

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

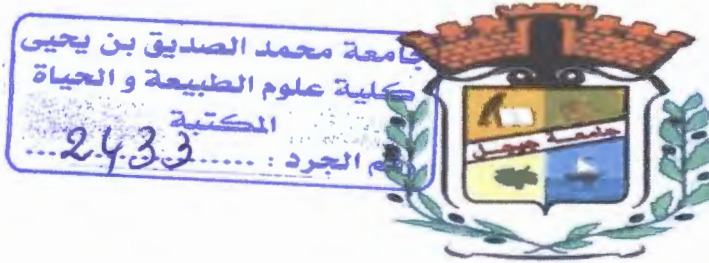
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى – جيجل-

Université Mohammed Seddik Ben Yahia – Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Microbiologie Appliquée et
Sciences alimentaires

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و علوم التغذية



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Etude de l'effet matrices alimentaires huileuses et grasses sur les propriétés probiotiques et le coefficient de corrélation entre l'auto-agrégation, l'adhésion et l'hydrophobicité de deux souches de *Lactobacillus*

Membres du Jury

Présidente : D^r. OULED HADDAR Houria

Examineur : M^r. DAIRI Sofiane

Encadreur : D^r. IDOUI Tayeb

Présenté par :

LEHTIHET Rahima

HAMLIL Rofia

Année Universitaire 2015-2016

Numéro d'ordre (bibliothèque)

Remerciements

*Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné
Le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous
Avoir éclairé le chemin de la réussite.*

Nous remercions nos très chers parents pour leurs soutiens et leurs patiences.

*Nous remercions notre honorable encadreur Dr : Idoui Tayab
Pour son suivi et ses conseils durant l'évolution de ce travail.*

*Nous tenons aussi à remercier les membres de jury qui ont accepté
de juger notre travail de mémoire de fin d'étude.*

*Nous tenons aussi à remercier M^{re}. Kfianoufe pour ses conseils scientifiques
Judicieux et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail.*

Nos remerciements vont également :

- A tous nos enseignants qui ont contribué à notre formation.

*tous les étudiantes de notre option master microbiologie appliquée
Et tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement
De ce mémoire.*

- A vous tous, un grande merci.



Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

I. Synthèse Bibliographique

Les probiotiques dans les produits alimentaires

I.1. Les probiotiques.....	1
I.1.1. Définition des probiotiques.....	1
I.1.2. Les microorganismes à potentiel probiotique.....	1
I.1.2.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	2
I.1.3. Critères de sélection des souches probiotiques	3
I.2. Les probiotiques dans les matrices alimentaires.....	4
I.2.1. Application des probiotiques en alimentation.....	4
I.2.2. Survie et stabilité des probiotiques dans différentes matrices alimentaires.....	4
I.2.3. Aliments probiotiques à base de lait	4
I.2.3.1. Lait frais potable et laits fermentés.....	5
I.2.3.2. Le yaourt	5
I.2.3.3. Le fromage.....	5
I.2.4. Autres produits alimentaires à base de lait	6
I.2.4.1. Le kéfir	6
I.2.4.2. La choucroute	6
I.2.4.3. Smen.....	6
I.2.5. Aliments probiotiques à base de légumes	6
I.2.5.1. Jus de carotte et de tomate	7
I.2.5.2. Jus de choux et de betterave et lait de soja	7
I.2.5.3. Les cornichons, concombres	7

I.2.6. Aliments probiotiques à base de fruit.....	7
I.2.7. Aliments à base de viandes	7
II. Matériel et Méthodes	
II.1. Matériel.....	8
II.1.1. Les souches bactériennes	8
II.1.2. Les matrices alimentaires utilisées.....	8
II.1.3. Les cellules épithéliales intestinales.....	8
II.1.4. Les milieux de cultures et tampons	8
II.1.5. Produits chimiques et réactifs	8
II.1.6. Appareillages	9
II.2. Méthodes.....	9
II.2.1. Revivification des souches et vérification de leur pureté	9
II.2.2. Recherche de l'activité lipolytique <i>in vitro</i>	9
II.2.2.1. Recherche de l'activité lipolytique sur gélose blanche	9
II.2.2.2. Recherche de l'activité lipolytique sur gélose MRS.....	10
II.2.2.3. Recherche de l'activité lipolytique sur matrice alimentaire.....	10
II.2.3. Influence des matrices grasseuses sur la croissance et la viabilité	11
II.2.4. Evaluation de l'effet matrice alimentaire et conservation sur les trois aptitudes probiotiques	11
II.2.4.1. Test d'hydrophobicité.....	11
II.2.4.2. Test d'auto-agrégation et de co-agrégation.....	12
II.2.4.3. Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial	12
II.2.5. Analyse statistique.....	12
III. Résultats et discussions	
III.1. Recherche de l'activité lipolytique <i>in vitro</i>	13
III.1.1. Activité lipolytique des cultures	13
III.1.2. Activité lipolytique des surnageants (exolipases et endolipases).....	15

Numéro	Titre	Page
<i>Tableau 1</i>	Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques	2
<i>Tableau 2</i>	Diamètres des zones de lipolyse sur gélose blanche (cm).	13
<i>Tableau 3</i>	Diamètres des zones de lipolyse sur gélose MRS (cm).	13
<i>Tableau 4</i>	Diamètres des zones de lipolyse des exolipases sur gélose blanche (cm).	15
<i>Tableau 5</i>	Diamètres des zones de lipolyse des exolipases sur gélose MRS (cm).	15
<i>Tableau 6</i>	Diamètres des zones de lipolyse des endolipases sur gélose blanche (cm).	17
<i>Tableau 7</i>	Diamètres des zones de lipolyse des endolipases sur gélose MRS (cm).	18
<i>Tableau 8</i>	Indice d'acidité de beurre témoin et ensemencée	19
<i>Tableau 9</i>	Résultats du dénombrement à temps zéro heure (UFC/ 100µl)	20
<i>Tableau 10</i>	Résultats du dénombrement après 4h d'incubation (UFC/ 100µl)	20
<i>Tableau 11</i>	Résultats du dénombrement après 3jours d'incubation (UFC/ 100µl)	21

Numéro	Titre	page
Figure 01	Aspect microscopique du genre <i>Lactobacillus</i>	3
Figure 02	Activité lipolytique sur gélose blanche à 3% de beurre	1 6
Figure 03	Activité lipolytique des surnagants de cultures sur gélose blanche à 3% de beurre	18
Figure 04	Pourcentage d'hydrophobicité de <i>L. rhamnosus</i> S10 et <i>L. satsumensis</i> S13 et la mixture témoins et ré-isolé de beurre	23
Figure 05	Effet du couple matrice alimentaire-froid sur le pourcentage d'hydrophobicité des cultures ré-isolé de beurre par rapport au témoin (T)	25
Figure 06	Pourcentage d'auto-agrégation de <i>L. rhamnosus</i> S10 et <i>L. satsumensis</i> S13 et de Co-agrégation de la mixture (Témoins)	26
Figure 07	Pourcentage d'auto-agrégation et de Co-agrégation des mêmes cultures ré-isolées du beurre	26
Figure 08	Effet du couple « matrice alimentaire –froid » sur le pourcentage d'auto-agrégation de <i>L. rhamnosus</i> S10 et <i>L. satsumensis</i> S13 et la co-agrégation de la mixture	27
Figure 09	Adhésion de <i>L. rhamnosus</i> S 10 et <i>L. satsumensis</i> S 13 et leur mixture aux muqueuse intestinale du poulet	28
Figure 10	photomicrographie d'adhésion des souches aux cellules épithéliales après 30 minutes	28
Figure 11	Photomicrographie d'adhésion des souches aux cellules épithéliales après 3 heures	29
Figure 12	Photomicrographie d'adhésion des souches aux cellules épithéliales après 3h des souches témoins	30
Figure 13	Photomicrographie d'adhésion des souches aux cellules épithéliales après 3h des souches ré-isolées de beurre	30
Figure 14	Effet du couple « matrice alimentaire- froid » sur l'adhésion des cultures	31
Figure 15	Photomicrographie d'adhésion des souches <i>L. rhamnosus</i> S10 et <i>L. satsumensis</i> S13 et la mixture aux cellules épithéliales « effet matrice alimentaire-froid » après 30mn d'incubation	31
Figure 16	Photomicrographie d'adhésion des souches <i>L. rhamnosus</i> S10 et <i>L. satsumensis</i> S13 et la mixture aux cellules épithéliales « effet matrice alimentaire-froid » après 3h d'incubation	31
Figure 17	Corrélation entre la capacité d'auto-agrégation et l'hydrophobicité de surface de <i>L. satsumensis</i> S13 et <i>L. rhamnosus</i> S10	32
Figure 18	Corrélation entre capacité d'auto- Agrégation et l'adhésion de <i>L. satsumensis</i> S13 et <i>L. rhamnosus</i> S10	33

Figure 19	Corrélation entre l'hydrophobicité de surface et l'adhésion de <i>L. satsumensis</i> S13 et <i>L. rhamnosus</i> S10	33
Figure 20	Corrélation entre l'hydrophobicité de surface et l'auto-agrégation de <i>L. satsumensis</i> S 13 et <i>L. rhamnosus</i> S 10 ré- isolé de beurre,	33
Figure 21	Corrélation entre l'hydrophobicité de surface et l'auto-agrégation de <i>L. satsumensis</i> S 13 et <i>L. rhamnosus</i> S 10 (Témoins)	33
Figure 22	Corrélation entre la capacité d'auto-agrégation et l'adhésion et entre l'hydrophobicité et l'adhérence de <i>L. satsumensis</i> S13 et <i>L. rhamnosus</i> S10 ré-isolé de beurre.	34
Figure 23	Corrélation entre la capacité d'auto-agrégation et l'adhésion et entre l'hydrophobicité et l'adhérence de <i>L. satsumensis</i> S13 et <i>L. rhamnosus</i> S10 (Témoins)	34

FAO : Organisation des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture

OMS : Organisation Mondiale pour la Santé

pH : Potentielle d'Hydrogène

°C : Degré Celsius

Min : Minute

MRS : Man, Rogosa et Sharpe

T : Temps

UFC/μl : Unité Formant Colonie par Microlitre

J : Jour

H : Heure

N : Normalité

PBS : Phosphate Buffer Saline

Rpm : Rotation par minute

L. : *Lactobacillus*

B. : *Bifidobacterium*

DO : Densité optique

Introduction

De la naissance à leur mort, les animaux ainsi que l'homme vivent en équilibre avec une flore microbienne extrêmement dense et variée qu'ils abritent, pour l'essentiel, dans la cavité de leur tube digestif. La flore microbienne est estimée numériquement 10 fois supérieure au nombre de cellules de l'organisme. Chaque individu possède une microflore intestinale unique. Avec l'âge, la complexité de la flore augmente. Cette microflore est en interrelation permanente avec les aliments et l'organisme humain qui l'héberge. L'ensemble forme un écosystème complexe. Toute modification d'un de ses constituants est susceptible de perturber l'équilibre et le fonctionnement de l'ensemble (**Crow et al., 1994**).

Plusieurs souches de bactéries lactiques sont utilisées comme des probiotiques, qui confèrent des effets bénéfiques sur la santé humaine. La sélection de ce type de souches est basée sur des critères, parmi, leur capacité à adhérer aux parois intestinales ce qui exclut la concurrence des agents pathogènes, leur aptitude à l'auto-agrégation et la co-agrégation, ce qui permet de former une barrière qui empêche la colonisation par des pathogènes (**Fuller, 1989 ; Lee et al., 1999**).

Dans certains écosystèmes alimentaires, les bactéries lactiques probiotiques constituent la microflore dominante. Ces organismes sont capables de produire des composés antimicrobiens contre la flore concurrente, elles colonisent de nombreux produits alimentaires et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (**Hassan et Frank, 2001; Parada et al., 2007**). Cependant, le choix de la matrice alimentaire qui va véhiculer ces probiotiques ainsi que la méthode de conservation resteront un terrain d'investigation.

Notre présent travail fait suite aux travaux antérieurs, il a pour objectifs d'étudier l'effet des matrices alimentaires huileuses et grasses, ainsi que la conservation sous régime du froid sur les principales propriétés probiotiques des souches isolées du rumen de chèvre.

La présente étude comporte trois parties, la première est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour des nouveautés scientifiques touchant les probiotiques dans les produits alimentaires. La seconde partie du manuscrit présente le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail, enfin, une dernière partie est consacrée aux résultats et discussion. Une conclusion générale permet de récapituler les principaux résultats de ce travail avec une présentation des principales perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche.

***Analyse
bibliographique***

I.1. Les probiotiques

I.1.1. Définition des probiotiques

Le terme probiotique est un mot relativement nouveau qui vient du grec 'pro bios' qui signifie «pour la vie», les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui colonisent le tractus intestinale et qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante fournissent des effets bénéfiques pour la sante de l'hôte (Argyri et al., 2013; Rai et al., 2013; Solieri et al., 2014). Cependant la définition la plus largement acceptée du terme, est celle de la consultation mixte d'experts FAO/OMS (2002) qui redéfinit les probiotiques comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte».

I.1.2. Les microorganismes à potentiel probiotique

Parmi les microorganismes, les bactéries lactiques ont été considérées comme des bactéries à potentiel probiotique. Elles ont été utilisées depuis longtemps de façon consciente ou non pour leurs activités technologiques. Elles ne se réduisent pas à leur importance économique, mais jouent un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé, elles regroupent treize genres bactériens différents principalement, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Les lactobacilles sont généralement utilisés comme probiotiques (Arthur et al., 2002). Les principaux microorganismes utilisés comme probiotiques sont groupés dans le **tableau 01**



Tableau 01 : Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques (Dacosta et Aou, 2001; Holzapfel et al., 2001; Marteau et Seksik, 2005).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Autres
<i>L.acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Sacharomyces cerevisae</i>
<i>L. amylovirus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Sacharomyces boulardii</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>E.coli Nissle</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>L. cellobius</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. farciminis</i>		<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Les bactéries lactiques font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale, colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales, les poissons, les fromages, les charcuteries, les boissons, les produits fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et augmentent la durée de conservation (Dortu et Thonart, 2008; Quinto et al., 2014; Chilton et al., 2015). Parmi les bactéries lactiques, le genre *Lactobacillus* est le plus utilisé comme probiotique.

1.1.2.1. Le genre *Lactobacillus* : C'est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, Gram positif, bacilles longs et fins, souvent groupés en chaînes, immobiles, sporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30°C et 40°C et acidophiles. Il est largement utilisé comme probiotique, notamment ces espèces *Lactobacillus acidophilus* et *L. casei*. Sa croissance est lente et exige des milieux enrichis en facteurs de croissance (Zehntner, 2008).

Les bactéries lactiques sont considérées comme faiblement lipolytiques par comparaison avec d'autres espèces bactériennes (Brennan et al., 2002). De même, la dégradation des lipides par les

lactobacilles est faible dans les produits alimentaires (Mekhtiche, 2003). La figure ci-dessous illustre la forme des lactobacilles sous microscope.



Figure 01 : Aspect microscopique du genre *Lactobacillus* (Zehntner, 2008)

I.1.3. Critères de sélection des souches probiotiques

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Les critères de sélection pour une bactérie utilisée comme probiotique incluent les capacités suivantes (Schrezenmeir et Vrese, 2001; Parvez et al., 2006; Farzanfar, 2006; Anukam et Reid, 2007; Parracho et al., 2007; Sanders et al., 2007; Faranworth, 2008; Venkatesan et al., 2012; Gogineni et al., 2013; Quinto et al., 2014) :

- ✓ Non pathogène avec une absence de toxicité ;
- ✓ Adhésion aux cellules épithéliales intestinales ;
- ✓ Production de substances antimicrobiennes ;
- ✓ Viabilité, stabilité et survie dans les denrées alimentaires ;
- ✓ Résistance à l'acidité gastrique et aux sels biliaires ;
- ✓ Exerce un effet bénéfique sur l'hôte ;
- ✓ Multiplication rapide, soit avec la colonisation permanente ou temporaire du tractus gastro-intestinal;
- ✓ Résistance aux antibiotiques et aux bactériophages.

Il est intéressant que les souches probiotiques puissent adhérer aux cellules de la paroi intestinale, ceci facilite une bonne colonisation du tube digestif (Farzanfar, 2006). De même, l'adhérence des bactéries probiotiques est l'un des principaux critères, les plus importants de sélection, car il est considéré comme une condition préalable pour la colonisation (Kos et al., 2003; Palomares et al., 2007). Par ailleurs, l'agrégation entre microorganismes de même souche (auto-agrégation), ou entre différentes espèces et souches (co-agrégation) et bactéries pathogènes est considérée comme une propriété importante lors du choix d'une bactérie probiotique.

Cependant, l'auto-agrégation est le critère le plus important de sélection des souches probiotiques. Il peut être considéré comme un marqueur pour la capacité d'adhérence et la colonisation au mucus du tractus digestif, ce qui permet aux cellules de former une barrière sur la muqueuse intestinale, empêchant ainsi la fixation des bactéries pathogènes. (Behira, 2012 ; Jankovic et al., 2012; Tulumoglu et al., 2013).

I.2. Les probiotiques dans les matrices alimentaires

I.2.1. Application des probiotiques en alimentation

Les probiotiques sont utilisés dans l'alimentation pour améliorer la qualité nutritionnelle de certains produits, notamment dans les laits fermentés ou yogourts, que ce soit pour l'inhibition de la flore pathogène présente dans le système digestif et sur les aliments ou pour enrichir la flore intestinale si importante pour le processus de la digestion. Ils sont également utilisés pour des procédés tels que la conservation des aliments, la production d'alcool et l'amélioration du goût de certains aliments (Roduit, 2011).

La survie des probiotiques dans les produits alimentaires est affectée par plusieurs facteurs au cours des processus de transformation et de stockage. Les nouvelles technologies, comme la technologie des cellules immobilisées et la microencapsulation, offrent une protection additionnelle à ces organismes dans l'aliment (Kailasapathy, 2002 ; Patterson, 2008).

I.2.2. Survie et stabilité des probiotiques dans différentes matrices alimentaires

La plupart des bactéries probiotiques sont des bactéries lactiques et parmi elles, les lactobacilles qui représente un groupe microbien fondamental. Ils sont capables de survivre dans les matrices alimentaires de nature variée (Coeuret et al., 2004 ; Normand et al., 2006). De nombreuses études ont rapporté que les meilleures matrices pour fournir les probiotiques sont des produits laitiers fermentés, tels que les laits fermentés et les yaourts (Argyri et al., 2013).

I.2.3. Aliments probiotiques à base de lait

Les probiotiques peuvent être trouvés dans une grande variété de produits laitiers commerciaux, y compris le lait aigre et frais, des yaourts, du fromage. Ces produits jouent un rôle important dans la prestation de bactéries probiotiques pour la santé humaine, car ces produits offrent un environnement qui favorise leur croissance et leur viabilité, ce qui assure une sécurité alimentaire (Taybi et al., 2014).

I.2.3.1. Lait frais potable et laits fermentés : Parmi les produits alimentaires probiotiques, les boissons lactées qui ont été les premiers produits commercialisés et encore consommés en plus grandes quantités que d'autres boissons probiotiques. Elles peuvent être regroupées en deux catégories: les boissons laitiers enrichies (y compris des probiotiques, des prébiotiques, des fibres, des polyphénols, des peptides, des stérols, des minéraux, des vitamines et de l'huile de poisson), et les boissons à base de lactosérum (Song et al., 2012).

Lors de la fabrication et du stockage de laits fermentés, plusieurs facteurs peuvent affecter la viabilité des bactéries probiotiques: l'acidité, le pH, la teneur en oxygène dissous, le potentiel d'oxydoréduction, la présence potentielle de composés aromatiques et divers additifs. Aujourd'hui, une large gamme de boissons à base de produits laitiers qui contiennent des bactéries probiotiques est disponible pour les consommateurs dans le marché, y compris: le lait Acidophilus^R, lait Bifidus^R, Acidophilus^R babeurre, Actimel^R, ProViva^R, Bio Danone^R et d'autres (Song et al., 2012).

I.2.3.2. Le yaourt : Le yaourt est l'une des sources originales de probiotiques, il est connu pour ses bienfaits pour la santé nutritionnelle. Il est produit par l'utilisation de culture de *L. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. D'autres lactobacilles et bifidobactéries sont parfois ajoutés pendant ou après la mise en culture du yaourt (Righi, 2006).

La survie de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium.spp* et d'autre souches de bactéries probiotiques dans le yaourt est affectée par nombreux facteurs comme : le pH, la présence de peroxyde d'hydrogène et l'oxygène dissous, la concentration des métabolites tels que l'acide lactique et l'acide acétique, la capacité tampon du milieu, ainsi que la température de stockage. La viabilité de ces bactéries dépend de la disponibilité des nutriments, des promoteurs et inhibiteurs de croissance, la concentration des solutés, le niveau d'inoculation, la température d'incubation et de stockage, le temps de fermentation (Hattingh et Viljoen, 2001 ; Farnworth, 2008).

I.2.3.3. Le fromage : Les fromages ont un certain nombre d'avantages par rapport aux yaourts et laits fermentés, très nutritifs, riches en énergie, consistance plus solide, relativement plus forte teneur en matières grasses, et peuvent prolonger la durée de vie des starters. La survie des probiotiques dans la matrice fromagère peut être affectée par plusieurs facteurs tels que la présence de sel, l'acidité, le changement de température et le stress oxydatif (Bergamini et al., 2005; Normand et al., 2006).

Plusieurs études ont montré un taux de survie élevé des probiotiques dans le fromage à la fin de la durée de conservation avec des cellules viables élevées. Le pH plus élevé et la teneur élevée en

matières grasses ainsi que la matrice solide de fromage peuvent protéger les bactéries de manière plus efficace que dans un environnement fluide pendant le stockage des aliments et leur transit dans le tube digestif humain (Bergamini et al., 2005). En outre, la faible teneur en oxygène et le pouvoir tampon de certaines matrices fromagères fournissent un environnement anaérobie capable d'augmenter la survie de plusieurs souches probiotiques (Ozer et al., 2009).

I.2.4. Autres produits alimentaires à base de lait

I.2.4.1. Le Kéfir : Est un lait fermenté, acide et alcoolisé, produit principalement à partir des laits de vache, de brebis ou de chèvre à l'aide de grains de kéfir. Dans les grains de kéfir il y a une association entre plusieurs groupes microbiens: des streptocoques mésophiles, des lactobacilles mésophiles ou thermophiles, des levures et des bactéries acétiques. Les ferments acceptés pour la préparation du kéfir sont les levures fermentant le lactose, les lactobacilles, les streptocoques lactiques et les grains de kéfir (Zubillaga et al., 2001; Farnworth, 2005).

I.2.4.2. La choucroute : La choucroute est un aliment lactofermenté. Les ferments lactiques se développent et transforment une partie des sucres du chou en acide lactique, ce qui rend le chou plus digeste. Après préparation de cet aliment, on laisse la fermentation s'effectuer pendant environ deux mois à une température de 20 à 25 °C en présence des souches *Leuconostoc mesenteroides* et *L. plantarum*, mais *L.brevis*, *P.cerevisioe* et *Enterococcus faecalis* contribuent également à la fermentation (Elhella et Satara, 2014).

I.2.4.3. Smen : Le beurre fermier est obtenu par barattage et malaxage de la crème du lait additionnée ou non de lait, puis conditionné dans des pots en terre cuite fermés hermétiquement et entreposés dans un endroit frais et obscur à température ambiante. Au cours de la maturation du Smen, *Lactococcus* et *Streptococcus* sensibles aux acides gras, disparaissent complètement en début d'affinage. En revanche, les lactobacilles qui utilisent ces acides gras comme nutriments, et qui sont résistants à leurs effets inhibiteurs, peuvent croître au début d'affinage, avant de diminuer lentement mais sans disparaître complètement à la fin de la maturation (Sakili et al., 2003).

I.2.5. Aliments probiotiques à base de légumes

I.2.5.1. Jus de carotte et de tomate : Le caractère de jus de carotte comme matière première pour la production de produits alimentaires probiotiques avec des souches de *Bifidobacterium* a été étudié. *Bifidobacterium* étaient susceptibles d'avoir des activités biochimiques dans le jus de carotte sans supplémentation en nutriments. Il a été rapporté que les quatre probiotiques *L. acidophilus*, *L.*

plantarum, *L. casei* et *L. delbrueckii* étaient capables d'utiliser rapidement le jus de tomate pour la synthèse cellulaire et la production d'acide lactique, sans suppléments nutritionnels et l'ajustement du pH (Song et al., 2012).

I.2.5.2. Jus de Choux et de betterave et lait de Soja : Il a été rapporté que le jus de choux fermenté peut soutenir la viabilité des probiotiques et servir comme une boisson saine. De même, la production de jus de betterave à base de probiotique a montré une bonne survie et bonne viabilité des starters dans le produit fini (Song et al., 2012)

I.2.5.3. Les cornichons, concombres : Les bactéries lactiques de la flore naturelle des concombres, *Pediococcus cerevisioe* et *L. plantarum* principalement, transforment peu à peu les sucres fermentés provenant des concombres, en acide lactique. Le pH décroît progressivement durant le temps de la fermentation, pour atteindre environ 3,5 au bout de six à neuf semaines. La concentration en sel est alors ajustée à 15 %, ce qui arrête la fermentation et aide à la conservation. D'autres végétaux peuvent également être fermentés de manière similaire (chou-fleur, petits oignons, etc). Ces produits maintiennent la survie des probiotiques (Elhella et Satara, 2014)

I.2.6. Aliments probiotiques à base de fruit

Les fruits sont riches en plusieurs nutriments tels que les minéraux, les vitamines, les fibres alimentaires, et les antioxydants. Ces caractéristiques permettent la sélection de souches appropriées de probiotiques pour fabriquer d'agréable jus de fruits sains comme : Jus d'orange, jus de grenade, jus de fruits tropicaux principalement l'ananas et mangue, le jus de pomme de cajou. Ces jus contiennent des nutriments bénéfiques qui peuvent être une source pour le maintien de la survie des probiotiques (Song et al., 2012).

I.2.7. Aliments à base des viandes

L'utilisation des bactéries probiotiques comme *L. casei*, *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *Pediococcus acidilactici* et *Pediococcus pentosaceus* dans la fermentation des produits carnés comme la viande et ce dans le but d'assurer la sécurité et la qualité du produit final Les bactéries lactiques sont les cultures de ferments les plus couramment utilisés dans la viande qui produisent de l'acide lactique à partir du glucose ou du lactose. (Desmazeaud, 1996 ; Mekhtiche, 2003).

Matériels et Méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Les souches bactériennes : Les souches bactériennes utilisées lors de la réalisation des différentes parties expérimentales sont des souches lactiques du genre *Lactobacillus*. Elles ont comme origine le rumen de chèvre locale elles sont codées S10 et S13. De même le levain mixte composé de *L. rhamnosus* S10 et *L. satsumensis* S13 a été utilisé au cours de cette étude.

II.1.2. Les matrices alimentaires utilisées : Deux types de matrices alimentaires ont été utilisées :

- Matrices alimentaires huileuses : Huile d'olive et huile à friture ;
- Matrices alimentaires grasseuses : Beurre et margarine

II.1.3. Les cellules épithéliales intestinales : Nous avons utilisé les tissus épithéliaux de duodéal du poulet, et ce pour étudier la capacité d'adhésion *in vitro* des lactobacilles.

II.1.4. Les milieux de cultures et tampons : Ce qui a été utilisé au cours de cette étude expérimentale, est le suivant:

- Les géloses : MRS (pH 6.4) (de Man-Rogosa et Sharp), Gélose blanche (pH 6) préparées au laboratoire;
- Bouillon MRS « Man-Rogosa-Sharpe » (pH 6.4) ;
- Tampon PBS (pH 7) ;
- Tampon Urée phosphate magnésium (pH 7).

II.1.5. Produits chimiques et réactifs :

- Cristal violet : utilisé pour la coloration des cellules épithéliales ;
- Sulfate de magnésium : utilisé pour la révélation de la lipolyse ;
- HCl (1N) et la soude NaOH (1N) : pour l'ajustement du pH et la titration ;
- HCl (0.5 N), Iso butanol-éthanol, potasse alcoolique (0.5 N), phénolphtaléine: pour la détermination de l'indice d'acidité ;
- Les solvants : Xylène, toluène, chloroforme et l'éthyle acétate: Pour la réalisation du test d'hydrophobicité ;
- La gomme arabique sert comme émulsifiant des matières grasses.

II.1.6. Appareillages : La réalisation de la partie pratique a nécessité ce qui suit :

- Autoclave (Pbibrand) ;
- Bain Marie (Gerhardt) ;
- Balance (KERN 440-35A) ; Balance analytique (KERN ALS220-4N) ;
- Centrifugeuse (EBA20HEHICH) ;
- Etuve (memmert) ; Etuve agitatrice (INFOBS HT Ecotron) ;
- Micro-centrifugeuse (SiGma1-14) ;
- Microscope optique (Olympus) ; Microscope à caméra (PARALUX) ;
- pH mètre (HANNA instrument) ;
- Spectrophotomètre (JENWAY)
- Vortex électrique (VWR) ;
- Plaque chauffante (VELP scientifica) ;

II.2. Méthodes

II.2.1. Revivification des souches et vérification de leur pureté : les deux souches ont été revifiées par ensemencement dans le bouillon MRS suivi d'une incubation à 37°C pendant 24 heures. Les cultures obtenues ont été repiquées sur gélose MRS, puis incubées aux mêmes conditions. La pureté des souches a été vérifiée par observation macroscopique suivie d'une coloration de Gram (**Idoui et al., 2009**).

II.2.2. Recherche de l'activité lipolytique *in vitro* :

II.2.2.1. Recherche de l'activité lipolytique sur gélose blanche :

Activité lipolytique des cultures : L'activité lipolytique est recherchée sur gélose blanche à pH 7 additionnée de 3% de chaque matière grasse (**Karam et al., 2012**). Cette dernière a été coulée et solidifiée. Des disques de papier Wattman stérile ont été déposés en surface de cette gélose, puis chaque disque reçoit 100µl d'une culture jeune. Après une incubation à 37°C pendant 72 h, la gélose est inondée avec du sulfate de cuivre préparé extemporanément. La lipolyse est révélée par une zone d'éclaircissement entourée d'un dépôt autour des disques (**Guiraud et Rosec, 2003**).

Activité lipolytique des surnageants: L'activité lipolytique est recherchée sur le même milieu additionné de 3% de chaque matière grasse. Après solidification de la gélose, des puits ont été confectionnés et la base de chaque puits a été bouchée par la même gélose. Chaque puits reçoit 100µl d'un surnageant de culture. Les boîtes ont été incubées à 37°C/24h. Après ajout du

sulfate de cuivre et repos, le caractère lipolytique est estimé par mesure des halos clairs autour de chaque puits (activité lipolytique des exolipases) (Roudj et al., 2009).

Par ailleurs, nous avons cherché à mettre en évidence une activité éventuelle des endolipases, pour ce faire, le culot bactérien de chaque culture a été récupéré après centrifugation à 5000 rpm/10min, ce dernier a été suspendu dans l'eau physiologique stérile (tampon pH7) puis incubé dans le bain marie à 80° C /10 min pour la lyse des cellules ensuite centrifugation. 100µl de chaque surnageant a été introduit dans chaque puits, suivi d'une incubation des boîtes à 37° C pendant 72 h. La lecture étant la même que celle avec le surnageant (Roudj et al., 2009).

II.2.2.2. Recherche de l'activité lipolytique sur gélose MRS : L'activité lipolytique a été recherchée sur milieu MRS tamponné à pH 6.4 et additionné de 3% de chaque matière grasse et/ ou huileuse. Les mêmes méthodes décrites en II.2.2.1 ont été appliquées.

II.2.2.3. Recherche de l'activité lipolytique sur matrice alimentaire : Pour évaluer cette activité, le beurre a été choisi comme matrice. Les échantillons du beurre ont été stérilisés dans des bains chauffants suivis de choc thermique. L'efficacité de la stérilisation a été vérifiée par un examen microscopique.

Chaque échantillon du beurre a été fondu puisensemencé à raison de 3% d'une culture. Les échantillons témoins et expérimentaux ont été incubés à 37°C. L'évolution du pH et de l'acidité des échantillons a été suivie au cours de la période d'incubation :

- **Détermination de l'indice d'acidité :** L'indice d'acidité est mesuré à T₀ et après 4 h, 1jour, 2jours et 3jours d'incubation à 37°C. Dix grammes de chaque échantillon de beurre sont introduits dans un Erlenmeyer puis additionnés de 10 ml de KOH alcoolique, 10 ml de la solution d'isobuthanol-éthanol et enfin 3gouttes de la solution de phénol phtaléine. La titration est réalisée à l'aide de l'acide chlorhydrique 0.5N jusqu'à virage de l'indicateur à l'incolore (Idoui et al., 2010). Le témoin est réalisé de la même manière mais sans matière grasse.

L'indice d'acidité est calculé avec la formule suivante :

$$Ia = (V_{HCl\text{témoin}} - V_{HCl\text{essai}}) \times N_{HCl} \times PM_{KOH}/P$$

Avec :

V : volume d'HCl utilisé (ml).

N : la normalité de KOH.

P : la prise d'essai (g).

II.2.3. Influence des matrices grasses sur la croissance et la viabilité

Dans cette partie, on a utilisé une seule matière grasse, le beurre stérilisé repartit sur trois flacons. Chaque flacon contenant 100 ml de beurre a étéensemencé par 3 ml de chaque culture. Après incubation dans le bain Marie agitateur à 37°C pendant 24 h, on a évalué le nombre d'UFC :

Préparation des micro-dilutions : un volume de chaque échantillon de beurre a été fondu à 37°C puis centrifugé, la phase aqueuse a été récupérée et a servi pour la préparation des micro-dilutions. Sur une série de tubes contenant 900 µl d'eau physiologique stérile par tube, une série de micro-dilutions a été réalisée (Idoui et al., 2009).

Le dénombrement des colonies à T_0 , après 4h et 3 jours d'incubation a été réalisé par étalement de 100 µl de chaque dilution sur gélose MRS. Après incubation à 37°C/24h, les colonies ont été dénombrées.

II.2.4. Evaluation de l'effet matrice alimentaire et conservation sur les trois aptitudes probiotiques :

Chaque échantillon de beurre inoculé à 3% par chaque culture bactérienne a été incubé à 37 °C pendant 3 jours. Ces échantillons ont été, par la suite conservés au froid à 4°C pendant trois jours.

Pour évaluer l'effet « matrice alimentaire-incubation » et effet « matrice alimentaire- froid » sur les trois propriétés probiotiques, les culots bactériens ont été récupérés selon le protocole décrit en (II.2.3). Les culots récupérés ont été suspendus dans le bouillon MRS pour la réalisation des tests. Il est à signalé, que nous avons appliqué les mêmes techniques utilisées par Kriket et Kias (2015) et ce, pour la reproductibilité des résultats et la possibilité de comparaison :

II.2.4.1. Test d'hydrophobicité :

Ce test a été réalisé comme décrit par Iyer et al. (2010). Pour la réalisation de ce test quatre solvants sont utilisés : le xylène, le toluène, le chloroforme et l'éthyle acétate.

Le culot bactérien de chaque culture a été récupéré par centrifugation à 5000 rpm/15min suivi de deux lavages successifs dans du PBS. Chaque culot bactérien a été suspendu dans 1.2 ml de tampon urée phosphate magnésium (pH 7). La densité optique initiale de la suspension a été ajustée approximativement à 1.0 à 450nm ($DO_{initiale}$). Ensuite 0.6 ml de chaque solvant a été ajouté doucement à 3 ml de la suspension bactérienne puis incubée à 37°C pendant 10 min. Ce mélange a été agité, en utilisant un vortex pendant 2min. Après 15 min, la phase aqueuse a été récupérée et on procède à la lecture de la densité optique finale (DO_{finale}).

La différence de la densité optique est considérée comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%), elle est calculée par l'équation suivante:

$$\% \text{ Hydrophobicité} = \text{DO}_{\text{initiale}} - \text{DO}_{\text{finale}} / \text{DO}_{\text{initiale}} \times 100$$

II.2.4.2. Test d'auto-agrégation et de co-agrégation

Pour réaliser ce test, la technique décrite par Juanez *et al.* (2005) a été appliquée : le culot bactérien de chaque culture a été récupéré par centrifugation à 5000 trs/15min, ce dernier a subi deux lavages par du PBS pH 7. L'inoculum bactérien a été ajusté à 10^8 UFC/ml ($\text{DO}_{600} = 0.6 \pm 0.05$).

La suspension des cellules standardisées (4ml) a été homogénéisée par vortex pendant 10 secondes et l'auto-agrégation a été déterminée durant les temps d'incubation 0h, 1h, 2h et 3h à la température ambiante.

Le pourcentage d'auto-agrégation est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'auto- agrégation} = 1 - (A_t / A_0) \times 100$$



Avec :

A_t : représente l'absorbance à $t = 1\text{h}, 2\text{h}$ et 3h

A_0 : est l'absorbance à $t = 0\text{h}$

Le pourcentage de co-agrégation de la mixture est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Co-aggregation \%} = \left\{ \frac{(A_x + A_y)}{2} - A_{(x+y)} \right\} / \left\{ \frac{(A_x + A_y)}{2} \right\} \times 100$$

Avec x et y représentant les deux souches S10 et S13 respectivement et $(x+y)$ représente leur mixture.

II.2.4.3. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial : La technique utilisée est celle décrite par Lin et Chien (2007) et qui comporte les trois étapes suivantes :

- ✓ **Préparation des cellules épithéliales:** Un segment de l'iléum d'un poulet a été bien lavé et nettoyé puis ouvert et lavé avec du tampon phosphate salin stérile (PBS pH 7.2), après une tenue dans le PBS à 4°C pendant 30 min. Par la suite, les tissus ont été repris, lavé 10 fois

avec du PBS stérile puis laissés au repos à 4°C pendant 3 h. Les cellules ont été récupérées en grattant la surface tapissant ce segment intestinal par une lame stérile et elles sont par la suite récupérées dans un tube à essai stérile contenant le tampon PBS. Des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10^{-4} , cette suspension cellulaire a été examinée par microscope pour assurer qu'elle n'était pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement 5×10^4 cellules/ml.

- ✓ **Préparation des cellules bactériennes:** le culot bactérien récupéré de la matrice alimentaire a été incubé dans le bouillon MRS pendant 18h. Les cellules bactériennes jeunes ont été récupérées par la suite par centrifugation à 6000 rpm/10min puis chaque culot reçoit 2 ml du PBS. Une observation microscopique (Gx100) a été faite pour pouvoir standardiser l'inoculum à 10^8 cellules/ml.
- ✓ **Réalisation du test :** 1ml de chaque culture est mélangé avec 1ml de la dilution 10^{-4} de la suspension des cellules épithéliales déjà préparée. Après incubation à 37°C pendant 30 minutes, 1h, 2h et 3h, une préparation de frottis et une coloration au cristal violet 0.5% pendant 5 min a été réalisée pour observer l'adhésion au microscope optique. Des photos ont été prises par un microscope à caméra.

Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérentes est supérieur à 15/cellule.

II.2.5. Analyse statistique

Pour l'étude de la corrélation entre les trois aptitudes probiotiques : hydrophobicité, auto-agrégation et adhésion au tissu épithélial ; on utilise un logiciel : Excel 2010 qui permet de donner les coefficients de corrélation entre ces trois propriétés testées.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Recherche de l'activité lipolytique *in vitro*

III.1.1. Activité lipolytique des cultures

Les résultats de l'activité lipolytique des souches lactiques sur gélose blanche et sur milieu MRS sont groupés dans les tableaux 02 et 03. D'après ces résultats, il apparaît que les cultures testées présentent une activité lipolytique sur les milieux gélosés additionnés d'une proportion (3%) d'une matrice alimentaire huileuse ou grasseuse (beurre, margarine, huile d'olive) à l'exception des milieux à huile à friture.

Tableau 02 : Diamètres des zones de lipolyse sur gélose blanche (cm).

	Gélose blanche à 3% de :			
	Beurre	Margarine	Huile d'olive	Huile à friture
<i>L. rhamnosus</i> S10	1.75	1.0	1.0	/
<i>L. satsumensis</i> S13	1.70	0.8	0.9	/
Mixture	1.95	1.1	1.0	/

Tableau 03 : Diamètres des zones de lipolyse sur gélose MRS (cm).

Souches	Gélose MRS à 3% de :			
	Beurre	Margarine	Huile d'olive	Huile à friture
<i>L. rhamnosus</i> S10	1.6	1.0	0.9	/
<i>L. satsumensis</i> S13	1.5	0.5	0.8	/
Mixture	1.7	1.0	1.2	/

III. Résultats et Discussion

Ces résultats montrent que l'activité lipolytique sur milieu MRS et gélose blanche additionnée de 3% de beurre comme unique source lipidique est plus élevée comparativement à celle obtenue sur les mêmes milieux additionnés de margarine et d'huile d'olive.

D'autre part, l'activité lipolytique sur gélose blanche additionnée de 3 % de beurre comme unique source lipidique était élevée comparativement à celle obtenue sur milieu MRS.

Les diamètres des zones d'activité lipolytique ont été mesurés après incubation dont les résultats sont résumés dans le **tableau 02**. D'après les résultats obtenus, on constate que les souches étudiées présentent une croissance avec une activité lipolytique qui s'est traduite par l'apparition d'un halo clair autour des disques (**Figure 02**). De même, l'activité est plus prononcée pour l'ensemble des cultures sur la gélose blanche à 3% de beurre, elle l'est et à moindre degré sur le même milieu et à mêmes proportions en margarine et en huile d'olive, en revanche, on constate une absence d'activité en présence d'huile à friture.

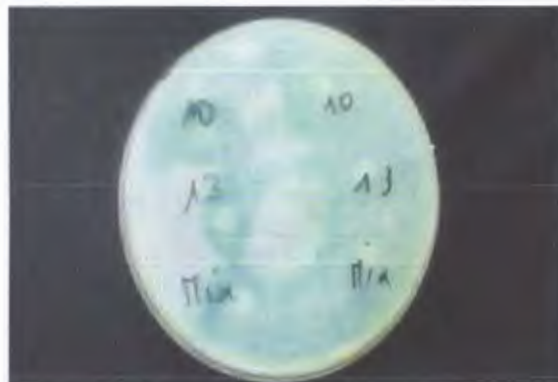


Figure 02. Activité lipolytique sur gélose blanche à 3% de beurre

S10 : *L. rhamnosus* , S13 : *L. satsumensis* , Mx : la mixture des deux souches

Il apparaît clairement que l'espèce *L. rhamnosus* S10 est plus lipolytique que *L. satsumensis* S13 avec un diamètre de 1.75 cm et de 1.6 cm sur la gélose blanche et MRS à 3% de beurre comparativement à l'espèce *L. satsumensis* S13 avec un diamètre de 1.70 cm et 1.5 cm. Par contre la mixture des deux espèces présente l'activité la plus élevée avec un diamètre de 1.95 cm sur gélose blanche et 1.7 sur gélose MRS.

L'activité lipolytique des bactéries lactiques est essentielle pour leur croissance dans les matrices alimentaires ainsi que pour le développement des caractéristiques organoleptiques et aromatiques des produits (tels que alcools, cétones, et aldéhydes ...) (Garry et Legurn, 1999 ; Regina et Brandelli, 2010).

III.1.2. Activité lipolytique des surnageants (exolipases et endolipases)

Nous avons voulu tester cette aptitude sur gélose blanche et MRS additionné de 3% d'une des matrices alimentaires huileuse ou grasseuse comme substrat lipidique afin de caractériser les enzymes lipolytiques qui y sont responsables à partir de surnageant des souches pures et leur mixture. Les résultats des tableaux 04,05,06 et 07 montrent une activité lipolytique reflétée par des zones de lipolyse autour des puits sur gélose blanche (Figure 03).

Tableau 04 : Diamètres des zones de lipolyse des exolipases sur gélose blanche (cm).

Cultures	Gélose blanche à 3% de :			
	Beurre	Margarine	Huile d'olive	Huile à friture
<i>L. rhamnosus</i> S10.	1.95	0.9	1.0	/
<i>L. satsumensis</i> S13	1.75	0.8	0.5	/
Mixture	2.1	1.1	0.9	/

Tableau 05 : Diamètres des zones de lipolyse des exolipases sur gélose MRS (cm).

Cultures	Gélose MRS à 3% de :			
	Beurre	Margarine	Huile d'olive	Huile à friture
<i>L. rhamnosus</i> S10.	1.75	0.9	0.9	/
<i>L. satsumensis</i> S13	1.7	0.7	0.8	/
Mixture	2.0	1.0	1.0	/



Figure 03. Activité lipolytique des surnageants des cultures sur gélose blanche à 3% de beurre

S10 : *L. rhamnosus* , S13 : *L. satsumensis* , Mx : la mixture des deux souches

D'après les résultats obtenus, il apparait une bonne activité lipolytique des surnageants des souches lactiques autour des puits, en effet les diamètres des zones d'activité des surnageants (exolipases) des souches lactiques étaient compris entre 1.95 cm et 2.0 cm sur la gélose blanche et MRS à 3% de beurre, cette fourchette est proche de celle obtenue avec les mêmes surnageants et sur les mêmes géloses à 3% de margarine et d'huile d'olive. En revanche, on constate qu'avec 3% d'huile à friture, l'activité est totalement absente (**tableau 04 et 05**).

Il apparait que le surnageant de la souche *L. rhamnosus* S10 exerce une meilleure activité lipolytique avec 3% de beurre ou de margarine ou d'huile d'olive dont les diamètres respectifs étaient de 1.95 cm, 0.9 cm et 1.0 cm sur gélose blanche et de 1.75 cm, 0.9 cm et 0.9 cm sur MRS.

Le fractionnement et la lyse des cellules pour la libération du contenu enzymatique et la recherche de l'activité lipolytique par l'application de la même technique a montré des zones d'activités plus faibles que celles des surnageants des cultures dont les diamètres obtenus varient entre 0.4 cm et 0.8 cm sur gélose MRS additionnée au beurre et faible pour la margarine et l'huile d'olive, et entre 0.9 cm et 1.0 cm sur gélose blanche. De même, on constate une absence d'activité sur les géloses à 3% d'huile à friture (**Tableau 06, 07**).

Tableau 06 : Diamètres des zones de lipolyse des endolipases sur gélose blanche (cm).

	Gélose blanche à 3% de :			
	Beurre	Margarine	Huile d'olive	Huile à friture
<i>L. rhamnosus</i> S10.	0.7	0.5	0.5	/
<i>L. satsumensis</i> S13	0.5	0.4	0.5	/
Mixture	0.8	0.6	0.7	/

Tableau 07 : Diamètres des zones de lipolyse des endolipases sur gélose MRS (cm).

	Gélose MRS à 3% de :			
	Beurre	Margarine	Huile d'olive	Huile à friture
<i>L. rhamnosus</i> S10.	0.5	Très petit	Très petit	/
<i>L. satsumensis</i> S13	0.4	Très petit	Très petit	/
Mixture	0.8	Très petit	Très petit	/

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que les surnageants des cultures étudiées exercent une activité lipolytique qui normalement se traduit par une libération d'acides gras dans le milieu. Ces acides vont constituer un bon substrat pour le métabolisme, et qui peuvent conduire aux composés aromatiques (Garry et Legurn, 1999).

III.1.3. Activité lipolytique sur matrice alimentaire

Les résultats de l'indice d'acidité après le temps : t_0 , t_{4h} , et après 1, 2,3 jours d'incubation sont présentés dans le **tableau 08**. Les résultats ont révélé que les valeurs d' I_A variaient entre 2.24 et 7.28 mg de KOH / g. Les valeurs de l'indice d'acidité observés dans les échantillons de beurreensemencé par les souches augmentent respectivement après 4 h jusqu'à 3 jours d'incubation avec une valeur maximale de 7.28 mg de KOH /g du beurreensemencé par la souche S13 par rapport aux valeurs d' I_a de beurre témoin (5.6 mg de KOH / g). Ces résultats sont logiques du moment que le dénombrement a montré qu'après trois jours d'incubation, la microflore lactique est indénombrable dans le beurre, donc

une activité lipolytique plus prononcée. En revanche, à t_0 jusqu'à 4 h d'incubation, l'indice d'acidité diminue, probablement lié à la faible activité des cultures et la consommation des acides libres par cette microflore lactique.

Tableau 08 : Indice d'acidité du beurre témoin et ensemencée

I_a (mg KOH/g)	Beurre			
	Témoin	<i>L. rhamnosus</i> S 10	<i>L. satsumensis</i> S 13	Mixture
$t=0$	5.6	5.6	5.6	5.6
$t=4h$	5.6	1.12	2.24	1.68
après 1jour	5.6	2.8	5.6	2.24
après 2 jours	5.6	5.6	6.16	2.8
après 3 jours	5.6	6.16	7.28	6.72

I_a : Indice d'acidité

III.2. Survie et viabilité des souches lactiques dans le beurre

Les résultats obtenus lors du dénombrement de la flore lactique, *L. rhamnosus* S10, *L. satsumensis* S13, et leur mixture dans le beurre à t_0 et après 4h et 3 jours d'incubation à 37°C sont résumés dans les **Tableaux 09, 10,11** respectivement. L'aspect des colonies sur gélose MRS de *L. rhamnosus* S10 et *L. satsumensis* S13 et leur mixture était un aspect caractéristique de bactéries lactiques. A T_0 , lors de l'ensemencement du beurre, les colonies sont indénombrables, on a obtenu un tapis cellulaire pour les dilutions $10^1, 10^2, 10^3$ pour les souches S10 et S13, sauf pour les dilutions $10^4, 10^5$ on a pu dénombrer les colonies. Cependant, il nous a été impossible de dénombrer les colonies de la culture mixte même à très faible dilution.

III. Résultats et Discussion

Tableau 09 : Résultats du dénombrement à temps zéro heure (UFC/ 100µl)

Cultures	Nombre d'UFC/ 100µl				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
<i>L. rhamnosus</i> S10	Ind	Ind	Ind	243	300
<i>L. satsumensis</i> S13	Ind	Ind	Ind	341	672
Mixture	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind

Ind : Indénombrable

Après 4 h d'incubation à 37°C, on voit clairement qu'on arrive à dénombrer même à faible et à grande dilution, ce qui prouve que la matrice alimentaire a affecté la viabilité de nos cultures du moment qu'il y a eu une perte en nombre après ce temps d'incubation. En revanche, l'association des souches a fait que leur viabilité a été maintenue après les 4h d'incubation et cela est reflété par les résultats identiques à ceux trouvés avec le premier dénombrement.

Tableau 10 : Résultats du dénombrement après 4h d'incubation (UFC/ 100µl)

Cultures	Nombre d'UFC/ 100µl				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
<i>L. rhamnosus</i> S 10	Ind	Ind	Ind	97	83
<i>L. satsumensis</i> S13	Ind	Ind	Ind	202	131
Mixture	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind

Après 3 jours d'incubation à 37°C, on assiste à une bonne reprise de la croissance pour l'ensemble des culture dont les résultats montrent qu'il est impossible de dénombrer, cela dit, il est fort possible que les souches avaient besoin de temps pour s'adapter à cet environnement. Donc, cette matrice alimentaire n'affecte en aucun cas la survie et la viabilité des cultures mises au test.

Tableau 11 : Résultats du dénombrement après 3jours d'incubation (UFC/ 100µl)

Cultures	Nombre d'UFC/ 100µl				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
<i>L. rhamnosus</i> S 10	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<i>L. satsumensis</i> S 13	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
Mixture	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind

III.3. Evaluation de l'effet matrice alimentaire sur les trois aptitudes probiotiques

III.3.1. L'hydrophobicité

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes. Ainsi, elle semble être un facteur aidant à l'adhérence, mais elle ne contribue pas à une bonne adhésion (Roos et Jonsson, 2002; Guglielmotti et al., 2007).

Dans notre étude, nous avons évalué l'effet de la matrice alimentaire, le beurre sur cette propriété probiotique. Pour ce faire la microflore lactique a été récupérée du beurre par centrifugation et elle a été confrontée aux quatre solvants : xylène qui est un solvant apolaire; chloroforme un mono polaire acide; et l'acétate d'éthyle un solvant mono polaire basique et le toluène qui est un solvant mono polaire.

Les pourcentages obtenus de l'hydrophobicité de surface des cultures sont illustrés par la **figure 04** Ces résultats montrent que les souches mises au test présentent une bonne hydrophobicité aux quatre solvants, cela témoigne d'une bonne sélectivité des surfaces membranaires.

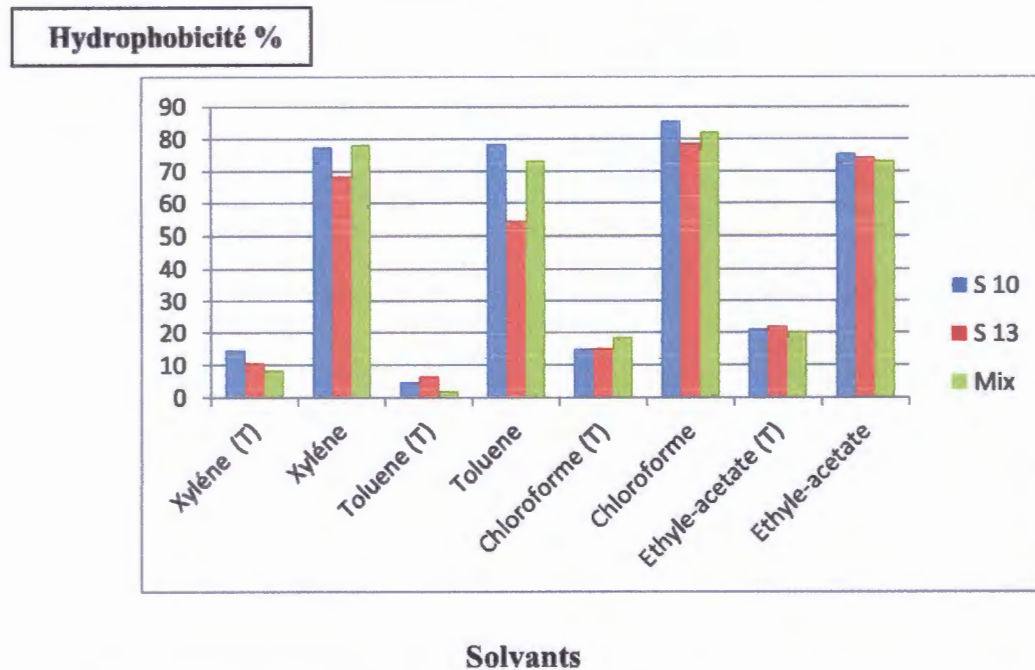


Figure 04 : Pourcentage d'hydrophobicité de *L.rhamnosus* S10 et *L.satsumensis* S13 et la mixture témoins et ré-isolé de beurre

L'hydrophobie des souches *L. rhamnosus* S10 et *L. satsumensis* S13 a montré une plus grande affinité pour les solvants utilisés comme l'éthyle- acétate, un pourcentage proche est obtenu avec S10, S13 et la mixture dont les valeurs étaient respectivement de 75.54%, 74.3% et 73.2 %, par contre les résultats des pourcentages de l'hydrophobicité des mêmes cultures cultivées sur bouillon MRS ont montré une faible affinité aux quatre solvants. Cette affinité à l'éthyle- acétate était 21.3%, 22% et 20.4% pour les souches S10, S13 et la mixture respectivement. Ces résultats laissent supposer que cette matrice alimentaire affecte positivement cette propriété probiotique.

Selon **Kos et al. (2003)**, l'adhérence microbienne aux solvants reflète le caractère hydrophobe de la surface cellulaire ou hydrophile parce que les interactions électrostatiques sont absentes. Le caractère hydrophobe de surface a été déterminé afin de vérifier une éventuelle concordance entre propriété physico-chimique et la capacité d'adhérer à la muqueuse intestinale comme suggéré par **Wadstrom et al. (1987)** et **Ngwai et al. (2006)** qui ont rapporté que les propriétés physico-chimiques telles que l'hydrophobie jouent un rôle majeur dans l'interaction initiale avec le tissu hôte.

III. Résultats et Discussion

Les pourcentages obtenus de l'hydrophobicité de surface des cultures après trois jours de conservation en froid sont illustrés par la **figure 05**. Les résultats montrent que les deux souches et leur mixture présentent une faible affinité aux quatre solvants.

L'affinité des souches *L. rhamnosus* S10, *L. satsumensis* S13 et la mixture au chloroforme, l'éthyle acétate et au xylène sont proches et faibles dont le pourcentage d'hydrophobicité est compris entre 17.22% et 21.54%. Avec le toluène, le pourcentage est meilleur (31.73%). Ces résultats sont similaires aux pourcentages d'hydrophobicité des souches cultivées sur bouillon MRS dont les valeurs obtenues sont comprises entre 14.8% et 21.3%.

Pour le toluène le pourcentage d'hydrophobicité pour les souches S10 et S13 et la mixture est de 31.75%, 26.65% et 24.56% respectivement, celui des mêmes cultures témoin, il est très faible et il était respectivement 4.3%, 6.6% et 2.1%. donc la surface des souches S 10 et S 13 et leur mixture ré-isolés de beurre a une affinité plus élevé au Toluène par rapport à la surface cellulaire des souches témoins qui présente une faible affinité au Toluène..

Une relation entre l'hydrophobicité et l'adhésion des lactobacilles aux solvants a été montrée par **Pascual et al. (2008)** dont la surface hydrophile chargée négativement est responsable d'une faible adhésion, mais les souches qui ont une surface hydrophobe chargée positivement adhérent fortement.

Pelletier et al. (1997) ont rapporté que les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire microbienne sont importantes, les surfaces hydrophobes sont associées à la présence de (glycol-) matière protéinée, tandis que les surfaces hydrophiles sont associées à la présence de polysaccharides. Donc la matière alimentaire (beurre) a un bon effet sur l'hydrophobicité de surfaces cellulaires des lactobacilles (hydrophobie élevée) tandis que le couple matrice alimentaire-froid à un effet négatif (hydrophiles).

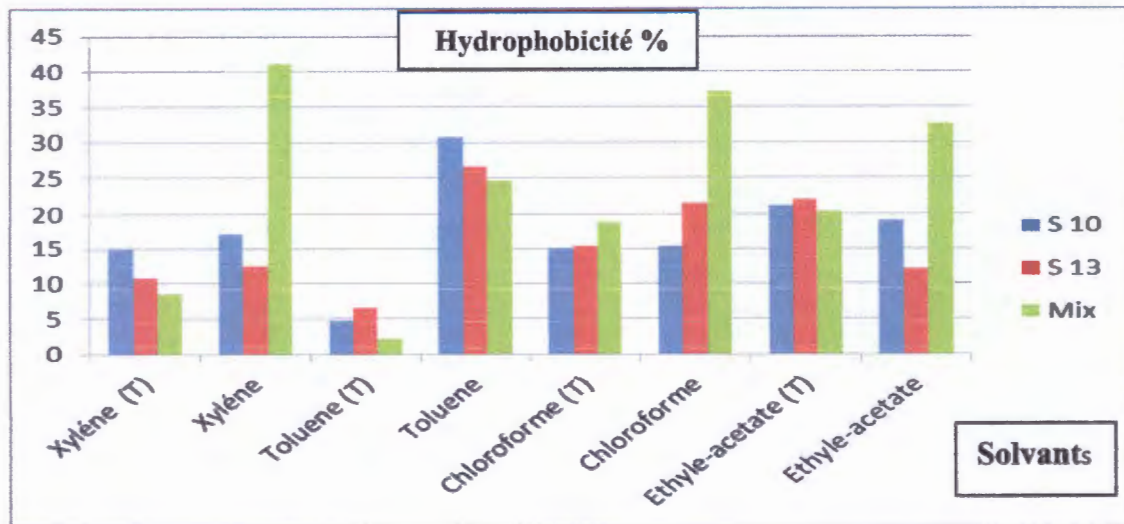


Figure 05 : Effet du couple matrice alimentaire-froid sur le pourcentage d'hydrophobicité des cultures ré-isolé de beurre par rapport au témoin (T)

III.3.2. L'auto-agrégation et la co-agrégation

La capacité d'auto agrégation des bactéries probiotiques est au corrélation avec l'adhérence des cellules épithéliales, connue pour être une condition préalable à la colonisation et à l'amélioration de la persistance dans le système gastro-intestinale tandis que la capacité de co-agrégation est la faculté de former une barrière qui empêche la colonisation par des microorganismes pathogènes.

Les résultats d'auto-agrégation et de co-agrégation sont présentés dans les figures 06 et 07. Les résultats de la **figure 07** montrent que les deux souches *L. rhamnosus* S10 et *L. satsumensis* S13 mises au test possèdent un fort degré d'auto agrégation durant presque toute la période d'incubation avec un maximum observé après 3 heures d'incubation avec la souche *L. satsumensis* S13 qui atteint la valeur 11.58 % par rapport au pourcentage de *L. satsumensis* S13 témoin (**Figure 06**) qui atteint une valeur maximale de 6.66 % à t_3 , en outre la souche *L. rhamnosus* S10 atteint le pourcentage maximale estimé à 10.45 % qui est supérieur à celui de la même souche cultivée sur bouillon MRS (8.5 %). D'après ces résultats, notre matrice alimentaire améliore ce paramètre probiotique du moment qu'on a eu des pourcentages doublés.

Une forte auto-agrégation montre le caractère hydrophobe élevé des surfaces de souches lactiques tandis qu'une faible auto-agrégation montre des surfaces cellulaires hydrophiles. De ce fait, il n'y a

aucune contraction entre les résultats, les souches montrent de la surface hydrophobe, donc plus apte à adhérer aux cellules intestinales.

La capacité d'agrégation a été considérée comme une propriété importante des souches bactériennes utilisées comme probiotiques, car, elle joue un rôle important dans la formation de biofilms qui protègent l'hôte contre la colonisation par des agents pathogènes (An *et al.*, 2000).

La mixture de ces deux lactobacilles possèdent un faible degré de co-agrégation entre elles durant presque toute la période d'incubation avec un maximum observé après 3 heures d'incubation atteignant une valeur proche de 4%, par contre la mixture témoin cultivée sur bouillon MRS ne présente aucun degré de co-agrégation entre elles (Kias et Kriket, 2015), de ce fait ces résultats montrent que la matrice alimentaire améliore cette aptitude probiotique.

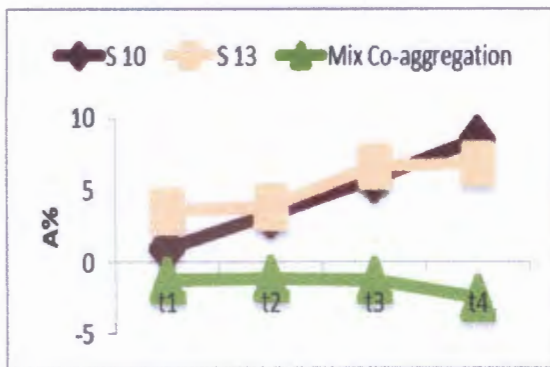


Figure 06 : Pourcentage d'auto-agrégation de *L. rhamnosus* S10 et *L. satsumensis* S13 et de Co-agrégation de la mixture (Témoins)

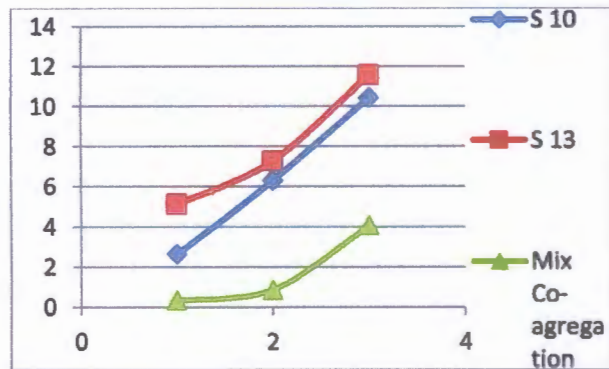


Figure 07 : Pourcentage d'auto-agrégation et de Co-agrégation des mêmes cultures ré-isolées du beurre

Les résultats de l'effet du couple « matrice alimentaire- froid » sur le pourcentage d'auto-agrégation et la co-agrégation sont présentés dans la **figure 08**.

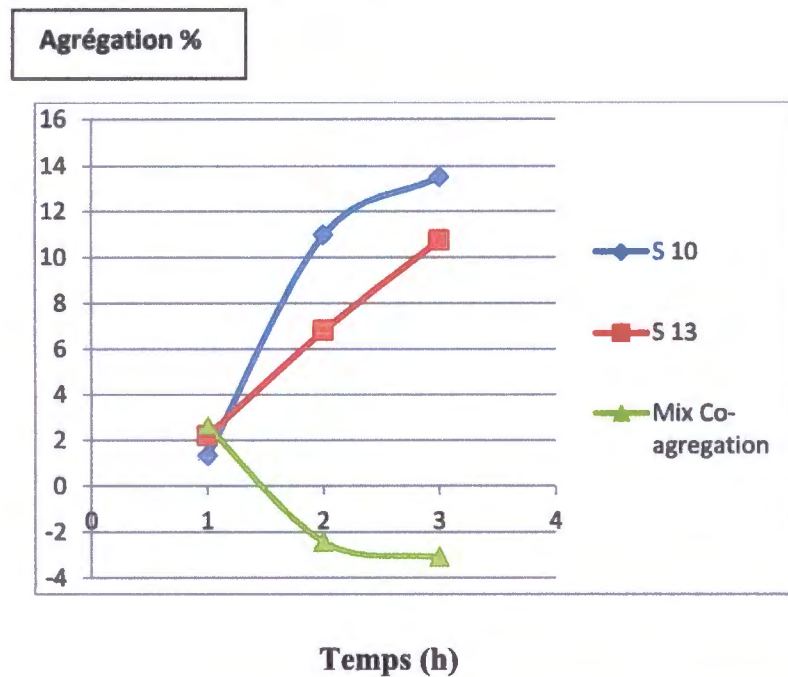


Figure 08 : Effet du couple « matrice alimentaire –froid » sur le pourcentage d'auto-agrégation de *L. rhamnosus* S10 et *L. satsumensis* S13 et la co-agrégation de la mixture

Les résultats montrent que les deux souches *L. rhamnosus* S10 et *L. satsumensis* S13 mises au test possèdent un fort degré d'auto agrégation durant presque toute la période de conservation sous régime du froid avec un maximum observé après 3 heures d'incubation avec la souche *L. rhamnosus* S10 qui atteint 13.51 %, celui de la même souche témoin est uniquement de 8.5 % (Kias et Kriket, 2015), en outre la souche *L. satsumensis* S13 a donné un pourcentage maximale de 10.73 % qui est strictement supérieur de celui du témoin(6.66 %). Donc les conditions de conservation n'altèrent pas l'auto-agrégation des lactobacilles.

III.3.3. L'adhésion au tissu épithélial

L'adhésion est un processus complexe, qui peut comprendre des mécanismes ligand-récepteur non-spécifiques et spécifiques (Cayuela et al., 2014). Des facteurs tels que les protéines, les glycoprotéines, sur la surface de la paroi cellulaire des bactéries ont été impliquées dans la capacité d'adhérence, d'auto-agrégation et d'hydrophobicité. La capacité d'adhérer aux cellules épithéliales des muqueuses et des surfaces a été suggérée comme une propriété importante lors de la sélection de souches probiotiques. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **figure 09**.

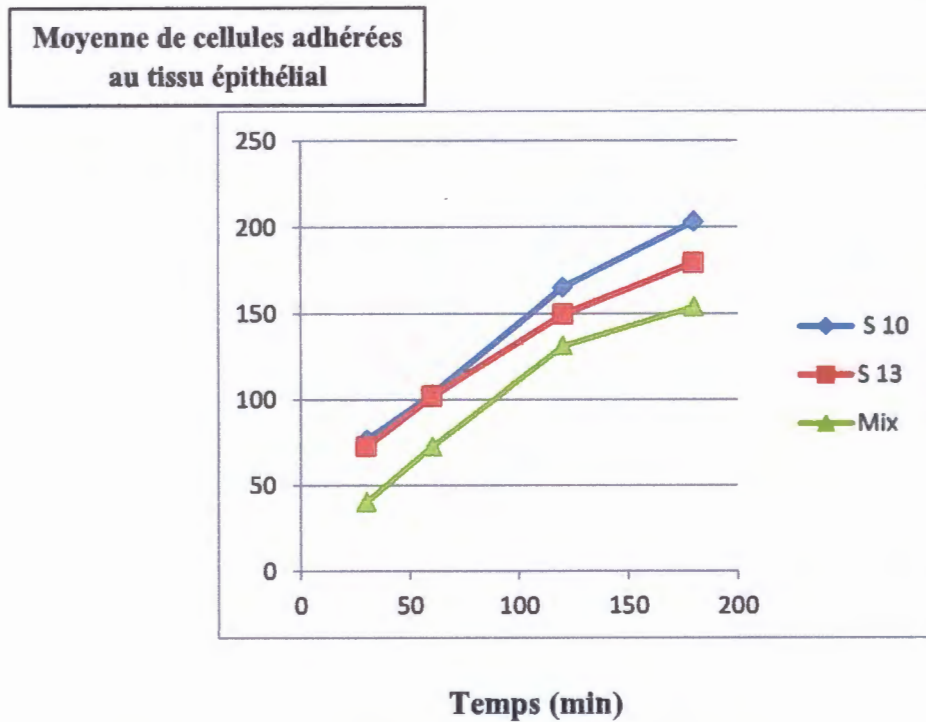


Figure 09 : Adhésion de *L. rhamnosus* S 10 et *L. satsumensis* S 13 et leur mixture aux muqueuses intestinales du poulet

Il apparait que les souches ont une capacité élevée d'adhésion aux cellules épithéliales de poulet. Après 3 heures d'incubation à 37°C, la souche *L. rhamnosus* S10 montre 203 cellules adhérentes par cellule épithéliale, en outre la souche *L. satsumensis* S13 atteint une moyenne de 183.33 cellules bactériennes, leur mixture a montré une moyenne maximale de 150 cellules bactériennes par cellule épithéliale.

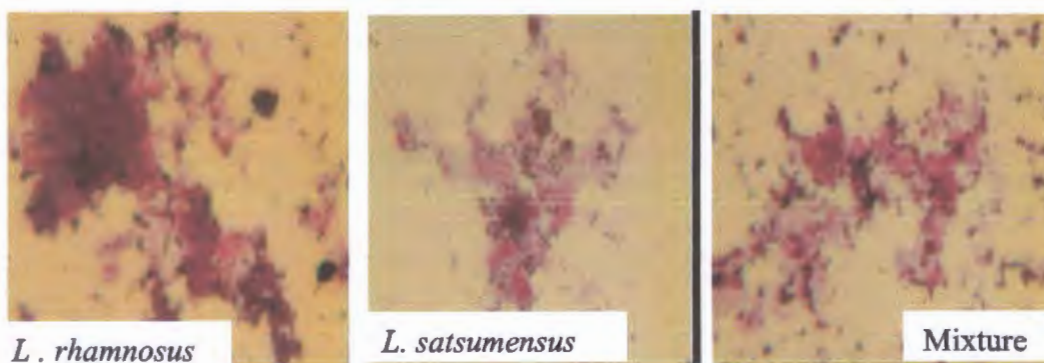


Figure 10 : photomicrographie d'adhésion des souches ré-isolées de beurre aux cellules épithéliales après 30 minutes

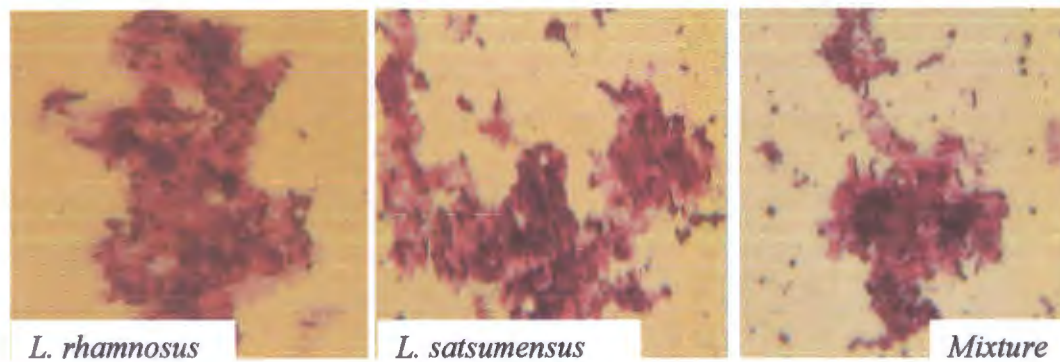


Figure 11: photomicrographie d'adhésion des souches ré-isolées de beurre aux cellules épithéliales après 3 heures.

D'après les résultats obtenus et les figures 10 et 11 on observe que le nombre de cellules adhérant augmente au cours du temps d'incubation à 37°C. Donc le temps d'incubation joue un rôle important dans l'adhésion des souches aux cellules épithéliales dont la moyenne des cellules adhérentes est de 81 , 74 et 47 cellules après 30 min et atteint une moyenne maximale après 180 min de 203 ,183 et 147 cellules des souches *L. rhamnosus* S10, *L. satsumensis* S13 et la mixture ,respectivement.

La comparaison de nos résultats à ceux trouvés par **Kias et Kriket (2015)**, montre que la matrice alimentaire avait un bon effet sur ce paramètre, du moment qu'il y a une amélioration de l'adhésion. L'exemple le plus simple est celui des résultats obtenus après 3h d'incubation, les cultures de *L. rhamnosus* S10 et *L. satsumensis* S13 ré-isolées de beurre possédant une moyenne des cellules adhérentes de 203 et 183 , respectivement par contre les moyennes des cellules adhérentes des mêmes cultures témoins n'est que de 25 et 28 cellules, respectivement.

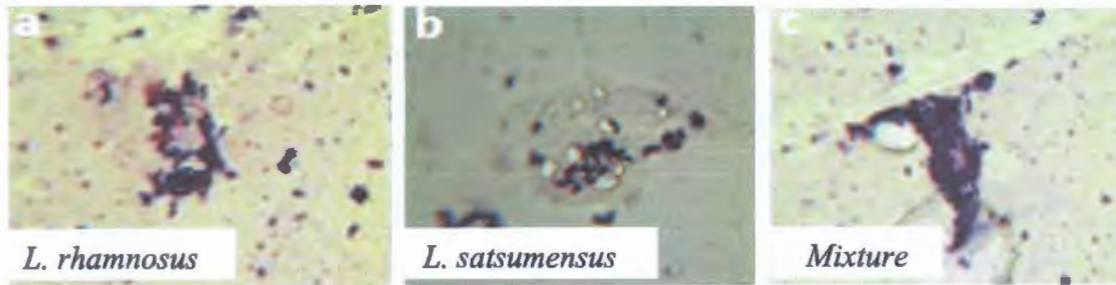


Figure 12 : Photomicrographie d'adhésion des souches témoin aux cellules épithéliales après 3h

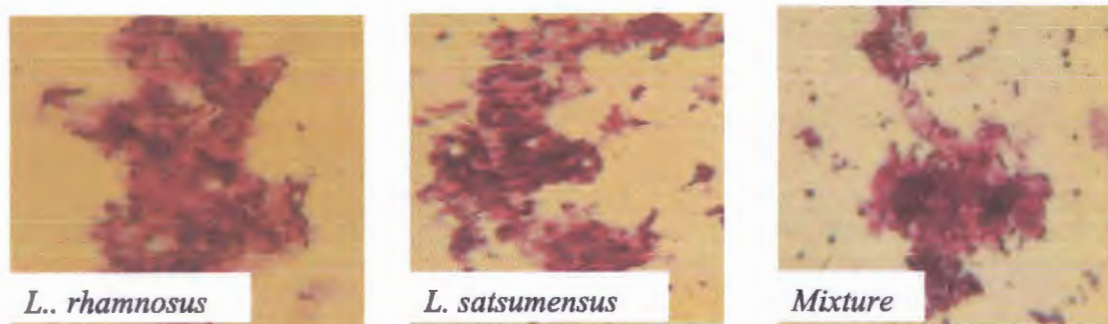


Figure 13 : photomicrographie d'adhésion des souches aux cellules épithéliales après 3h des souches ré-isolées de beurre

La figure 14, illustre l'effet du couple « matrice alimentaire- froid » sur l'adhésion des cultures. Les Figures 15 et 16, confirme l'effet du froid sur l'adhésion des cellules bactériennes. Il apparait clairement que les souches testées sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales et que le nombre de cellules adhérentes variait avec le temps de conservation au froid (figure 14). Nous avons remarqué que l'adhésion de *L. rhamnosus* S10 et *L. satsumensis* S13 et la mixture a augmenté au cours de temps de conservation au froid, dont la moyenne des cellules adhérentes s'est améliorée.

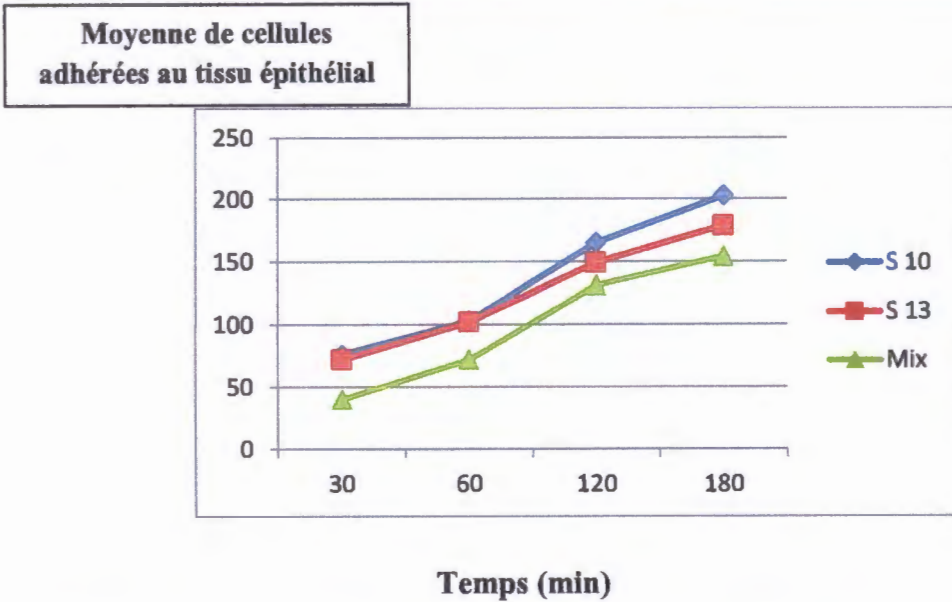


Figure 14 : Effet du couple « matrice alimentaire- froid » sur l'adhésion des cultures

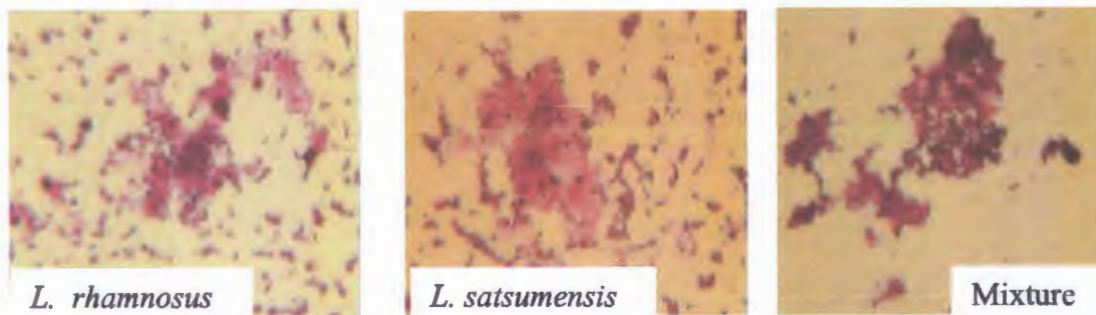


Figure 15 : Photomicrographie d'adhésion des souches *L. rhamnosus* S10 et *L. satsumensis* S13 et la mixture aux cellules épithéliales « effet matrice alimentaire-froid » après 30mn d'incubation

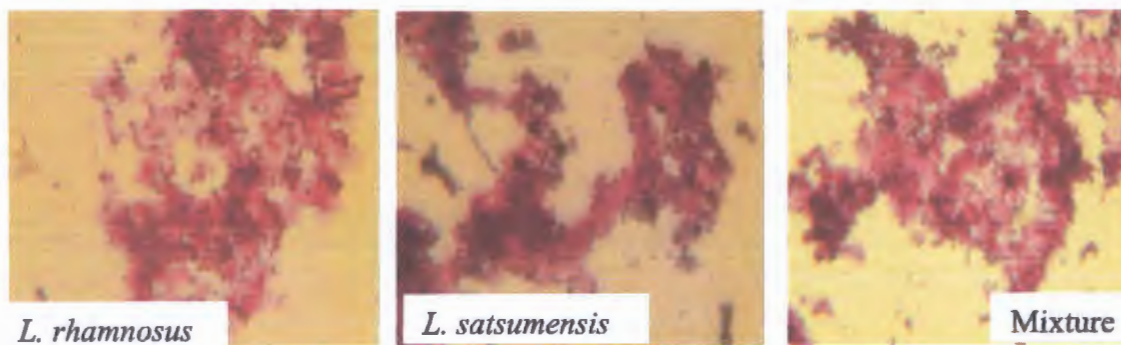


Figure 16: Photomicrographie d'adhésion des souches *L. rhamnosus* S10 et *L. satsumensis* S13 et la mixture aux cellules épithéliales « effet matrice alimentaire-froid » après 3h d'incubation

D'après certains auteurs, l'origine des probiotiques joue un rôle dans les capacités d'adhérence, il a été trouvé que les bactéries d'origine humaine peuvent adhérer mieux aux muqueuses intestinales de l'Homme (Gu et al., 2008). Cependant Kimoto-Nira et al. (2009) ont trouvé que des souches de *Lactococcus* (*Lc. lactis ssp. lactis* et *Lc. lactis ssp. cremoris*) isolées à partir de divers produits laitiers, peuvent adhérer aux cellules épithéliales intestinales humaines.

III.4. Corrélation entre l'hydrophobicité, l'auto-agrégation et l'adhésion

La corrélation entre l'auto-agrégation et l'hydrophobicité de surface des souches était calculée. La figure 17 illustre les résultats trouvés. Une corrélation (r) de 0.84 proche de 1 a été obtenue entre l'auto-agrégation et l'hydrophobicité des surfaces des deux souches bactériennes alors c'est une corrélation positive entre ces deux propriétés probiotiques.

Selon Nikolic et al. (2010) et Tuo et al. (2013), les souches ayant une auto agrégation ultérieure ont montré le caractère hydrophobe plus élevé ce qui a donné une corrélation significative

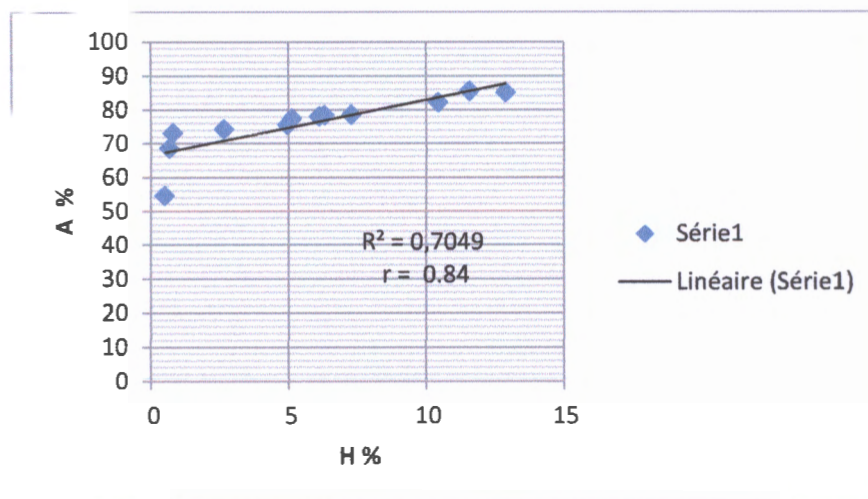


Figure 17 : Corrélation entre la capacité d'auto-agrégation et l'hydrophobicité de surface de

L. satsumensis S13 et *L. rhamnosus* S10

Les figures 17, 18 et 19 montrent une corrélation positive entre l'auto-agrégation et l'adhésion et l'hydrophobicité des deux souches. Ehrmann et al. (2002) ont indiqué que la corrélation entre la capacité d'adhérence et l'aptitude à l'auto-agrégation en plus des propriétés d'hydrophobicité des bactéries lactiques probiotiques peuvent être spécifique à la souche, par conséquent l'agrégation

bactérienne et l'hydrophobie peuvent être utilisées comme un examen préliminaire pour évaluer leur propriétés d'adhérence.

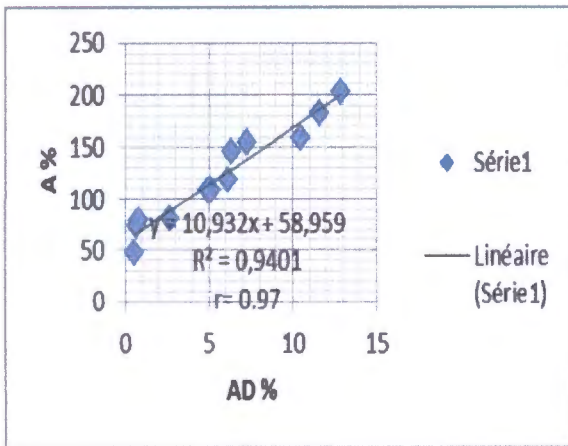


Figure 18 : Corrélation entre capacité d'auto-agrégation et l'adhésion de *L. satsumensis S13* et *L. rhamnosus S10* ré-isolés de beurre

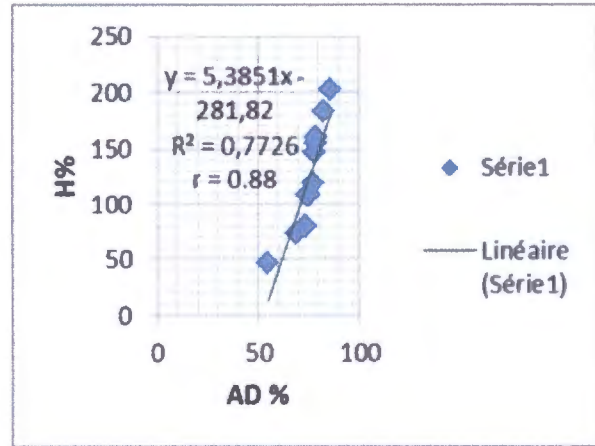


Figure 19 : Corrélation entre l'hydrophobicité de surface et l'adhésion de *L. satsumensis S13* et *L. rhamnosus S10* réisolés de beurre

Les résultats de corrélation entre les trois aptitudes probiotiques des lactobacilles ré-isolés de la matière grasse sont comparés avec les résultats de corrélation des trois aptitudes des souches lactobacilles pures cultivés sur bouillon MRS (Témoins) à partir des figures ci dessous (20 - 21).

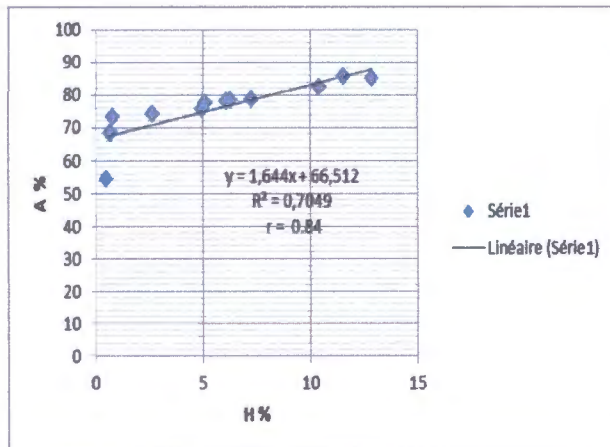


Figure 20 : Corrélation entre l'hydrophobicité et l'auto-agrégation des souches S13 et S10 ré-isolées de beurre

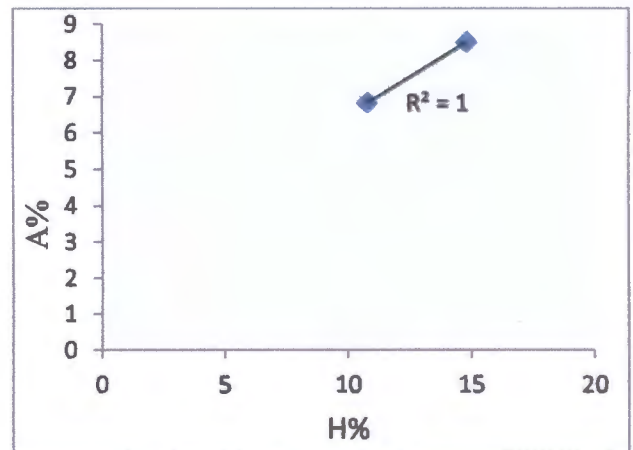


Figure 21 : Corrélation entre l'hydrophobicité et l'auto-agrégation des souches S10 et S13 cultivées sur bouillon MRS

III. Résultats et Discussion

Les résultats de corrélation entre l'hydrophobicité et l'auto-agrégation des souches lactobacilles pures sont similaires aux résultats de corrélation entre l'hydrophobicité et l'auto-agrégation des souches lactobacilles isolées de beurre avec un coefficient de corrélation positive (Proche de 1)

D'après les figures 22 et 23 on observe que les résultats de la corrélation entre l'hydrophobicité et l'adhérence, auto-agrégation sont négatives pour les souches lactiques *L. satsumensis* S13 et *L. rhamnosus* S10 cultivées sur bouillon MRS (témoins) par contre la corrélation entre les deux aptitudes est positive lorsque les souches sont ré-isolées de beurre. Donc la matrice alimentaire a un effet positif sur la corrélation entre l'hydrophobicité et l'adhésion, auto-agrégation et l'adhérence bactérienne des lactobacilles probiotiques

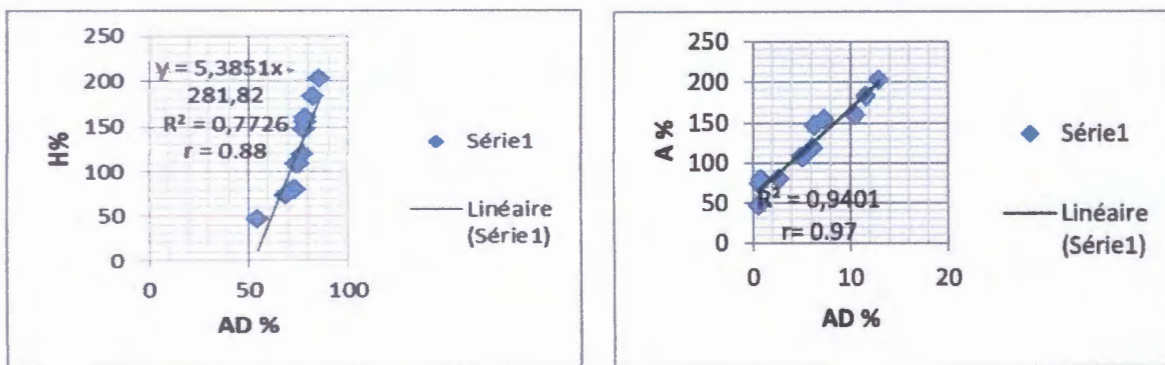


Figure 22 : Corrélation entre la capacité d'auto-agrégation et l'adhésion et entre l'hydrophobicité et l'adhérence de *L. satsumensis* S13 et *L. rhamnosus* S10 ré-isolé de beurre.

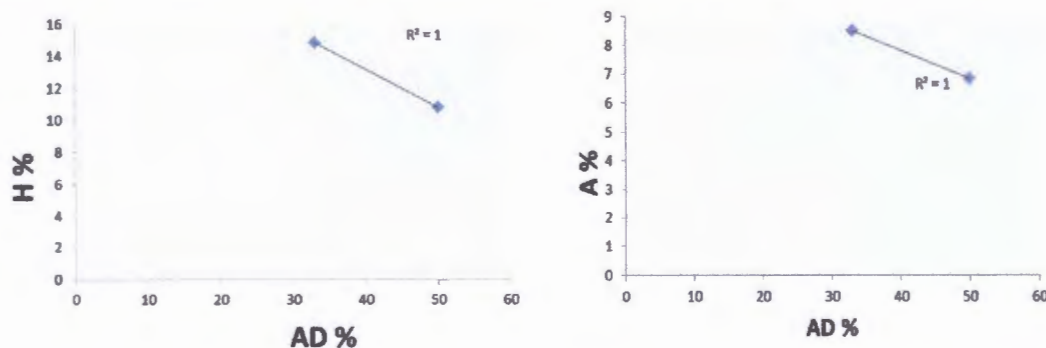


Figure 23 : Corrélation entre la capacité d'auto-agrégation et l'adhésion et entre l'hydrophobicité et l'adhérence de *L. satsumensis* S13 et *L. rhamnosus* S10 Témoins

Conclusion

Les corps gras ont toujours été perçus auprès des consommateurs comme des produits sains et constituent une partie importante du régime alimentaire. L'efficacité des probiotiques dépend de leur viabilité qui doit être maintenue au cours du processus technologique, de stockage et de conservation. De plus, les souches probiotiques commercialisées doivent survivre dans l'environnement du tractus gastro-intestinal.

Les résultats de la première partie expérimentale ont montré que *L. rhamnosus* S10 et *L. satsumensis* S13, ainsi que leur mixture disposent d'un complexe enzymatique capable de libérer des acides gras dans le milieu de culture. Sur une matrice alimentaire grasseuse, le beurre, les cultures et après une période d'adaptation arrive à dégrader la matière lipidique, ce qui a été révélé par une évolution de l'indice d'acidité. Par ailleurs, ces matrices alimentaires n'ont aucun effet défavorisant la survie et la croissance des souches mises au test.

Les résultats de la deuxième partie expérimentale ont montré que lorsque le probiotique est véhiculé dans une matrice alimentaire grasseuse (beurre), les principales propriétés probiotiques, à savoir l'hydrophobicité, la capacité de s'adhérer au tissu épithéliale, et l'auto-agrégation se trouve améliorées. Par ailleurs, la conservation du même produit sous régime du froid, ne réduit en aucun cas les aptitudes probiotiques des souches et cela est confirmé par la positivité des coefficients de corrélation.

L'incorporation de bactéries probiotiques comme additifs alimentaires dans les différents produits alimentaires tels que l'huile et le beurre a renforcé les propriétés acclamées pour la santé et a donné lieu à une consommation de plus en plus importante de ces produits.

***Références
bibliographiques***

- An Y.H, Dickinson R.B et Doyle R.J (2000).** Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. Handbook of bacterial adhesion: principles, methods and applications: 1- 27.
- Anukam K.C et Reid G (2007).** Probiotics 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. Curr Res Edu Topics Trends Appl Microbiol: 466-474.
- Argyri A.A, Zoumpopoulou G, Karatzas K.A.G, Tsakalidou E, Nychas G.J.E, Panagou E.Z et Tassou C.C (2013).** Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. Food Microbiol. Vol 33: 282-291.
- Arthur C, Salminen S et Isolauri E (2002).** Probiotics: an overview of beneficial effects. Vol 82: 279-289 .
- Behira B (2012).** Contribution à l'étude des espèces de Lactobacilles à caractère probiotique isolées de la poule domestique (*Gallus gallus domesticus*) de l'Ouest Algérien. Thèse de doctorat. Université d'Oran. Algérie.
- Bergamini C.V, E.R Hynes et C.A. Zalazar (2005).** Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. Int Dairy J. Vol 16: 856-866
- Brennan N.M, Ward A.C, Beresford T.P, Fox P. F, Goodfellow M et Cogan T.M (2002).** Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. Appl Environ Microbiol. Vol 82: 820-830.
- Cayuela T.A.S, Garc I.A, Bustos I, De Cadi N, Requena T, Mart I, Nez-Cuesta M.C (2014).** Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. Food Res Int: 44-50.
- Chilton S.N, Burton J. P et Reid G (2015).** Inclusion of Fermented Foods in Food Guides around the World. Can Centre for Human Microbiol Probiotic Res: 390-391.
- Coeuret V, Gueguen M et Vernoux J.P (2004).** Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. Int J Food Microbiol. Vol 97: 147- 156.
- Crow V.L, Holland R, Pritchard G.G et Collbear T(1994).** The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid bacteria. Int Dairy J. Vol 4:723-742.
- Dacosta Y et Aou T (2000).** La bioprotection des aliments : l'antagonisme bactérien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique. Ed Yves Dacosta. Paris: 3-21.
- Desmazeaud M (1996).** Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine: utilisation et innocuité. Cahiers Agricultures: 111-142.
- Dortu C et Thonart Ph (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires. Biotechnol Agron Soc Environ 13. Vol 1: 143-154.

- Ehrmann M.A, Kurzak P, Bauer J et Vogel R.F (2002).** Characterization of *lactobacilli* towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J Appl Microbiol*. Vol92: 966-975.
- Elhella Z et Satara S (2014).** Synthèse bibliographique sur les rôles des bactéries lactiques dans l'industrie agroalimentaire. Mémoire de Licence Université Ouargla. Algérie.
- FAO/ WHO (2002).** Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- Farnworth E.R (2008).** Kefir : from folklore to regulatory approval. *J Nutraceuticals Funct Med Foods*: 57-68.
- Farzanfar A (2006).** The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol Med Microbiol* Vol48: 151-152.
- Fuller R (1989).** Probiotics in man and animal. *J of Appl Bacteriol*. Vol 66: 365–378.
- Garry P et Leguern L (1999).** Les bactéries lactiques. *Bull. Liaison CTSCCV 6* .Vol 9: 423 430.
- Gogineni K.V, Morrow L.E et Malesker M.A (2013).** Probiotics: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *J Probiotics and Health*. Vol 1:1-11..
- Gu R.X, Yang Z.Q, Li Z.H, Chen S.L et Luo Z.L (2008).** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe*. 14: 313-317.
- Guglielmotti D.M, Marco M.B, Golowezye M, Reinheimer J.A et Quiberoni A.D.L (2007).** Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *Int Dairy J*. Vol 17: 916-925.
- Guiraud J. P et Rosec J. P (2003).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire, Dunod:238-245.
- Hassan A.N et Frank J.F (2001).** Starter Cultures and their use. *Appl Dairy Microbiol*: 151-205.
- Hattingh A.L et Viljoen C.B (2001).** Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J*. Vol 11: 1-17.
- Holzappel W.H, Haberer P, Snel J, Schillinger U et Huis-Veld H.J (2001).** Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol*. Vol 41: 85-101.
- Idoui T, Benhamada N et Leghouchi E (2010).** Microbial quality physicochemical characteristics and fatty acid composition of a traditional butter produced from cows' milk in East Algeria. *Grasas y Aceites* 61 : 232-236.
- Idoui T, Boudjerda J, Leghouchi E et Karam N.E (2009).** Lactic acid bacteria from Sheep's Dhan a traditional butter from sheep's milk: Isolation identification and major technological traits. Vol 3:177-183.
- Jankovic T, Frece J, Abram M et Gobin I (2012).** Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Int J San Eng Res*. Vol6: 20-21.

- Juanez M (2005).** Effects of culture condition on the growth and autoaggregation and ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRI 1294. *J Appl Microbiol*: 433-442.
- Kailasapathy K (2002).** Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Microbiol. Vol 3*: 39-48.
- Karam N.E, Dellali A et Zadi-Karam H (2012).** Activité lipolytique chez les bactéries lactiques: Renc. Rech. Ruminants. Vol 19. Université d'Oran. Algérie: 415.
- Kimoto-Nira H, Kobayashi M, Nomura M, Sasaki K et Suzuki C (2009).** Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition: Analysis by using different growth media. *Int J Food Microbiol. Vol 13*: 183-188.
- Kos B, Suskovic J.S, Vukovic, Simpraga M, Frece J et Matosic S (2003).** Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol. Vol 9*: 981-987.
- Kias A et Kriket A (2015).** Etude de coefficient de corrélation entre l'adhésion, l'auto-agrégation et l'hydrophobicité de quelques *Lactobacillus* probiotiques. Mémoire de Master. Université de Jijel.
- Lee Y.K, Nomoto K, Salminen S et Gorbach S (1999).** Handbook of Probiotics. ed. Lee, Y.K. New York: John Wiley Sons, Inc.
- Lin T.Y et Chien M.F.C (2007).** Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria
- Lin W, Hwang C, Chen L et Tsen H (2006).** Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol. Vol 23*: 74-81.
- Lyer R, Tomar, S. K, Singh, R et Sharma, R (2009).** Estimation of folate in milk by microbiological assay using trienzyme extraction method. *Milchwissenschaft*: 125-127.
- Marteau P et Seksik P (2005).** Probiotiques et alicaments in bactéries lactiques et probiotiques. De Luquet F.M et Corrieu G. Ed. Tec et Doc. Lavoisier. Paris: 256-260.
- Mekhtiche L (2003).** Les bactéries lactiques dans le milieu des viandes et produits carnés 1ère partie : classification et spécificité. Vol 14: 25-31.
- Ngwai Y.B, Adachi Y, Ogawa Y et Hara H (2006).** Characterization of biofilm-forming abilities of antibiotic resistant *Salmonella typhimurium* DT 104 on hydrophobic abiotic surfaces. *J Microbiol Immunol Infect. Vol 39*: 278-291.
- Nikolic M, Jovcic B, Kojic M et Topisirovic L (2010).** Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *Eur Food Res Technol* 231: 925-931.
- Normand M, Roland N, Richoux R et Kerjean J.R (2006).** Propriétés probiotiques des bactéries propioniques laitières. Programme Nutrition Santé: 1-42.

- Ozer B, Uzun Y.S et Kirmaci H.A (2009).** Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during Kasar cheese ripening. *Int J Dairy Technol* 61. Vol 3: 237-244.
- Palomares I , Morales P et Félix A (2007).** Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev Microbiol.* Vol 49: 47-49.
- Parada J.L , Caron C.R, Medeiros A.B.P et Soccol C.R (2007).** Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Braz Arch Biol Tech.* Vol 50: 521-542.
- Parracho H, Cartney A.L et Gibson G.R (2007).** Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proceedings of the Nut Soc* Vol 66: 407
- Parvez S, Malik K.A, Kang S et Kim H.Y (2006).** Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol.* Vol 100: 1175.
- Pascual L.M, Daniele M.B, Pajaro C et Barberins L (2006).** *Lactobacillus* species isolated from the vagina : identification hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance. *Contraception* Vol 73: 78-81.
- Patterson C.A (2008).** Probiotiques : bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base. *Agriculture and Agri-Food Canada AAFC:* 1-4.
- Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourlioux P et Bellon-Fontaine M.N (1997).** Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol.* Vol 63: 1725–1731.
- Quinto E.J, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J et Girbés T (2014).** Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food Nutr Sci:* 1765-1775.
- Rai V, Yadav B et Lakhani G.P (2013).** Application of probiotic and prebiotic in animals
- Regina C et Brandelli A (2010).** Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese. *Braz J of Microbiol.* Vol 41: 1-6.
- Riazi A. and Ziar H., 2008.** Growth and viability of yogurt starter organisms in honey-sweetened skimmed milk. *Afr J Biotech.* Vol 7: 2055-2063.
- Roduit F (2011).** Rapport : les probiotiques dans l'alimentation. Lycée-Collège de la Plante Rapport: 3-19.
- Roos S et Jonsson H (2002).** A high-molecular mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiol.* Vol 148: 433-442.
- RoudjS ,Belkheir K , Zadi-Karam H et Karam N.E (2009).** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European. J Sci Res* 34 Vol 2: 218-227.
- Sakili Det Issoual D (2003).** Physico-chemical study contribution of processing Moroccan men. *Physical and Chemical News* 23: 135-143.

- Schrezenmeir J et Vrese M (2001).** Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaching a definition. Institute of Physiol and Biochem of Nutr. Federal Dairy Res Center: 362.
- Solieri L, Bianchi A, Mottolèse G, Lemmetti F et Giudici P (2014).** *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by in vitro screening and principal component analysis. Food Microbiol. Vol 38: 240-249.
- Song D, Ibrahim S et Hayek S (2012).** Recent application of Probiotics in Food and Agri Sci: 3-4.
- Taybi O.N, Arfaoui A et Fadli M (2014).** Evaluation de la qualité microbiologique du lait cru dans la région du Gharb, Maroc Int Innovation Sci Res. Vol 9: 487-493
- Tulumogluet S, Yuksekdog Z.N, Beyatli Y, Simsek O, Cinar B et Yas E (2013).** Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. J Food Microbiol: 36-38.
- Tuo Y, Yu H , Ai L , Wu Z , Guo B et Chen W (2013).** Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. J Dairy Sci. Vol 96: 4252-4257.
- Venkatesan S , Kirithika M, Roselin , Ganesan R et Muthuchelian K (2012).** Comparative *in vitro* and *in vivo* study of three probiotic organisms, *Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus sp*, *Saccharomyces cerevisiae* and analyzing its improvement with the supplementation of prebiotics. J Plant Animal Environ Sci . Vol 2: 95.
- Wadstrom T, Andersson K, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S et Gullmar B (1987).** Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. J Appl Bacteriol. Vol 62: 513-520.
- Zehntner U (2008).** Comportement de la souche probiotique *Lactobacillus gasseri* K7 dans le fromage à pâte mi-dure affiné: 187-188.
- Zubillaga M, Weill R, Postaire E, Goldman C, Caro R et Boccio J (2001).** Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases: 569-579.

Annexes

Annexe I : Composition des bouillons, des géloses et tampons

Milieu MRS (Bouillon et gélose) a pH 6.5

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

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 60 min .

Gélose blanche (PH=6)

▪ Agar.....	15 g
▪ Eau distillée.....	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 60 min

Tampon PBS (Bouillon phosphate saline) a pH =7.2

▪ K ₂ HPO ₄	1.22g
▪ KH ₂ PO ₄	0.34g
▪ Nacl.....	8 g
▪ Eau distillée.....	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 60 min .

Tampon phosphate urée sulfate magnésium (pH 6.5)

▪ K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	22.2g
▪ KH ₂ PO ₄	7.26g
▪ Urée	1.8g
▪ MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.02g
▪ Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 60 min

Présenté par :

LEHTIHET Rahima

HAMLIL Rofia

Présidente : D^r OULED HADDAR .H

Examineur: M^r DAIRI .S

Encadrant: D^r IDOUI .T

Thème

Etude de l'effet matrices alimentaires huileuses et grasses sur les propriétés probiotiques et le coefficient de corrélation entre l'auto-agrégation, l'adhésion et l'hydrophobicité de deux souches de *Lactobacillus*

Résumé

Notre étude a porté sur l'effet des matrices alimentaires huileuses et grasses sur les propriétés des souches probiotiques à pouvoir lipolytique et l'étude de la corrélation entre trois aptitudes probiotiques : l'auto-agrégation, l'adhésion au tissu épithélial et l'hydrophobicité. Deux souches du genre *Lactobacillus* ont été utilisées dans cette étude. La matrice alimentaire grasse a un bon effet sur la croissance et la viabilité de ces deux souches et la mixture.

Les résultats ont montré que les souches probiotiques ré-isolées du beurre ont un pourcentage d'adhésion, d'auto-agrégation et d'hydrophobicité très important et élevé en comparaison avec ceux trouvés avec les mêmes cultures témoins. Le couple matrice alimentaire-froid agit en faveur des propriétés probiotiques avec des coefficients de corrélation positifs.

Mots clés : Probiotiques, *Lactobacillus*, matrice alimentaire, corrélation, froid.

Abstract

Our study focused on the effect of oily and fatty food matrices on the properties of probiotic strains with lipolytic activity and correlation study between three probiotic skills: Auto-aggregation, adherence to epithelial tissue and hydrophobicity. Two kind of *Lactobacillus* strains were used in this study. Fatty food matrix has a good effect on the growth and viability of this two strains and the mixture.

The results showed that the probiotic strains re-isolated from butter have an important percentage of adhesion, auto-aggregation and hydrophobicity and very high in comparison with those found with the same control cultures. The couple cold - food matrix is in favor of probiotic properties with positive correlation coefficients.

Keywords: probiotics, *Lactobacillus*, food matrix, correlation, cold

الملخص

اجريت هذه الدراسة لدراسة تأثير المواد الغذائية الزيتية و الدهنية على خصائص السلالات البروبيوتكية ذات نشاط دهني و دراسة العلاقة بين الخصائص البروبيوتكية : الالتصاق ، التجمع الذاتي و الخاصة الكارهة للماء. استخدم نوعين من السلالات في هذه الدراسة من جنس *Lactobacillus* المادة الغذائية الدهنية لها تأثير جيد على نمو و حيوية هذه السلالات و المزيج بينهما .

وأظهرت النتائج أن سلالات البروبيوتيك التي تم اعادة عزلها من الزبدة لديها نسبة التصاق، والتجمع الذاتي و خاصية كارهة للماء مهمة وعالية جدا مقارنة مع تلك التي وجدت مع نفس السلالات الشاهدة . الثنائية المادة الغذائية-البرودة هي في صالح خصائص البروبيوتيك مع معاملات ارتباط إيجابية.

الكلمات المفتاحية : *Lactobacillus* ، البروبيوتيك ، المادة الغذائية ، الارتباط عامل البرودة

