

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

Université de Jijel

MB.14/10
جامعة جيجل

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

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie
Moléculaire et Cellulaire

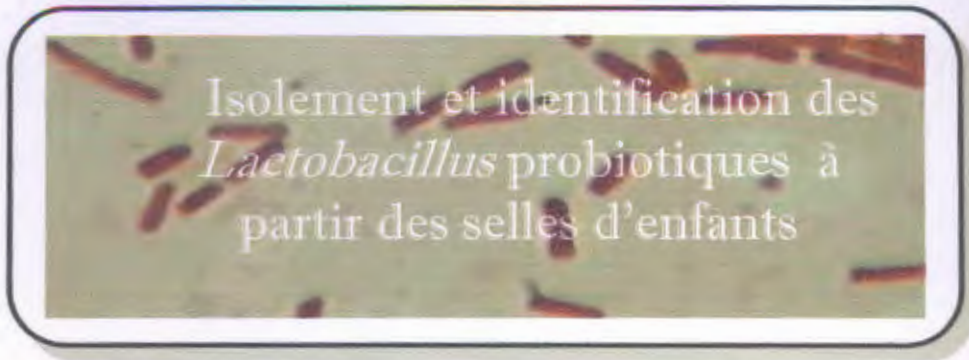
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلاوية



Mémoire De Fin D'études Pour L'obtention Du Diplôme
Des Etudes Supérieures en Biologie
Option : Microbiologie

Intitulé

01
02



Isolement et identification des
Lactobacillus probiotiques à
partir des selles d'enfants

Membres de Jury :

Présenté par :

Examineur: M^{lle}. ADJEROUD N

➤ BOUZIDI Besma

Encadreur: M^{me}. BOUSDIRA F

➤ BOUDARI Zineb



Année Universitaire : 2009/2010



Remerciement

Nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné le courage, la patience et la force pour élaborer ce travail.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance et notre gratitude pour tous ceux qui nous ont aidé et encouragé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire plus particulièrement :

Notre encadreur M^{me} Bousdira F qui nous a proposé ce sujet de recherche et qui nous a encadré et soutenu par ses conseils et ses efforts durant la préparation de ce mémoire.

Nous remercions également l'examinatrice M^{elle} Adjeroud N d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Nous n'oublions pas l'aide et le soutien de nos familles et de nos amies. Merci à nos parents pour avoir toujours cru en nous. Merci de nous avoir soutenus dans cette voie, merci de votre présence, de vos encouragements, de vos conseils, merci pour tout.

Zineb et Besma

2010



Sommaire

SOMMAIRE

| | |
|--------------------|---|
| Introduction | 2 |
|--------------------|---|

Synthèse bibliographique Chapitre I : les bactéries lactiques

| | |
|---|----|
| I.1. Définition | 4 |
| I.2. Propriétés générales | 4 |
| I.3. Classification des bactéries lactiques | 5 |
| I.3.1. Le genre <i>Streptococcus</i> | 6 |
| I.3.2. Le genre <i>Leuconostoc</i> | 7 |
| I.3.3. Le genre <i>Lactococcus</i> | 7 |
| I.3.4. Le genre <i>Pediococcus</i> | 7 |
| I.3.5. Le genre <i>Carnobacterium</i> | 7 |
| I.3.6. Le genre <i>Lactobacillus</i> | 8 |
| I.3.6.1. Définition | 8 |
| I.3.6.2. Origine et habitat | 10 |
| I.3.6.3. Taxonomie | 10 |
| I.3.6.4. Rôles des <i>Lactobacillus</i> | 11 |
| I.3.6.4.1. Rôles des <i>Lactobacillus</i> dans l'alimentation | 11 |
| I.3.6.4.1.a. Fabrication de yaourt et fromage | 11 |
| I.3.6.4.1.b. Dans la charcuterie | 11 |
| I.3.6.4.2. Rôles des <i>Lactobacillus</i> sur la santé de l'homme | 11 |
| I.3.6.5. Méthodes d'identification | 11 |
| I.3.6.5.1. Méthodes classiques | 11 |
| I.3.6.5.2. Méthodes moléculaires | 13 |

Chapitre II : Les probiotiques

| | |
|---|----|
| II.1. Historique | 15 |
| II.2. Définition | 15 |
| II.3. Classification des probiotiques | 15 |
| II.3.1. Les bactéries lactiques | 16 |
| II.3.2. Les bifidobactéries | 16 |
| II.3.3. Les levures | 17 |
| II.4. Critères de choix des <i>Lactobacillus</i> probiotiques | 18 |
| II.5. Mécanismes d'action des <i>Lactobacillus</i> probiotiques | 19 |
| II.5.1. Rôles d'acide lactique et de pH | 20 |
| II.5.2. Production des Bactériocines | 20 |
| II.6. Effet préventifs et curatifs | 21 |
| II.6.1. Les infections gastro-intestinales | 21 |
| II.6.2. Diarrhées associées aux antibiothérapies | 21 |
| II.6.3. Le système immunitaire | 22 |
| II.6.4. Intolérance au lactose | 24 |
| II.6.5. Les maladies inflammatoires de l'intestin | 24 |
| II.6.6. Infections de l'appareil respiratoire | 24 |
| II.6.7. Les effets anticancéreux | 24 |
| II.6.8. Un effet sur le cholestérol | 25 |
| II.6.9. Diarrhée chez les enfants | 25 |
| II.6.10. Inhibition des mauvaises bactéries | 25 |
| II.6.11. L'équilibre de la flore intestinale | 26 |
| II.7. Effet indésirable de probiotiques | 26 |

Chapitre III : la microflore de tube digestif humain

| | |
|-------------------------------|----|
| III.1. L'estomac | 29 |
| III.2. L'intestin grêle | 29 |

| | |
|-------------------------|----|
| III.3. Le colon | 29 |
| III.4. Les selles | 30 |

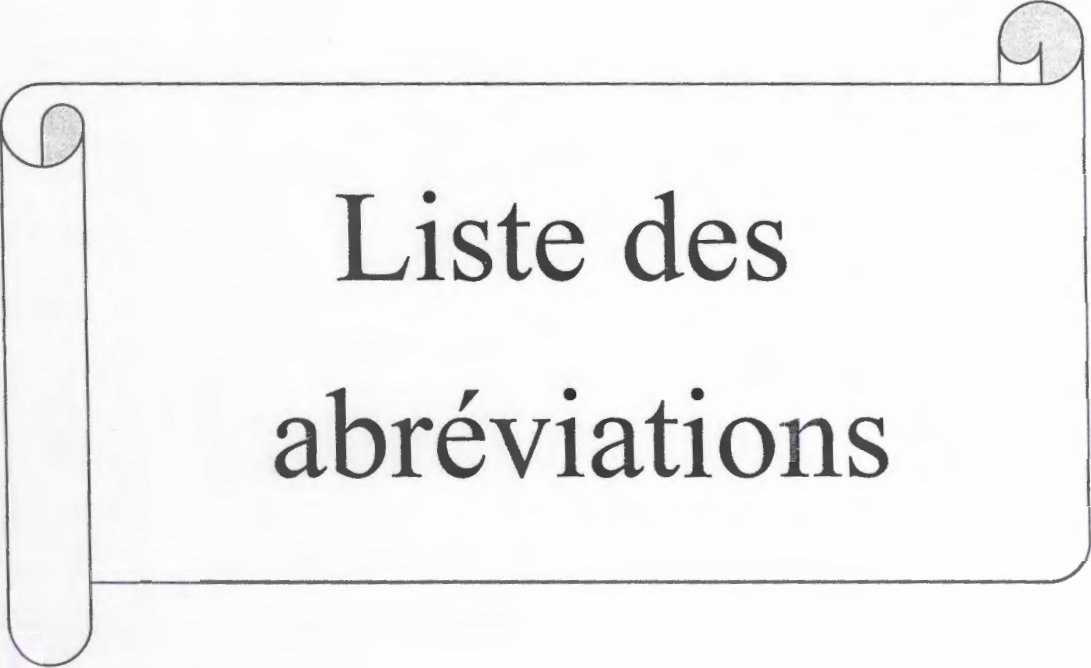
Chapitre IV: Matériel et méthodes

| | |
|---|----|
| IV.1. Matériel | 32 |
| IV.1.1. Les selles d'enfant..... | 32 |
| IV.1.2. Milieux de cultures..... | 32 |
| IV.1.3. Réactifs et matériel..... | 32 |
| IV.2. méthodes | 33 |
| IV.2.1. Evaluation de la microflore bactérienne | 33 |
| IV.2.1.1. Préparation des dilutions..... | 33 |
| IV.2.1.2. Dénombrement de la flore bactérienne | 33 |
| IV.2.1.2.1. Mesure du pH des échantillons | 33 |
| IV.2.1.2.2. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)..... | 33 |
| IV.2.1.2.3. Dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants | 34 |
| IV.2.1.2.4. Dénombrement des <i>Lactobacillus</i> | 34 |
| IV.2.2. Isolement et identification des <i>Lactobacillus</i> | 34 |
| IV.2.2.1. Enrichissement | 34 |
| IV.2.2.2. Isolement | 34 |
| IV.2.2.3. Purification | 34 |
| IV.2.3. Identification | 34 |
| IV.2.3.1. Examen macroscopique | 35 |
| IV.2.3.2. Examen microscopique | 35 |
| IV.2.3.3. Recherche de la catalase | 35 |
| IV.2.3.4. Test de la croissance à différente température | 35 |
| IV.2.3.5. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)..... | 36 |
| IV.2.3.6. Type fermentaire | 36 |
| IV.2.3.7. Profil des sucres | 36 |
| IV.2.4. Evaluation des aptitudes probiotiques <i>in vitro</i> | 36 |
| IV.2.4.1. Estimation de la croissance | 36 |
| IV.2.4.2. Croissance au milieu acide | 37 |
| IV.2.4.3. Croissance en présence de la bile | 37 |
| IV.2.4.4. Adhésion des bactéries aux cellules épithéliales..... | 37 |
| IV.2.4.5. Résistance aux antibiotiques | 38 |
| IV.2.4.6. Activité antibactérienne | 38 |
| IV.2.4.7. Activité inhibitrice des surnageants | 38 |

Chapitre V: Résultat et Discussions

| | |
|---|----|
| V.1. Dénombrement de la microflore des selles d'enfant | 39 |
| V.2. Isolement et identification des <i>Lactobacillus</i> | 39 |
| V.2.1. L'observation macroscopique | 39 |
| V.2.2. L'observation microscopique | 39 |
| V.2.3. Tests physiologiques et biochimiques | 40 |
| V.2.3.1. Test de catalase | 40 |
| V.2.3.2. Test de l'ADH | 41 |
| V.2.3.3. Recherche de type fermentaire | 41 |
| V.2.3.4. Fermentation des sucres | 41 |
| V.2.4. Identification des espèces | 42 |
| V.2.5. Evaluation des aptitudes probiotiques..... | 44 |
| V.2.5.1. Estimation de la croissance | 44 |
| V.2.5.2. Croissance sur milieu acide | 44 |
| V.2.5.3. Croissance en présence de la bile | 45 |

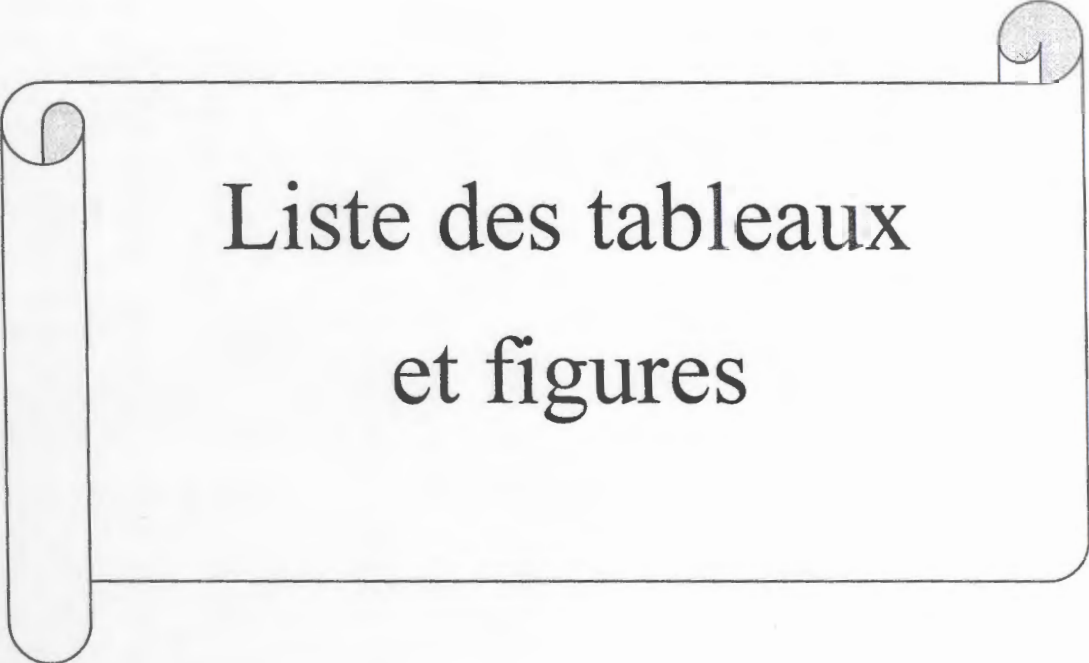
| | |
|---|-----------|
| V.2.5.4. Adhésion des bactéries aux cellules épithéliales | 49 |
| V.2.5.5. Résistance aux antibiotiques | 50 |
| V.2.5.6. Activité antibactérienne..... | 51 |
| V.2.5.7. Activité inhibitrice des surnageants..... | 52 |
| Conclusion | 55 |
| Références bibliographiques | |
| Annexes | |



Liste des
abréviations

LISTE DES ABRIVIAIIONS

- ADH** : Arginine Dihydrolase.
- C** : Cytosine.
- C°** : Degré Celsius.
- Cm** : Centimètre.
- CO₂** : Dioxyde de carbone.
- FAO** : Food Agriculture Organization of the United Nations.
- FTAM** : Flore Totale Aérobie Mésophile.
- g** : gramme.
- G** : Guanine.
- GALT** : Gut Associated Lymphoïde Tissues.
- H** : heure.
- H₂O** : Eau.
- H₂O₂** : Eau oxygénée.
- KDa** : Kilo Dalton.
- Lb** : *Lactobacillus*.
- Lc** : *Lactococcus*.
- Ln** : *Leuconostoc*.
- MEVAG** : Milieu d'étude de la voix d'attaque des glucides.
- Mm** : millimètre.
- MRS** : Man-Rogosa-Sharp.
- NO₃** : Nitrate.
- OMS** : Organisation Mondiale pour la Santé.
- pH** : potentiel d'Hydrogène.
- SB** : suspension biliaire.
- Sc** : *Streptococcus*.
- subsp** : Sub espèce.
- T°** : Température.
- TAM** : Tissus Associés aux Muqueuses.
- UFC** : Unité Formants Colonies.
- WHO** : World Health Organization.



Liste des tableaux
et figures

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|---------------------|--|----|
| Tableau N°01 | Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques. | 6 |
| Tableau N°02 | Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques. | 18 |
| Tableau N°03 | Principaux critères utilisés pour la sélection des probiotiques. | 19 |
| Tableau N°04 | Résultat de dénombrement des microflores des enfants. | 39 |
| Tableau N°05 | Résultats des tests physiologiques et biochimiques. | 40 |
| Tableau N°06 | Résultat de tests de fermentation des sucres. | 42 |
| Tableau N°07 | Les noms des espèces identifiées. | 43 |
| Tableau N°08 | Mesure de la densité optique (D.O) des souches. | 45 |
| Tableau N°09 | Résultat de la résistance de l'acidité. | 46 |
| Tableau N°10 | La densité optique (D.O) de population bactérienne en présence et absence de la bile. | 47 |
| Tableau N°11 | Dénombrement des espèces <i>Lactobacillus</i> en présence et en absence de la bile. | 48 |
| Tableau N°12 | L'adhésion des espèces de <i>Lactobacillus</i> aux antibiotiques. | 50 |
| Tableau N°13 | Test de résistance des espèces <i>Lactobacillus</i> aux antibiotiques. | 51 |
| Tableau N°14 | Résultat des interactions entre les espèces de <i>Lactobacillus</i> et les bactéries tests. | 52 |
| Tableau N°15 | Les résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne du surnageant natif et neutre des espèces de <i>Lactobacillus</i> . | 53 |

Tableau d'annexe IV :

| |
|---|
| Tableau N°1: Test de résistance des espèces de <i>Lactobacillus</i> aux antibiotiques. |
|---|

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure (01) : Différentes voix fermentaires des <i>Lactobacillus</i> . | 9 |
| Figure (02) : Méthode classique d'identification des <i>Lactobacillus</i> . | 12 |
| Figure (03) : Les bifidobactéries. | 16 |
| Figure (04) : Influence des <i>Lactobacillus</i> probiotiques sur le système immunitaire. | 23 |
| Figure (05) : Composition de la flore intestinale humaine dans les diverses portions du tube gastro-intestinal. | 31 |
| Figure (06) : Les <i>Lactobacillus</i> après coloration de Gram. | 40 |
| Figure (07) : Le profil fermentaire des sucres. | 42 |
| Figure (08) : Répartition des espèces d'origine humaines en pourcentage. | 44 |
| Figure (09) : Mesure de la densité optique en présence et en absence de la bile. | 49 |
| Figure (10) : Dénombrement des <i>Lactobacillus</i> en présence et en absence de la bile | 49 |
| Figure (11) : L'adhésion des <i>Lactobacillus</i> sur les cellules épithéliales. | 50 |
| Figure (12) : L'activité antibactérienne des souches de <i>Lactobacillus</i> vis-à-vis de <i>Salmonella</i> . | 53 |



Introduction

Introduction

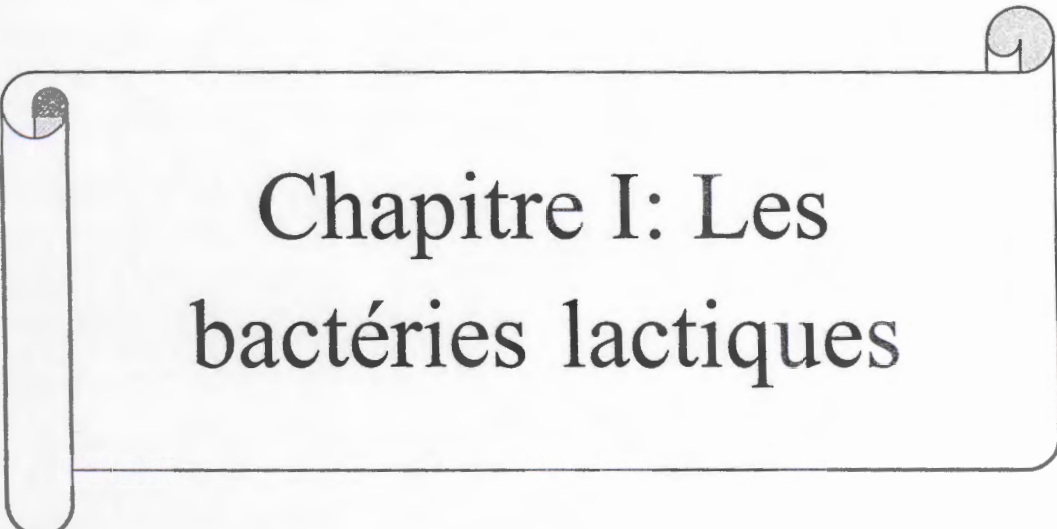
Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène des microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principale du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine et animale. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Stiles et al., 1997).

Les bactéries lactiques sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés ou elles permettent de développer certaines caractéristiques et d'augmenter la durée de conservation (Abee, 1995., Hageholtz et al., 1999). Ces bactéries lactiques jouent aussi un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé grâce à leur critères probiotiques (Gunal et al., 2006): comme les propriétés antimicrobiennes entre autre.

Parmi les bactéries lactiques on cite les *Lactobacillus* qui sont potentiellement intéressants par leurs caractères probiotiques tels que la non pathogénicité. L'absence de la toxicité, leur stabilité et leur bonne viabilité, leur résistance au pH acides et à l'acide lactique, ainsi que l'activité antimicrobienne (Klaenhammer et al., 2005).

En Algérie contrairement à d'autres pays du monde, il existe peu ou pas de recherche sur les probiotiques du genre *Lactobacillus* notamment ceux isolé chez l'homme. Ceci nous a incité, vu l'intérêt du sujet, à réaliser un travail pratique ayant pour objectifs :

- Isoler et caractériser des souches de *Lactobacillus* isolées chez l'enfant.
- Par une synthèse bibliographique apporter une information sur l'étude des *Lactobacillus* probiotiques via notre pays et dans le monde.



Chapitre I: Les bactéries lactiques

I.1. Définition

Les bactéries lactiques sont des bactéries très ubiquistes qui depuis longtemps se sont avérées utiles à l'homme. Celui-ci les a regroupées dans un ensemble dont le nom est en lui-même évocateur de la caractéristique principale du métabolisme de ce groupe bactérien : la production d'acide lactique. Outre le fait que cette capacité confère à ces espèces un intérêt capital dans le domaine de la transformation et de conservation des aliments, elle représente la voie majeure de production d'énergie qui va, leur permettre de se développer (Monnet et al., 2008).

I.2. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques constituent l'un des groupes incontournables de la microbiologie alimentaire connus depuis longtemps pour leur capacité de fermentation lactique associée à de nombreux aliments fermentés (yaourt, saucisson, choucroutes...), leur participation à l'acquisition des propriétés nutritionnelles ou de la qualité sanitaire de l'aliment est plus récemment utilisée. Elles sont généralement classées dans les flores technologiques (Federighi., 2005).

Les bactéries lactiques regroupent des bactéries à coloration de Gram positive généralement immobiles, asporulées, dépourvues de catalase et de cytochromes oxydase, elles constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique (Federighi., 2005). Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production d'acide lactique, lié à un métabolisme exclusivement fermentaire, ce sont par ailleurs des bactéries dépourvues de nitrate réductase, anaérobies ou aéro-tolérantes, exigeantes en facteurs de croissance : acides aminés, bases nucléiques, acides gras, vitamines..

Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites :

- Homofermentaires: l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose.
- Hétérofermentaires: la fermentation du glucose aboutit à formation de l'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO₂, et autres acides organiques (Federighi., 2005).

Elles possèdent une activité protéinolytique et peptidolytique. Elles inhibent les microorganismes contaminants acido-sensibles et elles préparent la coagulation des protéines du lait (Larpen et Gaugand., 1997).

- Chez les bactéries lactiques, la présence ou l'importance des plasmides varient avec les groupes. Elles peuvent être nombreux chez les lactococques mésophiles elles sont rares. Elles sont au nombre de (1 à 3) chez *Streptococcus thermophilus* (Larpen et Gaugand., 1997).

I.1. Définition

Les bactéries lactiques sont des bactéries très ubiquistes qui depuis longtemps se sont avérées utiles à l'homme. Celui-ci les a regroupées dans un ensemble dont le nom est en lui-même évocateur de la caractéristique principale du métabolisme de ce groupe bactérien : la production d'acide lactique. Outre le fait que cette capacité confère à ces espèces un intérêt capital dans le domaine de la transformation et de conservation des aliments, elle représente la voie majeure de production d'énergie qui va, leur permettre de se développer (Monnet et al., 2008).

I.2. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques constituent l'un des groupes incontournables de la microbiologie alimentaire connus depuis longtemps pour leur capacité de fermentation lactique associée à de nombreux aliments fermentés (yaourt, saucisson, choucroutes...), leur participation à l'acquisition des propriétés nutritionnelles ou de la qualité sanitaire de l'aliment est plus récemment utilisée. Elles sont généralement classées dans les flores technologiques (Federighi., 2005).

Les bactéries lactiques regroupent des bactéries à coloration de Gram positive généralement immobiles, asporulées, dépourvues de catalase et de cytochromes oxydase, elles constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique (Federighi., 2005). Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production d'acide lactique, lié à un métabolisme exclusivement fermentaire, ce sont par ailleurs des bactéries dépourvues de nitrate réductase, anaérobies ou aéro-tolérantes, exigeantes en facteurs de croissance : acides aminés, bases nucléiques, acides gras, vitamines..

Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites :

-Homofermentaires: l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose.

-Hétérofermentaires: la fermentation du glucose aboutit à formation de l'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO₂, et autres acides organiques (Federighi., 2005).

Elles possèdent une activité protéinolytique et peptidolytique. Elles inhibent les microorganismes contaminants acido-sensibles et elles préparent la coagulation des protéines du lait (Larrent et Gaurand., 1997).

-Chez les bactéries lactiques, la présence ou l'importance des plasmides varient avec les groupes. Elles peuvent être nombreuses chez les lactocoques mésophiles elles sont rares. Elles sont au nombre de (1 à 3) chez *Streptococcus thermophilus* (Larrent et Gaurand., 1997).

Certaines espèces donnent sur milieu hypersaccharosé des capsules (dextran) volumineuses : c'est le cas de *Leuconostoc mesenteroides*. Cette propriété est mise à profit pour produire des aliments à texture plus ou moins filante (Gasson et Devos., 1994).

La température optimale de croissance est généralement comprise entre 30 et 40C°, mais, selon les espèces, une culture peut être observée pour des températures variant de 2 à 53 C°.

La croissance sur les milieux solides est généralement stimulée par une réduction de la tension en oxygène et par l'adjonction de 5 à 10% de dioxyde de carbone (Whitman., 2009).

I.3. Classification

Les bactéries lactiques sont représentées par plusieurs genres. Leurs cellules sont soit des coques: c'est le cas de *Streptococcus*, mais aussi de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, soit des bacilles : *Lactobacillus*. Ils se distinguent en plus par leur type fermentaire, homolactique ou hétérolactique. A ces genres a été ajouté le genre *Bifidobacterium* (Kandler et Weiss, 1986).

Sept genres principaux constituent les groupes des bactéries lactiques (Sutra et al ., 1998).

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).

Le tableau (1) illustre les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques.

Tableau(1) : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Sutra et al ., 1998).

| Genres | Morphologies | Fermentation | T° optimal | Nb. D'espèces |
|------------------------|------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| <i>Lactobacillus</i> | bacilles | Homo - ou Hétérofermentaires | Thermophiles ou mésophiles | G.I :23 G.II :16 G.III :22 |
| <i>Lactococcus</i> | coques | Homofermentaires | Mésophiles | 5 |
| <i>Carnobacterium</i> | bacilles | Hétérofermentaires | psychrophiles | 6 |
| <i>Streptococcus</i> | coques | Homofermentaires | Mésophiles ou Thermophiles | 19 |
| <i>Enterococcus</i> | coques | Homofermentaires | Mésophiles | 13 |
| <i>Leuconostoc</i> | coques | Hétérofermentaires | Mésophiles | 11 |
| <i>Pediococcus</i> | Coques en tétrades | Homofermentaires | Mésophiles | 7 |
| <i>Bifidobacterium</i> | Formes irrégulières | Acides acétiques et lactiques | Mésophiles | 25 |

Nb : nombre.

I.3.1. Le genre *Streptococcus*

Comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S. pyogenes*, et *S. agactae*, d'autres impliquées dans la formation de la plaque dentaire : *S. mutans*. L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produit laitiers), et son caractère non pathogène. Du fait de ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique (Pilet et al., 1995).

I.3.2. Le genre *Leuconostoc*

Les *Leuconostoc* sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel, ils se développent entre 20 et 30C° pas à 45C°. Ils sont généralement capsulés, cette propriété entraîne fréquemment l'apparition d'une viscosité dans le milieu, leur fermentation hétérolactique donne de l'acide L. lactique, ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes, ce sont des contaminants fréquents des aliments acides et sucrés. Ils sont utiles dans certains fromages (bleu) ou ils facilitent l'ouverture par la production de CO₂, ils interviennent aussi dans les ensilages, et les végétaux fermentés, olives choucroute, et mais aussi cacao et café (Guiraud, 2003).

I.3.3. Le genre *Lactococcus*

Les *Lactococcus* sont des cocci sphériques ou ovoïdes, en paires, en chaînettes ou en tétrades, en générales immobiles, le métabolisme est fermentaire et peut donner à partir des glucides : des acides lactiques ou un mélange. (Guiraud, 2003).

I.3.4. Le genre *Pediococcus*

Les *Pediococcus* sont des germes microaéropiles, formés de cellules groupées en paires ou en tétrades, à besoins nutritifs complexes (Leveau et al., 1993).

Leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance, de nombreuses espèces sont acidophiles et osmophiles, leur fermentation homolactique donne parfois l'acide lactique racémique mais fréquemment la forme L prédomine. Les espèces osmophiles non acidophiles ne donnent que cette forme, ils sont saprophytes et contaminent les produits végétaux (Guiraud, 2003).

I.3.5. Le genre *Carnobacterium*

Morphologiquement proches des lactobacillus ils se différencient par leur tendance psychrotrophe et leur production majoritaire de l'isomère L de l'acide lactique.

Ce genre comprend 04 espèces, *C. divergens*, *C. piscicola*, *C. mobile* et *C. gallinarum*. Ils sont isolés de produits carnés ou de produits de la mer, mais également du contenu intestinal de salmonidés (Sutra et al., 1998).

I.3.6. Le genre *Lactobacillus*

I.3.6.I Définition

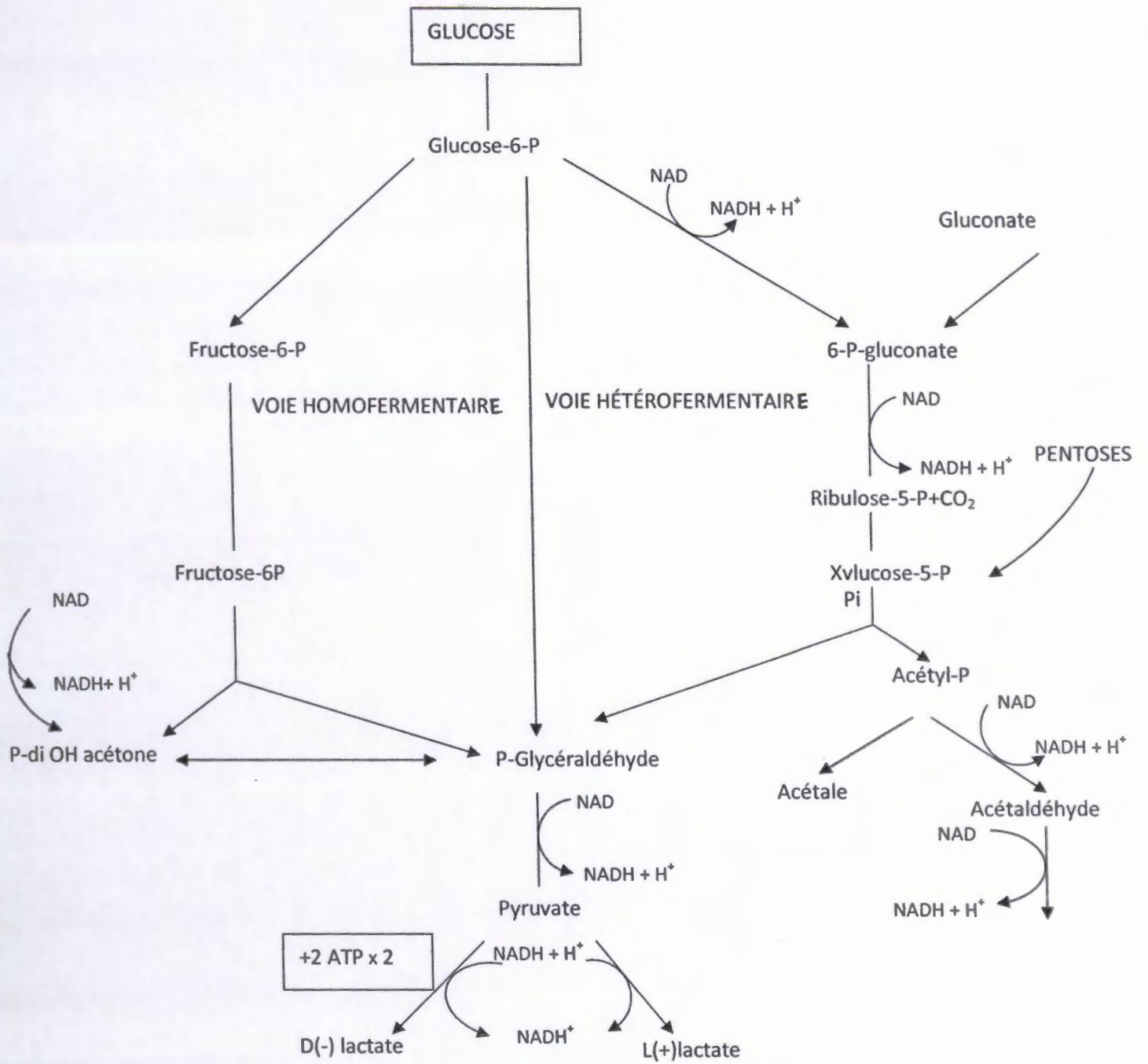
Les espèces de *Lactobacillus* sont caractérisées par des cellules en forme de bâtonnets souvent groupés en chaînes, une forte exigence en facteurs de croissance, une acidification du lait plus lente qu'avec les Streptocoques mais généralement plus intense grâce à une meilleure résistance au pH acide (jusqu'au pH 3,5) et à une concentration plus élevée d'acide lactique. Originellement, elles ont été classées en trois groupes et des sous-groupes.

Groupe I : les lactobacilles homofermentaires obligatoires, contenant les espèces du groupe *Thermobacterium* et d'autres espèces nouvellement décrites, Ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate, leurs cellules sont longues, droites souvent en palissades.

Groupe II : les lactobacilles homofermentaires facultatifs formés de groupe *Streptobacterium* et de nouvelles espèces. La fermentation des hexoses est hétérofermentaire avec une production d'acide lactique et d'acide acétique, leurs cellules sont courtes, souvent arrangées en filament.

Groupe III : Anciennement appelé *Betabacterium*. Ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire. Elles fermentent le gluconate et les pentoses. Elles produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO₂ et de l'éthanol (**Bourgoies et Larpent., 1996 ; Larpent et Gourgaud., 1997**)

C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes surtout mésophiles comme *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus sanfransisco* (**Sutra et al., 1998**)



Figure(1): Différentes voies fermentaires des *Lactobacillus*

On rencontre les *Lactobacillus* dans la flore intestinale et la flore vaginale (sous le fameux nom de *Lactobacillus acidophilus* ou flore döderlein).

Les *Lactobacillus* sont aussi des bactéries classiques du yaourt en association avec *Lactococcus* déniées de pouvoir pathogène. Ces bactéries interviennent dans d'autres produits alimentaires comme le saucisson, la viande, la choucroute. etc.

I.3.6.3. Taxonomie

Selon le Bergy's manuel (Violet., 2003) les lactobacilles sont classés comme suit :

Famille : *Lactobacillaceae*.

Genre : *Lactobacillus*.

Espèce : 1- *L. acidophilus*.

2- *L. bifementans*.

3- *L. brevis*.

4- *L. casei*.

5- *L. delbrueckii*.

5-1- *L. delbrueckii subsp - bulgaricus*.

5-2- *L. delbrueckii subsp - delbrueckii*.

5-3- *L. delbrueckii subsp - lactis*

6- *L. helveticus*.

7- *L. Kefir*.

8- *L. plantarum*.

9- *L. rhamnosus*.

10- *L. saki*.

11- *L. salivaricus*.

I.3.6.4. Rôles des *Lactobacillus*

I.3.6.4.1. Rôle des *Lactobacillus* dans l'alimentation

Les *Lactobacillus* ont deux rôles principaux dans les aliments, liés à leurs activités métaboliques. Un rôle positif ou technologique, il s'exerce principalement dans le produit fermenté avec conséquences sur l'ensemble des facteurs de qualité ; un rôle négatif : il se traduit essentiellement par l'altération des denrées concernées, qu'elles soient ou non fermentées

Certains *Lactobacillus* jouent un rôle fondamental dans les productions agro-alimentaires :

a. Fabrication de yaourt et de fromage

La fabrication du yaourt dû à la fermentation conjointe du lait par *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* a connu une très forte expansion en Europe et dans le monde, du fait de ses qualités organoleptiques et nutritionnelles. Les bactéries métabolisent le composant glucose du lactose et rejettent le résidu galactose dans le lait qui fermente en acidifiant le milieu jusqu'à pH entre 4,35 et 4,5. Un des composés aromatiques, caractéristique du yaourt est l'acétaldéhyde, qui ne provient pas du lactose, mais résulte de l'action d'une thréonine-aldolase enzyme des *Lactobacillus* dégradant l'acide aminée thréonine pour améliorer la texture des yaourts brassés, sans utiliser d'additifs épaississants. Généralement, on met en œuvre des souches qui produisent naturellement des polysaccharides à haut pouvoir texturant.

b. Dans la charcuterie

Exemple: *Lactobacillus plantarum* permet d'acidifier la charcuterie et donc d'empêcher un développement de microorganismes non désirés. D'autres *Lactobacillus* sont utilisées pour leurs effets probiotiques qui seront traités dans le chapitre suivant.

I.3.6.4.2. Rôle des *Lactobacillus* sur la santé de l'homme

Le rôle des *Lactobacillus* sur la santé de l'homme sera étudié dans chapitre probiotique.

I.3.6.5. Méthode d'identification

I.3.6.5.1. Méthode classique

Sur milieu MRS, (Man-Rogosa-Sharp) ou M17, les bactéries lactiques forment des petites colonies (2 à 3mm de diamètre) blanches à crème, bombées. L'appartenance au groupe se fait sur la base de la coloration de Gram positive, d'activité catalases et oxydase négatives et éventuellement de l'absence de réduction de nitrates.

L'identification du genre est d'abord orientée par la morphologie, puis par le type fermentaire (production de CO₂ à partir du glucose) et les conditions physiologiques de croissance telles que la température (Sutra et al., 1998).

La distinction entre les genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium*, qui est plus délicate, se fait à partir de la croissance sur gélose à l'acétate, la présence d'acide méso-diaminopimelique dans la paroi et le caractère psychrotrophe. L'identification des espèces de *Lactobacillus* se base, en plus de ces tests sur le profil de fermentation de différents glucides (20 à 30 composés tests). La figure suivante montre la méthode classique d'identification des bactéries lactiques.

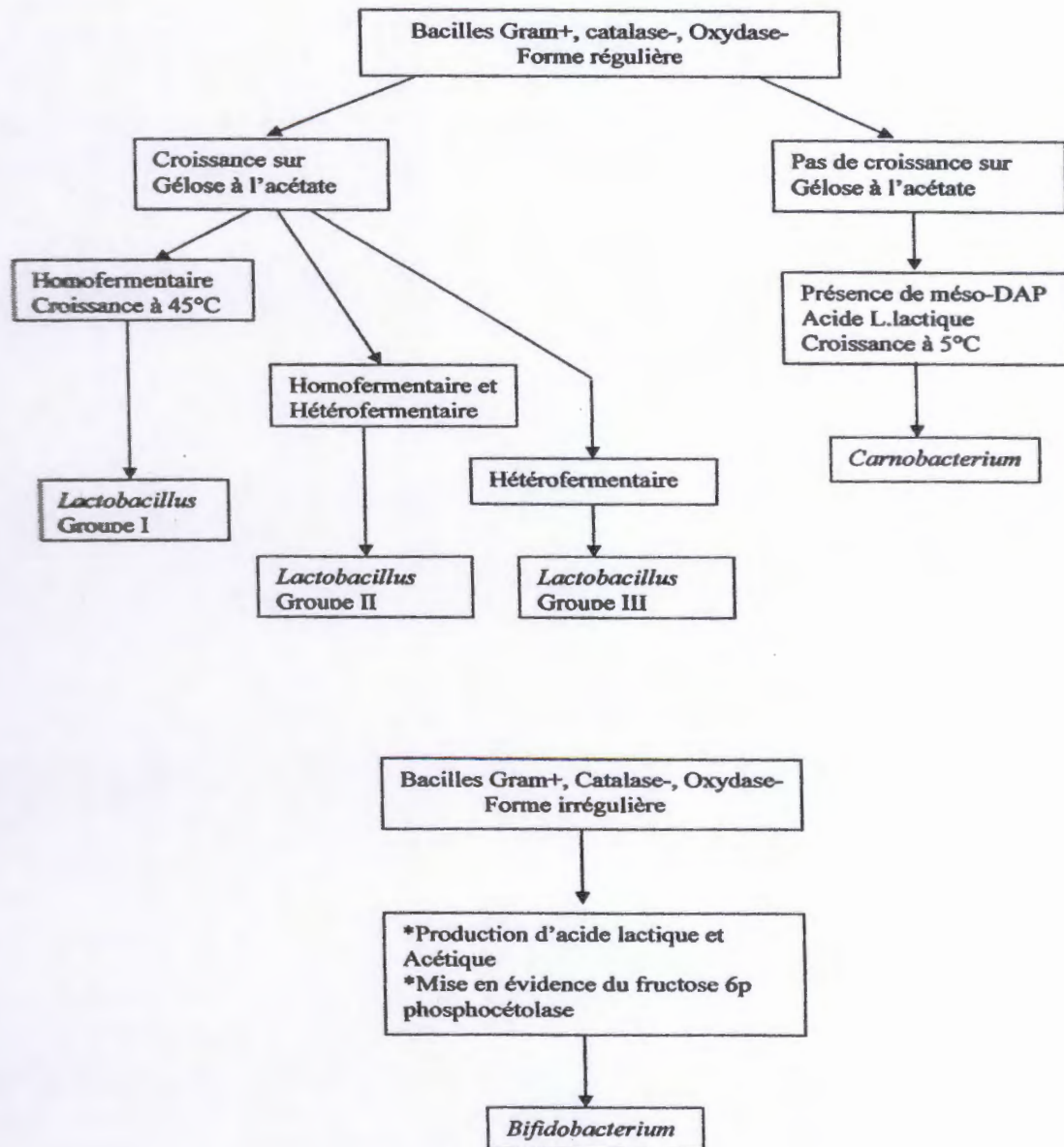


Figure (02) : Méthode classique d'identification des *Lactobacillus* (Sutra et al., 1998).

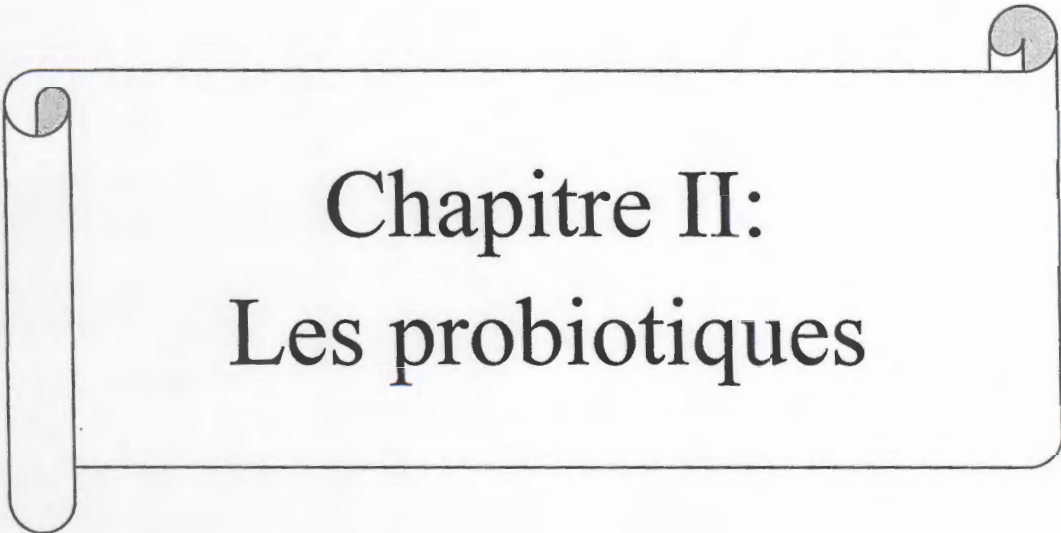
I.3.6.5.2. Méthode moléculaire

Elles se sont particulièrement développées dans le cas des bactéries lactiques d'une part pour l'identification des espèces et d'autre part, pour la différenciation intra spécifique. Parmi les techniques utilisables on peut citer :

La technique d'amplification au hasard (RAPD)

A permis de différencier des espèces de *Lactobacillus* dans les levains (Vogel et al, 1996). Elle est aussi utilisée pour le typage des souches de même espèce (Johansson et al, 1995).

- L'analyse des fragments des restrictions de l'ADN par électrophorèse en champs pulsé (R-ECP) donne également beaucoup de bons résultats pour l'identification de certaines espèces de *Lactobacillus*, (Danial et al., 1993).
- Le ribotypage a été utilisé pour mettre en évidence la contamination par *Lactobacillus sakee* de produits carnés conditionnés sous vide (Bjorkroth et al, 1996).



Chapitre II:
Les probiotiques

II.1. Historique

Il y'a un siècle, Elie Metchnikoff (scientifique russe), a affirmé que les bactéries de l'acide lactique offraient des bénéfices pour la santé conduisant à une plus grande longévité. Il suggéra que « l'auto intoxication intestinale » et que le vieillissement en résultant, pouvait être supprimé en modifiant la flore microbienne de l'intestin et en remplaçant des microbes protéolytiques tels que *Clostridium* qui produit des substances toxiques comme les phénols, les indoles et l'ammonium à partir des protéines de la digestion par les microbes utiles. Il développa un régime alimentaire avec du lait fermenté par une bactérie appelée « Bacille bulgare » (Guarner et al., 2008).

Au début des années 1920, en Indochine, un microbiologiste français du nom de Henri Boulard a isolé une nouvelle souche de levure à laquelle il donna son nom, *Saccharomyces boulardii*. Actuellement son usage est beaucoup plus répandu en Europe qu'en Amérique du nord. (Blumenthal et al., 2000).

Le terme « probiotiques » fut d'abord introduit en 1965 par Lilly et Stillwell; par contraste avec les antibiotiques, les probiotiques furent définis comme facteurs microbiologiquement dérivés stimulant la croissance des autres organismes. En 1989, Roy Fuller met l'accent sur la demande de viabilité des probiotiques et introduisit l'idée qu'ils avaient un effet bénéfique sur l'hôte (Gaurner et al., 2008).

De nos jours, les probiotiques font l'objet de recherches intensives et on trouve de plus en plus dans le commerce, des préparations renfermant divers micro-organismes bénéfiques. On ajoute parfois à ces produits des fibres destinées à favoriser la production de microorganismes (des fructooligosaccharides, par exemple, comme l'inuline, extrait de la racine chicorée). (Blumenthal et al., 2000).

II.2. Définition

Le terme probiotique dérive de deux mots grecs, pro et bios, qui signifient littéralement « pour la vie ». Depuis, plusieurs définitions ont été données, selon celle adoptée par l'OMS (organisation mondiale pour la santé), les probiotiques sont des microorganismes vivants qui administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte (OMS, 2007).

II.3. Classification des probiotiques

Il existe trois grands groupes des probiotiques (www.uni-roen.fr/ABISS/L3CAB/probiotique/index.Htm-1k-)

II.3.1. Les *Lactobacillus*

Actuellement plusieurs espèces de *Lactobacillus* sont reconnues comme des probiotiques telles que :

-*L. acidophilus*.

-*L. casei*.

-*L. reuteri*.

-*L. delbrueckii*.

-*L. gasseri*.

-*L. paracasei*.

-*L. plantarum*.

-*L. rhamnosus*.

-*L. crispus*.

-*L. gallinarum*.

II.3.2. Les bifidobactéries

La figure 03 représente les bifidobactéries

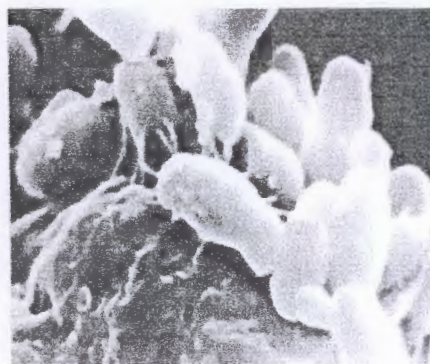


Figure (03) : Les bifidobactéries

Les bifidobactéries sont des bâtonnets de morphologie variée, cellules courtes ramifiées, bifurquées, spatulées, isolées ou en chaînettes disposées en grappe de raisin ou en palissade. Ces bactéries sont des Gram positives, non acido-résistantes, non sporulées, immobiles, aérobies-anaérobies facultatives (AAF) en présence de CO₂. Le genre est caractérisé par la présence d'une

enzyme : la fructose-6-phosphatophosphocétolase. Ces bactéries produisent de petites quantités d'acide formique, d'éthanol, et d'acide succinique. Ces espèces sont généralement catalase (-).

La présence d'alphagalactoside permet de différencier rapidement des lactobacillus. (www.uni-roen.fr/ABISS/L3CAB/probiotique/index.Htm-1k-).

La présence de Bifidobacterium entrainerait un effet anti-infectieux au niveau intestinal à cause de la présence d'un facteur bifidogène (Guiraud, 1998).

II.3.3. Les levures

Les levures sont des champignons chez lesquels la forme unicellulaire est prédominante. Elles se distinguent par leur taille plus grande et reproduction végétative s'effectuant le plus souvent par bourgeonnement. Leur reproduction sexuée conduit le plus souvent à la formation d'asques (Callon, 1997). Ce sont des microorganismes qui sont à l'origine de levée de la pâte grâce à la production de CO₂ à partir la fermentation des glucides (Bourgeois et Larpent., 1996).

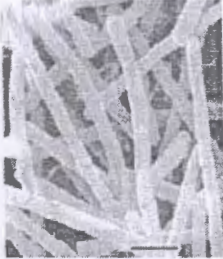

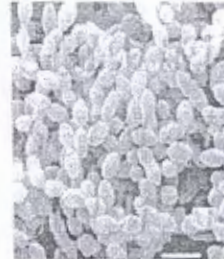

Les cellules des levures sont sphériques, elliptiques ou apicules (Guiraud., 1998). Elles sont immobiles, la taille des cellules est grande par rapport à celle des bactéries. Elles sont souvent osmophiles et se développe volontiers sur les préparations concentrées riche en sucres (jus de fruits et lait concentrés, sirops) mais aussi en sel (salaisons).

La température optimale de croissance est située entre 25C° - 30C°, mais les levures tolèrent, selon les espèces, des températures de 35C° jusqu'à 47C°. Elles peuvent s'adapter à tous les pH (sauf des valeurs extrêmes) mais préfèrent les milieux acides (Leyral et Vierling., 2001).

Les levures utilisées en tant que probiotiques sont des souches de *Saccharomyces cerevisiae* qui représente le groupe de microorganismes le plus exploité commercialement (www.univ-rouen.fr/ABISS/L3CAB/Probiotiques/index.htm-1k-).

Le tableau (02), illustre les principaux microorganismes utilisés comme probiotiques.

Tableau 02: Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques (Dierken et al., 2000)

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

L : Lactobacillus B : Bifidobacterium S : Streptococcus B : Bacillus S : Saccharomyces

II.4. Critères de choix probiotiques

Les microorganismes probiotiques sont spécifiques de l'hôte, une souche sélectionnée comme probiotiques chez l'homme, peut ne pas convenir à une autre espèce. De plus les microorganismes sélectionnés doivent présenter des caractéristiques (Quillen., 2001).

Le choix des souches fonctionnelles de microorganismes utilisés comme probiotiques doit reposer sur des critères établis scientifiquement (www.biok.com/fr/probiotiques.php).

Le tableau suivant cite les principaux critères utilisés pour la sélection des probiotiques.

Tableau (03) : Principaux critères utilisée pour la sélection des probiotiques (FAO/WHO, 2002).

| | |
|-------------------------|---|
| Critères de sécurité | <ul style="list-style-type: none"> -Historique de non pathogénicité -Souche d'origine humaine ou alimentaire -Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques -Souche déposée dans une collection de culture internationale -Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques -Pas de déshydroxylation des sels biliaires |
| Critères fonctionnels | <ul style="list-style-type: none"> -Tolérance à l'acide gastrique -Tolérance à la bile -Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production des substances anti microbiennes (bactériocines) -Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus -Stimulation du système immunitaire |
| Critères technologiques | <ul style="list-style-type: none"> -Stabilité au cours de procédés de production et dans le produit fini -Conservation des propriétés probiotiques après production. |

FAO: Food Agriculture Organization of the United Nations.

WHO: World Health Organization.

II.5. Mécanismes d'action des *Lactobacillus* probiotiques

Les probiotiques affectent l'écosystème intestinal, les mécanismes immunitaires de la muqueuse en stimulant les mécanismes non immunitaires par une compétition de pathogènes potentiellement antagonistes. On pense que ces phénomènes induisent des effets positifs, incluant la réduction de l'incidence et de sévérité de la diarrhée, pathologie la plus universellement reconnue bénéficiant de l'usage des probiotiques (Gaurner et al., 2008).

Les probiotiques réduisent l'activité de certains enzymes bactériennes qui pourraient augmenter les niveaux de procarcénogènes, mais ceci n'a pas été prouvé chez l'humain. Des études complètes et randomisées sont encore nécessaires pour définir le rôle des probiotiques comme agents thérapeutiques dans la maladie de l'intestin irritable (Gaurner et al., 2008).

Une étude finlandaise réalisée chez l'enfant suggère que *Lactobacillus casei* GG favorise le rétablissement rapide d'enfants présentant une diarrhée à rotavirus. Ceci en stimulant la sécrétion d'IgA spécifiques au niveau de la muqueuse intestinale (Kailla et al., 1992). Le métabolisme principale des bactéries lactiques à pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable, le pH final atteint, dépend de la matière première fermentée et des souches utilisées (plus ou moins acidifiantes) il est le plus souvent entre 4 et 4,5 dans le cas des yaourts, 4,8 pour le choucroute, 4,6 à 5,3 dans le cas des saucissons, c'est-à-dire à des valeur limitées de développement de la plupart des flores d'altération et des flores pathogènes (Pilet et al., 1995).

II.5.1. Rôle du pH

L'effet de pH est renforcé par la forme sous la quelle se trouvent l'acide lactique et les autres acides organiques produits lors des fermentations. En effet, la forme non dissociée de l'acide lactique qui est prédominante à pH acide est généralement plus toxique pour les cellules microbiennes. (Piard et Desmzeaud., 1992).

II.5.2. Productions des bactériocines

C'est des peptides antimicrobiens synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactiques, ils sont généralement thermorésistants, actifs uniquement sur des bactéries à Gram positif (Klaenhammer.,1993).

Les bactériocines des bactéries lactiques sont réparties selon leur structure chimique en 04 classes:

La classe I: regroupe les bactériocines possédant une structure peptidique particulière (acide aminés déshydrogénés reliés par des ponts monosulfures dénommées lanthionines mis en évidence chez une souche de *Lactococcus lactis*. Elle exerce ses effets inhibiteurs vis-à-vis de plusieurs autres bactéries lactiques mais également vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* ou *Clostridium tyrobutyricum*.

La classe II: réunit des peptides de faibles poids moléculaire à activité antimicrobienne. Parmi ceux-ci, une quinzaine possédant une structure peptidique très voisine, ont été identifiées au cours des 10 dernières années. Ils se caractérisent par leur activité commune vis-à-vis de *Listeria*

monocytogenes. Ils sont produits par divers genres de bactéries lactiques et exercent probablement naturellement des effets inhibiteurs dans les aliments où se trouvent les bactéries productrices. (Klaenhammer., 1993).

La classe III: protéines de taille supérieure à 30 kDa le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysine A, la zoocin A et la millericin B par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles. La zoocin A a un spectre d'action étroit alors que l'enterolysine A et la millericin B ont un spectre d'action large. L'helveticin J a un mode d'action bactericide (Nilsen et al., 2003).

La classe IV: peptide requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite (Nilsen et al., 2003 ; Papagianni., 2003 ; Nigutova., 2007).

II.6. Effet préventifs et curatifs

Les résultats cliniques publiés depuis une quinzaine d'année soulignent les multiples effets bénéfiques de probiotiques. Ils semblent avoir des effets préventifs et curatifs, notamment dans les cas de diarrhées virales, d'eczéma atopique, d'intolérance au lactose. d'autres travaux laissent présager qu'ils pourraient également jouer un rôle important dans la résistance aux infections respiratoires et dans la prévention du cancer (Anonyme., 2007).

II.6.1. Les infections gastro-intestinales

L'un des usages les mieux reconnus des probiotiques est la prévention et le traitement des diarrhées. Plusieurs études ont démontré des améliorations lorsque des troubles diarrhéiques aigus, incluant des infections bactériennes plus sérieuses, telle celle à *Clostridium difficile* sont traités par des probiotiques (Pedone et al., 1999). Chez les enfants, les probiotiques semblent avoir des effets sur des diarrhées virales probablement par une stimulation des anticorps IgA antirotavirus (Salminen et al., 1998). Ils réduisent la durée des épisodes ainsi que leur récurrence (Szajewska et al., 2001).

II.6.2. Diarrhées associées aux antibiothérapies

Les diarrhées associées aux traitements antibiotiques constituent la première indication des probiotiques. Ils limitent l'agression des antibiotiques sur la flore endogène intestinale et permettent une meilleure tolérance générale. Une méta-analyse montre que l'utilisation des probiotiques permet une diminution significative de l'incidence des diarrhées au cours des antibiothérapies (Hickson., 2007). Le genre *Lactobacillus casei* souche GG est également

capable de réduire le nombre d'épisodes diarrhéiques chez les enfants recevant une antibiothérapie pour des infections respiratoires (Arvola et al., 1999, Vanderhoof et al., 1999).

II.6.3. le système immunitaire

Les sujets âgés sont plus vulnérables face aux infections en raison du déclin de leur système immunitaire et en particulier de celui de l'activité des cellules lymphoïdes. Des études ont montré qu'un des suppléments avec probiotiques combat certains effets de l'affaiblissement du système immunitaire et, en particulier, renforce l'activité des cellules naturelles tueuses (Gill et al., 2001). Cinquante-trois personnes âgées et d'âge moyen ont été enrôlées dans une étude dans un premier temps. Elles ont reçu du lait pendant trois semaines, ce qui n'a provoqué aucune stimulation de leur système immunitaire. Ensuite, trois autres semaines, elles ont bu du lait enrichi en *Lactobacillus rhamnosus* l'activité de leurs cellules naturelles tueuses a été augmentée de 147 %, suggérant que le *Lactobacillus* stimulait l'immunité cellulaire systématique (Ying et Sheih., 2001). Ainsi au moment d'une vaccination, il a été montré que l'ingestion de probiotiques pouvait augmenter une réponse immune vaccinale (Link Amaster et al., 1994). Dans une étude clinique contrôlée contre placebo, on a administré par voie orale à de jeunes adultes des souches de *Lactobacillus rhamnosus* et *L. paracasei* avant et après une vaccination orale par un poliovirus atténué. Les probiotiques ont induit une réponse immunologique (IgA, IgG). De même qu'une production accrue d'anticorps neutralisant le virus. D'autres études indiquent une stimulation de l'activité phagocytaire des monocytes sanguins et une stimulation des IgA intestinales (Yoon et al., 1999).

L'influence des *Lactobacillus* probiotiques sur le système immunitaire représenté dans la figure N° 04.



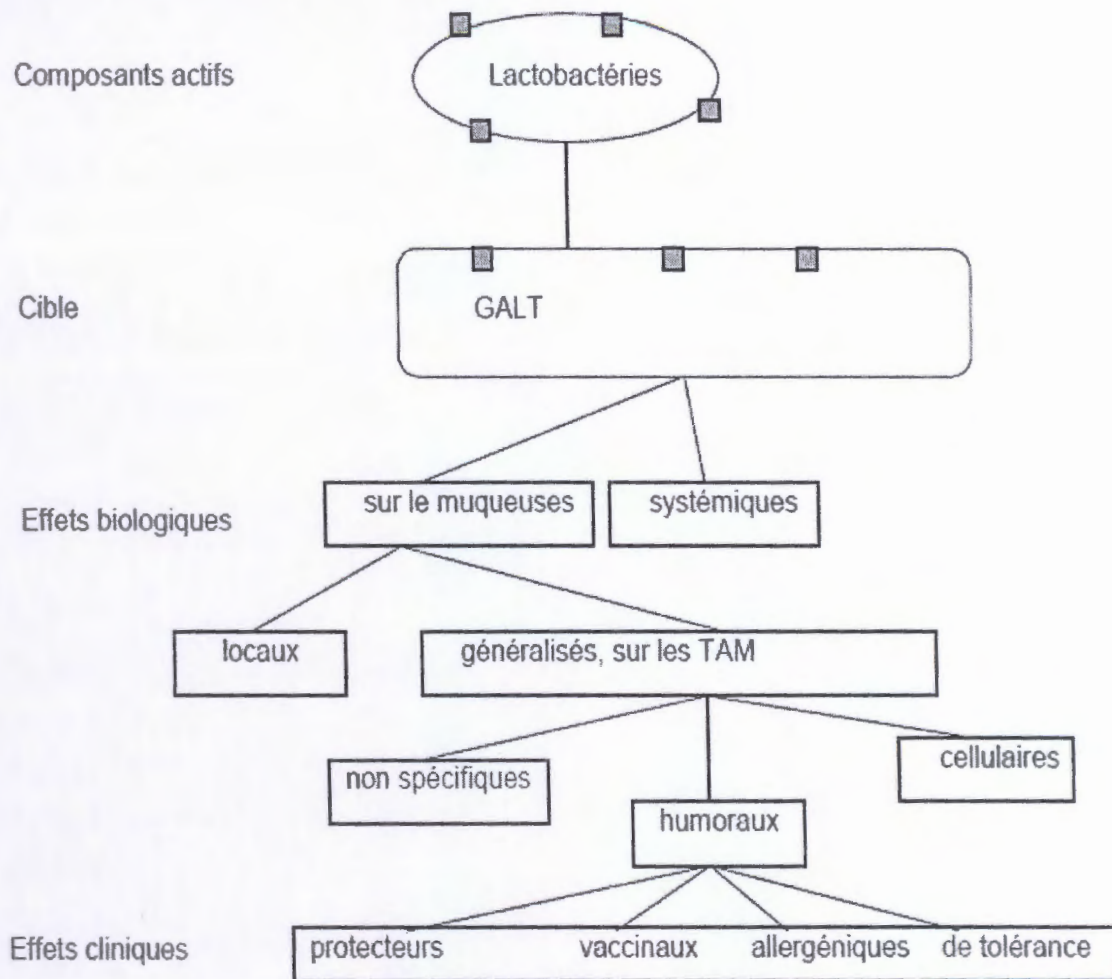


Figure N° 04: influence des *Lactobacillus* probiotiques sur le système immunitaire (Marteau., 1995).

II.6.4. Intolérance au lactose

La consommation de probiotiques améliore l'absorption du lactose chez les patients déficients en lactase et réduit les symptômes digestifs de l'intolérance au lactose. Cet effet repose principalement sur le fait que les bactéries vivantes renferment de la lactase microbienne qui est libérée dans l'intestin grêle pour soutenir l'hydrolyse du lactose, étape de la digestion partiellement prise en défaut chez des sujets souffrant d'intolérance au lactose (Abrahamsson et al., 2007).

II.6.5. Les maladies inflammatoires de l'intestin

Selon la littérature, les processus inflammatoires impliqués dans les pathologies de l'intestin de l'homme, comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la pouchite, seraient contrôlés par les probiotiques. L'administration de probiotique a provoqué des rémissions plus longues associées à une moindre expression de marqueurs inflammatoires ex-vivo et une augmentation de la sécrétion d'IgA, à une diminution de la consommation de médicaments et à une qualité de vie globalement supérieure. Les effets anti-inflammatoires de trois probiotiques avec des propriétés immunomodulatrices (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) ont été évalués et comparés sur un modèle de colite de rat. Les trois probiotiques ont restauré dans le côlon les niveaux de glutathion abaissés par le stress oxydatif du processus inflammatoires. Ils ont également montré une activité anti-inflammatoire, chacun ayant un profil anti-inflammatoire différent. Ces trois probiotiques pourraient être considérés comme de potentiels adjuvants dans le traitement de maladies inflammatoires du côlon (Peran et al., 2001).

II.6.6. Infection de l'appareil respiratoire

Les probiotiques doués de propriétés immunostimulantes pourraient aider à prévenir et traiter certaines infections virales courantes. Dans une étude finlandaise, en double aveugle versus placebo, des enfants de garderies (âgés de 1 à 6 ans) ont reçu pendant 7 mois du lait additionné d'une souche de *L. rhamnosus*. Le probiotique a diminué la durée d'absence des maladies de l'appareil digestif ou infection des voix respiratoires de 0.7 jours par rapport à celle des témoins. Les enfants avaient également un moindre risque d'infection des voix respiratoires (Hatakka et al., 2001).

II.6.7. Les effets anticancéreux

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. Dans une étude de supplémentation avec *L. acidophilus* chez 21 volontaires en bonne santé la concentration fécale de trois de ces enzymes (bêta-glucuronidase, nitroréductase, et azoréductase) a été diminuée. Cet effet a été observé après 10 jours de traitement. Cependant, il est réversible et n'est plus constaté 30 jours après la fin de l'étude, suggérant qu'une prise continue soit nécessaire à son maintien. D'autres travaux sur l'homme et le rat avec *L. acidophilus* ont montré une réduction de ces enzymes. (Goldin et al., 1984).

II.6.8. Un effet sur le cholestérol

Des études préliminaires ont révélé que la consommation du yaourt ou du 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 rat 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 (Pulusan., 1983).

II.6.9. Diarrhée chez l'enfant

Chez l'enfant, la diarrhée est une affection fréquente surtout dans les pays en voie de développement. La présentation des rôles protecteurs des probiotiques contre les pathogènes intestinaux stimule leur utilisation dans ce type d'affection. De ce fait, de nombreux travaux rapportant que certaines bactéries lactiques réduiraient la durée, et/ou l'incidence de certaines formes de diarrhées chez l'enfant (Luquet et al, 2005).

II.6.10. Inhibition des « mauvaises » bactéries

La répression du développement de germes indésirables ou pathogènes peut se faire de plusieurs façons. La production d'acides organiques à partir des glucides de ration alimentaire, tels que l'acide acétique ou l'acide lactique limitent, en abaissant le pH, le développement des *Escherichia coli* et des *Salmonelles*.

Les souches probiotiques pourraient également réprimer la croissance de bactéries pathogènes par production de substances antimicrobiennes. De type bactériocine, capable d'éliminer les germes fréquemment responsable d'infection.

Certaines souches possèdent également la capacité de déconjuguer les sels biliaires ; ces formes déconjuguées ont un pouvoir inhibiteur important sur le développement des bactéries

Les souches probiotiques pourraient également agir en inhibant l'implantation des germes pathogènes par compétition pour colonisation, par inhibition compétitive. De plus, certains probiotiques ont la capacité d'augmenter la résistance transépithéliale car ils permettent un maintien des protéines du cytosquelette, ainsi qu'une cohésion des jonctions serrées diminuant ainsi la perméabilité vis à vis des macromolécules, ces microorganismes ont également une capacité de glucosylation : un changement de conformation permettant d'inhiber l'adhésion de certains microorganismes dont les bactéries pathogènes (<http://www.univ-rouen.fr/ABISS/L3CAB/probiotique/index.htm-1k->).

II.6.11. L'équilibre de la flore intestinale

L'effet le plus documenté porte sur l'inhibition d'un certain nombre de bactéries dont les pathogènes par la production d'antibiotiques (*Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii subsp bulgaricus*) actif in vitro contre des bactéries Gram positives (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Sarcina*) ou Gram négatives (*Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Escherichia*.) L'acidification du milieu intestinal suffirait déjà à améliorer le transit intestinal et à inhiber de nombreuses bactéries pathogènes dont *E. coli* et *Salmonella*, dans ce dernier cas, l'acide lactique inhiberait le métabolisme oxydatif, diminuerait le pH intracellulaire et finalement serait bactéricide. Les bactériocines produites par de très nombreuses bactéries lactiques peuvent être responsables de l'inhibition de bactéries pathogènes du tractus digestif.

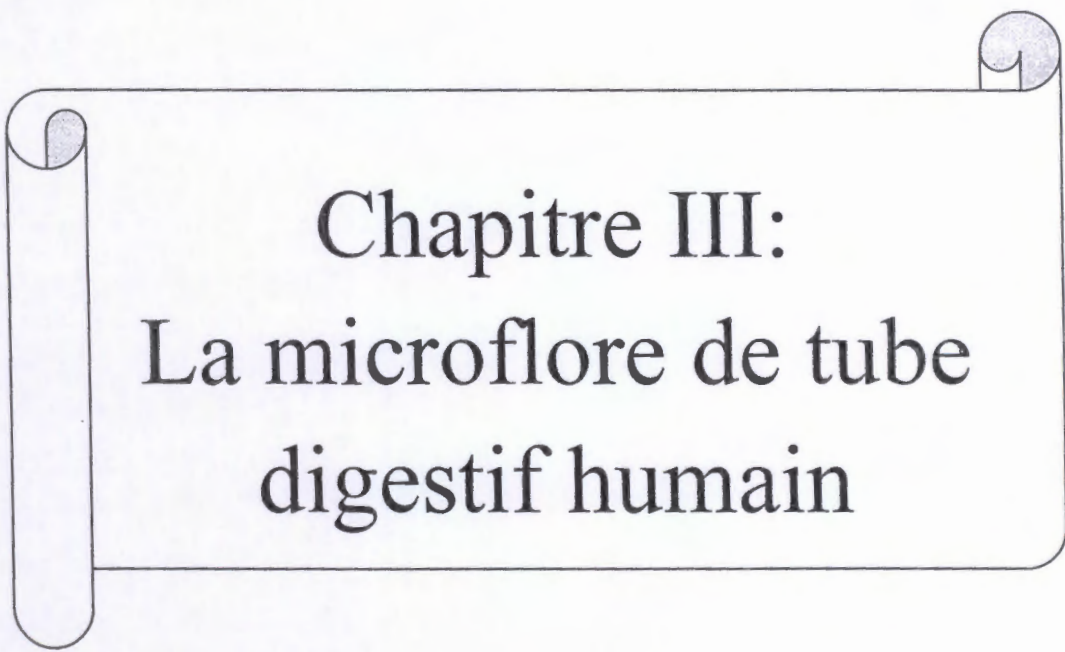
Enfin, *Lb. acidophilus* mais pas *Lb. casei* serait capable de déconjuguer des sels biliaires : l'acide biliaire résultant agirait alors plus efficacement sur les bactéries pathogènes (Novel., 1993).

La consommation du lait à *L. acidophilus* vivant faciliterait le transit intestinal et combattrait la constipation ; il stimulerait la muqueuse intestinale qui à son tour exciterait la couche musculaire sous-jacente (Novel., 1993).

II.7. Effet indésirable de probiotiques

Selon Barbut, 2002, les probiotiques provoqueraient une augmentation temporaire des gaz intestinaux chez certaines personnes. Une consommation élevée de suppléments de probiotiques peut également provoquer une légère irritation intestinale chez certaines personnes en début de traitement. Selon le même auteur, il est conseillé, dans ce cas, de commencer avec

de petites doses qu'on augmentera progressivement afin de donner le temps à l'organisme de sécréter les enzymes appropriées.



Chapitre III:
La microflore de tube
digestif humain

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

III.1. L'estomac

De nombreux microorganismes sont balayés de la cavité buccale dans l'estomac. En raison du pH très acide du contenu gastrique, la plupart des microorganismes sont tués en conséquence. L'estomac contient habituellement moins de 10 bactéries viables par ml de fluide gastrique, ce sont surtout des représentants des genres *Sarcina*, Streptocoques, Staphylocoque, *Lactococcus*, *Peptostreptococcus* et des levures tels que les *Candida*. Des microorganismes peuvent survivre s'ils passent rapidement à travers l'estomac ou si les organismes ingérés avec la nourriture sont particulièrement résistants au pH gastriques (ex : les mycobactéries). Normalement le nombre de microorganismes augmente après un repas mais chute rapidement suite au pH gastrique bas. (Prescott et al., 2002).

III.2. L'intestin grêle

La flore intestinale varie longitudinalement tout au long de l'intestin, mais aussi transversalement entre la lumière et la muqueuse intestinale. En fonction des niveaux de l'intestin une flore différente est retrouvée correspondant à des habitats différents ou niches écologiques spécifiques. Après le passage de l'estomac à pH acide, le pH redevient neutre l'oxygène se raréfie et la flore bactérienne qui a survécu au passage gastrique va augmenter progressivement du duodénum à l'iléon. La flore du duodénum-jéjunum n'excède pas 10^4 à 10^6 UFC/g de contenu intestinal et est composée d'espèces aéro-anaérobies facultatives (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterobacteriaceae*) appartenant à la flore de passage, la flore iléale est plus importante, atteignant 10^5 à 10^7 UFC/g de contenu intestinal avec une flore anaérobie stricte prédominante appartenant au genre *Bacteroides* associée à une flore anaérobie facultative cette flore bactérienne ne dépassants pas 10^7 UFC/g n'assurerait pas de fonctions majeurs en dehors de situations pathologiques (Suau et al., 1999, Wilson, 1991).

III.3. Le colon

Le colon est le segment le plus riche en bactéries, les taux atteignent 10^9 à 10^{11} UFC/g de contenu. Dans le colon, le transit très fortement ralenti et associé à un très bas potentiel d'oxydoréduction, est à l'origine de l'augmentation importante de la population bactérienne anaérobie. Le colon où la compétition pour l'espace et les nutriments contribue à maintenir l'intégralité de la microflore, est la seule zone colonisée de façon permanente par une flore résidente (Suau et al., 1999, Wilson, 1991).

- La flore microbienne essentiellement anaérobie, véritable organe microbien, assure de multiples fonctions bénéfiques pour l'hôte:
 - Fonctions métaboliques telles que la fermentation des résidus alimentaires non digestibles et des constituants endogènes de l'hôte, avec production d'acide gras à chaînes courtes.
 - Fonctions trophique, sur la muqueuse intestinale, développement de l'angiogénèse intestinal, développement du système immunitaire local.
 - Fonctions de barrière contre l'implantation de bactéries pathogènes (Seksik et al., 1992).

III.4. Les selles

La flore fécale a été la plus étudiée et contient 10^9 à 10^{11} UFC/g de fèces. Quarante pour cent du poids des selles correspond à des microorganismes. (Suau et al., 1999, Wilson, 1991).

A coté de la flore résidente ou autochtone, comprenant la flore dominante et sous-dominante, on trouve aussi une flore de passage ou allochtone.

La flore dominante présente à des taux de 10^9 à 10^{11} UFC/g est essentiellement composée de bactéries anaérobies strictes, parmi les quelles des bacilles à Gram négatif des genres *Bacteroides* en nombre important, des bacilles à Gram positif des genre *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, ainsi que des cocci à gram positif comme des *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*. La flore sous dominante, présents à des taux de 10^6 à 10^8 UFC/g se compose de bactéries aéro-anaérobies facultative, ces bactéries appartiennent à différentes espèces de la famille d'*Enterobacteriaceae* (surtout *Escherichia coli*) et aux genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* etc.

La flore de passage est variable et ne s'implante pas au sein du tube digestif, sauf lors de circonstances pathologiques (Freter, 1992). Cette flore se trouve à des taux inférieur à 10^6 UFC/g très polymorphe représentée par des Entérobactéries du genre *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* ou *Enterobacter* mais aussi par des *Pseudomonas*, des Staphylocoques et des levures essentiellement du genre *Candida* (Claude ramband el al., 2004).

La figure N°: (05) montre la composition de la flore intestinale humaine dans les diverses portions du tube gastro-intestinal.

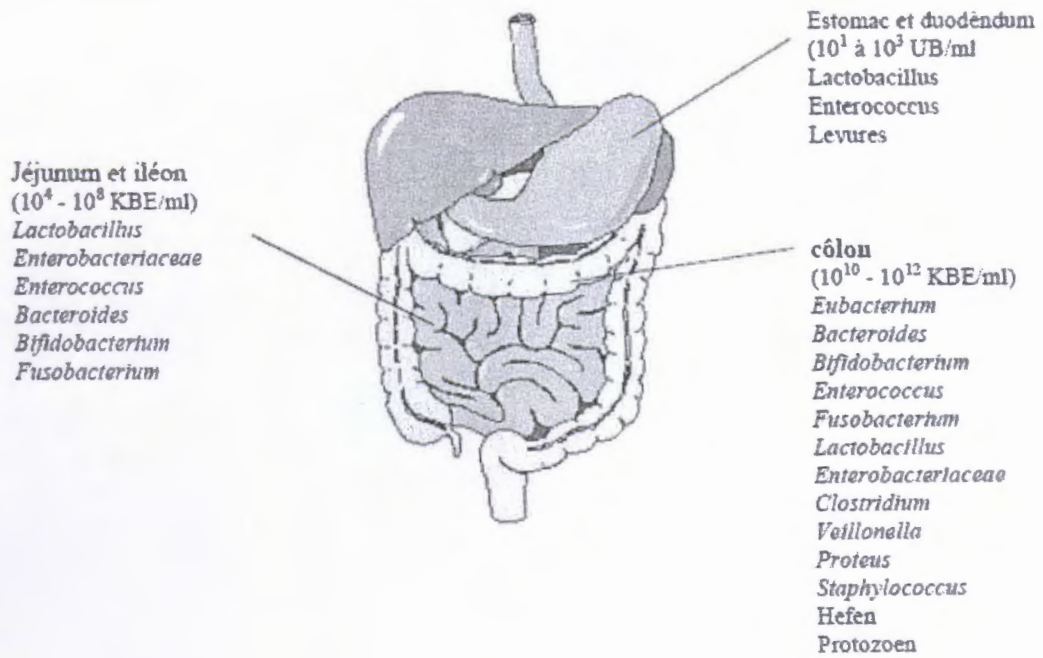
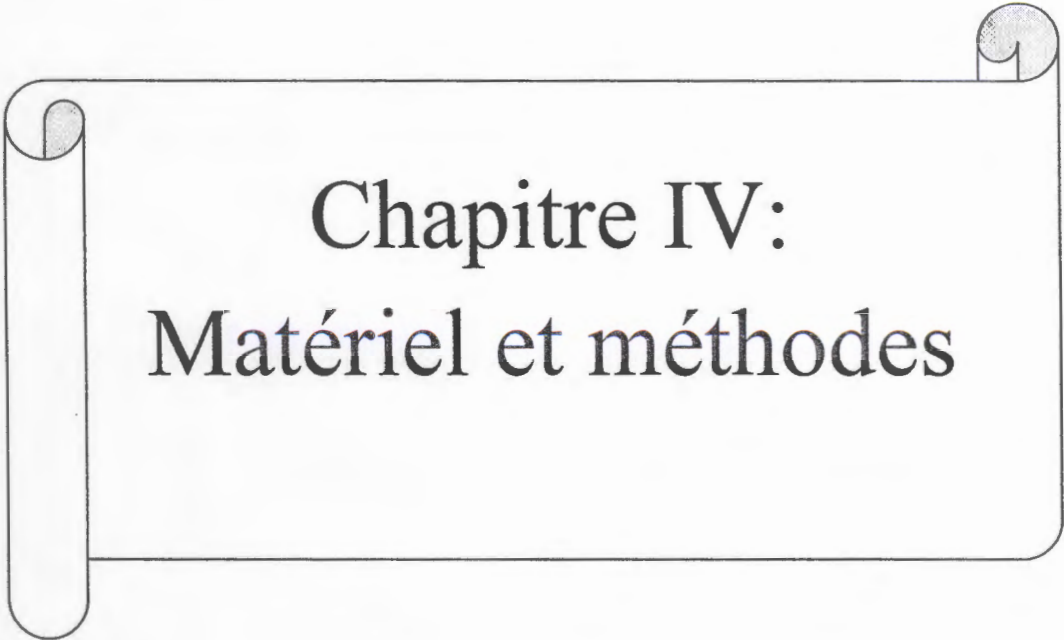


Figure 5 composition de la flore intestinale humaine dans les diverses portions du tube gastro-intestinal (d'après Holzapfel et al., 1998, modifié)



Chapitre IV:
Matériel et méthodes

IV. Matériel et méthodes

IV.1. Matériel

IV.1.1. Les selles d'enfant

La niche écologique utilisée pour l'isolement des bactéries lactiques et des entérobactéries est les selles d'enfants, âgé de 7 ans à 9 ans, ainsi l'étude, a été conduite sur 3 échantillons, pour mettre en évidence une collection des bactéries lactiques.

IV.1.2. Milieux de culture

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

- Milieu MRS (Man Rogosa Sharp) liquide et gélose, utilisée pour la culture de lactobacilles.
- Milieu GIBSON ABDEL-MALEK : pour la recherche du type fermentaire (préparé au laboratoire).
- Milieu Moëller: pour la recherche de l'arginine dihydrolase.
- 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 VRBL pour l'isolement des entérobactéries et leur conservation.
- Milieu PCA pour la culture de la Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM).

IV.1.3. Réactifs et matériels

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

- Violet de gentiane, fushine, lugol, alcool.
- Eau oxygénée.
- HCL, la soude (NAOH) N/9.
- Teinture de tournesol, chlorure de sodium (Na Cl).
- Lactose, xylose, saccharose, mannose, galactose, ribose.
- Papier filtre, papier Watman N°4.
- pH mètre, Four Pasteur, Réfrigérateur, Autoclave, Bain Marie, Etuve (WTB binder), Spectrophotomètre.
- Micropipettes.

- Disques d'antibiotiques (Pénicilline G, Streptomycine, Oxacilline, Sulfamide, Ampiciline, Tétracycline).

-Eau oxygénée.

IV.2. Méthodes

IV.2.1. Evaluation de la microflore des selles d'enfant

IV.2.1.1. Préparation des dilutions

On prélève stérilement 1g de l'échantillon, que l'on introduit dans un tube contenant 9ml d'eau distillée. Le tube est agité par des mouvements de rotation moyenne à l'aide d'un Vortex. On obtient ainsi une dilution au 1/10. Avec une nouvelle pipette de 1ml on prélève 1ml de cette dilution que l'on introduit dans un nouveau tube de diluant de 9 ml; on obtient une dilution au 1/100 et ainsi de suite jusqu'au 10^{-7} .

IV.2.1.2. Dénombrement de la flore bactérienne

IV.2.1.2.1. Mesure du pH des échantillons

Le pH des échantillons analysé a donné les valeurs suivants: $pH_{(E1)} = 6,73$, $pH_{(E2)} = 6,93$, $pH_{(E3)} = 7,92$ avec un moyenne de 7,19.

- L'objectif de la mesure de pH est d'ajuster le pH de milieu MRS utilisé au cour de notre travail.

IV.2.1.2.2. Dénombrement de la flore totale mésophile (FTAM)

A l'aide d'une pipette pasteur, on prélève 1ml de la dilution (10^{-7}) et on le dépose sous forme de gouttelette au fond de la boîte de Pétri, puis on fait couler aseptiquement la gélose PCA fondue et on homogénéise le tout. On laisse solidifier, puis on incube à 37°C pendant 24-48 h.

On fait de même avec une incubation à 22°C pendant 24-48 h pour la flore saprophyte (Guiraud, 1998).

IV.2.1.2.3. Dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants

On ensemence 1ml de la dilution 10^{-7} sous forme de gouttelette puis on coule la gélose VRBL fondue dans la boîte de pétri contenant l'inoculum et on homogénéise le tout. On incube à 37°C pendant 24-48 h.

- La technique est la même comme pour les coliformes thermotolérants sauf l'incubation se fait à 44°C pendant 24-48 h.

IV.2.1.2.4. Dénombrement des *Lactobacillus*

Le milieu utilisé pour le dénombrement des bactéries lactiques tient compte, de leurs exigences nutritionnelles, ainsi, le dénombrement effectué sur la gélose de Man-Rogosa-Sharp (MRS). L'ensemencement s'effectue par étalement de 0,1ml de la dilution 10^{-7} en surface de la gélose MRS déjà coulée et séchée. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 h en anaérobioses. Les colonies à dénombrer sont de petites tailles, de couleur blanchâtre.

IV.2.2. Isolement et l'identification des *Lactobacillus*

II.2.2.1. Enrichissement

On ensemence 1ml de chaque dilution sur bouillon MRS enrichi à la cystéine, pour avoir un grand nombre de bactéries.

IV.2.2.2. Isolement

Les boîtes de pétri contenant la gélose MRS préalablement coulés et séchées, sont ensemencées à partir des bouillons d'enrichissement déjà préparés, l'incubation est faite à 37°C pendant 24 h.

Après l'incubation, on a ciblé et repiqué les colonies caractéristiques des bactéries lactiques dans le bouillon MRS.

IV.2.2.3. Purification

Consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose MRS jusqu'à l'obtention des colonies de mêmes taille, mêmes formes et couleurs.

IV.2.3. Identification

Les tests principaux appliqués pour l'identification des souches purifiées sont:

IV.2.3.1. Examen macroscopique

Ce test est basé sur l'observation des cultures obtenues après l'incubation à 37°C pendant 24h: la taille des colonies leur formes et couleurs.

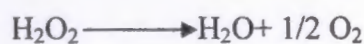
IV.2.3.2. Examen microscopique

L'observation microscopique permet la caractérisation de la morphologie, le mode de regroupement et le type de Gram (positif ou négatif). Le protocole de coloration de Gram se fait comme suit (Legral et Vierling, 2001).

- Sur une lame dégraissée; on dépose une goutte d'eau physiologique stérile, puis on étale une colonie prélevée de la gélose nutritive.
- On fixe le frottis en le passant légèrement sur la flamme du bec Bunsen.
- La coloration des frottis se fait par le violet de Gentiane pendant 1 minute puis on lave avec l'eau de robinet.
- On ajoute le Lugol et on laisse réagir pendant 1 minute.
- On décolore à l'éthanol jusqu'à l'élimination du premier colorant.
- Coloration par la fushine pendant 30 secondes, laver abondamment et sécher entre deux feuilles absorbantes.
- La lame peut être observée au microscope optique avec l'objectif ($\times 40$).

IV.2.3.3. Recherche de la catalase

La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée qui résulte l'oxydation, par l'oxygène de l'air. Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes; une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame et un peu de culture en milieu solide y est répartie: un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (Guiraud, 1998) :



IV.2.3.4. Test de croissance à différentes températures

Ce test est important car il permet de distinguer des bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles; après inoculation sur bouillon MRS avec une souche pure des germes à tester les tubes sont incubés pendant 24 à 48 h aux températures 15C° et 45C°, au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux. Les bactéries mésophiles poussent à 15C° alors que les bactéries thermophiles ne le font pas et poussent 45C°.

IV.2.3.5. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

La mise en évidence de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques, cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine, pour réaliser ce test, on ensemence le bouillon Moeller à l'arginine par une des souches à tester, la dégradation de l'arginine et la libération d'ammoniac empêchent le virage de couleur au jaune (Guiraud., 1998).

IV.2.3.6. Type fermentaire

Le test permet d'apprécier le métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il est défini de façon simple par le test de GIBSON-ABDELMALEK qui traduit un dégagement de CO₂ caractéristique des espèces hétérofermentaires. Le milieu de culture préalablement fondu, refroidi et solidifié en position verticale est ensemencé par les souches étudiées puis on coule en surface un bouchon de gélose blanche stérile. L'incubation se fait à 37 C° pendant 5 à 7 jours.

Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de gélose (Larpen et Gourgaud, 1997).

IV.2.3.7. Profil fermentaire des sucres

Ce test permet d'apprécier les capacités des souches purifiées à fermenter quelques sucres. Le test est réalisé sur milieu M.E.V.A.G (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) contenant le sucre. L'étude est basée sur la modification du pH en utilisant un milieu semi-solide additionné d'un indicateur de pH sensible. Pour se faire, des tubes de milieu M.E.V.A.G régénérés par chauffage au bain Marie, chaque tube est additionné d'un sucre, puis solidifié. On ensemence chaque souche dans un tube de M.E.V.A.G contenant le sucre en sujet, Les résultats sont lus après 24h d'incubation. Le virage de la couleur vers le jaune, indique l'utilisation du sucre par la bactérie (Legral et Vierling, 2001).

IV.2.4. Evaluation des aptitudes probiotiques *in vitro*

IV.2.4.1. Estimation de la croissance

Pour l'évaluation des aptitudes probiotiques *in vitro*, il est utile d'évaluer le nombre de colonies ou cellules dans un volume donné dont la technique est la suivante:

-Préparer des cultures jeunes (âgées de 20h): Elle se fait par ensemencement du bouillon MRS par chaque culture âgée de 24h avec un rapport de 1ml/9ml.

-la D.O des cultures jeunes est déterminée à une longueur d'onde de 660 nm.

IV.2.4.2. Croissance sur milieu acide

Pour réaliser ce test, il faut abaisser le pH de la gélose MRS à différentes valeurs à savoir : pH3 et pH4 par l'acide acétique, puisensemencer le milieu de culture à partir de cultures jeunes par étalement à 37C° /24h.

IV.2.4. 3. Croissance en présence de la bile

Pour l'application de cette technique, on a préparé au préalable 16 tubes de bouillon MRS dont 8 ont servi de témoin (T) et les 8 autres sont préparées à 0,3 % de la bile (SB).

Une fois les tubes préparés, chaque souche estensemencée en double avec un tube T et un autre SB. On procède à la mesure de la DO à 620 nm et au dénombrement des cellules à T = 0h et après 4h d'incubation à 37 C° (Lin et al., 2007).

IV.2.4.4. Adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales

La méthode utilisée est celle de Lin et al., 2007.

- Un segment de l'ileum de rat a été ouvert et lavé avec le tampon phosphate salin stérilisé (PSB. pH: 7,2) puis tenu dans le PBS à 4 C° pendant 30 min pour enlever le mucus de la surface et ensuite lavé trois fois avec le PBS stérile. La suspension cellulaire a été examinée par microscope pour assurer qu'elle n'était pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales était approximativement 5×10^4 cellules/ ml.

- Préparation des cellules de bactéries lactiques: des cultures jeunes de 24H de bactéries lactiquesensemencées dans le bouillon MRS ont été centrifugées, le culot a été récupéré puis soumis à des dilutions sur PBS jusqu'à 10^{-8} afin d'obtenir une concentration cellulaire de 10^8 cellules/ml.

- Application: 1ml de suspension de bactéries du tube de 10^{-8} a été mélangé avec 1ml de celle des cellules épithéliales, puis incubé à 37C° pendant 40 min.

- Durant la période d'incubation, les tubes ont subi une agitation chaque 5min. l'adhésion est observée sous microscope après préparation de frottis et coloration au cristal violet additionné d'alcool. Les résultats sont considérés positifs si le nombre de bactéries adhérees aux cellules épithéliales égale ou supérieur à 15 selon le tableau N°12.

IV.2.4.5. Resistance aux antibiotiques

La méthode utilisée est celle de Larpent et Gourgaud, 1997.

Pour chaque boîte on a coulé 9 ml de la gélose MRS déjà ensemencé par 1 ml de la souche à tester. Après solidification et séchage de la gélose on a déposé dans chaque boîte 6 disques d'antibiotiques à savoir : Streptomycine (S), Tétracycline (T), Pénicilline G(P), Oxacilline(OX), Sulfamides(G20), ampicilline(AM).

Après une incubation à 37C° pendant 24 h, on mesure les zones d'inhibitions.

Les choix des antibiotiques utilisés dans notre travail sont justifiés par leur utilisation fréquente en Algérie.

IV.2.4.6. Activité antibactérienne:

La recherche de l'activité antimicrobienne a été effectuée vis-à-vis de quatre souches cibles isolées en médecine humaine : *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Kebsiella* et *Staphylococcus aureus*. Ces bactéries sont mises en culture sur boîtes de Pétri dans différents milieux (Hektoen, Chapman, et Muller-Hinton) en utilisant des cultures âgées de 24h. Après le séchage de la gélose, les disques de papier Wattman stériles (de 5mm de diamètre) sont déposés à la surface de la gélose déjà ensemencée, chaque disque est imbibé par 20µl de souches jeunes des bactéries lactiques âgées de 20h.

Les boîtes sont incubées à 37 C° jusqu'à l'apparition des colonies bactériennes. Les diamètres des zones d'inhibition du pathogène sont ensuite mesurés autour de chaque disque (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

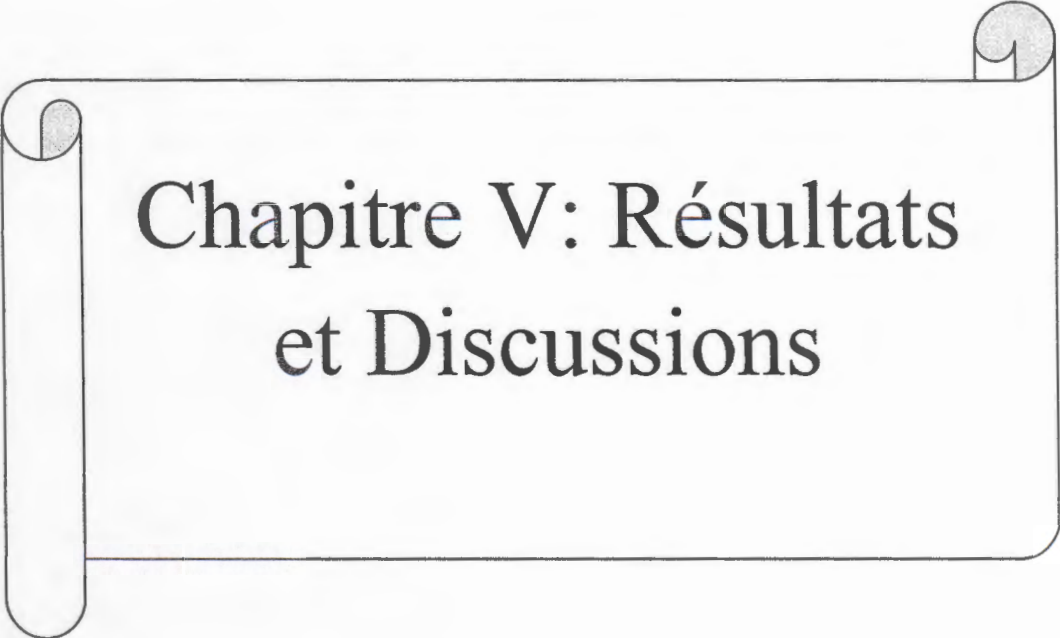
IV.2.4.7. Activité inhibitrice des surnageants

L'activité inhibitrice du surnageant natif et neutre a été également évaluée par application de la même technique de diffusion sur gélose

Ce test a été appliqué pour chaque souche de *Lactobacillus* ayant présentée un antagonisme (activité inhibitrice) envers les entérobactéries mis en test. Pour se faire, on a préparé des cultures âgées de 20h par ensemencement du bouillon MRS par des cultures âgées de 24h 1V/9V.

Après une centrifugation à froid une moitié du surnageant obtenu est ajusté à pH: 6 par NaOH (3N) pour obtenir le surnageant neutre.

On applique la même technique de diffusion sur disque à raison de 4 disques par boîte pour le surnageant natif et neutre.

A decorative graphic of a scroll with a black outline and rounded corners. The scroll is partially unrolled, with the top and bottom edges curving inward. The text is centered within the scroll.

Chapitre V: Résultats et Discussions

V. Résultat et discussions

V.1. Dénombrement de la microflore des selles d'enfant

L'analyse microbiologique des selles d'enfant a conduit aux résultats résumés dans le tableau 04.

Tableau N°04 : Résultats du dénombrement de la microflore isolée de selles d'enfant.

| FLORES | NOMBRES DE COLONIES (UFC) X 10 ⁷ |
|---------------------|---|
| FTAM | 308 |
| Les coliformes | 236 |
| Bactéries lactiques | 275 |

Les résultats obtenus après l'analyse microbiologique d'un gramme de la matière fécale montrent la présence d'une flore totale aérobie mésophile (FTAM) avec nombre de 308 X 10⁷ UFC/ ml. Le nombre des coliformes estimé à 236 X 10⁷ UFC/ml La numération des bactéries lactiques est de 275 X 10⁷ UFC/ml.

V.2. Isolement et identification des *Lactobacillus*

V.2.1. L'observation macroscopique

L'observation macroscopique montre que les souches cultivées sur milieu MRS solide donnent des colonies circulaires, de couleur blanche, de taille variable (1 à 4 mm de diamètre), de surface lisse plus ou moins bombées et de contour régulier correspondant à la description des colonies des *Lactobacillus* (Legral et Vierling., 2001).

V.2.2. L'observation microscopique

L'observation microscopique après la coloration de Gram montre des cellules colorées en bleu violet de Gentiane ce qui indique qu'il s'agit de bactéries à Gram positif. Elles se présentent sous forme de bâtonnets courts, isolées ou disposées en courtes chaînettes comme l'indique la figure N° 06.

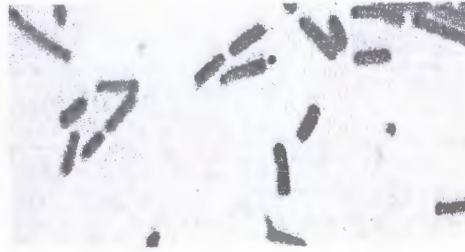


Figure (06) : Les *Lactobacillus* après coloration de Gram (X 40).

V.2.3. Tests physiologiques et biochimiques

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques sont portés dans le tableau N° 05.

Tableau N°05 : Résultat des tests physiologiques et biochimiques.

| souche | Gram | Forme | Catalase | Croissance à différentes températures | | ADH | Type fermentaire |
|--------|------|---------|----------|---------------------------------------|------|-----|------------------|
| | | | | 15C° | 45C° | | |
| S8 | + | Bacille | - | - | + | - | Homo |
| S9 | + | Bacille | - | + | - | - | Homo |
| S10 | + | Bacille | - | - | + | - | Homo |
| S13 | + | Bacille | - | + | - | + | Hétéro |
| S16 | + | Bacille | - | - | + | + | Homo |
| S19 | + | Bacille | - | - | + | - | Hétéro |
| S20 | + | Bacille | - | + | - | - | Hétéro |
| S22 | + | Bacille | - | + | - | - | Hétéro |

+ : Test positif; - : Test négatif; Homo : homofermentaire. Hétéro : hétérofermentaire.

Après l'étude des caractères biochimiques et physiologiques, huit (08) souches seulement ont été retenues sur vingt quatre (24). Les souches non retenues ne correspondaient pas au profil des *Lactobacillus*. Elles ont été éliminées.

V.2.3.1. Test de la catalase

Toutes les souches étudiées ne possèdent pas d'activité catalasique. D'après la littérature les *Lactobacillus* sont catalase négatif (Lin et al., 2007).

V.2.3.2. Test de l'ADH

Deux souches S13 et S16 ont un résultat positif donc elles dégradent l'arginine par l'arginine dihydrolase alors que le reste des souches donnent des résultats négatifs.

D'après la littérature les *Lactobacillus* sont généralement ADH négatif.

V.2.3.3. Recherche du type fermentaire

Sur le milieu GIBSON-ABDELMALAK, il y a eu un déplacement de la gélose chez quatre souche (S13, S19, S20, S22), Ce sont des hétérofermentaires, pour le reste des souches, il y aucun déplacement de la gélose, donc ce sont des homofermentaires.

D'après Federghi M, 2005 les souches de *Lactobacillus* sont classées en 3 groupes:

- Les homofermentaires obligatoires : tel que *L.delbrueckii*, *L. hervetius*, *L. acidophilus*.
- Les hétérofermentaires facultatifs : comme *L. curvatus*, *L. sakei* et *L. plantarum*.
- Les hétérofermentaires obligatoires : comme *L.sanfransiscensis*, *L.brevis* et *L.kefir*.

Chez l'homme les souches sont homofermentaires obligatoires ou hétérofermentaires facultatifs

V.2.3.4. Fermentation des sucres

Les résultats des profils de fermentations des sucres par les souches étudiées sont résumés dans le tableau N°6.

Tableau N°06: résultat des tests de fermentation des sucres.

| sucres souches | Mannose | Galactose | Saccharose | Lactose | Xylose | Ribose |
|-------------------|---------|-----------|------------|---------|--------|--------|
| S8 | + | + | + | + | - | +/- |
| S9 | - | +/- | + | - | + | - |
| S10 | + | - | + | - | + | - |
| S13 | - | - | - | + | - | +/- |
| S16 | + | - | - | - | - | - |
| S19 | + | - | + | +/- | - | - |
| S20 | +/- | - | - | - | - | - |
| S22 | - | - | - | - | - | - |

+ : résultat positif; - : résultat négatif ; +/- : résultat variable.

L'étude des profils des sucres est un critère important pour l'identification des groupes I, II, III, des espèces et sous espèces

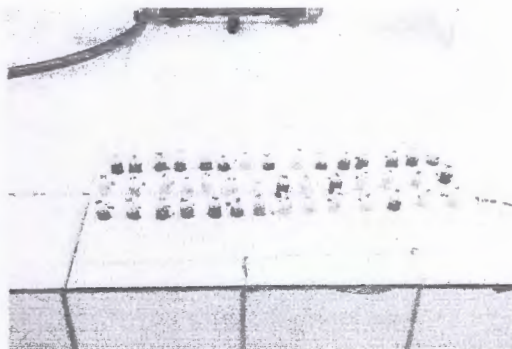


Figure (07) : le profil fermentaire des sucres

V.2.4. Identifications des espèces

Les résultats des tests biochimiques et physiologiques obtenus dans notre travail, étayés par la littérature, ont permis l'identification de différentes espèces de *Lactobacillus*. Elles sont mentionnées dans le tableau N° 7.

Tableau N°07 : Identification des espèces de *Lactobacillus* isolées à partir des selles d'enfant.

| Code | Nom d'espèce | Groupe |
|------|--------------------------------------|--------|
| S8 | <i>L. acidophilus</i> | G.I |
| S9 | <i>L. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> | G.I |
| S10 | <i>L. gasseri</i> | G.I |
| S13 | <i>L.kefir</i> | G.III |
| S16 | <i>L. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> | G.I |
| S19 | <i>L. gasseri</i> | G.I |
| S20 | <i>L. viridescens</i> | G.III |
| S22 | <i>L. viridescens</i> | G.III |

G: groupe.

Selon la littérature les souches *L. acidophilus* *L.delbrueckii.ssp.bulgaricus* *L. gasseri* sont des espèces isolées chez l'homme par contre les espèces *L.kefir* *L.viridescens*. Peuvent être d'origine alimentaire

La répartition des espèces identifiées, d'origine humaine, est comme suit:

L. acidophilus (20%), *L.delbrueckii.ssp.bulgaricus* (40%), *L. gasseri* (40%) comme illustré dans la figure (08).

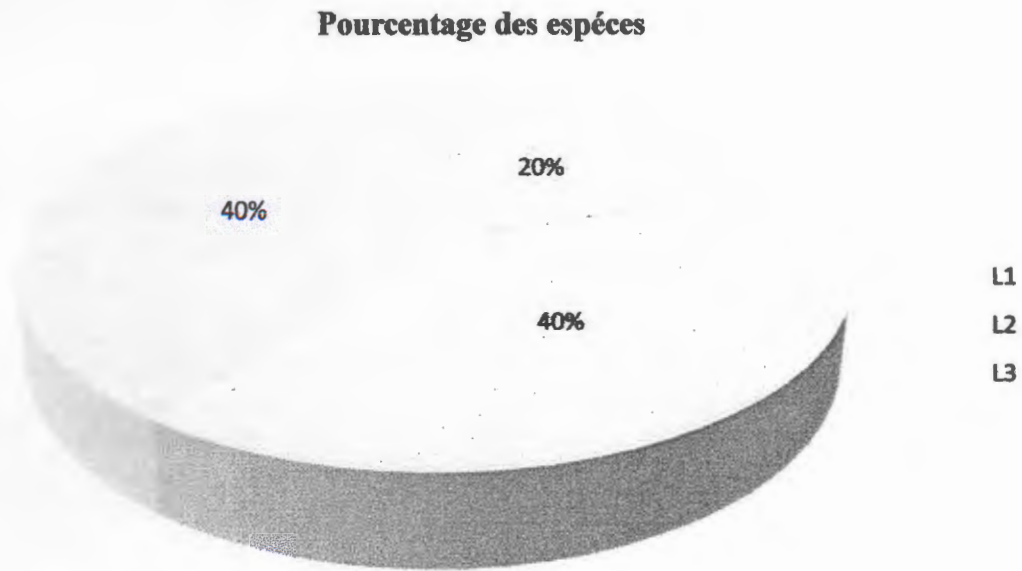


Figure (08): Répartition des espèces d'origine humaines en pourcentage.

V.2.5. Evaluation des aptitudes probiotiques *in vitro*

V.2.5.1. Estimation de la croissance

Les résultats de la mesure de la densité optique (D.O) des souches par spectrophotométrie sont résumés dans le tableau N° 08.

Tableau N°08: Mesure de densité optique (D.O) des souches des espèces de *Lactobacillus*.

| souches | D.O (660nm) |
|--|-------------|
| <i>L. acidophilus</i> (S8) | 2.601 |
| <i>L. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S9) | 2.206 |
| <i>L.gasseri</i> (S10) | 2.308 |
| <i>L.kefir</i> (S13) | 1.848 |
| <i>L.delbrueckii.ssp. bulgaricus</i> (S16) | 2.329 |
| <i>L. gasseri</i> (S19) | 2.103 |
| <i>L. viridescens</i> (S20) | 2.124 |
| <i>L. viridescens</i> (S22) | 2.103 |

Selon la littérature, chaque espèce de *Lactobacillus* a une DO spécifique. Nos résultats montrent par exemple que les espèces *L. kefir* et *L. acidophilus* ont des DO différentes de 1.848 et 2.601 respectivement.

V.2.5.2. Croissance sur milieu acide

Les résultats de l'étude de la résistance de l'acidité des espèces des *Lactobacillus* étudiées sont résumés dans le tableau N° 9.

Tableau N°9: résultat de l'étude de la résistance à l'acidité des espèces de *Lactobacillus* étudiées.

| Souche \ pH | pH 3 | pH 4 |
|---|------|------|
| <i>L.acidophilus</i> (S8) | + | + |
| <i>L.delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S9) | + | + |
| <i>L. gasseri</i> (S10) | + | + |
| <i>L. kefir</i> (S13) | + | + |
| <i>L.delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S16) | + | + |
| <i>L. gasseri</i> (S19) | + | + |
| <i>L.viridescens</i> (S20) | + | + |
| <i>L. viridescens</i> (S22) | + | + |

D'après nos résultats toutes les souches ont la capacité de se développer à des pH bas et en conséquence résistent ultérieurement aux conditions d'acidité de l'estomac.

V.2.5.3. Croissance en présence de la bile

Les résultats de l'étude de la croissance en présence de la bile humaine sont reportés dans le tableau N° 10 et 11.

Tableau N°10: mesures de la densité optique (D.O) des espèces de *Lactobacillus* en présence et en absence de la bile à 3% après 04h d'incubation.

| Souches | D.O à 660nm Sans la bile | D.O à 660nm Avec la bile |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>L. acidophilus</i> (S8) | 2,085 | 1,160 |
| <i>L. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S9) | 2,093 | 0,876 |
| <i>L. gasseri</i> (S10) | 2.093 | 0,321 |
| <i>L. kefir</i> (S13) | 2.005 | 0,2716 |
| <i>L. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S16) | 1.708 | 0,665 |
| <i>L. gasseri</i> (S19) | 1.775 | 0,354 |
| <i>L. viridescens</i> (S20) | 1.920 | 0,654 |
| <i>L. viridescens</i> (S22) | 1.945 | 0,940 |

D'après nos résultats il y'a une nette diminution des cellules bactériennes en présence de la bile.

Tableau N11: Dénombrement des espèces de *Lactobacillus* en présence et en absence de la bile à 3% après 04h d'incubation.

| dénombrement souches | Sans la bile (10^8) | Avec la bile (10^8) |
|--|-------------------------|-------------------------|
| <i>L. acidophilus</i> (S8) | 820 | 716 |
| <i>L. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S9) | 376 | 348 |
| <i>L. gasseri</i> (S10) | 384 | 264 |
| <i>L. kefir</i> (S13) | 1840 | 668 |
| <i>L. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S16) | 456 | 152 |
| <i>L. gasseri</i> (S19) | 380 | 240 |
| <i>L. viridescens</i> (S20) | 924 | 560 |
| <i>L. viridescens</i> (S22) | 416 | 172 |

Selon la littérature, il y'a une diminution de nombre de colonies en présence de la bile.

Les souches 8, 9, 10 et 19 montrent une bonne résistance à la bile. la résistance à l'acidité de l'estomac et à la bile constitue un des critères de choix des probiotiques (Guiraud, 2003).

Les figures (09) et (10) montrent: la mesure de la densité optique et le dénombrement des *Lactobacillus* en présence et en absence de la bile.

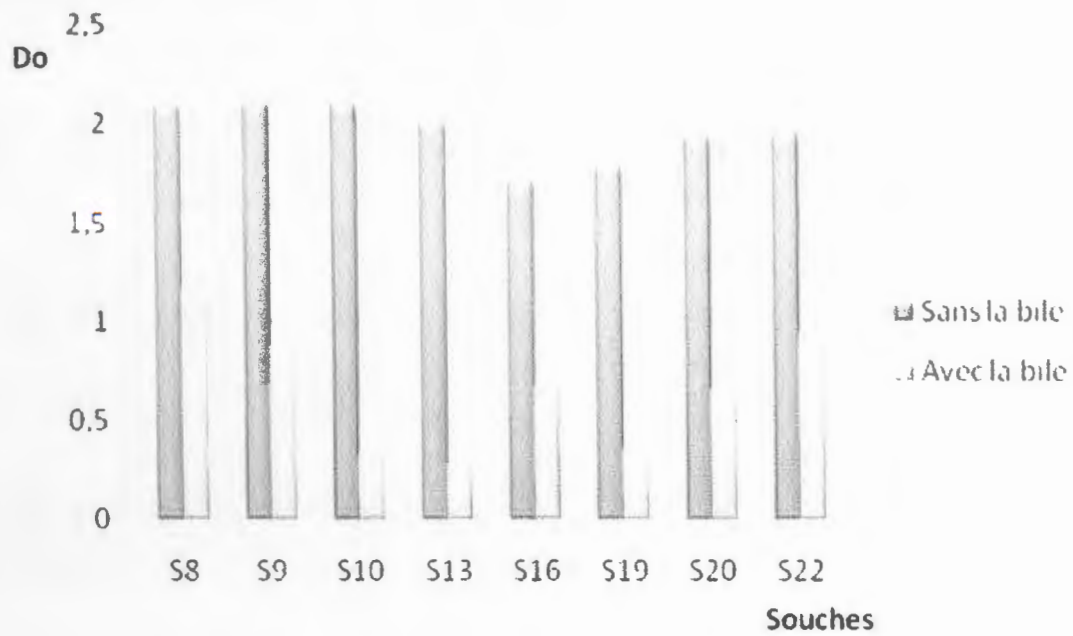


Figure (09) : Mesure de la densité optique en présence et en absence de la bile.

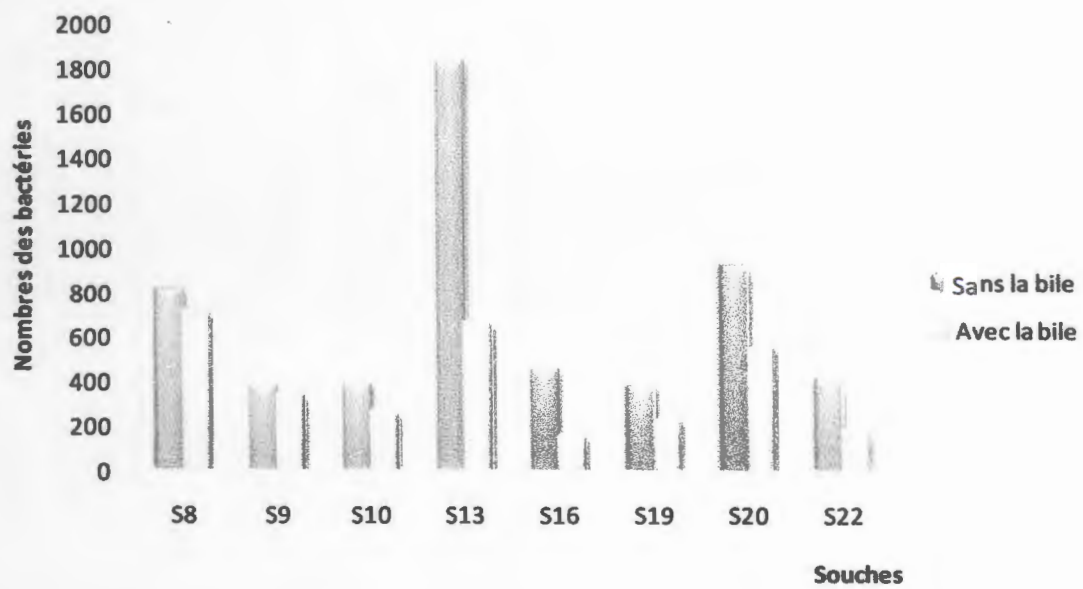


Figure (10) : Dénombrement des *Lactobacillus* en présence et en absence de la bile.

V.2.5.4. Adhésion des bactéries aux cellules épithéliales

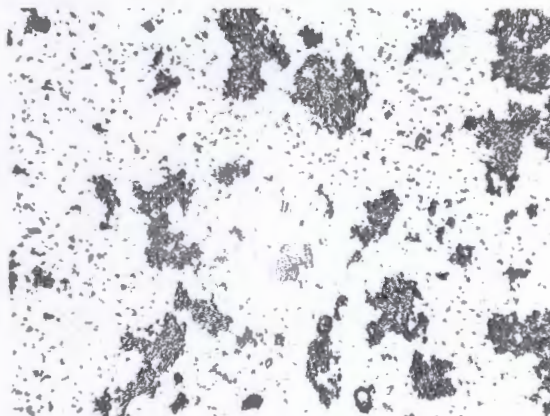
Les résultats de l'étude de test de l'adhésion des espèces de *Lactobacillus* étudiées aux cellules épithéliales du l'iléum du rat sont résumés dans le tableau N°12.

Tableau N°12 : Adhésion des espèces de *Lactobacillus* aux cellules épithéliales du l'iléum du rat.

| Souches | Adhésion > 15 cellules adhérees |
|--|---------------------------------|
| <i>L. acidophilus</i> (S8) | + |
| <i>L. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S9) | + |
| <i>L. gasseri</i> (S10) | + |
| <i>L. kefir</i> (S13) | + |
| <i>L. delbrueckii.ssp.bulgaricus</i> (S16) | + |
| <i>L. gasseri</i> (S19) | + |
| <i>L. viridescens</i> (S20) | + |
| <i>L. viridescens</i> (S22) | + |

+ : test positif.

Nos résultats montrent que toutes les espèces de *Lactobacillus* étudiées présentent des bons niveaux d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales de rat. La figure (11) montre l'adhésion des *Lactobacillus* sur les cellules épithéliales du l'iléum du rat.



Figure(11) : Adhésion des *Lactobacillus* sur les cellules épithéliales du l'iléum du rat.

L'adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus de l'hôte épithéliales constitue un des critères fonctionnels de choix des probiotiques (FAO, WHO., 2002).

V.2.5.5. Résistance aux antibiotiques

Les résultats de l'étude de la résistance des espèces de *Lactobacillus* aux antibiotiques sont résumés dans le tableau N° 13.

Tableau N°13: Test de résistance des espèces de *Lactobacillus* aux antibiotiques.

| Antibiotique Souches | Streptomycine | Pénicilline | Oxacilline | Sulfamide | Ampicilline | Tétracycline |
|-------------------------|---------------|-------------|------------|-----------|-------------|--------------|
| S8 | R | S | R | S | R | S |
| S9 | R | S | R | R | R | S |
| S10 | R | S | R | S | R | S |
| S13 | R | S | R | R | S | S |
| S16 | R | S | R | R | R | S |
| S19 | R | S | R | S | R | S |
| S20 | R | S | R | R | R | S |
| S22 | R | S | R | R | R | R |

S: sensible.

R: résistante.

D'après nos résultats toutes les souches sont sensibles aux Pénicilline et résistant aux Streptomycine et l'Oxacilline.

Les souches 9, 13 et 20 sont résistantes à la Streptomycine, l'Oxacilline et aux Sulfamides par contre la souche 22 montre une résistance en plus aux tétracyclines.

Selon la littérature, les souches de *Lactobacillus* probiotiques sensibles aux antibiotiques sont utilisées dans les cas d'intolérance au lactose par contre les souches résistantes

sont utilisées dans les cas d'infections nécessitant une antibiothérapie (Larpent et Gourgau, 1997).

Donc La souche 22 présente un profil intéressant dans le traitement des maladies infectieuses et les autres souches dans le cas de l'intolérance au lactose.

V.2.5.6. Activité antibactérienne

Les résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne des espèces de *Lactobacillus* vis-à-vis des bactéries tests sont résumés dans le tableau N°14.

Tableau N°14: Résultats des interactions entre les espèces de *Lactobacillus* étudiées et les bactéries tests.

| Bactéries Tests Espèces <i>Lactobacillus</i> | <i>E. coli</i> | <i>Salmonella</i> | <i>klebsiella</i> | <i>S.aureus</i> |
|--|----------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| <i>L. acidophilus</i> (S8) | 8mm | 8mm | 8mm | 11mm |
| <i>L. delbrueckii. ssp. bulgaricus</i> (S9) | 10mm | 10mm | 10mm | 0mm |
| <i>L.gasseri</i> (S10) | 11mm | 11mm | 8mm | 7mm |
| <i>L.kefir</i> (S13) | 12mm | 10mm | 9mm | 8mm |
| <i>L.delbrueckii. ssp. bulgaricus</i> (S16) | 9mm | 9mm | 9mm | 7mm |
| <i>L.gasseri</i> (S19) | 10mm | 10mm | 7mm | In |
| <i>L.viridescens</i> (S20) | 11mm | 9mm | 8mm | 8mm |
| <i>L.viridescens</i> (S22) | 11mm | 9mm | 9mm | 6mm |

In: indéterminé

Nos résultats montrent que les souches de *Lactobacillus* étudiées ont des activités, antibactériennes vis-à-vis des germes tests, très proches sauf la souche (09).

Selon la littérature, les *Lactobacillus* probiotiques exercent une activité antimicrobienne contre les germes indésirables ou pathogènes via leurs métabolites (Lin et al., 2007).

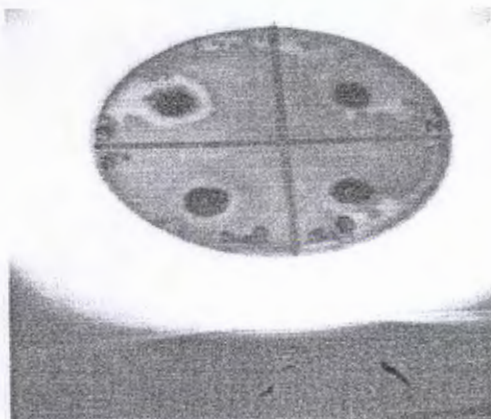


Figure (12): Activité antibactérienne des souches de *Lactobacillus* vis-à-vis de *Salmonella*.

V.2.5.7. Activité inhibitrice du surnageant :

Les résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne du surnageant natif et neutre des espèces de *Lactobacillus* vis-à-vis des bactéries tests sont résumés dans le tableau N°15.

Tableau N°15: Les résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne du surnageant natif et neutre des espèces de *Lactobacillus* vis-à-vis des bactéries tests.

| Souches | Activité antimicrobienne (zone d'inhibition mm) | | | | | |
|---------|---|-----|-----|--|-----|-----|
| | Surnageant natif | | | Surnageant neutre (neutralisé par le NaOH 3N) | | |
| | E.c | Sal | Sta | E.c | Sal | Sta |
| S8 | 20 | 14 | 14 | 50 | 23 | 10 |
| S9 | 31 | 23 | 16 | 35 | 30 | 20 |
| S10 | 36 | 20 | In | 24 | 15 | 12 |
| S13 | 45 | 12 | In | 30 | 15 | In |
| S16 | 30 | 18 | 10 | 20 | 12 | 16 |
| S19 | 34 | 22 | 15 | 25 | 20 | In |
| S20 | 31 | 19 | In | 40 | 16 | 15 |
| S22 | 20 | 26 | 14 | 42 | 11 | 12 |

E.c : *Escherichia coli*,

Sal : *Salmonella*,

Sta : *Staphylococcus aureus*.

In : indéterminé.

On a éliminé les résultats de *Klebsiella* parce qu'il n'y a pas de croissance de cette bactérie.

Les résultats illustrés dans le tableau montrent que, tous les surnageants natifs exercent une activité antimicrobienne contre *Salmonella* et *Escherichia coli* et *S. aureus*. Ceci confirme que l'activité antimicrobienne des *Lactobacillus* est due à l'action de leurs métabolites.

Les surnageants neutres montrent également une activité antibactérienne envers les espèces tests exception faite pour la souche 13 et 19 contre *S. aureus*, ceci explique que l'activité inhibitrice du surnageant natif de la souche 19 vis-à-vis de *S. aureus* est due à l'acide lactique.

Les souches 9, 16, et 20 montrent des profils d'inhibition intéressants contre *S. aureus*. On suppose que ce résultat est due à l'action des bactériocines car ces dernières agissent sur les bactéries Gram positives et non sur les Gram négatives (Leveau et al., 1991).



Conclusion

Conclusion

Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'isolement, l'identification et la caractérisation des souches locales de *Lactobacillus* probiotiques isolées à partir des selles d'enfants.

L'identification des souches selon leur profil biochimique et physiologique a conduit aux espèces suivantes : *L. acidophilus*, *L. delbrueckii.ssp.bulgaricus*, *L. gasseri*, *L. viridescens*, *L.kefir* avec une répartition pour les souches d'origines humaines comme suit : *L. acidophilus* (20%), *L. delbrueckii.ssp.bulgaricus* (40%) et *L. gasseri* (40%).

L'évaluation des aptitudes probiotiques a conduit à une sélection de souches intéressantes via l'ensemble des critères. Toutes les souches ont la capacité de se développer à des pH bas en conséquence résistent ultérieurement aux conditions d'acidité de l'estomac. Elles présentent également, un bon niveau d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales et une résistance à la bile surtout les souches 8, 9, 10 et 19

Les souches 9, 16 présentent un profil de résistance aux antibiotiques qui peuvent être intéressants dans les traitements de maladies infectieuses et les autres souches dans le cas de l'intolérance au lactose.

Les souches 9 et 16 montrent des profils d'inhibition intéressants contre *S. aureus*. On suppose que ceci est due à l'action des bactériocines car ces dernières agissent sur les bactéries Gram positives et non sur les Gram négatives (Sutra et al., 1998).

A la fin, il apparaît que la souche 9 montre un profil intéressant via tous les critères de probiotiques étudiés.

Pour conclure, notre travail nous a permis de :

- contribuer à l'isolement des souches locales de *Lactobacillus* d'origine humaine.
- parfaire nous connaissance sur le sujet de probiotiques qui reste mal voir totalement inconnu dans notre pays malgré les effets bénéfiques qui leurs sont attribués.



Références Bibliographiques

REFFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abee T, 1995. Pore forming bacteriocins of Gram⁺ bacteria and self protection mechanism of producing organisms. *FEMS Microbiol. Lett*, *129*, 1-9.

Abrahamsson T.R, 2007. Probiotics in prevention of IgE-associated eczema : a double blind, randomized, placebo, controlled trial, journal off allergy and clinical immunology, vol, *119(5)* ; 1174-1180. Cité dans www.biok.com/fr/probiotiques.php.

Albert M.J, Bhat P, Rajan D, Maiyap p, Pereira S. M, Baker S.J., 1978. Faecal flora of South indian infants and young children in health and with acute gastroentéritis, *JM ed Microbiol* : *11* :137-43.

Anonyme ,2007. Les probiotiques, de nombreux effets préventifs et curatifs.

Arvola T, Laiho K, Torkkeli S., 1999. Prophylactis lactobacillus GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infection. A rondomized study. *Pediatrics* *104* : 64.

Barbut F, 2002. Managing antibiotic associated diarrhea. Editorials. *BMJ*, *324* : 1345-1346.

Beagerie L, Barbut F, Delas N., 1998.Caractérisation des colites aigués de l'adulte immunocompétent : résultats préliminaire d'une série prospective multicentrique de 93 cas, *Gastroenterol Ctin Biol* ,*22* :A15.

Bjorkroth KJ, and Korkeala H.J., 1996. Manuel de bactériologie alimentaire, *J. food Prot*, *59* : 398-401.

Blumenthal M, Goldberg A, BrinckmannJ, 2000. Exanted commission monographs, American Botanical Coucil, publie en colleboration avec Integrative Medicine Communications. Etats-unis, 243-250.

Bourgeois CM et Larpent J, 1996. Bactéries lactiques in « *Microbiologie des aliments fermentés et fermentation alimentaire* », tome 2, Tec et Doc Lavoisier, paris, 4-29.

Callon C, 1997. Les levures in : « *Microbiologie alimentaire techniques de laboratoire* ». Ed Tec et Doc Lavoisier, Paris p : 465-473.

Chopin A et Langella P, 1982. Les bactéries lactiques « *Manuel de bactériologie alimentaire* », *Lait*, *62*, 705-719.

- Daniel L, 1993.** Manuel de bacteriologie alimentaire. *Appl, Microbiol. Biotechnol*, **38**, 638-641.
- De Roos NM, Katan MB, 2000.** Effets of bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis : a review of papers published between 1998. *Am J clin Nutr*, Feb ; **71(2)** : 11-405.
- Dierksen P, Inglis M and Tagg R., 2000.** High pharyngeal carriage rates of *Streptococcus pyogenes* in Dunedin school children with a low incidence of rheumatic fever. *New Zealand Medical journal*, **113** : 496-499.
- Dikes G.A ,1994.** Manuel de bactériologie alimentaire *Appl. Bacteriol*, **76** : 246-252.
- FAO/WHO working group, 2002,** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Frp: // frp foo, org/es/esn/food wgreport 2 : pdf.
- Freter R ,1992.** Factors influencing the microbiology of the gut, in : Fuller R.ed. *Probiotics : the scientific basis*. London : Chapman & Hall, : 11-45.
- Fuller R, 1989.** Probiotics in man and animals, *J Appl Bacteriol*, **66** : 365-378.
- Garriga M, Pascual M, Monfort J.M et Hugas M., 1998.** Selection of *Lactobacillus* for chicken probiotic adjuncts. *J. Appl. Microbiol*, **84** : 125-132.
- Gill H.S, Doull F, Rutherford, Cross M.L., 2001.** Immunoregulatory peptides in bovine milk. *BrJ Nutr* ; **84**(Suppl 1) : 111-117.
- Goldin B.R and Gorbach S.L., 1984.** Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics and *Lactobacillus* decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes and glucuronide, *J. Natl. Cancer Institute*, **73** : 689-695.
- Guarner F, Khan A.G, Thamson A., 2008.** Probiotics- the concept In : « *Probiotiques et Prébiotiques* », World Gastroenterology organisation (WGO), Espagne, 3-6.
- Guiraud J.P et Rosec J.P, 2004.** Autre flore In : « *Pratique des normes en microbiologie* », AFNOR, 237-248.
- Guiraud J.P, 1998.** Microorganismes intervenant dans l'industrie alimentaire In : « *Microbiologie alimentaire* » éd DUNOD, Paris, 90-121.
- Guiraud J.P, 2003.** *Microbiologie alimentaire*, éd DUNOD, Paris, 225 : 282-294.
- Gunal Pulusani S. R et al., M, Yayli, G, Kaya, O, Karahan, N, Sulak, O, 2006.** *Int. J. Poulet, sci*, **5**, 149-155.

Hatakka K., et al. 2001. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres : double blind, randomised trial . *BMJ* 322 :327.

Hickson M, D'souza A.L, Muthu N., 2007. Use of probiotique Lactobacillus preparation to prevent diarrhea associated with antibiotic : randomized double blind, placebo controlled trial. *BMJ*, 80 : 335-610.

Holzappel W.H, Habber P, Snel J, Schillinger and Huis in't Veld J.H.J., 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol*, 41(2) : 85-101.

Hugenholt J and Kleerebezem M., 1999. Metabolic engineering of lactic acid bacteria : overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol*, 10(5), 492-497.

Joffin J.N, 2000. Lactobacillus In : « *Systématique bactériologie* », DUNOD, 140-235.

Johansson M.L, Nobek S, Berggren A, Nynan M, Bjorck I, Ahrnes S, Jeppson B, Moling G., 1998. Survival of Lactobacillus plantarum DSM 9843, and effet of the short-chain fatty acid content of feces after injection of rose ,hip drink with fermented oats. *Int J Microbiol*, 42, 29-38.

Kaila M, Isoulauri E, Soppi E, Virtanene E, Laine S, Arvilomi H., 1992. Enhancement of the circulating antibod secreting cell reponse in humain Lactobacillus strain, *Pediatr Res* 32 : 141-144.

Kandler O, Weiss N, Genus Lactobacillus, Beijerinck 1901, 212 In : «*1986 Bergy's manuel of systematic bacteriology*», SNEATH P. H.A and coll. (eds) . *Vol (2), 1-209.*

Klaenhammer T.R, Barangou R, Logan Buck B and Azcarate-Peril M.A., 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol.Rev*, 29, 393-409.

Lac Z, Szabos S, Gippert T, Hullarri T. et Virra GG., 1990. Utilisation de Streptococcus feacium M74 DANS L'alimentation du lapin de chair, *revue culture*, 94.

Larpent J.P, 1996. Les microorganismes des fermentaire in : « *Microbiologie alimentaire* », Tec et Doc, 1-34

Larpent JP et Gourgand, 1997. Les microorganismes procaryotes In : « *Mémento technique de microbiologie* », 3^{ème} éd, Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 466-481.

Leveau J.Y et Bouix M et De Roissart H., 1991. La flore lactique In : « *Techniques d'analyse et de contrôle dans les I.A.A* », 2^{ème} éd Tec et Doc Lavoisier Apria, Paris, *Vol 3, 2-4.*

- Leveau J.Y et Bouix M, 1993.** Les microorganismes industriel In : « *Microbiologie industrielle* ». Éd Tec et Doc Lavoisier, p : 170-189.
- Leyral G, Vierling E., 2001.** Diversité du monde microbien In : « *Microbiologie et toxicologie des aliments, Hygiène et sécurité alimentaire* », 3^{ème} éd, 25-91.
- Lin J and Wilbur , 2007.** Pub Med related articles : A probiotic topic-based model for content similarity, *BCM Bioinformatics*, 8(1):423.
- Link-Amaster H, Rochat F, Saudan K.Y, Mignot O, Aeschlimann J.M., 1994.** Modulation of aspecific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 10 : 55-63.
- Luquet FM et George Corrieu, 2005.** Application des bactéries lactique dans les produits laitiers frais et effet probiotiques ; probiotiques et alicaments In : « *Bactéries lactiques et probiotique* », Ed Tec et Doc, Lavoisier ; p : 48-275.
- Mandell B, Bennett Z, Dolin W., 2005.** Principales and practice of infections diseases, ed. Churchill Livingstone,
- Martean PR, 2002.** Probioties in clinical conditions. *Clin rev immunol*, 22(3) , 73-255.
- Marteau P and Rambaud J.C., 1993.** Potential using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man *FEMS Microbiol. Rev* ; 12 : 207-220.
- Monnet C, 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactique in : « *Bactéries lactiques* », Tec et Doc, Lavoisier, 511-611
- Moreau M.C, Bisetti N, Dubuquoy C., 1998.** Immunomodulating properties of a strain of *Bifidobacterium*, used as probiotic on the fecal and cellular IgA antirotavirus responses mice. *Functional foods. The Royal society of chemistry*, Sadler M and Saltmarch M (ed), 47-54.
- Nigutova K, 2007.** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of its homologues among ruminal Gram⁺ cocci, *J. Appl. Microbiol*, 102(2) : 563-569.
- Nilsen T, Nes I.F and Halo H., 2003.** Enterolysin A, a cell wall degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol*, 69(5), 2975-2984.
- Novel G, 1993.** Les bactéries lactiques In : « *La microbiologie industrielle* ». Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 331-591.

- Papagianni M, 2003.** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties : biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv*, **21(6)**, 465-499.
- Pedone C.A, 1999.** The effect of supplementation with fermented by *Lactobacillus casei* on acute diarrhea in children attending day care centres, *IJCP*, **53** : 179-184.
- Penner R, Fedorak RN, Madsen KL., 2005.** Probiotics and nutraceuticals. *Curr Opin Pharmacol*, **5(6)** : 596-603.
- Peran L, 2001.** A comparative study of the preventive effects exerted by three probiotics *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* in the TNBS model of rat colitis.
- Pilet M.F, Magras C et Guiraud J.P., 1998.** Bactéries lactiques In : « *Manuel de bactériologie alimentaire* », éd Lavoisier Tec et Doc, Paris, 235-258.
- Prescott S.L and Björkstén ; 2007.** Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *Journal of allergy and clinical Immunology* **120** : 255-262.
- Pulusan S.R., 1983.** Whole body, liver and plasma cholesterol levels in rats fed with *Lactobacillus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* milks, *J. Food*, **48** : 220-281.
- Quillen G, 2001.** Les probiotiques, Rennes. Intra. France, 4-12.
- Salminen S, Bouley M.C, Boutron- Ruant J.H, Cummings A, Frank G.R, Gibson E, Isolauri M.C, Moreau M, Roberfroid and Rowland I., 1998a.** Functional food science and gastrointestinal physiology and function, *Brit.J. Nutr.* **88(Suppl 2)** : 147-171.
- Salminen S, Ouwehand A.C and Isolauri., 1998b.** Clinical applications of probiotic bacteria, *Int. Dairy J*, **8** : 563-572.
- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G et al., 2003.** Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, **52** : 237-42.
- Sharpe M.E, 1979.** Identification of the lactic acid bacteria In : « *F/A/Skinner and DW Lovelock (editors), identification methods for microbiologists* ». Academic press, London : 233-259.
- Stiles J, Stern C, Trauner D, et al., 1997.** Developmental change in spatial grouping activity among children with early focal brain injury: evidence from a modeling task. *Brain Cogn*, **31(1)**: 46-62

Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al., 1999. Direct analysis of genes encoding 16S_rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*, **65** :4799-807.

Sutra L, Federighi C et Jouve J.L, 1998. Bactéries lactiques In : « *Manuel de bactériologie alimentaire* », éd polytechnica, Paris, 235-241.

Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz J.Z, Armanski M, Mikotajczyk W., 2001. Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *Journal of pediatrics*, **138** : 361-365.

Vanderhoof J.A, Whitney D.B, Antonson D.L, Hanner T.L, Lupo J.V, Young R.J., 1999. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic associated diarrhea in children, *J Pediatr* **135** : 564-568.

Vogel R.F, 1996. Manuel de bactériologie alimentaire, *Adv Food sci*, **18** : 152-159.

Whitman W.B. 2009: Bergey's Manual of systematic bacteriology, seconde édition, vol. 3 (The firmicutes), Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, pp.465-511.

Wilson KH, 1991. The gastrointestinal microflora. In : Yamada T.ed. Textbook of gastroenterology. Philadelphia : JB Lippincott, **26** :532-43

Ying H et Sheih N., 2001. Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium Lactobacillus rhamnosus HN001, *Journal of the American college of nutrition*, **vol 20(2)** : 149-156.

Yoon H, 1999. New insights in the validation of systematic biomarkers of the immunoregulatory properties of milk fermented with yogurt culture and Lactobacillus casei (Actimel) : a prospective trial, *Int.J. Immunotherapy*, **XV**, 79-89.

Sites web:

www.biok.com/fr/probiotiques.php.

www.univ-rouen.fr/ABISS/L3CAB/Probiotique/index.htm-1k-.



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

1-MRS (bouillon et gélose)

| | |
|---|--------|
| Peptone | 10g |
| Extrait de levure | 4g |
| Extrait de viande | 8g |
| Glucose | 20g |
| Acétate de sodium trihydraté | 5g |
| Citrate d'ammonium | 2g |
| Tween 80 | 1ml |
| Hydrogeno peptide de potassium | 2g |
| Sulfate de manganèse tetrahydrate | 0,05g |
| Sulfate de magnésium heptahydraté | 0,2 g |
| Eau distillé | 1000ml |

pH : 6, 2

Autoclaver 15 min à 120 C°

2-Gélose VRBL

| | |
|--------------------------|--------|
| Peptone | 7g |
| Extrait de levure | 5g |
| Sels biliaires | 1,5g |
| Lactose | 10g |
| Chlorure de sodium | 5g |
| Agar | 11g |
| Rouge neutre | 0,03g |
| Cristal violet | 0,002g |

pH : 7, 4

Autoclaver à 110 C°

ANNEXE III

Milieux d'identification

1- Milieu MEVAG sans sucre

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

PH : 7

Autoclaver 20 min à 120 C°

2- Milieu Gibson Abd Elmalek

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

PH : 7

Stérilisation par tyndallisation 3 fois 30 min à 100 C°

3- Milieu ADH

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

pH : 6,4

Stérilisation 15 min à 120 C°

Gélose Hektoen

| | |
|-------------------------------|------|
| Proteose- peptone | 12g |
| Chlorure de sodium | 5g |
| Extrait de levure | 3g |
| Sels biliaires | 9g |
| Citrate fer ammoniacale | 1,5g |
| Salicine | 12g |
| Saccharose | 12g |
| Fushine acide | 0,1g |
| Bleu de bromothymol | 65mg |

PH : 7

Annexe IV

Tableau 01: les résultats de l'antibiogramme.

| ATB Souches | Streptomycine | Pénicilline | Oxacilline | Sulfamides | Ampicilline | Tetracycline |
|----------------|---------------|-------------|------------|------------|-------------|--------------|
| S8 | 7 | 14 | 10 | 12 | 10 | 20 |
| S9 | 8 | 15 | 9 | 7 | 10 | 8 |
| S10 | 10 | 26 | 16 | 8 | 7 | 18 |
| S13 | 7 | 15 | 0 | 10 | 9 | 20 |
| S16 | 0 | 19 | 0 | 11 | 0 | 15 |
| S19 | 8 | 20 | 10 | 16 | 8 | 22 |
| S20 | 6 | 20 | 12 | 17 | 10 | 18 |
| S22 | 0 | 25 | 10 | 10 | 11 | 15 |



| | |
|---|---|
| Réalisé par: ♦ Bouzidi Besma ♦ Boudari Zineb | Date de soutenance: juillet 2010 |
| | Dirigé par : M ^{me} Bousdira Fathia |

Thème : Isolement et identification des *Lactobacillus* probiotiques à partir des selles d'enfants

Nature de diplôme : Diplôme des Etudes Supérieures en Biologie (DES)
Option : Microbiologie

Résumé

Notre étude s'est portée sur l'isolement et l'identification des souches locales de *Lactobacillus* à caractères probiotiques isolées à partir des selles d'enfant 08 souches de *Lactobacillus* ont été isolées dont 06 étaient d'origine humaine. L'identification, par les tests biochimiques et physiologiques, a conduit aux espèces suivantes :

L. acidophilus (20%), *L. delbrueckii.ssp.bulgaricus* (40%) et *L. gasseri* (40%).

L'étude des caractères probiotiques montre que la souche 9 appartenant à l'espèce

L. delbrueckii.ssp.bulgaricus présente le profil probiotique le plus intéressant

Mots clés : *Lactobacillus*, Probiotiques. Selles d'enfants.

Abstract

Our study focused on isolation and identification of local strains of probiotics *Lactobacillus* characters isolated from the children feces: 08 strains of *Lactobacillus* were isolated among which 06 were of human origin. The Identification by biochemical and physiological tests, led to the following species:

L. acidophilus (20%), *L. delbrueckii.ssp.bulgaricus* (40%) and *L. gasseri* (40%).

The study of probiotic skills shows that strain (9) belonging to the species

L. delbrueckii.ssp.bulgaricus has the most interesting probiotic profile.

Keywords: *Lactobacillus*, Probiotics, Children feces.

المخلص

ترتكز دراستنا على عزل وتحديد سلالات *Lactobacillus* البروبيوتكية المعزولة محليا من براز الأطفال. لقد تم عزل 8 سلالات من بينها 6 ذات مصدر بشري اعتمادا على الخصائص البيوكيميائية و الفيزيولوجية تم تحديد الأنواع حسب النسب التالية:

L. acidophilus 20%, *L. delbrueckii.ssp.bulgaricus* 40%, *L. gasseri* 40%

الخصائص البروبيوتكية أظهرت أن السلالة 9 المنتمية للنوع *L. delbrueckii.ssp.bulgaricus* تمتلك أهم نمط بروبيوتكي.

كلمات البحث: لكتوباسيلوس, بروبيوتيك, براز الأطفال.