



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



## **Université Amar Thelidji- Laghouat**

FACULTE : SCIENCE

DEPARTEMENT : SCIENCES BIOLOGIQUES

### **MEMOIRE DE MASTER**

Présenté par M<sup>elle</sup> DJELLOUD MERIEM

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE(SNV)

FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUE

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

### **Thème**

**Contrôle de qualité des différents yaourts probiotiques  
produits en Algérie.**

#### **Jury de soutenance :**

<b>Nom et Prénom</b>	<b>Grade</b>	<b>Qualité</b>
Becheur Mourad	MAA	Président
Krantar Kamal	MAA	Examineur
Chetatha Mohamed	MAA	Rapporteur

**Promotion : JUIN 2018**

**Titre du mémoire :** contrôle de qualité des différents yaourts probiotiques produits en Algérie.

**Résumé:**

Durant 5 mois d'étude, un totale de 40 échantillons de 3 marques nationales de produits probiotiques commercialisé dans la ville de Laghouat, ont fait l'objet d'analyses bactériologiques et de l'étude comparative dans ce mémoire.

Nous avons utilisé des milieux de cultures décrits par le journal officiel Algérien pour le dénombrement des germes totaux, la flore lactique et les bactéries probiotiques ; et des tests statistiques pour comparer entre 3marques de produits probiotiques.

Les résultats de dénombrement sur milieu MRS et M17 et les résultats de comparaison par le test student montrent que le produit Pro-X contient la concentration la plus élevé de probiotiques par rapport aux autres marques, puis le produit Pro-Z ensuite le produit Pro-Y par ses deux formes.

Le non respect de la concentration en charge probiotique de la troisième marque pro-Y serait expliquée par la rupture de chaine froid et/ou la non disponibilité des ferments lactiques et la souche probiotique pour la fabrication de ces produits.

**Mot clés :** produits probiotiques, flore lactique, MRS, M17, PCA.

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes chers parents pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements sans votre amour et votre soutien je ne serais jamais arrivé là où je suis. Je vous aime qu'Allah vous protège et vous garde pour moi. Je vous offre ce modeste travail en témoignage de tous les sacrifices et l'immense tendresse dont vous avez toujours su me combler.*

*Vraiment aucune dédicace ne saura exprimer mon grand amour, estime et respect que j'ai pour vous.*

*A mon cher et unique frère Abderrazak*

*A toutes et tous les membres de ma famille*

*A mes chères copines (fatima khadija hayet Amira Amina Messouda et djoumana ....) qui n'ont pas cessé de m'encourager.*

*A ma tante zineb et son mari pour leurs*

*Encouragements et pour leurs aides.*

*Et à tous mes camarades de Microbiologie Appliquée.*

*Meriem*



## Remerciements

*Nous remercions notre créateur **Allah**, Grand et Miséricordieux, Le tout Puissant pour le courage qu'il ma donné pour mener ce travail à terme.*

\*\*\*\*\*

*Je commence par exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à **Mr CHETATHA Mohamed** qui ma proposé ce thème et qui ma honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans l'encadrement de ce mémoire. Merci de m'avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit, veuillez trouver ici toutes les expressions de ma profonde gratitude et mes profonds respect.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à Monsieur **BECHOUR Mourad**, Je suis fière que vous me fassiez l'honneur pour avoir accepté la présidence de jury de soutenance de cette mémoire. je vous remercie vivement pour toutes les fois que vous avez passés avec patience extrême à me diriger, guider tout au long de mes années d'étude . Je vous remercie pour votre modestie mais aussi pour votre partage du savoir et large disponibilité. Veuillez trouver ici toutes mes expressions de profonde gratitude et mes sentiments de respect.*

*Je vous serai reconnaissante pour le reste de ma vie.*

*Nos remerciements vont également à Monsieur **RAHMANI Mokhtar** pour son aide, et ses précieux conseils.*

*Mes remerciements sont adressés également aux membres du Jury qui ont pris sur leur temps et ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à Monsieur **Karantar Kamel** pour avoir accepté de juger ce modeste travail. Vous trouvez ici toutes mes expressions respectueuses. Je ne peux que sincèrement vous exprimer mon respect et ma gratitude.*

*Mes remerciements vont également à toute l'équipe du Laboratoire en particulier les ingénieurs du laboratoire surtout Aouissi Fatima .*

*Au terme de la réalisation de ce travail, il m'est difficile d'établir la liste des personnes qui m'ont aidée un jour, les personnes qui m'ont rendu service, les personnes qui m'ont donné conseil ...*

*Que tous ceux qui ont été impliqués de près ou de loin dans la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude : sans votre contribution, il m'aurait été impossible de mener à bien ce travail*

*Merci à tous de me permettre de me lancer dans de nouveaux défis ....*

*Merci*

TABLE DES MATIERES	Pages
Remerciements	I
Dédicace	II
Table des matières	III
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VI
Liste d'abréviations	VII
INTRODUCTION	1

**Partie I : Synthèse bibliographique**

<b>CHAPITRE I.</b> Généralités sur les probiotiques	
1.1 Historique	3
1.2. Les différentes souches probiotiques appliquées dans l'industrie alimentaire	5
1.3. Exemple de Micro-organismes probiotiques	5
1- Le genre <i>Lactobacillus</i>	6
2- <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	6
3- <i>Lactococcus</i> et <i>streptococcus</i> .	7
4- Le genre <i>Leuconostoc</i>	7
5- Les bifidobactéries	8
6- Levures probiotiques	8
1.4. Lignes directrices pour l'évaluation des microorganismes probiotiques	9
1.4.1. Difficultés réglementaires	10
1.4.2. Textes réglementaires algériens	11
1.5. Caractéristiques des probiotiques	11
1.6. Critères de sélection des souches probiotiques destinées à l'homme	12
1.6.1. Propriétés fonctionnelles	12
1.6.1.1. Survie au cours du transit digestif	12
1.6.1.2. Activité antimicrobienne	12
1.6.1.3. Colonisation et adhésion aux cellules intestinales	13
1.6.2. Propriétés technologiques	13
1.6.2.1. Viabilité et stabilité des microorganismes	13
1.6.2.2. Propriété acidifiante	13
2. Critères technologiques	14
2.1. Critères technologiques de sélection des souches probiotiques	14
2.1.1. Résistance à l'acidité gastrique	15
2.1.2. Tolérance aux sels biliaires	15
2.1.3. Résistance aux antibiotiques	15
3. Les Bifidobactéries comme bactéries probiotiques	16
3.1. Généralités sur les bifidobactéries	16
3.1.1. Taxonomie	16
3.1.2. Ecologie	17
3.1.2.1. Implantation chez le nouveau né	18
3.1.2.2. Origine de la colonisation	19
3.1.2.3. Facteurs influençant la colonisation	19
3.1.2.3.1. la prématurité	19
3.1.2.3.2. le mode d'allaitement	19
3.1.2.3.3. L'environnement	19

3.2. Propriétés phénotypiques	20
3.2.1. Morphologie	20
3.2.2. La composition de la paroi cellulaire	21
3.3. Propriétés physiologique	21
3.3.1. Température optimal	21
3.3.2. Sensibilité au pH	22
3.3.3. Anaérobiose	22
3.4. Besoins nutritionnels	22
3.4.1. Besoin en acides aminés et source de carbone	22
3.5. Les facteurs bifidogènes	22
3.6. Potentiel d'application des Bifidobactéries dans les produits laitiers	23
<b>CHAPITRE II : Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé</b>	
1. Application clinique (traitement et régime)	24
1.1. Les probiotiques en pathologie digestive	25
2. Application des probiotiques dans le domaine alimentaire	26
2.1. Les yaourt probiotiques	26
2.2. Aspect nutritionnel et thérapeutique du yaourt au <i>bifidus</i>	27
3. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine	28
3.1. Mécanismes d'action des probiotiques	28
3.2. Les principaux effets bénéfiques sur la santé de l'hôte	29
3.2.1. Soulagement de la constipation	30
3.2.2. Améliorer l'utilisation du lactose par l'organisme	30
3.2.3. Prévention ou le raccourcissement de la durée des diarrhées	30
3.2.4. Contrôle des infections intestinales par <i>Helicobacter pylori</i>	31
3.2.5. Diminution des allergies alimentaires	31
3.2.6. Réduction du taux de cholestérol sanguin	32
4. Effets probiotiques des Bifidobactéries	32
<b>Partie II : Matériels et méthodes</b>	
1. Lieu de l'étude	34
1.1 Matériels	34
1.1.1 Matériel de laboratoire	34
1.1.2 Matériels biologiques : Yaourt probiotiques	34
2. Echantillonnage	34
3. Les milieux d'isolement et de dénombrement de la flore lactique et probiotique	35
4. Conditions des cultures	36
5. Préparation des échantillons à dénombrer	36
5.1. Principe de dilution	36
5.1.1. Préparation de la dilution mère	36
5.1.2. Préparation des dilutions en série	37
5.2. Dénombrement en masse sur gélose PCA	37
5.3. Dénombrement de la flore spécifique du yaourt	38
6. Conservation des Souches	42
7. Détermination de la morphologie	42
7.1. Examen macroscopique	43
7.2. Examen microscopique	43
8. Identification biochimique	43
8.1. Détermination des caractères physiologiques	3

8.1.1. Production de catalase	43
8.1.2. Test de croissance dans les conditions hostiles	43

**Partie III : Résultats et discussions**

1. Résultats des testes de confirmation	44
1.1. Aspect morphologique	44
1.2. Résultats microscopiques	44
1.3. Résultats de la coloration du Gram	45
2. étude comparative	45
2.1. Calcule des moyennes	40
2.2. Comparaison de la charge probiotique sur les trois milieux de culture	48
2.3. Comparaison entre les différents types de produits probiotiques	51
2.4. Représentation graphique de la comparaison des yaourts Probiotiques	52
3. Evaluation de la charge bactérienne probiotique	53
4. Principaux constats	53
5. Limites de l'étude	54
Conclusion	55
Références bibliographiques	56
Annexes	70
ملخص	
Abstract	
Résumer	

<i>Liste des figures</i>	<i>pages</i>
<b>Figure 1.</b> Metchnikoff, zoologiste russe et directeur du service microbiologie à l'institut Pasteur.	3
<b>Figure 2.</b> Henry Tissier, médecin pédiatre français.	3
<b>Figure 3.</b> Micrographie au MEB de <i>Lactobacillus</i> .	5
<b>Figure 4.</b> Observation microscopique de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .	7
<b>Figure 5.</b> Micrographie au MEB de <i>Streptococcus Thermophilus</i> .	7
<b>Figure 6.</b> Micrographie au MEB de <i>Lactococcus lactis subsp. diacetylactis</i>	7
<b>Figure 7.</b> Micrographie au MEB des <i>Leuconostoc lactis</i> .	8
<b>Figure 8.</b> Micrographie au MEB de bactéries du genre <i>Bifidobacterium</i>	8
<b>Figure 9.</b> Micrographie au MEB d'une levure du genre <i>Saccharomyces</i> .	9
<b>Figure 10 :</b> Micrographie au MEB de <i>Bifidobactérium lactis</i> .	20
<b>Figure 11.</b> Observation microscopique de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> .	20
<b>Figure 12.</b> Micrographie au MEB <i>Bifidobacterium sp.</i>	21
<b>Figure 13.</b> Micrographie au MEB <i>Bifidobacterium breve</i> .	21
<b>Figure14.</b> Présentation des principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.	30
<b>Figure16.</b> lieu et condition de travail	36
<b>Figure17.</b> Autoclave automatique	37
<b>Figure18.</b> Bain-marie	38
<b>Figure 19.</b> La jarre d'anaérobiose	38
<b>Figure20.</b> Incubateur de 37°C.	38
<b>Figure21.</b> Boîtes pétries ensemencés.	39
<b>Figure22.</b> compteur de colonies.	39
<b>Figure23.</b> Protocole expérimentale pour le dénombrement de la flore lactique et probiotique dans le yaourt.	41
<b>Figure24.</b> Tubes de MRS Broth	42
<b>Figure25.</b> <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i> colorés au bleu de Méthylène et observés au microscope.	45
<b>Figure26.</b> Observation microscopique de bactéries, à l'état frais, contenues dans le yaourt.	45
<b>Figure27.</b> Observation microscopique des souches de Bifidobactéries avec (G x1000).	45
<b>Figure28.</b> Observation microscopique des souches de Bifidobactéries avec (G x1000).	45
<b>Figure29.</b> Aspect microscopique des Lactobacilles avec (G x1000).	45
<b>Figure30.</b> Observation microscopique des Lactobacilles avec (G x1000).	45
<b>Figure31.</b> Observation microscopique de <i>Streptococcus thermophilus</i> avec (G x1000)	46
<b>Figure 32.</b> Histogramme représentant la comparaison de la charge bactérienne probiotique d'échantillon Pro-X Aromatisé sur les trois milieux de culture.	48
<b>Figure 33.</b> Histogramme représentant la comparaison de la charge bactérienne probiotique d'échantillon Pro-X Nature sur les trois milieux de culture.	48
<b>Figure 34.</b> Histogramme représentant la comparaison de la charge bactérienne probiotique d'échantillon Pro-X Liquide sur les trois milieux de culture.	49
<b>Figure 35.</b> Histogramme représentant la comparaison de la charge bactérienne probiotique d'échantillon Pro-Y Aromatisé sur les trois milieux de culture.	49
<b>Figure 36.</b> Histogramme représentant la comparaison de la charge bactérienne probiotique d'échantillon Pro-Y Liquide sur les trois milieux de culture.	50

<b>Figure 37.</b> Histogramme représentant la comparaison de la charge bactérienne probiotique d'échantillon Pro-Z Aromatisé sur les trois milieux de culture.	50
<b>Figure 38.</b> Histogramme comparatif des différents produits probiotiques sur milieux de cultures.	52
<b>Figure 39.</b> <i>Streptococcus thermophilus</i>	74
<b>Figure 40.</b> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	74
<b>Figure 41.</b> <i>Bifidobacterium longum</i>	74
<b>Figure 42.</b> Trouble sur bouillon MRS	74

<i>Liste des tableaux</i>	<i>Pages</i>
<b>Tableau 1.</b> Certaines descriptions et définitions des probiotiques citées au cours des années	4
<b>Tableau 2.</b> Les espèces utilisées comme probiotiques	5
<b>Tableau 3.</b> Critères de sélection utilisés pour le screening des probiotiques	14
<b>Tableau 4.</b> Quelques souches probiotiques et leurs effets cliniques	25
<b>Tableau 5.</b> exemple de quelques souches probiotiques utilisées dans des fabricants de yaourts	27
<b>Tableau 6.</b> Valeur nutritionnelle du lait et du yaourt	29
<b>Tableau 7.</b> Échantillonnage des produits probiotiques.	35
<b>Tableau 8.</b> Conditions expérimentales pour le dénombrement de la flore lactique du yaourt.	39
<b>Tableau 10.</b> Moyennes et les ESM obtenues des échantillons dénombrés sur milieu PCA.	46
<b>Tableau 11.</b> Moyennes et les ESM obtenues des échantillons dénombrés sur milieu MRS.	47
<b>Tableau 12.</b> Moyennes et les ESM obtenues des échantillons dénombrés sur milieu M17.	47
<b>Tableau 13.</b> Résultats de comparaison par le test de student des yaourts probiotiques sur milieu PCA.	51
<b>Tableau 14.</b> Résultats de comparaison par le test de student des yaourts probiotiques sur milieu MRS.	51
<b>Tableau 15.</b> Résultats de comparaison par le test de student des yaourts probiotiques sur milieu M17.	52

*Liste des abréviations*

**AFNOR** : Agence Française de Normalisation  
**ADN** : Acide Désoxyribonucléique  
**ARN** : Acide Ribonucléique  
**ATP** : Adénosine Triphosphate °C: Degré Celsius  
**B.** : Bifidobacterium  
**LAB**: Lactic Acid Bacteria  
**CO2**: gaz carbonique  
°C : degré celsius  
**CE** : Conformité Européenne  
°D : degré dornique  
**μ** : micron  
**μg**: microgramme  
**μl**: micro litre  
**ESM** : Erreur Standard Moyenne  
**FAMT** : Flore aérobie mésophile totale  
**FAO**: Food and Agriculture Organisation of the united nations  
**Fig**: Figure  
**g**: gramme  
**ISO** : Organisation International de Normalisation  
**JORA**: Journal officiel de la république algérienne  
**Kg**: Kilogramme  
**Lb.** : Lactobacillus  
**MEB** : Microscope Electronique a Balayage  
**mg**: milligramme  
**min**: minute  
**ml**: millilitre  
**NaCl** : Chlorure de sodium  
**NaOH** : hydroxyde de sodium  
**OMS**: organisation mondiale de la santé ou (WHO)  
**O2** : Oxygène  
**pH** : potentiel d'hydrogène  
**PM** : pois moléculaire  
**Pro-** : probiotique  
**p/v** : poids /volume  
**sp.** : Espèce  
**St.** : Streptococcus  
**Subsp** : sous espèce  
**s**: second  
**T°**: Température  
**Tab**: Tableau  
**UFC**: unités formant colonies  
**UI** : Unité Internationale  
**Vol** : volume  
**WHO**: World Helth Organization ou (OMS)  
**YES**: Yeast Extract Sucrose  
**%** : pour cent

### Introduction

Le yaourt est un lait fermenté, qui est obtenu par le développement des bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, qui doivent se trouver vivantes dans le produit fini, à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme. **(Codex Stan 243-2003)**.

Il existe d'autres types de laits fermentés, entre autre les bio-yogourts qui sont des laits fermentés à base du lait de vache ou de chèvre ou de brebis ou d'autre lait selon les régions fermentés par des bifidobactéries ou /et par les *Lactobacillus acidophilus*, et *Lactobacillus casei*, souvent en association avec les ferments du yaourt qu'ils lui donnent une saveur assez douce. Ce type de lait fermenté est classé dans la catégorie des produits probiotiques **(Guler-Akin et Akin, 2007)**.

Aussi, différentes souches sont utilisées comme probiotiques dans l'industrie alimentaire (*Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*) **(Mercenier et al., 2003)**. Les genres microbiens les plus utilisés comme probiotiques sont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* **(Holzapfel et al., 1998; Mercenier et al., 2003)**.

Les probiotiques sont des microorganismes vivants, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte **(Guarner et Schaafsma, 1998)**.

Il a ainsi été suggéré que la prise quotidienne de probiotiques doit être comprise entre  $10^8$  et  $10^9$  unités formant colonie pour avoir un effet. Pour mettre au point des produits laitiers probiotiques aux effets démontrés chez l'homme garantissant aux consommateurs une satisfaction totale en terme de bénéfices santé et besoin nutritionnel, il est donc indispensable de conserver voire de renforcer la viabilité et la fonctionnalité des souches durant toutes les étapes de fabrication et de stockage des produits.

Cependant, les procédés de préparation et de fabrication perturbent significativement les fonctions probiotiques et donc la qualité des produits finis commercialisés d'un point de vue technologique et afin d'être considérées comme de potentiels probiotiques, les souches sélectionnées doivent montrer une capacité à

survivre dans des milieux hostiles à forte teneur en acides biliaires et en oxygène et au pH acide.

L'objectif de ce travail est pour évaluer la flore lactique probiotique, en effectuant des analyses bactériologiques comparatives de différents types de produits probiotiques de trois firmes industrielles laitières commercialisée en Algérie sous le label "probiotique". Pour atteindre cet objectif ce travail répond aux questions suivantes :

Existe-il des microorganismes probiotiques dans ces produits?

Quelle est la concentration bactérienne probiotique viables dans le produit fini ?

Quelle est la souche utilisée dans chaque produit?

Ce mémoire s'articule sur deux chapitres. En commençant par le premier qui est : des généralités sur les probiotiques, historique, définition, et les microorganismes probiotiques ; le deuxième chapitre traite l'application des probiotiques dans le domaine médical et agro-alimentaire.

Dans les deux parties qui suivent nous présenterons les matériels et les méthodes mis en œuvre dans ce travail. L'autre partie est consacrée aux résultats et discussion que nous avons obtenus, nous terminerons cette étude par une conclusion et des perspectives.

## 1. Les probiotiques :

### 1.1. Historique :

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques ; la notion de probiotiques a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff en 1907 (**Metchnikoff, 1907**). Ce prix Nobel suggérait que la bonne santé et la longévité des paysans bulgares étaient dues à leur consommation de produits laitiers fermentés. Pour lui, la consommation de *Lactobacillus* influençait positivement la microflore intestinale, diminuait la « putréfaction » et les activités toxiques microbiennes. Il a ainsi proposé l'ingestion de bactéries lactiques pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie.

Le terme “probiotique” est un mot relativement nouveau qui signifie “en faveur de la vie” et qui est actuellement utilisé pour désigner des bactéries associées à des effets bénéfiques chez l'homme et les animaux. L'observation originale du rôle positif joué par quelques bactéries sélectionnées est attribuée à Eli Metchnikoff, d'origine russe, lauréat du Prix Nobel qui travaillait à l'Institut Pasteur au début du siècle dernier et qui a suggéré que "la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour modifier la flore dans nos corps et remplacer les microbes dangereux par des microbes utiles" (**Metchnikoff, 1907**).

A cette époque, Henry Tissier, pédiatre français, a observé que les selles des enfants souffrant de diarrhée contenaient un petit nombre de bactéries caractérisées par une morphologie particulière en forme de Y. Ces bactéries “bifides” étaient au contraire abondantes chez les enfants sains (**Tissier, 1906**). A son avis, ces bactéries pourraient être administrées aux patients souffrant de diarrhée pour aider à rétablir une flore intestinale saine.



**Figure 1.** Metchnikoff, zoologiste russe et directeur du service microbiologie à l'institut Pasteur, a mis en évidence le mécanisme de la phagocytose.



**Figure 2.** Henry Tissier, médecin pédiatre français, il a administré les bifidobactéries aux patients qui souffrent de troubles intestinaux.

Une des premières définitions des probiotiques comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposé par Lilly et Stillwell en 1965. Depuis ce temps, la définition du terme probiotique a été modifiée à plusieurs reprises (**Ait-Belgnaoui et al ., 2005; Lamoureux, 2000**).

En 1989, Roy Fuller a mis l'accent sur la demande de viabilité des probiotiques et introduisit l'idée qu'ils avaient un effet bénéfique sur l'hôte (**Guarner et al ., 2008**). La FAO et l'OMS (2002), ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulent la définition suivante : « les probiotiques sont des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère».

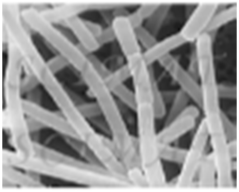
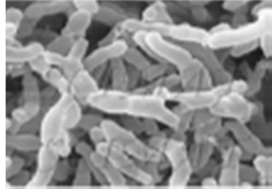
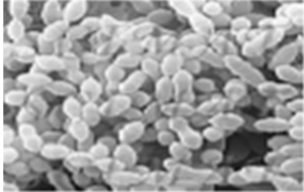
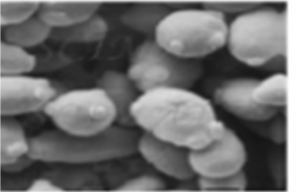
**Tableau1.** Certaines descriptions et définitions des probiotiques citées au cours des années (Vasiljevic et Shah, 2008).

Année	Description	Source
1953	Probiotics are common in vegetable food as vitamins, aromatic substances, enzymes and possibly other substances connected with vital processes	Kollath
1954	Probiotics are opposite of antibiotics	Vergin
1955	Deleterious effect of antibiotics can be prevented by probiotics therapy	Kolb
1956	A Substance secreted by one microorganism which stimulates the growth of another	Lilly and Stillwell
1973	Compounds that build resistance to infection in the host but do not inhibit the growth of microorganisms in vitro	Fujii and Cook
1974	Organisms and substances that contribute to intestinal microbial balance	Parker
1992	Live microbial feed supplement which beneficially effects the host animal by improving microbial balance	Fuller
1992	Viable mono-or mixed of live microorganisms which applied to animals or man have a beneficial effect on the host by improving the proprieties of the indigenous microflora	Havenaar and Huisint'veld
1996	Live microbial culture or cultured dairy product which beneficially influences the health and nutrition of the host	Salminen
1996	Live microorganisms which, upon ingestion exerts benefits beyond inherent basic nutrition	Schaafsma
1999	Microbial cell preparations or components of microbial cells that have a beneficial effect on the health and well-being of the host	Salminen, Ouwehand, Benno and Lee
2001	A preparation of or a product containing viable, defined microorganisms in sufficient number which alter the microflora ( by implantation or colonization) in a compartment of the host and by that exert beneficial health effect in this host	Scherezenmeir and de Vrese
2002	Live microorganisms that when administrated in adequate amount confer health benefit on the host	FAW/WHO

**1.2. Les différentes souches probiotiques appliquées dans l'industrie alimentaire :**

Les microorganismes les plus communément utilisés comme probiotiques viennent des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. D'autres souches bactériennes comme les *Enterococcus*, les *Streptococcus* et les *Escherichia* sont aussi utilisées Tableau 2.

**Tableau 2.** Les espèces utilisées comme probiotiques (Holzapfel et al., 1998; Mercenier et al., 2003).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Non bactéries Lactiques
			
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Saccharomyces sp</i>
<i>L. acidophilus</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. casei</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. gallinarum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. salivarius</i>	<i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. lactis</i> <i>B. longum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Propionibacterium freundenreichii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces boulardii</i>

**1.3. Exemple de Micro-organismes probiotiques :** Parmi les principales bactéries lactiques probiotiques utilisées on trouve:

**1- Le genre *Lactobacillus* :**

Le lactobacillus est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de la fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industrie (**Joseph-P, 1998**). Il s'agit en général de bâtonnets non flagellés, non sporulés , avec absence de catalase mais parfois une pseudo-catalase est détectée,

Gram positifs faisant partie des BAL. Elles sont importantes pour l'industrie alimentaire, notamment dans les fermentations laitières (Corrieu, 2008, Izquierdo, 2009).

Elles sont des bactéries anaérobies (mais aérotoleérantes) et obtiennent leur énergie du métabolisme fermentatif, mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène grâce à leur activité peroxydase capable d'inactiver le peroxyde d'hydrogène. Elles ont également la capacité de survivre à des pH acides dans les milieux qu'elles acidifient par la production d'acide lactique.

Cette capacité à produire de l'acide lactique donne aux *lactobacilles* un avantage compétitif dans les environnements riches en nutriments, ce qui peut en partie expliquer leur potentiel probiotique (Ait-Belgnaoui, 2006).

Une grande variété de lactobacilles sont utilisées comme probiotiques, parmi les quelles *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, sont les espèces les plus étudiées (Izquierdo,2009).

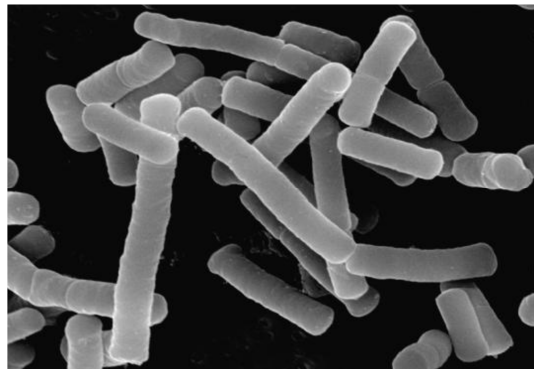


Figure 3. Micrographie au MEB de *Lactobacillus*. Source: institut-rosell-lallemand.com

## 2. *Lactobacillus bulgaricus* :

Comme le montre la (figure 3) *Lb. Bulgaricus* est un bacille Gram positif, immobile, asporulé, micro-aérophile. Il est isolé sous forme de bâtonnets ou de chaînettes. Il possède un métabolisme strictement fermentaire avec production exclusive d'acide lactique comme principal produit final à partir des hexoses de sucres par voie d'Emden Meyerhof. Il est incapable de fermenter les pentoses. *Lb. bulgaricus* est une bactérie thermophile, très exigeante en calcium et en Magnésium et sa température optimale de croissance est d'environ 42 °C. Cette bactérie a un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt (Marty-Teysset *et al*, 2000).



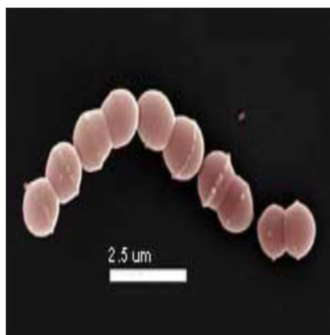
**Figure 4.** Observation microscopique de *Lactobacillus bulgaricus*. Source: institut-rosell-lallemand.com

### 3. Le genre *Lactococcus* et *Streptococcus*:

Ce sont des genres anaérobies facultatifs, généralement micro- aérophiles et très exigeants au point de vue nutritionnel (Guiraud, 2003). Ils rassemblent des coques homo-fermentaires, produisant en majorité de l'acide lactique. Les espèces initialement regroupées dans le genre *streptococcus* ont été redistribuées au sein de ces genres selon les homologies de leurs ARN ribosomiques 16S (Schleifer ; Kilpper, 1987).

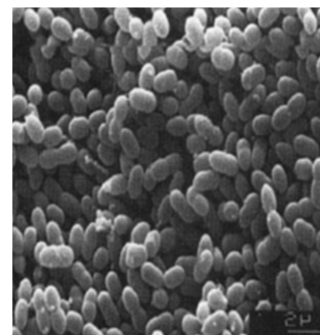
Le genre *Lactococcus* est formé de bactéries dont les cellules en forme de coques (figure 2), sont associées par paire ou en chainettes de longueur variable, ce sont des bactéries homo-fermentaires ne produisent que de l'acide lactique L(+) (To, 2010).

Le genre *Streptococcus* : Les cellules de streptocoques sont des coques ou coccobacilles chimioorganotrophes (Corrieu et Luquet, 2008). Généralement groupées en paires et surtout en chaînes, de longueur variable.



**Figure 5.** Micrographie au MEB de *Streptococcus Thermophilus*.

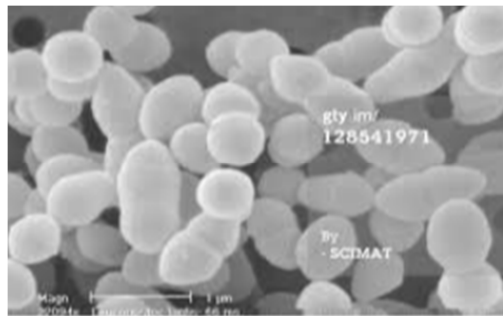
Source: institut-rosell-lallemand.com



**Figure 6.** Micrographie au MEB de *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* (Teuber et Geis, 2006)

#### 4. Le genre *Leuconostoc* :

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires en chainettes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO<sub>2</sub> et d'éthanol. Certaines espèces sont capables de fermenter le citrate ce qui leur confère une activité aromatique importante. D'autres synthétisent des dextrans en présence d'accharose. Ce genre comporte 6 espèces présentes majoritairement dans les produits végétaux, mais elles sont également isolées dans les produits laitiers. Ils participent à la fermentation des produits végétaux (**Michel fedrighi., 2005**) .



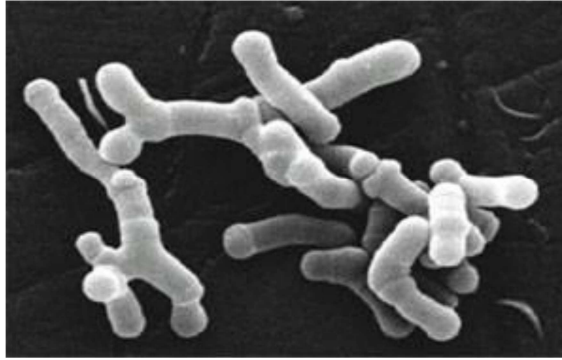
**Figure 7.** Micrographie au MEB des *Leuconostoc lactis* (**Devoyod J.J. et Françoise Poullain, 1988**).

#### 5. Les bifidobactéries :

Les bifidobactéries sont des bâtonnets aux formes variées (bifide ou ramifié) dont la caractéristique principale est une forme en Y. (**Dong et al., 2000**)

Les bifidobactéries sont des bacilles anaérobies à Gram positif non sporulés. Les cellules sont de morphologie variables selon le milieu de culture (**Larpen, 1997**), les bacilles peuvent être isolés en amas, en paire, et en forme de Y (**Prescott et al, 2003**) figure 3 leurs conditions optimales de croissance se situent à température entre 37°C et 41°C et a des pH compris entre 6.5 et 7.0 (**Scardovi, 1986**), son habitat est essentiellement le tube digestif humain ou animal, la variété humaine est présente dans le tube digestif de l'enfant et de l'adulte ; elle peut être utilisée comme probiotique (**Gristian, 2008**).

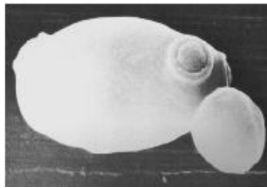
Les espèces les plus utilisées comme probiotiques sont *Bifidobacterium lactis* et *Bifidobacterium longum* (**Dong et al., 2000**)



**Figure 8.** Micrographie au MEB de bactéries du genre *Bifidobacterium*. Source: [microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacter](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacter).

## 6. Levures probiotiques :

Sont des champignons microscopiques de types unicellulaires où présentant dans leur cycle biologique une phase unicellulaire prépondérante (Leclere et al, 1994). Elles forment un groupe des micro-organismes probiotiques comme les *Saccharomyces* (Delarras, 2007), le *Saccharomyces boulardii* est le probiotique le plus documenté en clinique (Anonyme, 2014).



**Figure 9.** Micrographie au MEB d'une levure du genre *Saccharomyces*. Source: M. Bastide / S. Jouvert

### 1.4. Lignes directrices pour l'évaluation des microorganismes probiotiques :

Une grande variété de produits probiotiques a été développée et mise sur le marché ces dernières années. Cependant, les effets attribués à bon nombre de ces produits ne sont pas soutenus par une justification scientifique adéquate.

Les produits de qualité médiocre doivent être dénoncés car ils discréditent les autres aux yeux des non spécialistes. Par conséquent, il est nécessaire d'établir des critères rationnels Pour le criblage et la sélection des microorganismes candidats, sans oublier d'évaluer l'efficacité des souches sélectionnées sur l'Homme avec des essais cliniques contrôlés (FAO/WHO ,2002).

Le rapport de la FAO/WHO (2002) a établi des critères et une méthodologie à utiliser pour l'évaluation des probiotiques.

**a. Désignation du Genre/Espèce/Souche :**

Il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée, car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne. Le probiotique doit porter un nom reconnu scientifiquement et son identification doit être effectuée à l'aide de méthodes récentes et valides combinant les tests phénotypiques et génotypiques.

**b. Dépistage des probiotiques potentiels par des tests in vitro :**

les tests in vitro sont réalisés afin de déterminer les mécanismes par les quels les microorganismes probiotiques exercent leurs effets bénéfiques. Il est recommandé d'utiliser des tests spécifiques à la cible et appropriés pouvant corrélés avec les résultats des essais in vivo.

Les principaux tests in vivo réalisés pour étudier les probiotiques sont :

- Résistance à l'acide gastrique,
- Résistance aux acides biliaires,
- Adhérence au mucus et/ou cellules épithéliales humaines,
- Activité antimicrobienne contre les bactéries potentiellement pathogènes,
- Capacité de réduire l'adhésion des pathogènes aux surfaces,
- Activité de l'hydrolyse sur les sels biliaires (dissociation des sels biliaires)

**c. Etudes in vivo sur des animaux et humain:**

Afin de confirmer ou valider les résultats des tests in vitro, il serait nécessaire de réaliser des essais in vivo sur des animaux de laboratoire ou de préférence sur des sujets humains dans des conditions expérimentales appropriées. En général, une méthode standard d'évaluation clinique des probiotiques comprend les phases suivantes :

- ◆Phase 1 : consistant à évaluer l'innocuité de la souche probiotique
- ◆Phase 2 : permet d'étudier l'efficacité d'un probiotique par comparaison à un placebo
- ◆Phase 3 : permet de comparer des probiotiques avec un traitement standard (condition spécifique).
- ◆Phase 4 : consisterait à surveiller l'utilisation du probiotique (effets produits)

**1.4.1. Difficultés réglementaires :**

Bien que les scientifiques continuent d'étudier et de débattre le potentiel des effets santé des probiotiques, il y a un regain d'intérêt par les régulateurs et les membres de l'industrie sur la signification exacte du terme «probiotique».

Les réglementations gouvernementales diffèrent d'un pays à l'autre, toutefois le statut des probiotiques en tant que composante d'un aliment n'est pas établi actuellement à l'échelon international (Marcel et al., 2008).

Sur le plan international, les approches législatives varient beaucoup en fonction des pays: tandis que certains pays comme le Japon ont établi des réglementations méticuleuses, d'autres états se sont limités à formuler des déclarations par le biais d'organismes gouvernementaux (eg.les Etats Unis) ou de promouvoir des rapports scientifiques de consensus (ce qui était le cas de l'UE) (Marcel et al., 2008).

Cette façon de faire est due à l'absence d'une définition juridique des aliments fonctionnels. En effet, certains pays considèrent que les aliments fonctionnels constituent une catégorie à part et doivent donc être réglementés. D'autres, en revanche, ont limité leur intervention à la réglementation des allégations alimentaires, considérant que les autres aspects sont couverts par la législation alimentaire générale. Sans oublier enfin ceux qui ne se sont pas encore prononcés à ce sujet tels que l'Algérie (Marcel et al., 2008).

#### **1.4.2. Textes réglementaires algériens :**

Les textes réglementaires algériens relatifs au lait et produits dérivés se limitent aux aspects qui touchent à la qualité hygiénique et sanitaire de ces aliments. Actuellement, il n'y a aucune législation nationale qui traite du sujet des aliments fonctionnels ou les probiotiques. Cependant, il existe un nombre de textes qui concernent l'étiquetage des aliments. C'est l'ensemble de textes utilisés comme références pour la réalisation des analyses de contrôle de qualité par le Centre Algérien de Contrôle de la Qualité et de l'Emballage (CACQE) de la Wilaya de Jijel, concernant le lait et dérivés ainsi que l'étiquetage des denrées alimentaires.

Selon l'article no.3 du **décret exécutif n° 03-318** du 4 Chaâbane 1424 correspondant au 30 septembre 2003 modifiant et complétant le décret exécutif n° 89-147 du 8 août 1989.

#### **1.5. Caractéristiques des probiotiques :**

De façon plus spécifique, pour qu'un microorganisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes:

- Etre un habitant naturel de l'intestin (origine humaine);
- Etre capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier;
- Adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des pathogènes;
- Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bactériocines,...);
- Non invasif, non carcinogène et non pathogène (GRAS) ;
- Etre capable de co-agréger pour former une flore normale équilibrée;

- Absence de toxicité;
- Possibilité de production en grande échelle;
- Possibilité de cryoprotection;
- Résistance à la bile et au mucus intestinal (l'acide)

Les microorganismes probiotiques doivent également être technologiquement adaptés à interagir dans les produits alimentaires, tels qu'ils conservent à la fois la viabilité et l'efficacité dans les produits alimentaires (sur une échelle commerciale) pendant et après la consommation. Les probiotiques doivent être capables de survivre aux applications industrielles (par exemple la transformation des produits laitiers) et aussi être en mesure de croître ou survivre à des niveaux élevés dans le produit à la fin de la durée de conservation (**Farnworth, 2008**).

#### **1.6. Critères de sélection des souches probiotiques destinées à l'homme :**

Les probiotiques doivent être capables d'exercer leurs effets bénéfiques sur l'hôte par leur croissance et/ou leur activité dans le corps humain (**Collins et al., 1998; Morelli, 2000**).

Toutefois, c'est la spécificité de l'action, et non la source du microorganisme, qui est importante. En effet, il est très difficile de confirmer la source d'un microorganisme. Les nourrissons naissent sans aucune de ces bactéries dans l'intestin, et l'origine de la microflore intestinale n'a pas été entièrement élucidée. C'est leur aptitude à rester viables sur le site cible et à être efficaces qui devrait être vérifiée pour chaque souche potentiellement probiotique (**Tsuneo, 2000**).

##### **1.6.1. Propriétés fonctionnelles :**

Afin d'être conformes à la définition des probiotiques, les microorganismes doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte.

Les exigences fonctionnelles des probiotiques doivent être établies à l'aide de tests in vitro qui se réfèrent souvent à des propriétés bactériennes, telles que :

###### **1.6.1.1. Survie au cours du transit digestif**

Plus de deux litres de suc gastrique avec un pH faible sont sécrétés par les cellules qui tapissent l'estomac chaque jour, fournissant une barrière acide contre l'entrée de bactéries viables dans le tractus gastro-intestinal.

L'effet du pH gastrique sur la viabilité des bactéries en empêchant la colonisation bactérienne de l'intestin grêle est bien étudié (**Simon et Gorbach, 1987; Heatley et Sobala, 1993**).

Par conséquent, tout organisme probiotique doit avoir une tolérance élevée à l'acide pour survivre dans l'estomac.

La bile est le second facteur important qui influence le pourcentage de survie des microorganismes probiotiques. Le taux d'acides biliaires synthétisés dans le foie à partir du cholestérol est estimé à 500-700 ml / jour.

Ces acides sont sécrétés par la vésicule biliaire dans le duodénum, après la prise alimentaire par un individu.

Les sels biliaires hydrolases (BSH) catalysent l'hydrolyse des sels biliaires. L'hydrolyse des sels biliaires est médiée par les différents genres de la microflore intestinale, y compris *Lactobacillus* (Lundeen et Savage, 1990; Christiaens et al., 1992; Gopal et al., 1996), *Bifidobacterium* (Grill et al., 2000a).

#### **1.6.1.2. Activité antimicrobienne**

Les bactéries probiotiques doivent essentiellement maintenir de bonnes conditions sanitaires au niveau du tractus digestif, il est donc important qu'elles soient aptes à inhiber le développement des germes indésirables soit :

- Par la production des substances antagonistes de type bactériocines ou autres tels que les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène
- En empêchant l'adhésion des germes pathogènes aux cellules de la paroi intestinale (Simon et al., 2005).

#### **1.6.1.3. Colonisation et adhésion aux cellules intestinales :**

Il est généralement convenu que les bactéries probiotiques doivent adhérer au mucus intestinal ou aux cellules épithéliales dans le but de persister dans l'intestin. La capacité des BAL à adhérer aux surfaces des muqueuses empêche leur évacuation rapide par la contraction intestinale et après écoulement péristaltique du digeste, et pourrait également conférer un avantage concurrentiel.

Un grand nombre de recherches ont été menées à l'écran des bactéries probiotiques pour leur capacité à se fixer aux cellules intestinales (Goktepe et al., 2006).

#### **1.6.2. Propriétés technologiques :**

Plusieurs aspects technologiques doivent être pris en compte dans la sélection des probiotiques pour conférer de bonnes propriétés sensorielles au produit fini, tels que :

#### **1.6.2.1. Viabilité et stabilité des microorganismes :**

Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les probiotiques doivent survivre en grand nombre au procédé de fabrication, et à la période d'entreposage au froid qui s'ensuit. Il est en effet généralement admis qu'un nombre minimal de  $10^7$  cellules viables par gramme de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique. Cependant, la stabilité physique et génétique des cellules ainsi que toutes les propriétés nécessaires pour exercer leurs bienfaits sur la santé doivent également être assurées (**Izquierdo,2009**).

#### **1.6.2.2. Propriété acidifiante :**

La fonction acidifiante est la plus recherchée des bactéries lactiques qui a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable (**Jones, 2004**).

Les conséquences d'ordre physicochimique et microbiologique sont récapitulées d'après Surta et al.,1998 : coagulation du lait, la synérèse du caillé et la solubilisation du calcium micellaire, elle participe aux qualités organoleptiques des produits laitiers fermentés et inhibe la croissance de microorganismes nuisibles.

### **2. Critères technologiques :**

#### **2.1. Critères technologiques de sélection des souches probiotiques :**

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne.

La non pathogénicité (innocuité) des souches est un critère très important, les souches

ayant le statut GRAS (Generally Regarded As Safe) sont d'ailleurs à favoriser. Toutefois, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques qui doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin,

et donc résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte. Les bactéries étant administrées par voie orale, il faut qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif : le pH acide, les sels biliaires, les enzymes pancréatiques. (Millette et al., 2008; Lamoureux, 2000; Percival, 1997).

Ainsi parmi les critères de sélection la viabilité car certains processus industriels comme la fabrication et stockage réduisent la viabilité des souches. Cette perte constitue un fardeau économique pour les fabricants (Gueimonde et Sanchez, 2012), les probiotiques peuvent être ajoutés à des produits que des cellules fraîches ou lyophilisées. Les niveaux élevés de la population, entre et cellules microbiennes par ml, doivent être dans les produits probiotiques (Kos et al, 2008).

La capacité de la souche à être cultivée au grand nombre, concentré, stabilisé et incorporée dans un produit final avec de bonnes propriétés sensorielles, le cas échéant, et d'être stable, à la fois physiologiquement et génétiquement, jusqu'à la fin de la durée de conservation du produit et au niveau du site actif dans l'hôte (Lundeen et Savage, 2013). Le tableau 3 rapporte les critères les plus utilisés pour la sélection des probiotiques.

**Tableau 3.** Critères de sélection utilisés pour le screening des probiotiques (Nousiainen et al., 2004).

Critères	But recherché
Résistance à l'acidité gastrique	Survie pendant le passage par l'estomac et duodénum
Résistance aux sels biliaires	Survie pendant le passage par l'intestin grêle
Production d'acide (à partir de glucose et lactose)	Production (de barrière acide) efficace dans l'intestin
Adhésion au mucus et/ ou aux cellules épithéliales humaines	Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface
Production de substances antimicrobiennes	Inhibition du développement des germes pathogènes
Résistance à la chaleur	Survie pendant le processus de transformation
Bonnes propriétés technologiques	Stabilité, croissance sur une large échelle, survie dans le produit, résistance aux bactériophages

### **2.1.1. Résistance à l'acidité gastrique :**

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les bas pH.

Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime. Par conséquent (Ammor et Mayo, 2007).

La sécrétion d'acide gastrique constitue un mécanisme de défense primaire contre les microorganismes les plus ingérées (Dunne et al, 2001) , Avant d'atteindre le tractus intestinale et exerçant l'effet bénéfique sur l'hôte, les bactéries probiotiques doivent d'abord survivre dans l'estomac (Nawaz et al, 2011), qui sécrète de l'acide chlorhydrique, plus de deux litres de suc gastrique est sécrétée chaque jour (Morelli, 2000) ou pH peut être aussi faible que 1,5 à 2 (Mourad et Nour-eddine 2006), toutefois , la survie des souches de bactéries dans le jus gastrique humaine est une indication plus précise de la capacité des souches à survivre au passage à travers l'estomac (Nawaz et al, 2011).

### **2.1.2. Tolérance aux sels biliaires :**

Les acides biliaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol et sont sécrétés à partir de la vésicule biliaire dans le duodénum sous la forme conjuguée (500 à 700 ml/j) (Dunne et al, 2001), La concentration de sel de bile peut être aussi élevée que 1,5 à 2%(p/v) dans la première heure de la digestion, et peut diminuer par la suite à environ 0,3% (Nawaz, 2011) en raison de l'activité microbienne, qui entraîne une vaste modification chimique (déconjugaison, dés hydroxylation, la déshydrogénation, et glucuronidation) dans le colon (Dunne et al, 2001), aussi certains composants des aliments peuvent réduire l'effet toxique de la bile sur les micro-organismes (Nawaz et al,2011). La capacité à survivre à l'action des sels biliaires est un absolu besoin de bactéries probiotiques, et elle est généralement variée intra-spécifiquement et souvent observée entre les souches probiotiques potentielles (Tuomola et al, 2001) et donc la tolérance des probe aux sels biliaires a été initialement associée à la présence de l'activité d'hydrolase des sels biliaires (Houssain et al, 2012).

### **2.1.3. Résistance aux antibiotiques :**

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leurs structure et physiologie. Les travaux de Temmerman et al. (2003) ont montré que 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Dans la plus part des cas la résistance n'est pas transmissible, cependant, il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autre espèces et

genres. C'est une raison significative pour choisir des souches manquantes du potentiel de transfert de résistance (Denohue, 2004).

L'utilisation d'antibiotiques comme agents thérapeutiques produit un climat dans lequel les consommateurs et les fabricants cherchent des alternatives (Shinde, 2012). La résistance aux antibiotiques est un critère important pour les souches bactériennes probiotiques, un effet bénéfique de souches résistantes qu'ils peuvent être Co-administrés avec des antibiotiques thérapeutiques pour le traitement des maladies (Petsuriyawawong et Khunajakr, 2011), une telle résistance peut être facilement transférée à d'autres souches, soit des altérations du génome existant ou par transfère du matériel génétique entre les cellules par les plasmides ou des bactériophages (Gomez-Gil et al, 2000), dans la plus part des cas des probiotiques la résistance n'est pas transmissible, cependant, il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autres espèces et genre. C'est une raison significative pour choisir des souches manquantes du potentiel de transfert de résistance (Hadeh, 2012).

### 3. Les bifidobactéries comme bactéries probiotiques :

#### 3.1. Généralités sur les bifidobactéries :

##### 3.1.1. Taxonomie :

Les bifidobactéries ont été découverts pour la première fois dans les fèces infantiles nourris au lait maternel par Tissier (1900), qui a isolé une bactérie avec une forme étrange et caractéristique de Y et l'a appelée *Bacillus bifidus communis*. Cette bactérie était anaérobie, Gram positive et n'a pas développé de gaz pendant sa croissance. Depuis leur première description, la classification de ces bactéries n'a cessée d'être révisée passant du genre *Bacillus*, à celui de *Bacteroides* (Castellani et Chalmers, 1919), *Lactobacillus* (Hollande, 1920), *Bifidobacterium* (Orla-Jensen, 1924), *Bacterium* (Lehmann et Neumann, 1927), *Tissieria* (Pribram, 1929), *Nocardia* (Vuillemin, 1931), *Actinomyces* (Nannizzi, 1934), *Actinobacterium* (Puntoni, 1937) et *Corynebacterium* (Olsen, 1949).

En raison des similitudes entre les bifidobactéries et les bactéries du genre *Lactobacillus*, ils ont été inclus dans ce genre comme classifiés dans la 7<sup>ème</sup> édition du manuel de Bergey's de la bactériologie déterminative (Breedet al., 1957). Dehnert (1957) décrit l'existence des biotypes multiples des bifidobactéries et a proposé un arrangement pour la différenciation entre les souches basées sur leurs modèles de fermentation d'hydrate de carbone. Durant la même année Cummins et al. ont examiné la composition de la paroi cellulaire de plusieurs souches de bifidobactérie et ont

conclu que ces bactéries sont différentes de toutes les bactéries Gram positifs précédemment examinées. La classification taxonomique des bifidobactéries était donc à revoir et le sujet à été relancé de nouveau à l'investigation.

En 1963, Reuter a effectué des tests biochimiques et sérologiques sur des souches de *bifidobacteries* isolées des fèces d'enfants et d'adultes et a proposé l'arrangement suivant pour l'identification de ces bactéries: des bactéries aux formes bacillaires, anaérobie, Gram positif, ressemblaient à des lactobacilles, excepté la variabilité morphologique, elles fermentent le glucose en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique d'un rapport 2:1 et fermentent 11 sucres additionnel des sucres déjà étudiés.

En 1970, Scardovi et al ont commencé a appliqué intensivement le procédé d'hybridation ADN-ADN afin d'évaluer la validité des espèces de bifidobacteries précédemment décrite et pour identifier de nouveaux groupes de séquences ADN homologique parmi les souches qu'ils isolaient dans des diverses niches écologiques. Cette technique d'identification est une avance significative en bactériologie déterminative et a aidé à résoudre une grande partie de la confusion précédemment rencontré quand a la différenciation d'espèce de Bifidobacterium qui a été faite principalement sur le profil fermentaire d'hydrate de carbone. Dans la 8<sup>e</sup> édition du manuel de Bergey du déterminatif de la bactériologie (**Rogosa, 1974**), les bifidobacteries ont été classifiées dans le genre Bifidobacterium en utilisant le même nom proposé par Orla-Jensen.

Le genre a comporté huit espèces; il a été inclus dans la famille des Actinomycetaceae d'ordre Actinomycetales.

Avec l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire (l'analyse des séquences des ARNr 16S, l'analyse des séquences des gènes codant pour la protéine du choc thermique de 60 kDa (Hsp60), contenu G+C d'ADN), on dénombre aujourd'hui 31 espèces de bifidobactéries de diverses origines (**Euzéby, 2007**).

### **3.1.2. Ecologie :**

Les bifidobactéries sont des habitants naturels de la flore intestinale humaine. Ces microorganismes sont les bactéries intestinales majeures chez les bébés nourris au lait maternel (**Rasic et Kurmann, 1983**).

*B. breve* et *B. infantis* sont des espèces typiques des bébés nourris au lait maternel ou aux formules lactées pour nourrissons tandis que *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum* et *B. pseudocatenulatum* sont présents dans les fèces des nouveau-nés et/ou dans les fèces d'adulte.

*B. adolescentis* a été isolé seulement dans les fèces d'adulte.

L'habitat des bifidobactéries n'est cependant pas restreint à l'intestin. Quelques espèces comme *B. bifidum*, *B. breve* ou *B. longum biovar infantis* peuvent également coloniser le vagin de la femme.

Chez les animaux quelques espèces ont une présence spécifique.

*B. merycicum* et *B. ruminantium* sont isolés des bovins.

*B. choerinum*, *B. psychraerophilum* et *B. thermacidophilum subsp. porcinum* sont présents chez les porcs.

*B. gallinarum* et *B. pullorum* sont associés aux volailles.

*B. cuniculi*, *B. saeculare* et *B. magnum* sont isolés des lapins.

*B. asteroides*, *B. coryneforme* et *B. indicum* sont hébergés dans l'intestin des abeilles.

En revanche, *B. animalis subsp. animalis*, *B. boum*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum* sont isolés de diverses espèces animales.

*Bifidobacterium tsurumiense* une nouvelle espèce isolée par Okamoto et al., (2008) des plaques dentaires des hamsters nourris durant six semaines avec une alimentation riche en sucres.

Parmi les 24 espèces de *Bifidobacterium* aujourd'hui reconnues, 9 sont isolées essentiellement chez l'homme, à savoir:

*B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* et *B. dentium*.

Ces espèces sont préconisées par certains auteurs pour être recherchées en tant que témoins de contamination fécale humaine dans les eaux résiduaires (**Rensik et Levin, 1981b; Mara et Oragui, 1983**).

Les méthodes d'hybridation ADN-ADN ont permis à Scardovi (1986) de bien différencier ces espèces de celles d'origine purement animale.

Chez l'homme, elles colonisent les cavités naturelles et principalement le colon, le vagin et la bouche (**Rasic et Kurmann, 1983**).

### 3.1.2.1. Installation chez le nouveau né :

Il est généralement admis que jusqu'au moment de la naissance, le fœtus baigne dans un environnement parfaitement stérile. Après la naissance, la colonisation bactérienne du tractus digestif est très rapide (**Moro, 1900b; Mitsuoka, 1974; Bezirtzoglou, 1985**).

48 heures après la naissance, le côlon contient de  $10^9$  à  $10^{10}$  bactéries par gramme de selles correspondant principalement à des entérobactéries, des staphylocoques et des streptocoques (**Mitsuoka, 1974; Bezirtzoglou, 1985; Moreau et coll., 1986**).

Les bifidobactéries n'apparaissent qu'entre le deuxième et le cinquième jour (**Mitsuoka et coll., 1974**) et deviennent dominantes ( $10^{10}$  à  $10^{11}$  par gramme de selles) à peine une semaine après la naissance.

Elles atteignent 99 % de la flore fécale tandis que le taux des autres bactéries (coliformes, lactobacilles, entérocoques) diminue considérablement, près de 1000 fois (**Frisel, 1951; Mayer, 1956; Hoffman, 1966**).

Les anaérobies telles que *Bacteroides* et *Clostridium* et autres bactéries putréfiantes sont énormément réduites et peuvent disparaître.

### 3.1.2.2. Origine de la colonisation:

La flore bifide buccale du nourrisson (**Bergholm, 1902; Harrison et coll., 1953**) semble très proche de la flore vaginale (Leves Que, 1959a; Walch, 1956) ou fécale de la femme et est constituée principalement de *B. breve*, *B. longum* et *B. adolescentis*.

Cependant, les espèces isolées chez l'enfant ne correspondent pas nécessairement à celles de sa mère (**Bezirtzoglou, 1985**). Blaurock (1940) cultivant la flore vaginale de cent soixante femmes, avait déjà mis en évidence *B. bifidum* dans 95% des cas.

Il est donc évident que la colonisation orale du nouveau-né puisse provenir de la flore vaginale au moment de l'accouchement.

Les mains des sage-femmes et des accouchées représenteraient également des modes de diffusion de *B. bifidum* (**Blaurock, 1940**).

- Mutai et Tanaka (1987) observent dans la bouche de 23 nouveaux-nés, 10 minutes après la naissance par voie basse, des *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Enterobacteriaceae* alors qu'après césarienne chez 8 des 9 nouveaux-nés étudiés, ils n'isolent que des *Propionibacterium* et des *Enterococcus*.

### 3.1.2.3. Facteurs influençant la colonisation:

Outre le mode de naissance qui, nous venons de le voir, intervient directement sur la rapidité d'invasion des bifidobactéries, d'autres facteurs influencent cette colonisation:

**3.1.2.3.1. La prématurité :** est une cause de difficulté d'implantation des *Bifidobacterium* en raison d'un manque de récepteurs et/ou de substrats endogènes alors que les entérobactéries et les *Bacteroides* colonisent facilement le côlon (**Frisel, 1951; Mayer, 1956; Hoffmann, 1966; Stark et Lee, 1982; Stevenson et coll., 1985**).

**3.1.2.3.2. Le mode d'allaitement:** Mayer et Moser (1950) qui isolaient *B.bifidum* de colostrum et de lait de femme avant toute tétée, excluant la possibilité de contamination par la bouche de l'enfant. Ils admettent dès lors sa présence dans la glande mammaire mais cette hypothèse reste inexplicée, sauf peut-être par une mauvaise identification du genre bactérien isolé due à la pauvreté des méthodes de détection à cette époque.

### 3.1.2.3.3. L'environnement:

Le pays, l'hôpital et même le service dans lequel a lieu l'accouchement influent sur la rapidité de colonisation par les *Bifidobacterium* et sur les espèces présentes.

Les biotypes retrouvés varient également dans le temps. Mitsuoka et coll. (1974), en 1974, isolaient essentiellement *B. infantis* des selles de nourrissons japonais mais dix ans plus tard, c'est *B. breve* qui est reconnu espèce dominante.

De nombreuses observations permettent de penser que l'environnement, et en particulier les habitudes obstétricales et thérapeutiques (utilisation de plus en plus fréquente des antibiotiques), jouent un rôle non négligeable dans la colonisation des nouveaux-nés par les bifidobactéries.

Il semblerait même que des conditions d'hygiène très strictes freinent l'implantation des *Bifidobacterium* (**Simhon., 1982; Yoshioka et coll., 1984; Lundquist et coll., 1985**).

## 3.3. Propriétés phénotypiques :

### 3.3.1. Morphologie :

Les membres du genre *Bifidobacterium* montrent des formes bacillaires qui développent des ramifications donnant des formes en V, Y, X (figures 10,11,12,13) Cependant, leur polymorphisme dépend principalement du milieu de culture et des conditions de croissance. Les niveaux de N-acetylglucosamine, qui est impliqué dans la synthèse de peptidoglycanes, affectent l'embranchement des bifidobactéries. Tandis que des niveaux plus bas de N-glucosamine et d'acides aminés produisent la forme plus fortement embranchée, les milieux favorables et

riches en éléments de croissance produisent des formes bacillaires plus longtemps. Les colonies constituées par les bifidobactéries sont lisses, convexes, crèmes ou blanches, scintillant et de la régularité molle. Les cellules de *B. angulatum* montrent l'arrangement de V ou de palissade, tandis que les cellules *B. animalis* montrent la portion centrale agrandie.

*B. asteroides* exposés des arrangements à la forme étoile peu communs (Shah et Lankaputhra, 2002).



Figure 10. Micrographie au MEB de *Bifidobacterium lactis* (WGO, 2008).

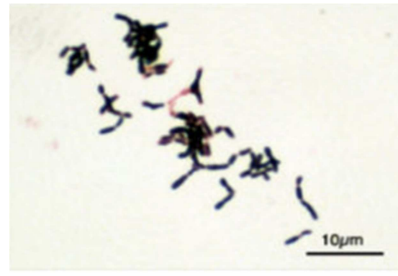


Figure 11. *Bifidobacterium adolescentis* (Bar:10µm) (Anonyme, 2008).

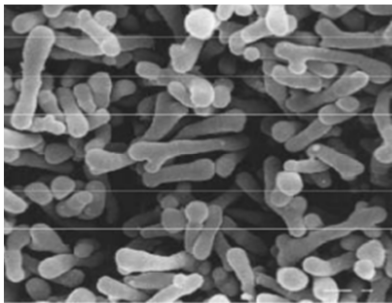


Figure 12. Micrographie au MEB de *Bifidobacterium sp.* (Bar: 1µm) (Biavati et al., 2000).

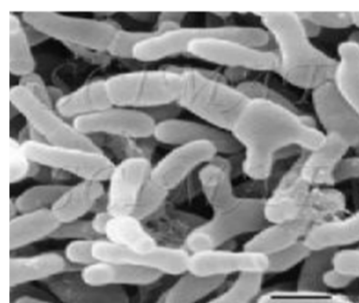


Figure 13. Micrographie au MEB de *Bifidobacterium breve* (Bar: 1µm). (Anonyme, 2006).

### 3.3.2. La composition de la paroi cellulaire :

La paroi cellulaire des bifidobactéries a une structure spécifique aux bactéries Gram Positive. Elle est constituée d'une épaisse couche de muréine (peptidoglycane) entremêlée de longues chaînes de polysaccharides ainsi que de protéines et d'acides lipoteichoïques. Les acides aminés qui composent les bases des tétrapeptides du muréine diffèrent parmi les espèces et/ou les souches de la même espèce, de ce fait permettant leur différenciation (Lauer et Kandler, 1983; Tamime et al., 1995).

Habituellement, L-alanine, acide D-glutamique, L-ornithine et D-alanine composent les tétrapeptides, mais l'ornithine peut être remplacée par la lysine dans quelques souches (Klein et al., 1998).

Les acides lipoteichoïques forment des liaisons avec des chaînes de polysaccharide sont considérés importants pour l'adhérence des cellules à la paroi intestinale. Plusieurs espèces de bifidobactéries ont des lipoglycans de diverses structures, avec L-alanine au lieu de D-isomère habituel (Iwasaki et al., 1990).

### 3.4. Propriétés physiologique :

#### 3.4.1. Température optimale :

La température optimale pour la croissance des bifidobactéries est de 37- 41 °C, alors qu'aucune croissance ne se produit en-dessous de 20 °C et au-dessus de 46 °C, à l'exception de *B. thermophilum*, *B. thermacidophilum subsp. Thermacidophilum* et *B. thermacidophilum subsp. porcinum* qui sont capables de croître aux états modérément thermophiles (47°C, 49,5°C et 46,5°C) (Scardovi et al., 1979 ; Dong et al., 2000 ; Zhu et al., 2003) et *B. psychraerophilum* cultivée à température de 4°C (Simpson et al., 2004).

Les bifidobactéries d'origine humaine révèlent une croissance optimale entre 36°C et 38°C, tandis que les bifidobactéries d'origine animale démontrent une croissance optimale entre 41°C et 43°C. La croissance à 45°C semble distinguer entre les espèces animales et humaines (Shah, 1997 ; Gavini et al., 1991).

#### 3.4.2. Sensibilité au pH :

Bifidobactéries sont des micro-organismes non acido-résistants. L'optimum pH est entre 6,5 et 7,0. Aucune croissance n'est enregistrée à pH plus bas que 4,5 et plus fortement qu'à 8,5. Seulement *B. thermacidophilum subsp. Thermacidophilum* a une croissance retardée à pH 4 (Dong et al., 2000) et *B. animalis subsp. animalis* et *B. animalis subsp. lactis* peuvent survivre exposés au pH 3,5 pendant 3 heures (Matsumoto et al., 2004).

#### 3.4.3. Anaérobiose :

Les bifidobactéries sont anaérobies. Cependant la sensibilité à l'oxygène parmi les espèces diffère selon leur origine, soit humaine ou animale. Les espèces d'origine humaine sont plus sensibles que les espèces d'origine animale. L'exposition à l'air pendant 4 jours à une température de 20°C permet la survie de beaucoup

d'espèces d'origine animale (*B.pseudolongum subsp. pseudolongum* et *B. thermophilum*) (Beerens et al., 2000).

*Bifidobacterium psychraerophilum* cultive faiblement en aérobiose (Simpson et al., 2004) et *B. animalis subsp lactis* capable de croître en présence d'une concentration d'oxygène. (Meile et al., 1997; Masco et al., 2004).

### 3.5. Besoins nutritionnels :

- Besoin en acides aminés et source de carbone : les Bifidobactéries sont des microorganismes aux exigences nutritionnelles élevées. La cystéine et la cystine sont des sources essentielles d'azote pour les bifidobactéries (Ravula et Shah, 1998). Certaines espèces de bifidobactéries peuvent aussi utiliser les sels d'ammonium comme source d'azote (Scardovi, 1986). Ces espèces, lorsqu'elles croissent sans source d'azote organique, rejettent des taux considérables d'acides aminés dans le milieu. Par exemple, *B. bifidum* peut produire jusqu'à 150 mg/litre de thréonine. En général, les acides aminés les plus souvent produits sont l'alanine, la valine, l'acide aspartique et la thréonine (Matteuzzi et al., 1978).

### 3.6. Les facteurs bifidogènes :

Les facteurs bifidogènes peuvent être désignés sous le nouveau concept des prébiotiques, qui sont définis en tant qu'ingrédients non digestibles qui affectent avantageusement l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un, ou un paroi cellulaire (Petschow et Talbott, 1990; Tamura, 1983; Glick et al., 1960). Toutefois, cet apport exogène de N-acétyl-D-glucosamine n'est pas représentatif des autres bifidobactéries. Dans le lait et le colostrum d'origine humaine, d'autres glycoprotéines, telles que le N-acétyl-glycosamine, le N-acétyl-galactosamine et le N-acétyl-mannosamine, ont été identifiées comme étant des facteurs bifidogènes (Modler, 1994).

Le lactulose s'est avéré un facteur efficace pour la croissance de *Bifidobacterium* et il est également appliqué dans une grande variété d'aliment comme facteur bifidogène ou comme ingrédient fonctionnel pour la réglementation intestinale. Le lactulose est aisément métabolisée par toutes les espèces de *Bifidobacterium* qui résident dans la région intestinale humaine (Terada et al. 1992).

### 3.7. Potentiel d'application des bifidobactéries dans les produits laitiers:

L'addition des bifidobactéries au lait fermenté et d'autres produits laitiers est assez nouvelle.

En 1968, l'équipe de Schuler-Malyoth et al. a été la première à envisager un procédé commercial pour la fabrication de lait fermenté contenant des bifidobactéries.

Aujourd'hui sur le marché mondial, on y dénombre plusieurs produits contenant des bifidobactéries, que ce soit sous formes de laits fermentés (**Baron et al., 2000**), de desserts congelés (**Kailasapathy et Sultana, 2003**), de fromages (**Boylston et al., 2004**), des yaourts à boire et congelé (**Gilliland et al., 2002**), les crème glacé (**Godward et Kailasapathy, 2003**), etc. Au contraire des levains classiques utilisés dans la production des laits fermentés, les bifidobactéries n'ont pas un rôle dans l'acidification du lait, ou dans la formation de la texture et/ou de la saveur, mais sont pensés pour jouer un rôle de promoteur des bienfaits santé pour le consommateur (**Leahy et al., 2005 ; Tannock, 2005**).

Les bifidobactéries sont incorporées dans les produits laitiers sous deux formes : soit les laits fermentés où ces bactéries sontensemencées en même temps que les bactéries lactiques, soit les laits fermentés auxquels on ajoute une quantité importante de bifides après la fermentation.

Les inoculum de bifidobactéries utilisés pour la fabrication des laits fermentés varient entre 2% et 10% (**Kurmann et Rasic, 1991**) et peuvent même aller jusqu'à 20% (**Goh et al., 1986; Marshall et al., 1982**).

La survie des bifidobactéries dans un lait fermenté doit être assurée jusqu'à la consommation du produit puisqu'on doit y dénombrer plus de  $10^7$  bifidobactéries /g pour exercer des effets probiotiques (**Ouwehand et Salminen, 1998**)

## **1. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé:**

### **1.1. Application clinique (traitement et régime) :**

Beaucoup de bénéfices pour la santé ont été attribués à différents probiotiques (**Sander, 2009**), qu'ils soient formés d'une seule ou de plusieurs souches. Dans la mesure où il est impossible de généraliser les résultats entre des différents probiotiques (**Hugin, 2013**), Il est important de noter qu'aucune souche ne fournira tous les avantages proposés, et non toutes les souches de la même espèce seront efficaces contre des états définis de santé. Chaque souche détient sa propre carte d'identité avec une action précise, donc une indication donnée. Pour être active, une bactérie doit être adhérent à la muqueuse intestinale (**Faure et al, 2013**). Ces bénéfices potentiels sont très nombreux et appartiennent à des domaines très variés et sont continuellement élargi avec de nouvelles idées et développements scientifiques (**Vandenplas et al, 2015**). L'utilisation des microorganismes probiotiques pour leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte doit indiquer les doses et la durée d'utilisation comme le recommande le fabricant de chaque souche ou de chaque produit sur la base de preuves scientifiques (**Moreau, 2001 ; AFSSA, 2005 ; Chouraqui et Michard- Lenoir, 2007 ; Faure et al, 2013**), ces effets résultent essentiellement de leurs interactions avec le contenu digestif, c'est-à-dire les nutriments présents dans la lumière intestinale et les composants de la flore endogène (**Faure et al, 2013**).

Les probiotiques sont proposés pour le traitement de nombreuses pathologies digestives (**Tournut, 1989 ; Boudry et al, 2013**) et plus récemment de l'obésité. Avec traitement des autres maladies, le tableau 4 illustre la diversité de l'application clinique des probiotiques.

**Tableau4.** Quelques souches probiotiques et leurs effets cliniques (**Sander, 2009**).

Souche probiotiques	Effets cliniques sur l'Homme
<i>Lactobacillus</i> GG (ATCC 53103)	Adhésion aux cellules intestinales humaines, réduction de l'activité des enzymes fécales, prévention des diarrhées associées aux antibiotiques, prévention et traitement des diarrhées à rotavirus et autres diarrhées, modulation de la réponse immunitaire.
<i>Lactobacillus johnsonii</i> Lj_1(LA81)	Prévention de la diarrhée des voyageurs, modulation de flore intestinale, réduction des symptômes de l'intolérance au lactose, traitement de la constipation, amélioration de l'immunité, adjuvant dans le traitement de <i>Helicobacter pylori</i> .
<i>Bifidobacterium lactis (bifidum)</i> Bb-12	Prévention de la diarrhée des voyageurs, traitement des diarrhées virales (Rotavirus), modulation de flore intestinale, traitement de la constipation, modulation de la réponse immunitaire.
<i>Lactobacillus reuteri</i> (ATCC 55730)	Colonisation du tractus intestinal, réduction de la durée des diarrhées aux rotavirus, traitement des diarrhées virales.
<i>Lactobacillus plantarum</i> (DSM 9843)	Adhésion aux cellules intestinales humaines, modulation de flore intestinale.
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Prévention et traitements des diarrhées associées aux antibiotiques (ex. <i>Clostridium difficile colitis</i> ).
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35264	réduction des symptômes de syndrome du colon irritable.
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN173 010	Amélioration de la fonction intestinale
<i>Lactobacillus fermentum</i> VR1003	Réduction du nombre de jours et de la gravité d'une maladie respiratoire.
VSL#3	Rémission prolongée chez des patients atteints de pochète.

## 1.2. Les probiotiques en pathologie digestive:

L'utilisation des probiotiques en thérapeutique a naturellement concerné en premier lieu les maladies de l'appareil digestif, et en particulier les maladies de l'intestin grêle et du colon; les travaux en pathologie digestive ont utilisé soit des « probiotiques-aliments » (c'est le cas des produits laitiers fermentés), ou, plus souvent, des « probiotiques-médicaments ». Plusieurs études ont montré effets thérapeutiques des probiotiques sur les diarrhées aiguës infectieuses et diarrhées compliquant l'antibiothérapie (**De-Vrese et Marteau, 2007**) sur les maladies inflammatoires chroniques intestinales (**Barnich et al., 2007**).

Des travaux de plus en plus nombreux suggèrent un intérêt pour les probiotiques dans le traitement de l'infection à *H. pylori* (**Goldman et al., 2006**; **Lesbros-Pantoflickova et al., 2007**; **Falagas et al., 2008**).

La diarrhée d'origine infectieuse est un grave problème sanitaire mondial, responsable chaque année de la mort de plusieurs millions de personnes. Si la majorité des décès se produit parmi les enfants des pays en développement, on estime que jusqu'à 30% de la population même dans les pays développés souffre chaque année de diarrhée d'origine nutritionnelle. Les probiotiques pourraient constituer un important moyen de réduire ces problèmes. L'effet bénéfique de souches définies de probiotiques a parfaitement été démontré à l'aide de *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Bifidobacterium lactis* BB-12 pour la prévention (Saavedra et al., 1994; Szajewska et al., 2001) et avec le traitement (Isolauri et al., 1991; Perdone et al., 1999; Guandalini et al., 2000) de la diarrhée aiguë causée principalement par des rotavirus chez les enfants.

*Bifidobacterium* sont principalement lancés sur le marché par les produits laitiers fermentés, qui sont bien convenus pour favoriser l'image de santé du probiotique pour plusieurs raisons. Les nourritures fermentées, et les produits laitiers en particulier, ont déjà une image positive de santé, et les consommateurs sont au courant du fait que ces produits contiennent les micro-organismes vivants (Heller, 2001). D'ailleurs, d'un côté l'image des laits fermentés et les yaourts en tant que aliment sains facilite la recommandation de la consommation quotidienne des bifidobactéries, d'un autre côté les bifidobactéries sont protégés par des protéines du lait pendant le passage dans tractus gastro-intestinal, qui permet de garantir des taux élevés de survie de bifidobactérie à l'arriver au colon et meilleur effet pour le consommateur (Lønnerdal, 2003).

## 2. Application des probiotiques dans le domaine alimentaire :

Les produits laitiers probiotiques appartiennent à la catégorie des produits laitiers fonctionnels qui ont montré une croissance impressionnante au cours de la dernière décennie (Menrad, 2003). Ainsi, le nombre des produits disponibles et la connaissance du consommateur du concept probiotique a évalué, en conséquence, la recherche sur ces produits a également augmenté, plus de 600 comprenant : les crèmes glacées, les fromages, beurre, lait en poudre, desserts glacés et mayonnaise (Sveje, 2007). Un aliment probiotique doit contenir de 10 à 100 millions de bactéries viables par gramme ou par millilitre (Isabelle, 2009).

## 2.1. Les yaourts probiotiques :

Le yaourt a longtemps été reconnu comme un produit avec de nombreuses caractéristiques appréciées par les consommateurs, ce qui en fait un choix évident en tant que porteur de souches probiotiques. Au cours de ces dernières années, la popularité de bio-yaourts, contenant des ferments *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. Acidophilus* et des espèces de *Bifidobacterium* a augmenté de manière significative (**Farnworth, 2008**).

Une revue récente dans le British Journal of Nutrition (**Guarner et al.,2005**) comprend la conclusion suivante:

La consommation de yaourt a été montrée à induire des avantages mesurables sur la santé liés à la présence de bactéries vivantes, par rapport aux produits avec des bactéries tuées. Ainsi, les levains du yaourt remplissent clairement le concept actuel des probiotiques au moins pour ses effets bénéfiques sur la digestion du lactose in vivo.

"Les cultures probiotiques de lactobacilles et de bifidobactéries restent viables dans le yaourt au cours du stockage réfrigéré à des niveaux supérieurs à  $10^6$  UFC/g. Cependant, des problèmes de stabilité des bactéries probiotiques dans le yaourt et les produits laitiers fermentés ont été rapportés (**Farnworth, 2008**).

Certaines souches de bactéries lactiques considérées comme étant probiotique peuvent faire partie du processus de fermentation, alors que d'autres souches sont ajoutées par la suite dans le produit final et n'ont rien à voir avec la fermentation (**Camille, 2014**).

Les bactéries probiotiques de yaourt les plus utilisées de type « bifidobactéries » (*bifidobacterium longum*, *bifidobacterium animalis* ...) et de type « Lactobacilles » (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii* ...). Certains Streptocoques » peuvent également être utilisés (**Dib et al, 2012**), elles sont considérées comme probiotiques car elles libèrent une enzyme bactérienne : la lactase, qui va permettre de digérer correctement le lait, même chez les personnes dépourvues de lactase physiologique (**Camille, 2014**).

Selon la fédération internationale laitière, le *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, doivent êtreensemencées simultanément et se trouver vivantes dans le produits final jusqu'à la durée limites de conservation, à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme rapportées à la partie lactée (**Amellal et Chibane, 2007**), la quantité d'acide lactique libre contenue dans 100 g de yaourt ne doit pas être inférieur à 0,7 g (**Gemren, 2009**). De plus, les doses nécessaires pour obtenir une action bénéfique varient considérablement selon les souches probiotiques. Pour cette raison, il est impossible d'établir une recommandation uniforme applicable à toutes les souches. Et chaque souches a son

propre champ d'action, les conseils cliniques doivent donc être personnalisés (Isabelle, 2009) (voir tableau suivant).

**Tableau 5.** Exemple de quelques souches probiotiques utilisées dans des fabricants de yaourts (Isabelle, 2009).

yaourt	La souche utilisée	La dose de bactérie (nombre de bactérie /g)
Activia de Danone	<i>B. lactis</i> DN-173 010	Plus de 1 milliard/ 113 g
Panier de Yoplait	<i>B. longum</i>	Plus de 1 milliard/ 100 g
Yoptimal de Yoplait	<i>B. lactis</i> BB-12 <i>L. acidophilus</i> LA65	Plus de 1 milliard/ 100 g
BioBest Vitalité	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. lactis</i> +inuline	Plus de 1 milliard/ 100 g
Stonyfield Bio	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. lactis</i> +inuline	Plus de 1 milliard/ 100 g
Liberté	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. humanis</i>	Plus de 1 milliard/ 100 g

## 2.2. Aspect nutritionnel et thérapeutique du yaourt au bifidus :

### 2.1.1. Aspect nutritionnel :

La valeur nutritionnelle du yaourt est supérieure à celle du lait. Son pourcentage en protéines et surtout en sels minéraux (calcium, phosphore, potassium) est particulièrement élevé, ainsi que celui de la riboflavine, comme le montre le tableau 6.

**Tableau 6.** Valeur nutritionnelle du lait et du yaourt (Malonga, 1985).

	Lait	Yaourt nature	Yaourt maigre	Yaourt aux fruits
Calories/100 g	66	84	69	90
Matières sèches non grasses (%)	8.7	13.1	13.1	14
Protéines %	3.2	4.8	4.9	5.2
Riboflavine(vitamine B2)mg/100 g	0.15	0.22	0.12	0.22
Calcium (Ca++) mg/ 100 g	120	180	181	153
Phosphore (P) mg/100 g	95	142	143	153
Potassium (K+) mg/100 g	160	240	242	254

La valeur nutritionnelle du yaourt dépend dans une large mesure des techniques de fabrication utilisées (addition de lait sec, température de pasteurisation, etc.) (**Malonga, 1985**).

### 2.1.2. Aspect thérapeutique :

Le yaourt apparaît comme un nouveau bord d'attaque thérapeutique pour différentes maladies. Un certain nombre de prestations de santé ont été réclamés pour les bactéries probiotiques telles que *Lb. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. Et *Lb. casei*. Il s'agit notamment de :

- propriétés antimutagènes
- les propriétés anti-cancérogènes
- stimulation du système immunitaire ;
- la prévention de l'eczéma et l'atrophie ;
- la réduction de la pression artérielle,
- réduction de la concentration de cholestérol sérique,
- l'entretien de la flore équilibrées et l'amélioration de métabolisme de lactose.

La consommation de yaourt est également utile pour soulager la maladie inflammatoire de l'intestin (**Ashraf et al., 2011**).

- propriétés anti-diarrhéiques (**Clancy, 2003; Van Niel et al., 2002**).
- une résistance accrue aux maladies infectieuses, la croissance de stimulation, amélioration de la gastro-entérite, maladie inflammatoire de l'intestin et suppression de l'infection à *Helicobacter pylori* (**Shah, 2007**).
- Inhibition de la colonisation intestinale par des micro-organismes pathogènes (**Russell et al., 2011**).

L'effet « probiotique », c'est-à-dire l'amélioration des performances zootechniques (effet positif sur la croissance, sur la diminution des diarrhées...) dépend de la sélection des souches, de la quantité et de la durée d'administration des bactéries lactiques vivantes (**Syndaifrais, 1997**).

### 3. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine :

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle de l'intestin.

D'innombrables avantages pour la santé sont fournis par l'ingestion des aliments contenant des cultures probiotiques (Figure 6) (**Da Cruz et al., 2010**).

Il est important de mentionner que les effets de la promotion de la santé dépendent de la souche présente dans la formulation du produit, et qu'il n'y a pas une souche probiotique en mesure de fournir tous les avantages (Shah, 2007)

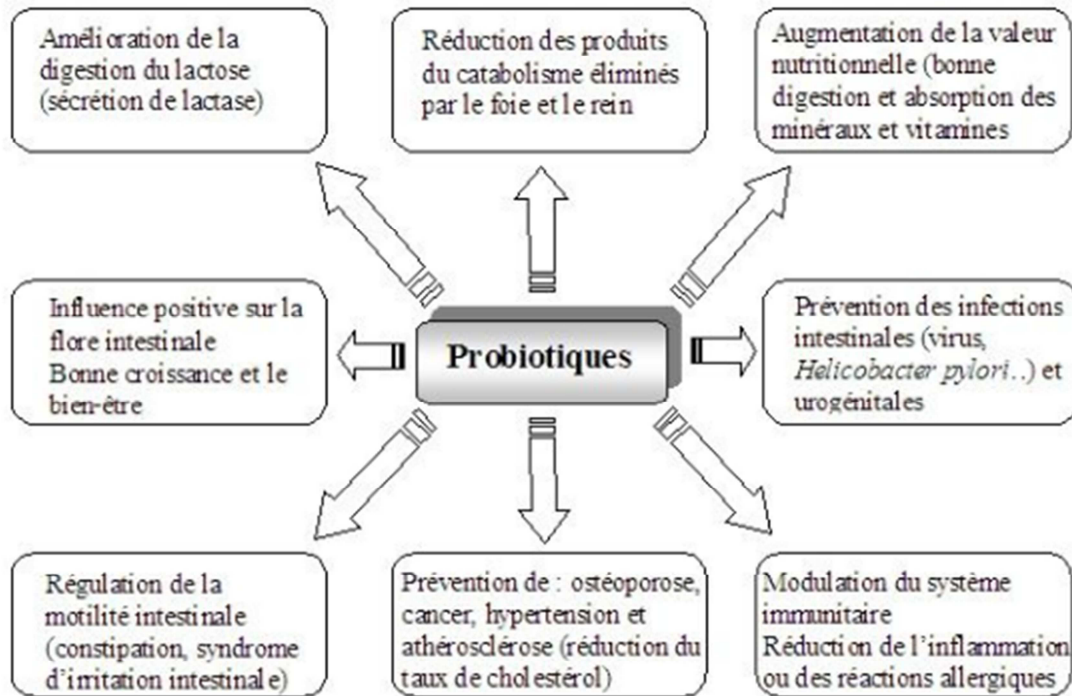


Figure 14. Présentation des principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Mercenier et al., 2002).

### 3.1. Mécanismes d'action des probiotiques :

La transformation des aliments et les technologies de préparation alimentaire éliminent les bactéries bienfaisantes que nous tirons normalement des fruits et des légumes frais ainsi que des produits laitiers. De même, les antibiotiques tuent les microbes, mais ils peuvent également éliminer les microbes bienfaisants dont dépend notre santé digestive. Egalement, Les produits chimiques, la pollution et les mauvaises habitudes alimentaires ont un effet dévastateur sur les bactéries bienfaisantes présentes naturellement dans notre organisme. Ces facteurs courants, voir quotidiens, appauvrissent la santé de la microflore (bactéries présents dans l'organisme) et peuvent compromettre la fonction intestinale, la digestion, la réponse immunitaire et la résistance aux agents pathogènes infectieux.

Aussi, plusieurs d'études scientifiques **Da Cruz et al., (2010)** indiquent que les probiotiques peuvent aider l'organisme à devenir plus résistant aux agents pathogènes en introduisant des bactéries bienfaisantes de la flore intestinale.

**-Compétition pour les nutriments :** Pour croître et proliférer au sein de l'intestin, les bactéries bénéfiques vont utiliser les mêmes nutriments que celles pathogènes. La

consommation de probiotiques aide à réduire le risque de développement de ces mauvaises bactéries.

**-Compétition pour les sites d'adhérence :** La capacité d'adhérence de la bactérie sur la paroi intestinale est un élément essentiel pour garantir sa prolifération. Là encore une compétition s'opère entre les bonnes et mauvaises bactéries.

En effet, elles doivent être solidement «armées» pour résister au mouvement péristaltique produit par le passage des aliments. Une des fonctions importantes des bactéries probiotiques est de contribuer à prévenir ou de limiter la croissance des bactéries potentiellement pathogènes sur la paroi intestinale. Ces bactéries perturbent la digestion et freinent l'absorption des nutriments. Elles sont connues pour provoquer aussi des troubles intestinaux majeurs tels que la diarrhée ou le vomissement. Dans une microflore intestinale équilibrée, la prédominance de bonnes bactéries permet de limiter ces risques.

### **3.2. Les principaux effets bénéfiques sur la santé de l'hôte :**

#### **3.2.1. Soulagement de la constipation**

Les lactobacilles peuvent avoir des effets sur la constipation (selles difficiles, dureté excessive des selles, transit intestinal lent) et permettent de réduire l'utilisation de laxatifs, qui ont l'inconvénient majeur d'éliminer différentes substances essentielles à l'organisme comme les acides aminés, les minéraux...(Guarner et al.,2008).

#### **3.2.2. Améliorer l'utilisation du lactose par l'organisme**

L'un des effets des BAL qui a été le plus mis en avant et démontré chez l'Homme est celui qui concerne l'amélioration de l'intolérance au lactose (De Vrese et al., 2001).

Chez les personnes souffrant d'intolérance au lactose, un déclin de la production de  $\beta$ -galactosidase est observé au-delà de la petite enfance. La deuxième cause d'intolérance (intolérance secondaire) est représentée par les maladies comme les résections intestinales, les gastro-intérites, la maladie céliaque ou les gastrectomies.

Plusieurs études ont montré que la  $\beta$ -galactosidase des BAL participait à la digestion du lactose dans l'intestin.

En principe, le remplacement du lait par du yaourt conduit à une meilleure absorption et une meilleure tolérance chez les sujets présentant une intolérance au lactose (primaire et secondaire). Il a été démontré que les bactéries qui survivaient dans l'intestin gardaient une activité métabolique suffisante pour hydrolyser le lactose, et que

celles dont la membrane est facilement lysée par les acides biliaires libèrent leur lactase dans l'intestin (**Drouault et al., 1999**).

*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus* améliorent la digestion du lactose et réduisent les symptômes liés à l'intolérance au lactose (douleurs abdominales, ballonnements).

Plusieurs travaux explicatifs ont montré que la lactase de bactéries lactiques participe à la digestion du lactose du yaourt (90%) chez les sujets déficients en lactase (**Guarner et al., 2008**).

### 3.2.3. Prévention ou le raccourcissement de la durée des diarrhées :

Des études cliniques ont démontré que la diarrhée du voyageur, diarrhée aux rotavirus, diarrhée associée aux antibiotiques comme celle causée par *Clostridium difficile*, peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques tels que :

*L. rhamnosus*, *B. bifidum*, *S.thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* (**Wang et al., 2004**).

Les mécanismes potentiellement impliqués incluent la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines, la compétition pour des nutriments ou des récepteurs d'adhésion, des actions anti-toxines et la stimulation du système immunitaire (**Gill, 2003**). Plusieurs études randomisées contrôlées sur l'Homme ont montré l'efficacité des souches probiotiques pour prévenir ou atténuer les perturbations digestives liées à la prise d'antibiotiques (**Cremonini et al.,2002; Fooks, et Gibson, 2002**) et les diarrhées nosocomiales infantiles dues surtout à des rotavirus (**Szymanski et al., 2006**).

### 3.2.4. Contrôle des infections intestinales par *Helicobacter pylori* :

L'infection par *Helicobacter pylori* favorise les risques d'ulcère du duodénum et de l'estomac et de certains cancers et lymphomes gastriques (**Dial et Lichtenberges, 2002**).

Wang et al.,(2004) ont rapporté que la consommation régulière de yaourt additionné de *L.acidophilus* La5 ou de *Bifidobacterium lactis* Bb12 induit une suppression effective de L'infection due à *Helicobacter pylori*.

La croissance d'*H.pylori* est inhibée par la production de quantités importantes d'acide lactique (**Zubillaga et al., 2001**) et par la production de bactériocines notamment la lacticine produite par *Lactococcus lactis* et qui exerce une activité antimicrobienne contre plusieurs souches d'*Helicobacter pylori*.

### 3.2.5. Diminution des allergies alimentaires :

L'allergie alimentaire du nourrisson se traduit souvent par de l'eczéma atopique. Les traitements curatif et préventif de cette pathologie par des BAL ont été évalués lors d'une étude clinique sur 27 enfants nourris au sein et souffrant d'eczéma atopiques (**Arvolaet al.,2000**).

Il a été notamment observé qu'après deux mois de traitement avec une formule supplémentée en *L.rhamnosus* GG et *B. lactis* Bb12, il y a eu une amélioration plus rapide de l'état atopique en comparaison avec le groupe placebo. Un effet préventif de *L. rhamnosus* GG a aussi été observé chez des enfants à risque nés de parents atopiques (**Kalliomaki et al., 2001**).

### 3.2.6. Réduction du taux de cholestérol sanguin :

Des tests in vitro ont montré une réduction du taux de cholestérol dans un milieu de culture avec certains *Lactobacillus* (**Zhang et al.,2008**) . Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par les bactéries ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués.

Les acides biliaires, synthétisés par le foie à partir du cholestérol, sont "recyclés" et utilisés en moyenne trois fois pendant un même repas. L'hydrolyse des sels biliaires conjugués (les acides biliaires doivent être conjugués à la taurine et à la glycine pour être solubles) rend nécessaire la synthèse de sels biliaires supplémentaires, ce qui conduirait à une réduction du cholestérol (**Liong et Shah ,2005**).

## 4. Effets probiotiques des bifidobactéries:

Plusieurs rôles sont attribués à la présence des *bifidobactéries*.

Un des rôles les plus importants des *bifidobactéries*, est l'adhésion de celles-ci aux cellules épithéliales de l'intestin ce qui permet de créer une niche écologique et ainsi d'empêcher l'invasion de bactéries pathogènes.

Certaines études ont été faites sur l'effet de l'administration de comprimés de *bifidobactéries* à des gens ayant la diarrhée et il a été remarqué que l'ingestion de ces comprimés aidait à diminuer les symptômes.

L'équipe de Tojo et al., (1987) avait remarqué que les personnes atteintes d'entérites causées par *Campylobacter* guérissaient plus vite lorsque des comprimés contenant *Bifidobacterium breve* leur étaient administrés.

Romond (1989) a aussi constaté l'effet positif de l'administration d'un lait fermenté avec *B. longum* sur la disparition d'un rotavirus. Il a aussi remarqué que les bifidobactéries ont un rôle nutritionnel car elles produisent des vitamines du groupe B, des acides aminés tels que la valine, l'alanine, l'acide aspartique et la thréonine (**Rasic et Kurxnann, 1983**).

Il est reconnu que les bifidobactéries ont un effet probiotique qui est imputable à leur métabolisme. Ainsi, il a été reconnu que la présence de bifidobactéries chez l'humain diminuait l'intolérance au lactose puisque les bifidobactéries métabolisent le lactose. De plus, la teneur en lactose des produits laitiers fermentés par des bifidobactéries est moins importante que les produits fermentés sans bifidobactéries ce qui rend ces produits attrayants pour les gens souffrants d'intolérance au lactose. Ainsi, il a été remarqué par Blanchette et al., (1996) que la teneur en lactose d'un fromage fait avec *B.infantis* était 40% moins importante que pour le fromage sans bifidobactéries, après une journée d'entreposage.

Le même phénomène a été observé par l'équipe de Roy et al., (1997) dans le cas de yaourts contenant des bifidobactéries et ceux sans bifidobactéries (**Nagengast et al., 1988; Roberfroid, 2000**).

## ***II. MATÉRIEL & MÉTHODES***

---

## **Partie II: Matériels et Méthodes :**

### **1. Lieu de l'étude :**

Les études et les expérimentations ont été réalisées dans le laboratoire de microbiologie, département de biologie, faculté des sciences, université de Laghouat.

### **1.1 Matériels :**

#### **1.1.1 Matériel de laboratoire :**

Le principal matériel qui a été utilisé pendant mon expérimentation est comme suit: des flacons, tubes à essais, boîtes de pétrie, pipettes pasteur, micropipette, pince, Anse de platine, bec bunsen, agitateur vortex, balance, seringue, et étuves (30°C et 37°C), la jarre +la bougie. Voir le détail en annexe 3.

#### **1.1.2 Matériels biologiques : Yaourt probiotiques**

Trois laits fermentés de trois industries différentes actuellement commercialisés ont fait l'objet de cette étude.

Pour ne pas citer les marques de ces produits, nous les nommerons Pro-X, Pro-Y, Pro-Z, Les deux marques Pro- X. et Pro-Y produisent le yaourt probiotique sous ses deux formes liquide (PTDJ) ; et la forme semi-solide (POT).

La troisième marque ne produit que le yaourt probiotique sous sa forme semi-solide.

Le yaourt au Bifidobacterium dont la composition est la suivante:

-Composition microbiologique et Souches étudiées :

*Streptococcus salivarius subsp. thermophilus;*

*Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus;*

*Bifidobacterium Actiregularis.*

### **2. échantillonnage:**

Quarante échantillon de trois types de yaourt probiotique ont été prélevés et fournis par le distributeur des laits fermentés et dans des points de vente répartis dans la ville (Laghouat).

Les échantillons de yaourt ont été gardés dans une température de 4°C et analysés avant la date limite de leur conservation.

Les échantillons analysés, leur date de péremption ainsi que leur date d'analyse sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau 7.** Échantillonnage des produits probiotiques.

Les Produits	Date de Péremption	Date d'analyse
1 pro-y AR	10/02/2018	04/02/2018
2 pro-y AR	10/02/2018	04/02/2018
3 pro-y AR	18/02/2018	12/02/2018
4 pro-y AR	18/02/2018	12/02/2018
5 pro-y AR	18/02/2018	12/02/2018
6 pro-y AR	18/02/2018	12/02/2018
7 pro-x AR	22/02/2018	13/02/2018
8 pro-x AR	22/02/2018	13/02/2018
9 pro-x AR	22/02/2018	13/02/2018
10 pro-x L	22/02/2018	13/02/2018
11 pro-x L	22/02/2018	13/02/2018
12 pro-x L	22/02/2018	13/02/2018
13 pro-x AR	18/03/2018	16/03/2018
14 pro-x AR	18/03/2018	16/03/2018
16 pro-y L	24/02/2018	18/02/2018
17 pro-y L	24/03/2018	18/02/2018
18 pro-y AR	06/03/2018	18/02/2018
19 pro-y AR	06/03/2018	18/02/2018
20 pro-y AR	07/03/2018	21/02/2018
21 pro-y AR	07/03/2018	21/02/2018
22 pro-y L	22/02/2018	21/02/2018
23 pro-y L	22/02/2018	21/02/2018
24 pro-y L	06/03/2018	01/03/2018
25 pro-y L	06/03/2018	01/03/2018
27 pro-z AR	20/03/2018	01/03/2018
28 pro-z AR	20/03/2018	01/03/2018
29 pro-z AR	07/03/2018	01/03/2018
30 pro-z AR	07/03/2018	01/03/2018
31 pro-z AR	25/03/2018	05/03/2018
32 pro-z AR	26/03/2018	26/03/2018
33 pro-x L	10/04/2018	05/04/2018
34 pro-x L	06/04/2018	05/04/2018
35 pro-x AR	06/04/2018	05/04/2018
36 pro-x AR	08/04/2018	05/04/2018
37 pro-x L	08/04/2018	05/04/2018
38 pro-x L	16/04/2018	05/04/2018
39 pro-x AR	16/04/2018	05/04/2018
40 pro-x AR	16/04/2018	05/04/2018

### **3. 3. Les milieux d'isolement et de dénombrement de la flore lactique et probiotique:**

Trois milieux gélosés ont été testés pour l'isolement et le dénombrement de la flore lactique: Le milieu PCA, milieu M17 et le milieu MRS acidifié en bouillon et en gélose (compositions en annexe 1).

### **4. Conditions des cultures :**

Les bifidobactéries sont des bactéries anaérobies strictes incapables de se cultiver en présence d'oxygène (O<sub>2</sub>). Cette action toxique nous impose à suivre des conditions particulières de culture, qui sont :

-Réalisation d'une atmosphère anaérobie : Tout au long du travail, les cultures de bifidobactérie (soit en milieu liquide ou milieu solide) sont incubées dans des jarres d'anaérobiose qui sont des enceintes closes dans lesquelles il est possible de réaliser une atmosphère sans O<sub>2</sub>. Elles contiennent des systèmes Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Germany), qui génère du CO<sub>2</sub> en fixant l'O<sub>2</sub>.

-Réductions des milieux: Tous les milieux et solutions utilisées pour cultiver les souches de bifidobactérie sont additionnés de la cystéine chlorhydrique, qui est un agent réducteur et non toxique pour la bactérie. La concentration finale utilisée est de 0.05% (p/v).

### **5. Préparation des échantillons à dénombrer :**

Le but de la numération (ou dénombrement) est de déterminer la concentration en bactéries contenues dans une préparation initiale. Elles nécessitent une ou plusieurs dilutions décimales (au dixième).

#### **5.1. Principe de dilution:**

- **Préparation de la dilution mère :** (toutes les manipulations ont été réalisées dans des conditions complètement aseptiques)



**Figure16.** lieu et condition de travail (photo personnelle 2018).

Sur une paillasse bien décontaminée et devant un bec benzène :

Nous avons introduit 10 g du produit fermenté aseptiquement dans un flacon stérile préalablement taré contenant 90 ml de diluant qui est une solution Ringer diluée au quart.

L'homogénéisation a été réalisée sur vortex après introduction de l'aliment dans la solution stérilisé au préalable dans l'autoclave à 120°C pendant 20min. Cette suspension constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond à la dilution 1/10 (le cas liquide) ou 10<sup>-1</sup> (le cas semi solide) (Lebres *et al.*, 2002).



**Figure17.** Autoclave automatique (photo personnelle 2018).

## 5.2. Préparation des dilutions en série (ou successives) 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, ...

- Ouvrir et flamber l'ouverture du tube.
- Prélever 1 ml de la dilution mère (10<sup>-1</sup>) est prélevé aseptiquement à l'aide de la pipette plastique stérile (ou pipette automatique). Ne pas introduire la pipette dans la suspension de plus de 1 cm.
- Flamber et refermer le tube. Il est conseillé de replacer le tube sur le portoir à une place montrant qu'il a déjà été prélevé (en retrait par exemple).

- Ouvrir le tube de 9 ml de diluant, flamber l'ouverture, y introduire le volume prélevé (sur la paroi sans toucher le liquide).
  - Flamber et refermer le tube, jeter la pipette souillée dans le bac à eau de Javel.
- On obtient ainsi la dilution  $10^{-2}$  et on répète la même procédure en prélevant 1ml à partir de la dilution  $10^{-2}$  et en l'introduisant aseptiquement dans un tube à essai contenant 9 ml du diluant et ainsi de suite (**Arrêté du 27 Mars 2004, JORA n° 32 ; Guiraud, 2003**). Nous avons préparé ainsi sept dilutions.

Chaque dilution nécessite un tube de diluant de 9 ml et d'une pipette stérile de 1 ml.

Ainsi, la réalisation d'une gamme de dilutions jusqu'à  $10^7$  nécessite : 7 tubes et 7 pipettes.

Exemple : la dilution  $10^7$  sera effectuée en prenant 1 ml de la dilution  $10^6$  préalablement

Homogénéisée qui sera introduit dans un tube contenant 9 ml de diluant.

### **Incubation :**

Les bactéries à dénombrer, présentes dans l'inoculum, sont introduites soit à la surface, soit dans la masse du milieu gélosé. Chaque bactérie isolée donne naissance à une colonie ou « unité formant colonie » (UFC).

### **5.3. Dénombrement en masse sur gélose PCA :**

Le dénombrement sur masse en gélose PCA s'effectue sur 1 ml de chacune des dilutions ( $10^{-1}$  ;  $10^{-2}$  ;  $10^{-3}$ ) que l'on ajoute à des boîtes de pétri à raison de deux boîtes par dilution, ensuite on ajoute le milieu PCA maintenu à l'état liquide ( $45^{\circ}\text{C}$ ) avec la technique de l'ensemencement en masse.



**Figure18.** Bain-marie (photo personnelle 2018).

Après homogénéisation et solidification, les boîtes sont incubées à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 72heures. Chaque expérimentation est réalisée 2 fois.

### **Lecture:**

Après la période d'incubation, les colonies ayant poussé en masse dans les boîtes de pétrie sont comptées à l'aide du compteur de colonies, en retenant celles contenant entre 15 et

300 colonies au niveau de deux dilutions. Le nombre de microorganismes par gramme de produit est ensuite déterminé.

#### 5.4. Etapes de dénombrement de la flore spécifique du yaourt :

- Le dénombrement est effectué sur géloses M17 et MRS acidifié à pH 5,4.
- ensemencement en masse pour les deux milieux de culture, trois dilutions  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  sont testées pour chaque pot de yaourt.
- Le diluant utilisé est une solution ringer diluée au quart.
- Les boîtes de Pétri contenant entre 25 et 250 colonies lenticulaires sont énumérées (Chougrani *et al.*, 2008).
- Chaque expérience est indépendamment répétée deux fois.
- L'incubation s'effectue en anaérobiose total en utilisant une jarre+ une bougie pour assurer l'anaérobiose dans un incubateur à 37°C pendant 72h.



Figure19. La jarre d'anaérobiose (photo personnelle 2018).



Figure20. Incubateur de 37°C (photo personnelle 2018).

- Les différentes colonies sont identifiées par observation microscopique et dénombrées.
- Tous les essais de dénombrement sont effectués en double.

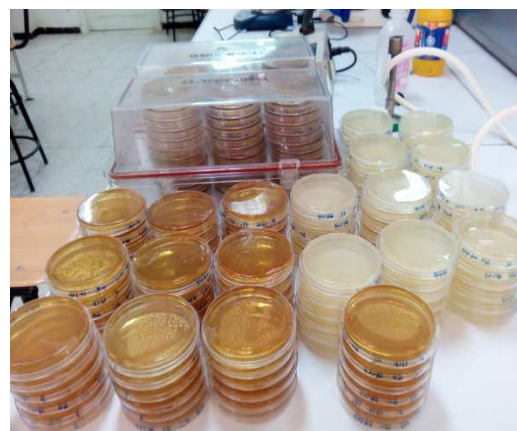
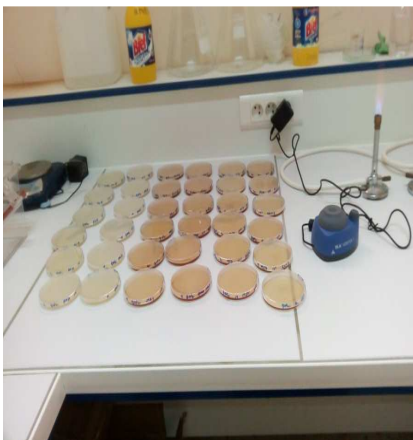


Figure21. Boites pétries ensemencés (photo personnelle 2018).

**Tableau 8.** Conditions expérimentales pour le dénombrement de la flore lactique du yaourt (JORA n° 43 du 04 juillet 2004).

<i>Bactérie lactique</i>	<i>Milieu de culture</i>	<i>Dilutions testées</i>	<i>Conditions d'incubation</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<b>M17</b>	$10^{-5}$ , $10^{-6}$ et $10^{-7}$	37°C pendant 24 à 48h
<i>Lactobacillus Bulgaricus</i>	<b>MRS acidifié</b> à pH 5,4	$10^{-5}$ , $10^{-6}$ et $10^{-7}$	37°C pendant 48 à 72h en anaérobiose

**Lecture:**

Après la période d'incubation, les colonies ayant poussées en masse dans les boites de pétrie sont comptées à l'aide du compteur de colonies, en retenant celles contenant entre 15 et 300 colonies au niveau de deux dilutions. Le nombre de microorganismes par gramme de produit est ensuite déterminer.

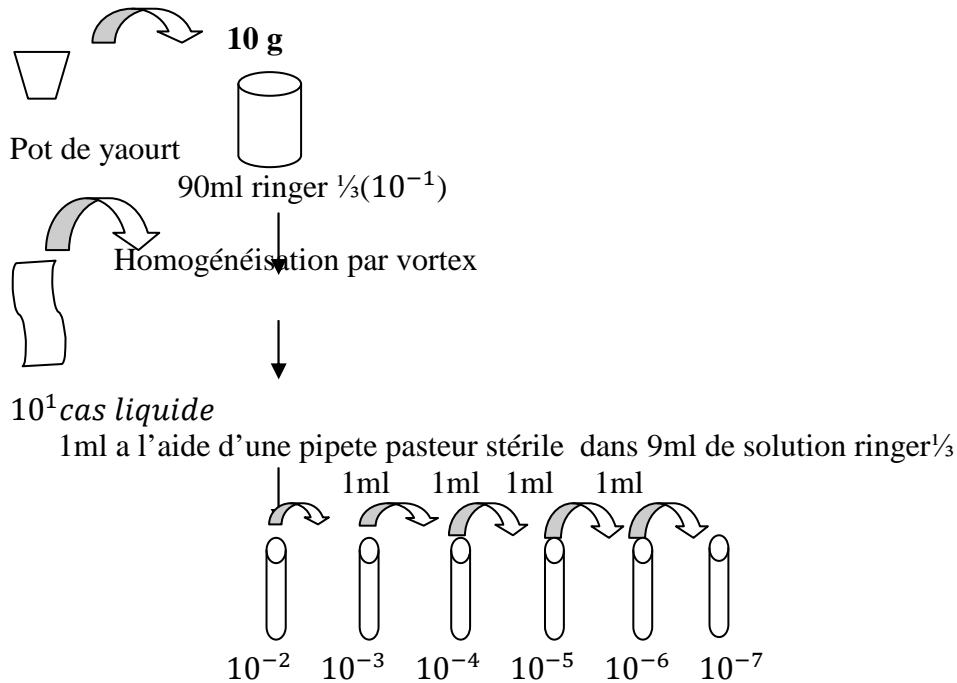


**Figure22.** compteur de colonies (photo personnelle 2018).

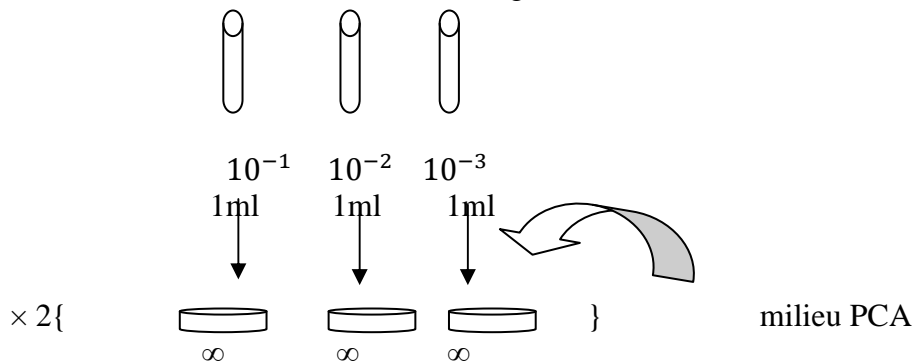
- La démarche de l'expérience est éllustré dans le schéma suivant :

**1. Isolement et identification des bactéries lactiques :**

**-Préparation de la batterie des dilutions ;**

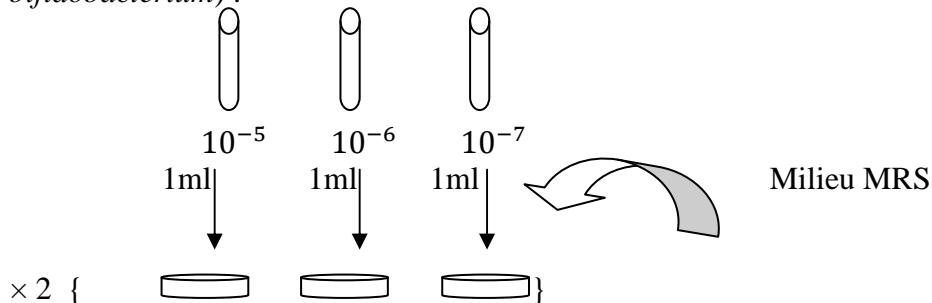


**2. Dénombrement sur milieu PCA : (germes totaux)**



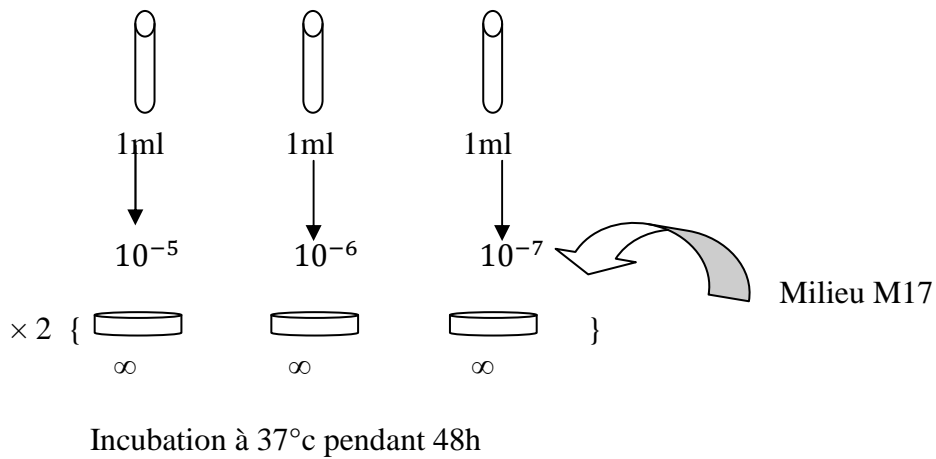
Incubation à 30°C pendant 72h

**3. Dénombrement sur milieu MRS : (sélectif pour *Lactobacillus bulgaricus*, *bifidobactérium*) :**



Incubation en anaérobiose dans une jarre +bougie à 37°C pendant 72 h

#### 4. Dénombrement sur milieu M17 : (sélectif pour *Streptococcus thermophilus* )



**Figure 23.** Protocole expérimentale pour le dénombrement de la flore lactique et probiotique dans le yaourt

#### La lecture :

Pour qu'un résultat soit valable, on estime en général qu'il est nécessaire de compter les colonies sur les boîtes contenant au minimum 15 colonies et au maximum 300 colonies.

Le comptage des colonies est réalisé par un Colony Counter. Le calcul de nombre N de microorganismes présents dans l'échantillon pour essais, en tant que moyenne pondérée à partir deux dilutions successives, à l'aide de la formule suivante:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1n_2)}$$

- $\sum$ colonie : est la somme des colonies sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successive et dont au moins une contient 15 colonies ;
- V : est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte en millilitres;
- $n_1$  : est le nombre des boîtes retenues à la première dilution ;
- $n_2$  : est le nombre de boîtes retenues à la seconde dilution ;
- $d_1$  : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Les résultats sont exprimés dans l'annexe.

Dans la réglementation Algérienne, aucune loi relative au calcul des germes bactériens probiotiques. Nous avons suivi les normes microbiologiques décrites par l'organisation française l'OMS et la FAO qui est  $10^7$  bactérie probiotique par gramme de yaourt.

## 6. Conservation des Souches :

Les souches sont cultivées sur milieu gélosé MRS et M17 à 37°C pendant 72h pour faire le dénombrement et le comptage des colonies obtenues. Ensuite les boîtes sont conservées à 4°C.

Avant chaque expérience les cultures sont rajeunies par incubation dans des tubes contenant 9ml de MRS BROTH additionnés d'une couche de l'huile de vaseline pour créer l'anaérobiose à 37°C pendant 24 h dans une jarre en anaérobiose pour obtenir des cultures en fin de la phase exponentielle. En effet, d'après la littérature scientifique, 18 à 20 h d'incubation sont nécessaires pour atteindre la fin de la phase exponentielle, indiquée par l'apparition des troubles dans le bouillon qui témoigne de la présence d'une biomasse bactérienne.



**Figure 24.** Incubation dans des tubes contenant MRS Broth (photo personnelle).

## 7. Détermination de la morphologie :

Afin de vérifier les caractères morphologiques de nos souches (Gram, type d'association), nous avons effectué une étude macroscopique et microscopique avec coloration de Gram. Afin de déterminer leurs caractères cultureux (couleur, disposition, forme et aspect), les colonies obtenues sont observées d'abord sous microscope à l'état frais et par coloration de bleu de méthélin (x40). L'observation macroscopique est réalisée dans le but d'observer la disposition, la couleur et l'aspect des colonies sur boîtes de Pétri (**Guiraud, 2003**). Après la coloration de Gram, les cellules sont examinées au microscope optique (x100).

Après 72h d'incubation, nous sommes devant 2 types de colonies et par conséquent 2 types

de bactéries, les *Lactobacillus* (bactérie habituelle du yaourt) et les bifidobactéries (ensemencés pendant la fabrication). Cela sur milieu MRS.

La méthode la plus facile pour le dénombrement des bifidobactéries, est l'utilisation d'un antibiotique qui est le nafcilline qui va inhiber la croissance des *Lactobacillus*. Mais à cause de la non-disponibilité de cet antibiotique, nous avons utilisé les tests biochimiques pour pouvoir différencier entre les deux bactéries et dénombrer la bactérie (objet de notre étude).

#### 1- Test de confirmation

Après l'obtention des colonies, ces dernières sont soumises aux principaux tests d'identification qui sont les suivants : examens macroscopique et microscopique.

##### a. Examen macroscopique

Ce test vise à apprécier la taille des colonies, leurs couleurs et leurs formes, si elles sont opaques ou translucides sur boîte de Pétri.

##### b. Examen microscopique

L'examen microscopique est révélé par la coloration de Gram (annexe 2) qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

## 8. Identification biochimique:

### 8.1. Détermination des caractères physiologiques

Nous avons réalisé une caractérisation physiologique des souches par le biais de trois tests : (i) la mise en évidence de l'enzyme catalase, (ii) la croissance des souches dans des conditions hostiles et (iii) le développement des colonies à différentes températures. Tous les tests sont réalisés sur des cultures rajeunies préparées à partir des souches conservées à basse température sur gélose inclinée comme suit :

- Une culture sur bouillon MRS pour les lactobacilles ou M17 pour les lactocoques est préparée en prélevant, à l'aide d'une anse de platine stérile, quelques colonies ;
- Ces colonies sont ensuite incorporées dans le tube contenant un des bouillons MRS ou M17 préalablement stérilisés et incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

### 8.2. Test de catalase :

L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en émulsionnant une à deux colonies de l'isolat de la souche à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Guiraud, 2003).

### 8.3. Test de croissance dans les conditions hostiles:

Pour réaliser ce test, nous avons préparé deux milieux hypersalés de NaCl : 4% et 6,5%. Après ensemencement de ces deux milieux par la souche à tester et incubation à 37°C pendant 24 heures, la croissance est appréciée par apparition d'un trouble dans les tubes de culture microbienne (Hariri *et al.*, 2009 ; Guiraud, 2003).

## Résultats et discussion :

Dans cette partie nous détaillons les résultats de dénombrement de la charge bactérienne probiotique et d'isolement et l'identification de bifidobacterium ainsi que les résultats de comparaison des trois types de yaourt probiotique commercialisé à Laghouat.

### I. Résultats des Tests de confirmation :

#### I.1. Aspect morphologique :

Les aspects morphologiques des trois espèces de bactéries lactiques isolées (voir l'Annexe 5 pour les photographies des colonies obtenues). Sur gélose M17 agar, il y a apparition de petites colonies bien isolées, distinctes d'une taille inférieure à 1mm, de couleur blanchâtre, crème, avec une forme lenticulaire coccie ou diplocoques en chênette.

#### I.2. Résultats microscopiques :

Sur gélose MRS agar, il y a apparition de petites colonies, bien isolées, distinctes, de couleur blanchâtre à pourtour régulier, forme ronde et lenticulaires (convexe) certains sont des bâtonnets avec un diamètre compris entre 1-2 mm.

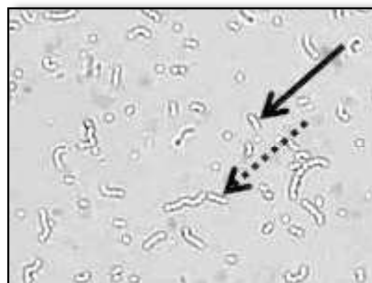
Ces observations microscopiques ont permis aussi de déterminer la forme et le mode de regroupement:

- Des coques disposées en pair et surtout en chaines (*S.thermophilus*).M17
- Des bâtonnets courts (*L.delbrueckii subsp. bulgaricus*).MRS
- Des bâtonnets disposés en chaines plus ou moins longues(*L.acidophilus*).MRS
- Des bâtonnets sous forme de v avec extrémité convexe (*Bifidobactérium sp*).MRS

Toutes les colonies obtenues sont de Gram+ et d'un catalase-.

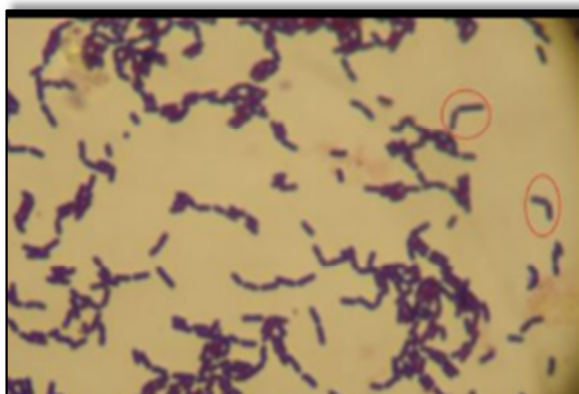


**Figure 25.** *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* colorés au bleu de Méthylène et observés au microscope (righi, 2006).

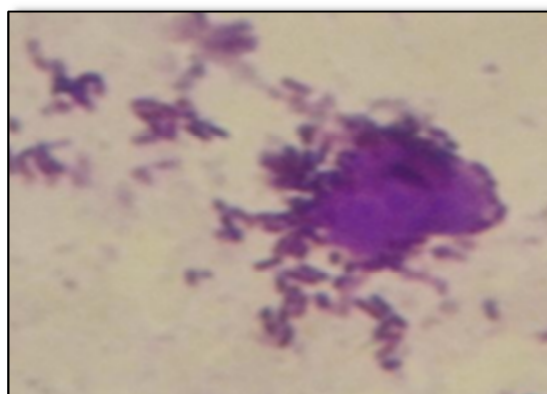


**Figure26.** Observation microscopique de bactéries, à l'état frais, contenues dans le yaourt : *Streptococcus thermophilus* (flèche en pointillés) et *Lactobacillus bulgaricus* (flèche pleine)(Righi, 2006).

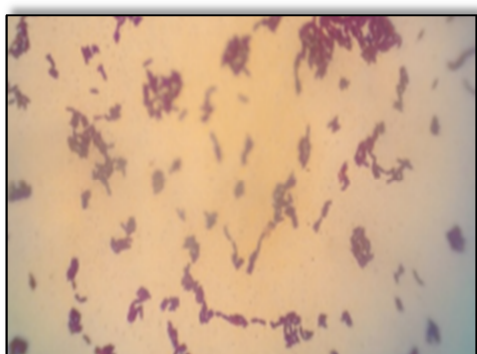
### I. 3. Résultats de la coloration du Gram :



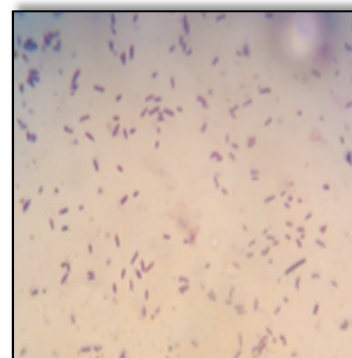
**Figure27.** Aspect microscopique des souches bifidobactéries avec (G x1000)



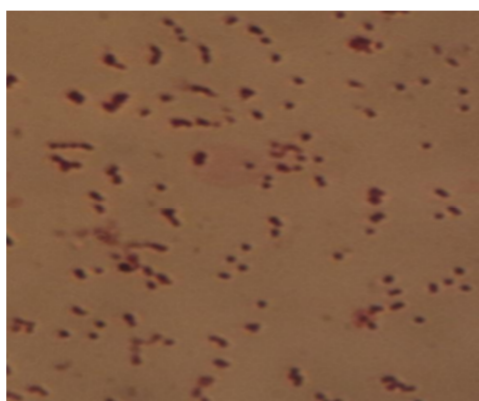
**Figure28.** Observation microscopique des souches de de bifidobactéries avec (G x100)



**Figure29.** Aspect microscopique des Lactobacilles avec (G x1000)



**Figure30.** Observation microscopique des Lactobacilles avec (G x100)



**Figure31.** Observation microscopique de *Streptococcus thermophilus* avec (G x100)

## II- étude comparative :

### II.1. Calcul des moyennes :

Les moyennes des résultats de dénombrements sur les milieux de cultures MRS, M17 et PCA des différents échantillons de produits probiotiques sont montrées dans les tableaux 10,11 et 12:

**a. Milieu PCA :**

Les résultats de dénombrement sur milieu PCA et les moyennes obtenues sont représenté dans le tableau10.

**Tableau 10.** Moyennes et les ESM obtenues des échantillons dénombrés sur milieu PCA.

échantillons	moyennes	ESM
Pro-x AR	45833,3333	12528,41215
Pro-x NA	23666,6667	3431,87671
Pro-x L	30000,0000	0,00000
Pro-y AR	45500,0000	10563,30125
Pro-y L	27666,6667	3527,66841
Pro-z AR	25833,3333	2713,13677

AR : aromatisé

NA : nature

L : liquide

**b. Milieu MRS :**

Les résultats de dénombrement sur milieu MRS et les moyennes obtenues sont représenté dans le tableau11.

**Tableau 11.** Moyennes et les ESM obtenues des échantillons dénombrés sur milieu MRS.

échantillons	moyennes	EMS
Pro-x AR	1000000000	0,000
Pro-x NA	75000000,00	16278820,60
Pro-x L	250000000,0	150000000,
Pro-y AR	250000000,0	150000000,0
Pro-y L	27666,6667	3527,66841
Pro-z AR	123333333,3	56725459,70

AR : aromatisé

NA : nature

L : liquide

**c. Milieu M17:**

Les résultats de dénombrement sur milieu M17 et les moyennes obtenues sont représenté dans le tableau12.

**Tableau12.** Moyennes et les ESM obtenues des échantillons dénombrés sur milieu M17.

échantillons	moyennes	EMS
Pro-x AR	850000000,0	150000000,0
Pro-x NA	555000000,0	200229035,5
Pro-x L	100000000,0	0,000
Pro-y AR	85000000,00	15000000,0
Pro-y L	83500000,00	16500000,0
Pro-z AR	550000000,0	201246118,0

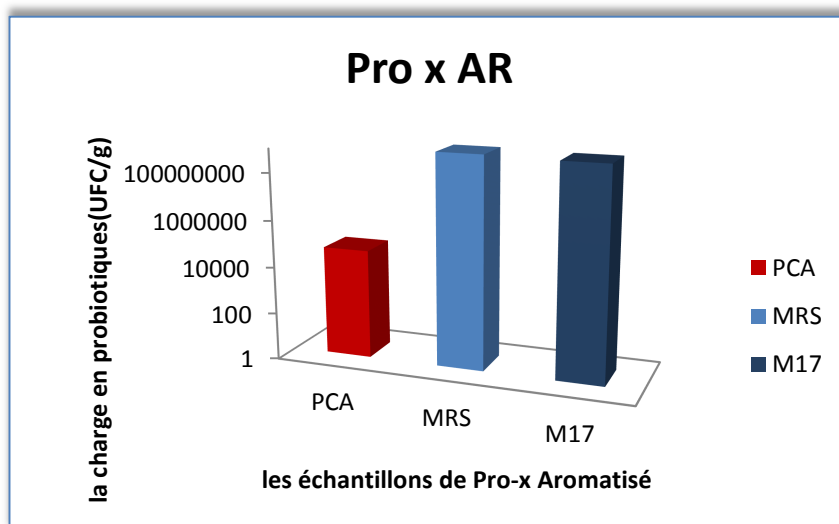
AR : aromatisé

NA : nature

L : liquide

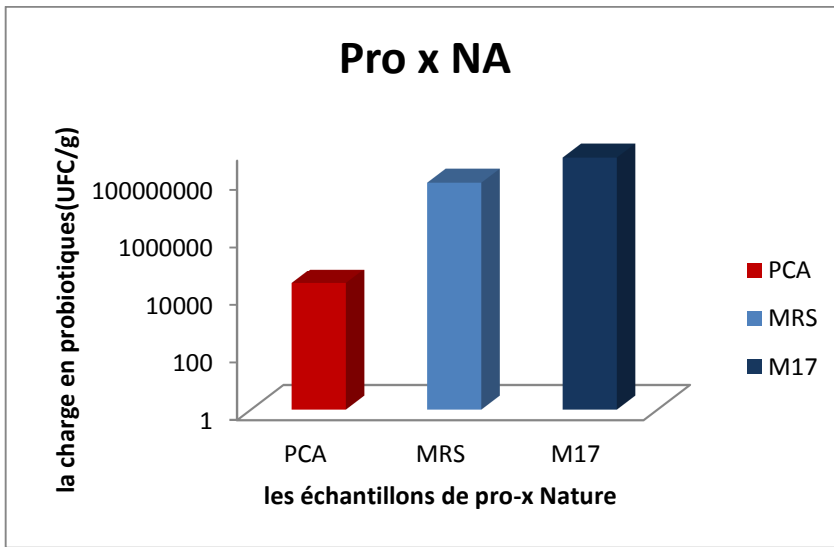
**II.2. Comparaison de la charge probiotique sur les trois milieux de culture :**

Les représentations graphiques de la comparaison des moyennes des différents produits probiotiques sont montrées dans les histogrammes suivants :



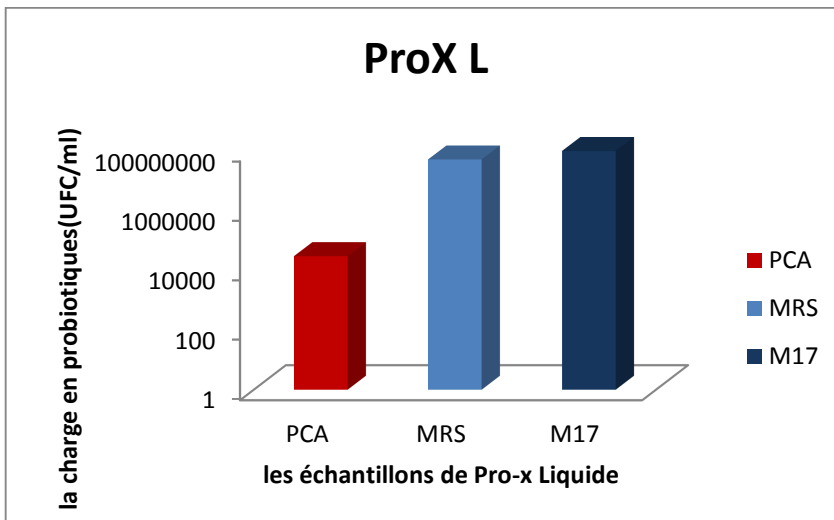
**Figure 32.** Comparaison de la charge bactérienne probiotique d'échantillon Pro-X Aromatisé sur les trois milieux de culture.

D'après les résultats obtenus de cet histogramme on remarque que le Pro-x Aromatisé contient une charge bactérienne des *Lactobacilles* et des *Bifidobactéries* plus élevé que les *Streptocoques*.



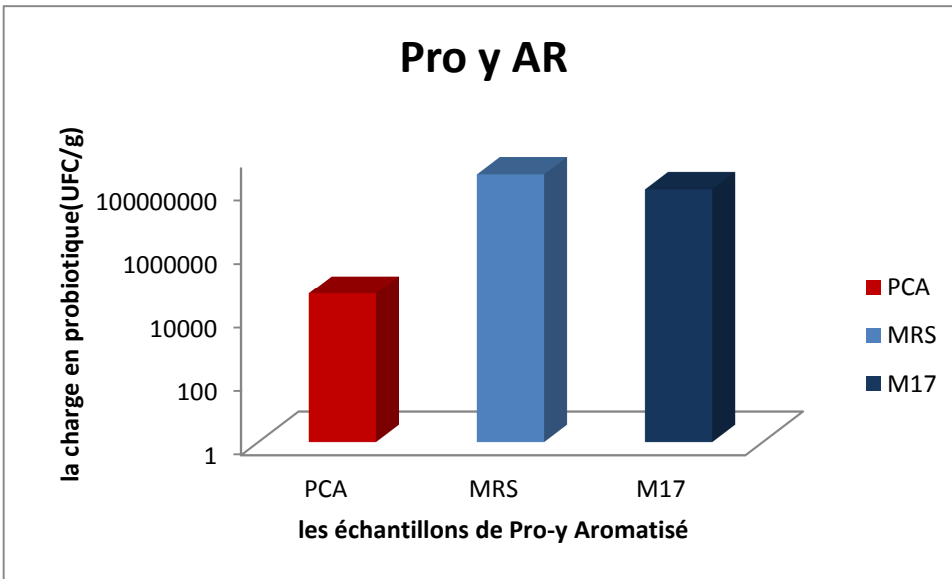
**Figure 33.** Comparaison de la charge bactérienne probiotique d'échantillon Pro-X Nature sur les trois milieux de culture.

D'après les résultats obtenus de cet histogramme on remarque que le Pro-x Nature contient une charge bactérienne de *Streptocoques* plus élevé que les *Lactobacilles* et des *Bifidobactéries*.



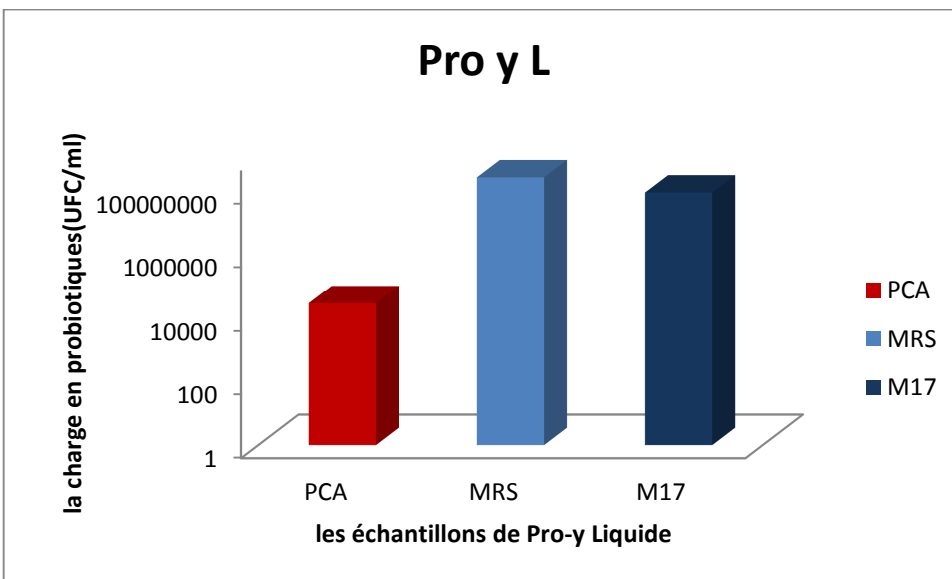
**Figure 34.** Comparaison de la charge bactérienne probiotique d'échantillon Pro-X Liquide sur les trois milieux de culture.

D'après les résultats obtenus de cet histogramme on remarque que le Pro-x Liquide contient une charge bactérienne de *Streptocoques* plus élevé que les *Lactobacilles* et des *Bifidobactéries*.



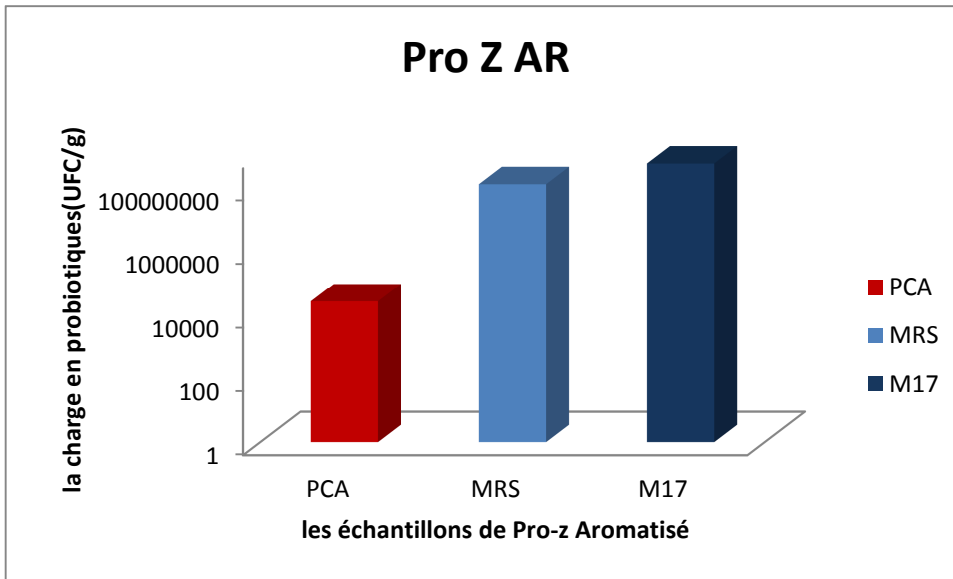
**Figure 35.** Comparaison de la charge bactérienne probiotique d'échantillon Pro-Y Aromatisé sur les trois milieux de culture.

D'après les résultats obtenus de cet histogramme on remarque que le Pro-Y Aromatisé contient une charge bactérienne des *Lactobacilles* et des *Bifidobactéries* plus élevée que les *Streptocoques*.



**Figure 36.** Comparaison de la charge bactérienne probiotique d'échantillon Pro-Y Liquide sur les trois milieux de culture.

D'après les résultats obtenus de cet histogramme on remarque que le Pro-Y Liquide contient une charge bactérienne des *Lactobacilles* et des *Bifidobactéries* plus élevée que les *Streptocoques*.



**Figure 37.** Comparaison de la charge bactérienne probiotique d'échantillon Pro-Z Aromatisé sur les trois milieux de culture.

D'après les résultats obtenus de cet histogramme on remarque que le Pro-Z contient une charge bactérienne des *Streptocoques* plus élevée que les *Lactobacilles* et des *Bifidobactéries*.

### II.3. Comparaison entre les différents types de produits probiotiques :

On a utilisée dans la comparaison entre deux produits probiotiques le test Student par le logiciel SPSS (version 20).

On a utilisé le Pro-x comme référence pour comparer les autres échantillons.

La comparaison se fait selon le « p » de test Student :

$p > 0.05$  l'écart est non significatif (NS)

$p < 0.05$  l'écart est significatif (S)

Les résultats obtenus de la comparaison des échantillons sur milieu PCA sont montrées dans le tableau suivant :

**Tableau 13.** Résultats de comparaison par le test de Student des yaourts probiotiques sur milieu PCA.

échantillons à comparés	t	ddl	p	résultats
ProxAR - ProxNA	1,599	5	0,171	NS
ProxAR - ProyAR	0,017	5	0,987	NS
ProxARpca - ProzAR	1,459	5	0,204	NS
ProxNA - ProyAR	-2,712	5	0,042	S
ProxNA - ProzAR	-0,608	5	0,570	NS
ProxL - ProyL	0,661	5	0,538	NS

Tous les résultats de comparaison de Pro-x avec les autres marques probiotiques sur milieu PCA, ont montré une différence non significative sauf pour la comparaison entre le produit Pro-X Nature et le Pro-Y Aromatisé qui ont montré une différence significative ( $p < 0.05$ ).

Les résultats obtenus de la comparaison des échantillons sur milieu MRS sont montrées dans le tableau suivant :

**Tableau 14.** Résultats de comparaison par le test de Student des yaourts probiotiques sur milieu MRS.

échantillons à comparés	t	ddl	p	résultats
ProxAR – ProxNA	56,822	5	0,000	NS
ProxAR - ProyAR	5,000	5	0,004	S
ProxAR - ProzAR	-2,712	5	0,042	NS
ProxNA - ProyAR	-1,200	5	0,284	NS
ProxNA - ProzAR	-,943	5	0,389	NS
ProxL - ProyL	-1,263	5	0,262	NS

Tous les résultats de comparaison de Pro-x avec les autre marques probiotiques sur milieu MRS, ont montré une différence non significative sauf pour la comparaison entre le produit Pro-X et le Pro-Y Aromatisé qui ont monté une différence significative de ( $p < 0.05$ ).

Les résultats obtenus de la comparaison des échantillons sur milieu M17 sont montrées dans le tableau suivant :

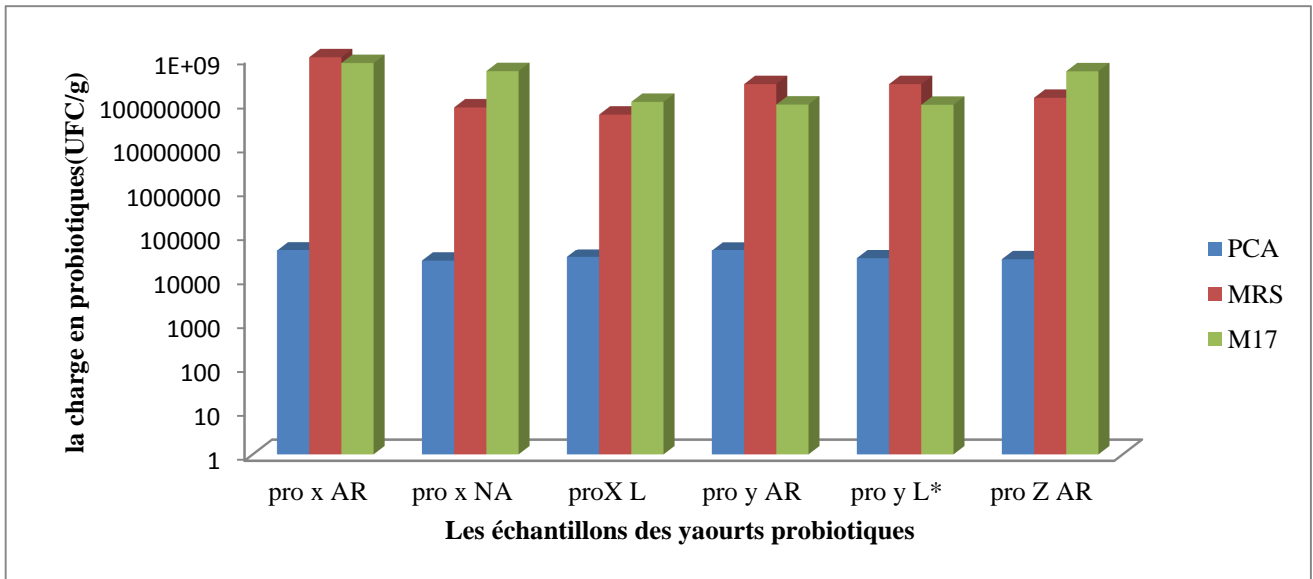
**Tableau 15.** Résultats de comparaison par le test de Student des yaourts probiotiques sur milieu M17.

échantillons à comparés	t	ddl	p	résultats
ProxAR – ProxNA	1,673	5	0,155	NS
ProxAR – ProyAR	4,977	5	0,004	S
ProxAR –ProzAR	1,000	5	0,363	NS
ProxNA -ProyAR	2,424	5	0,060	NS
ProxNA - ProzAR	021	5	0,984	NS
ProxL – ProyL	1,000	5	0,363	NS

Toute les résultats de comparaison de Pro-x avec les autre marques probiotiques sur milieu M17, ont montré une différence non significative sauf pour la comparaison entre le produit Pro-X et le Pro-Y Aromatisé qui ont monté une différence significative de ( $p < 0.05$ ).

#### II.4. Représentation graphique de la comparaison des yaourts Probiotiques :

Les résultats de la comparaison par le test Student obtenus dans les tableaux précédents sont représentées par l’histogramme suivant :



**Figure 38.** Histogramme comparatif des déférents produits probiotiques sur milieux de cultures.

D'après les résultats montrés dans la figure 38, on remarque que la charge de la flore aérobie totale est la même avec une valeur constante pour les trois marques de produit probiotique,

On distingue aussi que le Pro-X aromatisé contient la charge la plus élevée des *Lactobacillus* et les *bifidobacteries* que révèle le milieu MRS par rapport aux autres marques de produits probiotique, suivie par le produit probiotique Pro-Y par ses deux formes semi-solides et liquides, par contre le Pro-Z aromatisé et le Pro-X nature contiennent ils la plus faible concentration en flore lactique probiotique par rapport au produit Pro-X aromatisé.

En constat aussi que le Pro-X aromatisé à la flore lactique la plus grande en *Streptocoques* que l'on retrouve sur le milieu M17 par rapport aux autres marques probiotiques analysées et que les deux marques Pro-X nature et Pro-Z aromatisé utilisent la même concentration en *Streptococcus* dans leurs produits probiotiques.

Par contre les produits probiotiques liquides de la marque X et la marque Y contiennent une faible charge lactique en *Streptocoques*.

En pense que cette différence dans la charge bactérienne de la flore probiotique est due :

- au différent type de levains utilisés par les différentes firmes laitières,
- aussi aux différentes sources de laits utiliser dans la fabrication de ces yaourts,
- le non respect de la chaine froide lors du transport de ces yaourts est un facteur qui influence sur la viabilité des bactéries probiotiques, soit par diminution ou par augmentation de l'acidité du milieu.

### III. Evaluation de la charge bactérienne probiotique:

Les analyses bactériologiques réalisées sur les différents échantillons des produits probiotiques, ont révélé la présence des trois souches probiotiques avec une dominance de la souche cultivée sur milieu M17.

La recherche de la flore lactique totale concerne l'ensemble des bactéries lactiques et probiotique présentes dans le produit fini. A cet effet les isollements sont effectués sur des milieux plus au moins sélectifs pour faire une identification. Différentes techniques standardisées et normalisées à l'échelle internationale pour le contrôle ont été utilisées.

D'après les résultats obtenus sur le dénombrement de la flore lactiques probiotique sur milieu MRS on conclue que seul le produit **Pro-X** par ses deux formes liquide et solide respecte la charge bactérienne probiotiques nécessaire ; et que les résultats du produit **Pro-Z** sont presque similaire au produit **Pro-X** avec une charge élve en *Lactobacillus* et *Bifidobacteries* donc on peut déduire qu'ils utilisent la même souche pour l'ensemencement de leurs produits, par contre les résultats de l'ensemencement du produit **Pro-Y** et le facteur P que montre le test Student signifient qu'ils utilisent une autre souche avec une faible quantité bactérienne.

Les résultats de dénombrements sur milieu M17 sont proche et similaire indiquent que les trois types des firmes probiotiques utilisent la même souche ensemencée sur ce milieu qui est une *Streptococcus thermophilus* ».

## VI. Principaux constats :

Les réglementations gouvernementales diffèrent d'un pays à l'autre, toutefois le statut des probiotiques en tant que composante d'un aliment n'est pas établi actuellement à l'échelon international (FAO/OMS, 2001). La réglementation algérienne concernant les yaourts non probiotiques exige une concentration totale de bactéries lactiques d'au moins  $10^7$  UFC/g. En effet, selon l'arrêté interministériel du 16 *Joumada Ethania* 1419 correspondant au 7 octobre 1998 relatif aux spécifications techniques des yaourts et aux modalités de leur mise à la consommation : « Les bactéries lactiques thermophiles spécifiques doivent être ensemencées simultanément et se trouver vivantes dans le produit fini à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme rapportées à la partie lactée. »

Les résultats du dénombrement des flores lactiques des yaourts probiotiques analysés sont résumés dans le Tableau 11 et 12. Nous déduisons que les yaourts sont conformes à la réglementation algérienne.

Pour ce qui est des souches probiotiques, les lignes directrices diffèrent selon les pays. La FAO et l'OMS recommandent un minimum de  $10^6$  UFC de bactéries probiotiques viables par gramme (Versalovic et Wilson, 2008). Récemment, des concentrations dans la gamme de  $10^8$  -  $10^9$  UFC/g de produit, à la fin de sa durée de conservation, ont été recommandées pour compenser la perte de viabilité qui a lieu lors du passage dans le tract gastro-intestinal (Versalovic et Wilson, 2008).

## V. Limites de l'étude :

Notre étude à présentée une limitation lors de la réalisation dont on nous citons :

La non disponibilité de la galerie des sucres fermentaires CH50 pour faire l'identification du genre exacte des *Bifidobacterium* utilisé dans les produits analysés.

## Conclusion et perspectives.

Les produits laitiers ont toujours été perçus auprès des consommateurs comme des produits sains et constituent une partie importante du régime alimentaire. L'incorporation de bactéries probiotiques comme additifs alimentaires dans les différents produits laitiers a renforcé les propriétés acclamées pour la santé et donné lieu à une consommation de plus en plus importante de ces produits. L'efficacité des probiotiques dépend de leur viabilité qui doit être maintenue au cours du processus technologique, de stockage et de conservation. De plus, les souches probiotiques commercialisées doivent survivre dans l'environnement du tractus gastro-intestinal. La viabilité des probiotiques est par conséquent un facteur principal dans l'aptitude des souches commercialisées à fournir les effets désirés.

Nous avons énuméré les bactéries lactiques probiotiques livrées dans trois marques yaourts fabriqués en Algérie et commercialisés en tant que « probiotiques ». Puis nous avons comparé entre ces marques afin d'assurer que ces firmes laitières utilisent les souches fermentaires probiotiques selon les quantités requises et respectent la concentration réglementaire de  $10^8$  à  $10^9$  UFC /g de produit.

Généralement, les trois produits étudiés étaient conformes à la réglementation Européenne, à savoir une charge en probiotiques de  $10^8$  UFC/g pour les Streptococcus, les lactobacillus et bifidobactérium. Cependant, la forme liquide du produit X avait une charge inférieure à la norme ( $10^6$  UFC/g) pour les souches Lactobacillus et Bifidobacterium et cela après une comparaison des moyennes des échantillons analysés sur milieu MRS.

Nous avons également constaté que nos échantillons utilisent la souche Streptococcus thermophilus en concentration réglementaire de  $10^8$  UFC/g de produit pour les trois types pro-x aromatisé, pro-x nature et pro-z aromatisé ; par contre, le pro-y utilise la concentration de  $10^6$ UFC/g de cette souche.

Cependant, on a pu constater que le pro-x était le produit qui respecte la charge nécessaire en probiotiques, suivi par le pro-y par ses deux formes et en fin le produit pro-z aromatisé.

Au terme de la présente étude, on peut conclure que les yaourts probiotiques commercialisés sont de bonne qualité microbiologique et sont conformes aux normes nationales en matière de concentration des cellules viables pour ce qui est des Streptocoques et

Lactobacillus. Cependant, nous avons constaté qu'il existe des lacunes dans la réglementation par rapport aux aliments fonctionnels et à l'étiquetage des aliments contenant des additifs microbiologiques (probiotiques). En outre, la réglementation Algérienne ne fait pas de prévisions pour différentes catégories d'aliments comme c'est le cas dans d'autres pays.

Donc, nous recommandons que les autorités compétentes comblient ces lacunes en mettant en place une réglementation spécifique aux produits probiotiques. Aussi, des visites inopinées doivent être effectuées par des structures de contrôle qualité sur les lieux de production de ces yaourts pour vérifier la conformité du produit.

Il serait souhaitable d'approfondir la présente étude en élargissant la taille de l'échantillon, en utilisant la galerie CH50 pour une identification plus précise des souches probiotiques et en étudiant l'effet des arômes sur la croissance des ferments lactiques.

**Bibliographie :**

**ACIA., (2009).** Agence canadienne d'inspection des aliments. Chapitre 8, Allégations santé Sections 8.7 -8.16. Downloaded from [www.inspection.gc.ca](http://www.inspection.gc.ca).

**AFSSA., (2005).** Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte ; p22.

**AISA : Association pour les ingrédients santé en alimentation (2006).** Innocuité, Qualité et Efficacité des probiotiques ; p2.

**Ait-Belgnaoui A., (2006).** Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. INRA Toulouse, 5pp: 3-152.

**Al-Otaibi M.M., (2009).** Evaluation of some probiotic fermented milk from el ahsa markets, Saudi Arabia. *Amer. J. Food.Tech.*, **4(1)** pp: 1-8.

**Arvola T., Sutas Y., Moilanen E. and Salminen S., (2000).** Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy.*, **30** : 1604-1610.

**Allaert F.A., Pillon F., (2010).** Role des probiotiques, prébiotiques et produits de fermentation au niveau du microbiote intestinal. *Actualités pharmaceutiques* ; **501** : 43-44.

**Amrouche T., (2005).** Contribution à l'étude du pouvoir immuno-modulateur des bifidobactéries : Analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. Mémoire de doctorat, Université Laval de Québec ; p15.

**Anonyme (2014).** La levure dévoile son son potentiel en nutrition santé. *L'Actualité des Ingrédients Fonctionnels et Santé* ; **41** : 6-10.

**Arsenault J.B., (2011).** Effets des probiotiques *Lactobacillus helveticus* RO052 et *Bifidobacterium longum* RO175 sur la dépression post-infarctus du myocarde chez le rat. Thèse du doctorat. p48-50.

**Badel S., Bernardi T. and Michaud P., (2011).** New perspectives for *Lactobacilli* exo-polysaccharides. *Biotechnology Advances.*, **29**pp: 54–66.

**Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarnie D., Kihal M. and Ouzrout R., (2003).** Caractérisation phénotypiques des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales – Arabia et Kabyle-.*Sci et Tech.*, **23**pp: 30-37.

**Beasley S., (2004).** Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. *Academic Dissertation in microbiology* : 1-57.

**Ben yahia L., (2012).** L'Institut des sciences et Industries du vivant et du l'environnement (Agro Paris Tech). Thèse de doctorat. Ecole doctoral ABIES ; p06.

- Begley M., Gahan C.G. and Hill C., (2006).** The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol.Rev.*, **29**pp: 625-651.
- Betoret N., Puente L., Díaz M.J., Pagán M.J., García M.J., Gras M.L., Martínez-Monzó J. and Fito P., (2003).** Development of probiotic- enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering.*, **56**pp: 273-277.
- Biggerstaff J. P., Puil M. L., Weidow B.L., Prataer J., Glass K., Radosevich M. and White D.C., (2006).** New methodology for viability testing in environmental samples. *Molecular and Cellular probes.*, **20**pp: 141-146.
- Bjorksten B., (2004).** Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Seminars in Immune.*, **25**pp: 257-27.
- Blanova C., Galvicova A., Petrosava D., (2009).** Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea. *Bratisl lek Listy* ; **110(2)**:p 98-104.
- Boke H., Aslim B., Alp G., (2010).** The role of résistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria. *Arch. Biol. Sci., Belgrade* ; **62(2)** : 323-328.
- Bomba A., Nemcova R., Mudronova D. and Guba P., (2002).** The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends in Food Science and Technology.*, **13(4)** pp : 121-126.
- Boubchirl K., (2010).** Effets de l'enrichissement (avec des concentres de protéines laitières) et des paramètres technologiques sur la qualité du yaourt fabrique a la laiterie Soummam d'akbou. Université de Mouloud Mammere de tiziouzou ; p06.
- Bouchefra A., (2011).** Yaourts probiotiques Algériens et ferments commerciaux utilisés dans leur fabrication : contrôle de qualité et de l'étiquetage. Mémoire de Mémoire de Magistère. Université Mentouri de Constantine ; p10.
- Boudry G., Hamilton M.K., Wickramasinghe S., Pacheco A.R., Mills D.A., Raybould H.E., (2013).** Bien nourrir son probiotiques : le probiotique Bifidobacterium infantis consommé avec des oligo saccharides de lait de vache mais pas de l'inuline restaure l'homéostasie intestinale de souris obèse. *Nutrition clinique et métabolisme 27 / Cahiers de nutrition et de diététique* ; **48** : S57-S175.
- Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallir,J., and Desjardins R., (1999).** Bac Light TM: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological methods.***37**pp: 77-86.
- Bourrier T., (2006).** Intolérances et allergies aux colorants et additifs. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, **46**pp: 68–79.
- Brashears M. M., Jaron D. and Trimble J., (2003).** Isolation, selection and characterization of lacticacid Bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of Escherichia coli O157:H7in cattle. *J. Food Prot.*, **66**pp:355-363.

- Bruno E., (2012).** Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz. Thèse de doctorat. Ecole Doctorale Environnement – Santé. Université de Bourgogne – AgroSup Dijon : 10-18.
- Bukola C.A. and Abidun A. O., (2008).** Screening of lactic acid bacteria strains isolated from some Nigerian Fermented Foods for EPS production. *W. App.Sci. J.*, **4(5)** pp:741-747.
- Bunthof C.J., Bloemen K., Breeuwer P., Rombouts F.M. and Abee T., (2001).** Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**pp :2326–2335.
- Buttriss J., (2000).** Is Britain ready for FOSHU? *Nutrition Bulletin*, **25**pp: 159–161.
- Camille R., (2014).** Intérêts du microbiote intestinal et probiotiques. Thèse de doctorat. Université Toulouse III Paul Sabatier Faculté des sciences pharmaceutiques ; p40.
- Canani R.B., Cucchiara S., Cuomo R., Pace F., Papale F., (2011).** *Saccharomyces boulardii* : a summary of the evidence for gastroenterology clinical practice in adults and children. *European Review for Medical and pharmacological Sciences* ; **15**pp : 809-822.
- Charteris W. P., Kelly P. M., Morelli L., and Collins J. K., (1998).** Development and application of an in vivo methodology to determinethe transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, **84**pp:759–768.
- Chiquette J., (2010).** Le rôle des probiotiques en production laitière. CRAAO ; p2.
- Choubaila L., (2010).** Caractérisation et contrôle de qualité de ferments lactiques utilisés dans l'industrie laitière algérienne. Mémoire de Magistère. Université Mentouri de Constantine ; p07.
- Chougrani F., Cheriguene A. and Bensoltane A., (2008).** Use of lactic strains isolated from Algerian ewe's milk in the manufacture of a natural yogourt. *Afr. J. Biotech.*, **7(8)** pp: 1181-1186.
- Christophe L. and Yildirim S., (2007).** Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnolog.*, **18**pp: 176–183.
- Christiaens H., Leer R. J., Pouwels P. H., and Verstraete W., (1992).** Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**pp: 3792-3798.
- Codex alimentarius, (2008).** Proposed draft symbiotic for the Use of Health Claim. *Geneva WHO*.

**Corrieu G. et Luquet F.M., (2008).** Bactéries lactiques: de la génétique aux ferments. *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris: 269-306.

**Coudeyras S., Forestier C., (2010).** Microbiote et probiotiques : impact en santé humaine. *Can. J. Microbiol* ; **65**(8) pp : 611-650.

**Dacosta Y. et Aou T., (2000).** La bioprotection des aliments: l'antagonisme bactérien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique. *Ed. Yves Dacosta. Paris*: 3-21.

**Da Cruz A.G., Adriano Gomes C., Jose de Assis F. F. and Susana Marta I. S., (2010).** High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing. *Trends in Food Science and Technology* pp: 1-11.

**Danone., (2008).** Les probiotiques au cœur de la stratégie de recherche du Groupe DANONE. *Edité par la direction de la communication de Danone recherche* ; 1-12.

**Dave R.I. and Shah N. P., (1998).** Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt. *Journal of Dairy Science*, **81**pp: 2804–2816.

**De Carvalho K.J., Kruger M.F., Behrens J, Destro M.T., Landgraf M. and De Melo Franco B., (2009).** Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Food Science and Technology*, **42**pp: 491–495.

**Delarras C., (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire. *Ed, Lavoisier, Paris* : 320-321.

**Delorme C., (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, **126**pp: 274–277.

**De Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C. and Schrezenmeir J., (2001).** Probiotics – Compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, **73**pp: 421-429.

**Dial E. J. and Lichtenberger L.M., (2002).** Effect of laetolerrin on *Helicobacter felidis* induced gastritis. *Biochem Cell Biol.*, **80**(1) pp: 113-117.

**Dib H., Hajj Semaan E., Mrad R., Ayoub J., Choueiry L., Moussa H., Bitar G., (2012).** Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. *Lebanese Science Journal* ; **1**(13) pp :45.

**Djellid Y., (2015).** Etude comparative des propriétés technologiques et probiotiques des souches de bifidobactéries indigènes et celles utilisées en industries laitière. Mémoire de Magister, université Ahmed Ben Bela-Oran ; p12-20.

**Dong X., Cheng G. and Jian W., (2000).** Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species Isolated from human beings using multiple PCR primers. *Syst. App. Micr.* Université de Laval., **23** pp: 386-390.

**Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. and Shah N.P., (2006).** Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, **16** pp: 1181–1189.

**FAO/ OMS, (2001).** World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: 34.

**FAO/WHO, (2002).** Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.

**Fijan S., (2014).** Microorganismes with Claimed Probiotic properties : An Overview of recent Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health* ; **11**pp : 4745-4767.

**Fitzpatrick K.C., (2005).** Probiotique, Rapport présenté à la Direction des produits de santé naturels. *Santé Canada* : 19-20.

**Fooks L. J. et Gibson G. R., (2002).** Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, **88** pp: 39-49.

**Fuller R., (1989).** Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**pp: 365-78.

**Ganon M., (2007).** Rôle des probiotiques lors d'infection entérique d'origine bactérienne et virale : Analyses in vitro chez des modèles murins. Thèse de doctorat (PH.D). Sciences et technologie des aliments. Université laval. Québec : 1-155.

**Gastro Net Australia, (2001).** Your digestive system, downloaded from [http://www.gastro.net.au/frame\\_digestive.html](http://www.gastro.net.au/frame_digestive.html).

**Georgieva R., Danova S., Iliev I., Haertle T., Chobert J.M. and Ivanova S., (2009).** Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Int. Dairy J.*, **19**.pp: 696–702.

**Gill H.S., (2003).** Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastro-intestine. *Best Pract. Res. Clin. Gastro-enterol.*, **17** pp:755-773.

**Giraffa G., (2009).** Natural dairy starters: microbiological aspects and importance in the field. Sci Topics. Consulté le 25 novembre 2011 sur: [http://www.scitopics.com/Natural\\_dairy\\_starters\\_microbiological\\_aspects\\_and\\_importance\\_in\\_the\\_field.html](http://www.scitopics.com/Natural_dairy_starters_microbiological_aspects_and_importance_in_the_field.html)

**Goginil V.K., Morrow M.A., (2013).** Probiotics: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *J prob Health* ; **1** :1.

**Goktepe I., Juneja V. K. and Ahmedna M., (2006).** Probiotics in food safety and human health. Boca Raton, FL: Taylor and Francis group: 494.

**Gomez-Gil B., Roque A., Turnbull J.F., (2000).** The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* ; **191**pp : 259-270.

**Gopal A., Shah N. P. and Roginski H., (1996).** Bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Milchwissenschaft.*, **51**pp: 619-623.

**Guarner F., Khan A., Garisch J., Eliakim R. and Gangl A., (2008).** Recommandation Pratique: Probiotique et prébiotiques. Organisation mondiale de Gastroentérologie: 3-17.

**Gueimonde M., Sanchez B., (2012).** Enhancing probiotic stability in industrial. *Microbial ecology in Health & Disease* ; **23**pp : 18562.

**Guiraud J.P., (1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris: 387-433.

**Guiraud J.P. et Rosec J. P., (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire, Dunod, Paris: 238-245.

**Gupta V., Garg R., (2009).** Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology* ; **27(3)** :202-9.

**Hadef S., (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire Magister, Université Kasdi Merbah-Ouargla ; p16.

**Hadadji M., Benaama R., Saidi N., Henni D.E. and kihal M. (2005).** identification of cultivable *Bifidobacterium* species isolated from breast-fed infants feces in west- Algeria. *African journal of biotechnology* vol. **4(5)**: 422-430.

**Harzellah D., Belhadj H., (2013).** Lactic Acid Bacteria as probiotics : characteristics, selection Criteria and role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. *R&D for food. Health and livestock purposes* : 197-216.

**Hao W. L. and Lee Y. K., (2004).** Microflora of the gastrointestinal tract: a review. Met in Mol Biol. Thèse doctorat. Université de Laval. Québec, **268**pp: 491-502.

**Heatley R. V. and Sobala G. M., (1993).** Acid suppression and gastric flora. *Baillere's Clin. Gastroenterol.*, **7**pp: 167-181.

**Heller K. J., (2001).** Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, **73**pp: 374-379.

**Holzappel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. and Huis-Veld H. J., (2001).** Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. of Food Micr.*, **41**pp: 85-101.

**Hossain Md. E, Ko S. Y., Lee S.S., Yang C.J., (2012).** Selection of probiotic strains and development of green tea based probiotics for livestock. *African Journal of Microbiology Research* ; **6(49)** pp : 7494-7503.

**Huet F., Lachambre E., BeckL., Van Egroo L.D., Sznajder M., (2006).** Evaluation d'une préparation pour nourrissons à teneur réduite en protéines et enrichie en probiotiques, en relais de l'allaitement maternel. *Archives de pédiatrie* ; **13** : 1309-1315.

- Hungin A.P., Mulligan C., Pot B., Whorwell P., Agreus L., Fracasso P., Lionis C., Mendive J., Philippart de Foy J M., Rubin G., Winchester C., (2013).** Systematic review : probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice –an evidence-based. *International guide. Aliment Pharmacol* ; **38(8)** : 864-86.
- Isabelle H., (2009).** Les probiotiques, Faut-il s’y abonner ? La nutrition au cœur de la médecine préventive. *Le Médecin du Québec* ; **3(44)**.
- Isolauri E., Kirjavainen P. V. and Salminen S., (2002).** Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut. Université de Laval, Québec*, **50**pp: 54-59.
- Iyer R. and Tomar T., (2010).** Streptococcus thermophilus strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **20** pp: 133.
- Iyer R., Tomar S.K. and Kapila S., (2010).** Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Research International*, **43** pp: 103–110.
- Izquierdo E., 2009.** Les protéines bactériennes tant que bio marqueurs de l’activité probiotique. Thèse de Doctorat, Université de Strasbourg: 8-141.
- Jankovic T., Frece J., Abram M., Gobin I., (2012).** Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of sanitary engineering Research* ; **1(6)** : 19-24.
- Jayamanne V. S. and Adams M. R., (2006).** Determination of survival identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bioyoghurts. *Letters in Applied Microbiology*, **42(3)** pp: 189-194.
- Jungersen M., Wind A., Johansen E., Christensen J.E., Stuer-Lauridsen B., Eskesen D., (2014).** The science behind the probiotic Strain *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB - 12. *Microorganisms* ; **2** : 92-110.
- Kacem M. and Kaid-Harche M., (2008).** Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria. *Grasas Y Aceitis*, **59(3)** pp: 218-224.
- Kanam T., Taku M., Harun-ur-Rachid M. D. and Minoru U., (2007).** Probiotic Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Milk–Dahi- in Bangladesh. *Pakistan J. Nutr.*, **6(6)** pp: 647-652.
- Klaenhammer T., Altermann E., Arigoni F., Bolotin A. and Breidt F., (2002).** Discovering lactic acid bacteria by genomics, Antonie Van Leeuwenhoek, *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, **82**pp: 29–58.
- Kos B., Us’kovic’ J.S., Beganovic’ J., Frece J., Gjurac’ic K., Iannaccone C., Changanella F., (2008).** Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. *World Microbial Biotechnol* ; **24** :699-707.

- Kotikalapudi B.L., (2009).** Characterization and encapsulation of probiotic bacteria using a pea-protein alginate matrix. Thèse de Doctorat, University of Saskatchewan: 2-91.
- Kourkoutas Y., Xolias V., Kallis M., Bezirtzoglou E. and Kanellaki M., (2005).** *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additives, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry*, **40**pp: 411-416.
- Lahtinen S.J., Gueimande M., Ouwehand A. C., Reinikainen J. P. and Salminen S.J., (2006).** Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiology*, **23**pp: 571-577.
- Lankaputhra W.E.V. and Shah N.P., (1996).** A simple method for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Milchwissenschaft*, **51**pp: 446-451.
- Larpent J.P (1997).** Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire. Ed, techniques et documentation ; paris : 383p.
- Le Medcin du Québec (2009).** Les probiotiques, Faut-il s'y abonner ?. Formation contenue ; **44**(3) : 57-62.
- Leahy S.C., Higgins D.G., Fitzgerald G.F. and Van Sinderen D., (2005).** Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, **98**pp: 1303-1315.
- Leclere H., Meyer A., Deiana J., (1994).** Cours de microbiologie générale, nouveau programme. Ed, éditeurs (nouvelle édition) ; paris : 73p.
- Liong M. T.and Shah N. P., (2005).** Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties. *Food Research International.*, **38**pp: 135-142.
- Lourens-Hattingh A. and Viljoen B.C., (2001).** Yoghurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, **11**pp: 1-17.
- Losada M.A. and Olleros T., (2002).** Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. *Nutrition Research*, **22**pp: 71-84.
- Luquet F.M., Corrieu G., (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. Ed *TEC et DOC*, paris.272p.
- Macouzet M. et Champagne C.P., (2007).** Les bactéries probiotiques: innovations et tendances de développement technologique. Bioveille, pp:4-16.
- Marcel B.R., Coxam V. and Delzenne N., (2008).** Aliments fonctionnels. Tec. Doc.2 ed *Lavoisier*: 23-1015.
- Margoles A. and Garcia L., (2003).** Characterisation of a bifidobacterium strain with acquired resistance to cholate: A preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, **80**pp : 191-198.

**Marion L.S., (2012).** Intérêt de probiotiques en parodontologie. Thèse de doctorat. Université de nanter, unité de formation et de recherche d'odontologie ; **009**.45p.

**Marteau P. et Seksik P., (2005).** Probiotiques et alicaments in Bactéries lactiques et probiotiques. De Luquet F.M. et Corrieu G. *Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris*: 256-260.

**Martin M.D.C.R., Walker M.D.A., (2008).** Probiotics : Role in pathophysiology and prevention in necrotizing enterocolitis. NEC. *Semin perinatol, Published by Elsevier Inc* ; **32** :127-137.

**Matilla-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R. and Saarela M., (2002).** Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, **12**pp:173-182.

**Menrad K., (2003).** Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, **56**pp: 181-188.

**Michaylova M., Minkova S., Kimura K Sasaki T., Isawa K., (2007).** Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria. *FEMS Microbiology Letters* ; **269** : 160-169.

**Mitsuoka, T. et Kaneuchi. (1977).** Ecology of the bifidobacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1799-1810.

**Moreau M.C., (2001).** Les probiotiques : des microorganismes bénéfiques pour notre système immunitaire ?. *Le bulletin de liaison des banques de données NUTRIPID et CERINUT* ; **63** : 1-6.

**Morelli L., (2000).** In vitro selection of probiotic Lactobacilli : A critical Appraisal. *Curr. Issues Intest. Microbiol* ; **1(2)** : 59-67.

**Mosilhey S.H., (2003).** Influence of Different Capsule Materials on the Physiological Properties of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. *Doktor-Ingenieur. Institut für Leben smittel technologie*: 3-113.

**Mourad K., Nour-Eddine K., (2006).** In vitro preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olive origin. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* ; **1(1)** : 27-32.

**Nagpal R., Yadav H., Puniya A. K., Singh K., Jain S. and Marotta F., (2007).** Potential of probiotic and prebiotics for symbiotic functional dairy foods: an overview. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, **2**pp: 75-84.

**Nawaz M., Wang J., Zhou A., Ma C., Wu X., Xu J., (2011).** Screening and characterization of new potentially probiotic Lactobacilli from breast-fed healthy babies in Pakistan. *African Journal of Microbiology Research* ; **5(12)** : 1428-1436.

**Née A., Chibane H., (2007).** Aptitude technologiques de quelques variétés communes de dattes : formulation d'un yaourt naturellement sucré et aromatisé. Thèse de doctorat. Université m'hamed bougrara de Boumerdes ; 26-38.

**Nge W., Yeung M. and Tong B.S., (2010).** Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. *Int.J. Food.Microbiol*: 2-7.

**Ninane V.,Mukandayambaje R. et Berben G., (2009).** Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir: le point sur la situation règlementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13(3)** pp: 459-466.

**Oliviera M.N. and Damin M.R., (2003).** Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. *Ciência e Tecnologia d'Alimentos*, **23**pp: 172–176.

**Olson D.W and Aryana K.J., (2008).** An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. *Food Science and Technology*, **41**pp:911-918.

**Oudina S., Mouatas A. et Idoui T., (1997).** Isolement, purification et identification des souches de bactéries lactiques à partir du beurre traditionnel de brebis et de vache de la région de Skikda. *INFSA*: 1-8.

**Ouwehand A.C. and Vesterlund S., (2003).** Health aspects of probiotics and drugs. Thèse doctorat. Université Laval. Québec., **6**pp: 573-580.

**Parvez S., Malik K. A., Ahkang S. and Kim H.-Y., (2006).** Probiotic and their fermented foodproducts are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, pp: 1171–1185.

**Pereira D. I. A. and Gibson G. R., (2002).** Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **37**pp: 259-281.

**Petsuriyawong B., Khunajar N., (2011).** Screening of probiotic Lactic Acid Bacteria from piglet Feces. *Kasetsart J. (Nat.Sci.)* ; **45** : 245-253.

**Pilet et al, (2005).** Bactéries lactiques. *2ème Ed. Economica, paris* : 219-260.

**Prescott L.M., Harley D.A., (2003).** Microbiologie *2ème Edition de Boeck Université, Bruxelles* : 549p.

**Puri M.S., Grover H.S., Dewan A., (2011).** Use of probiotics for oral Health. *J Oral Health comm dent* ; **5(3)** :149-152.

**Quévrain E., Seksik P., (2013).** Microbiote intestinal : de la diarrhée post-antibiotique aux maladies inflammatoires intestinales. *Presse Med* ; **42** : 45-51.

**Qureshi A.A., Omar S., Bhajipale N.S., (2010).** Probiotics in diarrhea : myths and fact. *Int J Pharmacy and Pharm Sci* ; **3(2)** : 23-28.

**Rao A.V., (2002).** Prébiotiques et Probiotiques : nouvelles théories en matière de nutrition et de santé. *Institut de nutrition pour bébé Heinz. Documentation ; 2(19) : 1-4.*

**Rastall R.A., (2004).** Bacteria in the gut: Friends and foes and how to alter the balance. *J.of Nutr. Québec.134pp: 2022-2026.*

**Rautava S., Kirjavainen P. and Salminen S., (2002).** Rôle of probiotics in food hypersensitivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2pp:263-271.*

**Rautava S., (2007).** Potentiel uses of Probiotics in the neonate. *Seminars in Fetal et Neonatal Medicine. 12 : 45-53.*

**Renard A.C., (2000).** Les ingrédients santé à la conquête de l'Europe. *Rev. Lait. Fr., pp:16-21.*

**Règlement (CE) n°1924/2006 du Parlement européen et du Conseil, du 20 décembre 2006 :**concernant les allégations nutritionnelles et de santé portants sur les denrées alimentaires. *Journal officiel de l'Union Européenne. L. 404/9 du 30 décembre 2006.*

**Sanchez B., Reyes -Gavilan C. G., Margolles A. and Gueimonde M., (2009).** Probiotic fermented milks: present and future. *International Journal of Dairy Technology, 62(4) pp: 472-483.*

**Sander M., (2001).** Lactic acid bacteria and human health. *Dairy and Food Cul.Tec.USA, 73pp: 361-364.*

**Sanders M., (2008).** Use of probiotics and yogurts in maintenance of health. *Journal of Clinical Gastroenterology, 42(2) pp: 71-74.*

**Sanz Y., (2007).** Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of Bifidobacterium: a way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal, 17(11) pp: 1284-1289.*

**Savadogo A., Traore A.S., (2011).** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles du yaourt et laits fermentés. *International journal of biological and chimical science ; 5(5) : 2057-2075.*

**Scardovi V., (1986).** Ganus bifidobacterium in bergy's manual of systematic bacteriology. *Ed. Sneath. P.H.A, Mair .N.S. sharp. M.E et Holt .J.G ; 2: 1418-1434.*

**Shah N.P., (2000).** Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science ,83pp: 894–907.*

**Shah N.P., (2007).** Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal., 17(11) pp: 60-65.*

**Sillanpaa J., (2001).** Tissue-adherence in lactic acid bacteria: Identification and characterization of the collagen-binding S-Layer protein of *Lactobacillus crispatus*.

Academic Dissertation in General Microbiology. Faculty of Science of the University of Helsinki. Finland.

**Shinde P.B., (2012).** Probiotic : an overview for selection and evaluation. *International Journal of pharmacy and pharmaceutical Sciences* ; **4(2)**: 14-21.

**Sultana K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R., Peiris P. and Kailasapathy K., (2000).** Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated Gastrointestinal conditions and in yoghurt. *In ternational Journal of Food Microbiology*, **62**pp: 47-55.

**Surawicz C.M., (2010).** The microbiota and infectious diarrhea. *Gastroentérologie clinique et biologique* ; **1(34)** : S29-S36.

**Surta L., Federighi M. et Jouve J-L., (1998).** *Listeria monocytogenes*: Manuel de bactériologie alimentaire. *Polytechnica Paris*: 133-159.

**Sveje M., (2007).** Probiotic and prebiotics improving consumer health through food consumption. *Nutracos*, sept/oct: 28-31.

**Takahashi N., Xiao J.Z., Miyaji K., Yaeshiima T., Hiramatsu A., Iwatsuki K., Kokubo S. and Hosono A., (2004).** Selection of acid tolerant bifidobacteria and evidence of a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Research*, **71**pp:340–345.

**Talwalkar A. and Kailasapathy K., (2003).** Metabolic and biochemical responses of probiotics bacteria in oxygen. *Journal of Dairy Science*, **86**pp: 2537–2546.

**Talwalkar A. and Kailasapathy K., (2004).** The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Current Issues in Intestinal Microbiology*, **5**pp: 1–8.

**Tamime A., (2005).** Probiotic Dairy Products. *Dairy Science and Technology Consultant. Blackwell publishing*: 56-62.

**Tannock G.W., (2002).** Probiotics and prebiotics: where are we going? In: Tannock G.W., ed. *Probiotics and prebiotics: where are we going?* Norfolk, U.K. *Caister Academic Press*: 1-40.

**Thirabunyanon M., Boonprasom P. and Niamsup P., (2009).** Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol.Lett.*, **31**pp: 571–576.

**To T.M. H., (2010).** Moddification de la copmposition liquide membranaire chez les bactéries lactiques en conditions de stress : Etude du role physiologique des Acides Gras cycliques chez deux modèles : *Oenococcus oeni* ATCC-BAA1163 et *Lactococcus lactis* MG1363. thèse Dr. Université de bourgogne : 117p.

**Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolauri E., Salminen S., (2001).** Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* ; **73** :393S-8S.

**Vanderplas Y., Huys G., Daude G., (2015).** Probiotics : an update. *J pediatr (Rio J)* ; **91**: 6-21.

**Vilella S.B., (2008).** Aliment fonctionnels et allégations alimentaire dans l'Union Européenne: une approche juridique in: aliments fonctionnels.Tec. Doc Lavoisier: 23.

**Vinderola C.G., Costa G.A. and Regenhardt S., (2002).** Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *Int.Dairy J.*, **12pp**: 579–589.

**Virta M., Lineri S., Kankaanpää P., Karp M., Peltonen K., Nuutila J. and Lilius E.M. (1998).** Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** pp: 515–519.

**Wang M. F., Lin H. C., Wang Y. Y. and Hsu C. H., (2004).** Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Paed. Aller. Immun.*, **15pp**: 152-158.

**World Gastroenterology Organisation (WGO), (2008).** Practice guideline. Probiotics and Prebiotics. [www.biokar-diagnostics.fr](http://www.biokar-diagnostics.fr) .

**World Gastroenterology Organisation (WGO), (2011).** Probiotics and Prebiotics ; p23.

**Zanell G., Meurens F., Berri M., Salmon H., (2009).** *Saccharomyces boulardii* effects on gastro intestinal diseases. *Curr. Issue Mol. Biol* ; **11** : 47-58.

**Zhang M., Hang X., Fan D., Li H. and Yang X., (2008).** Characterization and selection of *Lactobacillus* strains for their effect on bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24pp**:7-14.

**Zhiri., (2011).** <http://mangersain.medicalistes.org/>.

**Zubillaga M., Weill R., Postaire E., Goldman C., Caro R. and Boccio J. B., (2001).** Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutr. Res.*, **21pp**: 569-579.

## Annexes

## ANNEXE 1

## ❖ Composition des bouillons et des géloses

Les milieux de cultures utilisés lors de la présente étude sont :

**MRS (gélose) :**

- Peptone.....10g
- Extrait de viande.....8g
- Extrait de levure.....4g
- Acétate de sodium.....5g
- Phosphate bipotassique.....2g
- Citrate d'ammonium.....2g
- Sulfate de magnésium, 7H<sub>2</sub>O.....2g
- Sulfate de manganèse, 4H<sub>2</sub>O.....0.05g
- Glucose.....20g
- Tween 80.....1ml
- Agar (dans le cas de la gélose).....15g
- Cystéine.....0.1g
- Eau distillée.....1000ml

pH : 6,2 et 5,4

Autoclaver 15 min à 120 °C

**M17 (gélose) :**

- Tryptone.....2,5g
- Peptone pepsique de viande .....2,5 g
- Peptone papaïnique de soja .....5 g
- Extrait autolytique de levure.....2,5 g
- Extrait de viande .....5 g
- Lactose .....5 g
- Glycérophosphate de sodium .....19 g
- Sulfate de magnésium .....0,25 g
- Acide ascorbique .....0,5g
- Agar agar bactériologique (dans le cas de la gélose).....15g
- Eau distillée.....1000ml

pH : 7,1

Autoclaver 15 min à 120 °C



## ANNEXE 2

### ❖ Colorants et réactifs

#### Catalase :

- Eau oxygénée.....10V

#### Fushine :

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

#### Lugol :

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

#### Violet de gentiane :

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

## ANNEXE 3

### ❖ Appareillages:

–Bain Marie (Mammert) : pour liquéfier les milieux de culture.

–Balance de précision (Scout Pro) : pour peser des ingrédients de milieux de culture.

–Etuves (Mammert) (30 et 37°C) : Pour l'incubation des boîtesensemencées.

– L'Autoclave automatique (NUVE) : Pour stérilisation (par la chaleur humide : T° (120C/15min) des équipements en verrerie ainsi que des milieux de culture.

–Microscope-photonique binoculaire (ZEISS, Axio star) : observation des bactéries aux différents grossissements

–Plaque chauffantes agitatrices (VELP scientific) : Faire agiter les milieux de culture durant leur préparation jusqu'à l'ébullition.

– Réfrigérateur (CONDOR) : Pour la conservation des milieux de culture.

-Vortex : pour homogénéiser la solution

**Equipements :**

Anse de platine, bec Benzène, boîtes de pétri, pipettes pasteur stérile, papier aluminium, portoirs, seringues, spatules de laboratoire, pipettes pasteur.

**Verreries :**

Béchers à différents volumes, burette, erlenmeyers, flacons en verre (250ml), lames et lamelles en verre, tubes à essai, Pipettes Pasteur.

## ANNEXE 4

### ❖ **Fiches techniques des espèces de bactéries analysées**

*Lactobacillus acidophilus*

❖ **Taxonomie :**

**Règne :** Bacteria

**Division :** Firmicutes

**Classe :** Bacill

**Ordre :** Lactobacillales

**Famille :** Lactobacillaceae

**Genre :** Lactobacillus

**Espèce :** *Lactobacillus acidophilus*

❖ **Caractéristiques microbiologiques :**

*Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) est un bacille à Gram positif avec des extrémités arrondies, groupé par paires ou en courtes chaînes. La taille typique est 0,6 à 0,9 um de longueur.

Il est non flagellé, non mobile et non sporulé, et est intolérant au sel et microaérophiles. La plupart des souches de *L. acidophilus* peuvent fermenter le cellobiose, le fructose, le galactose, le glucose, le lactose, le maltose, le mannose, la salicine, le saccharose, le tréhalose et esculine. *L. acidophilus* utilise le saccharose plus efficacement que le lactose, de telles observations peuvent être attribuées à des différences dans l'activité de la  $\beta$ -galactosidase et  $\beta$ -fructofuranosidase. La croissance de *L. acidophilus* peut se produire à une température aussi élevée que 45 °C, mais a une croissance optimale de 35-40 °C. La tolérance acide varie de 0,3% à 1,9% d'acidité titrable, avec un pH optimal de 5,5 à 6,0 (Mosilhey *et al.*, 2003).

❖ **Effet technologiques et probiotiques dans le yaourt :**

*Lactobacillus acidophilus* est souvent ajouté au yaourt en raison de ses effets probiotiques. Les effets bénéfiques éventuels de la consommation de yaourt contenant *L. acidophilus* incluent : l'amélioration de la digestion du lactose chez les personnes qui ont cette difficulté, l'abaissement de niveau de cholestérol, prévenir certains types de cancer, la stimulation du système immunitaire, le contrôle des infections urogénitales chez les femmes, et la prévention ou le contrôle des infections intestinales (Olson et Aryana, 2008).

*Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus*

❖ **Taxonomie :**

**Règne :** Bacteria

**Division :** Firmicutes

**Classe :** Bacill

**Ordre :** Lactobacillales

**Famille :** Lactobacillaceae

**Genre :** Lactobacillus  
**Espèce :** *Lactobacillus delbrueckii*  
**Sous-espèce :** *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*

### ❖ **Caractéristiques microbiologiques**

*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* est un bacille à Gram positif, généralement immobile, asporulé, anaérobie (mais aérotolérant). Ces bactéries obtiennent leur énergie du métabolisme fermentatif, mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène grâce à leur activité peroxydase capable d'inactiver le peroxyde d'hydrogène. Elles ont également la capacité de survivre à des pH bas (Ait-Belgnaoui, 2006).

### ❖ **Effet technologiques et probiotiques dans le yaourt :**

*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* contribue au développement rapide de l'acidité, la saveur et la texture des yaourts. Des études ont clairement démontré que les yaourts contenant des bactéries viables de *L. bulgaricus* améliorent la digestion du lactose et éliminent les symptômes d'intolérance au lactose. Ainsi, ces cultures correspondent clairement au concept actuel de probiotiques. En outre, de nombreuses études ont rapporté des effets thérapeutiques contre des maladies comme le cancer, les troubles intestinaux, des propriétés immunomodulatrices et immunostimulantes (Guglielmotti *et al.*, 2007).

## *Streptococcus thermophilus*

### ❖ **Taxonomie :**

**Règne :** Bacteria  
**Division :** Firmicutes  
**Classe :** Coccus  
**Ordre :** Lactobacillales  
**Famille :** Streptococcaceae  
**Genre :** Streptococcus  
**Espèce :** *Streptococcus thermophilus*

### ❖ **Caractéristiques microbiologiques**

*Streptococcus thermophilus* est identifiée comme anaérobie, aérotolérante, à catalase négatif et à Gram positif, groupée en chaînes linéaires de cellules ovoïdes et incapables de croître à 10 °C, à pH 9,6 ou 6,5% de NaCl, hydrolyse l'arginine et l'esculine, fermente le cellobiose, l'inuline, le maltose, le mannitol, le raffinose et N-acétylglucosamine, capacité à croître à 45 °C (Delorme, 2008).

### ❖ **Effet technologiques et probiotiques dans le yaourt**

*Streptococcus thermophilus* possède des aptitudes texturantes et aromatisantes (acétaldéhyde) arôme majeur du yaourt. Bien que *Streptococcus thermophilus* soit d'origine non humaine, elle est connue pour résister aux conditions acides de l'estomac, une capacité modérée à adhérer à l'intestin et pour survivre le transit gastro-intestinal. Par conséquent, *S. thermophilus* pourrait être considérée comme un transitoire probiotique. En outre, elle améliore la microflore intestinale et la digestion de lactose pour les individus intolérants au lactose, stimule le système immunitaire de l'intestin, produit des quantités élevées d'acide folique extra cellulièrement. Des effets d'atténuation des risques de certains cancers, l'ulcère et l'inflammation, capacité de déconjugaison des sels biliaires et résistance à la barrière gastrointestinales (suc gastrique et des sels biliaires) sont également des propriétés qui ont été observées chez *S. thermophilus* (Iyer *et al.*, 2010).

ANNEXE 5

❖ Photos des colonies isolées sur géloses MRS et M17 :

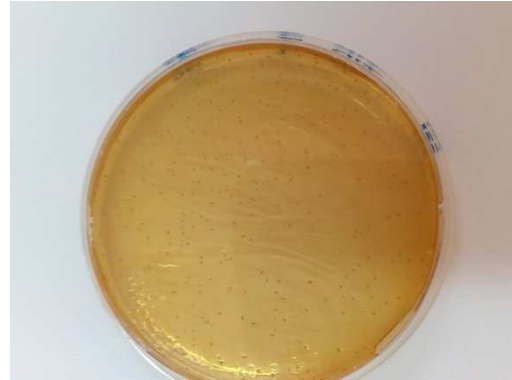
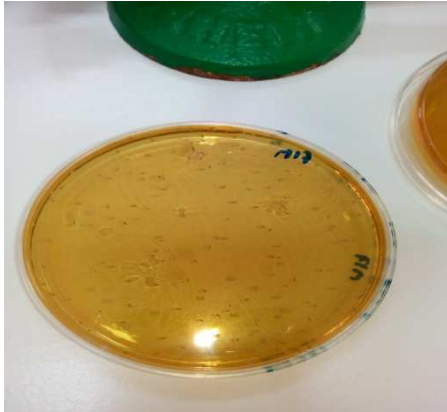


Figure 39. *Streptococcus thermophilus*

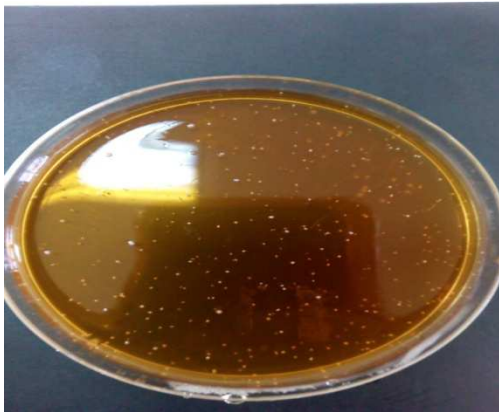


Figure40. *Lactobacillus acidophilus*

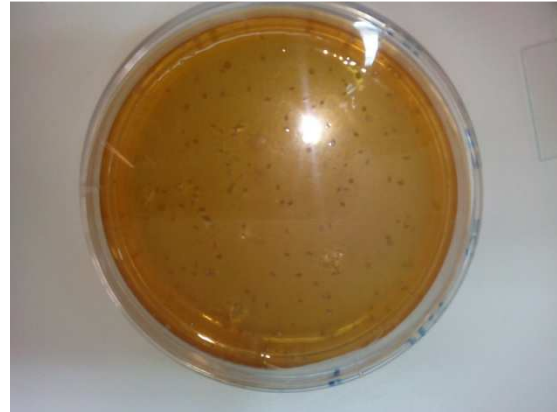


Figure 41. *Bifidobacterium longum*



Figure42. Trouble sur bouillon MRS

عنوان المذكرة: مراقبة جودة الزبادي البروبيوتيك المنتج على مستوى الجزائر.

الموظف: السيد شتاتحة محمد

الاسم : مريم

اللقب: جلود

### ملخص:

خلال 5 أشهر من الدراسة، تمت دراسة و تحليل ومقارنة ما مجموعه 40 عينة من 3 علامات تجارية وطنية من المنتجات البروبيوتيك المسوقة في مدينة الأغواط. اعتمدنا النصوص التي وصفها الجريدة الرسمية الجزائرية لتعداد الجراثيم الكلية والبكتيريا المعززة البروبيوتيك والاختبارات الإحصائية لمقارنة 3 علامات من منتجات البروبيوتيك. تظهر مقارنة النتائج في الوسط MRS و M17 ونتائج مقارنة اختبار Test Student أن المنتج Pro-X يحتوي على أعلى تركيز من البكتيريا البروبيوتيك الضرورية مقارنة بالعلامات التجارية الأخرى ، يليه المنتج Pro-Z و أخيرا المنتج Pro-Y بشكليه السائل والشبه صلب. يفسر عدم احترام تركيز الكمي للبروبيوتيك للعلامة التجارية الثالثة الموالية ل Pro- Y لاحتمال عدم احترام سلسلة التبريد خلال تسويق المنتج أو عدم توافر الخمائر اللبنية وسلالة البروبيوتيك في صناعة المنتج. الكلمات المفتاحية: المنتجات البروبيوتيك ، الخمائر اللبنية ، MRS ، M17 ، PCA.

---

**Memory title: quality control of different yoghurt probiotic products in Algeria.**

**Name: DJELLOUD**

**First Name: Meriem**

**Directed by: Mr. CHETATHA Mohamed**

### Abstract:

During 5 months of study, a total of 40 samples of 3 national brands of probiotic products marketed in the city of Laghouat, were the subject of bacteriological analysis and comparative study in this memory.

We used culture media described by the Algerian official journal for the enumeration of total germs, lactic flora and probiotic bacteria; and statistical tests to compare 3 brands of probiotic products.

The MRS and M17 count results and the student test comparison results show that the Pro-X product contains the highest concentration of probiotics compared to the other brands, then the Pro-Z product then the Pro-Y product. Finally the Pro-Y by its two forms.

The non-respect of the probiotic load concentration of yogurt of the third brand pro-Y is explained by the cold chain breakage and / or the unavailability of lactic ferments and the probiotic strain.

**Key words:** probiotic products, lactic flora, MRS, M17, PCA.

---

**Titre du mémoire : contrôle de qualité des différents yaourts probiotiques produits en Algérie.**

**Nom : DJELLOUD**

**Prénom : Meriem**

**Encadreur : Mr. CHETATHA Mohamed**

### Résumé:

Durant 5 mois d'étude, un totale de 40 échantillons de 3 marques nationales de produits probiotiques commercialisé dans la ville de Laghouat, ont fait l'objet d'analyses bactériologiques et de l'étude comparative dans ce mémoire.

Nous avons utilisé des milieux de cultures décrits par le journal officiel Algérien pour le dénombrement des germes totaux, la flore lactique et les bactéries probiotiques ; et des tests statistiques pour comparer entre 3 marques de produits probiotiques.

Les résultats de dénombrement sur milieu MRS et M17 et les résultats de comparaison par le test student montrent que le produit Pro-X contient la concentration la plus élevé de probiotiques par rapport aux autres marques, puis le produit Pro-Z ensuite le produit Pro-Y par ses deux formes.

Le non respect de la concentration en charge probiotique de la troisième marque pro-Y serait expliquée par la rupture de chaine froid et/ou la non disponibilité des ferments lactiques et la souche probiotique pour la fabrication de ces produits.

**Mot clés :** produits probiotiques, flore lactique, MRS, M17, PCA.