ème</sup> éd Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 256-466-481.
- 23-Larpent J P, 1996.** Les bactéries lactiques in : *Microbiologie alimentaire, aliment ferments fermentés et fermentation alimentaire*. Tom 2. 2<sup>ème</sup> éd Tec et Doc. Paris, P : 5-20.
- 24-Lessard M, 2004.** Utilisation des probiotiques chez le porc, modulateurs potentiels de la santé intestinale (Rapport), P : 05.
- 25-Leveau J Y et Bouix M, 1993.** *Bifidobacterium* in: *Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel*, éd Tec et Doc Lavoisier, paris p: 170-189.

- 26-Leveau J Y et Bouix M, 1993.** Les bactéries lactiques in: *Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel*, éd Tec et Doc Lavoisier, paris p: 170-189.
- 27-Leyral G et Vierling E, 2001.** Diversité du monde microbien in : *microbiologie et toxicologie des aliments, hygiène et sécurité alimentaire*. 3<sup>ème</sup> éd, P: 25-91.
- 28-Lin J, and Wilbus, 2007.** A probiotic topic – based model for content similarity, *BCM bioinformatics*, Pub Med related articles, **08(01)**, P: 432.
- 29-Luquet F M et Corrieu G, 2005.** Application des bactéries lactique dans les produits laitier frais et effet probiotiques ; probiotiques et aliments in : *Bactéries lactiques*, éd Tec et Doc, Lavoisier, P: 72.
- 30-Mandell B, Benett Zet Dolin W, 2005.** Principles and practice of infections diseases, éd Churchill Livingstone, **82**, P: 89-92
- 31-Michel F, 2005.** *Microbiologie alimentaire*, compendium d'hygiène des aliments, 2<sup>ème</sup> éd Economica, P : 219-220.
- 32-Morelli L, 2000.** In vitro selection of probiotic Lactobacilli: a critical appraisal. *Curr. Issues Intest. Microbiol*, **01**, P: 59-67.
- 33-Moretro T, Aosen I M et Ascelssont, 2000.** Production of sotakin Pby L. Soker in a completely defined medium *J. Appl. Microbiol*, **88**, P: 536-545.
- 34-OMS, 2009.** Health and Food (Rapport), **4**, P: 409-426.
- 35-Parente E et Ricciardi A, 1999.** Production recovery and purification of bacteriocine from lactic acid bacteria. *Appl Microbiol. Biotechnool*, **52**, P: 628-638.
- 36-Prescott L M, Harley J P et Klein D A, 2002.** La microflore normale et la résistance non spécifique de l'hôte in : *Microbiologie*, 2<sup>ème</sup> éd Deboek et Lavoisier S-a, Université de liège. Bruscelles, P : 703.
- 37-Ramé A et Therond S, 2005.** Anathomie et physiologie, éd Elsevier Masson, P : 202-203.
- 38-Robin J M et Rouchy A, 2001.** Les probiotiques. *NUTRANEWS Science, nutrition, prévention et santé*, **12**, P: 02-12.
- 39-Ronboud J s et Buts J P, 2004.** *Physiologie et pathologie digestif*, éd John Libbey Eurotext, P: 61.

- 40-Rolfe R D, 2000.** The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of nutrition*, **130**, P: 3965-4025.
- 41-Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto j, Mattila et Sandholm T, 2000.** Probiotic bacteria: Safety functional and technological properties *J B cotechol*, éd Lavoisier, **84**, P: 197-215.
- 42-Salminen S, Ouwehand A C and Isolauri E, 1998.** Clinical application of probiotic bacteria, *Int. Diary J*, **8**, P: 563-572.
- 43-Scardovi V, 1986.** In *bergey's Manual of systematic bacteriology*, Vol **2** Williams et Wilkins, éd Baltimore, P: 418-434.
- 44-Schillinger U et lucke F, 1989.** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat, *Appl. Environ Microbiol*, **55**, P: 1901-1906.
- 45-Shanahan F, 2000.** Probiotic and inflammatory bowel disease: Is there a Scientific nationale? *Inflammatory bowel Diseases*, Article first Publisher online: 18APR2007, **6(2)**, P: 15-107.
- 46-Sharpe M E, Fryer T E et Smith D G, 1966.** Identification of the lactic acid bacteria. in : *Identification methods for microbiologists*. éd F/A Skinner and DW Lovelock. Academic Press. London, P: 233-259.
- 47-Silverthorn D U, Ober W, Ganison C, Silverthorn A et Johnson B, 2007.** *Physiologie human*. 4<sup>ème</sup> éd Pearson Education, P: 646-647.
- 48-Szajewska R, Kotowska M, Mrukowicz J Z et Armonska M, 2001.** Efficacy of *Lactobacillus GG* in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *Journal of pediatrics*, **138(3)**, p: 361-365.
- 49-Tagg J R, Dajani A S et Wannamaker L W, 1976.** Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacterial. Rev*; **40**: P: 722-756.
- 50-Tahara T et Kanatani K, 1996.** Isolation partial characterisation and mode of action andocin J 1269, bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1129. *J. Appl. Bacteriol*, **81**, P: 18.

**Sites:**

[www.anostose.com](http://www.anostose.com).

[www.ecosociopsysteme.fr/Levure.html](http://www.ecosociopsysteme.fr/Levure.html).

[www.univ-rouen.fr/ABISS/L3CAB/Probiotique/index.htm-1k-](http://www.univ-rouen.fr/ABISS/L3CAB/Probiotique/index.htm-1k-).

# *Liste des abréviations*



## LISTE DES ABREVIATIONS:

- **ADH** : Arginine dehydrolase.
- **ATB** : Antibiotique.
- **C** : Cytosine.
- **C°** : Degré Celsius.
- **CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.
- **FAO**: Food Agriculture Organization of the United Nations.
- **g**: Gramme.
- **H** : Heure.
- **H<sub>2</sub>O** : Eau.
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Eau oxygénée.
- **Lb** : *Lactobacillus*.
- **MEVAC** : Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides.
- **MRS** : Man-Rogosa-Sharp.
- **NaCl** : Chlorure de sodium.
- **NO<sub>3</sub>** : Nitrate.
- **OMS** : Organisation Mondiale pour la Santé.
- **PBS** : Tampon Phosphate Salin.
- **pH** : potentiel Hydrogène.
- **Sc** : *Streptococcus*.
- **St** : *Staphylococcus*.
- **ssp** : Sub espèce.
- **T°** : Température.
- **UFC** : Unité Formant Colonie.
- **WHO** : World Health Organisation.
- **Pm** : *Pseudomonas*

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b>	Profil biochimique des souches de bactéries lactiques étudiées	30
<b>Tableau II</b>	Profils fermentaires des sucres des souches de bactéries lactiques étudiées	32
<b>Tableau III</b>	Identification des espèces de <i>Lactobacillus</i>	34
<b>Tableau IV</b>	Pourcentage des espèces de <i>Lactobacillus</i> identifiées.	35
<b>Tableau V</b>	Croissance des souches de <i>Lactobacillus</i> à différents pH	36
<b>Tableau VI</b>	Mesure de la densité optique des souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées	37
<b>Tableau VII</b>	Résistance aux antibiotiques	38
<b>Tableau VIII</b>	Résistance des souches de <i>Lactobacillus</i> à la bile humaine.	39
<b>Tableau IX</b>	Activité inhibitrice des <i>Lb</i> sur les germes tests	41
<b>Tableau X</b>	Effet du surnageant natif sur les germes tests	43
<b>Tableau XI</b>	Effet du surnageant neutre sur les germes tests	44
<b>Tableau XII</b>	Adhésion des <i>Lb</i> aux cellules épithéliales.	45

## LISTE DES FIGURES:

<b>Figure (01)</b>	Les coques.	04
<b>Figure (02)</b>	Les Bifidobactéries.	05
<b>Figure (03)</b>	Les levures.	05
<b>Figure (04)</b>	Mécanisme d'action possible des bactéries probiotiques.	08
<b>Figure (05)</b>	Les <i>Lactobacillus</i> .	13
<b>Figure (06)</b>	Le tube digestif humain.	17
<b>Figure (07)</b>	Composition de la flore intestinale humaine dans diverses portions du tube gastro-intestinale.	19
<b>Figure (08)</b>	Aspect macroscopique des colonies de la souche <i>Lactobacillus</i> .	27
<b>Figure (09)</b>	<i>Lactobacillus</i> , observation après coloration de Gram	28
<b>Figure (10)</b>	Test de l'ADH	29
<b>Figure (11)</b>	Résultats de la fermentation des sucres par les <i>Lactobacillus</i> .	33
<b>Figure (12)</b>	Répartition des espèces en pourcentage.	35
<b>Figure (13)</b>	Résultats de l'antibiogramme.	39
<b>Figure (14)</b>	Mesure de la densité optique en présence et en absence de la bile.	40
<b>Figure (15)</b>	Dénombrement de <i>Lactobacillus</i> en présence et en absence de la bile.	40
<b>Figure (16)</b>	Effet de <i>Lactobacillus</i> sur l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	42
<b>Figure (17)</b>	Effet de surnageant neutre.	44
<b>Figure (18)</b>	Adhésion des <i>Lactobacillus</i> aux cellules épithéliales <i>Lactobacillus debrueckii</i> . <i>SS. bulgaricus</i> .	46

# *Annexes*

# ANNEXE I

## Réactifs.

### 1-Violet de gentiane.

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

### 2-Fushine de zeil.

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

### 3-Lugol

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

### 4-Bleu de méthylène

Bleu de méthylène.....	1g
Ethanol.....	10ml
Phénol.....	2g
Eau distillé.....	100ml

## ANNEXE II

### MILIEU D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION

#### MRS (Bouillon et gélose) :

- Peptone.....10g
- Extrait de viande.....8g
- Extrait de levure.....4g
- Acétate de sodium..... 5g
- Phosphate bipotassique.....2g
- Citrate d'ammonium..... 2g
- Sulfate de magnésium, 7H<sub>2</sub>O..... 2g
- Sulfate de manganèse, 4H<sub>2</sub>O.....0,05g
- Glucose.....20g
- Tween 80.....1ml
- Agar (dans le cas de la gélose).....15g
- Cystéine.....0,1g
- Eau distillée .....1000ml

pH : 6, 2

Autoclaver 15 min à 120 C°

## ANNEXE III

### MILIEU D'IDENTIFICATION

#### M.E.V.A.C sans sucre :

- Extrait de viande.....3g
- Chlorure de potassium.....5g
- Rouge de phénol.....20g
- Agar.....3g

pH : 7

Autoclaver 20 min à 120 C°

#### Milieu GIBSON ET ABDELMALEK :

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

pH : 7

répartir en tube (8-10)

Stérilisation par tyndalisation 3 fois 30 min à 100 C°

#### Milieu ADH

- Peptone.....5g
- Extrait de viande.....5g
- Pyridoxal.....0,005g
- Solution aqueuse de pourpre de bromocrésol à 2%.....5.ml
- Glucose.....0,5g
- Eau distillé.....1000ml

pH : 6,4

Stérilisation 15 min à 120 C°

<b>Noms :</b> BRADAI TOBBI	<b>Prénoms :</b> SALIHA KAWKEB	<b>Date de soutenance : 28 /09/2010</b> 9h-10:30h Encadreur : M <sup>me</sup> BOUSDIRA Fathia
----------------------------------	--------------------------------------	---

**Evaluation des aptitudes probiotiques des souches de *Lactobacillus* d'origine humaine**

**Résumé :**

Notre travail pratique nous permis d'isoler et d'identifier des souches de *Lactobacillus* conservées sur bouillon MRS.

L'identification selon leur profil biochimique et physiologique a conduit aux espèces suivantes : *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus*, avec une répartition de 4 %, 16 % et 80 % respectivement. Ces souches sont isolées chez l'homme.

L'étude des critères probiotiques permet de sélectionner deux souches sur l'ensemble des *Lactobacillus* étudiées : *Lb. acidophilus* (S7), *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus* (S19). Elles présentent les profils probiotiques les plus intéressants selon les tests appliqués.

**Mots Clés:** *Lactobacillus*. Probiotiques.

**Abstract:**

Our practical work has allowed us to isolate and identify strains of *Lactobacillus* kept on MRS broth.

Identification according to their biochemical and physiological profile led to the following species: *Lactobacillus gasseri* (4%), *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus delbrueckii.ssp.bulgaricus*, with an allocation of 4%, 16% and 80% respectively. These strains were isolated from humans.

The study of the criteria used to select probiotic strains on the two all *Lactobacillus* studied: *Lb. acidophilus* (S7), *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus* (S19). They have the most interesting probiotics profiles according to the tests applied.

**Keywords :** *Lactobacillus*, probiotics

**ملخص**

لقد مكنتنا عملنا التطبيقي من عزل و التعرف على سلالات *Lactobacillus* محفوظة في وسط سائل (MRS) التعرف عن طريق التجارب البيوكيميائية والفيزيولوجية أدى إلى الحصول على الأنواع التالية : *Lactobacillus gasser*، *Lactobacillus acidophilus*، و *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus*، الموزعة على النسب 4%، 16% و 80% على التوالي

دراسة المعايير المستخدمة لتحديد سلالات Probiotique سمحت بتحديد نوعين من مجموع سلالات *Lactobacillus* المدروسة: *Lb. delbrueckii.ssp.bulgaricus* (S19)، *Lb. acidophilus* (S7) التي لديها أهم الخصائص البروبيوتكية وفقا للاختبارات المدروسة.

كلمات البحث: *Lactobacillus*. Probiotiques.