

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOuat

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine S.N.V: Science De La Nature Et De La Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliqué

THEME

**Contribution à l'étude du comportement de
souches probiotiques vis à vis des conditions du
tube digestif**

Présenté par :

DJEKAL NOUR EL HOUDA/ KHELIFI DJIHAD

Devant le jury :

Président : Gacem Mohamed Amine

(MCB.univ.Laghouat)

Rapporteur : Zerrouki Mohamed Hocine

(MAA.univ.Laghouat)

Examineur : kamel krantar

(MAA.univ.Laghouat)

Année Universitaire 2021/2022

*R*emerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier notre dieu tout puissant ALLAH qui nous a donné la santé, le courage et la patience pour mener à bien ce modeste travail.

Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans l'aide d'Allah qui nous donne la force afin de l'accomplir.

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à notre promoteur M zerrouki mohamed hocine. d'avoir proposé et dirigé ce travail, de nous donner ses conseils judicieux et son attention qu'elle a apporté pour la réalisation de ce mémoire.

Nos remerciements aux honorables membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci aux responsables de laboratoires du Département de Biologie et aux ingénieurs des laboratoires

Enfin à tout ce qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail.

Dédicace

La louange appartient à Allah qui ordonne la bienfaisance et l'entraide dans la piété, que son salut et sa bénédiction soit sur le dernier des prophètes.

Je dédie ce modeste travail à :

A celle qui inséré le gout du vié et le sens de la responsabilité.....merci mère.

A celui qui a été toujours la source d'inscription et de courage.....merci père.

A mes frères et mes soeurs (Nasro, Toufik, Fatima , Asmaa).

A Mon binôme Djihad

A toute ma famille de prés et de loin. A mes amies (Dalal, khadidja, Anfal, Fatima, Nasira, nariman, Malika, Aicha).

Nour el houda

Dédicace

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour A mes chers parents ma mère et mon père pour leur patience, leur amour ,leur soutien et leur encouragements A mes frères Abd el basset et ben aissa A mes sœurs Ikram sarah arzak A toute ma familles Et a toutes mes amiez et surtout: sarah ,hadjer amina, khaldia, iman

Sans oublier mon binôme nour el houda pour son soutien moral,sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail.

DJIHAD

Résumé :

Le titre : Contribution à l'étude du comportement de souches probiotiques vis à vis des conditions du tube digestif

Pour être des probiotiques, les microorganismes doivent avoir une certaine tolérance des condition dans tractus gastro-intestinal. Ce travail consiste a étudier *in vitro* le pouvoir de survie des souches lactiques isolées du alicament aux condition du tube digestif ,et ceci en recherchant les souches ayant une tolérance du pH gastrique (pH = 2), de différentes concentrations des sels biliaries, en absence de l'oxygène et enfin la sensibilité aux antibiotiques Parmi 11 souches, seulement 9 sont survécu dans un milieu acide (pH2). tout Ces 9 souches ont montré une tolérance aux différentes concentrations des sels biliaries (0,2 %; 0,4%; 0,6 %; 0,8%) ainsi qu'en anaérobiose. La plupart des souches testées ont présenté une résistance à la majorités des antibiotiques

Mots clés : *probiotiques, bactérie lactiques , tube digestif.*

Abstract :

Title :contribution to the study of the behavior of probiotic strains with respect to the conditions of the digestive tract

For probiotics, microorganisms must have some tolerance of conditions in the gastrointestinal tract. This work consists in studying *in vitro* the power of survival of lactic acid strains isolated from yoghurt to the conditions of the digestive tract, and this by looking for the strains having a tolerance of the gastric pH (pH = 2), of different concentrations of the bile salts, in the absence of oxygen and finally sensitivity to antibiotics Among 11 strains, only 9 are served in an acid medium (pH2). all These 11 strains showed

tolerance to different concentrations of bile salts (0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%) and anaerobiosis.

Most strains tested showed resistance to the majority of antibiotics

Key words: *probiotics, lactic acid bacteria, digestive tract,.*

ملخص:

المساهمة في دراسة سلوك سلالات الكائنات الحية حسب شروط الانبوب الهضمي .

البروبيوتيك كائنات حية دقيقة لها القدرة على العيش في وسط الجهاز الهضمي .

يتألف هذا العمل من دراسة قدرة البقاء على قيد الحياة لسلالات حمض اللاكتيك في ظروف الجهاز الهضمي، وذلك من خلال البحث عن السلالات التي تتحمل درجة الحموضة المعدية (pH=2)، من تركيزات مختلفة من الأملاح الصفراوية، في غياب الأوكسجين وأخيرًا الحساسية للمضادات الحيوية.

بين 11 سلالة، نجا 9 فقط في الوسط الحمضي (pH2)، كل هذه السلالات 09 أظهرت التحمل لتركيزات مختلفة من الأملاح الصفراوية (0,2% -0,4% -0,6% -0,8%) و هي في الوسط اللاهوائي . كما أظهرت معظم السلالات التي تم اختبارها مقاومة لأغلبية المضادات الحيوية.

الكلمات الرئيسية: البروبيوتيك، وبكتيريا حمض اللاكتيك، والجهاز الهضمي، وأملاح الصفراء

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
I . Les probiotiques	03
I.1. Historique et définitions	03
I.2 les critères de sélection et d'utilisation des probiotiques	03
I.2.1 Critères fonctionnels :	03
I.2.2 Critères de sécurité :	04
I.2.3 Critères technologiques :	04
I.3 Les effets bénéfiques des probiotiques	05
I.4 Les ferments probiotiques	08
I.5. Les micro-organismes probiotiques	09
I.5.1. Levures	09
I.5.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	09
I.5.1.2. <i>Saccharomyces boulardii</i>	11
I.5.2. Les moisissures	11
I.5.3. Bactéries lactiques	11
I.6. Les mécanismes d'action des probiotiques	12
I.7 Prébiotiques	13
I.8 Symbiotiques	13
II. Les bactéries lactiques :	
II.1. Définition	14
II.2 Propriétés générales :	14
II.3. Origine des bactéries lactiques :	15
II.4. Intérêt des bactéries lactiques	16
II.5. Niche écologique	16
II.6. Classification des bactéries lactiques	
II.6.1. Classification classique :	18
II.6.2 Classification moderne :	18
II.7. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	
II.7.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	21
II.7.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	21
II.7.3. Le genre <i>Streptococcus</i>	22
II.7.4. Le genre <i>Enterococcus</i>	22
II.7.5. Les genres <i>Leuconostoc</i>, <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	22
II.7.6. Les genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	23
II.7.7. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	23
III.8. <i>Bifidobacterium. spp</i> et <i>Lactobacillus. Spp</i>	24
III. Généralités du système digestif	
III .1. Structure du système digestif	25
III.1.1. L'intestin grêle	26

III.1.2.Le côlon	27
III.2.Colonisation du tube digestif	28
III .3. Le microbiote	29
IV. Matériel et méthodes	
IV.1 Objectif	32
IV.2 Lieu d'étude	32
IV.3 Origine des souches	32
IV.4 Choix des milieux de culture	32
IV.5 Purification des souches	32
IV.6 Confirmation de l'appartenance des souches au groupe lactique	32
IV.6.1 Coloration de Gram	32
IV.6.2 Test Catalase	33
IV.7 Testes de croissance des souches en fonction de différentes conditions	33
IV.7.1 Test de pH	33
IV.7.2 Test d'anaérobiose	33
IV.7.3 Test des sels biliaire	34
IV.7.3.3 Essais avec la bile fraiche de boeuf à différent concentrations	34
IV.7.3.4 Teste d'antibiogramme	35
V. résultats et discussions	
V.1 Résultats de purification et confirmation des souches	36
V.2 Observation microscopique	36
V.3 Résultats du test de pH	37
V.4 Test d'anaérobiose	38
V.5 Résultats du test des sels biliaire	38
V.6 résultats du test d'antibiogramme	39
Conclusion	41
Références bibliographique	

Listes des tableaux

Tableau 1: Effets bénéfiques sur la santé humaine de quelques souches probiotiques commerciales.	07
Tableau 2: Principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique.	11
Tableau 3 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques.	20
Tableau 4 : Classification des bactéries appartenant au genre <i>Lactobacillus</i> .	21
Tableau 5: le code et la dose de chaque antibiotique utilisé.	35
Tableau 6 : caractéristique des colonies après purification	36
Tableau 7 : l'observation microscopique de quelques souches.	37
Tableau 8 : résultats des comportement des souches lactiques vis-à-vis du pH	38
Tableau 9 : la tolérance des souches aux différentes concentrations des sels biliaires.	38
Tableau 10 : Les résultats d'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques .	40

Listes des figures

Figure 1 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.	08
Figure 2 : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sous microscopie électronique .	09
Figure 3 : <i>Bifidobacterium longum</i> .	24
Figure 4 : Structure du système digestif .	25
Figure 5 : Structure de l'intestin grêle .	26
Figure 6 : La muqueuse intestinale .	27
Figure 7 : Microbiote intestinal et répartition le long du tractus digestif .	28
Figure 8 : Répartition des <i>phylums</i> majoritaires qui composent le microbiote intestinal .	30
Figure 9 : L'aspect macroscopique des bactéries lactiques sur milieu MRS solide et liquide après purification.	36
Figure 10 : Observation microscopique des souches lactiques avec grossissement $\times 100$.	37
Figure 11 : La croissance des souches qui ont résisté à pH 2	37
Figure 12 : résultat de l'antibiogramme	39

Liste des abréviations

AAF : aérobie anaérobie facultatif

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine triphosphate

ADH : Arginine Di hydrolase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique

FAO : Food and Agriculture Organization

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

Ig : immunoglobuline

LB : lymphocyte B

Lb. : Lactobacillus

Lc. : Lactococcus

Ln. : Leuconostoc

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

TD : tractus digestif

UFC : Unité Formant Colonie

UI : Unité Internationale



INRODUCTION :

INTRODUCTION :

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, peuvent exercer de nombreux bénéfices pour la santé de l'hôte. L'intérêt et le champ des recherches dans ce domaine ont considérablement progressé ces dernières années. Les effets bénéfiques des probiotiques ont notamment été démontrés dans le traitement de l'intolérance au lactose (**Coombes et al., 2007**).

Les bactéries lactiques représentent un groupe diversifié de bactéries dont le produit majeur de fermentation est l'acide lactique. Ces dernières années, l'activité probiotique de certaines bactéries lactiques a été soulignée notamment sur modèle *Lactococcus lactis* (**Bermudez-Humaran., 2002**).

La grande majorité des bactéries probiotiques appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* et *Streptococcus*. Actuellement les produits probiotiques sont utilisés ou reconnus efficaces pour de nombreuses. Leurs applications seront davantage détaillées dans un paragraphe dédié. Les probiotiques offrent résistance aux phages, production de bactériocines et production de déxtranes) dans de nombreux aliments fermentés (**De Roissart, 1986 ; Diviès et al. 1994**).

L'hypothèse que certains microorganismes sont capables de diminuer le lactose dans l'intestin et d'améliorer les propriétés nutritionnelles, diététiques et thérapeutiques est maintenant sujette de plusieurs recherches (**Dilmi Bouras et al., 2007**), notamment Les bactéries lactiques qui provoquent sa transformation chimique en le dégradant en acide lactique grâce à l'enzyme même (**Clinquart, 2005**).

L'étude de la survie des probiotiques isolé a partir des alicaments dans le tractus gastro-intestinal est importante pour une meilleure connaissance du devenir des bactéries lactiques ingérées avec l'aliment et une meilleure compréhension de l'action des probiotiques chez l'homme et l'animal. Il est probable que pour exercer un effet probiotique significatif, les bactéries doivent arriver vivantes et en nombre suffisant dans l'intestin (**Drouault et Corthier, 2001**). Ainsi ces ferments doivent pouvoir passer sans dommage irréversible la barrière acide de l'estomac, puis l'effet inhibiteur éventuel des sels biliaries (**Dilmi Bouras et Sadoun, 2002**) . La présente étude est consacrée à:

Introduction

Sélectionner des souches de bactéries lactiques mésophiles locales dont les espèces sont *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris* et *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* ayant une grande capacité de dégradation de lactose ; Etudier la survie de ces souches en cultures pures et mixtes dans les conditions extrêmes du tube digestif (acidité gastrique et sels biliaires) *in vitro*, pour pouvoir à la fin sélectionner un lait fermenté dont les bactéries restent viables dans le tube digestif et peuvent être utilisés comme alicament destiné aux intolérants au lactose. Et comment on peut préserver cette flore durant la durée de traitement ou il aura un traitement par les antibiotiques d'une part et l'interaction entre alicament et d'autres produits fermentés qui contiennent des autres probiotiques comme les produits laitiers par exemple .



CHAPITRE I :
Les probiotiques

Synthèse bibliographique

I . Les probiotiques

I.1. Historique et définitions

Le concept de « probiotiques » revient à un chercheur russe **Elie Metchnikoff**, qui avait constaté que les paysans bulgares qui consommaient une large quantité de lait fermenté avaient théoriquement une longévité plus grande (**Sanders, 2000**). Suite à cette observation, il a essayé de modifier la microflore du côlon par l'ingestion d'un lait à base d'un bacille nommé *bulgarian Bacillus* (**Fooks et al., 1999**)

Le terme probiotique dérive du mot Grec « pro bios » qui signifie « pour la vie » (**Kovi et al., 2001**). Ce terme a été introduit en 1965 par **Lilly et Stillwell** pour décrire des substances synthétisées par des microorganismes pour stimuler le développement d'autres microorganismes. Depuis ce temps, la définition du terme probiotique a été modifiée à plusieurs reprises.

Selon **Parker (1974)** probiotique désigne les substances et les microorganismes qui contribuent au maintien de l'équilibre de la microflore intestinale. **Fuller en (1991)** a redéfini les probiotiques comme étant : « des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale ».

Récemment, la définition des probiotiques adoptée est « des microorganismes vivants (bactéries et levures) administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfiques pour la santé de l'hôte ». Cette définition globalisante a été critiquée car pour étudier les effets probiotiques pour quantifier ces effets l'analyse séparée des différents germes et leur influence sur des mécanismes cliniques précis s'imposent (**Die Fassung, 2002**).

I.2 Quels sont les critères de sélection et d'utilisation des probiotiques ?

Au-delà du choix de la souche s'ajoute trois catégories de critères de sélection des probiotiques conduisant à une aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé. Il s'agit de **critères fonctionnels, de critères de sécurité et de critères technologiques**.

I.2.1 Critères fonctionnels :

Tolérance au stress durant le transit gastro-intestinal c'est-à-dire à la sécrétion d'acide lors du passage dans l'estomac, à la basicité de la bile au niveau du duodénum (les sels biliaires sont

Synthèse bibliographique

bactéricides) et à l'ensemble des enzymes du tractus digestif (**Ait Abdelslam A, 2008 et Tripathi MK and Giri SK ,2014**).

- adhésion aux cellules épithéliales pour assurer une colonisation de la muqueuse .
digestive (sucre du mucus = apport énergétique pour les bactéries) (**Ait Abdelslam A, 2008**)
- persistance dans le tractus intestinal (l'efficacité est fonction du temps de résidence) (**Ait Abdelslam A, 2008**).
- immunomodulation (**Ait Abdelslam A, 2008**).
- cicatrisation des muqueuses (**Ducluzeau R , 2002**).
- élimination des pathogènes : production de substances bactéricides ou bactériostatiques, stimulation du système immunitaire, compétition pour les nutriments avec les germes (**Ducluzeau R , 2002**) .

I.2.2 Critères de sécurité :

- Taxonomie précise selon le Code International de Nomenclature (nom du genre, nom de l'espèce, identification de la souche) (**Ducluzeau R , 2002**).
- la souche sélectionnée doit être évaluée dans des études in vivo chez l'animal puis chez l'homme (**Carmona B, 2016**).
- l'efficacité est démontrée dans des études contrôlées sur l'humain (**Burgain J ,et al 2011**).
- l'innocuité totale (non toxique, exempt de pathogénicité) pour l'homme : absence d'infestions systémiques, de stimulation excessive, d'activités métaboliques délétères (**Ait Abdelslam A, 2008**) .
- l'absence de transfert de gènes entre les probiotiques et les bactéries du microbiote (**Burgain J ;et al 2011 et Ait Abdelslam A, 2008**).

I.2.3 Critères technologiques :

- Stabilité lors des procédés de fabrication (**Ait Abdelslam A, 2008**) .
- stabilité des produits finis lors du stockage : non modification des propriétés organoleptiques du produit fini (**Ducluzeau R , 2002**).
- maintien de la viabilité et donc de la fonctionnalité des étapes de production à l'ingestion (**Burgain J ;et al, 2011**).
- conditionné à un dosage approprié jusqu'à sa date de péremption (avec une variabilité minimale d'un lot à l'autre) (**Burgain J ;et al, 2011**).
- production à l'échelle industrielle (**Carmona B, 2016**).

Les critères fonctionnels et de sécurité sont les conséquences directes des critères technologiques. Aujourd'hui des études pharmacocinétiques doivent être mises en place afin de déterminer le devenir des probiotiques au sein du tube digestif car leur efficacité est directement

Synthèse bibliographique

liée à leur capacité à persister au sein de cet environnement. La galénique est un facteur primordial pour moduler cette persistance.

I.3 Les effets bénéfiques des probiotiques

Chez l'homme plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques (**Tableau.1**) (**figure 1**) (**Mercenier et al., 2002**). Eneffet *Lactobacillus rhamnosus GG* et *Saccharomyces boulardii* administrés à de forte dose, dans le traitement de la diarrhée aiguë en association avec l'administration d'une solution de réhydratation orale se sont révélés efficaces (**Vanderhoof et Young, 1998**).

Dans les deux cas les enfants traités se sont avérés présenter plus rapidement moins de selles et ont eu une évolution plus brève, surtout lorsqu'il s'agissait de diarrhées virales. De même *Lactobacillus GG* et *Saccharomyces boulardii* se sont avérés efficaces pour diminuer l'incidence de la diarrhée des voyageurs dans des groupes contrôlés.

Des études récentes ont démontré l'utilisation des probiotiques peuvent contrecarrées les infections gastrointestinales causées par *Helicobacter pylori*, la diarrhée associée aux antibiotiques et liée au développement de *Clostridium difficile*, diarrhée due aux rotavirus (**Gionchetti et al., 2000 ; Guslandi et al., 2000 ; Rosenfeldt et al., 2002 ; Turchet et al., 2003 ; Wang et al., 2004**).

D'autres effets bénéfiques ont pu être attribués aux probiotiques. Ainsi certaines études laissent à penser que les probiotiques peuvent avoir un effet positif vis-à-vis de l'allergie alimentaire ou encore de l'hypercholestérolémie ou dans la prévention du cancer (**Vanderhoof et Young, 1998**) ainsi que dans la prévention des infections respiratoires (**Hatakka et al, 2001**) et des maladies allergiques (**Pelto et al., 1998, Kalliomaki et al., 2001**). Mais, ces études sont beaucoup trop limitées et parcellaires pour pouvoir actuellement fournir des arguments suffisants à l'utilisation des probiotiques dans ce cadre.

D'autres études ont rapportés la possibilité d'utiliser les bifidobactéries comme indicateur de contamination d'origine fécale à la place d'*E.coli*. Elles sont surtout considérées comme indicateurs de contamination fécale dans les eaux traités au chlore. En effet elles deviennent sensibles à l'acide nalidixique quand elles sont soumises à un traitement au chlore (**Sartory, 1980**).

Synthèse bibliographique

Les bifidobactéries sont présents en nombre important qu'*E. coli* dans les matières fécales. De plus, les espèces dominantes de bifidobactéries sont différentes selon l'hôte colonisé. En effet, *Bifidobacterium boum* ou *Bifidobacterium pseudolongum* se retrouvent essentiellement dans les matières fécales des ruminants tandis que *Bifidobacterium longum*, *adolescentis* et *dentium* se retrouvent dans le tractus digestif de l'homme. Cette caractéristique permettrait de déterminer, en plus du niveau de contamination, l'origine de la contamination (**Delcenserie et al., 2002**).

Synthèse bibliographique

Tableau 1: Effets bénéfiques sur la santé humaine de quelques souches probiotiques commerciales (Marteau *et al.*, 2001 Gionchetti *et al.*, 2000).

Souches	Producteur	Produits	Effets observés chez l'humain
<i>Lactobacillus johnsonii La1 (Lj1)</i>	Nestlé (Suisse)	Yaourts à boire Yaourts	Inhibition du développement de <i>Helicobacter pylori</i> Stimulation de l'activité phagocytaire
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Yakult (Japon)	Yaourts à boire Laits fermentés	Augmentation de l'activité des cellulesNK Diminution des diarrhées à rotavirus
<i>Lactobacillus plantarum 299v</i>	ProViva (Suède)	Jus de fruits	Prévention des maladies cardiovasculaires
<i>Lactobacillus casei DN- 114 001</i>	Danone (France)	Yaourts à boire	Stimulation de la production d'IgA Diminution de l'incidence des diarrhées
<i>Bifidobacterium lactis Bb12</i>	Chr. Hansen (ÉtatsUnis)	Formules infantiles	Stimulation de la production d'IgA Diminution de l'eczéma atopique . Stimulation de l'activité phagocytaire. Stimulation de la croissance des bébés. Modulation de la composition de la flore. Prévention des diarrhées à rotavirus.
(mélange de 7 souches) <i>L. casei</i> ; <i>L. plantarum</i> ; <i>L.acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> ; <i>B. longum</i> ; <i>B.breve</i> <i>B. infantis</i> ; <i>S. thermophilus</i>	CSL (Italie)	Capsules	Prévention de la pouchite. Prévention des rechutes de pouchite.

Synthèse bibliographique

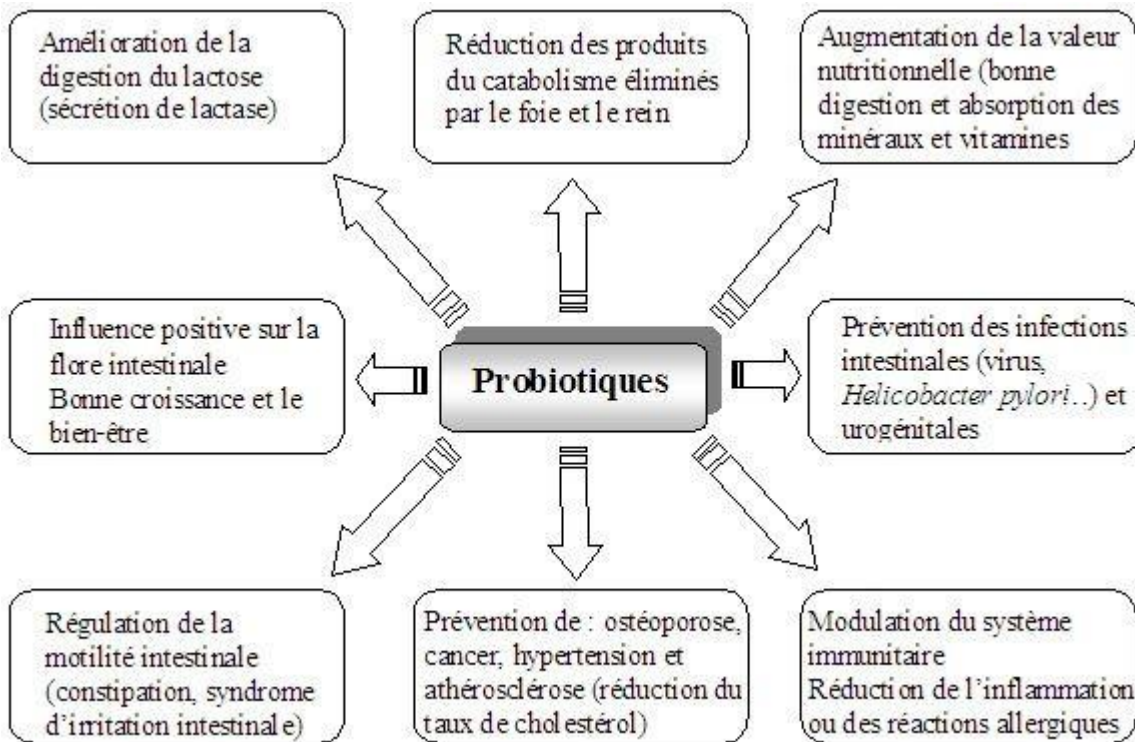


Figure 1 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques. (Mercenier *et al.*, 2002).

I.4 Les ferments probiotiques

Bien que le premier lait fermenté par des bifidobactéries a été mis sur le marché il y a près de 50 ans, le domaine des aliments probiotiques ne s'est développé que dans les années 1970 (Tamime *et al.*, 1995).

En 1997, plus de 70 produits laitiers industriels tels que des laits fermentés, du fromage blanc, du babeurre et des desserts surgelés contenait des bactéries probiotiques. Le Japon est le leader mondial pour la diversité des produits probiotiques, avec plus de 50 variétés (Shah, 1997). Aujourd'hui, les marques LC1 (Nestlé), Vifit (Campina Melkunie), Actimel (Danone) et Yakult ont émergé comme des chefs de file dans les yaourts et laits fermentés probiotiques (Stanton *et al.*, 2001).

Par ailleurs, les laits fermentés 'AB milk' et 'Cultura' contenant *Lactobacillus. acidophilus* et *Bifidobacterium. bifidum* sont très populaires au Danemark (Tamime *et al.*, 1995). D'autres produits comme les ferments du yaourt), les laits 'Bifidus' (*Bifidobacterium. bifidum* ou *Bifidobacterium. longum*), 'Biogarde' (*Lactobacillus. acidophilus*, *Bifidobacterium. bifidum* et *Streptococcus. thermophilus*), 'Biomild' (*Lactobacillus. acidophilus* et *Bifidobacterium*)

Les bifidobactéries peuvent être utilisées seules mais sont souvent associées à des bactéries lactiques pour des raisons organoleptiques et technologiques (Saloff-Coste, 1997).

Synthèse bibliographique

I.5. Les micro-organismes probiotiques

Sont considérés comme probiotiques différentes souches bactériennes ainsi que les levures. Les bactéries probiotiques sont principalement des bactéries lactiques et des *bifidobactéries*.

I.5.1. Levures

Les levures sont les premiers micro-organismes utilisées par l'homme depuis des millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et du pain par fermentation (**Bouix et Leveau, 1991; Pol, 1996**). Les levures sont des champignons microscopiques se présentant sous forme unicellulaire au moins à un stade de leur cycle biologique (**Bouix et leveau, 1980**).

Les levures sont des cellules eucaryotes, présentant une structure plus complexe que celle des bactéries notamment par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de Golgi et de plus d'un chromosome (*Saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes) (**Labrecque, 2003**). Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent ainsi largement ces microorganismes, pour la production de molécules à intérêt médical (ex : production de protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B) (**Mercier, 1997 ; Blin, 2002**).

I.5.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

La classification des levures qui a été remaniée en 1984 par **Kreger Van R** montre que le genre *Saccharomyces* appartenant à la classe des ascomycètes et à l'ordre des endomycétales est impliqué dans les productions industrielles (**Leveau et al., 1993**) (**figure2**).

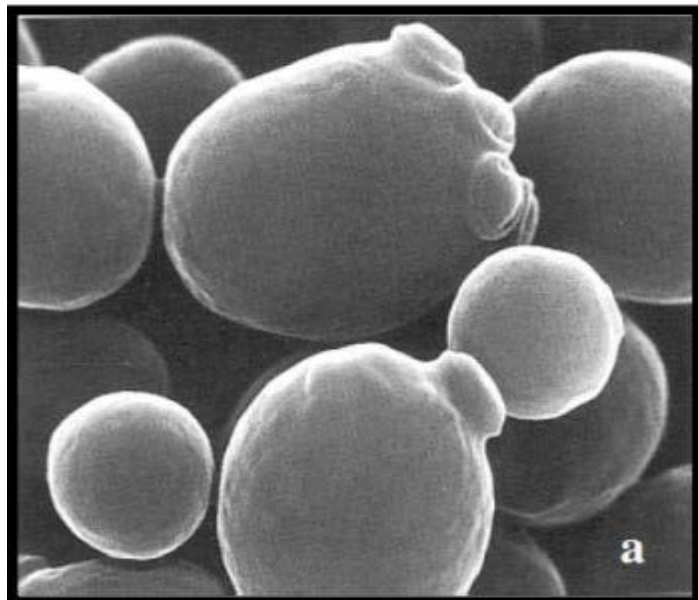


Figure 2: *Saccharomyces cerevisiae* sous microscopie électronique (**Tortora et al., 2003**)

Depuis l'antiquité, la levure *S. cerevisiae* a été utilisée dans la panification et la fabrication des boissons alcoolisées, après, la levure s'est installée et progressée en qualité d'additif alimentaire de probiotique en élevage intensif de ruminant (**Carter et Phillips, 1944**), actuellement, *S. cerevisiae*

Synthèse bibliographique

est utilisée comme des probiotiques contre les maladies fongiques chez les humains (**Munoz et al., 2016**).

I.5.1.2. *Saccharomyces boulardii*

C'est une levure semblable à *S. cerevisiae*, isolée, pour la première fois, en **1923** par le scientifique français **Henri Boulard**, elle appartient à la classe des *Saccharomycetes* et l'ordre des *Saccharomycetales* (**Alis et Jespersen, 2003**). *S. boulardii* est une souche de levure ayant fait l'objet de très nombreuses études cliniques démontrant son grand intérêt en cas de diarrhées (réduction de la fréquence) ou de prise d'antibiotiques (prévention de la diarrhée associée à l'antibiothérapie).

Elle favorise le réensemencement et la croissance des germes utiles, les saprophytes, en inhibant celle des germes nuisibles. Il a été démontré scientifiquement que l'utilisation périodique de la levure *S. boulardii*, réduit de manière sensible l'apparition des colites et des colopathies fonctionnelles, ou syndrome du côlon irritable (ballonnements, douleurs abdominales chroniques, troubles du transit chroniques, etc.), qui représentent près d'un tiers des consultations en gastro-entérologie. Il y a maintenant presque une dizaine d'années que des études randomisées et des méta-analyses ont montré l'effet des probiotiques sur la réduction du risque de survenue d'une diarrhée infectieuse et sur la diminution de sa sévérité évaluée en termes de durée de l'épisode (**Rodrigues, 2000 ; Kamm, 2004 ; Szajewska, 2005 ; Olivier, 2009 ; Pothoulakis, 2009**).

I.5.2. Les moisissures

Sans importance dans le lait liquide, elles intéressent un grand nombre d'autres produits laitiers. Elles se développent en surface, ou dans les parties internes aérées. Elles sont productrices de lipases et de protéases, dont on rencontre le *Penicillium* et le *Geotrichum* (**F.A.O, 1995**).

I.5.3. Bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini en **1919** par **Orla-Jensen**. Il réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Leveau, Bouix et al., 1993**).

En raison de sa composition physicochimique, le lait est considéré comme un écosystème idéal pour la croissance de différents types de microorganismes (**Belarbi, 2011**).

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini, du point de vue, taxonomique (**Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005**).

Synthèse bibliographique

Les bactéries lactiques sont des microorganismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver un grand nombre de ses aliments. Les bactéries lactiques ont été isolées pour la première fois à partir du lait (**Metchnikoff, 1908 ; Sandine et al., 1972 ; et Carr et al., 2002**).

Ce sont des bactéries anaérobies facultatives, généralement immobiles, elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et pour les glucides fermentes cibles (**Dellaglio et al., 1994 ; Hogg, 2005**).

En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (**Dellaglio et al., 1994; Salminen et al., 2004**).

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature, elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples (**Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001**). Les genres les plus utilisés comme des probiotiques sont des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* (**Khan et Ansari, 2007**), et aussi des souches de genres : *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (**Stiles et Holzapfel, 1997 ; Pot, 2008 ; Rokka et Rantamaki, 2010 ; Gbassi et al., 2011**) (Tableau 2).

Tableau 2: Principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique (**Shah, 2007 et 2010**).

Espèces de <i>Lactobacillus</i>		
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. paracasei</i>
<i>L. amylovorus.</i>	<i>L. johnsonni</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>
Espèces de <i>Bifidobacterium</i>		
<i>B. lactis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. infantis</i>
<i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. breve</i>
<i>B. adolescentis</i>		
Autres bactéries lactiques		
<i>Lc. Lactis</i>	<i>St. Diacetylactis</i>	<i>En. faecalis</i>
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>St. intermedius</i>	<i>En. faecium</i>
<i>P. acidilactici</i>	<i>St. Thermophiles</i>	

Synthèse bibliographique

Espèces de *Lactobacillus*

L. acidophilus *L. gasseri* *L. paracasei* *L. amylovorus* *L. johnsonni* *L. rhamnosus* *L. crispatus* *L. casei* *L. plantarum*

Espèces de *Bifidobacterium*

B. lactis *B. animalis* *B. infantis* *B. longum* *B. bifidum* *B. breve* *B. adolescentis*

Autres bactéries lactiques

Lc. lactis *St. Diacetylactis* *En. faecalis* *Ln. mesenteroides* *St. intermedius* *En. faecium* *P. acidilactici* *St. Thermophiles* .

I.6. Les mécanismes d'action des probiotiques

Les mécanismes d'action potentiellement impliqués dans l'effet bénéfique de ces probiotiques sont nombreux faisant intervenir l'amélioration de la digestibilité du lactose suite à une élévation de la sécrétion de β -galactosidase, l'inhibition compétitive de l'adhésion bactérienne, la synthèse de composés qui inhibent voire détruisent certains pathogènes telle que la baisse du pH intestinal ,production des bactériocines, la stimulation de la immunologie aux germes pathogènes (production augmentée des IgA, IgG, IgM ; augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires, Interleukin-10, TgF-bêta ; diminution de la production des cytokines-pro-inflammatoires TNF-alpha, Interferon-gamma ainsi que d'autres médiateurs inflammatoires tel que par exemple les matrixmetalloprotéinases). (**Die Fassung, 2002**), et la consommation compétitive de certains nutriments empêchant par ce biais la prolifération de certains pathogènes (**Vanderhoof et Young, 1998**).

Certains organismes tels que *Saccharomyces boulardii* sont susceptibles d'avoir un effet trophique sur la muqueuse intestinale par le biais de la production de polyamines.

Il faut insister sur le fait que le facteur majeur qui détermine l'efficacité d'unprobiotique et sa capacité à survivre lors du transit gastro-intestinal et de ce fait à coloniser l'intestin. Ainsi il a pu être montré que *Bifidobacterium bifidus* (**Langhendries et al., 1995 ; Pahwa et Mathur, 1987 ; Pochart et al., 1992**) et *Lactobacillus GG* (**Vanderhoof et Young, 1998**) survivaient, s'implantaient etpersistaient plusieurs jours après leur administration dans l'alimentation.

Synthèse bibliographique

I.7 Prébiotiques

Les prébiotiques sont définies comme étant des ingrédients alimentaires non digestibles, exerçant des effets bénéfiques sur l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité métabolique d'une ou d'un nombre de microorganismes dans le colon et capable d'améliorer la santé de l'hôte (**Gibson et Reberfroid, 1995**).

Pour être considéré comme prébiotiques ces ingrédients alimentaires ne doivent pas être hydrolysés, ni absorbés dans le tractus gastro-intestinal, et de préférence doivent être utilisés par les microorganismes bénéfiques de la microflore colique (**Mannig et Gibson, 2004**). Ces prébiotiques sont généralement des oligosaccharides ou Fructo-Oligo- Saccharide(FOS) et l'uniline qui sont sélectivement fermentés par les espèces de *Bifidobacterium*, pour cette raison que parfois sont référés aux facteurs bifidogènes(**Gomes et Malcata, 1999**).

I.8 Symbiotiques

Le concept « symbiotique » est de plus en plus utilisé pour évoquer la relation synergique entre les microorganismes probiotiques et leurs substrats sélectifs.

C'est un mélange de probiotiques et de prébiotiques qui affecte positivement l'hôte en améliorant la survie et l'implantation d'espèces microbiennes vivantes apportées sous forme de suppléments alimentaires dans le tractus gastro-intestinal, et par conséquent, la santé de l'hôte (**Suskovic et al., 2001 ; Isolauri et al., 2002**).

L'aliment ou le supplément alimentaire comprend non seulement les cellules vivantes de bactéries probiotiques, mais aussi un substrat sélectif. Une étude réalisée par (**Bartosch et al en 2005**) à montré qu'un groupe de volontaires âgés de plus de 62 ans, dont le contenu intestinal en bifidobactéries est fortement réduit par l'âge, lorsqu'ils ont ingérés un symbiotique à base de *Bifidobacterium bifidum* BB-02 et *Bifidobacterium lactis* BL-01 (probiotiques) et de l'inuline (prébiotique) a augmenté significativement la taille et la diversité des populations de bifidobactéries dans leurs matières fécales par rapport au groupe contrôle et groupe placebo.



CHAPITRE II :
les bactéries
lactiques

II. Les bactéries lactiques :

II.1. Définition :

Le groupe des bactéries lactiques englobe un ensemble de micro-organismes morphologiquement hétérogène caractérisées par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique D(-), L(+), DL. Selon **(Orla-Jensen, 1919)**, La fermentation est dite homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂, etc...). D'autre part les bactéries sont dites : homofermentaires si elles empruntent dans le métabolisme glucidique la voie d'Embden Meyerhof Parnas (Glycolyse) de telle sorte que l'acide lactique soit le seul produit final, par contre, si elles réalisent la voie des Pentoses phosphate elles sont donc hétérofermentaires **(Leveau et al., 1991)**. Les bactéries lactiques présentent des caractéristiques communes qui expliquent leur regroupement.

Ce sont des bactéries Gram (+), généralement immobiles, non sporulantes, catalase et oxydase négatives et généralement nitrate réductase négative. Anaérobies facultatives, micro-aérophiles, capables de fermentation en aérobiose comme en anaérobiose, sont aussi dépourvues de cytochromes et inaptés à toute respiration aérobie ou anaérobie. Toute leur énergie vient de la fermentation. Chimio-organotrophes, poly-auxotrophes pour divers acides aminés, bases nucléiques, vitamines, acides gras. Ce qui explique leur faible capacité de biosynthèse. Alors que la majorité des souches se développent à pH 4,0-4,5, certaines sont en activité à pH 9,6 et d'autres à pH 3,2 **(Novel, 1993 ; Jozala et al., 2005)**.

II.2 Propriétés générales :

D'une façon générale le groupe se compose de bactéries sous forme, de coques ou de bâtonnets à Gram positifs, non sporulant, et produisent l'acide lactique comme produit final principal pendant la fermentation des carbohydrates **(Kandler, 1983)**. Les BL sont, selon la voie qu'elles empruntent pour fermenter les hexoses, Homofermentaires ou hétérofermentaires. La voie de la glycolyse (Embden-Meyerhof-Parnas), ayant pour produit final principal l'acide lactique ou la voie 6-phosphogluconate/phosphokétolase (6-pg/pk) **(Schleifer et Ludwig, 1995)** Ayant pour résultat l'acide lactique, l'anhydride carbonique et l'éthanol (acide acétique).

Cependant, quelques espèces sont considérées comme hétérofermentaires facultatifs.

Synthèse bibliographique

Concernant la fermentation des hexoses, ces espèces sont homofermentaires, mais dans certaines conditions (par exemple si la source disponible de carbone est un pentose), elles induisent la voie 6-pg/pk, ayant pour résultat la fermentation hétérolactique (Axelsson, 2004 et Jozala *et al.*, 2005).

Les BL sont trouvées dans diverses niches écologiques, tel que le lait, ainsi que certaines nourritures, la bouche, les régions gastro-intestinales et urogénitales des humains et des animaux (Lopez-Diaz *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2000; El Shafei *et al.*, 2000 et Mathara *et al.*, 2004). Elles constituent aussi la flore microbienne dominante responsable de la fermentation des céréales et des plantes fourragères ensilées (Carr *et al.*, 2002 et Kotelnikova et Gelfand, 2002). Même si elles se développent dans une variété d'habitats, elles exigent des carbohydrates fermentescibles, des acides aminés, des acides gras, des sels et des vitamines pour leur croissance (Shihata et Shah, 2000; Björkroth et Holzappel, 2003 et Hammes et Hertel, 2003).

Les souches sont généralement faiblement protéolytiques et lipolytiques et exigent des acides aminés, des purines, des pyrimidines et des vitamines pour leur croissance (Stamer, 1976; Cogan et Hill, 1993 et Jay, 1996). Les bactéries lactiques utilisées dans les fermentations laitières peuvent être divisées en deux groupes sur la base de leur croissance optimale (Bissonnette *et al.*, 2000). Les bactéries mésophiles avec une température optimum de croissance entre 20°C et 30°C et les thermophiles entre 30°C et 45°C. Alors que la majorité de souches se développent à pH 4,0-4,5, certaines sont en activités à pH 9,6 et d'autres à pH 3,2 (Jozala *et al.*, 2005). L'acide lactique produit peut être sous deux formes stéréoisomériques, L moins fréquemment, D ou un mélange des deux (Who, 1974).

II.3. Origine des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont été isolées dans de nombreux milieux naturels végétaux, animaux et humains ; certains espèces semblent adaptées à un environnement spécifique et ne semblent guère se retrouver ailleurs que dans leur habitat naturel. Grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, les BL peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique (de Roissard et Luquet, 1994).

Selon Desmazeaud (1992), les espèces du genre *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* se rencontrent plutôt chez les hommes, ainsi que chez les animaux. Dans le domaine laitier, elles existent en quantité considérable, les espèces du genre *Lactobacillus* sont encore plus répandues

Synthèse bibliographique

dans la nature, par exemple, on les trouve sur les végétaux ou elles assurent l'acidification de l'ensilage, on les trouve aussi dans l'intestin des animaux et de l'homme. Elles sont également isolées des cavités naturelles de l'organisme (cavités buccales et vaginales) (**de Roissard et Luquet, 1994**)

taxonomie des bactéries lactiques Historiquement, les bactéries lactiques regroupées les genres : *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*, mais l'évolution de la taxonomie basée sur les caractères phénotypiques et génotypiques a revue la classification de ces bactéries. En effet, sont un groupe phylogénétique divers avec 50% GC de leur ADN. Le pourcentage GC de leurs ADN donne une composition assez proche pour le genre *Lactococcus* (34,46%), *Pediococcus* (34,42%), *Leuconostoc* (36,43%) alors que le genre *Lactobacillus* est caractérisé par une grande hétérogénéité (32,53%) (**Novel, 1993**).

Récemment les bactéries lactiques regroupées en onze genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* *Aerococcus*, *Allococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (**Axelsson, 2004**).

II.4. Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques se comportent comme d'excellents ambassadeurs d'un monde microbien souvent calomnié. Elles ne se réduisent pas à leur importance économique, mais jouent un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé de l'homme (**Luquet et Corrieu, 2005**).

Traditionnellement, les fermiers et les bergers ont utilisés les bactéries lactiques pour faire le fromage à partir du lait cru ont incubant le lait ou le petit lait dans des conditions spécifiques. Actuellement, les souches de bactéries lactiques sont sélectionnées pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons (**Lopez-Diaz et al., 2000 ; Ross et al., 2002**) Par contre, seuls cinq genres *Bifidobacteriu* *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont communément utilisés dans l'industrie laitière (**Mills, 2004 ; Lee et al., 2006**)

II.5. Niche écologique :

Bien qu'elles servent à de nombreux procédés concernant l'industrie laitière et agro-alimentaire, les bactéries lactiques habitent de nombreux milieux qui peuvent être probablement leur réservoir naturel (**Desmazeaud, 1992; Novel, 1993**). Les bactéries lactiques du lait

Synthèse bibliographique

proviennent de l'organisme de l'animal producteur (vaches, brebis, chèvres et chamelles) ou des plantes. De nombreuses souches de *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc* ont été isolées à partir de différents laits de vaches, brebis et chèvres (**Cheriguene et al, 2006 ; Chougrani et al., 2006 ; Rouissat et Bensoltane, 2006**).

Les espèces du genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*, peuvent être isolées chez l'homme, la peau et le poil des animaux, les oiseaux, des matières fécales, des poussières, de l'ensilage du foin, des grains et des ustensiles de domiciles et industriels en quantités considérable (**Petransxiene et Lapied, 1981; Desmazeaud, 1992**).

Les lactocoques comme les Streptocoques du groupe N non pathogènes peuvent être isolées du lait et des végétaux. *Lactococcus lactis* subsp *lactis* est facilement isolée du lait cru et des végétaux par contre *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* est exclusivement isolée du lait (**Guiraud et Galzy, 1980**).

Les *Leuconostocs* habitent plusieurs milieux : Lait et produits laitiers, fruits et légumes en particulier la betterave d'où leur ancien nom *Betacoccus* (**Leveau et al, 1991**). On les isole même des produits de panification, des solutions visqueuses dans les sucreries tandis que l'espèce *Oenococcus oeni* ne peut être isolée que du vin (**Larpen et al, 1990; Novel, 1993**).

Les lactobacilles sont, quantitativement, les plus importantes du groupe des bactéries lactiques. Elles sont très hétérogènes et ces diverses espèces présentent des caractères phénotypique et génotypique variés. Cette variété se reflète dans le pourcentage de G+C qui peut aller de 32 à 53%. (**Falsen et al., 1999**).

Les espèces mésophiles qui ont un large spectre de fermentation sont présentes dans le lait, laits fermentés, fromages, végétaux fermentés, on les isole également du vin, de la bière, des produits de panification et mêmes des viandes fraîches ou fermentées (**Petransxiene et Lapied, 1981; Desmazeaud, 1992**). Par contre on remarque que les espèces thermophiles qui sont caractérisées par un spectre d'acidification étroit peuvent être obtenues des laits fermentés, yaourt, lait traité par la chaleur et certains fromages à des températures dépassant 40°C (**Novel, 1993**). *Lactobacillus acidophilus* se trouve dans l'intestin de l'homme et des animaux, par sa nature, elle résiste à des pH très bas, ainsi qu'aux sels biliaires. (**Desmazeaud,1992**). Enfin les espèces du genre *Pediococcus* ne peuvent être isolée qu'à partir des végétaux et rarement des vins, bières et parfois des laits fermentés (**Desmazeaud, 1992; Novel, 1993**).

II.6. Classification des bactéries lactiques

II.6.1. Classification classique :

Elle s'appuie sur les caractères phénotypiques distinctifs de l'espèce et du genre; la première classification était donc basée sur la morphologie, la température de croissance, le mode de fermentation du glucose et la forme de l'acide lactique produit (**Orla Jensen, 1919**).

En **1957**, **Bergey** dans leur Manual a regroupé les bactéries lactiques dans la famille des *Lactobacteriaceae*, mais cette classification a été remise en question et totalement simplifiée (**Desmazeaud, 1992**).

II.6.2 Classification moderne :

Cette classification est mieux affinée car elle s'appuie principalement sur les techniques d'électrophorèse des protéines et des acides nucléiques, la définition du pourcentage GC de l'ADN, ce qui permet de définir une souche bactérienne du point de vue de la taxonomie moléculaire, et de connaître l'homogénéité des genres. La taxonomie actuelle investit le progrès de la génétique (hybridation ADN-ADN, ADN-ARN), de l'écologie (découverte des bactéries de milieux externes), elle inclue également les techniques modernes de séquençage d'ADN, de micro galeries d'identification, des banques de données informatisées (**Bugnicourt, 1995**).

Les bactéries lactiques sont un vaste ensemble des microorganismes procaryotes qui se rattachent à deux filiations généalogiques, ou phylum :

Le phylum de Clostridium, dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de G+C inférieur à 50%. Ce phylum comprend le groupe des bactéries lactiques au sens strict qu'on rencontre dans les aliments, soit en forme de coque (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus*), soit en forme de bâtonnet (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*).

Le phylum des Actinomycètes, dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de G+C supérieur à 50%. Ce phylum comprend des genres apparentés, qu'on range souvent au sens large (*Bifidobacterium*, *Propionobacterium*).

Cependant les genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, et *Streptococcus*, dont le G+C% de l'ADN est inférieur à 50% peuvent être regroupés dans la branche des Clostridium avec *Bacillus* et *Clostridium* est séparé de la branche des actinomycétales au G+C supérieur à 50% et

Synthèse bibliographique

comprenant *Propionobactérium* et *Bifidobactérium* (**Kandler et Weiss, 1986 ; Stackebrandt et Goebel, 1994 ; Stackebrandt et al., 2002**).

Le rassemblement de ces 5 genres dans un même groupe est confirmé par la taxonomie moléculaire ; l'analyse de la séquence nucléotidique de leur ARN ribosomique (ARN16S) permet de réunir dans un même grand groupe phylogénétique les genres : *Lactobacillus-Pediococcus-Leuconostoc-Streptococcus-Bacillus-Clostridium-Propionobactérium-Bifidobactérium* (**Scardovi, 1986**).

Le tableau 3 : regroupe les principales caractéristiques des 12 genres les plus étudiés des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*, *Weissella*. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage est très répandu en industrie laitière (**Isolauri et al., 2001**).

Synthèse bibliographique

Tableau 3 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Dellaglio et al., 1994).

Genre	Morphologie	Fermentation	T° Opt	Habitats principaux
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaires ou Hétérofermentaires	Thermophiles ou Mésophiles	Homme Produits laitiers, carnés, végét aux ...
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaires	Psychrotrophes peu acidotolérants	Produits carnés, poissons, produits laitiers
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	Produits laitiers, végétaux
<i>Streptococcus</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produits laitiers
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	Intestin de l'homme et des animaux, produits laitiers
<i>Vagococcus</i>	Coques mobiles	Homofermentaires	Mésophiles	
<i>Pediococcus</i>	Coques en tétrades	Hétérofermentaires	Mésophiles	Bière, produits végétaux, saucissons
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en tétrades	Hétérofermentaires	Mésophiles	Saumures
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produits végétaux, produits laitiers
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Vin
<i>Bifidobacterium</i>	Forme en Y (Bifid)	Acide acétique et lactique	Mésophiles	Intestin de l'homme et des animaux
<i>Weissella</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produite végétaux, produits laitiers

T° Opt : température optimale de développement

II.7. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

II.7.1. Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, (**Tableau 2**), il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans denombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C.

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (**Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994**).

Tableau 4 : Classification des bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* (**Franz et al., 2014**).

Classification	
Règne	<i>Bacteria</i>
Division	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (**Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004**)

Groupe I « *Thermobacterium* » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

Groupe II « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.

Groupe III « *Betabacterium* » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.

II.7.2. Le genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits «lactique», car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (**Pilet et al., 2005**).

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *hordniae* (Pot et al., 1996 ; Pot, 2008).

II.7.3. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques .

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles et Holzapfel, 1997). *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie, 1986 ; Pilet et al., 2005).

II.7.4. Le genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007).

II.7.5. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine,

Synthèse bibliographique

la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des leuconostoc entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les leuconostoc principalement *Ln. mesenteroides* ssp.*cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008).

Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzappel, 1997).

II.7.6. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pediocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Guiraud et Rosec, 2004 ; Tosukhowong et al., 2005).

II.7.7. Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G+C. Les

Synthèse bibliographique

bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson *et al.*, 2004 ; Pilet *et al.*, 2005 ; Ho *et al.*, 2007).

III.8. *Bifidobacterium. spp* et *Lactobacillus. Spp*

Bifidobacterium. spp est présent naturellement dans l'intestin qu'il colonise durant la première semaine après la naissance. Il fait partie des Actinobactéries, c'est un genre anaérobie strict à Gram positif qui possède un haut pourcentage en base GC (entre 55 et 64%) (Van Der Werf, 2001).

Son activité métabolique rejoint celle des BL, par la production d'acétate et de lactate. Il représente 95% du microbiote de l'enfant et 3% de l'adulte. On dénombre environ 30 espèces différentes dont certaines sont considérées comme probiotiques (Trebichavsky *et al.*, 2009)

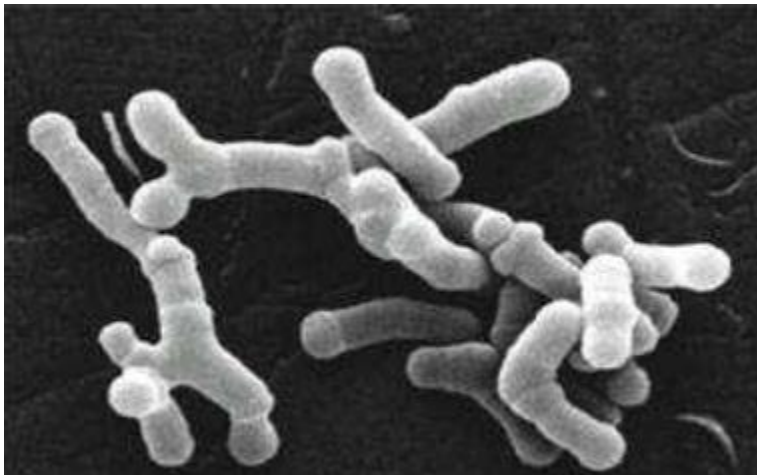


Figure 3: *Bifidobacterium longum* (Schell, université de Georgie).



CHAPITRE III :
Le tube digestif

Synthèse bibliographique

III. Généralités du système digestif

III .1. Structure du système digestif

Le système digestif est composé successivement de la cavité buccale, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jejunum et iléon), le caecum, le côlon ou gros intestin (côlon ascendant, côlon transversal et côlon descendant) puis se termine par le rectum et l'anus (Figure 4) .

(Villarrea, 2006)

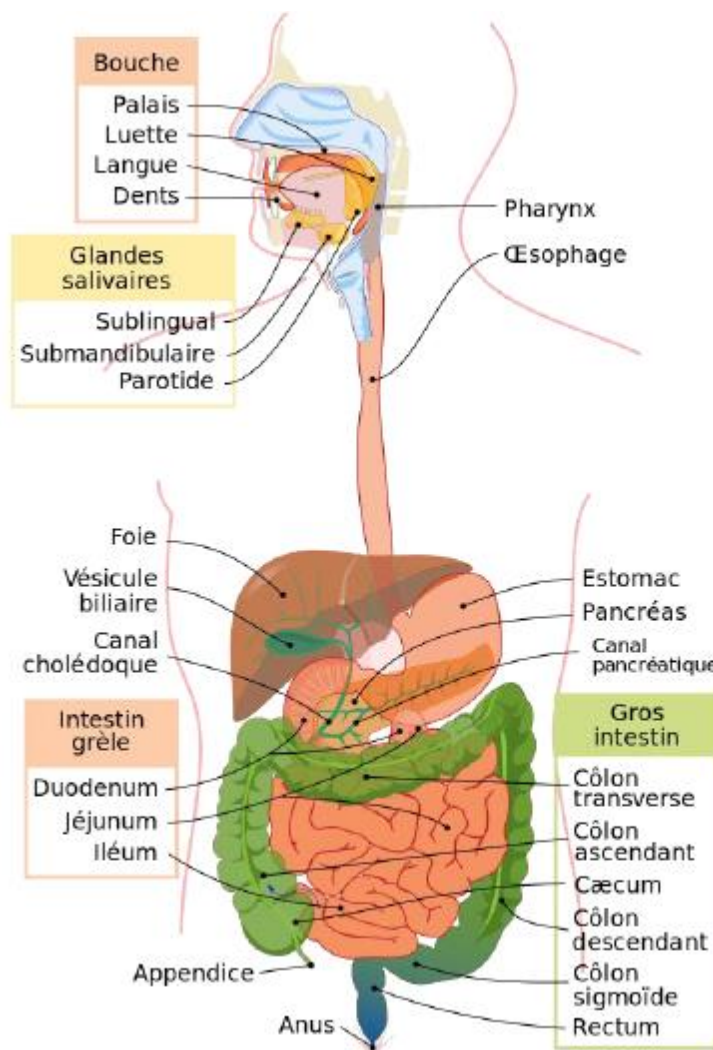


Figure 4 : Structure du système digestif (Villarrea, 2006).

Synthèse bibliographique

La physiologie du tube digestif est constituée de 5 tuniques concentriques situées respectivement de l'extérieur vers l'intérieur de l'organisme (Figure 5):

La muqueuse, qui comporte un épithélium de revêtement ainsi qu'un tissu conjonctif sous-jacent : le chorion ou *lamina propria*, qui lui-même contient des tissus lymphoïdes diffus ainsi que des follicules lymphoïdes. **La muscularis mucosae**, **la sous-muqueuse**, **la musculaire externe** comprenant la partie circulaire interne et longitudinale externe ainsi que **la tunique externe** constituée par un tissu conjonctif lâche qui la rend solidaire aux organes voisins (André *et al.*, 2002).

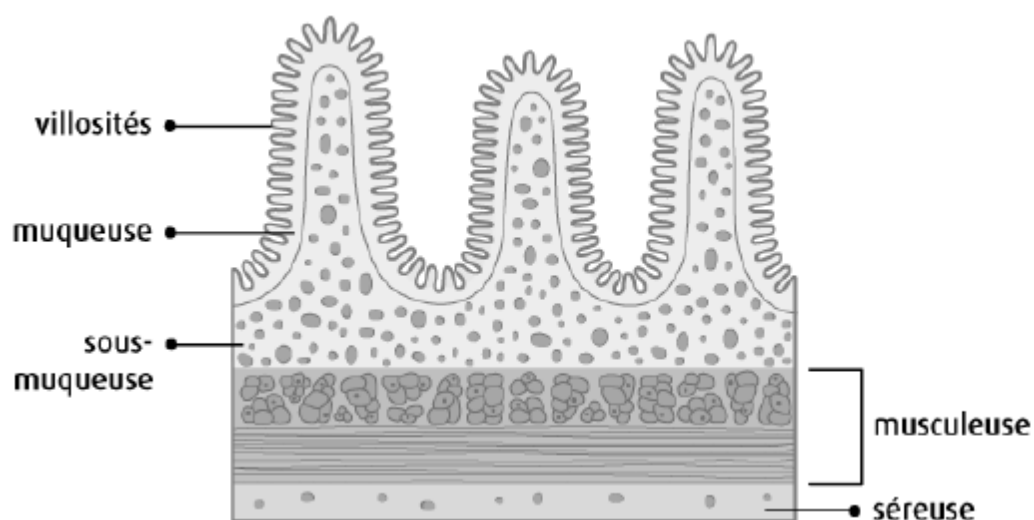


Figure 5: Structure de l'intestin grêle (André *et al.*, 2002).

III.1.1. L'intestin grêle

L'intestin grêle mesure 4 à 7 m chez l'homme. Les parois sont recouvertes de plis circulaires, de villosités et de microvillosités formant la bordure en brosse, ce qui lui confère une surface d'échange avec la lumière de 400 m² en moyenne. Les sécrétions intestinales permettent de maintenir un pH neutre ou légèrement basique au alentour de 8.

L'intestin grêle est le siège de phénomènes d'absorption mais joue également un rôle dans les phénomènes de sécrétion et participe à la réponse immunitaire. Il comprend le duodénum (0,25 m), le jejunum (2,5 m) et l'iléon (3,5 m).

La muqueuse de l'intestin grêle comprend un étage composé de villosités ainsi qu'un étage composé de glandes de Lieberkühn (ou cryptes) (Figure5) (Sergi, 1997; André *et al.*,2002).

Synthèse bibliographique

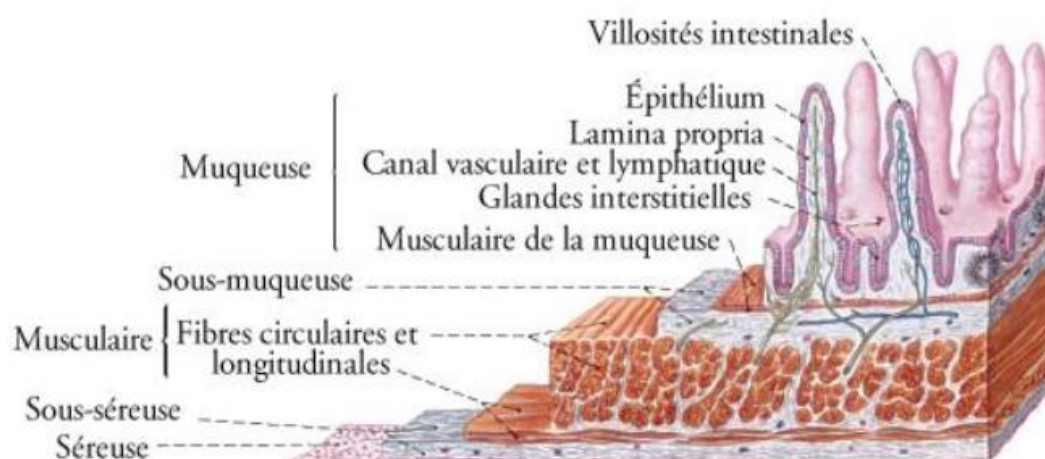


Figure 6 : La muqueuse intestinale (Sergi, 1997; André *et al.*,2002).

III.1.2.Le côlon

De calibre plus large que l'intestin grêle, le gros intestin mesure environ 1,5 m de long, il comprend le côlon ascendant, transversal et descendant. Le pH est compris entre 4,7 et 7,5 respectivement dans sa partie proximale et distale. A la différence de la muqueuse de l'intestin grêle, le côlon ne comporte pas de villosités mais un épithélium plan (ou épithélium de surface). L'épithélium est constitué de colonocytes, cellules responsables de l'absorption de l'eau et des électrolytes, de cellules caliciformes et de cellules entéroendocrines. Le chorion lui, est riche en tissu lymphoïde.

➤ Les fonctions du côlon sont

- i) la déshydratation du bol alimentaire (absorption de l'eau et des électrolytes).
- ii) la digestion terminale de la cellulose et autres polysaccharides résistant à la digestion au niveau de l'intestin grêle par le microbiote.
- iii) l'évacuation des déchets alimentaires (Villarrea, 2006).

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. Sa muqueuse étant estimée à 200-300 m², il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement. L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable entre l'épithélium gastro-intestinal, le système immunitaire et une importante flore microbienne. Si l'un des trois composants de l'écosystème est défaillant, des pathologies peuvent survenir. Les interactions entre les microorganismes et l'hôte peuvent être de trois types : symbiose, commensalisme ou pathogénicité. L'hôte est protégé contre la microflore intestinale pathogène par

Synthèse bibliographique

les barrières chimiques et physiques formées par l'épithélium gastro-intestinal (Bäckhed et al., 2004 ; Amrouche, 2005).

III.2.Colonisation du tube digestif

La colonisation du tube digestif par les micro-organismes a lieu dès les premiers jours de vie. Chez l'Homme, le profil microbien varie selon la durée de la gestation, la voie de naissance (césarienne ou voies naturelles), et l'alimentation du nouveau-né (Goldin, 1986).

Le microbiote intestinal a été le plus amplement étudié, peut-être parce que ce tractus représente la plus grande surface d'échange de notre corps et qu'il est aussi le plus colonisé, avec à lui seul une population de bactéries issues de plusieurs centaines d'espèces différentes, c'est environ dix fois plus de bactéries que le nombre total de cellules de notre corps. En poids cela représente entre 1,5 et 2 kg. Du fait de l'accès difficile à certaines parties du tractus digestif, et de la très grande complexité de la flore digestive, elle n'est pas totalement découverte. Cependant, les chercheurs ont déterminé les bactéries principales et un ordre de grandeur des quantités présentes dans les différentes régions du tractus digestif. Plus on avance vers le colon, plus le nombre de bactéries présentes grandit (figure 7) (Coudeyras et Forestier, 2010).

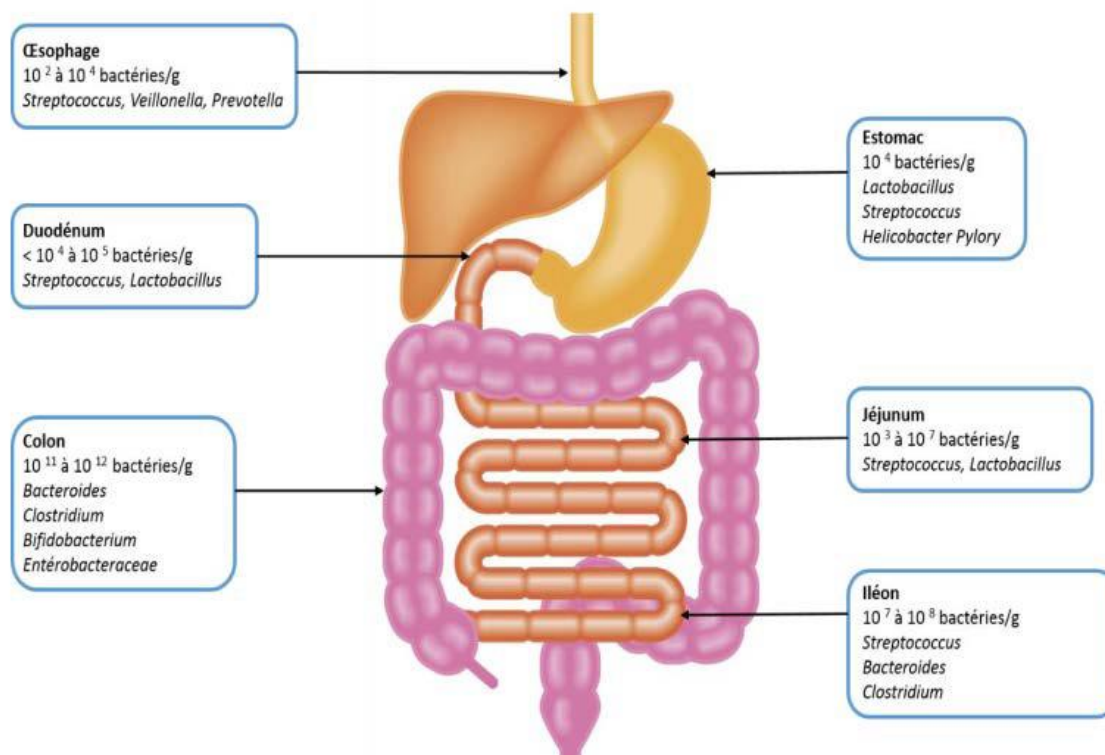


Figure 7 : Microbiote intestinal et répartition le long du tractus digestif (Goulet, 2009)

Synthèse bibliographique

III .3. Le microbiote

L'écosystème microbien digestif est composé du microbiote, de l'hôte et des aliments ; il est responsable de l'homéostasie et participe au maintien de la santé de l'hôte.

Le microbiote comporte 10¹⁴ microorganismes vivant en symbiose avec l'hôte soit plus de 100 fois le nombre de cellules de l'organisme humain (Gill *et al.*, 2006). *In vitro*, le tube digestif est stérile, les premières colonisations se font principalement par la flore vaginale, intestinale et cutanée de la mère lors de la naissance, ainsi que par l'environnement extérieur (O'Hara and Shanahan, 2006). Sa composition va par la suite évoluer en fonction de l'environnement et de l'alimentation de l'hôte, pour se stabiliser vers les deux ans de l'individu. Chaque homme possède donc son propre microbiote, reflet de son environnement.

Chez l'individu sain, le microbiote, une fois stabilisé, ne subira que des changements ponctuels, conséquence de la prise d'antibiotiques ou d'un changement d'alimentation. Très complexe et diversifié, le microbiote est composé d'environ 1000 espèces différentes réparties selon trois *phylums* majoritaires, le *phylum* des Firmicutes représentant 79% du microbiote, constitué principalement de bactéries à Gram positif à bas GC. La plus grande majorité des espèces des Firmicutes appartient à la classe des Clostridu parmi lesquels on retrouve les groupes *Clostridium coccoides* et *Cl. Leptum*. Moins de 5% des autres espèces du *phylum* Firmicutes appartiennent aux classes Mollicutes et Bacillu . Les deux autres *phylums* majoritaires sont *Bacteroidetes* et *Actinobacteria* qui représentent respectivement 17% et 3% de l'écosystème intestinal (Lay *et al.*, 2005; Tap *et al.*, 2009)

(Figure 8).

Enfin, les autres *phylums* rencontrés sont principalement ceux des *Proteobacteria* et *Verrumicrobia* qui ne représentent que quelques pourcents des bactéries totales. Les progrès effectués concernant l'analyse génomique des procaryotes a fait considérablement évoluer la taxonomie.

Anciennement basée sur l'analyse morphologique (coque/bacille) et phénotypique (coloration de Gram), elle est aujourd'hui basée sur l'analyse métagénomique *via* l'ARN ribosomique 16S. En effet, il s'est avéré que les précédentes techniques de classification ne permettaient pas d'obtenir une classification totale des espèces peuplant le microbiote mais uniquement des espèces cultivables qui ne représentent que 30% de l'écosystème intestinal.

Synthèse bibliographique

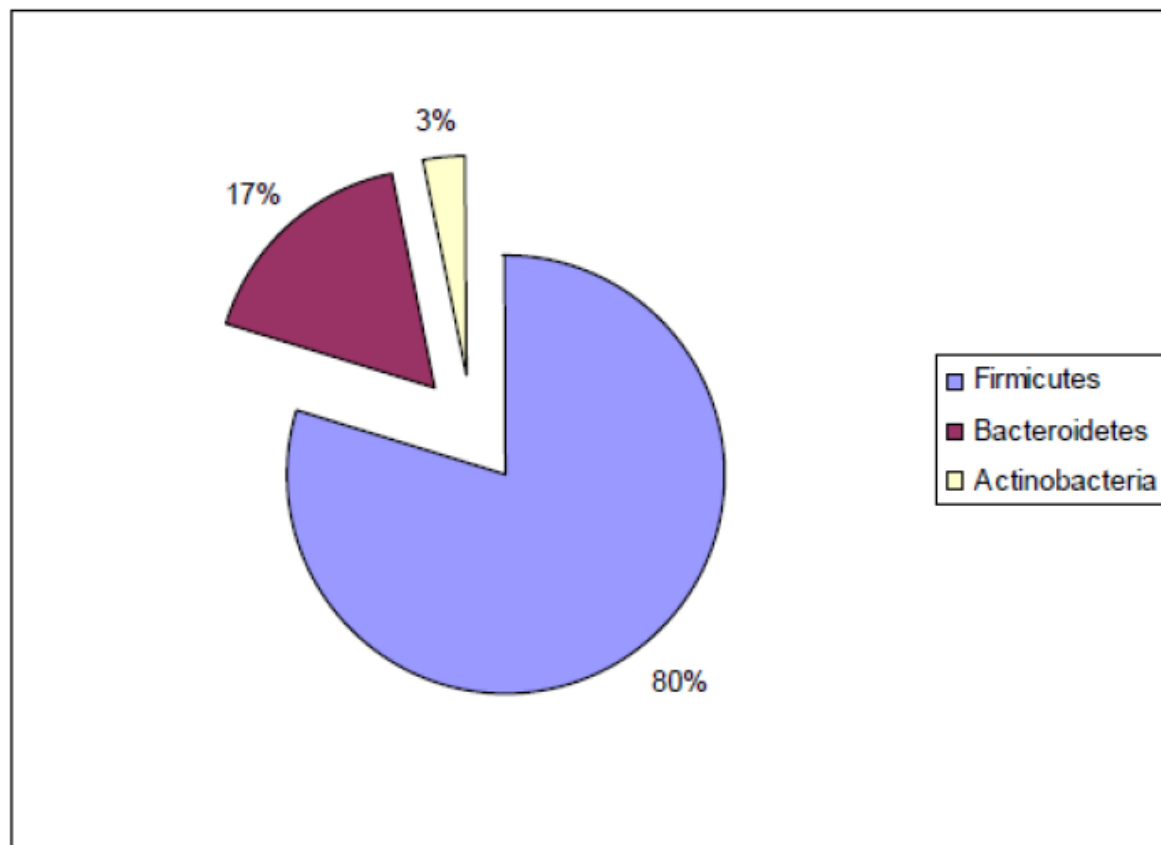


Figure 8: Répartition des *phylums* majoritaires qui composent le microbiote intestinal (Tap et al., 2009).

Parmi les espèces rencontrées au sein du TD, 99% sont anaérobies. La concentration et la diversité bactérienne augmentent parallèlement avec l'augmentation du pH. La composition varie en fonction de la teneur en oxygène qui diminue le long du TD, ainsi, l'estomac est constitué d'environ 10⁴ unités formants colonies (UFC)/g de contenu, le duodénum Introduction bibliographique: généralités du système digestif et le jéjunum sont constitués de 10⁴ à 10⁷ UFC/g, la majeure partie étant des bactéries aérobies anaérobies facultatives (AAF) telles que des lactobacilles, des streptocoques ou encore des entérobactéries. Dans l'iléon, la proportion augmente de 10⁵ à 10⁷ UFC/g, principalement constitué de bactéries AAF et anaérobies telles que *Bacteroides*, enfin le côlon contient 10⁹ à 10¹¹ UFC/g de contenu principalement anaérobies strictes telles que *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium* et *Clostridium* (Butel and Collignon, 2004).

On peut distinguer le **microbiote endogène** ou **autochtone**, qui colonise principalement le côlon et qui est capable de se multiplier *in vivo*, du **microbiote en transit** ou **allochtone**, qui provient principalement de l'alimentation et persiste peu de temps au sein du TD.

Synthèse bibliographique

Les principales fonctions du microbiote peuvent être définies selon 3 catégories

➤ **Les fonctions métaboliques** : le microbiote réalise la fermentation des résidus alimentaires non digestibles et produit ainsi des acides gras à chaînes courtes tels que le butyrate, de l'énergie et des vitamines essentielles au développement de l'hôte (**Wong *et al.*, 2006; Macfarlane and Macfarlane, 2007**).

➤ **Les fonctions trophiques** : le microbiote participe au développement de l'anxiogènes de l'intestin *via* les cellules de *Paneth*, et aide ainsi au développement du système immunitaire (**Stappenbeck *et al.*, 2002; Macpherson and Harris, 2004**).

➤ **Les fonctions de protection** : le microbiote permet d'augmenter l'effet barrière de la muqueuse intestinale en colonisant les sites de fixation à la muqueuse du TD, en créant une compétition vis-à-vis des nutriments ou encore en libérant des composés anti-microbiens luttant ainsi contre les bactéries pathogènes (**Hooper *et al.*, 2003**).



**Matériel et
Méthodes :**

IV- 1- Objectif

L'objectif de notre étude consiste à tester le comportement de quelques souches isolé de lait fermenté et des alicaments vis-à-vis des conditions du tube digestif in vitro par étapes. Celles qui sont capable d'être des probiotiques, si elles possèdent les autres caractéristiques (Avoir un effet bénéfique sur l'hôte).

Pour réaliser cet objectif, nous avons passé par les axes suivants

- Test des croissances des souches à un pH de 7 (pH de l'intestin).
- Culture en anaérobiose des souches qui ont dépassé la première barrière.
- Vérification de la sensibilité aux antibiotiques.
- Test de croissance en présence de différentes concentrations des sels biliaires.

IV-2-Lieu d'étude

Cette étude a été effectuée au niveau du laboratoire de Microbiologie du Département de biologie, Université Ammar Thelidji Laghouat.

IV-3-Choix des milieux de culture

Les milieux de culture sont utilisés liquides ou solides après addition d'agar-agar. Selon **Larpent, (1996)**, les milieux utilisés pour la culture des bactéries lactique tiennent compte dans leur composition des caractères essentiels de ces germes à la fois acidotolérants, mais aussi exigeants sur le plan nutritionnel tel que :

- **MRS (De Man Rogsa et Sharpe)** qui est utilisé pour réaliser les tests d'isolement et la culture.
- **Muller Hinton** qui est utilisé pour réaliser le test d'antibiogramme.

IV-4- Purification des souches

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs de façon alternée en milieu MRS solide jusqu'à purification afin d'avoir des colonies bien distinctes ,et MRS liquide pour voir la croissance bactérienne a travers le trouble pour nous aidées a caractérisé de celles des bactéries lactiques.

Pour la purification des souches sur milieu solide on utilisant la méthode de stries. Dès l'obtention sur les boites de Pétri de culture pure, on arrête la purification.

IV- 5- Confirmation de l'appartenance des souches au groupe lactique

IV- 5-1-Coloration de Gram

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de Gentiane ; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courant, traité pendant une minute par une solution de lugol, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec

Matériel et méthodes

l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 10 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. A ce stade, les cellules Gram négatif seront incolores, les cellules Gram positif seront violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la fushine pour colorer les cellules Gram négatif présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à immersion ($G \times 100$) (Singleton, 1999).

IV- 5-2. Test Catalase

Exposer une culture sur boîte à l'air pendant 30 min. Prélever quelques colonies, les émulsionner dans une goutte d'eau oxygénée à 10 vol. La formation de bulles est due à la catalase du germe.

IV-6-Testes de croissance des souches en fonction de différentes conditions

IV-6-1 -Test de pH

Sachant bien que la tolérance à l'acidité des bactéries varie d'une espèce à une autre, et d'une souche à une autre au sein de la même espèce.

Pour tester la tolérance de nos souches à un pH extrême, nous avons procédé à l'ajustement du pH du milieu MRS liquide avec l'ajout de HCl jusqu'à pH=2 (pH de l'estomac) par l'utilisation d'une électrode de pH, relié à un enregistreur de données (pH-mètre).

Le milieu MRS dont le pH est ajusté à 2, est ensuite réparti en tubes en raison de 10 ml/tube, autoclavé à $121^{\circ}\text{C} \pm 1$ pendant 15 minutes et en finensemencé par nos souches à raison de 0.1 ml (1%) (Larpen, 1996).

Les cultures sont ensuite incubées à 37°C pendant 2h à 3h culture t1 (Le passage d'aliment dans l'estomac).

Ensuite, la survie des bactéries dans des conditions extrêmes de pH est déterminée en réalisant à partir de culture t1, un repiquage sur milieu MRS se fait par la méthode d'ensemencement en surface.

La lecture s'effectue après l'incubation à 37°C pendant 48 h.

IV-6-2-Test d'anaérobiose (Larpen, 1996)

Ensemencer les 11 souches en stries à l'aide d'anse de platine sur le milieu MRS dans les boîtes de Pétri.

Pour assurer les conditions d'anaérobiose pour nos souches de bactéries lactiques étudiées, les cultures (boîtes) sont incubées dans une jarre d'anaérobiose par la technique d'ensemencement en masse et en surface. Pour éliminer l'oxygène dans la jarre, les bougies sont allumées, et on ajoute

Matériel et méthodes

de bicarbonate de sodium et HCL à l'intérieur. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 48 heures dans l'étuve.

IV-6-3-Test des sels biliaires

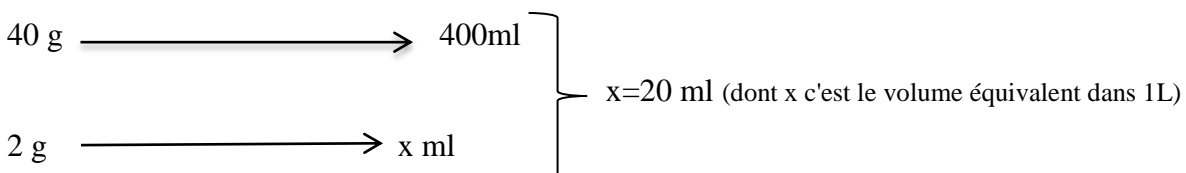
L'évaluation de la capacité de la tolérance aux sels biliaires des souches a été effectuée seulement pour les souches qui ont été capable de survivre à pH 2. A cause du manque de produits (oxagale- sels biliaires déshydraté), on a réalisé des teste avec différents types de milieu; de culture qui contiennent les sels biliaires, et un autre essai avec les sels biliaires frais de moutan à de différents concentrations.

IV-6-3-1- Essais avec la bile fraiche de mouton à différents concentrations

L'additionnement des sels biliaires dans le milieu MRS gélosé à raison d'une concentration finale de La détermination de 0,2% ; 0,4% ; 0,6 % et 0,8 % la quantité des sels biliaires frais en volume pour les concentrations Désigné 0,2%. ; 0,4%. ; 0,6%. . Et 0, 8%, est réalisé par la manière suivante :

-Pour la concentration 0,2 %

D'après Guiraud (2003), 40g de sel biliaire déshydraté est l'équivalent de 400ml de la bile fraîche de moutan . Pour obtenir une concertation de 0,2 (p/v) on calcule le volume de sels biliaires frais à ajouter dans 1 litre du milieu de culture.



-On cherche le volume équivalent de 2g dans un 1L.

C'est les mêmes étapes pour les autres concentrations (0,4 ; 0,6 et 0,8 %) Pour les concentrations 0,2% ; 0,4%; 0,6 % et 0,8%, on ajoute respectivement les volumes suivant : 4 ml, 8 ml, 12 ml, 16 ml de sels biliaires frais dans 4 flacons avec l'ajout du milieu MRS gélose de volume 196, 192,188 et 184 respectivement à raison d'avoir un volume total de 200 ml dans chaque flacon pour les autoclavés.

Le milieu MRS additionné des sels biliaires est ensuite coulé dans les boites de Pétri, ces dernières sontensemencées par les 11souches qui présente une tolérance au pH 2 en stries à l'aide d'une anse de platine.

L'incubation s'effectuant toujours à 37°C et la croissance a été suivie pendant 48h.

IV-6-3-2-Teste d'antibiogramme

Le test d'antibiogramme a été effectué seulement sur les 9 souches parmi les 11 qui ont présenté une tolérance vis-à-vis du pH 2.

Nous avons réalisé un ensemencement de notre souche en inondant toute la surface de la gélose Muller Hinton avec 2 ml de culture bactérienne en bouillon. Des disques imprégnés de solution d'antibiotiques (5 disques d'antibiotiques) sont disposés en surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile.

Après incubation à 37°C pendant 48h pour les bactéries lactiques la sensibilité ou la résistance des souches est évaluée par la présence ou non d'une zone d'inhibition de croissance autour du disque d'antibiotique. Le résultat a été exprimé comme sensible (S), résistant(R) ou intermédiaire(I) à l'aide des abaques de lecture spécifique (**Larpen, 1996**).

Les antibiotiques utilisés dans ce test sont présentées dans le tableau

Tableau 5: le code et la dose de chaque antibiotique utilisé.

Antibiotique	Code	Dose
Ampicilline	AMP	10 µg
Penicillin-G	P	10 µg
Doxycycline	DO	30 µg
Erythromycin	E	15 µg
Streptomycine	S	10 µg



**Résultats
et discussions :**

Résultats et discussions

V- résultats et discussions :

V-1-Résultats de purification et confirmation des souches

Les colonies de bactéries lactiques isolées sur MRS sont représentées dans la figuresuivante :



Figure 9 : L'aspect macroscopique des bactéries lactiques sur milieu MRS solide et liquide après purification.

La purification de nos souches a été faite en se basant sur les critères macroscopiques des bactéries lactiques, qui sont comme citer dans le tableau suivant :

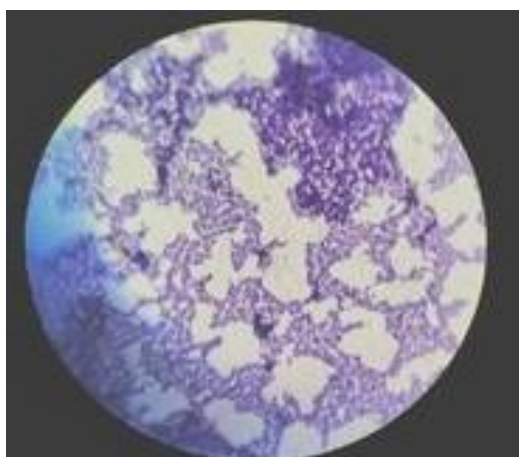
Tableau 6 : caractéristique des colonies après purification

Colonies	Contour et mesure	Couleur
Grosse colonies circulaires	contour régulier de diamètre 2mm.	blanchâtre,
Très petites colonies	diamètres inférieurs à 0.5 mm	blanchâtre,
Petites colonies	contour régulier. de diamètre 0.5 mm	jaunâtre
Petites colonies	contour régulier. de diamètre 0.5 mm	blanchâtre,

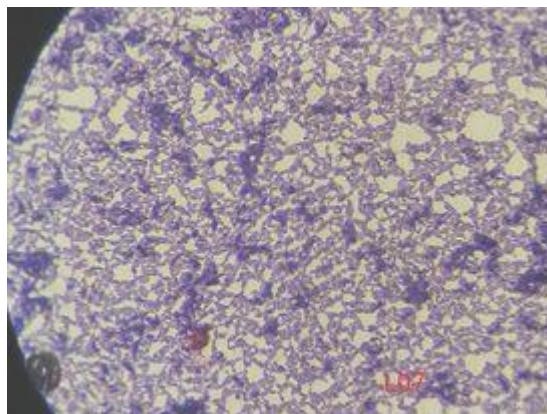
V-2- Observation microscopique

Après la coloration de Gram, on est passé à l'observation microscopique au (G X 100) avec l'huile à immersion, où on a pu observer que les bactéries étaient Gram positives apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations comme il est représenté dans la figure 10 .

Résultats et discussions



UA



LB

Figure 10: Observation microscopique des souches lactiques avec grossissement $\times 100$.

L'observation microscopique des souches a montré que 2 sont des Cocci contre 9 bacille a les 11 souches, dont la majorité sont catalase (catalase négative). Les critères microscopiques de nos souches sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 7 : l'observation microscopique de quelques souches.

souche	Coloration de gramme		Agencement	Activité catalisique
	gram	forme		
L1	+	coques	Chainettes, Dispersées	-
L2	+	coques	dispersées	-
L7	+	coques	dispersées	-

V- 3- Résultats du test de pH

Le test de survie des souches on montre que 11 souches seulement ont présenté une tolérance variable à pH 2 sur le milieu MRS (figure).

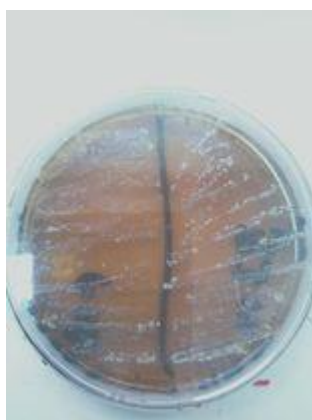


Figure 11 : La croissance des souches qui ont résisté à pH 2

Les résultats de la tolérance de nos souches à pH 2 sont montrés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : résultats des comportement des souches lactiques vis-à-vis du pH

Résultats et discussions

Souches	tolérance
L 1	+
L 2	-
L 3	-
L 4	+
L 5	+
L 6	-
L 7	-

D'après plusieurs auteurs, (Conway et al., 1987 ; Chou et Weimer, 1999 ; Rallu, 1999), la capacité de survie à l'acidité gastrique varie beaucoup selon le genre et la souche. La différence constatée est liée essentiellement à la composition en acides gras de la paroi cellulaire des bactéries lactiques. Ce mécanisme de tolérance caractérise en particulier les genres *Pediococcus* et *Enterococcus* (Marteau et al., 2003; Gagnon et al., 2004).

V.4. Test d'anaérobiose

Les 11 souches qui ont présenté une tolérance du pH 2, ont toutes marqué une croissance plus ou moins importante en anaérobiose (figure 11).

Figure 12 : la croissance des souches de bactéries lactique en anaérobiose.

Puisqu'elles sont aéro-anaérobies facultatives, Selon (Pilet et al., 1998).

Les bactéries lactiques peuvent croître dans les deux milieux avec une préférence en anaérobiose

V- 5- Résultats du test des sels biliaires

Le tableau 9 présente les résultats de la tolérance des souches aux différentes concentrations des sels biliaires frais.

Tableau 9 : la tolérance des souches aux différentes concentrations des sels biliaires.

Souches	0.2	0.4	0.6	0.8
L 1	+/-	+/-	-	-
L 2	+	+	+	+
L 3	+/-	+/-	+/-	+/-
L 4	+	+	+	+
L 5	-	-	-	-
L 6	+	+/-	-	-
L 7	-	-	-	-
L 8	+/-	+/-	-	-
L 9	+	-	-	-

(+) : fort croissance

(+/-) : croissance moyenne

Résultats et discussions

(-) : faible croissance

Après le test de sels biliaires nous remarquons que :

- souches (L2 , L4) présentent une forte croissance
- souches (L5,L7) présentent une faible croissance
- souches restantes présentent une croissance moyenne ou variable

Notre résultat est cohérent avec ce de **Dutoit et al. (1998)**, Nous avons remarqué que toutes les souches se développent en présence des sels biliaires à des différentes concentrations la tolérance des bactéries lactiques aux sels biliaires est liée à l'activité enzymatique (hydrolases de sels biliaires BSR) qui permet l'hydrolyse de ces substances conjuguées. Cette activité est observée particulièrement chez les souches isolées à partir des produits d'origine animale ou bien des selles (**Bateup et al., 1995 ; Tannock., 1999**). Donc c'est le cas de nos souches qui sont isolées à partir du lait fermenté et ultrabiotique.

Les variations observées sur la tolérance de nos souches aux différentes concentrations des sels biliaires sont dues probablement à la physiologie qui se diffère d'une espèce bactérienne à l'autre ainsi que d'une souche à l'autre dans la même espèce. Ceci est en accord avec les travaux de (**Marteau et al., 1996**) qui ont clairement démontré, *in vitro*, que les sels biliaires avaient un effet bactéricide de la même manière que l'acidité gastrique, cette étude démontre une différence dans la sensibilité aux sels biliaires entre les espèces bactériennes et entre les souches elles-mêmes. Les sels biliaires auraient un effet détergeant sur les membranes cellulaires ce qui a un effet sur la perméabilité cellulaires (**Tannock et al., 1999**).

V. 6- résultats du test d'antibiogramme

La figure présente quelques résultats de l'antibiogramme réalisé sur les 11 souches lactiques acido-tolérantes.

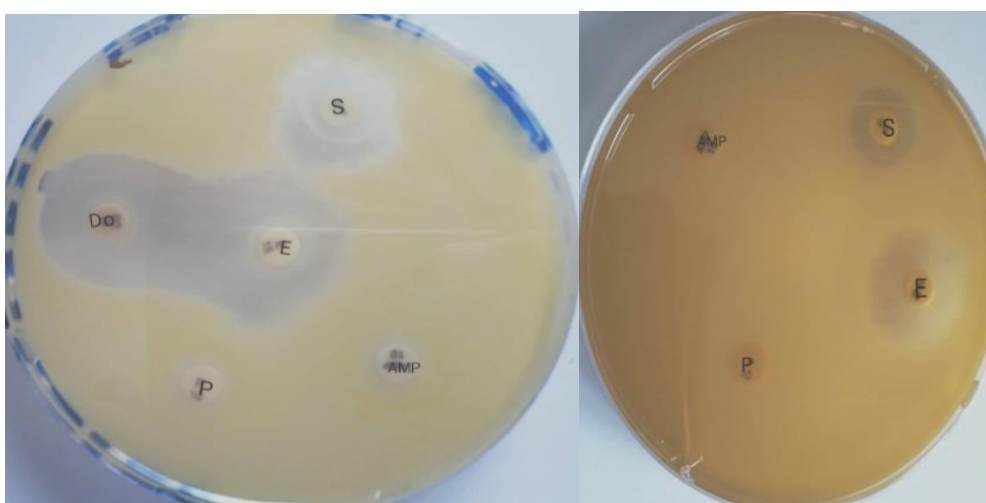


Figure 12 : résultat de l'antibiogramme

Résultats et discussions

Tableau 10 : Les résultats d'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques .

S/Ant	AMP	P	DO	E	S
L 3	R	R	S	S	I
L 4	R	R	I	S	S
L 5	R	R	I	S	I
L 6	R	R	S	I	I
L 7	R	R	R	S	I

(R) : résistant (I) : intermédiaire (S) : sensible

Les résultats dans le, tableau 11 ont montré que toutes les souches testées sont résistantes aux deux antibiotiques Penicillin et Ampicilline .

Seulement une souche L 7 sont résistant au Doxycycline .

Pour le Erythromycine les souches présentant une sensibilité sont(L 3 , L 4, L5,L7) et 2 sont sensibles à Doxycycline (L 3 , L6) et une sensible à Selon **Halami et al., (2000)**, la plupart des bactéries lactiques sont résistantes aux principaux antibiotiques. Cette résistance est marquée en particulier pour des *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* vis-à-vis de la famille des Cyclines tels que le Doxycycline. La résistance aux antibiotiques peut être attribuée à la synthèse des enzymes contre ces derniers.



CONCLUSION:

Conclusion

Les résultats ont montré que les Bactéries Lactiques isolée à partir d'un ultrabiotique se comporte comme un bon candidat à la formulation des ferments lactiques à usage industriel. L'idée d'incorporer des microorganismes dans l'alimentation humaine ou d'utiliser des effets bénéfiques potentiels de la présence de ces microorganismes remonte à la plus haute antiquité. A l'heure actuelle, différentes études mettent en exergue l'effet bénéfique des bactéries et leurs innocuités liées aux caractères non pathogènes des souches utilisées.

Notre étude avait comme but de tester le comportement des souches de bactéries lactiques vis-à-vis des conditions du tube digestif in vitro. Les 11 souches qui font l'objet de cette étude ont passé par quatre tests à savoir : le pH de l'estomac, l'anaérobiose, les sécrétions biliaires et la sensibilité aux antibiotiques.

Les résultats obtenus révèlent une tolérance du pH 2 par 9 souches parmi les 11. Pour l'anaérobiose et la résistance aux sels biliaires, toutes les souches qui ont montré une tolérance au pH de l'estomac ont réussi à passer par ces deux barrières. Le test de l'antibiogramme a montré que la plupart des souches ont développé une résistance à la majorité des antibiotiques utilisés ce qui est justifié par l'origine de ces souches prévenant des animaux déjà traités par ces substances.

Nous proposons comme suite à ce travail l'étude de l'effet probiotique, des propriétés technologiques et sanitaires par la détermination de la nature de leurs métabolites ainsi que le test in vivo de ces caractéristiques avec d'autre souche probiotique pour savoir l'activation et inhibition sans oublier de tester d'autre antibiotique qui sont commercialisés tout ça pour préserver la flore administrée et indigène durant le traitement par antibiotique.

L'eau physiologique:

L'eau distille.....	1000 ml.
Na Cl.....	9g.
pH.....	7

Stérilisation par autoclavage à 120C° pendant 20 min.

Solution PH :

L'eau distillée.	
H Cl.	
NaOH.	
pH.....	2et 3 et 6,8.

Stérilisation par autoclavage à 120C° pendant 20 min.

- Milieu Muller Hinton (Muller et Hinton, 1941)

Composition	g/l
Infusion de viande de boeuf	300ml
Peptone de caséine	17.50g
Amidon de maïs	1.50g
Agar-agar	15 g
Eau distillé	11

Autoclavage 120°C pendant 20min

- La gélose MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Composition	g/l
Peptone	10g
Extrait de viande	Peptone
Extrait de levure	10g
Glucose	Extrait de viande
Acétate de sodium trihydraté	8g
Citrate d'ammonium	Extrait de levure
Tween 80	1ml
Hydrogénophosphate de potassium	2g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0.2g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0.05g
Agar-agar	15g

Autoclavage 120°C pendant 20min

Composition de ultrabiotique :



Ultrabiotique

Ultrabiotique, l'expert du probiotique, apporte des souches de ferments lactiques au cœur de la flore.

- Une **diversité** des souches de ferments lactiques et une **quantité adéquate**
- Des souches **gastro-digestives** : elles résistent à l'acidité gastrique et aux selles denses. Elles arrivent saines saines dans l'intestin.
- Une **capacité d'adhésion** aux cellules intestinales pour une bonne colonisation intestinale.
- Des souches qui appartiennent à 3 familles : les **lactobacilles**, et les **bifidobactéries** qui composent majoritairement notre microflore.
- Une **gélule végétale** pour assurer la protection des souches de ferments lactiques sensibles.
- Des souches **scientifiquement documentées**
- Des **conditions de conservation** proches au maximum de leur origine.

CONSEILS D'UTILISATION :

1 gélule matin et 1 gélule soir par jour, à jeun avec un verre d'eau, de préférence pendant un repas.

Il est possible d'ajouter les gélules à du mélange à soupe, yaourt, lait, jus de fruits, compote, yaourt...
A renouveler aussi souvent que nécessaire.

10 souches végétales

Nutrisante