

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

PHA 09/10

Université de Jijel



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 والخلوية

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

Option : Pharmacologie Expérimentale



01
01

Intitulée

Recherche des bactéries lactiques
à effet probiotique
dans le tractus gastro- intestinal de Larus michahellis

Membres de Jury :

Président : Dr. Bouhous Mostefa

Examineur : Dr. Idoui Tayeb

Encadreur : Dr. Boudjerda Djamel

Présenté par :

Ayad Amina

Bouhali Houria

Année Universitaire : 2009- 2010

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail à ma famille qui m'a beaucoup encouragé :

A ma mère, la femme la plus chère au monde, la source de tendresse qui a tout donné sans rien recevoir (je remercie du fond de mon cœur).

A mon père, le plus cher homme au monde, la source de patience (je remercie du fond de mon cœur).

A ceux qui sont la source de mon inspiration et mon courage, à qui je dois de l'amour et de la reconnaissance :

A mes chères sœurs

A mes chers frères

A mes chères amies et copines chacune de son nom

Sans oublier mon binôme *Amina*, pour les moments de joie et de peine qu'on a partagés ensemble durant toute la période de nos études, sans oublier toute sa famille.

Ainsi tous les collègues de la promotion 2010.

A tous un grand Merci

Houria

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail à ma famille qui m'a beaucoup encouragé :

A ma mère, la femme la plus chère au monde, la source de tendresse qui a tout donné sans rien recevoir (je remercie du fond de mon cœur).

A mon père, le plus cher homme au monde, la source de patience (je remercie du fond de mon cœur).

A ceux qui sont la source de mon inspiration et mon courage, à qui je dois de l'amour et de la reconnaissance :

A mes chères sœurs

A mes chers frères

A mes chères amies et copines chacune de son nom

Et sur têt a mon fiancé **Kamel**

Sans oublier mon binôme **Houria**, pour les moments de joie et de peine qu'on a partagé ensemble durant toute la période de nos études, sans oublier toute sa famille.

Ainsi tous les collègues de la promotion 2010.

A tous un grand Mercie

Amina

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractères morphologiques de <i>L. michahellis</i>	02
Tableau 02 : Classification des BL et leurs principaux caractères.....	07
Tableau 03 : Liste des micro-organismes les plus utilisés comme probiotiques.....	12
Tableau 04 : Mode d'action de quelques bactériocines produits par les BL.....	15
Tableau 05: Principales bactéries lactiques associées aux produits laitiers fermentés et leurs rôles.....	19
Tableau 06: Principales bactéries lactiques associées aux produits de panification, carnés et végétaux et leurs rôles.....	20
Tableau 07: Profils biochimiques des souches des bactéries lactiques isolées.....	36
Tableau 08: Profils fermentaires des sucres des souches isolées.....	37
Tableau 09: Les noms scientifiques des espèces identifiées.....	38
Tableau 10: Evaluation de l'acidité et du pH pendant 24h.....	41
Tableau 11: Pouvoir protéolytique des souches étudiées sur milieu YMA.....	43
Tableau 12: Production de polysaccharides par les bactéries lactiques identifiées.....	45
Tableau 13: Estimation de la population microbienne des bactéries lactiques après 24h d'incubation.....	46
Tableau 14: La croissance des souches des bactéries lactiques à pH 3 et à pH 4.....	47
Tableau 15: La croissance des souches des bactéries lactiques en présence de sels biliaires.....	49
Tableau 16: Résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques.....	50
Tableau 17: Résultats d'interaction entre les BL et les souches des entérobactéries.....	52

Liste des figures

Figure 01 : <i>Larus michahellis</i>	02
Figure 02: Les différentes parties de prélèvement des échantillons.....	23
Figure 03 : Examen macroscopique des souches des bactéries lactiques.....	32
Figure 04 : Exemple de microphotographies des souches isolées.....	33
Figure 05: Exemple de test de la croissance a différente température.....	33
Figure 06 : Exemple de la production d'acétoïne.....	34
Figure 08 : Exemple du test de la recherche de la réductase.....	35
Figure 12: Répartition des espèces des bactéries lactiques en pourcentage.....	39
Figure 14: a, b, c: évolution de l'acidité pendant 24h d'incubation.....	42
Figure 15: Exemple de la production de polysaccharides.....	44
Figure 16: Quelques exemples de la croissance en milieu acide.....	48
Figure 17: Exemple de test de la résistance des bactéries lactiques (PP _{2,3}) aux antibiotiques.....	57
Figure 18 : Exemple de test d'antagonisme des bactéries lactiques avec <i>E.coli</i> 29 L ⁺	49

Liste des abreviations

L. michahellis: *Larus michahellis*
G. leucophée: Goéland leucophée
BL: bactéries lactiques
Hétéro: Hétérofermentaire
Homo: Homofermentaire
PTS: phosphotransférase
MLE: enzyme malolactique
Citp: citrate perméase (Citp).
EPS: exopolysaccharides
FAO- WHO: Food Agricultural Organisation- World Health Organisation
G(+): Gram positif
G(-): Gram négatif
MRS: Man Rogosa Sharpel
MEVAG: Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides
LDC: lysine décarboxylase
ODC: Ornithine décarboxylase ODC
ADH: arginine dihydrolase
DO: densité optique
O₂: oxygène.
CO₂: dioxyde de carbone.
H₂O: eau.
H₂O₂: peroxyde d'hydrogène
O^{-2°}: superoxyde
OH: l'hydroxyle
TLR: toll- like receptors
CLR: C type lectin receptors
DC: cellules dendritiques
NK: natural killer
NaOH: hydroxyde de sodium.
NaCl: chlorure de sodium.
pH: potentiel d'hydrogène.

V: volume.

g: gramme.

ml: millilitre.

μl: microlitre

L: litre

N: normalité

Cm: centimètre

mn: minute.

h: heure.

°C: degré celsius.

D°: degré dornic.

sp: espèce.

ssp: sous espèce.

VPI: α-naphtol à 6% dans l'alcool absolu.

VPII: solution de potasse à 15% d'eau distillé.

OX: oxydase.

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Première partie : Analyse bibliographique

Chapitre I : *Larus Michahellis* (Goéland leucopnée)

I-1. Généralités sur <i>Larus Michahellis</i>	2
I-2. Classification.....	2
I-3. Cycle de reproduction.....	3
I-4. Régime Alimentaire.....	3
I-5. Habitat.....	3
I-6. Répartition géographique.....	3

Chapitre II : Les bactéries lactiques

II-1. Définition.....	4
II-2. Caractères généraux.....	4
II-3. Classification.....	4
II-4. Métabolisme.....	8

Chapitre III : Les bactéries lactiques à effet probiotique

III-1. Définition des probiotiques.....	11
III-2. Critères de sélection des probiotiques.....	11
III-3. La pharmacocinétique.....	12
III-4. Le rôle des BL probiotiques sur la santé	14
III-5. Rôle des bactéries lactique en industrie agroalimentaire.....	18

Deuxième partie : Etude expérimental

I. Matérielles et méthodes	21
I-1. Matériel	21
I-1-1. Les souches utilisées.....	21
I-1-2. Milieux de culture.....	21
I-1-3. Produits chimiques et réactifs.....	21
I. 1. 4. Autres matériels.....	22
I. 2. Méthodes	23
I. 2. 1. Origine des souches des BL.....	23
I. 2. 2. Autopsie des poussins de <i>L. michahellis</i>	23
I- 2-3. Isolement, purification.....	23
I-2-4. Identification des bactéries lactiques.....	24
I-2-4-1. Examen macroscopique.....	24
I-2-4-2. Examen microscopique.....	24
I-2-5. Tests biochimiques.....	25
• Test de croissance à différentes températures.....	25
• Etude des enzymes respiratoires.....	25
• Recherche de l'arginine dihydrolase ADH.....	26
• Recherche de citratase.....	26
• Recherche de type fermentaire.....	26
• Production d'acétoïne.....	27

• Profil fermentaire des sucres.....	27
I-2-6. Etude de quelques propriétés technologiques des bactéries lactiques.....	28
I-2-6-1. Etude de pouvoir acidifiant.....	28
I-2-6-2. Etude de pouvoir protéolytique.....	29
I-2-6-3. Etude de pouvoir texturant.....	29
I-2-7. Estimation des aptitudes probiotiques <i>in vitro</i>	29
I-2-7-1. Estimation de la croissance.....	29
I-2-7-2. Croissance sur milieux hostiles.....	30
I-2-7-3. Résistance aux antibiotiques.....	30
I-2-7-4. Pouvoir antagoniste des bactéries lactiques <i>in vitro</i>	30
II. Résultats et discussions.....	32
Conclusion générale.....	54
Références bibliographique.....	56
Annex.....	65

Introduction

Introduction

La flore intestinale constitue la communauté bactérienne la plus importante dans l'organisme, non seulement par son nombre et sa diversité, mais aussi du fait de ses multiples effets sur le maintien de l'homéostasie (**Piquet et al., 2007**). Les bactéries lactiques qui font partie de cette flore intestinale sont considérées parmi les microorganismes les plus importants, appelées probiotiques qui sont identifiées pour la première fois par Metchnikoff en 1907 (**Holzappel et al., 2004**). Elles sont utilisées depuis longtemps à cause de leurs effets bénéfiques chez l'homme et l'animal, cet effet bénéfique se traduit par: l'inhibition des germes pathogènes, la disponibilité aux nutriments, l'amélioration du système immunitaire ainsi que, leur effet sur les maladies métaboliques (**Rychen et Simoes Nunes, 1995**). De plus, elles ont un grand rôle dans l'industrie alimentaire en améliorant les propriétés organoleptiques des aliments (**Dortu et Thonart, 2008**). Les critères de sélection *in vitro* de ces bactéries pour l'utilisation comme auxiliaire technologique et pour l'entretien de la santé de l'homme comme ingrédient probiotique dans les aliments et dans les préparations pharmaceutiques restent l'une des préoccupations majeures des laboratoires de microbiologie.

Dans le but de l'enrichissement de la banque de données dans le domaine des bactéries lactiques nous nous sommes intéressés à effectuer ce travail et qui se divise en deux parties : une partie bibliographique dont le but est l'enrichissement de nos connaissances sur *Larus michahellis*, les bactéries lactiques et leur effet probiotique, et une deuxième partie pratique qui a pour axe principale le screening des bactéries lactiques dans le tractus gastro-intestinal d'un oiseau autochtone sauvage et omnivore appelé *Larus michahellis* ainsi que la détermination de leurs aptitudes à être utilisées comme probiotiques.

L'importance de ce travail réside dans la rareté ou l'absence des travaux effectués sur la flore lactique de cet oiseau.

Partie I:
Analyse bibliographique

Chapitre I:
Larus michahellis

I-1. Généralités sur *Larus michahellis*

Le mot goéland est un emprunt au breton " gouelan" qui signifie pleurer. Le Goéland leucophée est une espèce appartenant à la famille des Laridés (Rentz *et al.*, 2007). Cet oiseau, appelé aussi « gabian » (Deltor, 2003).

Le G. leucophée ou *L. michahellis* se reconnaît par sa forte poitrine et ses longues pattes jaunes (Tableau 01) (Rentz *et al.*, 2007). Sa tête est plutôt carrée, blanche, avec des stries très fines. Son bec est court et épais, souvent jaune orangé vif avec une tache rouge. L'œil est jaune-gris mat ou jaune-citron vif (Figure 01) (Collin, 2003). Le cercle orbital est rouge (Rentz *et al.*, 2007).



Figure 01 : *Larus michahellis* (Collin, 2003).

Tableau 01 : caractères morphologiques de *L. michahellis* (Rentz *et al.*, 2007).

Critères	Valeurs
Taille (de long de tête à la queue)	58 à 68 cm
Envergure	130 à 158 cm
Poids	750 à 1250g
Etat de l'espèce	Sauvage
Statut	Nicheur

I-2. Classification

- Règne : Animalia
- Embranchement : Chordata
- Classe : Aves
- Ordre : Charadriiformes
- Famille : Laridae
- Nom vernaculaire : Goéland leucophée
- Synonymie : * *Larus argentatus michaelis*

* *Larus cachinnans michahellis* Naumann

* *Larus michaellis*

I-3. Cycle de reproduction

Les goélands leucophées s'installent sur les sites de reproduction dès le mois de décembre (**Valérié- Claude et al., 2002**). La femelle pond fin mars/ avril, deux à trois œufs qui sont de couleur crème-olive et tachetés de brun. L'incubation dure 28 à 30 jours. Peu après l'éclosion, les poussins qui possèdent un duvet gris avec des marques foncées restent près du nid 35 à 40 jours (**Deltort, 2003 ; Berger, 2008**). Les poussins volent au bout de 42 à 48 jours (**Rentz et al., 2007**). Ils sont immatures pendant trois ans et la première reproduction a lieu vers trois ou quatre ans (**Cadiou et al., 2002**).

I-4. Régime Alimentaire

Le G. leucophée est chasseur, prédateur, cueilleur des vers de terre dans les labours et les rizières. Par fois il se montre comme un opportuniste et se nourrit soit sur des poissons non consommables et rejetés dans la mer, et dans la plupart des cas tire la major partie de son aliment des décharges publiques (**Berger, 2008**). Ce régime diversifie le qualifie d'être un omnivore avec un régime alimentaire très varié (**Deltort, 2003**).

I-5. Habitat

La biologie de Goéland leucophée se caractérise par une très grande capacité d'adaptation. Il niche principalement sur les îles rocheuses et îlots mais aussi dans les falaises côtières, les marais salants, le long des cours d'eau ou encore en ville (**Berger, 2008**), sur les terrasses des bâtiments et également à l'intérieur des terres (**Collin, 2003**).

I-6. Répartition géographique

On retrouve le Goéland leucophée sur l'ensemble des îles et côtes du bassin méditerranéen mais également sur le littoral atlantique du Maroc à la Bretagne. Il occupe également les îles macaronésiennes. Les plus importantes colonies occidentales sont situées en milieu insulaire, sur l'île Berlenga (Portugal), sur les îles de Marseille et les îles Baléares. Certains individus quittent leur site de nidification en période internuptiale et vont rejoindre le littoral Français ou Espagnol mais aussi l'Afrique du Nord. On en retrouve ainsi en abondance sur les côtes atlantiques et de la mer du Nord, jusqu'au grands lacs alpins. On les trouve aussi en Croatie, Italie, Russie, Turquie et en Ukraine (**Berger, 2008**).

Chapitre II:

Les bactéries lactiques

II-1. Définition

Les bactéries lactiques (BL) ont été définies pour la première fois par Orla-Jensen au début du 19^{ème} siècle **(Novel, 1993)**. Ce sont un groupe hétérogène de micro-organismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme **(Dortu et Thonart, 2009)**. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres de bactéries à Gram (+) possédant des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes **(Sutra et al., 1998)**.

II-2. Caractères généraux

La caractéristique principale qui fait l'unité de ce groupe bactérien est la production de l'acide lactique à partir de différents substrats carbonés mais, il convient de prendre en compte de nombreux caractères microbiologiques :

- 1- Ce sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes **(Rizk, 2006)**. Elles ont des forme des bacilles ou des coques, généralement immobiles, jamais sporulées, et dépourvus de catalase et de nitrate réductase **(Bornert, 2000 ; Yao et al., 2009)**.
- 2- Les BL sont des anaérobies facultatifs ou microaérophiles **(Prescott et al., 2003)**. En outre, elles ne produisent pas d'indole, ni l'hydrogène sulfureux **(Rizk, 2006)**
- 3- Elles sont incapables de synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème **(Bourgois et Larpent, 1996)**.
- 4- Ce sont des bactéries non pathogènes **(Laouabdia Sellami et al., 2007)**.
- 5- Leur capacité de biosynthèse est faible, ce qui explique leur polyauxotrophie pour divers acides aminés, des bases nucléiques, des vitamines et des acides gras **(Novel, 1993)**.
- 6- Les BL peuvent subdiviser en trois groupes biochimiques : homofermentaires, hétérofermentaires et homo-hétérofermentaires **(Bourgois et Larpent, 1996)**.

II-3. Classification

Les bactéries lactiques font partie d'un grand groupe bactérien divisé en deux catégories en fonction de leur morphologie : les lactobacilles et les coques **(Rizk, 2006)**.

Orla-Jensen a été regroupé les BL dans les groupes suivant : *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Tetracoccus*, selon leurs critères morphologiques et phénotypiques **(Tableau 02) (Holzapfel et al., 2001)**. Les genres de BL les plus importants sont :

II-3-1. Genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre représentatif des BL. Les bactéries de ce genre ont des cellules allongées, régulières en forme de bâtonnets ou coccobacilles, isolés ou en chaînettes de taille variable, immobiles ou mobiles grâce à des flagelles péritriches (Rizk, 2006).

Elles sont microaérophiles, catalase négative, mais quelques souches présentent une pseudocatalase (Felis et Dellaglio, 2007). Selon le type de fermentation, les bactéries de ce genre ont été classées en trois groupes :

- **Groupe I** : ce sont des *Lactobacillus* homofermentaires stricts et thermophiles (Novel, 1993). La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers, mais un grand nombre a été isolés chez l'homme et les animaux (Sutra et al., 1998)
- **Groupe II** : ce sont des *Lactobacillus* hétérofermentaires facultatifs mésophiles (Novel, 1993). Elles sont isolées dans les fourrages, les produits laitiers et les produits carnés (Sutra et al., 1998).
- **Groupe III** : Ce sont des *Lactobacillus* hétérofermentaires stricts, mésophiles ou thermophiles (Laouabdia Sellami et al., 2007). Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'homme (Novel, 1993).

II-3-2. Genre *Streptococcus*

Ce genre comporte plusieurs espèces mais l'espèce thermophile *St. thermophilus* est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique (Sutra et al., 1998). Ce sont des cocci ovalaires ou sphériques, isolés en diplocoques, chaînette ou chaînes, immobiles en générale (Corrieu et Luquet, 2008). On peut l'isoler des produits laitiers (Novel, 1993).

II-3-3. Genre *Lactococcus*

En 1985 Schleifer et al., se fondant sur les critères moléculaires ont proposé de séparer les streptocoques lactiques mésophiles (du groupe N) du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus*. Elles se trouvent en paire ou en chaînes (Novel, 1993). Elles réalisent une fermentation homolactique (Corrieu et Luquet, 2008). Les produits végétaux constituent le réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Sutra et al., 1998).

II-3-4. Genre *Enterococcus*

Ce sont des cocci anaérobies facultatives, de forme sphérique ou ovoïde, arrangées en paires ou en courtes chaînes (Myers, 2007). Elles réalisent une fermentation homolactique

(Prescott et al., 2003). Les *Enterococcus* sont ubiquistes, elles se trouvent libres dans le sol, les plants, les produits laitiers, et comme une partie de la flore normale du tractus gastrointestinal de l'homme, du chien, des oiseaux, chat, cheval, et d'autres animaux **(Bascomb et Manafi, 1998).**

II-3-5. Genre *Leuconostoc*

Le genre *Leuconostoc* inclue des cocci anaérobies facultatifs pouvant être allongés ou elliptiques et disposés par paires ou en chaîne **(Albanese et al., 2006)**. Ces espèces sont généralement capsulées **(Guiraud et Rosec, 2004)**. Ils réalisent la fermentation hétérolactique **(Novel, 1993)**. Ils peuvent être isolés de plantes, de fourrage ensilé et de lait **(Prescott et al., 2003)**.

II-3-6. Genre *Pediococcus*

Ce sont des coques homofermentaires dont la particularité est le groupement en tétrades. Ils sont mésophiles, anaérobies facultatifs **(Sutra et al., 1998)**. Les *Pediococcus* sont généralement catalase négative mais quelques souches produisent une pseudocatalase. **(Holzapfel et al., 2001)**. Ils sont le plus souvent incapables d'utiliser le lactose. Les différentes espèces sont présentes dans les végétaux, parfois dans les boissons alcoolisées de plus elles peuvent aussi être trouvés dans le lait et les produits laitiers **(Novel, 1993)**.

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*) ne sont pas des bactéries lactiques typiques, mais leur usage fait qu'elles sont classées avec les bactéries lactiques **(Sutra et al., 1998)**.

Tableau 02 : classification des BL et leurs principaux caractères (Holzapfel *et al.*, 2001).

	Groupe	Catalase	Nitrate réductase	Fermentation	Genre	Quelques espèces
Lactobacilles	<i>Betabacterium</i>	-	-	Hétéro	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. viridescens</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. hilyardii</i>
					<i>Weissella</i>	
	<i>Thermobacterium</i>	-	-	Homo	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. jensenii</i> , <i>Lb. salivarium</i> , <i>Lb. remini</i> , <i>Lb. vitulinus</i> .
	<i>Streptobacterium</i>	-	-	Homo- Hétéro	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. coryniformis</i> , <i>Lb. curvatis</i> , <i>Lb. homohiochii</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. yamonshiensis</i>
<i>Carnobacterium</i>						
	<i>Microbacterium</i>	+	+	Homo	<i>Brochothris</i>	
Coques	<i>Streptococcus</i>	-	-	Homo	<i>Streptococcus</i>	<i>St. thermophilus</i>
					<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. garvieae</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. piscium</i> , <i>Lc. plantarum</i> , <i>Lc. raffinolactis</i> .
					<i>Enterococcus</i>	<i>Ec. faecalis</i> , <i>Ec. faecium</i> , <i>Ec. gallinarum</i> , <i>Ec. raffinosus</i>
					<i>Vagococcus</i>	
	<i>Betacoccus</i>	-	-	Hétéro	<i>Leuconostoc</i>	<i>Ln. carnosum</i> , <i>Ln. citreum</i> , <i>Ln. fructosum</i> , <i>Ln. gelidum</i> , <i>Ln. inhae</i> , <i>Ln. lactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Ln. pseudomesenteroides</i>
					<i>Oenococcus</i>	
					<i>Weissella</i>	
<i>Tetracoccus</i>	+ ^I	+	Homo	<i>Pediococcus</i>	<i>Pc. acidilactici</i> , <i>Pc. classenii</i> , <i>Pc. damnosus</i> , <i>Pc. dextrinicus</i> , <i>Pc. ethanolidurans</i> , <i>Pc. parvulus</i> , <i>Pc. pentosaceus</i> , <i>Pc. stilesii</i>	
				<i>Tetragenococcus</i>		

I : le genre *Pediococcus* est catalase négatif mais quelques souches possèdent une pseudocatalase qui donne une réaction positive

II-4. Métabolisme

II-4-1. Métabolisme carboné

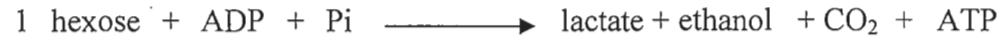
- **Métabolisme des sucres**

L'une des caractéristiques des BL est qu'elles ne sont capables de cataboliser qu'un nombre réduit de sucres de carbone via les voies métaboliques générales suivant :

- **Voie homofermentaire** (*Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*).



- **Voie hétérofermentaire** (*Leuconostoc* et *Lactobacillus*)



Si les accepteurs d'électrons sont externes l'acétate sera formé à la place de l'éthanol.

- **Voie de bifidum** (*Bifidobacterium*) : 2 glucoses \longrightarrow 2 lactates + 3 acétates

Le glucose entre dans la cellule et prend la voie de la glycolyse (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Le galactose peut être transformé par deux voies distinctes : la voie du Tagatose et de Leloir (**Thompson, 1980**).

Le lactose est métabolisé par B-galactosidase en D-glucose et D-galactose, suivie de conversion de D-galactose en D-glucose-6-phosphate via la voie de Leloir ; alors que D-galactose-6-phosphate prend la voie du Tagatose (**Bissett et Anderson, 1974**).

Le pyruvate est l'intermédiaire clé du métabolisme des BL ; il est converti majoritairement en lactate via la lactate déshydrogénase chez les lactocoques et les lactobacilles homofermentaires (**Goffin et al., 2005**).

- **Métabolisme de l'acide citrique**

Le citrate pénètre dans la cellule via une perméase à pH acide (chez *St. diacetylactis*) à l'intérieure des cellules, le citrate est transformé en acétate et en oxaloacétate par le citrate lyase. L'acétate produit est accumulé par les cellules, alors que l'oxaloacétate est converti en pyruvate et en CO₂ par l'action d'oxaloacétate décarboxylase (**Sánchez et al., 2008**).

- **Métabolisme de l'acide malique**

Le métabolisme de l'acide malique ne concerne réellement que les souches bactériennes naturellement présentes dans les moûts et les vins (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Leuconostoc oenos est la bactérie responsable de la fermentation malolactique. Elle dégrade l'acide malique en produisant de l'acide lactique et de CO₂ (Davis *et al.*, 1986).

L'enzyme responsable de la fermentation malolactique est appelée : enzyme malolactique MLE, c'est une malate- décarboxylase (Novel, 1993).

- **Production de polysaccharides**

Les polysaccharides sont regroupés en trois classes selon leur localisation au sein de la cellule : polysaccharides intracellulaires, polysaccharide de l'enveloppe, et les exopolysaccharides (EPS). Ces derniers sont classés en deux grands groupes :

- **Les homopolysaccharides** : longues chaînes saccharidiques, composées d'un type de saccharide tel que α -D-glucanes produit par *Ln. mesenteroides*.

- **Les hétéropolysaccharides** : correspondent à des polymères d'oligosaccharides avec au moins deux saccharides différents (Corrieu et Luquet, 2008). La souche *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* HP1, isolée de grain de Kéfir est responsable de la production de kefiran (hétéropolysaccharide) composé de glucose et galactose (Frengova *et al.*, 2002).

II-4-2. Métabolisme Azotée

De par leur charge et leur taille, les protéines et les oligopeptides du lait ne peuvent traverser la membrane cytoplasmique des BL (Novel, 1993). Leur hydrolyse nécessite la présence des protéases extracellulaires et des peptidase intracellulaires (Roudj *et al.*, 2009).

- **Les protéases** : elles dégradent des protéines natives par exemple : caséine κ , la caséine β , β -lactoglobuline les caséines α_s et du α - lactalbumine. Elles sont classées en trois types : P_I, P_{II}, P_{III} (Novel, 1993). *Lb. plantarum* et *Lb. brevis* possèdent des protéases de type P_I et P_{III} (Roudj *et al.*, 2009).

- **Les peptidases** : ils sont capables de hydrolysées des peptides issus de la dégradation des protéines (Corrieu et Luquet, 2008). Les peptidases des BL comportent les endopeptidases et les aminopeptidases qui sont responsables de l'hydrolyse des caséines α_{s1} chez *Lb. helveticus* CNRZ 32 (Sridhar *et al.*, 2005).

- **Activité protéolytique**

La protéolyse est mieux étudiée chez *Lc. lactis* : L'endoprotéase situé à la surface bactérienne (protéase de paroi) dégrade les caséines en oligopeptides.

Certains peptides résultant de cette caséinolyse sont prise en charge par deux systèmes de transport des oligopeptides (Opp et Opt) pour traverser l'enveloppe bactérienne. Des di et tripeptides présents dans le milieu peuvent aussi être transportés par deux autres systèmes (DtpT et Opt).

Enfin, dans le cytoplasme bactérien de nombreuses peptidases concourent à achever l'hydrolyse des peptides en acides aminés.

- **Catabolisme des acides aminés**

Le catabolisme des acides aminés génère de l'énergie par les voies suivantes:

- la décarboxylation des acides aminés, en particulier celle de l'aspartate, glutamate, l'histidine (**Corrieu et Luquet, 2008**).
- catabolisme de l'arginine : chez *Lc. lactis* subsp. *lactis* et son biovar *diacetylactis* par le système de l'arginine désiminase (**Novel, 1993**).
- catabolisme de la sérine en pyruvate et acétate, qui est catalysée par une sérine déshydratase chez *Lb. murinus*, *Lb. fermentum* (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Les voies cataboliques génèrent des molécules aromatiques soit par une réaction d'élimination soit par une réaction de transamination (**Smit et al., 2005**).

II-4-3. Métabolisme lipidique

Les activités d'hydrolyse d'esters ont été mesurées à de nombreuses bactéries lactiques. Ces activités sont généralement plus importantes chez *St. thermophilus* et les lactobacilles que chez les lactocoques. D'une manière générale, on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec des acides gras à chaînes courtes (C₂ à C₈). Des lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaînes longues (>C₈) (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Chapitre III:
Les bactéries lactiques
à effet probiotique

III-1. Historique et définition des probiotiques

Le mot probiotique est dérivé de Grec « probios » signifier « pour la vie » (Myers, 2007). Le concept probiotique est né de la théorie de la longévité de Metchnikoff en 1907 : il fut le premier à proposer l'utilisation de lactobacilles de yaourts pour la restauration de la microflore dans le tractus gastrointestinal (Rousseau, 2004).

Lilly et Stillwell furent apparemment les premiers en 1965 à utiliser le terme choisirent des « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » (Luquet et Corrieu, 2005).

En 1974, Parker redéfinit les probiotiques comme : « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore » (Savadojo *et al.*, 2006).

Afin de souligner la nature microbienne de probiotiques, Fuller (1989) a redéfini le terme comme suit : « un supplément alimentaire microbien vivant qui affecte bénéfiquement l'animale hôte en améliorant sa balance microbienne » (Fuller, 1991).

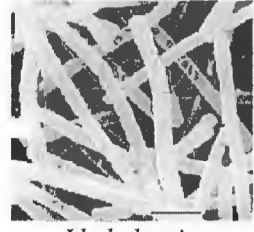
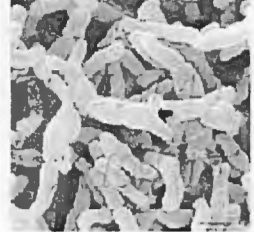
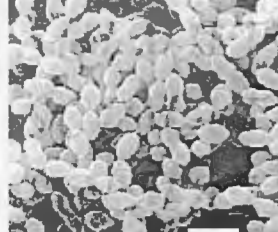

Selon la définition de la FAO- WHO (Food Agricultural Organization –World Health Organization), généralement adaptée, le terme probiotique désigne un micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité adéquate, exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (Piquet *et al.*, 2007).

III-2. Critères de sélection des probiotiques

Le terme probiotique regroupe plusieurs organismes différents (Tableau 03) (Myers, 2007). Un grand nombre de probiotiques sont des BL (Kim *et al.*, 2008), dont les principales espèces font partie du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Biavati *et al.*, 2000).

Certaines autres espèces bactériennes ont toutefois été utilisées (comme certaines souches non pathogènes d'*Escherichia coli*), voir des micro-organismes non bactériens, en particulier la levure *Saccharomyces boulardii* (Piquet *et al.*, 2007).

Tableau 03 : Liste des micro-organismes les plus utilisés comme probiotiques (Myers, 2007)..

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Autres micro-organismes
 <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. johnsonii</i> <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. salivarius</i> <i>Lb. lactis</i>	 <i>B. breve</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. longum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. lactis</i> <i>B. adoliscensis</i>	 <i>St. thermophilus</i> <i>St. thermophilus</i> <i>Ec. faecium</i> <i>Ec. faecalis</i>	 <i>Sc. boulardii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium butyricum</i> Levures : <i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Les critères de sélection des BL à effet probiotique incluent :

- 1- des BL qui ne présentent pas de caractère de pathogénéicité.
- 2- ne génèrent pas de substances toxiques (Corrieu et Luquet, 2008).
- 3- stables génétiquement et facilement produit à grand échelle (Biavati et al., 2000).
- 4- viables dans les milieux acides (résistances à l'acide) (Novel, 1993).
- 5- résistantes aux sels biliaries.
- 6- capables d'adhérer et de coloniser le tractus gastrointestinal (Myers, 2007).
- 7- produisant des substances antimicrobiennes (comme: bactériocines).
- 8- pouvant être à l'origine d'une stimulation immunitaire (Rousseau, 2004).

III-3. La pharmacocinétique des BL à effet probiotique

Les bactéries les plus isolées de l'intestin humain et animal et sélectionnées comme probiotiques, incluent les espèces du genre *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus*. Cependant, certains autres BL qui ne sont pas des habitants normales du tractus intestinal peuvent être utilisés comme probiotiques. La plupart de ces bactéries sont utilisés dans les produits laitiers et incluent *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*

(Moreira *et al.*, 2005). La pharmacocinétique des souches potentiellement probiotiques est en relation étroite avec la dose et le type d'administration de cette souche à l'hôte (Pavan, 2003).

III-3-1. La survie dans l'intestin

La survie de ces bactéries dans le tractus gastrointestinal suppose qu'elles puissent résister à un certain nombre de barrières physiologiques, parmi lesquelles la sécrétion d'acide gastrique, les acides biliaires, les peptides antimicrobiens du mucus et ceux sécrétés par certaines cellules intestinales (exemple : lactoferrine, lysozyme) (Piquet *et al.*, 2007).

La présence d'hydrolases et des transporteurs de sels biliaires chez les bactéries lactiques probiotiques indique leur adaptation au tractus gastrointestinal, et leur capacité de survie dans des environnements riches en acides et sels biliaires comme l'estomac et l'intestin.

En outre, La présence d'un grand nombre de gènes codants pour le transport et l'utilisation de carbohydrate, et pour la production d'exopolysaccharides et les agents antimicrobiens entraîne une bonne adaptation (Salminen *et al.*, 2005).

III-3-2. L'adhérence

L'adhérence des BL à la surface épithéliale et muqueuse se fait soit de manière non spécifique par des interactions électrostatiques ou hydrophobes soit de manière spécifique par des récepteurs (Buck *et al.*, 2005).

Parmi ces récepteurs il existe des récepteurs protéiques, carbohydrates, et les acides lipoteichoïques dans les cellules bactériennes (Guglielmetti *et al.*, 2008).

D'autre part, les fibronectines sont l'un des récepteurs eucaryotiques qui servent de médiateur de l'adhérence de lactobacilles aux cellules épithéliales (Åvall-Jääskeläinen *et al.*, 2003).

III-3-3. Colonisation ou persistance

La possibilité d'une colonisation durable de l'écosystème digestif par un probiotique a longtemps été considérée comme conceptuellement impossible en raison d'un grand déséquilibre de force en faveur de l'écosystème endogène. On parle donc de persistance des bactéries lactiques dans l'intestin (Luquet et Corrieu, 2005).

III-4. Le rôle des BL à effet probiotique sur la santé

III-4-1. Inhibition des germes pathogènes

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

a. Par compétition aux récepteurs d'adhérence

Certains souches probiotiques ont choisit leur capacité d'adhérence à l'épithélium pour la compétition avec les pathogènes sur les récepteurs d'adhérence (**Fuller, 1991**).

Ces probiotiques limitent l'adhérence des micro-organismes pathogène entéroinvasifs (Salmonelles, Shigelles, *E. coli* entérotoxigène, *Vibrio cholerae*) aux cellules épithéliales intestinales (**Sherman et al., 2005**).

Exemple *Lb. acidophilus* et quelque bifidobactéries peuvent adhérer aux entérocytes humain (comme les cellules CA-Co-2) et inhiber l'adhérence des *E. coli* entérotoxigénique et entérotoxigénique, ainsi que *Salmonella typhimurium* et *Yersinia pseudotuberculosis* (**Macfarlane et al., 1999**).

b. compétition aux nutriments

Les BL peuvent inhiber les germes pathogènes par la compétition aux nutriments tels que l'inhibition de *Clostridium difficile* par la compétition pour le glucose monomérique, N-acétyl- glucosamine, et acide sialique qui se trouvent dans le colon (**Fuller, 1991**).

En outre, les lactobacilles peuvent inhiber certains pathogènes par l'utilisation de leur activité arginine désaminase. Cet enzyme catalyse la transformation irréversible de l'arginine en citrulline et ammonium et réduit donc la disponibilité en arginine dans le milieu pour les pathogènes qui la métabolisent normalement via l'arginine décarboxylase en polyamine (**Rousseau, 2004**).

c. La production de facteurs d'interaction (antagonisme)

- **Les acides organiques**

Les propriétés inhibitrices des BL sont attribuées à la production d'acides organiques, notamment **l'acide lactique**. La fraction non dissociée de l'acide lactique qui est

prédominante à pH acide est généralement plus toxique pour les cellules microbiennes (Sutra *et al.*, 1998). Cette fraction peut diffuser passivement à travers la membrane et détruire le gradient électrochimique de proton ou altérer la perméabilité de la membrane ce qui engendrerait une perturbation des systèmes de transport de substrats.

L'acide acétique peut interagir avec les membranes cellulaires et causer une acidification intracellulaire et une dénaturation protéique (Ammor, 2004).

- **Les bactériocines**

Ce sont des molécules de nature protéique, douées d'une activité bactéricide ou bactériostatique.

Elles sont synthétisées par voie ribosomique au sein de la cellule sous forme d'un précurseur et subissent un processus de maturation au cours de leur export vers le milieu extracellulaire (Cenatiempo *et al.*, 1996).

Toutes les bactériocines produits par les BL ont des activités dirigées contre les bactéries Gram (+) comme *Listeria monocytogenes* et Gram (-) (Labioui *et al.*, 2005). Elles sont réparties en quatre classes (Tableau 04):

Tableau 04 : Mode d'action de quelques bactériocines produits par les BL (Cenatiempo *et al.*, 1996).

Classe	Structure	Mode d'action	Exemple	Bactérie productrice
Lantabiotiques	Peptide 5KDa	Inhibition de synthèse de peptidoglycanes	Nisine	<i>St. lactis</i>
Non lantabiotiques	Peptides 10KDa	Perméabilisation	Pediocine ACH	<i>Pc. acidilactici</i>
Proteines	Molécules 30KDa	Hydrolyse de peptidoglycanes	Helvéticine J Lacticine B	<i>Lb. helveticus 481</i> <i>Lb. acidophilus</i>
Bactériocines complexes	Lipo ou glycoprotéines		Casécine 80	<i>Lb. casei</i>

- **Autres composés**

Certaines BL peuvent réduire l'oxygène en **peroxyde d'hydrogène** (H₂O₂) en aérobiose par l'action d'une oxydase flavoprotéinique (Rousseau, 2004). H₂O₂ endommage certaines enzymes par l'oxydation des groupes sulfhydriques, ainsi que les peptides membranaires, donc l'augmentation de la perméabilité de la membrane. Il peut être aussi un précurseur de la

production de radicaux libres bactéricides comme le superoxide (O_2^\bullet) et l'hydroxyle (OH^\bullet), ces radicaux peuvent endommager l'ADN des bactéries (**Ammor, 2004**).

Le diacétyle qui est produit suite au métabolisme du citrate, est capable d'inhiber des bactéries à Gram (-). Il réagit avec la protéine arginine et agit donc sur l'utilisation de l'arginine (**Sutra et al., 1998**).

Les acides gras insaturés sont actifs aussi contre les bactéries à Gram (+) et peuvent présenter une activité antifongique (**Ammor, 2004**).

III-4-2. Stimulation de système immunitaire

L'activation de la réponse immune systémique et sécrétoire par les BL se fait par la transmission de différents signaux (**Perdigón et al., 2001**). Ces signaux sont les principes actifs des bactéries probiotiques qui incluent : les lipopolysaccharides, peptidoglycane, et l'acide lipotéichoïque (**Macfarlane et al., 1999**). L'hôte distingue ces signaux grâce aux récepteurs tels que les récepteurs dits *toll-like receptors* (TLR), les récepteurs CLR (C type lectin receptors), présents sur les cellules immunitaires et les cellules épithéliales intestinales (**Luquet et Corrieu, 2005**). Cette interaction entre les BL probiotiques et les récepteurs induit :

La production des cytokines (tel que $TNF-\alpha$) (**Heyman et Ménard, 2002**), la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires comme la différenciation de cellules DC immatures en DC régulatrices en dépendance avec les récepteurs CLR (**Shida et Nanno, 2008**), ainsi que l'activation de la phagocytose et la libération des enzymes lysosomiales tels que β -glucuronidase et β -galactosidase (**Perdigón et al., 2001**).

Certains BL de genres *Pediococcus*, *Lactobacillus*, et *Oenococcus* peuvent produire de l'EPS (1,3)- β -D-glucane (**Palencia et al., 2009**), qui activent la cytotoxicité des macrophages, de cellules T helper et les cellules NK, la différenciation des cellules T et l'activation de la voie alternative de complément (**Chae et al., 2006**).

III-4-3. Effet sur les maladies métaboliques

- **L'intolérance au lactose**

La présence des BL vivantes dans le yaourt (exemple *Lb. acidophilus*) permet une meilleure assimilation du lactose soit par l'induction de l'activité lactasique de la muqueuse intestinale

soit par la libération de la lactase (β - galactosidase) lors de la lyse de paroi bactérienne. Cet enzyme permet l'hydrolyse du lactose (**Jeantent et al., 2008**). Un ralentissement du transit intestinal ou de la vidage gastriques permettant une meilleure digestion du lactose par la lactase humaine résiduelle (**Furet et al., 2008**).

- **Effet hypocholestérolémie**

La réduction de cholestérol dans le sang est l'un des effets bénéfiques attribués aux bactéries probiotiques (**Cavallini et al., 2009**).

Les mécanismes par lequel les probiotiques affectent le niveau de cholestérol inclus:

1. L'assimilation de cholestérol par les cellules bactériennes (**Gill et Guarner, 2004**) par la réduction de sa absorption dans l'intestine (**Lye et al., 2009**).

2. La fixation de cholestérol aux cellules bactériennes (**Gill et Guarner, 2004**): cette liaison est le résultat de propriétés chimiques et structurales de peptidoglycane de leur paroi qui contient différents acides aminés qui facilitent l'attachement de cholestérol à la surface cellulaire. Certaines probiotiques peuvent produire les exopolysaccharides (EPS) qui adhèrent à la surface cellulaire et peuvent absorber le cholestérol. L'incorporation de cholestérol à la membrane cytoplasmique peut être un autre mécanisme qui réduit le cholestérol dans le sang.

3. La déconjugaison des acides biliaires: elle se fait principalement dans l'intestine grêle et le gros intestin des mammifères par l'activité d'hydrolase BSH (BSH: Bil Salt Hydrolase) qu'est détectée chez les bactéries de l'intestin comme *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

4. L'utilisation de cholestérol dans la synthèse de nouveaux acides biliaires (**Lye et al., 2009**).

- **Effet sur le diabète**

La consommation de probiotiques est une nouvelle stratégie thérapeutique pour diminuer l'incidence de diabète. Les mécanismes proposés sont: l'inhibition de la déplétion de l'insuline, préservation de dyslipidémie diabétique, et l'inhibition de peroxydation de lipides et la formation de nitrite chez les rates. Leur effet est surtout lié à la régulation et à la protection des cellules pancréatiques (**Lye et al., 2009**).

III-4-4. Amélioration de la disponibilité aux nutriments

Les probiotiques auraient des effets nutritionnels sur l'organisme. Elles stimuleraient la digestion des aliments par l'acidification du milieu, la production d'acide lactique et par leur activité lipolytique et protéique dont l'hydrolyse des protéines enrichit le milieu en acides aminés libres (Novel, 1993).

Les probiotiques améliorent aussi l'assimilation des acides aminés essentiels pour l'hôte en inhibant l'action destructrice des désamidonnages et des décarboxylases bactériennes excrétées par la microflore du tube digestif, ainsi que la disponibilité des minéraux notamment celle du calcium, fer, zinc, manganèse, cuivre et du phosphore.

Elles sont capables de synthétiser des vitamines B: la thiamine (B1), riboflavine (B2), niacine (B3), pyridoxine (B6) et l'acide folique (B9). Ces vitamines sont facilement assimilées par l'organisme (Robin et Rouchy, 2001).

III-5. Rôle des bactéries lactique en industrie agroalimentaire

III-5-1. Produits laitiers

- **Le yaourt** : est obtenue par fermentation du lait par *Lb. delbrurkii* subsp *bulgaricus* et *St. thermophilus* qui sont les deux thermophiles (Tableau 05) (Sutra et al., 1998). Les deux espèces vivent en symbiose *St. thermophilus* est stimulé par l'apport d'acides aminés et de petit peptides provenant de l'activité protéolytique de *Lb. bulgaricus*. La stimulation de *Lb. bulgaricus* est attribuée à l'acide fumarique à l'acide pyruvique et au CO₂ produit par *St. thermophilus* (Jeantent et al., 2008).

- **Les fromages** : Le rôle des BL dans la fabrication fromagère est lié principalement à la production d'acide lactique et l'activité protéolytique (Tableau 05). La fermentation lactique participe à la coagulation. Elle contribue à la conservation du produit, en inhibant les germes de putréfaction, et elle participe aussi au développement de la saveur. Les acides gras issus de la lipolyse sont estérifiés et prennent naissance à des composées comme le butyrate d'éthyle, l'hexanoate d'éthyle qui contribuent à la formation de la saveur et de l'arôme (Bourgeois et Larpent, 1996).

Tableau 05: Principales bactéries lactiques associées aux produits laitiers fermentés et leurs rôles (Sutra *et al.*, 1998).

Produits fermentés	laitiers	Bactéries lactiques	Rôles
Laits fermentés	yaourt	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>St. thermophilus</i>	Acidification, texture, arômes (acétaldéhyde)
	Kéfir, koumiss	<i>Lb. brevis</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lc.lactis</i>	Acidification, texture, arômes
	Lait ribot	<i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i>	Texture, arômes
Beurre et crème		<i>Lc. Lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	Arômes (diacétyl)
Fromages	Frais ou à pâte molle	<i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>lactis</i> , <i>diacetylactis</i>	Acidification: formation du caillé
	à pâte persillée	<i>Leuconostoc</i>	Formation d'ouvertures facilitant la croissance de <i>Penicillium</i>
	à pâte pressée	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i>	Arômes au cours de la maturation
	à pâte pressée cuite (gruyère emmenthal)	<i>St. thermophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Acidification: production d'acide lactique utilisé par les bactéries propioniques, protéolyse

III-5-2. Produits de panification

Dans le processus de panification les BL sont largement représentées (Sutra *et al.*, 1998). L'acidification de la pâte par les BL favorise l'activation des protéases et la production des acides aminés à partir du gluten. La dégradation de gluten affecte les caractéristiques rhéologiques des pâtes et la texture de pain (Rizk, 2006). Les *Lactobacillus* sont les plus utilisées à cause de leur rôle dans la production de gaz carbonique (*Lb. sanfranciscensis*), production de composées aromatiques (Bourgeois et Larpent, 1996 ; Rizk, 2006).

III-5-3. Fermentation des produits carnés

La flore spontanée prédominante de la fermentation des produits carnés est constituée de *Lactobacillus* (Novel, 1993). Il intervient comme agents de fermentation dans les préparations des viandes salées, épicées et les saucissons (Sutra *et al.*, 1998). Les lactobacilles sont ajoutés dans le but d'accélérer les processus de fermentations, d'améliorer les qualités organoleptiques et de réduire les accidents de fabrication. Ces bactéries produisent de l'acide lactique par homofermentation, comme ils hydrolysent l'arginine, et produisent une β -galactosidase et de l'acétoïne (Bourgeois et Larpent, 1996).

Lb. plantarum, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum* sont proposés pour la fabrication de saucissons (Novel, 1993). Des ferments pour l'acidification des saucisses et saucissons secs et demi-secs ont été réalisés à partir de *Pc. damnosus*, *pentosaceus* et *acidilactici*.

Les BL interviennent aussi dans la préparation de nombreux produits végétaux fermentés comme le choucroute, et les olives (Tableau 06) (Lavermicocca et al., 2005).

Tableau 06: Principales bactéries lactiques associées aux produits de panification, carnés et végétaux et leurs rôles (Lavermicocca et al., 2005).

Produits fermentés		Bactéries lactiques	Rôles
Produits de panification		<i>Lactobacillus</i>	Production: de gaz, des composés aromatiques Et des composés antifongiques Texture
Produits carnés		<i>Lactobacillus</i>	Accélération de la fermentation Amélioration de qualité organoleptique et réduction des accidents de fabrication
végétaux	Choucroute	<i>Ln. mesenteroïdes</i>	Inhibition de la flore aérobie Empêchement de l'oxydation de vitamine C Formation de saveur
		<i>Lb. plantarum</i>	L'acidification supprime le goût amer de choucroute
		<i>Lb. brevis</i>	Acidification finale
	Olive	<i>Lb. plantarum</i>	Fermentation des olives
		<i>Lb. casei</i>	
<i>Lb. mesenteroïdes</i>			

Partie II:
Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie de l'université de Jijel.

IL avait pour objectifs de recouvrir les points suivants:

- 1 Isolement, purification et identification de la microflore du tube digestif de *L. michahellis* à savoir les BL.
- 2 Evaluation de leurs aptitudes technologiques.
- 3 Evaluation de leurs aptitudes probiotiques *in vitro*.

I-1. Matériel

Au cours de cette étude, nous avons utilisé le matériel suivant:

I-1-1. Les souches utilisées

Les souches d'*E. coli* (16L⁺, 29L⁺, L⁺16A) polyrésistants isolées à partir des déjets alimentaires d'origine animale (Il faut noter que les souches d'*E. coli* (16 L⁺, 29 L⁺, L⁺16A) sont fournies par le laboratoire de phytopharmacologie et phytochimie).

I-1-2. Milieux de culture

Pour la réalisation de différentes parties expérimentales, on a utilisé les milieux de culture suivants:

- Gélose et bouillon MRS (MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960),
- Gélose M17,
- Gélose Hektoen,
- Milieu GIBSON ABD-EL-MALEK et gélose blanche,
- Milieu YMA (YEAST MILK AGAR),
- Milieu hypersaccharosé, Bouillon hypersalé (préparé dans notre laboratoire) à 4% et 6,5% de NaCl,
- Lait tournesolé (préparé au laboratoire),
- Milieu MEVAG sans sucre,
- Lait écrémé,
- Milieu Moeller additionné de l'arginine,
- Milieu Moeller additionné de Lysine,
- Milieu Moeller additionné de l'ornithine,
- Les sucres: Amidon, Glucose, Dulcitol, Maltose, Saccharose, Lévulose, Adonitol, Arabinose, Ribose, Inositol, Cellobiose, Sorbitol, Tréhalose, Salicine.

I-1-3. Produits chimiques et réactifs

Au cours de notre travail nous avons utilisé :

- Violet de gentiane, Fushine, Lugol, Alcool,

- Huile à immersion,
- Huile de Vaseline sterile,
- La soude Dornic (NaOH) N/9, Phénol phtaléine (1%),
- VpI solution alcoolique d' α - naphthol.
- VpII solution aqueuse de soude 16%,
- Teinture de tournesole,
- Eau oxygénée (H₂O₂),
- Tween 80 additionné au bouillon MRS,
- HCl (1N) et NaOH (1N): pour l'ajustement du pH,
- Eau physiologique,
- Eau distillée sterile.

I- 1- 4. Autres matériels

- Agitateur magnétique (MEIDOLPH, MR 3001),
- Boite de PETRI,
- Pipette graduée,
- Pipette Pasteur,
- Anse de platine,
- Flacons stériles,
- Tubes à essai stériles,
- Les lames,
- Bec Bunsen,
- Microscope optique (OLYMPUS),
- Balance (DENYER instrument XP-600),
- Four pasteur (CONTROLS),
- Bain marie (GERHARDT),
- Réfrigérateur (ENIEM),
- pH mètre (MICROPROCESSOR),
- Etuve,
- Micropipettes,
- Becher,
- Burette de Mohr à robinet
- Embouts pour micropipettes,
- Membrane filtrantes 0.20 μ m,
- Microtome (REICHERT-JUNG ,1130/BIOCUT).

I. 2. Méthodes

I- 2- 1. Origine des souches des BL

Notre expérimentation a été réalisée sur des souches isolées à partir du tube digestif de poussins de *L. michahellis*.

I- 2- 2. Autopsie des poussins de *L. michahellis*

On a sacrifié et autopsié un poussin de *L. michahellis*, et prélevé les organes suivants: proventricule, l'oesophage, gésier, colon (Figure 02).

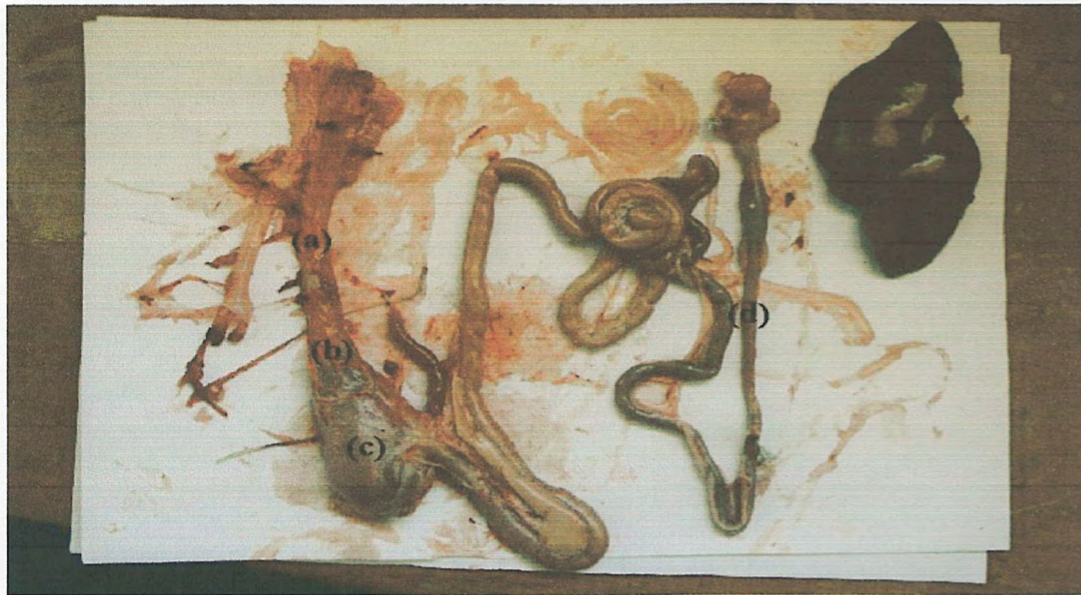


Figure 02: les différentes parties de prélèvement des échantillons. (a):l'oesophage, (b): proventricule, (c): gésier, (d): colon.

I- 2-3. Isolement, purification

a. Mise en culture et enrichissement

La mise en culture et l'enrichissement ont été effectués selon la méthode décrite par **Guiraud (1998)** et qui consiste à mettre l'échantillon à la culture dans le milieu MRS selon la procédure suivante :

Après nettoyage des muqueuses, nous avons effectué un raclage de la muqueuse de l'oesophage, proventricule, gésier et le colon.

Les échantillons obtenus sont transférés dans un bouillon MRS puis on l'incube à 37°C pendant 24h.

b. Isolement et purification

Les boîtes de pétri contenant la gélose MRS préalablement coulée, sont ensemencées à partir de la culture bactérienne par épuisement. L'incubation est faite à 37°C pendant 24h.

A partir des boîtes déjà incubées, on a ciblé des colonies bien distinctes et on a repiqué sur le bouillon MRS, ensuite on réisole sur gélose MRS et dès qu'on obtient des colonies homogènes on arrête la purification, puis l'incubation est faite à 37°C pendant 24h (**Labioui et al., 2005**).

I-2-4. Identification des bactéries lactiques

L'identification est établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères physiologiques et biochimiques (**Labioui et al., 2005**).

I-2-4-1. Examen macroscopique

Après l'étape de purification, les boîtes sont soumises à un examen macroscopique afin de noter les caractères relatifs à chaque souche à savoir la taille des colonies, leur couleur et leurs formes sur ces milieux sélectifs (MRS et M17). L'observation macroscopique est réalisée par l'oeil nu (**Guiraud, 1998**).

I-2-4-2. Examen microscopique

Il est réalisé en utilisant la coloration de Gram. Cette coloration des cellules bactériennes permet à la fois de connaître la morphologie des bactéries, le mode de regroupement et de les classer en deux groupes en fonction de la forme bactérienne (Forme bacillaire et forme sphérique) (**Larpen, 1997**).

La coloration de gram a été effectuée selon la méthode suivante:

- Préparation des frottis par étalement et fixation par la chaleur de la suspension bactérienne sur une lame.
- Coloration pendant une minute au violet de Gentiane.
- Lavage à l'eau de robinet pendant quelques secondes.
- Ajout du lugol pendant une minute.
- Lavage à l'eau pendant quelques secondes.
- Rinçage avec de l'alcool pendant 30 secondes à 1 minute.
- Lavage à l'eau.

- Recoloration pendant 1 à 2 minutes par une solution de la fuschine diluée.
- Lavage à l'eau.

Après séchage, les lames sont soumises à une observation microscopique (objectif X100) en immersion.

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose (**Prescott *et al.*, 2003**).

I-2-5. Tests biochimiques

- **Test de croissance à différentes températures**

Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles, des bactéries lactiques thermophiles.

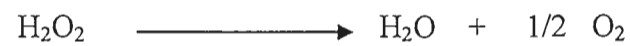
Après inoculation de deux tubes de bouillon MRS avec une culture pure des germes à tester, on a les incubés, l'un à 46°C pendant une période de 24h à 48h, l'autre à 15°C durant 7 à 10 jours.

La croissance bactérienne est appréciée par l'apparition d'un trouble bactérien. Les BL mésophiles poussent à 15°C alors que les bactéries thermophiles poussent à une température de 46°C (**Guiraud, 1998**).

- **Étude des enzymes respiratoires**

1 La recherche de catalase

La catalase ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en oxygène et l'eau. Le dégagement d'oxygène en formant des bulles d'air dans la suspension témoigne en présence d'une catalase.



Ce teste est réalisé selon la méthode décrite par **Lambin et German (1969)**.

- Sur une lame on a déposé 1 ou 2 gouttes d'eau oxygénée.
- A laide d'anse de platine, on a prélevé une colonie pure et on la délaye directement dans la goutte d'eau oxygénée.
- La présence d'un catalase se traduit par l'apparition des bulles d'air.

2 Recherche de la réductase

Dans des tubes à vis contenant 1ml de lait écrémé stérile, on rajouté de la teinture de tournesol jusqu'à l'obtention d'une couleur violette, le pH est ajusté à 7.

Après ensemencement des tubes par les souches à étudier, ils étaient à 37°C pendant 24h.

La lecture se fait selon 3 cas possibles :

- Acidification, coagulation par la présence d'enzymes glucidolytiques (virage au rouge).
- Alcalinisation, peptonisation par la présence d'enzymes protéolytiques (virage au bleu ou éclaircissement du milieu).
- Le phénomène de réduction du lait tournesolé se traduit par une décoloration du milieu précédemment de couleur violette (**Larpen, 1997**).

• Recherche de l'arginine dihydrolase ADH

La recherche 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 teste:

On a ensemencé le bouillon Moeller à arginine avec les germes à tester, et on à l'incubé à 37°C pendant 24h. Une réaction positive se traduit par une utilisation de l'acide aminé qui se manifeste par une teinte violette (**Larpen, 1997**).

• Recherche de citratase

Cette enzyme est mise en évidence par culture sur gélose MRS additionné au citrate d'ammonium. La gélose est ensemencée en masse et incubé à 37°C pendant 3 à 5 jours (**Guiraud, 1998**).

La présence d'une citratase se traduit par l'apparition de bulles de gaz, c'est la première réaction de transformation du citrate en diacetyl et acétoïne (**Larpen, 1997**).

• Recherche de type fermentaire

Ce teste permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carbone est transformé. Il est défini de façon simple par le teste de Gibson et Abd El Malek, traduit un dégagement de CO₂ caractéristique des espèces hétérofermentaires.

Le milieu Gibson Et Abd El Malek est préalablement fondu, refroidi à 45°C puis distribué à raison de 9ml dans des tubes à essais stériles, puis on laisse la gélose se solidifie en position

incliné. Après inoculation par culture en stries on recouvre la culture par une couche de gélose fondue et refroidie à 45°C, avec une gélose blanche stérile. L'incubation se fait à 37°C pendant plusieurs jours.

Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de gélose, mais le gaz produit par un germe hétérofermentaire pousse au contraire le bouchon de gélose vers le haut du tube (**Guiraud, 1998**).

- **Production d'acétoïne**

Ce teste permet de caractériser la capacité des bactéries lactiques à produire le diacetyl et l'acétoïne pour éviter les concentrations trop élevées de pyruvate qui est toxique, ce dernier peut résulter de l'utilisation de citrate en présence d'une source d'énergie comme le lactose.

Pour réaliser ce teste on a préparé des tubes contenant du lait écrémé à 9%. Les tubes utilisés subissent un traitement thermique de 5 minutes à 70 °C au bain marie. Ils sont ensuiteensemencés par les souches à tester et on a incubé les cultures à 37°C pendant 24h, ensuite on a ajouté respectivement 5 à 4 gouttes de la solution VPI (Voges Proskauer) et de la solution VPII dans chaque tube, suivi d'une agitation intense.

Après un délai de 10 minutes, une coloration rose traduit la formation d'acétylméthylcarbinol. Cette substance se transforme en acétoïne sous l'action de la soude (VPII) et se combine avec α -naphthol (VPI) en donnant un complexe de couleur rouge (**Larpen, 1997**).

- **Profil fermentaire des sucres**

Ce teste permet d'apprécier la capacité des souches purifiées à fermenter les sucres. La fermentation des sucres est réalisée selon la technique suivante:

- 1 On a fait fondre au bain marie le milieu MEVAG à 100°C puis on y rajoute le sucre correspondant (3 à 5 gouttes d'une solution saturée de sucre stérile)
- 2 On a laissé refroidir à une température de 45°C,
- 3 L'ensemencement se fait par piqûre centrale avec l'anse de platine chargée de la culture bactérienne à étudier sur des microplaques.
- 4 L'incubation à 37°C pendant 24h.

Le développement de la culture et le virage de l'indicateur colore (rouge au jaune) dû à l'acidification du milieu traduit la fermentation du sucre (**Guiraud, 1998**).

I-2-6. Etude de quelques propriétés technologiques des bactéries lactiques

I-2-6-1. Etude de pouvoir acidifiant

Le métabolisme des bactéries lactiques a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Pour réaliser ce test, on a commencé tout d'abord à préparer le milieu à ensemercer selon le protocole suivant:

- 1 Lait écrème reconstitué 9g/ 100ml.
- 2 Stérilisation 100°C/ 10minutes.
- 3 Refroidissement en température ambiante.
- 4 Ensemencement par 1ml de la culture lactique.
- 5 Incubation à 37°C pendant 24h.

Après l'incubation, le titrage de l'acidité est effectué sur 10 ml de lait par une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N à l'aide d'une burette de Mohr à robinet, en présence d'une goutte d'une solution méthanolique de phénophtaléine à 1% utilisée comme indicateur coloré, jusqu'au virage à la rose pale. Les tests sont effectués à des intervalles d'incubation de temps réguliers et qui sont, 3h, 6h, 22h, 24h (**Labioui, 2005**).

L'acidité dornic est déterminée par la formule:

$$\text{Acidité [D°]} = V_{\text{NaOH}} * 10$$

V_{NaOH} : volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique.

La courbe d'acidification en fonction du temps peut alors être tracée (**Guiraud, 1998**).

Une estimation plus rapide peut être effectuée par mesure du pH du lait après 24 heures d'incubation. Le pH dépend de la concentration en ions hydronium H^+ ou H_3O^+ d'un milieu, le pH égal à:

$$\text{pH} = \log 1/ [\text{H}_3\text{O}^+]$$

L'utilisation du pH mètre permet de déterminer le pH du lait. La technique consiste à prolonger l'électrode du pH mètre dans un béccher contenant 10 ml de lait avec agitation. La valeur du pH est lue puis enregistrée (**Larpen, 1997**).

I-2-6-2. Etude de pouvoir protéolytique

Ce test consiste à étudier la capacité des bactéries à dégrader les protéines. L'activité protéolytique est déterminée de façon rapide par un test de dégradation de la caséine pour ce la nous avons utilisé le milieu YMA pour tester les souches.

On a testés cette activité sur le milieu YMA qu'on a préparé au laboratoire, des disques de papier WATMAN N°4 sont imbibés dans la suspension bactérienne qu'on a purifiée préalablement, puis on a déposés sur la gélose YMA déjà coulée et solidifiée sur les boites de pétri. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

Le pouvoir protéolytique se manifeste par d'une zone claire autour du disque (**Lapent, 1997**).

I-2-6-3. Etude de pouvoir texturant

Certaines souches de bactéries lactiques ont la faculté de synthétiser des exopolysaccharides, glucanes (dextranes) et fructosanes (levanes). Ces macromolécules contribuent à la modification de la texture des milieux de culture. Ce test consiste à: ensemercer le gélose hypersaccharosé avec les souches à tester. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24h.

Les colonies des bactéries obtenues sont:

- 1 grosses très scintillants, muqueuse donc production de levanes.
- 2 Ou petites «cloutées» ne devenant muqueuses qu'après séjours à la température ambiante se qui implique qu'il y'a production de dextrane (**Larpent, 1997**).

I-2-7. Estimation des aptitudes probiotiques *in vitro*

I-2-7-1. Estimation de la croissance

Avant de commencer le travail, on a évalué le nombre colonies contenu dans chaque ml d'une culture jeune par un dénombrement sur gélose. Pour chaque souche bactérienne, des cultures jeunes ont été préparées par ensemencement du bouillon correspondant par une culture âgée de 24h (V/9V).

Après une incubation de 5h 30, on a mesuré la densité optique (DO) de chaque culture à 660 nm, puis on a réalisé des dilutions décimales et on a ensemencé les géloses correspondantes. Après une incubation à 37°C/ 24h on procède à un dénombrement sur gélose et ainsi, on a déterminé le nombre des colonies correspondant.

I-2-7-2. Croissance sur milieux hostiles

1 Croissance sur milieu acide

Les souches de BL à tester sont cultivées dans du bouillon MRS pendant 24h à 37°C. Chaque souche estensemencée dans deux tubes de milieu MRS ajusté respectivement à pH= 3, pH= 4 avec une solution d'HCl 10M. Pour chaque essai, les cultures sont incubées à 37°C pendant 24h. La survie des BL dans ces conditions extrêmes de pH est déterminée en réalisant des dénombrements sur des boîtes de pétrie de MRS. La lecture s'effectue après l'incubation des boîtes de pétrie à 37°C en anaérobiose pendant 24h (**Larpen, 1997**).

2 Croissance en présence de sels biliaires

A partir de la culture bactérienne sur milieu liquide, on aensemencé le bouillon MRS contenant des doses de 0.15% et 0,3% de sels biliaires. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24h (**Draksler et al., 2004**).

I-2-7-3. Résistance aux antibiotiques

La méthode de diffusion dans la gélose est particulièrement adaptée à l'étude de l'action des antibiotiques sur la croissance des bactéries. Elle permet de déterminer leurs antibiogrammes, qui rendent compte de la sensibilité spécifique des différentes espèces bactériennes pathogènes vis-à-vis des antibiotiques testés. Mais elle peut être adaptée à l'analyse d'autres agents antimicrobiens et d'autres microorganismes.

La gélose MRS a étéensemencée à partir des cultures fraîches de nos souches de bactéries lactiques à l'aide d'écouvillons stériles. Ensuite, les disques d'antibiotiques streptomycine (SSS), Sulphonamide (S3₃₀₀), Tétracycline (TE), Spiramycin (SP₁₀₀) et Pénicilline G (P5) sont déposés à la surface du milieu. Après incubation à 37°C pendant 24h on a déterminé le diamètre des zones d'inhibition (**Joffin et Leyral, 2006**).

I-2-7-4. Pouvoir antagoniste des bactéries lactiques *in vitro*

Le pouvoir antibactérien des bactéries lactiques d'intérêt, est réalisé par la méthode de diffusion sur gélose à partir de puits confectionnés dans un milieu de culture solide, pour nous c'est la gélose Muller Hinton.

La technique consiste à faire fondre la gélose à 100 °C puis la refroidir à 45 °C ensuite la répartir dans des boîtes de Pétri de 90 mm, à près refroidissement, toute la surface des géloses

sontensemencées par un écouvillon qui a été préalablement trempé dans une suspension de *E.coli* à tester (de 10^5 germe :ml), à laide d'une pipette pasteur on confectionne des puis de 6mm de diamètre dans la gélose inoculée et chaque puis recevra 50 μ l d'une culture sur bouillon MRS (Bouillon de culture total) de la souche lactique à tester.

Après incubation 24 heures à 37°C, le pouvoir antibactérien des souches lactique se traduit par des zones d'inhibition apparaissant autour des puis, en fin le diamètre de ces zones est mesurer puis enregistré (**Labioui et al., 2005**).

II. Résultats et discussion

II. 1. Isolement, purification, caractérisation et identification de BL

Les résultats de l'isolement et de purification des souches isolées à partir du tube digestif de *Larus mechahellis* nous a permis d'isoler et d'identifier 24 souches de BL.

II. 1. 1. Examen macroscopique

L'observation macroscopique pour chaque isolat montre des colonies bien distinctes de même taille, même forme et de même couleur sur chaque boîte, cela témoigne la pureté des souches. Globalement, les colonies sont bien isolées de couleur blanchâtre et jaunâtre brillante et d'un diamètre très minime (**Figure 03**).

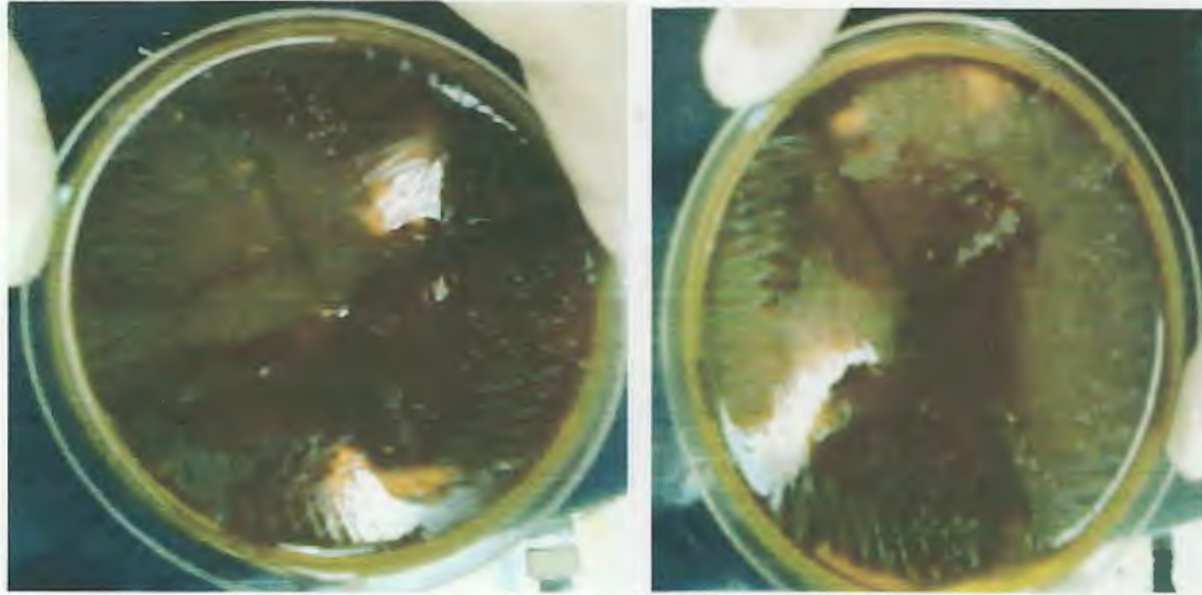


Figure 03 : Examen macroscopique des souches des bactéries lactiques.

II. 1. 2. Examen microscopique

La coloration de Gram révèle que l'ensemble des souches isolées sont Gram+ de forme bacillaire plus ou moins allongée (**Figure 04**).



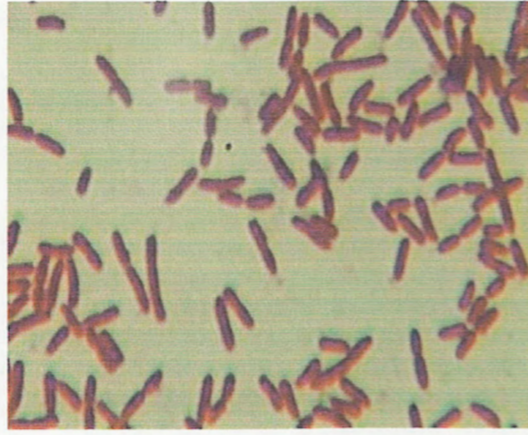


Figure 04 : Exemple de microphotographies des souches isolées.

II.2. Tests physiologiques et biochimiques

D'après les résultats (Tableau 07), il apparaît que :

- Les vingt cinq souches sont à catalase négatif (pas d'apparition des bulles d'air).
- Le test de croissance à différentes température montre que onze souches sont capables de croître à 46°C donc ce sont des souches thermophiles, alors que les autres souches sont capables de pousser seulement à des températures plus basse, ce qui les qualifie de se classer parmi les espèces mésophiles (Figure 05).

En industrie agroalimentaire, les souches mésophiles sont utilisées pour la fabrication des crèmes fraîches et des fromages frais, les souches thermophiles sont plutôt utilisées pour la fabrication pour les fromages à patte cuite et les yaourts (Furet *et al.*, 2008).

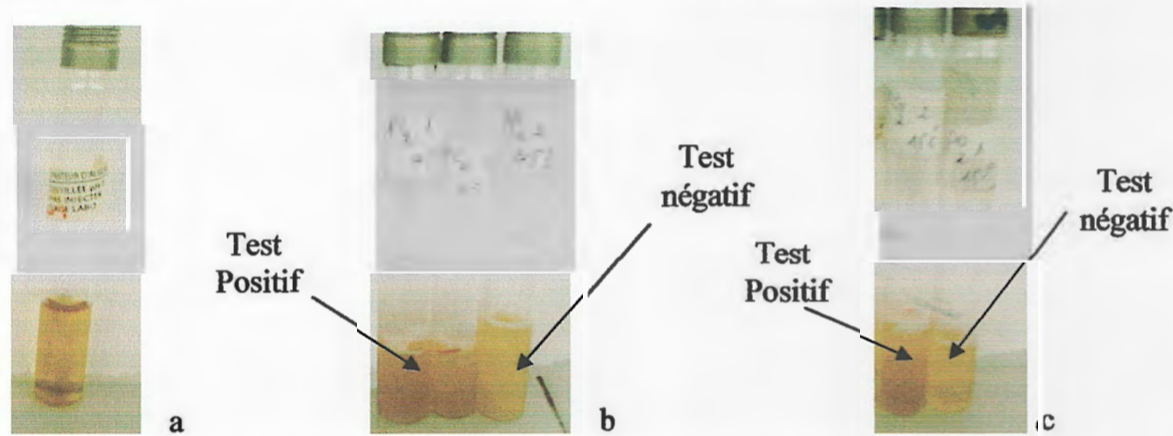


Figure 05: exemple de test de la croissance à différentes températures, a: témoin (bouillon MRS), b: la croissance à 4°C, c: la croissance à 15°C.

- La recherche d'acétoïne sur le lait écrémé donne des résultats qui varient largement d'une souche à l'autre. Dix-huit ont données un résultat positif, c'est à dire la formation d'un anneau rouge après avoir effectué la réaction de Voges- proskauer. Le reste des souches donnent des résultats négatifs (absence d'anneau rouge) (**Figure 06**)

La production d'acétoïne chez les souches concernées semble très importante dans le domaine agro- alimentaire surtout la production d'arôme dans les produits fermentés, dans le cas des *Leuconostoc*, cette production d'acétoïne ne commence que lorsque le milieu est acidifié (**Luquet et Corrieu, 2005**).

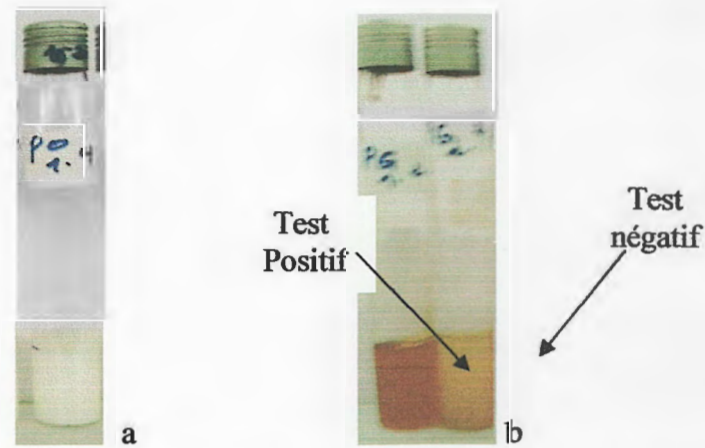


Figure 06 : exemple de la production d'acétoïne, a: témoin (lait écrémé), b: lait avec VPI et VPII.

- D'après les résultats du test de l'arginine dihydrolase (ADH), on a remarqué que quatre souches donnent des résultats positifs: c'est à dire capables de dégrader l'arginine et libérer l'ammoniac (couleur violet de milieu trouble), le reste donnent des résultats négatifs (couleur jaune).

- Toute fois, la recherche de la réductase a révèle que cinq souches sont capables de réduire et de coaguler le lait tournesolé au même temps.

Quatre autres souches sont capables de réduire le lait tournesolé sans coagulation. Mais le reste des souches de la collection sont incapables de réduire et de coaguler le lait tournesolé. En effet, la coagulation du lait est le résultat de l'acidification du milieu suite à l'accumulation de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques (**Figure 07**).

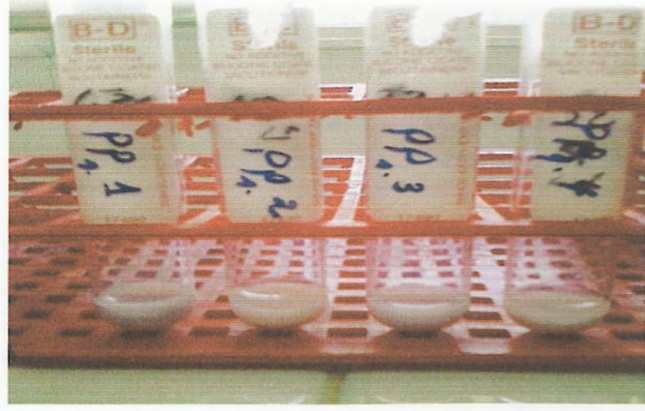


Figure 07 : exemple du test de la recherche de la réductase.

- Quant à l'utilisation du citrate il apparaît que toutes les souches isolées sont incapables d'utiliser le citrate. ces résultats confirment la polyauxotrophie de bactérie lactique.

Avant d'être métabolisé, le citrate est transporté à l'intérieur de la cellule grâce à une enzyme; le citrate perméase (Citp).

Le gène codant pour Citp, localise sur un plasmide est exprimé durant l'acidification naturelle du milieu par la population bactérienne. A des pH proches de la neutralité, la voie de fermentation du citrate est constitutive. L'inaptitude du reste des souches à utiliser le citrate peut donc être expliquée par la perte de gène codant pour le citrate perméase (**Corrieu et Luquet, 2008**).

- La recherche de type fermentaire sur le milieu Gibson- Abd El Malek permet de noter que 100% des souches testées sont à type homofermentaire où il n'y a pas un déplacement du bouchon de la gélose vers le haut, comme on a remarqué l'absence de la production du gaz.

Les bactéries lactiques homofermentaires produisent l'acide lactique uniquement, alors que les hétérofermentaires produisent, en plus de l'acide lactique, du gaz carbonique et d'autres métabolites (acétate, éthanol) qui peuvent avoir des effets sur le goût et la texture notamment (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

Tableau 07: profils biochimiques des souches des bactéries lactiques isolées.

Test Souche	Gram	Forme	Différente température	Catalase	Citratase	Acétoïne	Réductase		Type fermentaire	ADH
							R	Co		
PG _{1.1}	+	Bac	46°C	-	-	+	+	-	Homo	-
PG _{1.2}	+	Bac	15°C	-	-	+	+	-	Homo	+
PG _{1.3}	+	Bac	15°C	-	-	+	+	-	Homo	-
PG _{2.3}	+	Bac	15°C	-	-	+	-	-	Homo	-
PG _{2.4}	+	Bac	46°C	-	-	-	-	-	Homo	-
PC _{1.1}	+	Bac	46°C	-	-	-	+	+	Homo	-
PC _{1.2}	+	Bac	15°C	-	-	+	-	-	Homo	-
PC _{1.3}	+	Bac	46°C	-	-	-	-	-	Homo	-
PC _{1.4}	+	Bac	46°C	-	-	-	+	+	Homo	-
PC _{2.1}	+	Bac	46°C	-	-	+	-	-	Homo	+
PC _{2.2}	+	Bac	46°C	-	-	+	+	+	Homo	-
PC _{2.3}	+	Bac	46°C	-	-	+	+	+	Homo	-
PC _{2.4}	+	Bac	46°C	-	-	+	+	-	Homo	+
PP _{1.1}	+	Bac	15°C	-	-	+	-	-	Homo	-
PP _{1.2}	+	Bac	46°C	-	-	-	+	+	Homo	-
PP _{1.3}	+	Bac	15°C	-	-	+	-	-	Homo	-
PP _{2.2}	+	Bac	15°C	-	-	+	-	-	Homo	-
PP _{2.3}	+	Bac	15°C	-	-	-	-	-	Homo	-
PO _{1.3}	+	Bac	15°C	-	-	+	-	-	Homo	-
PO _{1.4}	+	Bac	15°C	-	-	+	-	-	Homo	-
PO _{2.1}	+	Bac	15°C	-	-	+	-	-	Homo	-
PO _{2.2}	+	Bac	46°C	-	-	+	-	-	Homo	+
PO _{2.3}	+	Bac	15°C	-	-	+	-	-	Homo	-
PO _{2.4}	+	Bac	15°C	-	-	+	-	-	Homo	-

+: Test positive

Bac: Bacille

Hétéro: Hétérofermentaire

-: Test négative

Homo: Homofermentaire

R: Réduction

Co: Coagulation

- En comparant le profil fermentaire des sucres (**Tableau 08**), on a trouvé des différences intra- espèces, certaines ont la capacité de fermenter les sucres, d'autres ne le font pas, ainsi on a distingué la présence des biotypes pour la majorité des espèces identifiés. L'espèce *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* avec les biotypes PC_{2.1}, PC_{2.2}, PC_{2.3}, PC_{2.4}, PO_{2.2}. Ces biotypes montrent des différences dans la fermentation de différents sucres.

Les bactéries lactiques convertissent les sucres fermentescibles du milieu en particulier le Glucose en acide lactique par toute une série de réactions. Il apparaît que l'adaptation au niche intestinale semble liée à la présence des gènes codants pour les enzymes impliqués dans l'hydrolyse des disaccharides et oligosaccharides (O'Sullivan *et al.*, 2009).

Tableau 08: profils fermentaires des sucres des souches isolées.

Sucre souche	Dulcitol	Tréhalose	Maltose	Salicine	Cellobiose	Glucose	Levulose	Sorbitol	Arabinose	Saccharose	Inositol	Amidon	Adonitol	Ribose
PC _{1.1}	-	V	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
PC _{1.2}	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
PC _{1.3}	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
PC _{1.4}	-	V	-	-	-	-	V	-	-	+	-	+	-	-
PC _{2.1}	-	-	-	-	-	-	+	V	-	-	-	+	V	-
PC _{2.2}	-	V	-	-	-	-	+	-	-	V	-	+	-	-
PC _{2.3}	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
PC _{2.4}	-	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	+	-	-
PG _{1.1}	-	+	+	V	+	+	-	V	-	V	-	+	V	-
PG _{1.2}	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	V	+	V	V
PG _{1.3}	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
PG _{2.3}	-	+	+	-	-	+	+	-	-	V	V	-	-	-
PG _{2.4}	-	+	-	V	-	-	+	-	-	V	-	-	-	-
PP _{1.1}	+	+	+	-	-	+	+	V	-	+	V	V	-	-
PP _{1.2}	-	-	-	V	-	+	+	V	-	V	V	+	-	-
PP _{1.3}	-	+	+	-	+	+	+	V	-	+	V	V	-	V
PP _{2.2}	-	-	-	+	-	-	-	-	-	V	-	V	-	-
PP _{2.3}	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	V	V	-	-
PO _{1.3}	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	V	V	+
PO _{1.4}	-	-	-	V	-	+	+	-	-	V	-	V	-	+
PO _{2.1}	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
PO _{2.2}	-	-	-	+	-	-	+	-	-	V	-	-	-	-
PO _{2.3}	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	V	-	-
PO _{2.4}	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-

-: test negatif

+: test positif

V: resultat variable

- L'aspect des souches bactériennes révèle la dominance de la forme bacillaire représentée par le genre *Lactobacillus* qui représente 100% de la collection (**Tableau 09**).

Tableau 09: les noms scientifiques des espèces identifiées.

Souche	Code	Nom d'espèce identifiée
1	PG _{1.1}	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
2	PG _{1.2}	<i>Lb. brevis</i>
3	PG _{1.3}	<i>Lb. rhamnosus</i>
4	PG _{2.3}	<i>Lb. brevis</i>
5	PG _{2.4}	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
6	PC _{1.1}	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>
7	PC _{1.2}	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
8	PC _{1.3}	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>
9	PC _{1.4}	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>
10	PC _{2.1}	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
11	PC _{2.2}	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
12	PC _{2.3}	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
13	PC _{2.4}	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
14	PP _{1.1}	<i>Lb. brevis</i>
15	PP _{1.2}	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>
16	PP _{1.3}	<i>Lb. brevis</i>
17	PP _{2.2}	<i>Lb. bif fermentans</i>
18	PP _{2.3}	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>
19	PO _{1.3}	<i>Lb. brevis</i>
20	PO _{1.4}	<i>Lb. brevis</i>
21	PO _{2.1}	<i>Lb. rhamnosus</i>
22	PO _{2.2}	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
23	PO _{2.3}	<i>Lb. rhamnosus</i>
24	PO _{2.4}	<i>Lb. rhamnosus</i>

La forme bacillaire et la forme ramifiée englobent les espèces suivantes:

- 1) *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* représenté par 25%.
- 2) *Lb. brevis* occupant 25%.
- 3) *Lb. rhamnosus* occupant 16,67%
- 4) *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* occupant 8,32%
- 5) *Lb. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* occupant 16,67%
- 6) *Lb. bifementans* occupant 4,17%
- 7) *Lb. casei* subsp. *casei* occupant 4,17%

La collection des souches des bactéries lactiques nous a permis donc d'obtenir 7 espèces différentes. On a remarque la dominance de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* et *Lactobacillus brevis* avec un pourcentage de 25%.

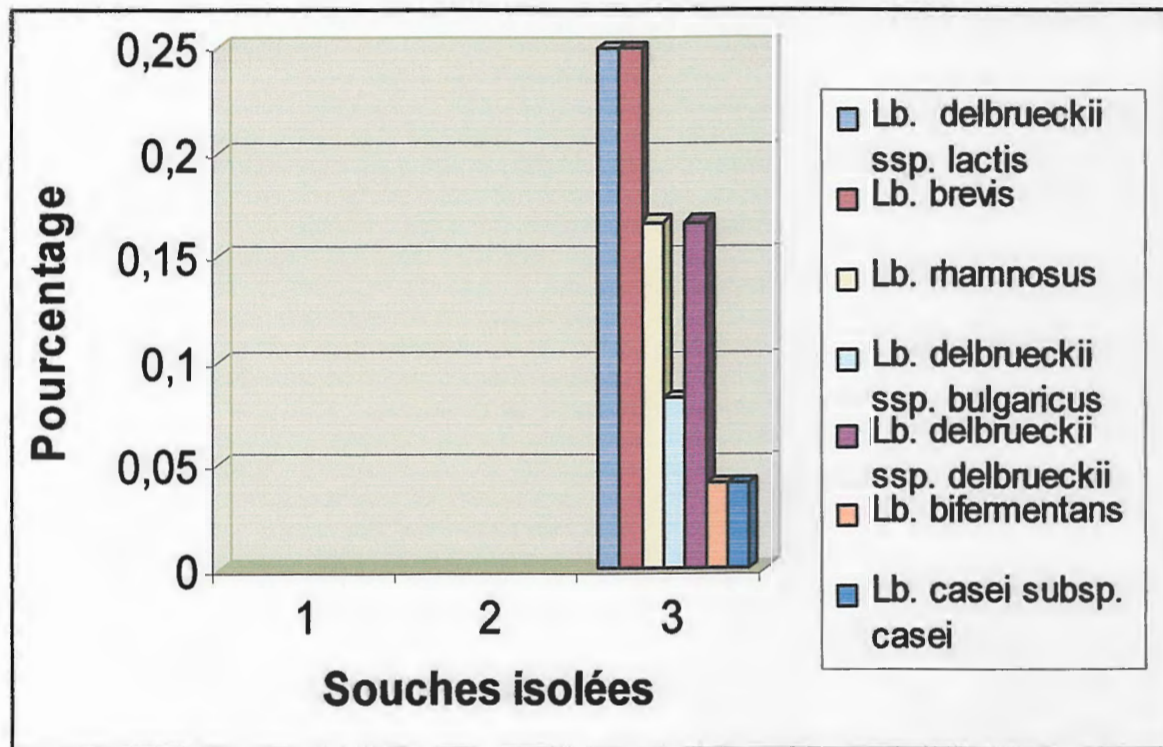


Figure 08: Répartition des espèces des bactéries lactiques en pourcentage.

II. 3. Aptitudes technologiques

II. 3. 1. Pouvoir acidifiant

Ce test consiste à évaluer l'acidité et le pH pour chaque souche pendant 24h. L'évaluation de l'acidité et les variations de pH au cours de la croissance des souches identifiées dans le lait stérile, démontrent une différence entre ces dernières (**Tableau 10**).

La quantité d'acide lactique produite augmente d'une façon considérable, alors que les valeurs de pH diminuent avec le temps.

Après 3h d'incubation les valeurs de pH varient entre 6.11 et 6.58, en parallèle, la quantité de l'acide lactique se situe entre 1.3g par litre de lait et 1.8g/l. Au bout de 24h d'incubation, les valeurs de pH s'abaissent et se trouvent situées entre 4.48 et 5.18, de même, la quantité de l'acide lactique produite se situe entre 3.1g/l et 7.5g/l.

Pour les souches isolées, on a remarqué que la souche *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* possède une forte activité acidifiante (7.5g/l) par rapport aux autres souches. La souche *Lb. brevis* produit une quantité de 5.5g/l et la souche qui possède la plus faible activité 3.1g/l est la souche *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* après 24h d'incubation.

Il existe une relation étroite entre le pH et le degré d'acidité, le pH diminue à mesure que la quantité d'acide lactique produite augmente.

Nous pouvons dire que nos souches (isolées de *Larus michahellis*) possèdent une importante activité acidifiante avec un maximum de 7.5g/l.

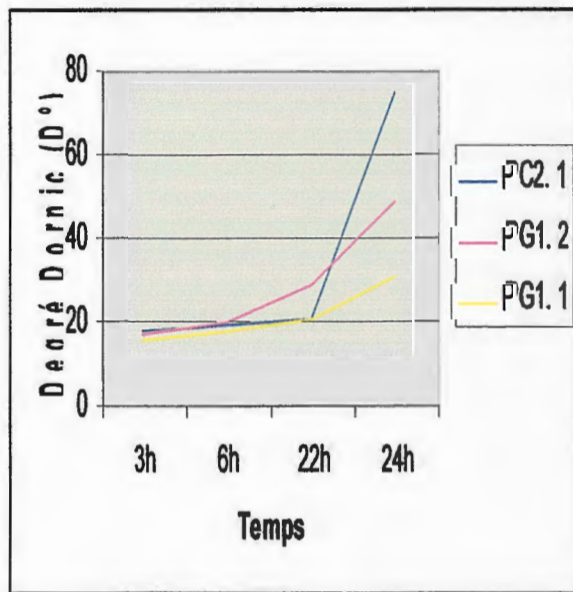
Pour l'objectif technologique notamment en laiterie et en fromagerie, il est très intéressant de préciser le pouvoir acidifiant des souches lactiques. D'après **Ammor (2004)**, l'une des étapes cruciales de fabrication d'un fromage est la coagulation du lait au cours de laquelle l'acidification doit suivre une cinétique précise (vitesse, pH final) afin d'obtenir un caillé, et donc un fromage, qui auront des caractéristiques définies. Donc, la vitesse d'acidification est l'une des critères importants dans la sélection des souches rapidement acidifiant.

Tableau 10: Evaluation de l'acidité et du pH pendent 24h.

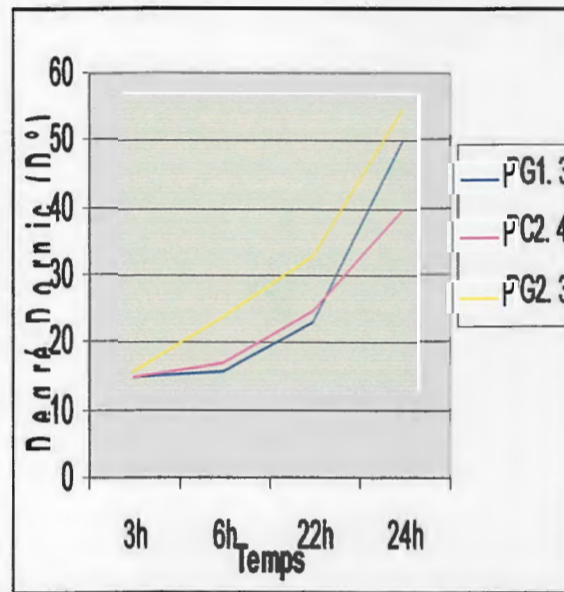
	3h		6h		22h		24h	
	pH	D°	pH	D°	pH	D°	pH	D°
PC _{2.1}	6.45	18	6.53	19	5.33	21	4.93	75
PG _{1.2}	6.48	17	6.03	20	5.47	29	4.48	49
PG _{1.1}	6.46	16	5.82	18	5.46	21	4.84	31
PG _{1.3}	6.52	15	6.44	16	5.78	23	5.18	50
PC _{2.4}	6.58	15	6.29	17	6.06	25	5.15	40
PG _{2.3}	6.54	16	5.77	24	5.64	33	4.80	55
PP _{2.3}	6.63	14	6.25	17	6.11	20	4.95	44
PG _{2.4}	6.48	18	5.80	19	5.60	28	5.03	42
PP _{1.1}	6.63	13	6.29	15	5.96	17	4.87	45

D°: Degre dornic

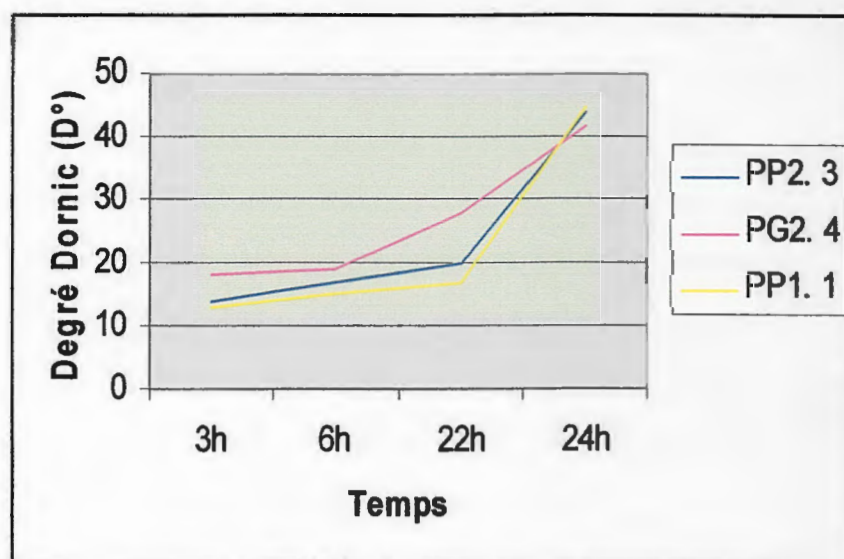
h: heure



(a)



(b)



(c)

Figure 09: a, b, c: évolution de l'acidité pendant 24h d'incubation.

II. 3. 2. Pouvoir protéolytique

Nos résultats montrent une croissance sans protéolyse et une croissance avec protéolyse.

Les zones de protéolyse sont présentes chez la majorité des souches qui font apparaître un diamètre large de la zone d'hydrolyse des protéines autour des disques et qui varie entre 6 mm et 20 mm (Tableau 11).

Seule la souche *Lb. brevis* ne montre pas de zone de protéolyse par contre les deux souches *Lb. rhamnosus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* présentent une homogénéité et monteront une zone de protéolyse de 9 mm.

La souche *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* montre une faible activité protéolytique dont la zone de protéolyse est de 6 mm, alors que la souche *Lb. brevis* présente une forte activité protéolytique avec un diamètre de lyse arrive à 20 mm.

Tableau 11: Pouvoir protéolytique des souches étudiées sur milieu YMA.

Souche	Diamètre de la Zone de la protéolyse	Observation
PC _{2.1}	6 mm	Croissance avec protéolyse
PG _{1.2}	0 mm	Croissance sans protéolyse
PG _{1.1}	8 mm	Croissance avec protéolyse
PG _{1.3}	9 mm	Croissance avec protéolyse
PG _{2.3}	5 mm	Croissance avec protéolyse
PG _{2.4}	7 mm	Croissance avec protéolyse
PC _{2.4}	9 mm	Croissance avec protéolyse
PP _{2.3}	11 mm	Croissance avec protéolyse
PP _{1.1}	20 mm	Croissance avec protéolyse

Les travaux effectués par **Lamarque (2004)** et **O'Sullivan et al., (2009)** ont démontré que les bactéries lactiques possèdent un système protéolytique complexe représenté par des endopeptidases situées dans le cytoplasme ou liées aux parois et des exopeptidases liées aux parois.

En outre, **Roudj et al.**, ont démontré que deux souches de *Lactobacillus* possèdent une forte activité protéolytique grâce à des enzymes protéolytiques qui sont capables de dégrader les caséines du lait ainsi ces deux bactéries montrent une activité protéolytique extracellulaire et font partie des lactobacilles capables de libérer les protéases dans le milieu de culture (**Roudj et al., 2009**).

Donc l'absence de l'activité protéolytique chez la souche *Lb. brevis* revient à l'absence des exopeptidases liés à la paroi, car grâce à leur charge et leurs poids moléculaire les protéines ne peuvent traverser les enveloppes microbiennes, donc pour être utilisées, les protéines doivent être au préalable hydrolysées par des enzymes soit exocellulaires, soit liées aux enveloppes (**Novel, 1993**). La présence de zone de lyse indique la présence du gène ou plasmide codant pour cette activité (**Vermeulen et al., 2005 ; Paster et al., 2003**).

En fin, les résultats obtenus autorisent à dire que 88,89% de souches mise en test possèdent une activité protéolytique qui est l'une des critères de sélection de culture destinées à la production de fromage et des autres produits lactofermentés. La protéolyse due aux bactéries

lactiques sera surtout conduite à des peptides courts et à des acides amines libres, ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arômes (Novel, 1993).

II. 3. 3. Pouvoir texturant

La présence de colonies grosses très scintillantes, muqueuses avec aspect brillant indique que notre résultats aient positifs, (Larpent, 1997). Sur cette base de données on a remarque que 5 souches codées (PG_{1,2}, PG_{1,1}, PG_{1,3}, PG_{2,3}, PP_{1,1}) présentent des résultats positifs et ont donc une activité texturant en produisant des polysaccharides par des quantités considérables, donc elles pouvant être utilisé comme levains épaississants (Tableau 12).

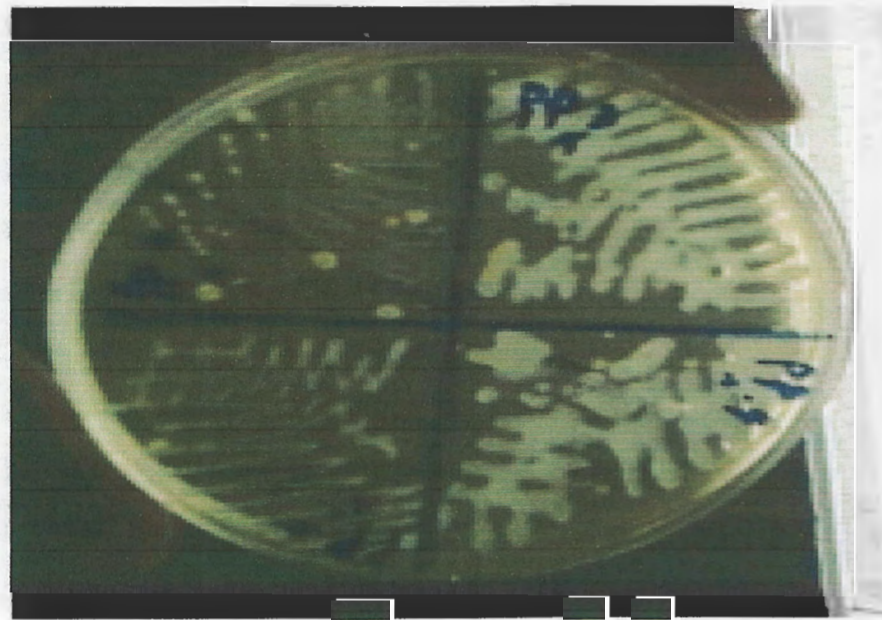


Figure 10: exemple de la production de polysaccharides.

Deux autres souches *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lb. casei* subsp. *casei* ont un pouvoir texturant douteux car les colonies sont un peu de grande taille mais la forme observée ne suffit pas pour leur attribuer le caractère épaississant à cause de l'absence de colonies suffisamment larges et gluantes, donc même s'il y a production des polysaccharides elle est très faible.

En ce qui concerne les deux souches restantes *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ont un pouvoir texturant négatif, ces résultats sont probablement due aux pertes de plasmide.

Certaines souches de bactéries lactiques ont la faculté de synthétiser des polysaccharides glucanes (dextranes) et fructosanes (levanes), qui constituent la capsule cellulaire, ces macromolécules contribuent à modifier la texture des produits dans lesquels se développent les souches compétents (Novel, 1993).

Ces polysaccharides contribuent à améliorer les caractères rhéologiques des produits fermentés, quand elles sont ajoutées avec des quantités adéquates. Elles sont fonctionnelles comme agents: épaississantes, stabilisants, émulsifiants, gélifiants (Frengova et al., 2002).

Ils ont démontré que les exopolysaccharides produits par certaines souches de bactéries lactiques peuvent exercer des effets bénéfiques sur la santé humaine, parmi ces effets, la possibilité à fonctionner comme prébiotiques (Salazar et al., 2008).

Tableau 12: Production de polysaccharides par les bactéries lactiques identifiées.

Souche	Observation	Conclusion
PC _{2.1}	Colonies larges et peu gluantes	Test douteux
PG _{1.2}	Colonies larges, gluantes et brillantes	Test positif
PG _{1.1}	Colonies larges, gluantes et brillantes	Test positif
PG _{1.3}	Colonies larges, gluantes et brillantes	Test positif
PG _{2.3}	Colonies régulières	Test négatif
PG _{2.4}	Colonies larges, gluantes et brillantes	Test positif
PC _{2.4}	Colonies larges et peu gluantes	Test douteux
PP _{2.3}	Colonies régulières	Test négatif
PP _{1.1}	Colonies larges, gluantes et brillantes	Test positif

D'après, tous ce qui a été rapporté, on a déduit qu'on a isolé des souches performantes vis-à-vis de la production de polysaccharides.

II- 4. Evaluation des aptitudes probiotiques

I-4-1. Estimation de la croissance

Nos résultats montrent qu'il y a une croissance normale sur les boîtes contenant de la gélose MRS pour tous les souches. La meilleure performance de croissance est notée avec la souche *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*. Il apparaît clairement que l'espèce *Lb. brevis* manifeste le

minimum de croissance avec 844 colonies (**Tableau 13**). Ce test nous permet de mieux évaluer le pouvoir de développement des souches dans les milieux hostiles.

Tableau 13: Estimation de la population microbienne des bactéries lactiques après 24h d'incubation.

Souche	DO	Nombre de colonies (dilution 10 ⁻³)
PG _{1,3}	0.915	2600
PG _{2,3}	0.754	3432
PC _{2,1}	0.950	1140
PG _{2,4}	0.202	3576
PG _{1,2}	0.525	4944
PC _{2,4}	0.140	5360
PP _{2,3}	0.930	2048
PP _{1,1}	0.896	844
PG _{1,1}	0.920	1464

I-4-2. Croissance sur milieu acide

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une croissance des bactéries lactique sur le milieu à différent pH (3 et 4) mais il est clair que la croissance sur la gélose à pH 4 plus forte que celle sur la gélose à pH 3 comme il y a une différence de la croissance entre les souches lactiques testées (**Tableau 14**).

On note que les souches offrent une sensibilité très marquée sur le milieu à pH 3 de fait que les souches codées PG_{1,1}, PG_{1,2}, PG_{1,3}, PC_{2,1}, PP_{2,3} ne pouvant pas croître sur ce milieu.

Toutes les souches testées tolèrent mieux le pH 4 avec une estimable croissance des colonies bactériennes est notée avec la souche *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*.

D'après les résultats obtenus, on a déduit qu'il y a une réduction de la croissance bactérienne avec l'abaissement du pH, les résultats montrent aussi qu'il y a une chute de croissance sur le milieu à pH 3 comparativement au milieu témoin.

Les résultats obtenus sont en accord avec les données bibliographiques qui dit que le pH des bactéries lactiques est compris entre 5 et 7, plus le pH est acide, plus la croissance est faible (**Novel, 1993**).

Les résultats rapportés par Draksler et al., (2004) ont montré que 6/ 137 souches de BL sont résistantes à pH 3.

De même, Maragkoudakis et al.,(2006) ont rapporté in vitro que 29 souches de *Lactobacillus* sont capables de survivre sous pH 3 mais l'abaissement de pH à 1 inhibe la croissance de bactéries.

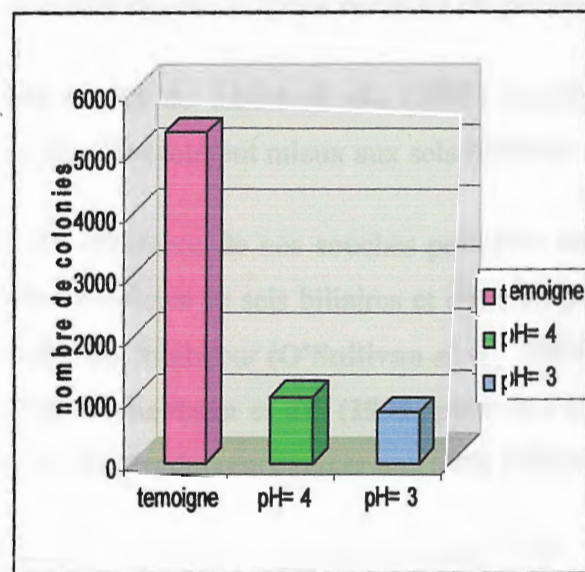
En fin, cette adaptation à pH acide semble liée aux protéines et les gènes codant impliqués dans l'homéostasie de pH tel que le système GAD, ADI et la pompe H⁺- ATPase (Cotter et Hill, 2003). De fait que Azcarate- peril et al., (2004) ont montré que *Lactobacillus acidophilus* résiste à pH acide en utilisant le système F₀F₁ ATPase.

De même, Penaud et al.,(2006) on trouvé que *Lactobacillus bulgaricus* résiste aux conditions acides grâce aux systèmes de transports des ions.

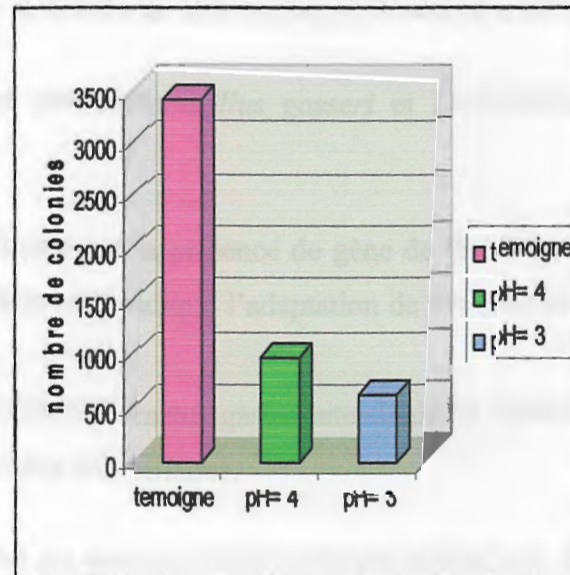
Tableau 14: La croissance des souches des bactéries lactiques à pH 3 et à pH 4.

Souche	PG _{1.1}	PG _{1.2}	PG _{1.3}	PP _{1.1}	PC _{2.4}	PC _{2.1}	PG _{2.3}	PP _{2.3}	PG _{2.4}
Nombre des colonies									
A pH 4	2720	880	2120	1688	1064	1320	992	1424	2980
A pH 3	-	-	-	788	822	-	632	-	1350

-: l'absence de la croissance des bactéries.



(a)



(b)

En fin, des études in vivo sont nécessaires pour montrer la capacité de ces bactéries à passer à travers le tractus gastro-intestinal et à résister aux sels biliaires.

Tableau 15: La croissance des souches des bactéries lactiques en présence de sels biliaires.

Souche	PG _{1.1}	PG _{1.2}	PG _{1.3}	PP _{1.1}	PC _{2.4}	PC _{2.1}	PG _{2.3}	PP _{2.3}	PG _{2.4}
Croissance									
A 0,15% de la bile	+	+	+	+	+	-	-	+	+
A 0,3% de la bile	-	-	-	-	+	-	-	+	+

+: la présence de la croissance des bactéries.

-: l'absence de la croissance des bactéries.

I-4-5. Résistance aux antibiotiques

Les résultats obtenus montrent que quelques souches sont sensibles seulement à trois antibiotiques où les zones d'inhibition sont comprises entre 15 et 38 mm, mais elles sont résistantes aux deux antibiotiques restants (zones d'inhibition comprises entre 0 et 15mm) (**Tableau 16**).

Les deux souches *Lb. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, montrent une résistance vis à vis de TE, et la souche *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* manifeste une résistance pour SP₁₀₀, alors que la souche, *Lb. casei* subsp. *casei* montre une résistance vis à vis de TE et SP₁₀₀. Les plus grandes zones d'inhibition sont notées chez toutes les souches envers Pénicilline G (**Figure 17**).

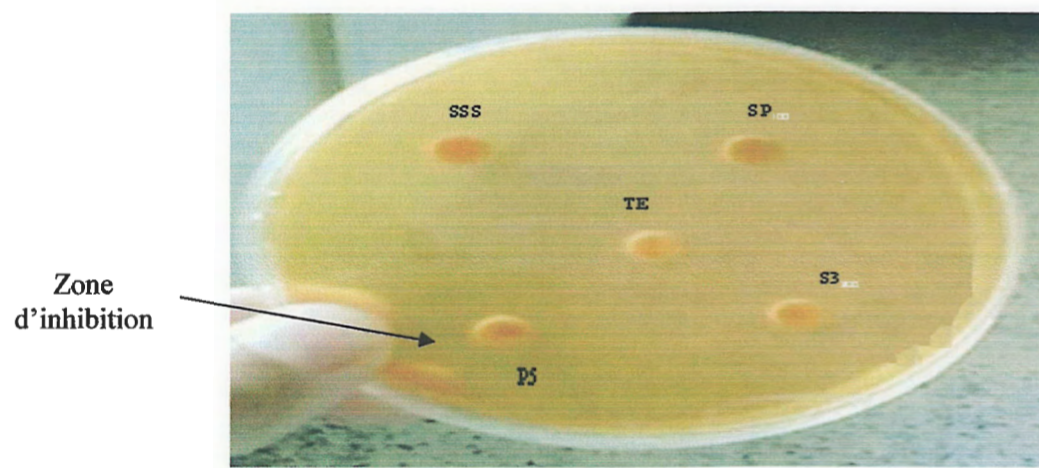


Figure 12: exemple de test de la résistance de *Lb. casei* subsp. *casei* aux antibiotiques.

La résistance aux antibiotiques indique que nos résultats sont en accord avec de nombreux travaux et qui ont rapporté que les bactéries lactiques peuvent avoir une résistance aux antibiotique naturelle ou acquise.

Maragkoudakis et al, (2006) ont trouvé que la majorité des souches de *Lactobacillus* testées manifestent une résistance aux vancomycine et teicoplanin, mais cette résistance diminuée avec le tétracycline et chloramphénicol.

De plus, **Hummel et al, (2007)** ont rapporté que la résistance des souches de *Lactobacillus* aux antibiotiques est liée principalement à la présence des gènes de résistance, et il a rapporté aussi que cette résistance peut être due à des mutations aux niveaux des gènes codants, ainsi la concentration maximale inhibitrice (CMI) des antibiotiques joue un rôle dans cette résistance.

Tableau 16: Résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques.

ATB	SSS	SP ₁₀₀	S3 ₃₀₀	P5	TE
Souche					
PG _{2.4}	0 mm	30 mm	0 mm	35 mm	0 mm
PC _{2.1}	0 mm	10 mm	0 mm	32 mm	18 mm
PG _{2.3}	0 mm	15 mm	0 mm	24 mm	14 mm
PC _{2.4}	0 mm	26 mm	0 mm	34 mm	0 mm
PG _{1.3}	0 mm	22 mm	0 mm	38 mm	20 mm
PP _{1.1}	0 mm	18 mm	0 mm	32 mm	22 mm
PP _{2.3}	0 mm	0 mm	0 mm	28 mm	0 mm
PG _{1.1}	0 mm	0 mm	0 mm	25 mm	10 mm
PG _{1.2}	0 mm	18 mm	0 mm	22 mm	18 mm

SSS: Streptomycin

SP₁₀₀: Spiramycin

S3₃₀₀: Sulphonamide

P5: Penicillin

TE: Tétracycline

I-4-5. Aptitude antagonistique des BL *in vitro*

Le test d'interaction *in vitro* entre les souches des BL isolées à partir de tube digestif de *Larus michahellis* et les souches d'*E. coli* polyrésistants isolées à partir des déjets alimentaires d'origine animale, révèle l'existence d'une activité inhibitrice des BL par rapport aux souches d'*E. coli* testées notamment pour les souches *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. brevis* et

qui ont montré des zones d'inhibition comprises entre 11 mm et 15 mm autour des puits (Figure 13).

Cependant, on note aussi que cette activité varie selon les souches des BL et selon la variation des souches d'*E. coli*.

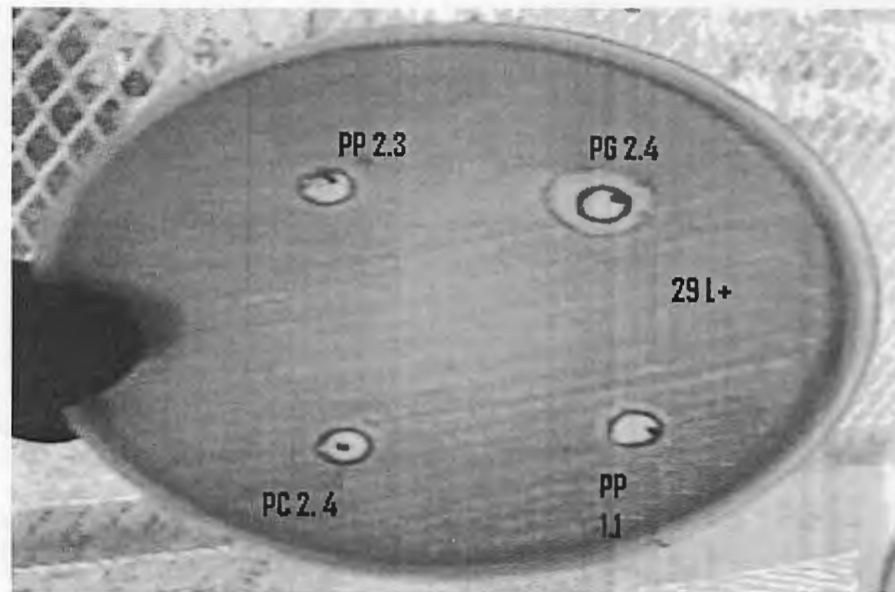


Figure 13 : exemple de test d'antagonisme des bactéries lactiques avec *E. coli* 29 L⁺

En effet, une analyse approfondie des résultats montre que la souche 16 L⁺ et 29 L⁺ sont inhibées par 6 souches/ 9 testées, par contre la souche L⁺ 16 A n'est inhibée que par 3 souches/ 9 testées ce qui nous permet de dire que les souches de BL peuvent soit avoir un effet sélectif sur les souches d'*E. coli*, soit que les d'*E. coli* possède normalement des aptitudes de résistance vis-à-vis des facteurs d'inhibition élaborés par des BL (Tableau 17).

Tableau 17: Résultats d'interaction entre les BL et les souches des entérobactéries.

Entérobactéries	16 L ⁺	29 L ⁺	L ⁺ 16 A
BL			
PG _{1.1}	0	0	0
PG _{1.2}	10	10	9
PP _{1.1}	8	0	0
PP _{2.3}	9	11	0
PG _{1.3}	11	11	0
PC _{2.4}	0	0	0
PG _{2.3}	0	0	0
PG _{2.4}	11	10	15
PC _{2.1}	0	13	0

L'absence des zones d'inhibition se traduit par une symbiose qui est le résultat d'une interaction positive entre les BL et les entérobactéries testées. Alors que, la présence des zones d'inhibition se traduit par un antagonisme qui est le résultat d'une interaction négative entre les BL et les entérobactéries.

Les BL ont un rôle dans l'inhibition de flore non lactique en synthétisent des substances inhibitrices ayant des activités antimicrobiennes sur les bactéries à Gram (-) et Gram (+) (**Lima et al., 2006**).

Les travaux de **Lengkey et al., (2009)** et **Daeschel et al., (1989)** ont montré que le pouvoir inhibiteur des BL est lié à la production des substances qui confèrent à nos souches des aptitudes antagonistes. Il s'agit de bactériocines et d'antibiotiques probables. D'autres métabolites peuvent être produits par les souches testées tel que l'acide lactique, acétique, le diacetyl, et le peroxyde d'hydrogène (**Lengkey et al., 2009 ; Daeschel et al., 1989**).

Les travaux d'Ammor ont montré que: l'effet de pH et les acides, notamment l'acide lactique qui est le métabolite majeur produit par les bactéries lactiques au cours de la fermentation, la diminution du pH cause une acidification du cytoplasme cellulaire qui se traduit par une inhibition de la flore acido-sensible dont la fraction acide non dissociée peut diffuser à travers la membrane et détruire le gradient électrochimique de proton ou altérer la perméabilité de la membrane ce qui engendrerait une perturbation des systèmes de transport de substrats (**Ammor, 2004**).

Conclusion générale

Conclusion générale

Les bactéries lactiques sont des germes qui dont l'importance technologique et industrielle reste considérable. Les critères de sélection *in vitro* de ces bactéries pour l'utilisation comme auxiliaire technologique et pour l'entretien de la santé de l'homme comme ingrédient probiotique dans les aliments et dans les préparations pharmaceutiques reste l'une des préoccupations majeures des laboratoires de microbiologie.

dans le but d'une contribution à l'enrichissement de la base de données des bactéries lactiques à effets probiotiques, nous nous sommes intéressés à une niche écologique qui et jusqu'à nos jours n'a été explorée et qui est le tractus digestif d'un oiseau marin sauvage appelé *Larus michahellis*.

Le travail se déroule en trois phases, la première est consacrée à l'isolement et l'identification de 24 souches de bactéries lactiques en forme bacillaire, la deuxième partie s'est axée sur l'étude de l'aptitude probiotique avec leur pour antagoniste des souches isolées *in vitro*.

Les résultats obtenus révèlent la richesse et la diversité des souches lactiques qui est hébergée par le tube digestif de *Larus michahellis*, en effet, le résultat du screening nous a permis d'identifier 24 souches (6 de *Lb. delbrueckii ssp lactis* (25%), 6 de *Lb. brevis* (25%), 4 de *Lb. rhamnosus* (16,67%), 2 de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* (8,32%), 4 de *Lb. delbrueckii ssp delbrueckii* (16,67%), 1 de *Lb. bifementans* (4,17%), 1 de *Lb. casei subsp* (4,17%).

L'étude des aptitudes technologiques de 9 souches choisies au hasard a montré que la plus part de ces souches possèdent la capacité d'acidification, de protéolyse et d'un pouvoir remarquable à se multiplier dans des milieux hostiles. En effet les souches mises en test possèdent une activité acidifiante importante avec un maximum de 7.5g/l produite par la souche PG₂. Par ailleurs la recherche de l'activité protéolytique a montré que 8 de 9 souches possèdent cette aptitude technologique.

Quant à la production de polysaccharides, 5 souches ont la faculté de synthétiser ces macromolécules qui contribuent à modifier la texture des produits laitiers.

Pour les aptitudes probiotiques, les souches mises en test ont montré une résistance aux conditions hostiles vis-à-vis du pH (3 et 4) et de différentes concentrations de sels biliaires (0.15% et 0.3%) et des antibiotiques (SSS, SP₁₀₀, S3₃₀₀, P5, TE) et le test des interactions bactériennes *in vitro*, nous a permis de voir les effets de stimulation et d'inhibition, la mise en

évidence de la production des substances inhibitrices sur les milieux solides par la mesure d'une zone d'inhibition.

Même que préliminaire, les résultats de notre travail confirme l'hébergement du tube digestif de *Larus michahellis* d'une flore lactique diversifiée avec des propriétés intéressantes dans le domaines des industries agro-alimentaires.

En fin, nos résultats restent insuffisants dans la mesure où d'autres travaux sont nécessaires pour évaluer l'intérêt réelle de l'utilisation de ces bactéries lactiques comme probiotiques.

Références bibliographiques

- 1- Albanese A, Spanu T, Sali M, Novegno F, D'Inzeo T, Santangelo R, Mangiola A, Anile C and Fadda G. (2006). Molecular identification of *Leuconostoc mesenteroides* as a cause of Brain Abscess in an immunocompromised patient. *Journal of Clinical Microbiology* ; 44(8) : 3044–3045.
- 2- Ammor MS. (2004). Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison: identification et propriétés des bactéries lactiques (thèse). Lempdes : université de Rennes I; p. 1-29.
- 3- Ávall-Jääskeläinen S, Lindholm A, and Palva A. (2003). Surface display of the receptor-binding region of the *Lactobacillus brevis* S-Layer protein in *Lactococcus lactis* provides nonadhesive Lactococci with the ability to adhere to intestinal epithelial cells. *Applied Environnement Microbiology* ; 69(4): 2230–2236.
- 4-Azcarate-Peril M, Altermann E, Hoover-Fitzula R, Cano R, and Klaenhammer T.(2004). Identification and Inactivation of Genetic Loci Involved with *Lactobacillus acidophilus* Acid Tolerance. *Applied Environnement Microbiology*; 7(9): 5315–5322.
- 5- Bascomb S, Manafi M. (1998). Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram-positive cocci. *Clinical Microbiology Reviews*; 11(2): 318–340.
- 6- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. (2000). Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology* ; 50:117-131.
- 7- Bissett DL and Anderson RL. (1974). Lactose and D-Galactose metabolism in group N streptococci: presence of enzymes for both the D-Galactose 1-Phosphate and D-Tagatose 6-Phosphate Pathways. *Journal of Bacteriology* ; 117 (1) : 318-320.
- 8- Bornert G. (2000). Importance des bactéries psychotropes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue Méd. Vét*; 151(11): 1003-1010.

- 9- Bourgeois CM, Larpent JP. Microbiologie alimentaire: aliments fermentés et fermentations alimentaires. Paris : Lavoisier; 1996.
- 10- Buck BL, Altermann E, Svingerud T and Klaenhammer TR. (2005). Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied Environnement Microbiology*; 71(12) : 8344–8351.
- 11- Cavallini DCU, Bedani R, Bomdespacho LQ, Vendramini RC and Rossi EA. (2009). Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: a randomized double-blind study. *Lipids in Health and Disease* 8:1.
- 12- Cenatiempo Y, Berjeaud JM, Biet F, Fremaux C, Hechard Y, Robichon O. (1996). Bactériocines de bactéries lactiques: données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Lait*; 76:169-177.
- 13- Chae BJ, Lohakare JD, Moon WK, Lee SL, Park YH, Hahn TW. (2005). Effects of supplementation of β - glucan on the growth performance and immunity in broilers. *Research in Veterinary Science*; 80: 291- 298.
- 14- Corrieu G, Luquet FM. Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Paris: Lavoisier; 2008.
- 15-Cotter P et Hill C. (2003). Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiology and Molecular biology Reviews*; 67(3): 429–453.
- 16- Daeschel MA. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food technology*: 164- 166.
- 17- Davis CR, Wibowo DJ, Lee TH and Fleet GH. (1986). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Applied Environnement Microbiology*; 51(3): 539-545.
- 18- Dimitonova SP, Danova ST, Serkedjieva JP, Bakalov BV. (2007). Antimicrobial activity and protective properties of vaginal lactobacilli from healthy Bulgarian women. *Anaerobe*; 13: 178–184.

- 19- Dortu C, Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*; 13(1): 143-154.
- 20- Drakslar D, Gonzales S, Oliver G. (2004). Preliminary assays for the development of a probiotic for goats. *Reprod. Nutr. Dev*; 44: 397-405.
- 21- Elkins CA, Muñoz ME, Mullis LB, Stingley RL, Hart ME. (2008). *Lactobacillus*-mediated inhibition of clinical toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* strains and its relation to acid and peroxide production. *Anaerobe*; 14: 261- 267.
- 22- Felis GE and Dellaglio F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr. Intest Microbiol*; 8: 44-61.
- 23- Frengova GI, Simovaa ED, Beshkovaa DM and Simovb ZI. (2002). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Z. Naturforsch*; 57: 805- 810.
- 24- Fuller R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*; 32: 439- 442.
- 25- Furet GP, Relano P, Langella P, Corthier G. Les probiotiques consommés comme aliments ou compléments alimentaires. (2008). In: Roberfroid MB, Coscam V, Delzenne N, eds. *Aliments fonctionnels*. Paris: Lavoisier; p. 77- 111.
- 26- Gill HS, Guarner F. (2004). Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J*; 80:516-526.
- 27- Goffin P, Lorquet F, Kleerebezem M and Hols P. (2004). Major Role of NAD-dependent lactate dehydrogenases in aerobic lactate utilization in *Lactobacillus plantarum* during early stationary phase. *Journal of Bacteriology*; 186(19) : 6661-6666.
- 28- Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D, Minuzzo M, Scarafoni A, Arioli S, Hellman J, Karp M and Parini C. (2008). Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Applied Environnement Microbiology*; 74(15): 4695-4702.

- 29- Guiraud JP. Microbiologie alimentaire. Paris: DUNOD; 1998.
- 30- Guiraud JP et Rosec JP. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. France: AFNOR; 2004.
- 31- Hummel A, Hertel C, Holzapfel Y, Franz C. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of Lactic Acid Bacteria. *Applied Environnement Microbiology*; 73(3): 730–739.
- 32- Heyman M and Ménard S. (2002). Probiotic microorganisms : how they affect intestinal pathophysiology. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*; 59: 1151- 1165.
- 33- Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J and Schillinger U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr*; 73:365S–73S.
- 34- Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Moller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, Sandström B, Tvede M, et Jakobsen M. (1999). Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Applied Environnement Microbiology*; 65 (11): 4949–4956.
- 35- Jeantent R, Croguennec T, Mahaut M, Schuck P, Brulé G. Les produits laitiers. Paris: Lavoisier; 2008.
- 36- Joffin JN, Leyral G. Microbiologie technique, Dictionnaire des techniques. Paris : CRDP d'Aquitaine; 2006.
- 37- Kim SE, Park MH, Lee JH, Kim TW, Kim HY. (2008). Probiotic properties of *Lactobacillus brevis* J- 38 from Mukeunji, a Korean ripened kimchi. *Journal of Biotechnology*; 136S: S717- S742.
- 38- Labioui H, El moualdi L, El yachioui M, Ouhssine M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes .*Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*; 144: 237-250.

- 39- Lamarque M, Charbonnel P, Aubel D, Piard JC, Atlan D and Juillard V. (2004). A Multifunction ABC transporter (Opt) contributes to diversity of peptide uptake specificity within the genus *Lactococcus*. *Journal of Biotechnology*; 186(19): 6492–6500.
- 40- Lambin S. Précis de microbiologie. Paris: Massow et Cie; 1969.
- 41- Laouabdia Sellami N, Badis A, Guetarni D, Ouzrout R and Kihal M. (2007). Caractérisation local Arabia and Kabyle. *Journal of Animal and Veterinary Advances*; 6(12): 1474- 1481.
- 42- Larpent JP et Larpent- Gourgand M. Mémento technique de microbiologie. Paris: Lavoisier; 1997.
- 43- Larsen N, Nissen P, Willats WGT. (2007). The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus* spp. and *E. coli* O138. *International Journal of Food Microbiology*; 114 : 113- 119.
- 44- Lavermicocca P, Valerio F, Lonigro SL, Angelis M, Morelli L, Callegari ML, Rizzello CG and Visconti A. (2005). Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied Environnement Microbiology*; 71(8): 4233–4240.
- 45- Lengkey HAW, Balia RL, Togoe I, Tabac BA, Ludong M. (2009). Isolatio and identification of lactic acid bacteria from raw poultry meat. *Biotechnology in Animal Husbandry*; 25(6): 1071- 1077.
- 46- Lick S, Drescher K and Heller K. (2001). Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the Terminal Ileum of Fistulated Go'ttingen Minipigs. *Applied Environnement Microbiology*; 67 (9) : 4137–4143.
- 47- Luquet FM et Corrieu G. Bactéries lactiques et probiotiques. Paris: Lavoisier; 2005.
- 48- Lye HS, Kuan CY, Ewe JA, Fung WY and Liong MT. (2009). The improvement of hypertension by probiotics : effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *Int. J. Mol. Sci*; 10: 3755- 3775.

- 49- Macfarlane G T, Cummings J H. (1999). Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?. *BMJ*; 318: 999-1003.
- 50- Maragkoudakisa A, Zoumpoulou G, Miarisa C, Kalantzopoulou G, Potb B, Tsakalidou E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*. 16; 189–199
- 51- Moreira J L S, Mota R M, Horta M F, Teixeira S MR, Neumann E, Nicoli J R and Nunes ÁC. (2005). Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiology*; 5(15): 1471-2180.
- 52- Myers D. (2007). Probiotics. *Journal of Exotic Pet Medicine*; 16(3): 195- 197.
- 53- Novel G. Les bactéries lactiques. (1993). In: Leveau JY, Bouix M, eds. *Microbiologie industrielle: les microorganismes d'intérêt industriel*. Paris: Lavoisier; p. 169- 331.
- 54- O'Sullivan O, O'Callaghan J, Sangrador-Vegas A, Auliffe OM, Slattery L, Kaleta P, Callanan M, Fitzgerald GF, Ross RP and Beresford T. (2009). Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiology*; 9:50.
- 55- Palencia PF, Werning ML, Sierra-Filardi E, Dueñas MT, Irastorza A, Corbí AL and López P. (2009). Probiotic properties of the 2-Substituted (1,3)- β -D-Glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus*. *Applied Environnement Microbiology*; 75(14): 4887–4891.
- 56- Pastar I, Tonic I, Golic N, Kojic M, Kranenburg R, Kleerebezem M, Topisirovic L and Jovanovic G. (2003). Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Applied Environnement Microbiology*; 69(10): 5802–5811.
- 57- Pavan S, Desreumaux P and Mercenier A. (2003). Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*; 10(4): 696–701.
- 58- Penaud S, Fernandez A., Boudebbouze S, Ehrlich S.D, Maguin E, Van de Guchte M. (2006). Induction of Heavy-Metal-Transporting CPX-Type ATPases during Acid

Adaptation in *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied Environment Microbiology*; 72(12): 7445–7454

59- Piquet MA, Gloro R, Justum AM, Reimund JM. (2007). Les probiotiques, des outils thérapeutiques pour moduler les effets biologiques de la flore intestinale : une introduction. *Obes*; 2: 227–233.

60- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiologie. Paris: Boeck et Larcier; 2003.

61- Rizk Z. (2006). Caractérisation moléculaire des bactéries lactiques des levains de panification (thèse). Lempdes : université de Rennes I; p. 1-29.

62- Roudj S, Belkheir K, Zadi-Karam H and KaramNE. (2009). Proteolysis and autolysis properties of two lactobacilli isolated from Camel milk of South-Western Algeria. *European Journal of Scientific Research*; 34(2): 218-227.

63- Rousseau V. (2004). Evaluation d'oligosaccharides à effet prebiotique vis-à-vis de la microflore vaginale (thèse). Toulouse : laboratoire GENIBIO; p. 1- 186.

64- Rychen G, Simoes Nunes C. (1995). Effets des flores lactiques des produits laitiers fermentés : une base scientifique pour l'étude des probiotiques microbiens dans l'espèce porcine. *INRA Prod. Anim*; 8(2): 97- 104.

65- Salazar N, Gueimonde M, Hernández-Barranco AM, Ruas-Madiedo P and Reyes-Gavilán CG. (2008). Exopolysaccharides produced by intestinal *Bifidobacterium* strains Act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. *Applied Environment Microbiology*; 74(15): 4737–4745.

66- Salminen S, Nurmi J and Gueimonde M. (2005). The genomics of probiotic intestinal microorganisms. *Genome Biology*; 6: 225.

67- Sánchez C, Neves AR, Cavalheiro J, Santos MM, García-Quintáns N, López P and Santos H. (2008). Contribution of citrate metabolism to the growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at low pH. *Applied Environment Microbiology*; 74(4): 1136–1144.

- 68- Savadogo A, Ouattara CAT, Bassole IHN, Traore SA. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *African Journal of Biotechnology*; 5 (9): 678-683.
- 69- Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PSC, Goulet J and Tompkins TA. (2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infection and Immunity*; 73(8): 5183–5188.
- 70- Shida K, Nanno M. (2008). Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff. *Trends in immunology*; 29(11): 565- 571.
- 71- Smit BA, Hylckama Vlieg JET, Engels WJM, Meijer L, Wouters JTM and Smit G. (2005). Identification, cloning, and characterization of a *Lactococcus lactis* branched-chain α -keto acid decarboxylase involved in flavor formation. *Applied Environnement Microbiology*; 71(1): 303–311.
- 72- Sridhar VR, Hughes JE, Welker DL, Broadbent JR and Steele JL. (2005). Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Applied Environnement Microbiology*; 71(6): 3025–3032.
- 73- Sutra L, Federighi M, Jouve JL. Manuel de bactériologie alimentaire. Paris: Polytechnica; 1998.
- 74- Thompson J. (1980). Galactose transport systems in *Streptococcus lactis*. *Journal of Biotechnology*; 144(2): 683-691.
- 75- Vermeulen N, Pavlovic M, Ehrmann MA, Gänzle MG and Vogel RF. (2005). Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T during growth in sourdough. *Applied Environnement Microbiology*; 71(10): 6260–6266.
- 76- Yao AA, Egounlety M, Kouame LP, Thonart P. (2009). Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l’Afrique de l’Ouest : leur utilisation actuelle. *Ann. Méd. Vét*; 153: 54-65.

Format électronique :

Berger G. (2008). Goéland leucophée. Conservation- Nature. Available from: URL: <http://www.conservation-nature.fr/article1.php>

Cadiou B, Sadoul N, GISOM. (2002). La Problématique du Goéland leucophée *Larus michahellis* sur les étangs palavasiens. CEN-LR / SIEL. Available from: URL : http://www.polelagunes.org/web/pdf.../Rap%20Goeland%202005_550Ko.pdf

Collin D. (2003). Goéland leucophée: *Larus michahellis*- *Yellow- legged Gull*. Oiseaux. net. Available from: URL: <http://www.oiseaux.net/.../goeland.leucophee.htm>

Deltort C. (2003). Petites animaux..., gros problèmes... !. Port- Cros. Available from: URL: http://www.portcrosparcnational.fr/documentation/pdf/Plaquette_animaux.pdf

Rentz G, Siorat F, Rousseau E, Dubois P. (2007). Dossier de presse Les Goélands dans les villes. LPO. Available from: URL : <http://www.lpo.fr/comm/docs/DossierDePresseGoelandpdf>

Robin JM, Rouchy A. (2001). Les Probiotiques. Nutrithérapie INFO. Available from: URL: <http://www.synergiashop.com/annexes/PDF/TEST/Probiotique.pdf>

Valérié- Claude S, Romani M, Barré N, Leviol G. (2002). Mieux connaître le Goéland leucophée pour en gérer les nuisances. DDAF. Available from: URL : <http://www.languedoc-roussillon.ecologie.gouv.fr/milieux/GOELAND.pdf>

ANNEX

Violet de Gentiane

Violet de gentiane	1g
Ethanol à 90%	10ml
Phénol	2g
Eau distillée	100ml

Fuschine de Ziel

Fuscine basique	1g
Alcool éthylique à 90%	10ml
Phénol	5g
Eau distillée	100ml

Lugol

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

Réactif de Voges Prosquawer (VP)

VPI

KOH	40g
Eau distillée	100ml

VP II

Naphtol	60g
Ethanol	100ml

Eau physiologie

Chlorure de sodium	8.5g
Eau distillée	100ml

MRS (bouillon et gélose)

Peptone	10g
Extrait de viande	4g
Acétate de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,2g
Sulfate de manganèse, 4H ₂ O	0,2g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Agar (dans le cas de gélose)	15g
Eau distillée qsp	1000ml

pH final 6,2

Stérilisation 15 mn à 120°C.

M17 (gélose)

Milieu complet

-milieu de base préalablement fondu et ramené à 48-50°C

-solution de lactose chauffée à 48°C

Mélangé par agitation, incubation deux (2) jours à 37°C

Milieu de base

Peptone tryptique de caséine	2,5g
Peptone pepsique de viande	2,5g
Peptone papainique de soja	5g
Extrait de levure déshydraté	2,5g
Extrait de viande	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,25g
Acide ascorbique	0,5g
Agar	8 à 18g

Eau distillée qsp	1000ml
-------------------	--------

pH final 7,2

Stérilisation 20 mn à 120°C

Milieu hypersalé

Gélose	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	15g
NaCl	65g
Eau distillée	1000ml

pH final 7,5

Stérilisation 20mn à 120°C

C'est le milieu hypersalé à 6,5% de NaCl.

On change la concentration en NaCl (40g) pour obtenir le milieu hypersalé à 4% de NaCl.

Arginine déhydrolase (ADH)

Peptone	5g
Extrait de viande	5g
Pyridoxal	0.005g
Solution aqueuse de pourpre de bromocrésol à 2%	5ml
Glucose	0.5g
Eau distillée	1000ml

pH final 6,5

Milieu à l'arginine est obtenu en ajoutant 10g d'arginine, la répartition est faite en tubes stérilises 15mn à 120°C.

Ornithine décarboxylase (ODC)

Ornithine (L)	5g
Extrait de levure	3g
Chlorure de sodium	5g

Glucose	1g
Pourpre de bromocrésol	16g

pH final 6.3
Autoclaver 15mn à 120°C.

Lysine décarboxylase (LDC)

Lysine	5g
Extrait de levure	3g
Glucose	1g
Chlorure de sodium	5g
Pourpre de bromocrésol	6g

pH final 6.3
Autoclaver 15mn à 120°C.

Milieu GIBSON ABD-EL-MALEK

Lait écrémé à 0.01%	800ml
Glucose	55g
Peptone	2g
Extrait e viande	2g
Extrait de levure	2.8g
Na Cl	1g
Agar	4g
Jus de tomate	100ml
Eau distillée qsp	100ml

pH final 7
Stérilisation à 120°C pendant 15mn

Milieu YMA (Yeast Milk Agar)

Peptone	5g
Extrait e levure	3g
Lait écrémé	1g

Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH final 7.1

Stérilisation à 120°C pendant 20mn

Milieu hypersaccharosé

Extrait de viande	10g
Extrait de levure	3g
Bactropeptone	2.5g
Saccharose	150g
K ₂ HPO ₄	2g
NaCl	1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

pH final 6.8 ~7

Stérilisation à 120°C pendant 20mn

ملخص:

تعتبر البكتيريا اللبنية التي تنحدر من فلورة الجهاز الهضمي بكتيريا بروبيتيك. بهدف البحث عن هذه البكتيريا تمت دراستنا على الفلورة الدقيقة للجهاز الهضمي للاروس ميكائيليس حيث تم عزل و تعريف 25 سلالة للبكتيريا اللبنية وفقا لاختبارات فيزيولوجية و بيوكيميائية. دراسة القابلية التكنولوجية أظهرت أن السلالات المعزولة لها قدرة حمضية عالية وكذلك لها قدرة التحلل البروتيني و إنتاج السكريات المتعددة. إن دراسة القدرة البروبيوتكية بينت أن البكتيريا اللبنية تستطيع تحمل pH منخفض، الصفراء و المضادات الحيوية.

في النهاية اختبار التداخلات صناعيا بين أن السلالات المعزولة لها قدرة عالية مضادة لثلاث سلالات من انتيروبيكتيريا.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية، بروبيتيك، الجهاز الهضمي، لاروس ميكائيليس.

Résumé :

Les bactéries lactiques qui font partie de la flore intestinale sont considérées comme bactéries probiotiques. Dans le but de la recherche et l'identification de ces bactéries, notre travail a été menée sur la microflore de tractus gastro-intestinale de *Larus michahellis*, dont 25 souches de bactéries lactiques ont été isolées et identifiées selon les testes physiologiques et biochimiques. L'étude des aptitudes technologiques montre que nos souches possèdent une importante activité acidifiante, protéolytique et texturant. De même, l'étude de pouvoir probiotique a révélé que nos souches sont résistantes à pH acide aux sels biliaires et aux antibiotiques.

En fin, le teste d'interaction *in vitro*, a montré une bonne activité inhibitrice de nos souches vis à vis de trois souches d'entérobactéries.

Mots clés : bacteries lactiques, probiotiques, tractus gastro-intestinale, *Larus michahellis*.

Summary :

Lactic acid bacteria that are part of the intestine are considered as probiotic bacteria. In order to research and identification of these bacteria, our work has been performed on the microflora of the *Larus michahellis* gastro-intestinal tract. Including 25 strains of lactic acid bacteria were isolated and identified by physiological and biochemical testes.

The study of technological skills shows that our strains have a significant acidifying proteolytic and texturing activity. Similarly, the study of probiotic ability has revealed that probiotic strains are resist to acidic pH, bile salts and antibiotics.

Finally, the test for interaction *in vitro*, showed good inhibitory activity of our strains against three strains of Enterobacteriaceae.

Key words: Lactic acid bacteria, probiotic, gastro-intestinal tract, *Larus michahellis*.