



N°Ref :.....

## Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

# Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Appliquée et Environnement

Option : Biochimie et Microbiologie Appliquée

Thème :

## *Etude des aptitudes probiotiques des bactéries lactiques*

Présenté par : Kerour Asma

Boucettouh Soulaf

Devant le jury composé de :

M<sup>r</sup> BOUBENDIR Abdelhafid

M<sup>lle</sup> AMMARI Salima

M<sup>lle</sup> HADEF Sawsen

Maître de Conférences A (C.U.M)

Maître Assistante A (C.U.M)

Maître Assistante A (C.U.M)

Président

Examinatrice

Promotrice

Année Universitaire: 2016/2017

## Remerciements



*Avant tout, nous remercions "Allah", le Clément, le Miséricordieux, le tout Puissant. Louange à "Allah " Seigneur du monde, qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail, ainsi que ses innombrables bienfaits.*

*Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nous tenons avant tout à remercier notre promotrice M<sup>lle</sup> HADEF Sawsen, Maître Assistante A, qui a accepté de nous encadrer, qui a nous guidé par ses précieux conseils et suggestions pertinentes et nous ont bien expliqué les étapes de ce travail.*

*Nous remercions également:*

*M<sup>r</sup> BOUBENDIR Abdelhafid, Maître de conférences A, pour l'honneur qu'il nous a fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.*

*M<sup>lle</sup> AMMARI Salima, Maître Assistante A, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Un grand merci au chercheur : M<sup>r</sup> FOUGHALIA Abdelhamid pour son aide précieuse et l'informaticien BOUCETTOUH Zouhir. Sans oublier le personnel des laboratoires pédagogiques du Centre Universitaire de Mila.*

*Nos très spéciaux remerciements reviennent à nos familles et nos amis pour leurs encouragements et leur compréhension*

*Enfin, nous remercions tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, trouvant ainsi l'expression de nos profondes gratitude et respects.*

## *Dédicaces*



*A nos mères,*

*"Vous nous avez donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.*

*Tous ce que nous pouvons vous offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que nous vous portons.*

*En témoignage, nous vous offrons ce modeste travail pour vous remercier pour vos sacrifices et pour l'affection dont vous nous avez toujours entourées. "*

*A nos pères,*

*"Aucune dédicace ne serait exprimer nos sentiments, que Dieu vous préserve et vous procure santé et longue vie. "*

*A nos frères,*

*A nos sœurs,*

*A notre famille,*

*A nos amis (es).*

*Asma & Soulaf*



## *Résumé*

---

Les bactéries majoritairement utilisées comme potentiels probiotiques appartiennent au groupe des bactéries lactiques. Afin de remplir cette fonction, ces bactéries doivent répondre à un certain nombre de critères de sélection : technologiques, sécuritaires et fonctionnelles. Dans ce travail, dix souches de bactéries lactiques d'origine locale (six souches de *Lactobacillus* sp. et quatre souches d'*Enterococcus* sp.) ont été purifiées et examinées pour leurs aptitudes probiotiques afin d'évaluer leur intérêt sanitaire et nutritionnel. D'après les résultats, les souches ont montré une résistance remarquable vis-à-vis des conditions hostiles : l'acidité, les sels biliaires, 0.4% de phénol. Elles ont montré une bonne production d'acide, une bonne hydrophobicité et une capacité de s'adhérer au tissu épithélial. Les tests d'auto-agrégation, de coaggrégation, d'activité  $\beta$ -galactosidase, d'activité antibactérienne et de coexistence ont été aussi révélés intéressants. Une résistance modérée aux antibiotiques et une absence du caractère hémolytique ont été enregistrées.

Ces résultats renforcent leur choix en tant que probiotiques « surs » pour une éventuelle utilisation dans plusieurs domaines de la vie.

**Mots clés :** Bactéries lactiques, probiotique, locale, résistance, conditions hostiles.

## *Abstract*

---

The most used bacteria as probiotic potentials belong to the group of lactic acid bacteria. To fulfill this function, these bacteria must meet a number of selection criteria: technological, safe and functional. In this work ten strains of lactic acid bacteria of local origin (six strains of *Lactobacillus* sp. And four strains of *Enterococcus* sp.) Were purified and examined for their probiotic abilities in order to assess their health and nutritional value. According to the results, the strains showed remarkable resistance to hostile conditions: acidity, bile salts, 0.4% phenol. They showed good acid production, good hydrophobicity and ability to adhere to epithelial tissue. The tests of self-aggregation, coaggregation, -galactosidase activity, antibacterial activity and coexistence were also found to be advantageous. Moderate resistance to antibiotics and absence of hemolytic trait were recorded.

These results reinforce their choice as "safe" probiotics for a possible use in several life areas.

**Keywords:** lactic bacteria, probiotic, local, resistance, hostile conditions.

## المخلص

البكتيريا التي تستخدم أساسا في الإمكانيات البروبيوتكية تنتمي إلى مجموعة البكتيريا اللبنية.

لتحقيق هذه المهمة، يجب على هذه البكتيريا الاستجابة إلى عدد معين من معايير الانتقاء: التكنولوجية، الأمنية و الوظيفية.

في هذا العمل، عشر سلالات من البكتيريا اللبنية ذات المنشأ المحلي (ست سلالات من جنس *Lactobacillus sp.* وأربعة سلالات من جنس *Enterococcus sp.*)، تم تنقيتها واختبار قدراتها البروبيوتكية و هذا لتقييم أهميتها الصحية و الغذائية.

من خلال النتائج، أظهرت السلالات مقاومة ملحوظة إزاء الظروف العدائية: الحموضة، الأملاح الصفراوية، 0.4 % من الفينول. إنتاج جيد للحمض، hydrophobicité معتبرة ضف إلى ذلك القدرة على الالتصاق بالأنسجة الطلائية. إختبارات التجميع الذاتي، coaggregation، النشاط غالاكتوزيداز، النشاط ضد المكروبات والتعايش مثيرة للاهتمام أيضا، كما سجلت مقاومة معتدلة للمضادات الحيوية وغياب الطابع الانحلالي للكريات الحمراء.

هذه النتائج تعزز اختيارها كبروبيوتيك "آمنة" وإمكانية استخدامها في العديد من مجالات الحياة.

**الكلمات المفتاحية:** البكتيريا اللبنية، بروبيوتيك، المحلية، مقاومة وظروف معادية.

---

***Table des  
matières***

---

# Table des Matières

Liste des tableaux.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
<b>Introduction</b> .....	01

## Partie I : Synthèse Bibliographique

### Chapitre I : Les bactéries lactiques

I.1. Généralités .....	03
I.2. Ecologie et nutrition des bactéries lactiques.....	03
I.3. Taxonomie des bactéries lactiques.....	04
I.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques.....	06
I.4.1. <i>Lactobacillus</i> .....	06
I.4.2. <i>Enterococcus</i> .....	07
I.4.3. <i>Streptococcus</i> .....	08
I.4.4. <i>Lactococcus</i> .....	08
I.4.5. <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i> .....	08
I.4.6. <i>Leuconostoc</i> .....	09
I.4.7. <i>Bifidobacterium</i> .....	09
I.5. Physiologie et principales voies fermentaires chez les bactéries lactiques.....	10
I.5.1. Voie homofermentaire ou EMP.....	10
I.5.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphates.....	10
I.6. Intérêts et applications industrielles des bactéries lactiques.....	11
I.6.1. Domaine alimentaire.....	11
I.6.1.1. Rôle sur la structure, la texture et les caractéristiques organoleptiques.....	12
I.6.1.2. Rôle dans la conservation.....	12
I.6.2. Domaine de santé.....	12
I.7. Les bactéries lactiques comme probiotique.....	13

## Chapitre II : Les probiotiques

II.1. Historique et généralités.....	14
II.1.1. Historique.....	14
II.1.2. Définition.....	14
II.1.3. Démarches générales pour la sélection des probiotiques.....	15
II.1.4. Principaux micro-organismes au potentiel probiotique.....	16
II.2. Réglementation : médicaments et aliments.....	18
II.2.1. Aliments probiotiques.....	18
II.2.2. Médicaments probiotiques.....	19
II.3. Pharmacologie des probiotiques.....	20
II.3.1. Principes actifs.....	20
II.3.2. Principaux modes d'action.....	20
II.3.3. Posologie des probiotiques.....	22
II.3.4. Interaction bactéries /hôte.....	22
II.3.5. Applications thérapeutiques et groupes cibles humains.....	24
II.3.5.1. Amélioration de la digestion du lactose.....	24
II.3.5.2. Réduction du taux de cholestérol sanguin.....	24
II.3.5.3. Diminution des allergies alimentaires.....	25
II.3.5.4. Réduction du risque de diarrhée.....	25
II.3.5.5. Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin.....	25
II.3.5.6. Prévention du cancer du côlon et autres cancers.....	25
II.3.6. Évaluation du risque sanitaire des probiotiques sur l'homme.....	26
II.3.6.1. Infections.....	26
II.3.6.2. Activités métaboliques délétères.....	26
II.3.6.3. Immunomodulation excessive.....	26
II.3.6.4. Transfert de gènes.....	26
II.4. Utilisation des bactéries probiotiques dans les produits laitiers.....	27
II.5. Utilisation potentielles dans d'autres secteurs de l'alimentation humaine.....	27
II.6. Procédés de fabrication et de commercialisation.....	27

## Partie II: Etude Expérimentale

### II. Matériels et méthodes

<b>II.1. Matériel</b> .....	29
II.1.1. Matériel biologique.....	29
II.1.1.1. Les souches bactériennes.....	29
II.1.1.2. Les souches indicatrices.....	29
II.1.1.3. Le segment iléal.....	30
II.1.1.4. Les sels biliaires.....	30
II.1.1.5. Le sang humain.....	30
II.1.1.6. Disques d'antibiotiques.....	30
II.1.1.7. Le lait écrémé.....	30
II.1.2. Milieux de culture.....	30
II.1.3. Produits chimiques.....	31
II.1.4. Tampons.....	31
II.1.5. Appareillage et autres.....	31
<b>II.2. Méthodes</b> .....	32
II.2.1. Méthodologie générale.....	32
II.2.2. Revivification et purification des souches bactériennes.....	33
II.2.3. Confirmation de la pureté des souches.....	33
II.2.3.1. Critères morphologiques.....	33
II.2.3.1.1. Examen macroscopique.....	33
II.2.3.1.2. Examen microscopique.....	33
II.2.3.2. Critères biochimiques.....	33
II.2.3.2.1. La production d'oxydase.....	34
II.2.3.2.2. La production de catalase.....	34
II.2.4. Etude des aptitudes probiotiques d'un souche de bactéries lactiques.....	35
II.2.4.1. Production d'acide.....	35
II.2.4.2. Résistance des bactéries lactiques aux conditions hostiles gastro-intestinales.....	37
II.2.4.2.1. Tolérance à l'acidité.....	37
II.2.4.2.2. Tolérance aux sels biliaires.....	37
II.2.4.2.3. La résistance à 0.4% de phénol.....	39

II.2.4.3. Tests de sécurité.....	39
II.2.4.3.1. Test d'hémolyse.....	39
II.2.4.3.2. La résistance aux antibiotiques.....	40
II.2.4.4. Tests des propriétés fonctionnelles et physiologiques.....	40
II.2.4.4.1. L'activité -galactosidase.....	40
II.2.4.4.2. Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial.....	41
II.2.4.4.3. Test d'hydrophobicité.....	42
II.2.4.5. Mise en évidence des activités d'agrégation.....	43
II.2.4.5.1. Autoagrégation.....	43
II.2.4.5.2. Coagrégation.....	44
II.2.4.6. Etude des interactions bactériennes.....	44
II.2.4.6.1. L'activité antibactérienne.....	44
II.2.4.6.2. Test de coexistence.....	44
II.2.5. Traitement statistique des résultats.....	45

### **III. Résultats et discussion**

III.1. Revivification et confirmation de la pureté des souches.....	46
III.2. Examen macroscopique et microscopique.....	46
III.2.1. Caractérisation macroscopique.....	46
III.2.2. Caractérisation microscopique.....	46
III.3. Tests biochimiques des souches lactiques.....	47
III.4. Etude des aptitudes probiotiques d'un souche de bactéries lactiques.....	47
III.4.1. Production d'acide.....	47
III.4.2. Résistance des bactéries lactiques aux conditions hostiles gastro-intestinales.....	53
III.4.2.1. Tolérance à l'acidité.....	53
III.4.2.2. Tolérance aux sels biliaires.....	55
III.4.2.3. Résistance au phénol.....	57
III.4.3. Tests de sécurité.....	59
III.4.3.1. Test d'hémolyse.....	59
III.4.3.2. Résistance aux antibiotiques.....	60
III.4.4. Tests de propriétés fonctionnelles et physiologiques.....	63
III.4.4.1. Activité -galactosidase.....	63
III.4.4.2. Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial.....	65

III.4.4.3. Test d'hydrophobicité.....	66
III.4.5. Mise en évidence des activités d'agrégation.....	68
III.4.6. Etude des interactions bactériennes.....	71
III.4.6.1. L'activité antimicrobienne.....	71
III.4.6.2. Test de coexistence.....	73
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>75</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>77</b>

---

# *Illustrations*

---

---

***Liste des  
tableaux***

---

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Habitats des bactéries lactiques	4
<b>2</b>	Principaux genres de bactéries lactiques	9
<b>3</b>	Les définitions les plus couramment des probiotiques	15
<b>4</b>	Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques	16
<b>5</b>	Exemples de micro-organismes ayant un intérêt probiotique	17
<b>6</b>	Espèces de bactéries lactiques utilisées et leurs origines	29
<b>7</b>	Tests biochimiques des souches lactiques	48
<b>8</b>	Activité hémolytiques des bactéries lactiques	48
<b>9</b>	les résultats de l'antibiogramme ainsi que la sensibilité et la résistance des souches lactiques vis à vis es dix antibiotiques (les rayons de la zone d'inhibition)	61
<b>10</b>	Adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales de l'iluém	65
<b>11</b>	Aptitude des souches lactiques pour adhérer in vitro au tissu épithélial, pourcentage d'hydrophobicité et la capacité d'autoagregation	71
<b>12</b>	Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques vis-à-vis les souches pathogènes	72
<b>13</b>	Interactions entre les bactéries lactiques	74

---

*Liste des  
figures*

---

<b>LISTE DES FIGURES</b>		
<b>Figure N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques des genres associés, obtenu par analyse des ARNr16S	6
<b>2</b>	Principal voies du métabolisme du glucose par les bactéries lactiques	11
<b>3</b>	Démarche scientifique de l'évolution d'un effet probiotique	19
<b>4</b>	Les différents mécanismes d'action des probiotiques	21
<b>5</b>	Répartition bactérienne dans le tractus digestif, genres bactériens retrouvés et stress rencontrés par les bactéries	23
<b>6</b>	Schéma de fabrication des probiotiques	28
<b>7</b>	Méthodologie d'étude des aptitudes probiotique des bactéries lactiques	32
<b>8</b>	Étapes de la revivification et la purification des bactéries lactiques	35
<b>9</b>	Mesure de la production d'acide	36
<b>10</b>	Détermination de l'effet des sels biliaires sur la viabilité des souches	38
<b>11</b>	La méthode de micro-dillution et utilisation de la cellule de Malassez.	39
<b>12</b>	Quelques étapes du test d'adhésion	42
<b>13</b>	Détermination de taux d'hydrophobicité des souches lactiques	43
<b>14</b>	Test de l'activité antibactérienne des souches lactiques	45
<b>15</b>	Revivification de quelques souches étudiées sur bouillon MRS. "L": <i>Lactobacillus</i> sp. ; "E": <i>Enterococcus</i> sp	46

<b>16</b>	Exemples d'aspect culturels des bactéries lactiques sur gélose MRS après 24h d'incubation à 37°C	47
<b>17</b>	Aspect morphologique cellulaire des cultures lactiques pures (x100)	47
<b>18</b>	Résultat noté lors de la titration du lait (virage de la couleur en rose pale)	49
<b>19</b>	Production d'acide lactique par les souches <i>Enterococcus</i> sp. codées E1, E2, E4 et E6	50
<b>20</b>	Production d'acide lactique par les souches <i>Lactobacillus</i> sp. codées L1, L2, L4, L5, L7 et L8	50
<b>21</b>	Evolution de pH au cours de temps chez les souches <i>Enterococcus</i> sp codées E1, E2, E4 et E6	51
<b>22</b>	Evolution de pH au cours de temps chez les souches <i>Lactobacillus</i> sp codées L1, L2, L4, L5, L7 et L8	51
<b>23</b>	La tolérance des différentes souches lactiques à l'acidité.	53
<b>24</b>	Tolérance des différentes souches lactiques envers les sels biliaires	56
<b>25</b>	Tolérance des différentes souches lactiques envers le phénol	58
<b>26</b>	Activité hémolytique de quelques souches lactiques sur gélose Columbia	60
<b>27</b>	Zone d'inhibition de quelques souches lactiques sur gélose MRS	62
<b>28</b>	Activité $\beta$ -galactosidase des souches lactiques	64
<b>29</b>	L'adhésion des bactéries lactiques au tissu épithélial du iléum observée par microscope (X100) après coloration au cristalviolet (0.5%)	65
<b>30</b>	Pourcentage de l'hydrophobicité des différentes souches testées	67
<b>31</b>	Interaction des souches lactiques avec le toluène	67
<b>32</b>	Pourcentage de coagrégation des souches lactiques avec l' <i>E.coli</i>	69

<b>33</b>	Pourcentage de l'autoagrégation des souches lactiques	69
<b>34</b>	Activité antibactérienne (mm) des souches lactiques	73
<b>35</b>	Résultats des interactions entre quelques souches lactiques	74

---

***Liste des  
abréviations***

---

❖ **Noms de genres bactériens**

*B* : *Bifidobacterium*

*E* : *Entérocooccus*

*E.coli* : *Escherichia coli*

*L* : *Lactobacillus*

*Ln* : *Leuconostoc*

*S* : *Streptococcus*

❖ **Unités de mesures**

D° : degré Dornic

DO : Densité Optique

N : normalité

tr/min : tour par minute

UFC : Unité Formant Colonie

v/v : volume par volume

❖ **Autres abréviations**

ADN : Acide DéoxyriboNucléique

AINS: Anti-inflammatoires non stéroïdiens

ATP: Adénosine TriPhosphate

BL : Bactérie lactique

CO<sub>2</sub>: Dioxyde de Carbone

DO : Densité Optique

EMP : Embden-Meyerhof-Parnas

EPS: ExoPolySaccharides

FAO: Food and Agriculture Organization

FBA: Fructose 1, 6 – bis phosphate aldolase

G+C: Guanine + Cytosine

GRAS: Generally Recognized As Safe

H% : pourcentage d'hydrophobicité

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène

HCl : Acide chlorhydrique

LTH : Lymphocytes T helper

MH : Muller Hinton

MRS: Man Rogosa Sharp

NaCl: Chlorure de sodium

NaOH: Hydroxyde de sodium

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ONPG : Ortho-nitrophényl- -D-galactopyranoside

PBS : Phosphate Buffer salin

pH : Potentiel d'Hydrogène

PTS: Système phosphotransférase PEP-dépendant

QPS: Quality Presumption of Safety

SDS: Sodium Dodecylsulfate

Sp. : Espèce non précisée

Ssp. : Sous espèce

V : volume

WHO: World Health Organisation

---

# *Introduction*

---

L'utilisation des probiotiques a connu une énorme évolution dans les pays technologiquement avancés, l'exploitation de ce genre est par contre très limitée dans certains autres pays comme l'Algérie, cette limitation concerne la diversité des produits présents sur le marché, mais également le nombre des souches introduites dans ces produits, cela est liée aux contraintes posées par le secteur économique qui néglige la recherche scientifique (**Leghouchi et al., 2007 ; UNICEF/OMS, 2009** )

En raison des problèmes liés à l'utilisation des antibiotiques dont le principal est l'antibiorésistance des bactéries, la législation est de plus en plus restrictive quant à leur utilisation comme facteurs de croissance. Il devient nécessaire la recherche des nouvelles solutions alternatives à l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance. Parmi ces solutions, l'utilisation des probiotiques. Ces derniers sont des micro-organismes (bactéries, levures...) qui ont un effet bénéfique (en quantité suffisante) sur la santé en inhibant le développement d'autres micro-organismes indésirables ou pathogènes. Ils ont un rôle important dans l'amélioration de la digestion et le maintien de l'équilibre de la flore intestinale et de l'équilibre acido-basique au niveau du côlon (**Nagpal et al., 2012 ; Tulumoglu et al., 2013 ; Manhar et al., 2016** ).

Depuis quelques dizaines d'années, l'utilisation des bactéries probiotiques en alimentation humaine et animale a eu une bonne réputation. Parmi les probiotiques les plus connus, les bactéries lactiques qui colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et appartenant à la flore intestinale normale et vaginale humaine ou animale, ont toujours montré un effet bénéfique sur la santé et en particulier sur l'équilibre de la flore intestinale. En effet, l'ingestion des bactéries lactiques, a été pratiquée depuis 1907, pour réduire les troubles intestinaux et améliorer la digestion. Cette utilisation est due aux effets nutritionnels et thérapeutiques de ces bactéries car elles enrichissent le milieu où elles se trouvent en vitamines, acides aminés, composés organiques, enzymes et bactériocines responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes. Elles sont également impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (**El-Ghaish et al., 2011 ; Toscano et al., 2015 ; Galat et al., 2016**).

Pour une éventuelle utilisation comme probiotique et pour qu'un organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique il doit d'abord avoir plusieurs critères qui le confèrent une bonne stabilité aux conditions de survie dans le tractus gastro intestinal, c'est pourquoi de nombreuses études visent à sélectionner des souches capables de produire l'acide lactique, de tolérer l'acidité gastrique, les sels biliaires, d'adhérer temporairement aux cellules épithéliales et de produire des substances antagonistes (Oelschlaeger, 2010 ; Todorov *et al.*, 2011 ; Vijaya *et al.*, 2015).

En Algérie, nous disposons d'un potentiel énorme en matière de bactéries lactiques autochtones, mais nous constatons peu de données relatives à leur potentiel probiotique subsistent. Ainsi, nous nous sommes intéressés à prendre en charge ce volet scientifique afin de contribuer à l'apport de renseignement pratique à ce sujet.

Alors, à travers cette étude, nous avons essayé d'évaluer les aptitudes probiotiques de quelques souches de bactéries lactiques locales. C'est pour cela nous avons opté pour le plan suivant :

- ) Une synthèse bibliographique mettant l'accent d'une part, sur les bactéries lactiques, leurs principales caractéristiques et application industrielles et d'autre part sur les probiotiques : plus précisément les critères de sélection des souches probiotiques.
- ) Une deuxième partie expérimentale présente la démarche optée. Elle regroupe les différentes méthodes et techniques mises en œuvre dans le cadre de l'évaluation des aptitudes probiotiques de quelques souches de bactéries lactiques.
- ) Une troisième partie regroupe les principaux résultats obtenus et leurs discussions.
- ) Une conclusion générale récapitulant les principaux résultats de cette étude avec une présentation des principales perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique d'étude.

---

*Partie I*

*Synthèse*

*Bibliographique*

---

---

# *Chapitre I*

---

### I.1. Généralités

Le terme de bactéries lactiques est intimement associé aux bactéries impliquées dans la fermentation des aliments pour l'homme et l'animal (**Limsowtin et al., 2004 ; Gemechu, 2015**). Elles sont utilisées traditionnellement dans la fermentation des végétaux, des produits laitiers, carnés et de panification (**Dhamale et al., 2015**). Décrites pour la première fois par **Orla-Jensen** au début du XX<sup>ème</sup> siècle (**Quinto et al., 2014**).

Comme leur nom l'indique, les bactéries lactiques sont connues par leur capacité à fermenter des sucres pour produire de l'acide lactique (**Mozzi et al., 2010**). Elles jouent un rôle fondamental dans la conservation des aliments en raison d'une part, de leur pouvoir acidifiant (acide lactique) qui inhibe la croissance de la plupart des germes non lactiques et d'autre part, grâce à leur capacité de produire d'autres substances antimicrobiennes comme les bactériocines (**Cizeikiene et al., 2013 ; Adeniyi et al., 2015**).

D'après **Pilet et al. (2005)**, Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, constitué de cocci et de bacilles. Ce sont des bactéries à Gram positive, asporulantes, aéro-anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, immobiles et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C (**Badis et al., 2005 ; Zhang et Cai, 2014**).

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles ont de nombreuses exigences nutritionnelles (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (**Gevers, 2002 ; Hogg, 2005 ; Arena et al., 2015**). Elles sont toutes considérées comme « GRAS » (*Generally Recognized As Safe*), excepté certaines espèces d'entérocoques et certaines ont obtenu le statut QPS (*Quality Presumption of Safety*) (**Streit, 2008**).

### I.2. Ecologie et nutrition des bactéries lactiques

Malgré leurs capacités métaboliques réduites et leurs besoins nutritionnels complexes, les bactéries lactiques ont bien survécu dans des environnements spécifiques, en raison de leurs spécialisations en fermentation des sucres (**El-Ghaish, 2011**).

Les bactéries lactiques colonisent les habitats riches en nutriments. Elles sont présentes en tant que flore technologique dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les produits végétaux (choucroutes, pickles, olives fermentés), les levains de panification et les boissons alcoolisées (vins, bières blanches) (**Navarro et al., 2000**).

Ainsi que certains genres colonisent la bouche, les régions gastro-intestinales et uro-

génitales des humains et des animaux (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Turhan et Öner, 2014).

Les principaux habitats des groupes des bactéries lactiques sont donnés dans le tableau 01.

**Tableau 01 : Habitats des bactéries lactiques (Jerome *et al.*, 2004).**

Habitat	Groupe prédominant	Activité ou produit
Matériel végétal en décomposition	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Lactobacillus plantarum</i>	Cornichon, ensilage et Choucroute
Laiterie	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbruckii</i> , <i>L. lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroide</i>	Fromages, yaourts
Tractus gastro-intestinal des animaux (Oral, Intestinal)	<i>Streptococcus salivarius</i>	Flore normale
	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i>	Caries dentaires
	<i>Streptococcus faecalis</i>	Intestin; quelques pathogènes du tractus urinaire
Vagin des mammifères	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp.	Flore normale

En général, les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance tels que la vitamine B, les acides aminés, les peptides, et les bases puriques et pyrimidiques. Les milieux de culture sont complexes et dits "riches". Seul l'abaissement du pH sera souvent utilisé comme agent de sélection. Elles tolèrent en effet des pH acides (pH=5 et parfois moins) (Sachindra *et al.*, 2005 ; Nielsen *et al.*, 2008).

### I.3. Taxonomie des bactéries lactiques

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimio taxonomiques,

comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (Krieg, 2001 ; Chen *et al.*, 2003).

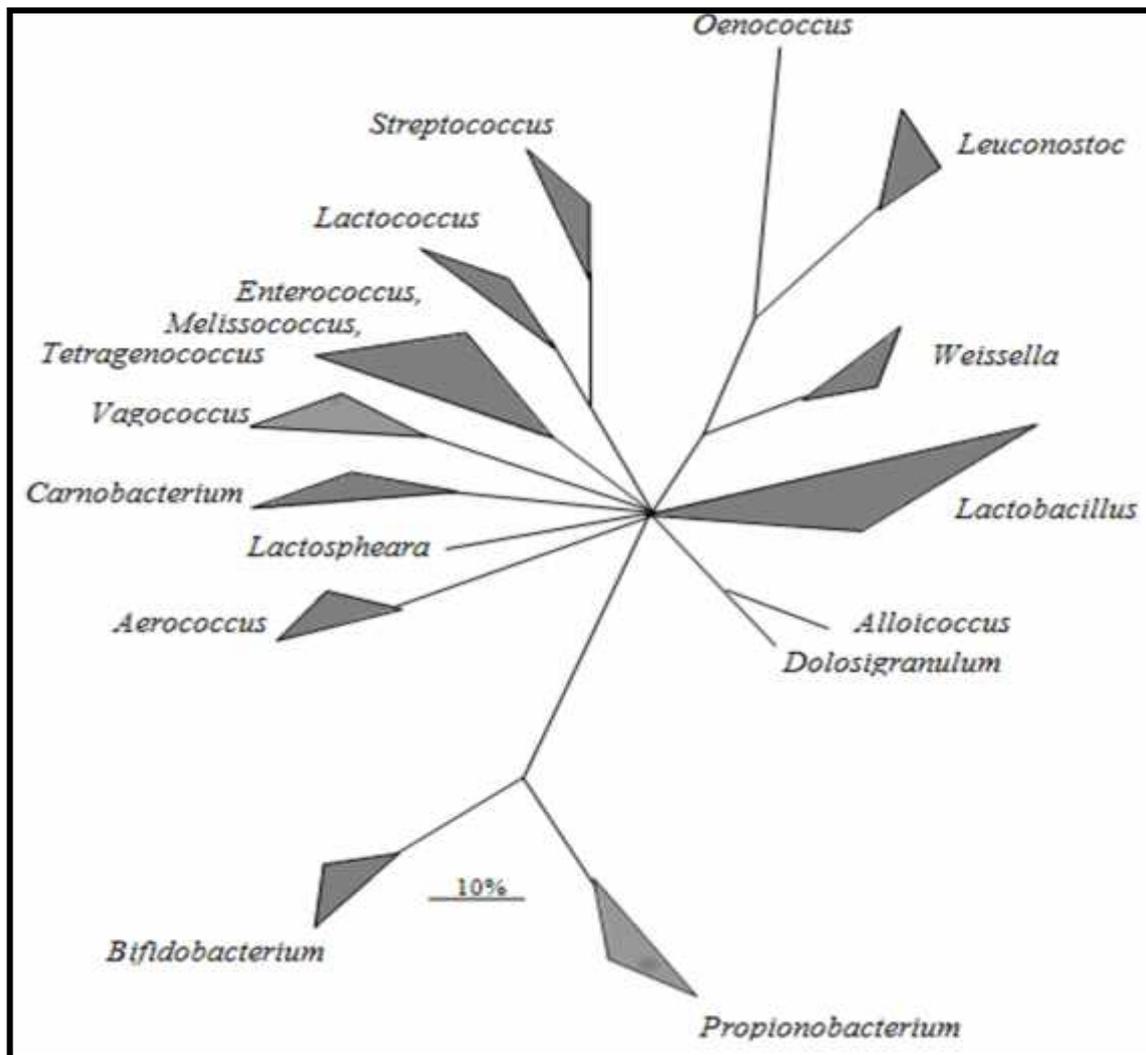
La taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente, la classification phénotypique est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel, la tolérance aux pH acides (Kunene *et al.*, 2000 ; Ghazi *et al.*, 2006).

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les glucides, tolérer les différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes (Ho *et al.*, 2007 ; Ercolini *et al.*, 2009). La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique du lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Pot, 2008 ; Bailiang *et al.*, 2015).

La classification s'appuie sur des données moléculaires comme la comparaison des séquences codant pour les ARN16S. D'après Ludwig *et al.* (2008), le phylum Firmicutes comprend trois classes : Bacilli, Clostridia et Erysipelotrichi. Appartenant à la classe Bacilli, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- ) Famille des Lactobacillaceae comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- ) Famille des Leuconostocaceae contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- ) Famille des Streptococcaceae comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Les révisions taxonomiques des bactéries lactiques montrent que ces dernières peuvent comprendre environ une quarantaine de genres. Les révisions récentes de la taxonomie des bactéries lactiques sont présentées dans le **Bergey's manual (2009)**.



**Figure 01:** Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Klein, 2003).

#### I.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

##### I.4.1. *Lactobacillus*

La famille des Lactobacillaceae comprend le plus grand nombre d'espèces GRAS, et de nombreuses souches sont parmi les bactéries les plus importantes de la microbiologie alimentaire et de la nutrition humaine en raison de leur contribution à la production d'aliments fermentés ou leur utilisation comme probiotiques (Giovanna et Sandra, 2015). Il s'agit des bacilles longs et fins souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Elles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et minéraux) (Guiraud *et al.*, 2003). Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est

encore utilisée dans l'industrie alimentaire (Tamime, 2002 ; Salvetti, 2012) :

**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...) sont *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*.

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

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

Les lactobacilles sont très utilisés dans l'industrie agroalimentaire (en laiterie...). Leur rôle est également important dans la fermentation des fruits et légumes (raisins, cornichons,...) (Figueiredo *et al.*, 2008 ; Siezen *et al.*, 2008 ; Lysianes, 2012).

#### **I.4.2. Enterococcus**

Les *Enterococcus* sont des micro-organismes mésophiles. Ils se développent dans une gamme des températures allant de 10 à 45°C, avec une température optimale de 35°C. Certaines espèces peuvent survivre à 60°C. Ce sont des coques homofermentaires. Ils poussent dans des conditions hostiles de 6.5% de NaCl, de lait renfermant 0.1 % de bleu de méthylène, de concentration sels biliaires de 0.4 % et dans une gamme de pH comprise entre 4.4 et 9.6 (LeBlanc, 2006 ; Galvez *et al.*, 2012 ; Henning *et al.*, 2015).

Les entérocoques produisent des bactériocines considérées comme des agents de contrôle biologique dans les aliments, en conservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles. Ils apportent des bénéfices pour la santé (effets positifs sur la flore intestinale, ils peuvent aussi avoir des propriétés probiotiques (Moreno *et al.*, 2006; Dio *et al.*, 2014). D'ailleurs, des préparations d'*E. Faecium* et d'*E. faecalis* sont été utilisées en tant que probiotiques. Certaines résistent aux antibiotiques et transfèrent de telles propriétés au moyen d'éléments génétiques mobiles (Guerra *et al.*, 2007 ; Ruiz-Moyano *et al.*, 2008).

Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *E. faecalis* et les espèces proches, généralement différenciées par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (Marteau *et al.*, 2004 ; Spear *et al.*, 2014).

### I.4.3. *Streptococcus*

Ce sont des coques en paire ou en chaîne, Gram positif, catalase négative, non sporulés, immobiles et anaérobies facultatifs. Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène, oral (tel que *Streptococcus salivariu* et *Streptococcus bovis*) et les autres streptocoques. *Streptococcus thermophilus* 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 permet de distinguer les *S. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Huys *et al.*, 2006 ; Desai *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2013).

### I.4.4. *Lactococcus*

Les Lactocoques ont la forme de coques à Gram positives et s'associent entre elles en paire ou en chaînes de longueur variable. Leur métabolisme est généralement homofermentaires avec, la production de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. ; *lactis* biovar et *diacetylactis* produisent le diacétyle. Elles se distinguent par leur température de croissance minimale inférieure ou égale à 10°C et optimale voisine de 30°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides (EPS) et des bactériocines (Bachmann *et al.*, 2012).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont généralement présentes dans divers aliments fermentés, l'environnement de produits laitiers et dans les sources végétales et animales, mais généralement pas dans les matières fécales ou dans le sol (Teuber et Geis, 2006).

### I.4.5. *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance (Guiraud et Rosec, 2004 ; Makhloufi, 2011).

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. Les pediocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries et les *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja (Tosukhowong *et al.*, 2005 ; Goubeyre *et al.*, 2011).

**I.4.6. *Leuconostoc***

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique, de CO<sub>2</sub> et d'éthanol. Les caractéristiques telles que la formation de dextrine, la capacité à croître à différents pH (5-7) et température (20-40°C). Le développement des *Leuconostoc* entraîne l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des EPS. L'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Tanigawa et Watanabe, 2011 ; Tanasupawat et al., 2015).

Les *Leuconostoc* principalement *Leuconostoc 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 CO<sub>2</sub>, des substances aromatiques telles que le diacétyl et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hassan et Frank, 2001; Ogier et al., 2008).

**I.4.7. *Bifidobacterium***

Les *Bifidobacterium* sont des bacilles présents dans la flore intestinale des nouveau-nés. Elles sont phylogéniquement proches des actinomycètes et les autres bactéries lactiques sont proches des clostridies. Les souches des *Bifidobacterium* peuvent survivre dans le transit intestinal et persister transitoirement dans le côlon. Les bifidobactéries ont besoin d'un pH neutre et d'un environnement anaérobie pour survivre et être viable au nombre requis pour fournir des avantages thérapeutiques (*Bifidobacterium bifidum*) (Settachaimongkon et al., 2014).

Le tableau 02 récapitule les principaux genres des bactéries lactiques ainsi que leurs caractéristiques.

**Tableau 02 : Principaux genres de bactéries lactiques (Yang, 2000).**

Genre	Morphologie	Type fermentaire	Forme d'acide lactique
<i>Streptococcus</i>	Coques en chaines	Homofermentaire	L-
<i>Leuconostoc</i>	Coques en chaines	Hétérofermentaire	D-
<i>Pediococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaire	DL-
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo- ou hétérofermentaire	D, L, DL

### **I.5. Physiologie et principales voies fermentaires chez les bactéries lactiques**

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Parce qu'elles ne possèdent pas un système respiratoire, elles doivent obtenir leur énergie par phosphorylation au niveau du substrat (**Atlan et al., 2008 ; Lahtinem et al., 2012**).

Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, tréhalose). Selon les genres, les bactéries lactiques utilisent l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres. Il s'agit des voies homofermentaire (Embden-Meyerhof-Parnas) et hétérofermentaire (**Wu MH et al., 2010**).

#### **I.5.1. Voie homofermentaire ou EMP**

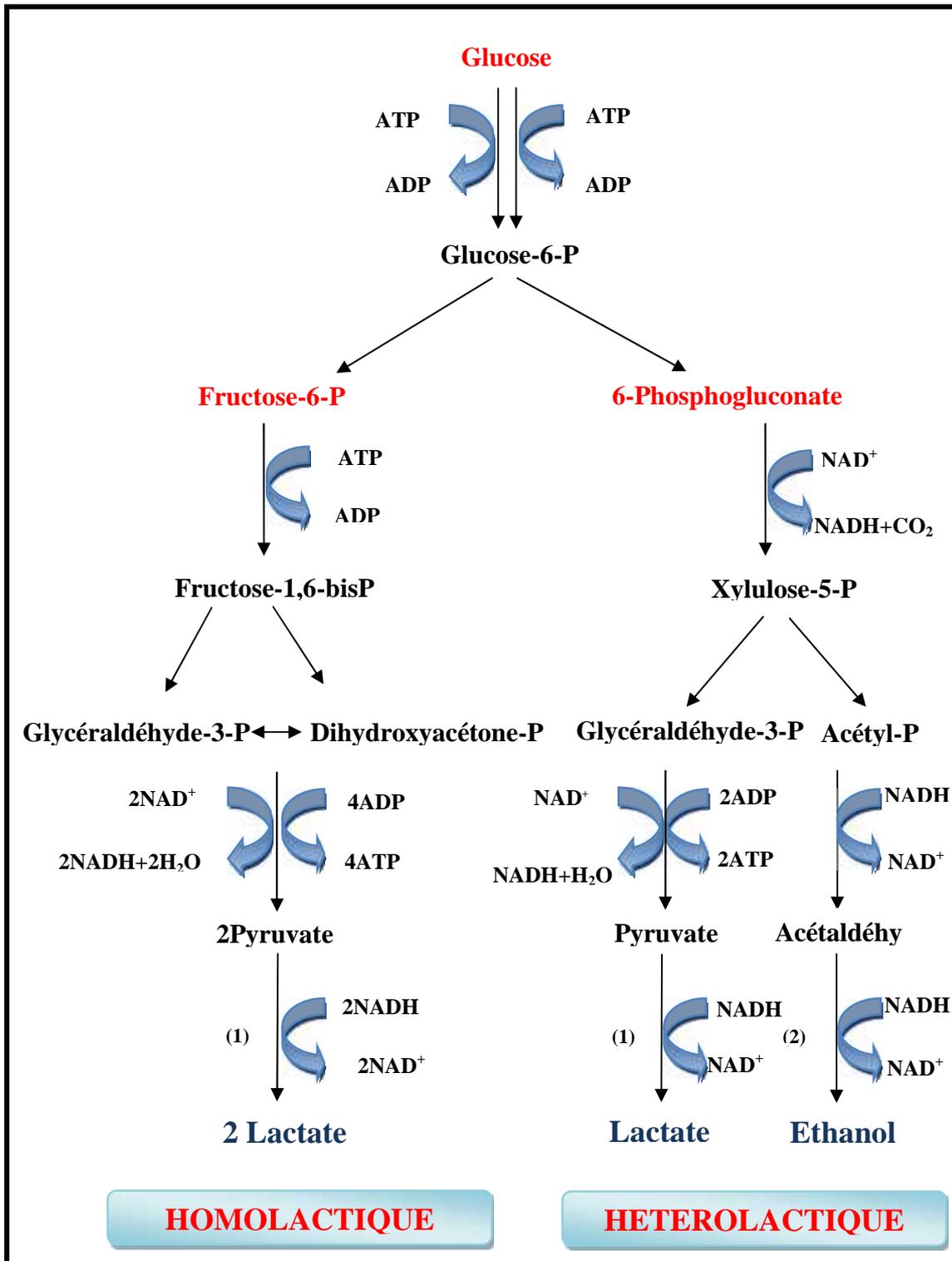
Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de Lactocoques, Pediocoques, ainsi que certains Lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (**Wee et al., 2006 ; Ma la nka et al., 2015**).

Toutes les bactéries lactiques à l'exception des genres : *Leuconstoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et certaines espèces du genre *Lactobacillus*, entravent la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses (ex : glucose). La fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBA), est une enzyme clé présente chez toutes les espèces homofermentaires (**Mozzi et al., 2010**).

#### **I.5.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphates**

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> sont dites hétérofermentaire. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostoc et certains lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS (**Savilahti et al., 2008 ; Al Kassa et al., 2014**).

Le métabolisme hétérofermentaire est deux fois moins énergétique que le métabolisme homofermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate, d'éthanol, de CO<sub>2</sub> et d'un seul ATP (**Raynaud, 2006**).



**Figure 02** : Principales voies du métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Modifié à partir de Makhloufi, 2012). [P : phosphate ; ADP: adénosine 5' diphosphate ; ATP: adénosine 5' triphosphate ; NAD<sup>+</sup>: nicotinamide adénine dinucléotide ; NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ; (1) : lactate déshydrogénase ; (2) : alcool déshydrogénase].

## **I.6. Intérêts et applications industrielles des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs secteurs d'activités, notamment dans le domaine de l'agriculture, de la santé et de l'industrie agroalimentaire. Elles présentent des activités métaboliques assez diversifiées. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (Streit *et al.*, 2007).

### **I.6.1. Domaine alimentaire**

#### **I.6.1.1. Rôle sur la structure, la texture et les caractéristiques organoleptiques**

En industrie agro-alimentaire, les bactéries lactiques sont utilisées pour aider à la fois à la fabrication et à la conservation des produits à partir de certaines matières premières telles que le lait, la viande, les végétaux et les céréales. En égard à leur pouvoir acidifiant, leur capacité à améliorer la texture des aliments, les bactéries lactiques sont de loin des agents d'amélioration de la qualité organoleptique des aliments (Kaktcham *et al.*, 2012). Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres (Hugenholtz *et al.*, 2002 ; Streit *et al.*, 2007).

#### **I.6.1.2. Rôle dans la conservation**

La technologie de biopréservation utilisant des bactéries lactiques inhibitrices constitue un outil supplémentaire au service des industriels qui peut contribuer à l'amélioration de la qualité et de la sécurité microbiologique. Elle constitue une alternative pour la conservation des produits réfrigérés qui ont une durée de conservation de plusieurs jours à plusieurs semaines (Lee *et al.*, 2006 ; Boudjemaa, 2008 ; Pilet *et al.*, 2009 ).

Parmi les nouvelles stratégies de conservation, notons l'application des nouvelles techniques physiques dites de pasteurisation ou de stérilisation à froid (hautes pressions, et champs électriques) en combinaison avec les bactériocines (Deegan *et al.*, 2006).

### **I.6.2. Domaine de santé**

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du XX<sup>ème</sup> siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus sp.* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant sa flore. L'extraordinaire diversité de structures des EPS en fait une classe de molécules dont les applications directes ou indirectes dans le domaine médical sont en plein essor (Langella *et al.*, 2001 ; Calvez *et al.*, 2009 ; Benasla, 2012 ; Tulini FL *et al.*, 2013 ).

### I.7. Les bactéries lactiques comme probiotique

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont consommées quotidiennement et en grande quantité par des populations très importantes. Dans les yaourts, par exemple, deux espèces de bactéries lactiques (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) sont présentes à  $10^8$ – $10^9$  germes par gramme. En plus de leur intérêt dans la fabrication et la préservation des produits alimentaires, certaines souches de bactéries lactiques ont été décrites comme ayant des effets bénéfiques sur la santé humaine dans le cadre des probiotiques (Picard *et al.*, 2005 ; Merrifield *et al.*, 2014).

Des travaux de plus en plus nombreux montrent ou suggèrent en effet les effets bénéfiques de ces bactéries. Un certain nombre d'études cliniques chez l'homme ou sur des modèles animaux ont notamment confirmé l'effet bénéfique des laits fermentés et des yaourts dans le cas d'intolérance au lactose, de diarrhées virales ou de diarrhées associées à la prise d'antibiotiques. Les mécanismes par lesquels les bactéries lactiques exercent leurs effets bénéfiques sont multiples et seront présentés ultérieurement (Shukla *et al.*, 2014).

---

# *Chapitre II*

---

## II.1. Historique et généralités

### II.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 probiotique a été développée principalement grâce aux travaux de **Metchnikoff**, ayant suggéré que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes accroît la longévité en réduisant dans le tube digestif la population de bactéries putréfiantes ou produisant des toxines. Une des premières définitions des probiotiques comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposée par **Lilly** et **Stillwell** en 1965. Depuis ce temps, la définition du terme probiotique a été modifiée à plusieurs reprises (**Lamoureux, 2000 ; Ait-Belgnaoui et al., 2005**). 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**).

### II.1.2. Définition

Le terme « probiotiques » est dérivé de deux mots grecs « pros » et « bio » qui signifient littéralement « pour la vie » contrairement au terme antibiotiques signifiant « contre la vie » (**O'May et Macfarlane, 2005 ; Seiladie et al., 2011**).

La **FAO** et l'**OMS** (2002), ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme probiotique 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* ».

Les probiotiques ont été définis de plusieurs manières, selon la compréhension des mécanismes de leur action sur la santé et le bien-être de l'homme (tableau 03).

**Tableau 03** : Les définitions les plus couramment des probiotiques.

Définitions	Références
Les probiotiques sont des micro-organismes qui en quantité suffisante (au moins $10^6$ _ $10^7$ UFC / g) exercent un effet positif sur la santé.	(Boylston <i>et al.</i> , 2004 ; Kingsley <i>et al.</i> , 2007).
Sont des biopréparations qui contiennent des cellules vivantes ou des métabolites de micro-organismes autochtones stabilisés.	(Jamaly <i>et al.</i> , 2011)
Sont des substances produites par les protozoaires pour stimuler la croissance des organismes.	(De Vrese et Schrezenmeir, 2008)

### II.1.3. Démarches générales pour la sélection des probiotiques

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Le choix des probiotiques dépend de ces propriétés et du type d'utilisation.

Pour qu'un produit soit reconnu comme étant probiotique, une évaluation basée sur plusieurs critères (tableau 04) doit être effectuée suivant les recommandations de la FAO/OMS sans oublier d'évaluer l'efficacité des souches sélectionnées chez l'homme avec des essais cliniques contrôlés (FAO/WHO, 2002 ; Amara *et al.*, 2015).

La sélection de souches probiotiques peut donc être divisée en quatre catégories distinctes : Bénéfice santé, innocuité, production industrielle et résistance aux stress du tractus gastro-intestinal car dans de nombreux cas, les avantages pour la santé ne sont obtenus que lorsqu'une souche probiotique atteint le site cible dans une zone métaboliquement active en nombre suffisant. Par exemple pour la livraison orale, les microorganismes probiotiques doivent survivre aux différents facteurs physico-chimiques, Enzymatiques et microbiens à travers le transit gastro-intestinal (l'acide gastrique et les sels biliaires duodénaux) (Cook *et al.*, 2012 ; Kumar *et al.*, 2012).

**Tableau 04** : Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques  
(FAO/OMS, 2002 ; Nousiainen *et al.*, 2004).

	<b>Le but recherché</b>
<b>Critères de sécurité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Historique de non pathogénicité (GRAS) ou (QSP).</li> <li>-Souche d'origine humaine ou alimentaire.</li> <li>-Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques.</li> <li>-Souche déposée dans une collection de cultures internationales.</li> <li>-Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques.</li> <li>-Pas de déshydroxylation des sels biliaires.</li> </ul>
<b>Critères fonctionnels</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Tolérance à l'acidité gastrique pour une survie pendant le passage par l'estomac et le duodénum.</li> <li>-Tolérance à la bile pour la survie pendant le passage par l'intestin grêle.</li> <li>-Production d'acide (à partir de glucose et lactose) et production de barrière acide efficaces dans l'intestin.</li> <li>-Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes (bactériocines) pour l'inhibition du développement des germes pathogènes.</li> <li>-Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus afin d'assurer la colonisation efficace et la réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface.</li> <li>-Stimulation du système immunitaire.</li> </ul>
<b>Critères technologiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini.</li> <li>-Conservation des propriétés probiotiques après production.</li> <li>-Résistance à la chaleur (survie pendant le processus de transformation).</li> <li>-Bonnes propriétés technologiques, croissance sur une large échelle et résistance aux bactériophages.</li> </ul>

#### II.1.4. Principaux micro-organismes au potentiel probiotique

Les bactéries probiotiques sont des membres de la flore normale de l'intestin, connues pour ne pas présenter des risques toxiques ou infectieux (GRAS) et sont relativement faciles à inclure dans des produits laitiers (Izquierdo, 2009 ; Patel *et al.*, 2014).

Le tableau 05 rapporte quelques souches probiotiques pour lesquelles des effets bénéfiques sur la santé sont bien documentés.

**Tableau 05** : Exemples de micro-organismes ayant un intérêt probiotique.

Micro-organismes	Références
	<i>B.lactis</i> (Chervaux <i>et al.</i> , 2011).
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.infantis</i>
	<i>B.longum</i> (Bron <i>et al.</i> , 2011 ; Khaksar <i>et al.</i> , 2012 ;
	<i>B.breve</i> Mirnejad <i>et al.</i> , 2013 ; Mookiah <i>et al.</i> ,
	2014).
<i>Lactobacillus</i>	<i>L.acidophilus</i>
	<i>L.plantarum</i>
	<i>L.bulgaricus</i>
	<i>L.paracasei</i>
	<i>L.brevis</i> (Duskova et Karpiskova, 2013).
	<i>L.reuteri</i> (Coccorullo <i>et al.</i> , 2010).
	<i>L.rhamnosus</i> (Prajapati <i>et al.</i> , 2012).
Bactéries lactiques ou pseudo lactiques	<i>Enterococcus faecium</i> (Mountzouris <i>et al.</i> , 2010 ; Franz <i>et al.</i> ,
	<i>E.fecalis</i> 2011).
	<i>Lactococcus lactis</i> (Todorov <i>et al.</i> , 2007 ; Gao <i>et al.</i> , 2011).
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (Nakamura <i>et al.</i> , 2012).
	<i>Pediococcus acidilactici</i> (Barreau <i>et al.</i> , 2012).
	<i>Streptococcus thermophilus</i> (Bibiloni <i>et al.</i> , 2005 ; Chapman <i>et al.</i> ,
2006 ; Nagpal <i>et al.</i> , 2007).	
	<i>Weissella confus</i> (Nam <i>et al.</i> , 2002 ; Lee <i>et al.</i> , 2012).
Autres microorganismes	<i>Escherichia coli</i> (Schultz, 2008 ; Kruis <i>et al.</i> , 2012).
	<i>Saccharomyces boulardii</i> (Morrow <i>et al.</i> , 2012 ; Rahman <i>et al.</i> ,
	2013).
	<i>Kluyveromyces lactis</i> (Kourelis <i>et al.</i> , 2010).

Comme le montre le tableau 05, il n'existe pas que des produits probiotiques d'origine bactérienne. En effet, *Saccharomyces boulardii* est une levure non pathogène qui a beaucoup été étudiée et connue pour ses effets probiotiques. Elle est naturellement

résistante à l'acidité gastrique, n'adhère pas aux cellules épithéliales et ne colonise pas l'intestin. Son activité clinique est essentiellement dirigée contre les diarrhées associées à la prise d'antibiotiques et les infections intestinales causées par *Clostridium difficile* (Czerucka *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008 ; McFarland, 2010).

D'autre part, la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 a montré des propriétés probiotiques dans différentes études. Cette souche aux propriétés antiinflammatoires a montré des effets préventifs dans le cadre d'inflammations intestinales aiguës ou chroniques chez la souris (Schultz *et al.*, 2004 ; Goel *et al.*, 2009).

## II.2. Réglementation : médicaments et aliments

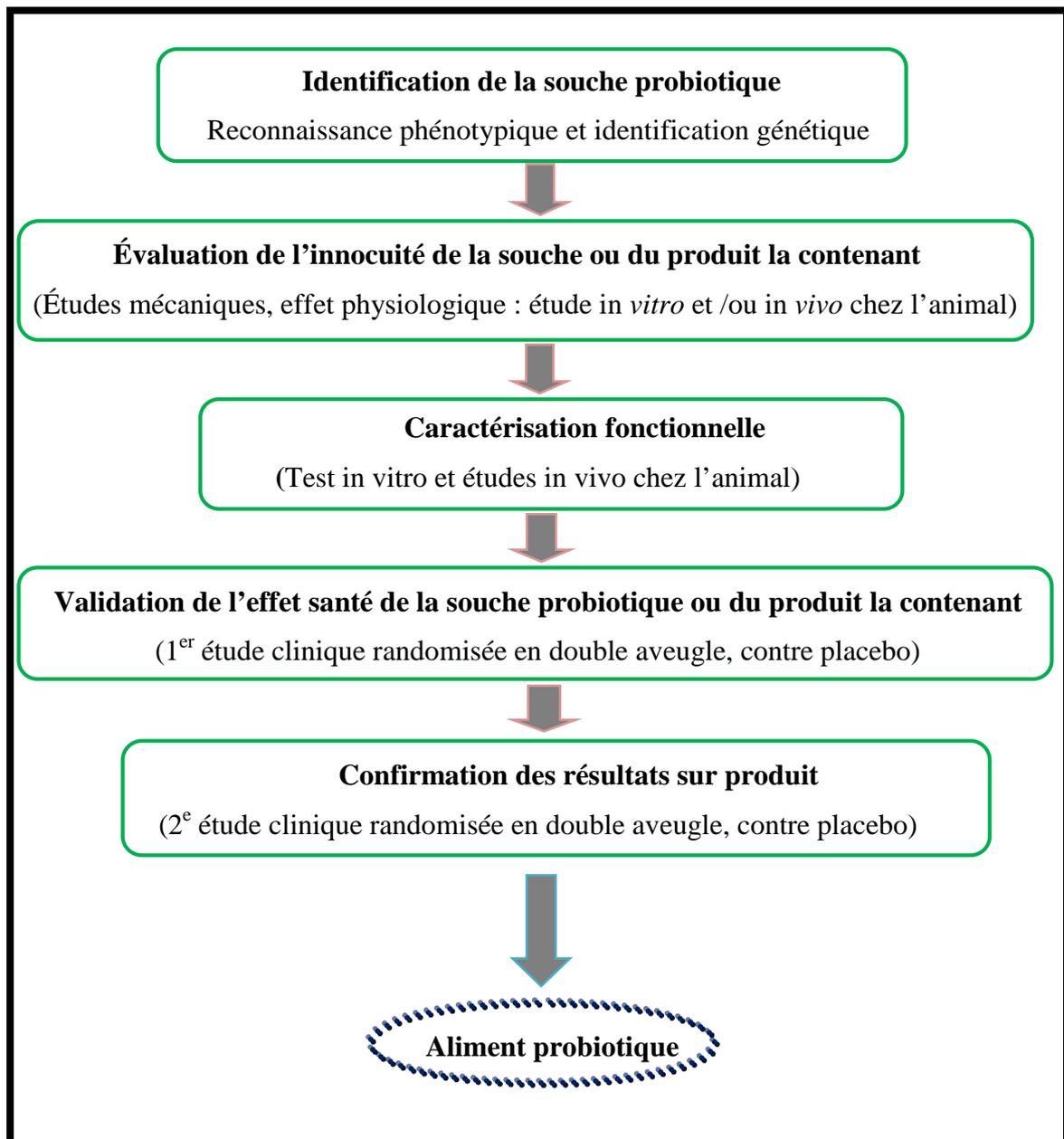
Les conditions de mise sur le marché des probiotiques sont définies en fonction de leur application médicamenteuse ou alimentaire. En majorité, les probiotiques sont des aliments fonctionnels ou sont utilisés sous forme de compléments alimentaires. Ces «aliments santé » se situent à la frontière entre le médicament et l'aliment traditionnel et sont régis par la législation alimentaire (Granato *et al.*, 2010).

### II.2.1. Aliments probiotiques

Les probiotiques utilisés comme compléments alimentaires, de même que les aliments fonctionnels, sont considérés comme des denrées alimentaires et sont régis par la législation y attachée. Ils se différencient des aliments diététiques qui sont destinés à une alimentation particulière et doivent faire l'objet d'une formulation ou d'un procédé de fabrication spécifique pour se différencier de l'aliment courant et des médicaments, en particulier pour ce qui est des allégations (figure 03) (FAO/WHO, 2001 ; Ninane *et al.*, 2009).

Les compléments alimentaires sont des denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant, seuls ou combinés, un effet nutritionnel ou physiologique. Ils sont commercialisés sous forme de doses (gélules, pastilles, comprimés, sachets de poudre ou ampoule) (Ashwell, 2002).

Cependant les aliments fonctionnels sont considérés comme des aliments courants destinés à être consommés dans le cadre d'une alimentation équilibrée et variée. Leur particularité réside dans le fait qu'ils contiennent des composés biologiquement actifs qui exercent un effet bénéfique sur une ou plusieurs fonctions cibles de l'organisme (Boudouhi *et al.*, 2005).



**Figure 03** : Démarche scientifique de l'évolution d'un effet probiotique  
(Francois et Georges, 2005).

### II.2.2. Médicaments probiotiques

Par définition, un médicament est : « toute substance ou composition présentée possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques » (FAO/WHO, 2001).

### II.3. Pharmacologie des probiotiques

#### II.3.1. Principes actifs

Les principes actifs des probiotiques ne sont pas les mêmes pour tous les effets. Certains sont bien établis, notamment des enzymes qui peuvent être actives dans l'intestin (Ex : la lactase des bactéries lactiques). D'autres sont reconnus par le système immunitaire ; ils incluent des peptides formylés, des lipopolysaccharides, des peptidoglycanes composants de la paroi cellulaire et des nucléotides. Certains principes actifs peuvent être naturellement présents dans des probiotiques et d'autres peuvent y être introduits par des techniques de génie génétique (**Vandenplas, 2012**).

#### II.3.2. Principaux modes d'action

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen pour véhiculer les principes actifs (enzymes, composants de paroi, peptides ou nucléotides immunomodulateurs, protéines antibactériennes...) jusqu'à leur cibles d'action dans le tractus digestif (figure 04) (**Angmo et al., 2016**).

- Les probiotiques capables de renforcer la barrière épithéliale via l'amélioration des interactions intercellulaires, ceci a été notamment montré au niveau intestinal (**Ewaschuk et al., 2008 ; Ng et al., 2009**).
- Les acides organiques produits notamment lors de la fermentation (essentiellement l'acide lactique et l'acide acétique) perméabilisent la paroi bactérienne permettant le passage d'autres molécules antibactériennes (**Servin, 2004 ; Makras et De Vuyst, 2006 ; Natarajan et Parani, 2014**).
- Il a été montré que l'ingestion de certaines souches de Lactobacilles ou de Bifidobactéries pouvait modifier de manière reproductible certaines activités enzymatiques bactériennes fécales, telles que la  $\alpha$ -glucuroïdase, l'azoréductase ou la nitroréductase (**Shanahan, 2012**).
- La sécrétion d'antimicrobiens (peroxyde d'hydrogène, acides organiques, bactériocines, antibiotiques), limitent l'adhésion d'autres bactéries aux cellules épithéliales (**Ouwehand et al., 2002 ; Ingrassia et al., 2005**).

- Les exopolysaccharides de surface des Lactobacilles ont montré des capacités à moduler la production de cytokines par les macrophages murins (Ciszek-Lenda *et al.*, 2011 ; Kang *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2011).
- Certains probiotiques sont en mesure de faire pencher la balance lymphocytes T helper (LTh) en faveur des lymphocytes Th1 (au détriment des Th2), ce qui aurait un effet positif sur la diminution des réponses allergiques médiées par les Th2 (Ezendam et Van Loveren, 2006).

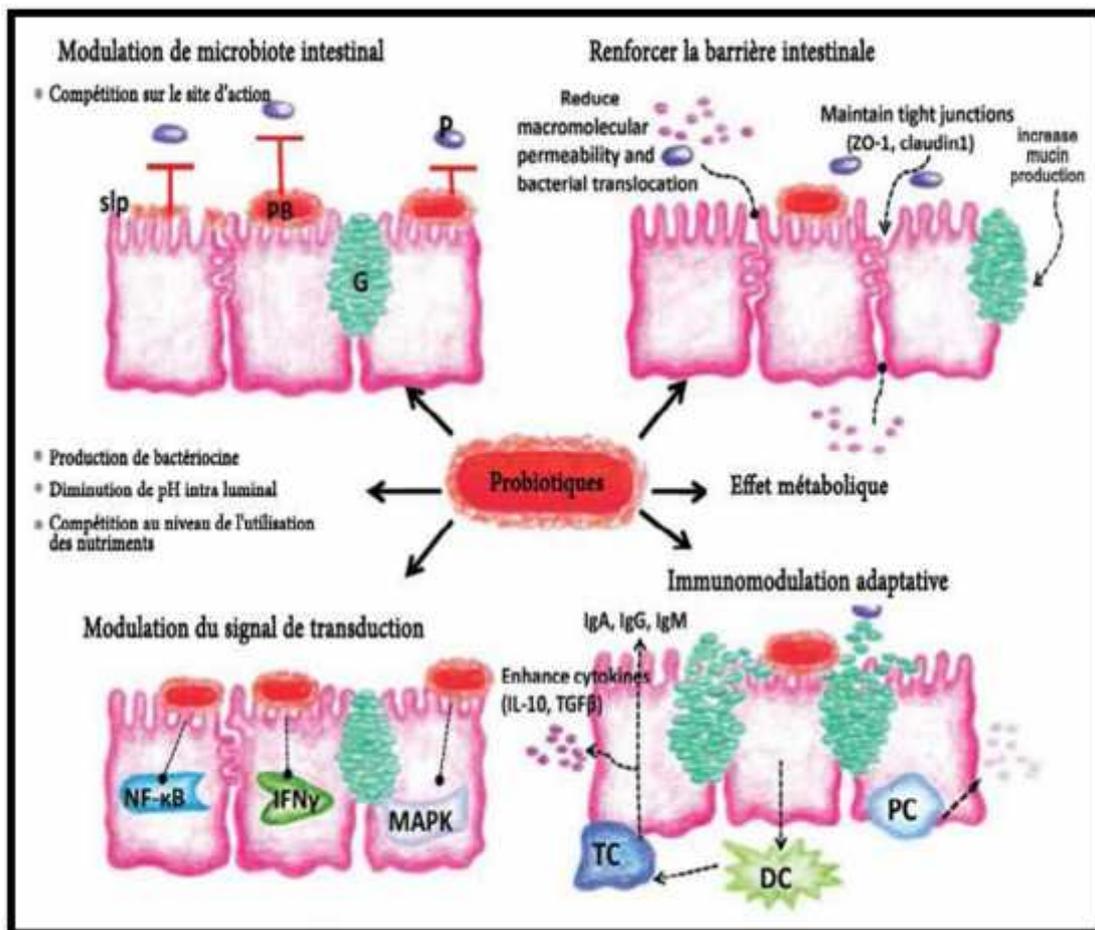


Figure 04 : Les différents mécanismes d'action des probiotiques  
(Burgain *et al.*, 2012)

### II.3.3. Posologie des probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes ingérés vivants. Généralement, il s'agit de bactéries ou de levures présents soit dans des aliments, notamment les produits laitiers fermentés, soit dans des médicaments ou des compléments alimentaires. Dans ce dernier cas, la forme lyophilisée est la plus courante (Ruggiero, 2014).

Un défi important dans le domaine des probiotiques est de comprendre comment certains facteurs peuvent influencer la physiologie du probiotique. D'un autre point de vue, c'est la physiologie des probiotiques qui influence la fonctionnalité et la stabilité du produit lorsqu'il est consommé (**Kayodé et al., 2012**). Un autre critère dont il faut tenir compte est la dose de bactéries à ajouter dans le produit pour observer l'effet santé recherché. En effet, les doses nécessaires varient selon la souche et le produit. Les doses requises pour obtenir des effets bénéfiques sont couramment rapportées pour être de l'ordre de  $10^9$ - $10^{10}$  UFC/jour. Cependant, les doses efficaces sont parfois moins importantes. Il suffit dans certains cas d'administrer seulement  $10^8$  UFC/jour pour observer un effet bénéfique des produits probiotiques (**Granato et al., 2010**).

Etablir un dosage général pour tous les probiotiques n'est pas possible, il faudrait plutôt s'appuyer sur des études menées chez l'homme et ayant déterminé la dose appropriée pour observer un effet bénéfique pour la santé. Ce paramètre doit aussi être compatible avec une prise quotidienne par le consommateur (**Klein et al., 2010**).

#### **II.3.4. Interaction bactéries /hôte**

Le microbiote intestinal, se définit comme l'ensemble des microorganismes présents dans l'écosystème digestif et assurant des relations symbiotiques avec l'hôte, leur diversité qualitative et quantitative crée un équilibre qui peut être considéré comme unique pour chaque individu, presque au même titre qu'une empreinte digitale (**Sommer et al., 2013**).

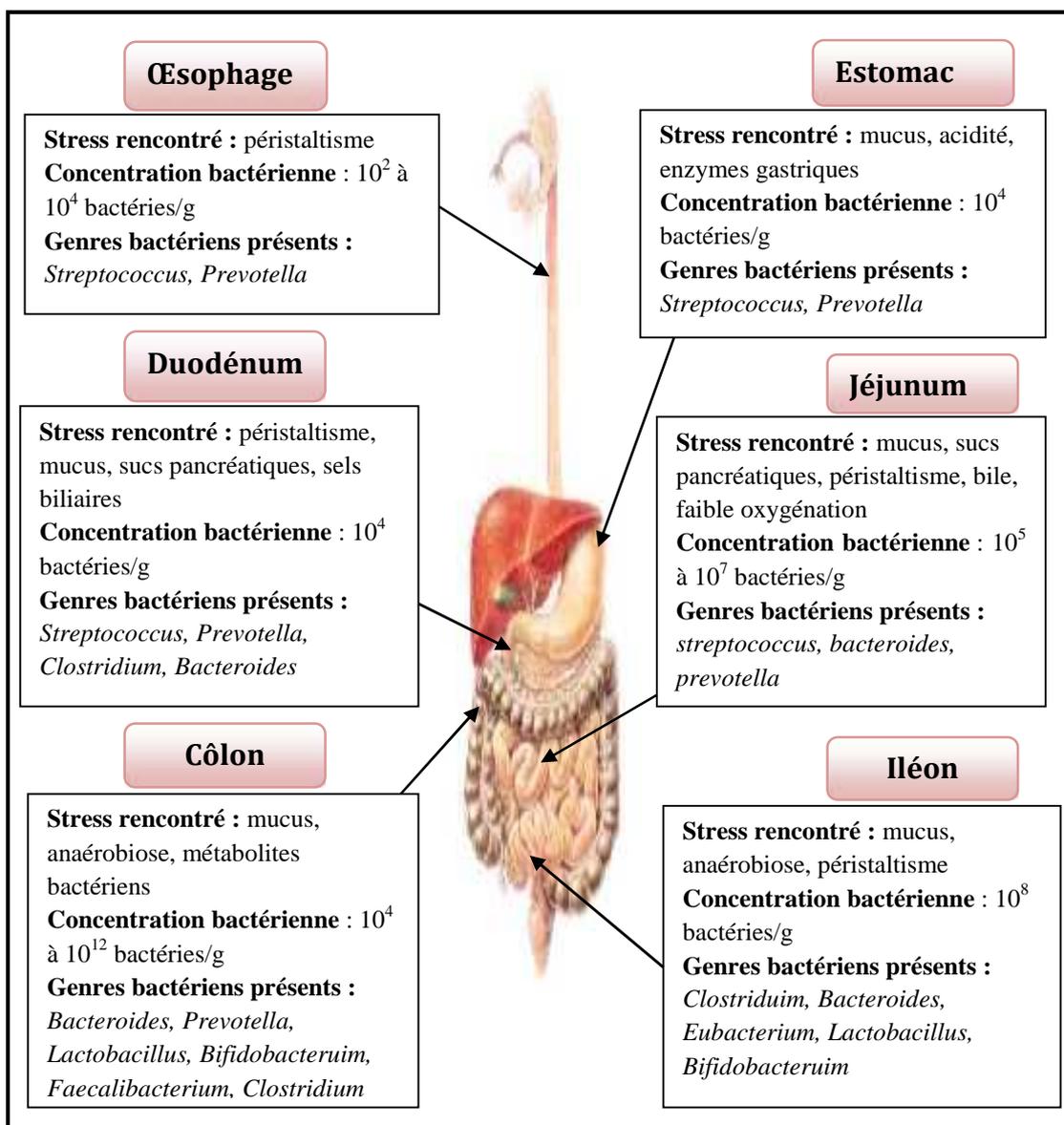
Le tractus gastro-intestinal humain est un environnement riche au sein duquel 100 mille milliards de microbes ( $10^{14}$ ) cohabitent et constituent la flore intestinale endogène normale (**Ley et al., 2006**).

Cependant la stabilité de cet écosystème est toute relative puisque le microbiote est soumis à des multiples facteurs pouvant le modifier et le déréguler (régime alimentaire riche en graisses, consommation chronique d'alcool, tabagisme, prise d'antibiotiques ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens). Ce dérèglement, définit par le terme de dysbiose, n'est autre qu'un déséquilibre entre les bactéries commensales et les bactéries pathogènes du microbiote. La dysbiose s'avère être le dénominateur commun à plusieurs pathologies : l'obésité, les hépatopathies alcooliques et non alcooliques et enfin les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. (**Schwartz et al., 2003**).

L'idée d'administrer des microorganismes exogènes afin de moduler la flore endogène dans un sens favorable ou simplement d'utiliser leurs propriétés métaboliques est la base du concept de probiotique. Le plus souvent les microorganismes utilisés comme

probiotiques proviennent d'isolats humains constitués d'espèces que l'on retrouve parmi la flore résidente, et l'accent est ainsi mis sur le rétablissement de l'équilibre écologique de la flore intestinale. (Vries *et al.*, 2006).

La figure 05 montre un gradient ascendant en nombre de bactéries le long du tractus digestif. La plus grande diversité bactérienne est retrouvée au niveau du côlon, où cohabitent des bactéroïdes, des lactobacilles, des bifidobactéries, des entérobactéries et beaucoup d'autres bactéries. Au cours de leur passage dans le tractus digestif, les bactéries probiotiques font face à différents stress, tels que le péristaltisme, l'acidité, le mucus, les sucs pancréatiques, et les sels biliaires (Coudeyras et Forestier, 2010).



**Figure 05** : Répartition bactérienne dans le tractus digestif, genres bactériens retrouvés et stress rencontrés par les bactéries (Coudeyras et Forestier, 2010).

### II.3.5. Applications thérapeutiques et groupes cibles humains

Dans le but d'améliorer la santé humaine, l'apport d'une souche probiotique par des sujets sains a principalement des objectifs préventifs. Pourtant, il faut souligner que l'introduction d'une souche étrangère - même si elle est un probiotique - doit être abordée avec soin et doit être effectuée après un processus d'évaluation bien établi. En particulier, l'environnement intestinal des sous-populations humaines sensibles, tels que les nourrissons et les petits enfants, subit un fort degré de développement ou de transition (**Twetman et Stecksens-Blicks, 2008**). Des études réalisées ont montré des effets bénéfiques pour tous les gents quelque soit leurs âges, comme les nourrisson, les nouveau-nés, les enfants et les personnes âgées (**Kumar et al., 2013**).

Les probiotiques ont été mis au point pour améliorer la désfonctionnement du corps humain. Alors que le tractus gastro-intestinal est l'objectif le plus important pour la majorité des probiotiques, ya aussi d'autres sites corporels, tels que la bouche, l'appareil urogénital et la peau (**Kumar et al., 2013 ; Szajewska et al., 2014**).

#### II.3.5.1. Amélioration de la digestion du lactose

Plusieurs études ont montré que la  $\beta$ -galactosidase des bactéries lactiques 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 (**Stamatova et Meurman, 2009 ; Makino et al., 2010**).

#### II.3.5.2. Réduction du taux de cholestérol sanguin

Il a été observé que la flore intestinale aurait une influence sur les niveaux de cholestérol sanguin. Des tests *in vitro* ont montré une réduction du taux de cholestérol dans un milieu de culture avec certains *Lactobacillus*. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par les bactéries ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués (**Lye et al., 2010 ; Wang et al., 2012 ; Kumar et al., 2013**).

#### II.3.5.3. 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 bactéries lactiques ont été évalués lors d'une étude clinique sur 27 enfants nourris au sein et souffrant d'eczéma atopique (**Gallelli et al., 2013 ; Otani et al., 2013**).

Plusieurs mécanismes touchant à l'immunité ou à l'état de la muqueuse ont été suggérés pour expliquer l'effet protecteur des bactéries lactiques. Celles-ci pourraient, en diminuant la perméabilité intestinale très augmentée en période de réactivité allergique, participer à la diminution du passage des protéines alimentaires (**Chanez et al., 2007**).

#### **II.3.5.4. Réduction du risque de diarrhée**

Plusieurs types de diarrhées sont dus à des infections microbiennes. Des effets protecteurs de souches probiotiques contre certaines infections intestinales ont été observés sur des modèles animaux. 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 (**Phavichitr et Puwdee, 2013 ; Hegar et al., 2014 ; Vandenplas, 2014**).

#### **II.3.5.5. Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin**

De nombreux travaux ont montré que certains microorganismes de la flore endogène pouvaient jouer un rôle nocif pro-inflammatoire au cours des maladies inflammatoires du tube digestif. Des travaux ont ainsi suggéré des effets positifs des souches *Escherichia coli* et du mélange de probiotiques VSL#3 dans la prévention des rechutes dans les cas de colites, de la pochite ou encore de la maladie de Crohn par une modulation de la flore intestinale et une stimulation du son système immunitaire (**Kortterink et al., 2014 ; Peres et al., 2014**).

#### **II.3.5.6. Prévention du cancer du côlon et autres cancers**

La flore intestinale et le système immunitaire jouent un rôle dans la cancérogénèse colique, ces deux paramètres pouvant être eux-mêmes modulés par des probiotiques. Plusieurs études ont montré que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes, la concentration de mutagènes ou d'acides biliaires secondaires dans les selles, qui pourraient être impliqués dans la cancérogénèse colique (**Kumar et al., 2013**). Les probiotiques pourraient empêcher la croissance d'autres souches qui transforment les procancérogènes en cancérogènes, réduisant ainsi la quantité de cancérogènes dans l'intestin (**Ishikawa et al., 2005 ; Piquepaille, 2013**).

### **II.3.6. Évaluation du risque sanitaire des probiotiques sur l'homme**

Il a été considéré que ces bactéries bienfaites étaient sans danger pour l'homme. Cependant, depuis 2001, on connaît aux probiotiques, quatre effets secondaires (Stamatova et Meurman, 2009).

#### **II.3.6.1. Infections**

Le risque d'infections par les probiotiques est quasiment nul. Cependant, le risque de leur passage dans le sang par translocation existe. Trois mécanismes sont incriminés :

- L'augmentation de la perméabilité intestinale, ou la création de nombreuses lésions sur la muqueuse intestinale ;
- L'augmentation de la croissance bactérienne ;
- L'immunodéficience (Lo Vecchio et Cohen MB, 2014).

#### **II.3.6.2. Activités métaboliques délétères**

Les microorganismes présents en excès peuvent induire des diarrhées et des lésions intestinales via les voies de déconjugaison et de déshydroxylation des sels biliaries. Il a été montré que les patients porteurs d'une iléostomie consommant des probiotiques augmentaient la transformation des acides biliaries primaires conjugués en acides biliaries secondaires libres (Marteau et Shanahan, 2003 ; Bouchefra, 2012).

#### **II.3.6.3. Immunomodulation excessive**

L'administration parentérale de composants de parois bactériennes tels que les peptidoglycanes peut induire de la fièvre, des arthrites et des maladies auto-immunes (Marteau et Seksik, 2005 ; Kuitunen, 2013).

#### **II.3.6.4. Transfert de gènes**

Particulièrement des gènes de résistance aux antibiotiques, peuvent être transférés entre microorganismes. La probabilité de transfert de gènes dépend de la nature du matériel génétique à transférer (plasmides, transposons...), de la nature des souches donneuses et receveuses, de leurs concentrations respectives et de la pression de sélection dans le milieu (tout particulièrement la présence d'antibiotiques) favorisant la pousse des transconjugants (Aires *et al.*, 2007 ; Van Reenen et Dicks, 2011).

### **II.4. Utilisation des bactéries probiotiques dans les produits laitiers**

Les produits laitiers probiotiques appartiennent à la catégorie des produits alimentaires fonctionnels qui ont montrés une croissance impressionnante au cours de la dernière décennie. Ainsi, le nombre des produits disponibles et la connaissance du consommateur

du concept probiotique a évolué, et en conséquence, la recherche sur ces produits a également augmenté. Plus de 600 produits alimentaires probiotiques sont commercialisés par l'industrie laitière depuis 2006 comprenant : les crèmes glacées, les fromages, les laits en poudre, les desserts glacés et les mayonnaises (Menrad, 2003 ; Sveje, 2007).

Concernant les desserts et les crèmes glacées de nombreux travaux ont récemment été menés sur la survie des probiotiques dans ce types de produits. Elle est parfois améliorée par encapsulation des probiotiques et parfois des prébiotiques sont associés à l'utilisation des probiotiques, on parle alors de symbiotique. Ces produits sont souvent des yoghourts glacés et des desserts lactés (Akalin et Erisir, 2008 ; Woraharn *et al.*, 2010).

### II.5. Utilisation potentielles dans d'autres secteurs de l'alimentation humaine

Outre leur utilisation dans le secteur laitier, les probiotiques concernent aussi d'autres secteurs de l'alimentation humaine. Les secteurs concernés par ces applications sont :

- Les boissons : il s'agit de jus de fruits, considérés comme un véhicule approprié pour les bactéries probiotiques car exposés peu longtemps aux conditions acides de l'estomac (temps de séjour court). Une eau minérale a même été décrite comme contenant une souche de bifidobactérie ;
- Les produits de boulangerie (biscuits) ;
- Snacks sous formes de chips ;
- Produits pour le charcutier, de la mer ou à base d'œufs ;
- Céréales pour le petit-déjeuner ;
- Assaisonnement, du type sauce à salade ;
- Matière grasse (margarines ou de beurres) (Francois et Georges, 2005 ; Castex et Panes, 2012).

### II.6. Procédés de fabrication et de commercialisation

La viabilité et l'activité du probiotique doivent être maintenues pendant toutes les opérations de transformation, de manipulation et de stockage et être vérifiées à la fin de la durée de conservation de ce produit (figure 06) (Soccol *et al.*, 2010).

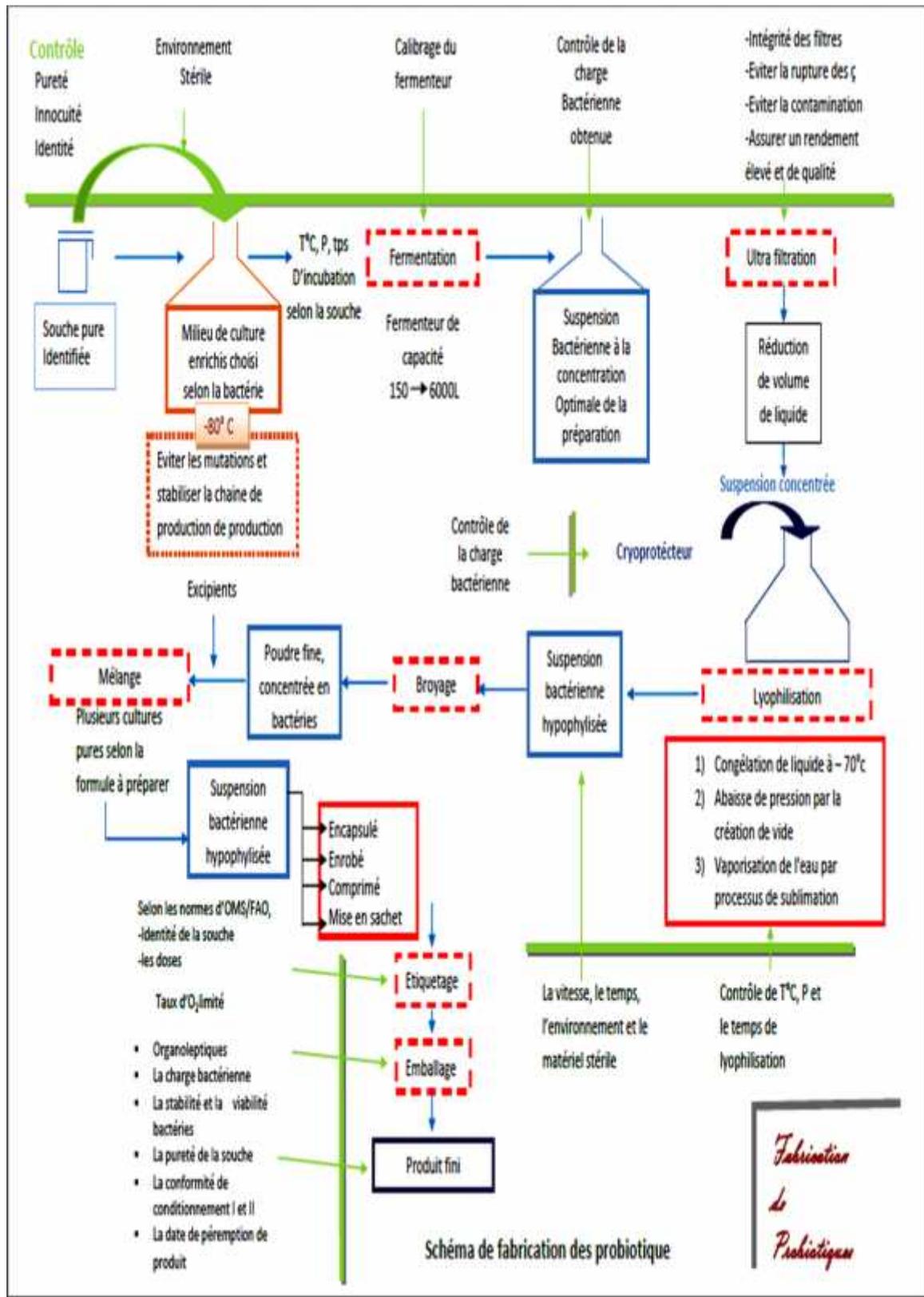


Figure 06 : Schéma de fabrication des probiotiques (Castex et Panes, 2012).

---

*Partie II*

*Etude Expérimentale*

---

---

***Matériels et  
Méthodes***

---

## II. Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé au laboratoire de biologie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF-Mila, durant la période Février-Mai de l'année 2017. Il a pour objectif d'étudier les aptitudes probiotiques d'un souche de bactéries lactiques d'origine locale.

### II.1. Matériel

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales, nous nous sommes servis du matériel suivant :

#### II.1.1. Matériel biologique

##### II.1.1.1. Les souches bactériennes

Les dix souches de bactéries lactiques ont été utilisées pour la réalisation de cette étude. Ces souches ont été identifiées par les techniques de microbiologie classique (tableau 06).

**Tableau 06** : Espèces de bactéries lactiques utilisées et leurs origines.

Souches	Origine	Code	
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i> sp. C1	Beurre de chèvre	E1
	<i>Enterococcus</i> sp. C2	Beurre de chèvre	E2
	<i>Enterococcus</i> sp. C4	Beurre de chèvre	E4
	<i>Enterococcus</i> sp. C6	Beurre de chèvre	E6
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. B1	Klila	L1
	<i>Lactobacillus</i> sp. B2	Klila	L2
	<i>Lactobacillus</i> sp. B4	Klila	L4
	<i>Lactobacillus</i> sp. B5	Klila	L5
	<i>Lactobacillus</i> sp. B7	Klila	L7
	<i>Lactobacillus</i> sp. B8	Klila	L8

##### II.1.1.2. Les souches indicatrices

Il s'agit de cinq souches indicatrices représentées par les espèces suivantes :

- *Escherichia coli* ATCC 25922;
- *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724;
- *Listeria innocua* Clip 74915;

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213;

Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire de recherche de l'université de Boumerdes.

### **II.1.1.3. Le segment iléal**

Après le sacrifice d'un poulet de chair, la partie iléale a été isolée afin d'étudier la capacité des bactéries lactiques à adhérer *in vitro* aux cellules épithéliales.

### **II.1.1.4. Les sels biliaires**

Les sels biliaires (Institut Pasteur d'Alger) ont été utilisés pour étudier le pouvoir des bactéries lactiques à résister à cet inhibiteur dans un milieu liquide.

### **II.1.1.5. Le sang humain**

Dont le but est d'enrichir le milieu de culture Columbia. Une quantité du sang a été additionnée au milieu en surfusion. Le sang additionné est issu des donneurs volontaires sains et le prélèvement a été effectué par ponction veineuse dans un laboratoire d'analyses médicales.

### **II.1.1.6. Disques d'antibiotiques**

Pour étudier le comportement des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques, dix disques (fourni par le CHU Benbadis Constantine) ont été utilisés pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide. Il s'agit de : rifampicine (RD 30µg), amikacine (AK 30µg), céfotaxime (CTX 30µg), ciprofloxacine (CIP 5µg), acide nalidixique (OA 30µg), lincomycine (L 2µg), céfazoline (CZ 30µg), gentamicine (CN 15µg), oxacilline (OX 1 et 5µg).

### **II.1.1.7. Le lait écrémé**

Le lait écrémé en poudre a été fourni par l'unité GROUZ, Ouad El Athmania, Mila. Il a été utilisé pour tester la production d'acide par les bactéries lactiques.

## **II.1.2. Milieux de culture**

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

- **Les géloses** : MRS (de Man, Rogosa, Sharp), Columbia au sang 5%, Mueller-Hinton.

- **Les bouillons** : MRS, MRS au phénol 0.4%, M17 (bouillon de Terzaghi), M17 au lactose 0.5%, bouillon nutritif (annexe 01).

**II.1.3. Produits chimiques**

Les produits chimiques utilisés au cours de cette étude sont les suivants :

- ) **Les colorants** : Violet de Gentiane, fuschine, cristal violet, phénolphtaléine à 1% (annexe 02).
- ) **Les acides et bases** : HCl (1M), HCl 37%, soude Dornic (NaOH 1/9N).
- ) **Alcool et autres** : éthanol (95°,75°), lugol, eau oxygénée, chloroforme, SDS à 1%, NaCl, lactose, phénol, toluène, disques d'oxydase, disques ONPG, eau physiologique stérile.

**II.1.4. Tampons**

La réalisation de cette étude nécessite la présence des tampons suivants :

- ) PBS (pH 7.2 ; 6.5 ; 3 et 2) (annexe 01) ;
- ) PBS au 0.5% des sels biliaires (pH 8).

**II.1.5. Appareillage et autres**

L'appareillage utilisé au cours de cette étude est le suivant :

- ) Agitateur électrique (Stuart) ;
- ) Autoclave (Pbibrand) ;
- ) Bain marie (Mettler) ;
- ) Bain marie agitateur (Mettler) ;
- ) Balance (Kern 572) ;
- ) Balance analytique (Kern) ;
- ) Cellules de Mallassez ;
- ) Centrifugeuse électrique (Sigma) ;
- ) Congélateur (Thermo scientific) ;
- ) Etuve (Mettler) ;
- ) Hotte à flux laminaire horizontale (Asem) ;
- ) Micropipettes (Socorex) ;
- ) Micro-onde (LG) ;
- ) Microscope optique (Optika B-192) ;
- ) pH mètre à affichage numérique (Hanna) ;
- ) Plaque chauffante agitatrice (Stuart) ;
- ) Réfrigérateur (Liebherr) ;
- ) Spectrophotomètre UV-VIS (Shimadzu, UV1800) ;
- ) Vortex (Topmix).

II.2. Méthodes

II.2.1. Méthodologie générale

La partie expérimentale vise à l'étude des aptitudes probiotique de dix souches lactique quatre du genre *Enterococcus* et six *Lactobacillus*. Notre expérimentation se résume dans les étapes montrées dans la figure 07 :

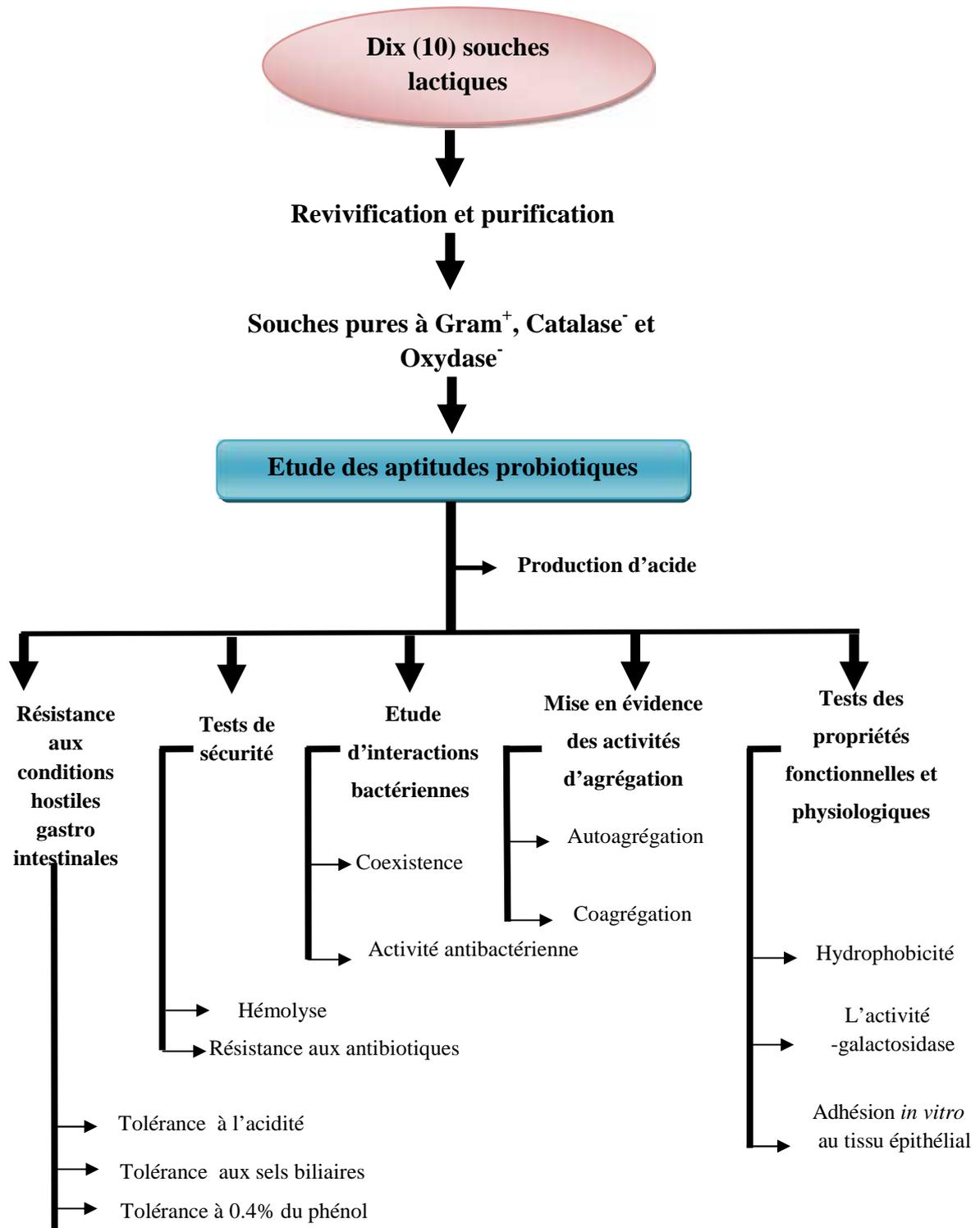


Figure 07 : Méthodologie d'étude des aptitudes probiotiques des bactéries lactiques.

### **II.2.2. Revivification et purification des souches bactériennes**

Dont le but est de revivifier les souches lactiques utilisées, ces dernières ont été cultivées sur bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 24 à 48h. Le développement des bactéries se traduit par un trouble et une pastille blanche au fond de tube.

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS, préalablement coulée et solidifiée. L'ensemencement a été effectué par la méthode des stries, l'incubation a été faite à 37°C pendant 24h jusqu'à l'obtention des colonies homogènes de même forme, même taille et même couleur (**Idoui et al., 2009**).

### **II.2.3. Confirmation de la pureté des souches**

La pureté des souches a été vérifiée en réalisant une coloration de Gram et une recherche de la catalase et de l'oxydase (**Tabak et Bensoltane, 2011**).

#### **II.2.3.1. Critères morphologiques**

##### **II.2.3.1.1. Examen macroscopique**

La morphologie des colonies et leur dimension sont étudiées à partir des cultures obtenues sur la gélose MRS. Elle consiste à étudier la forme, l'aspect, le contour, la surface, la couleur des colonies sur le milieu MRS.

##### **II.2.3.1.2. Examen microscopique**

L'étude microscopique des souches lactiques a été réalisée après une coloration de Gram. Elle a été effectuée sur un frottis bactérien, préparé à partir des colonies suspectes en cultures pures.

Cette étude permet la distribution de deux groupes majeurs des bactéries : à Gram<sup>+</sup> et à Gram<sup>-</sup> et aussi entre les coques et les bâtonnets ainsi que le mode de regroupement.

#### **- Coloration de Gram**

La coloration de Gram a été effectuée après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS, et dans le but d'écarter tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram en suivant la méthode décrite par **Camille Delarras, (2014)** (annexe 03).

#### **II.2.3.2. Critères biochimiques**

L'étude des caractères biochimiques des souches a été basée essentiellement sur :

### II.2.3.2.1. La production d'oxydase

Le cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes (les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète). (Guy *et al.*, 2007).

La mise en évidence de cette enzyme consiste à imbiber par une goutte d'eau distillée stérile le disque d'oxydase « Ox » (contenant le diméthyl paraphénylène diamine). Puis y étaler une partie de la colonie de la souche à analyser.

La présence d'une oxydase se traduit par l'apparition d'une couleur violette foncée après 30 à 60 secondes due à l'oxydation du réactif en produisant l'indophénol après 10 min (avec virage vers le noir) dans ce cas la bactérie est dite oxydase<sup>+</sup>, et lorsque la couleur de disque reste inchangée, la bactérie est dite oxydase<sup>-</sup>. Les colonies sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur.

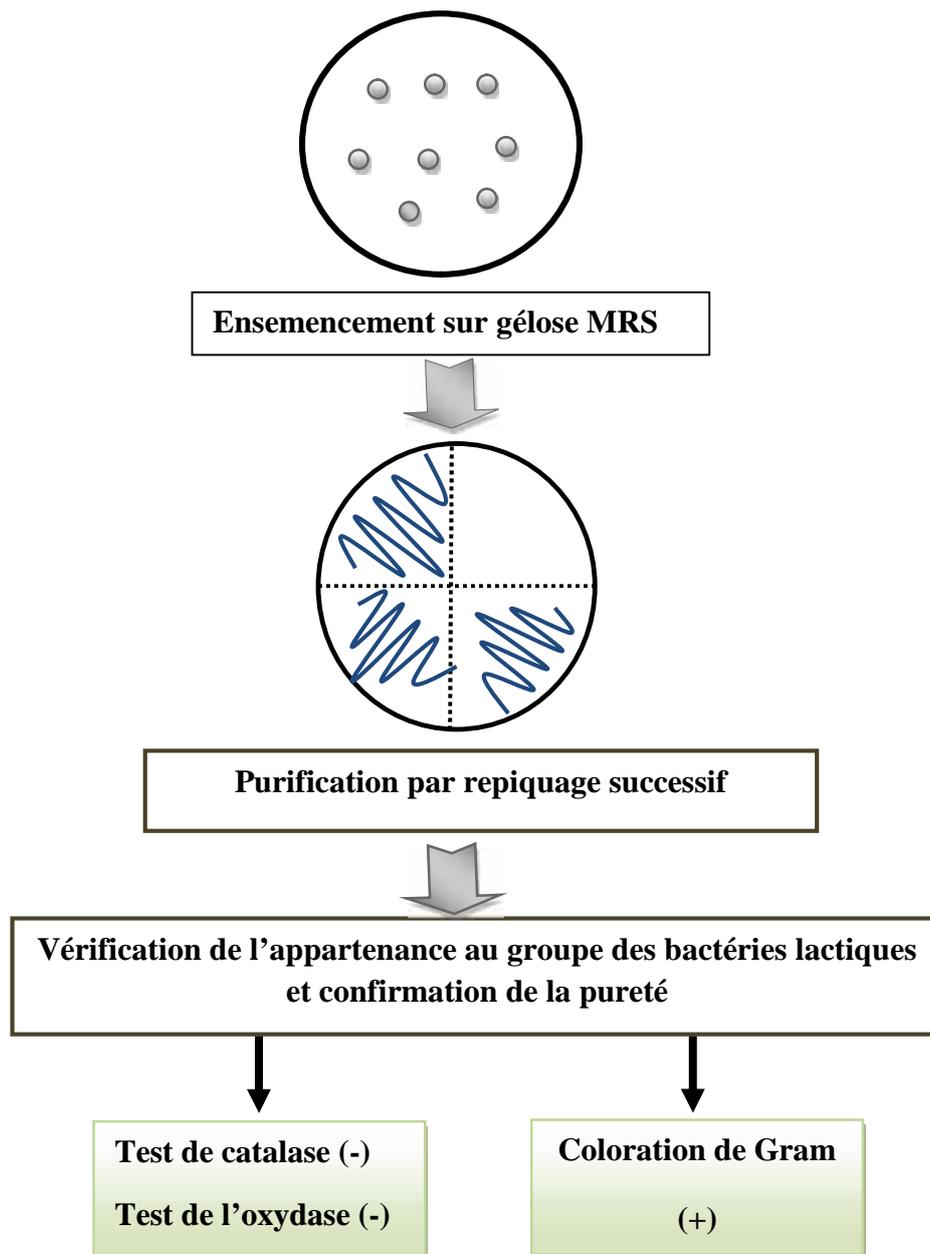
### II.2.3.2.2. La production de catalase

Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase<sup>-</sup>) des entérobactéries (catalase<sup>+</sup>). La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle leur permet de vivre en présence de l'oxygène. Elle décompose l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) formée, en eau et en oxygène qui se dégage selon la réaction suivante (Guy *et al.*, 2006):



La recherche de la catalase consiste à déposer sur une lame stérile une goutte de l'eau oxygénée, puis déposer et étaler sur cette dernière une colonie de la souche à analyser, l'effervescence (dégagement des bulles d'air) indique la présence d'une catalase.

Les étapes de la revivification et la purification des souches lactiques sont résumées dans la figure 08 :



**Figure 08 :** Etapes de la revivification et la purification des bactéries lactiques.

## II.2.4. Etude des aptitudes probiotiques d'un souche de bactéries lactiques

### II.2.4.1. Production d'acide

Ce test a pour but de déterminer par titrage la concentration molaire en ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  dans un échantillon de lait. Cette concentration est exprimée en degré Dornic ( $\text{D}^\circ$ ). L'un des critères technologiques et probiotiques les plus importants chez les bactéries lactiques, c'est leur cinétique de production d'acide lactique (Hassain, 2013).

La mesure de l'activité acidifiante est déterminée par modification des deux méthodes de **Champagne et Moineau (2003)** et **Guiraud (2003)** qui consistent à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude Dornic.

Pour mettre en évidence la production d'acide par les bactéries lactiques, des tubes stériles avec bouchon à vis (10 à 20 ml) sont préparés puis remplis du lait écrémé à 10% (annexe 01).

Après stérilisation et refroidissement à la température d'ensemencement, chaque tube estensemencé par une culture lactique (V/100V) puis incubé à 37°C à un intervalle du temps de 2h, 4h, 6h et 24h. Après incubation, 10ml du lait sont prélevés puis titrés par la soude Dornic (N/9) en présence de 5 gouttes de phénolphtaléine (Figure 09), jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes. L'acidité est déterminée par la formule suivante:

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

Où :

$V_{\text{NaOH}}$  : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

1D° = 0.1g/l d'acide lactique produit.

La mesure de pH a été faite directement par le pH- mètre, en plongeant l'électrode dans un bécher contenant 20ml de l'échantillon. Le pH a été déterminé à chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique (**Hariri et al., 2009**).



**Figure 09:** Mesure de la production d'acide.

#### II.2.4.2. Résistance des bactéries lactiques aux conditions hostiles gastro-intestinales

L'objectif de cette partie de l'étude est d'évaluer le comportement de quelques souches de bactéries lactiques étudiées envers les conditions rencontrées au cours du passage à travers le tractus gastro-intestinal (Pitino *et al.*, 2011).

##### II.2.4.2.1. Tolérance à l'acidité

L'aptitude des souches lactiques à résister à l'acidité gastrique, a été déterminée selon la technique décrite par Anthoule *et al.* (2003) et Guo *et al.* (2010) :

Des cultures bactériennes jeunes de 18h ont été préparées dans le bouillon MRS. Le culot bactérien issu de la centrifugation (à 3000g / 15min) des suspensions bactériennes de 18 h préparées dans le bouillon MRS a été récupéré puis lavé deux fois dans le tampon PBS.

1 ml de chaque suspension obtenue est additionné à 9ml de la solution PBS et le pH est ajusté à 2 ; 3 et 7.2 (contrôle). Les suspensions sont agitées par un vortex pendant 10s puis incubées à 37°C pendant 3h.

Un comptage des cellules vivantes a été effectué dans deux temps différents (à 0h et 3h). La technique utilisée est celle de micro-dilution en utilisant la cellule de Malassez. L'expérience est indépendamment répétée pour chaque souche deux fois.

Le taux de survie est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log\text{UFC à } T_{3h} / \log\text{UFC à } T_{0h} \times 100$$

##### II.2.4.2.2. Tolérance aux sels biliaires

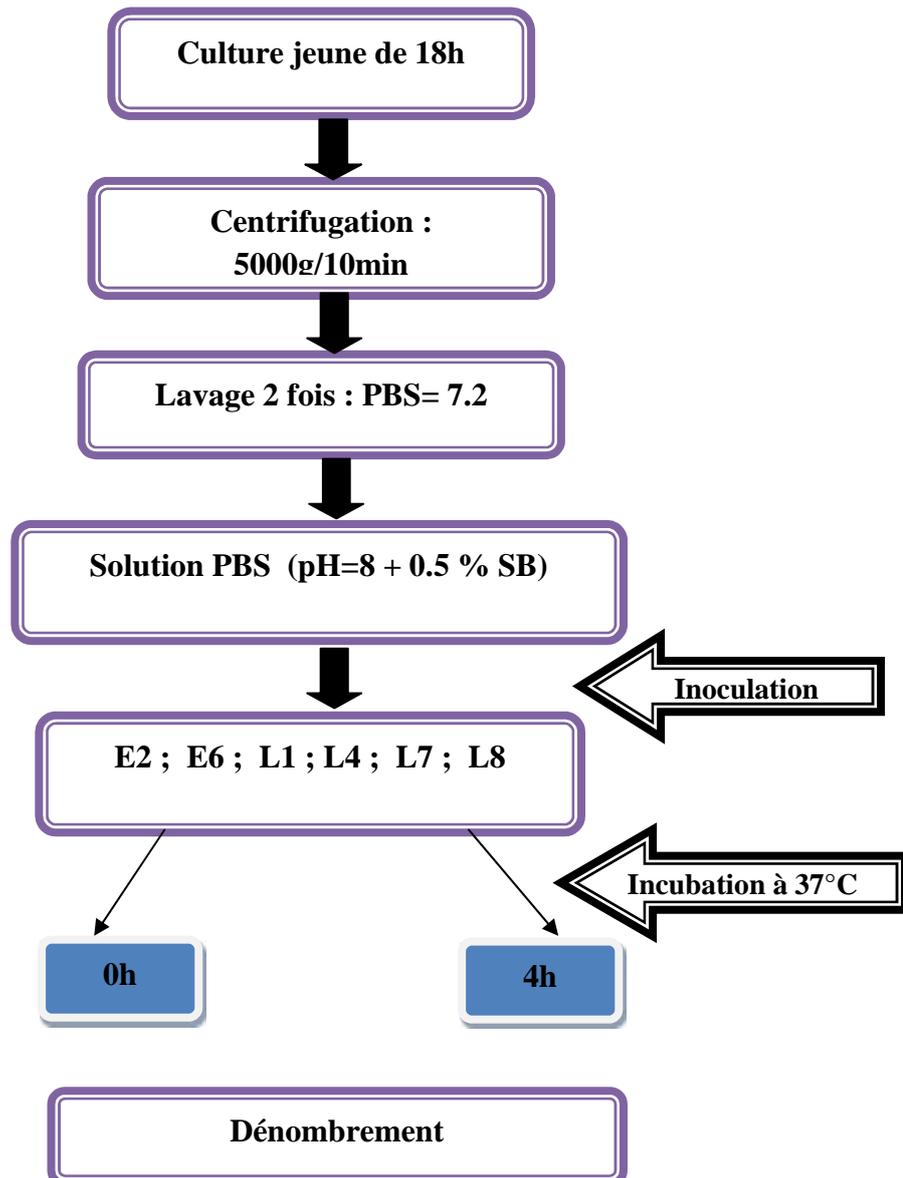
Six (6) souches de bactéries lactiques qui sont : E2; E6; L1; L4; L7;L8 ont été choisies pour réaliser ce test.

La tolérance aux sels biliaires est un facteur important pour évaluer l'aptitude probiotique des bactéries lactiques. Dans le but d'étudier la résistance des souches des bactéries lactiques aux sels biliaires, nous avons procédé à la méthode décrite par Leite *et al.* (2015) et Bouridane *et al.* (2016) :

Comme le montre la figure 10, des cultures bactériennes jeunes de 18h ont été préparées dans le bouillon MRS. Le culot bactérien a été récupéré par centrifugation à 5000g / 10min suivie de deux lavages successifs dans le PBS (pH 7.2) puis suspendu dans le tampon PBS (0.5% en SB, pH 8) pour avoir une suspension de 10<sup>8</sup>UFC/ml et incubation à 37°C.

Le comptage à 0h et 4h des cellules a été effectué par la technique de micro-dilution en utilisant la cellule de Malassez. L'expérience est indépendamment répétée deux fois pour chaque souche. Le taux de survie est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log\text{UFC à } T_{4h} / \log\text{UFC à } T_{0h} \times 100$$



**Figure 10 :** Détermination de l'effet des sels biliaires sur la viabilité des souches.

### II.2.4.2.3. La résistance à 0.4% de phénol

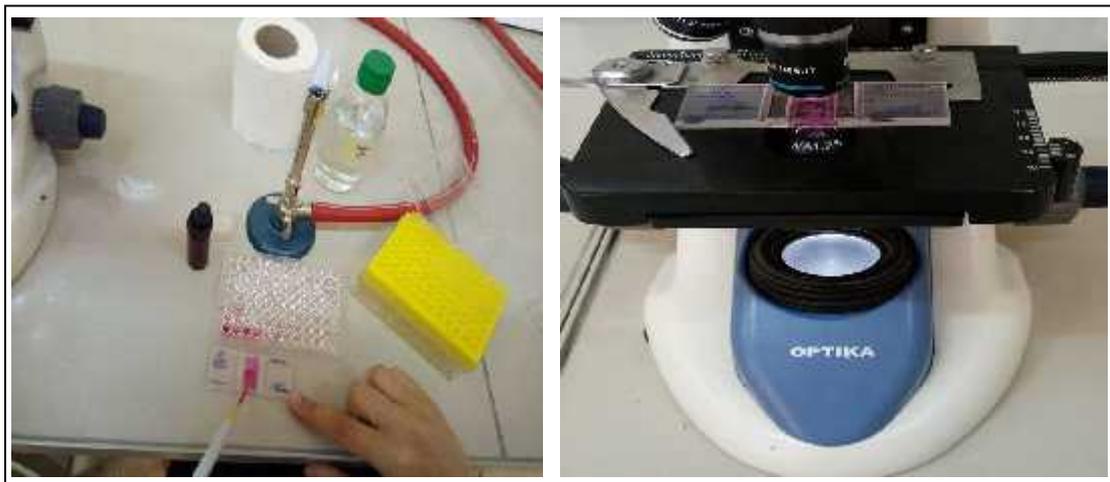
La résistance des souches lactiques au phénol à 0,4% a été déterminée selon la méthode de **Pinto et al. (2006)**

Des suspensions bactériennes jeunes de 18h ont été préparées dans le bouillon MRS puis centrifugées à 5000g /10min. le culot a été récupéré puis lavé deux fois dans le PBS (pH=7.2) et suspendu dans le bouillon MRS additionné ou non du phénol à 4%.

Nous avons procédé à un comptage des cellules vivantes à 0h et 24h après incubation à 37°C, par la méthode de micro-dilution en utilisant la cellule de Malassez. L'expérience est indépendamment répétée pour chaque souche deux fois (figure 11).

Le taux de survie est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log\text{UFC à } T_{24h} / \log\text{UFC à } T_{0h} \times 100$$



**Figure 11:** La méthode de micro-dilution et utilisation de la cellule de Malassez .

### II.2.4.3. Tests de sécurité

#### II.2.4.3.1. Test d'hémolyse

L'activité hémolytique a été évaluée par la méthode décrite par **Argyri et al. (2013)** :

Des suspensions bactériennes jeunes de 18h ont été préparées dans le bouillon MRS, puis ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Columbia à 5% du sang humain (préalablement coulée et solidifiée) par stries serrées. Après incubation pendant une période de 24-48h à 37°C, le type d'hémolyse a été examiné.

L'apparition d'une zone claire autour des colonies indique la présence d'une activité

hémolytique de type  $\alpha$ . Une activité hémolytique de type  $\beta$  est caractérisée par des zones vertes entourant les colonies, c'est le signe d'une activité hémolytique incomplète. Si le milieu n'est pas modifié donc c'est une souche  $\gamma$  hémolytique.

#### II.2.4.3.2. La résistance aux antibiotiques

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée. Chaque inoculum bactérien a été standardisé dont la  $DO_{600}$  varie entre 0.08 et 0.1 puis ensemencée par étalement à l'aide d'écouvillon en surface de la gélose MRS, déjà coulée et solidifiée. Les boîtes ont été laissées sécher à la température de laboratoire.

Chaque deux boîtes de la même souche reçoivent dix disques d'antibiotiques (cinq disques par boîte) à savoir : les inhibiteurs de la synthèse de la paroi : oxacilline (OX 1 et OX 5 $\mu$ g), céfazoline (CZ 30 $\mu$ g), céfotaxime (CTX 30 $\mu$ g) ; les inhibiteurs de la réplication d'ADN : acide nalidixique (OA 30 $\mu$ g), ciprofloxacine (CIP 5 $\mu$ g) ; les inhibiteurs de la transcription : rifampicine (RD 30 $\mu$ g) ; les inhibiteurs de la traduction : amikacine (AK 30 $\mu$ g), lincomycine (L 2 $\mu$ g) ; gentamicine (CN 15 $\mu$ g) .

Après incubation à 37°C pendant 24h, les zones d'inhibitions autour des disques des antibiotiques ont été mesurées et les résultats ont été exprimés comme suit : sensible [le diamètre est supérieur à 15mm (S)], intermédiaire [le diamètre égale 15 mm (I)] et résistante [le diamètre est inférieur à 15mm (R)] (Leroy *et al.*, 2007 ; Balamurugan *et al.*, 2016 ).

#### II.2.4.4. Tests des propriétés fonctionnelles et physiologiques

##### II.2.4.4.1. L'activité $\beta$ -galactosidase

L'activité  $\beta$ -galactosidase est déterminée par le protocole expérimental décrit par Iyer *et al.* (2010) et Wang *et al.* (2010) :

Ce test est basé sur l'utilisation des disques ONPG (Ortho-nitrophényl-  $\beta$ -D-galactopyranoside) permettant d'identifier le taux de la fermentation du lactose (si actif ou en retard).

Des cultures bactériennes jeunes de 18h ont été préparées dans le bouillon M17 (+0.5% lactose), le culot bactérien a été récupéré par centrifugation à 3000g / 15min suivie de deux lavages successifs avec du PBS (pH 7.2). Dans un tube, 1ml de chloroforme et 1 ml de SDS (0.1%) sont ajoutés au 2 ml de la suspension bactérienne et mélangés par le vortex pendant

10s suivie d'une incubation à 37°C dans un bain Marie pendant 1 min. Par la suite un disque ONPG est mis dans le tube et le mélange est incubé pendant 24h à 37°C.

L'apparition d'une couleur jaune entre 1h jusqu'à 6h est un indicateur positif qui indique une production rapide de la  $\beta$ -galactosidase alors que l'apparition de la couleur jaune après 6h signifie une production lente de la  $\beta$ -galactosidase. Dans ce test *Escherichia coli* utilisée comme un témoin positif.

#### **II.2.4.4.2. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial**

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est un critère de sélection recommandé pour le choix des souches probiotiques. Ce test consiste à étudier la capacité des souches bactériennes à effet probiotique de s'adhérer à l'épithélium intestinal. Pour se faire, la méthode décrite par **Lin et al. (2007)** qui comporte trois étapes, a été suivie :

##### **➤ Préparation des cellules épithéliales :**

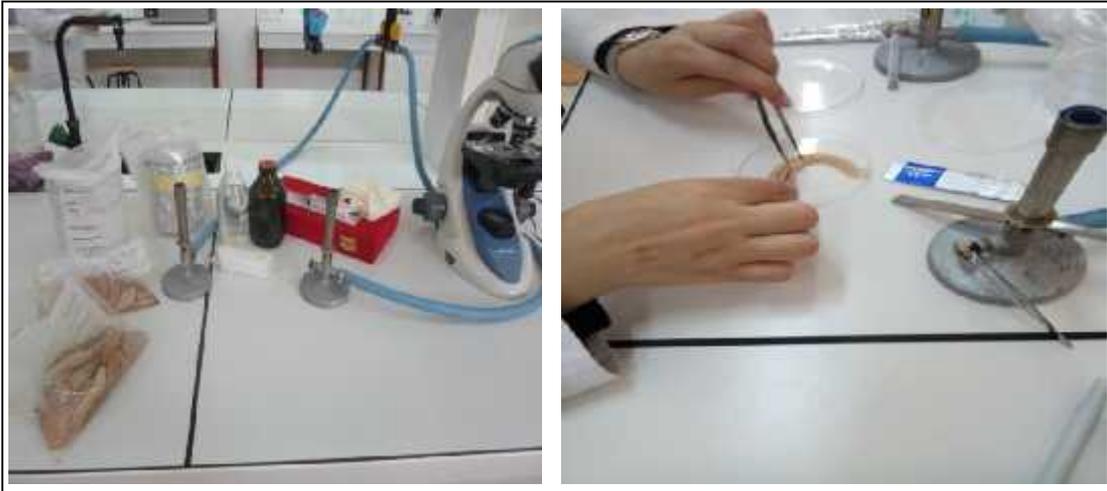
Avant de mettre en œuvre le test d'adhésion, un segment de l'iléum d'un poulet de chair a été ouvert et lavé avec du tampon phosphate salin stérile (PBS) (pH7.2), puis tenu dans le PBS à 4°C pendant 30min pour être lavé. Par la suite, les tissus ont été repris puis lavés 3 fois avec du PBS stérile. Les cellules ont été récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin par une lame stérile. Des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à  $10^{-4}$ , cette suspension cellulaire a été examinée par microscope pour assurer qu'elle n'était pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement égale à  $5 \times 10^4$  cellules/ml.

##### **➤ Préparation des souches :**

Des cultures bactériennes jeunes de 18h ont été préparées dans le bouillon MRS. Puis elles ont été centrifugées à 5000 g/ 10min et le culot de chaque souche a été récupéré dans 2ml du PBS ( $10^8$  cellules /ml =  $DO_{600} = 0.2$ ).

##### **➤ Réalisation du test :**

1ml de chaque culture est mélangé avec 1ml de la dilution  $10^{-4}$  de la suspension des cellules épithéliales déjà préparée. Après incubation avec agitation 20 tr/min à 37°C pendant 30 min, une préparation de frottis et une coloration au cristal violet 0.5% pendant 5 min a été réalisée pour observer l'adhésion au microscope optique. Le test est considéré positif si le nombre de bactéries adhérentes est supérieur à 15. Au moins 10 cellules épithéliales sont examinées.



**Figure 12:** Quelques étapes du test d'adhésion.

#### II.2.4.4.3. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité bactérienne est considérée comme l'un des facteurs les plus importants qui influence l'adhésion des cellules à divers supports. Elle est déterminée selon la méthode décrite par **Handa et Sharma (2016)** :

Des cultures jeunes de 18h ont été préparées dans le bouillon MRS. Le culot bactérien a été récupéré par centrifugation à 5000g / 10min suivie de deux lavages successifs avec du PBS (pH 7.2) puis resuspendu dans le même tampon pour avoir  $10^8$ UFC /ml ( $DO_{600}=0.2$ ). La densité optique initiale( $DO_{initiale}$ ) de la suspension a été mesurée à 600nm.

Ensuite, 1ml du toluène a été ajouté doucement à 5ml de la suspension bactérienne. Ce mélange a été agité en utilisant un vortex pendant 1 min puis incubé 1h à 37°C. Après 1h, la phase aqueuse est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et la densité optique finale ( $DO_{finale}$ ) est mesurée à 600nm (figure 13).

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

$$\% \text{Hydrophobicité} = \frac{DO_{initiale} - DO_{finale}}{DO_{initiale}} \times 100$$



**Figure 13** : Détermination de taux d'hydrophobicité des souches lactiques.

#### II.2.4.5. Mise en évidence des activités d'agrégation

##### II.2.4.5.1. Autoagrégation

Pour mettre en évidence le phénomène d'autoagrégation des bactéries lactiques nous avons suivi le protocole expérimental décrit par **Idoui *et al.* (2016)** et **Kouidhi *et al.* (2016)** :

Des suspensions bactériennes jeunes de 18h préparées dans le bouillon MRS sont centrifugées à 5000g / 10 min et le culot obtenu est lavé deux fois dans le tampon PBS (pH=7.2) puis suspendu dans le même tampon pour avoir une suspension de  $10^8$ UFC /ml.

4ml de la suspension bactérienne ont été mélangés à l'aide d'un vortex pendant 10s suivie d'une incubation à une température de 37°C pendant 5h. Au cours de l'incubation, 0.1ml de la suspension est transférée chaque heure à un autre tube contenant 3.9 ml de PBS et la densité optique a été mesurée à 600nm.

Le pourcentage d'autoagrégation est exprimé selon l'expression suivante :

$$\% \text{ Autoagrégation} = [(DO_i - DQ) / DO_i] \times 100$$

Où :

DO<sub>i</sub> : l'absorbance à t=0h.

DO<sub>f</sub> : l'absorbance à t=5h.

#### II.2.4.5.2. Coagrégation

Dans le but d'étudier le phénomène de coagrégation des souches lactiques avec la souche *Escherichia coli*, nous avons suivi les mêmes étapes du test d'autoagrégation pour la préparation des suspensions bactériennes (10<sup>8</sup>UFC /ml dans le tampon PBS (pH=7.2).

À partir de ces suspensions, un volume de 2ml est mélangé en paire (2ml de la souche lactique et 2ml d'*E. coli*) avec un vortex pendant 10s. Le blanc est réalisé en même temps (4ml de chaque suspension bactérienne). L'absorbance du mélange est mesurée à 600nm après 5h d'incubation à une température ambiante (Idoui et Sifour, 2016).

Le pourcentage de coagrégation est calculé par l'équation suivante :

$$\% \text{ Coagrégation} = [(DO_x + DO_y)/2 - DO_{(x+y)}] / [(DO_x + DO_y)/2] \times 100$$

Où :

x et y : les souches du blanc.

(x+ y) : les souches du mélange.

#### II.2.4.6. Etude des interactions bactériennes

##### II.2.4.6.1. L'activité antibactérienne

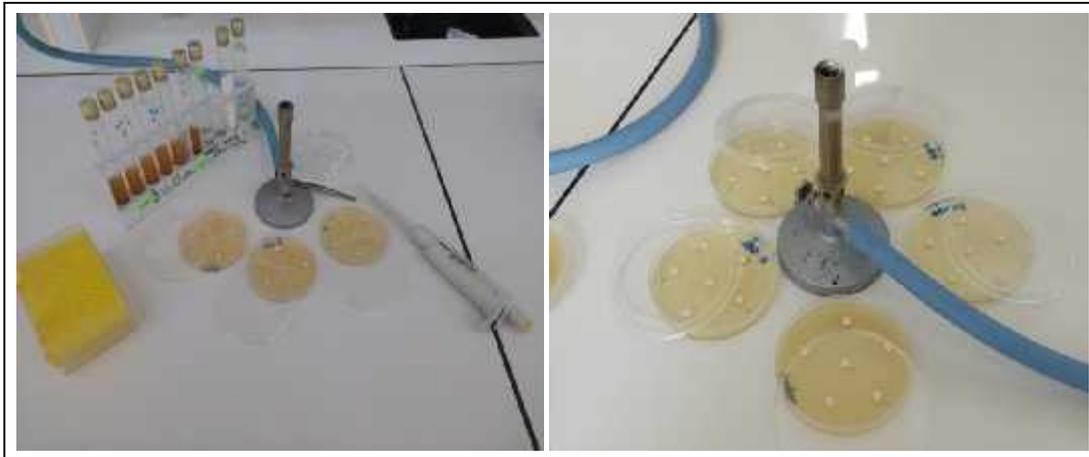
Ce test consiste à étudier l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des souches indicatrices. Il s'agit de cinq souches : *Escherichia coli* ATCC 25922 ; *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 ; *Listeria innocua* Clip 74915 ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Des cultures bactériennes jeunes de 18h ont été préparées dans le bouillon MRS (pour les bactéries lactiques) et dans le bouillon nutritif (pour les souches indicatrices).

Pour mettre en évidence cette activité, le milieu Mueller-Hinton a été coulé, solidifié et séché dans des boîtes de pétri stériles, puis la souche indicatrice (DO<sub>600</sub> varie entre 0.08 et 0.1) est inondée en surface de ce milieu. Après incubation pendant 30 min à 37°C, des disques de papier Wattmen n°3 stériles (de 5mm de diamètre) ont été déposés en surface de la gélose. Chaque disque reçoit un volume de 10 µl d'une culture lactique jeune. Une fois

les boîtes sont séchées à température ambiante, elles sont incubées à 37°C pendant 24h.

L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques et les diamètres des zones sont mesurés (Shehata *et al.*, 2016 ).



**Figure 14 :** Test de l'activité antibactérienne des souches lactiques.

#### II.2.4.6.2. Test de coexistence

L'interaction entre les souches lactiques a été étudiée selon le protocole expérimental décrit par Guo *et al.* (2010), qui consiste à ensemencer en stries perpendiculaires croisées la surface d'une gélose MRS, préalablement coulée dans des boîtes de Pétri, à partir des suspensions bactériennes jeunes (18 heures) préparées dans le bouillon MRS.

La symbiose est révélée par l'absence des zones d'inhibition (au niveau des points de rencontre entre les stries croisées) par contre l'antagonisme se traduit par la présence de ces dernières après une incubation à 37°C pendant 24h.

#### II.2.5. Traitement statistique des résultats

Pour effectuer des analyses statistiques le logiciel XLSTAT 2009 a été utilisé pour analyser les résultats obtenus concernant les tests : tolérance à l'acidité, tolérance aux sels biliaires, tolérance à 0.4% de phénol, les tests d'agrégation (autoagrégation et coagrégation) et test d'hydrophobicité.

Le test ANOVA (analyse de variance) à un seul facteur avec un facteur de risque égale à 5% a été utilisé.

---

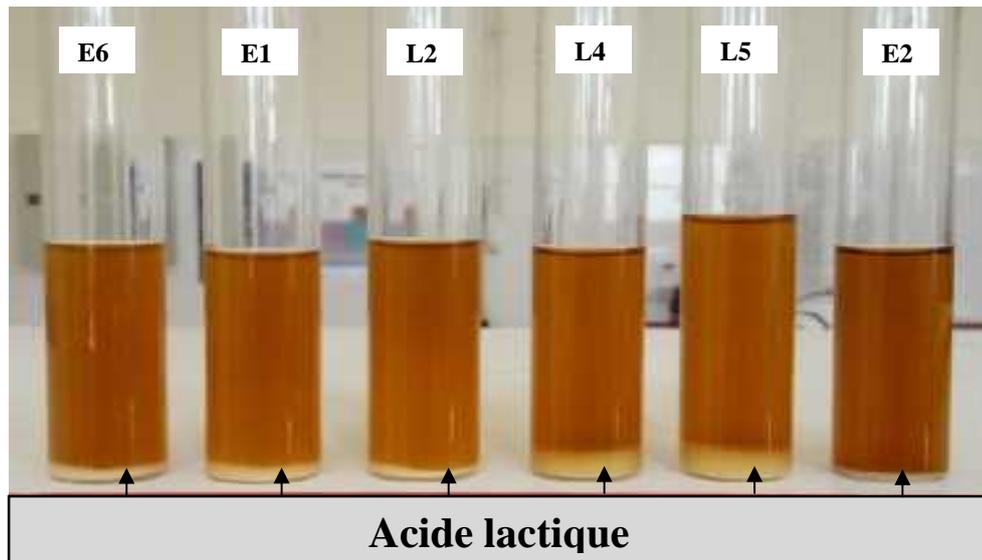
***Résultats et  
Discussions***

---

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Revivification et confirmation de la pureté des souches

La revivification des dix souches lactiques a été réalisée sur bouillon MRS. La présence de trouble homogène avec une pastille blanche au fond de tube désigne la viabilité de la souche lactique (Figure15).



**Figure 15** : Revivification de quelques souches étudiées sur bouillon MRS

"L": *Lactobacillus* sp. ; "E": *Enterococcus* sp.

#### III.2. Examen macroscopique et microscopique

##### III.2.1. Caractérisation macroscopique

Un total de dix souches ont été isolées et purifiées sur milieu MRS. La caractérisation macroscopique, permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur gélose MRS après 24h d'incubation à 37°C et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité).

Les caractères des colonies se diffèrent d'une souche à une autre. Les colonies sont blanchâtres, crèmes et parfois translucides, à contour régulier ou irrégulier et de forme ronde ou lenticulaire avec de différentes tailles (grande, moyennes et petites), dont le diamètre varie de 0.5 à 2mm (figure 16).

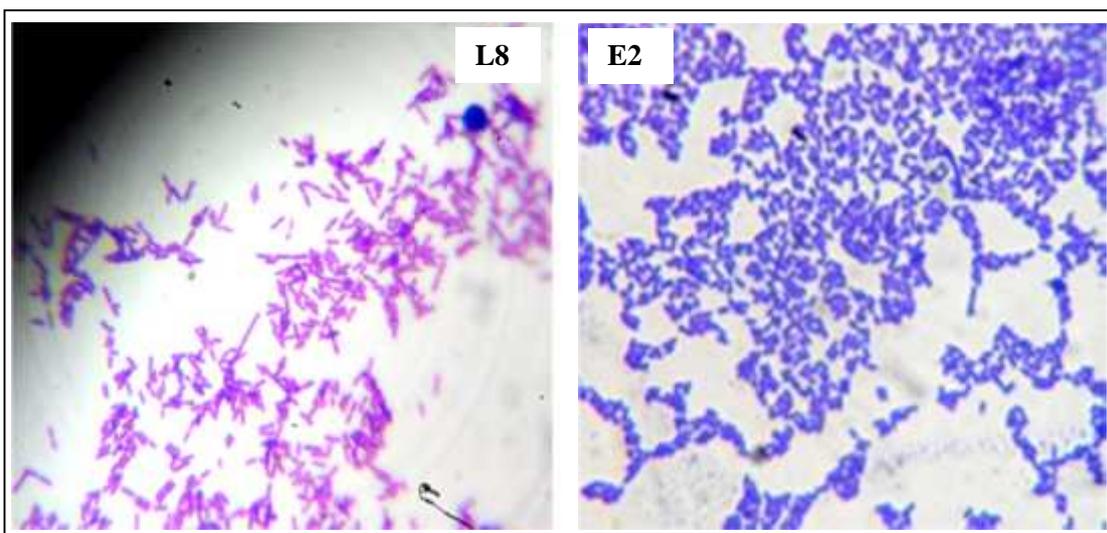


**Figure 16** : Exemples d'aspect culturels des bactéries lactiques sur gélose MRS après 24h d'incubation à 37°C.

### III.2.2. Caractérisation microscopique

L'étude de l'aspect microscopique après coloration de Gram permet d'éliminer d'éventuels contaminants surtout les champignons dans notre cas et différencier entre les coques et les bacilles.

Les bactéries sous forme de cocci se disposent en petites chainettes, en tétrade et en diplocoque, ou sont parfois isolées, par contre celles de la forme bacillaire sont sous forme de grandes chaînes régulières. Toutes les souches, asporulés et de Gram positifs (figure17).



**Figure 17** : Aspect morphologique cellulaire des cultures lactiques pures (x100).

### III.3. Tests biochimiques des souches lactiques

La confirmation de la pureté est complétée par la recherche de caractères biochimiques (catalase, oxydase). Nous avons noté l'absence d'une catalase et oxydase très puissantes chez les dix souches. Les résultats sont représentés dans le tableau 07.

**Tableau 07 :** Tests biochimiques des souches lactiques.

Souches lactiques	Caractère biochimique	
	Catalase	Oxydase
E1	-	-
E2	-	-
E4	-	-
E6	-	-
L1	-	-
L2	-	-
L4	-	-
L5	-	-
L7	-	-
L8	-	-
« E » : <i>Enterococcus</i> sp		« L » : <i>Lactobacillus</i> sp

Les résultats négatifs pour les deux tests permettent de confirmer l'appartenance au groupe des bactéries lactiques. Le test catalase montre l'absence d'enzyme permettant d'éliminer le peroxyde d'hydrogène, même résultat pour l'oxydase.

### III.4. Etude des aptitudes probiotiques d'un souche de bactéries lactiques

#### III.4.1. Production d'acide

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries agro-alimentaires car elle est considérée comme un critère primordial de sélection des souches à double intérêt technologique et probiotique. Le suivi de l'activité acidifiante des souches étudiées a été réalisé sur le milieu lait écrémé stérilisé (figure 18).

Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 19, 20, 21 et 22.



**Figure 18** : Résultat noté lors de la titration du lait (virage de la couleur en rose pale).

**Adnan et Tan (2007)** ont montré une corrélation entre les profils de production de l'acide lactique par quelques souches de bactéries lactiques (*Lactococcus lactis* et *Lactobacillus lactis*) et les profils du pH des cultures, ci pour cela, nous remarquons que la totalité des bactéries lactiques identifiées présentent une production progressive en acide lactique. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

D'après nos résultats, nous observons que l'évolution de l'acidité et les variations de pH au cours de la croissance des souches testées sur le lait écrémé démontrent une différence entre les genres et les espèces.

Après deux heures d'incubation, les valeurs de pH varient entre pH 6.41 et pH 6.64, en parallèle la quantité de l'acide lactique produite se situe entre 2.5g et 2.9g d'acide lactique par litre de lait.

Au bout de 24h d'incubation, ces valeurs de pH diminuent et se trouvent situées entre pH 4.13 et pH 5.16, de même la quantité de l'acide lactique produite se situe entre 6.5g/l et 12.5g/l.

La souche E1 était la plus acidifiante avec une quantité d'acide lactique moyenne de 11.5 g/l après 24h d'incubation. En parallèle, la valeur de pH atteinte avec cette souche 4.13. La cinétique d'acidification a montré que les souches L5, L8, L7 étaient moins acidifiantes en produisant des quantités variables d'acide lactique dont les moyennes sont de 7.90g/l, 6.85g/l et 6.55g/l respectivement.

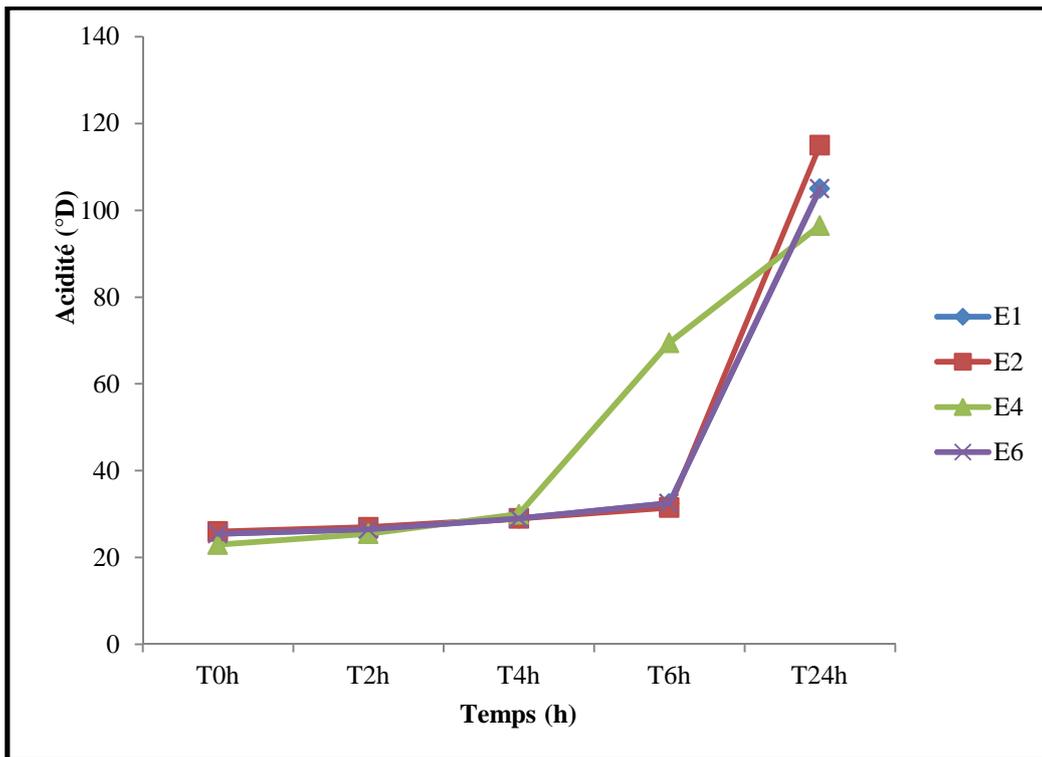


Figure 19 : Production d'acide lactique par les souches *Enterococcus* sp. codées E1, E2, E4 et E6.

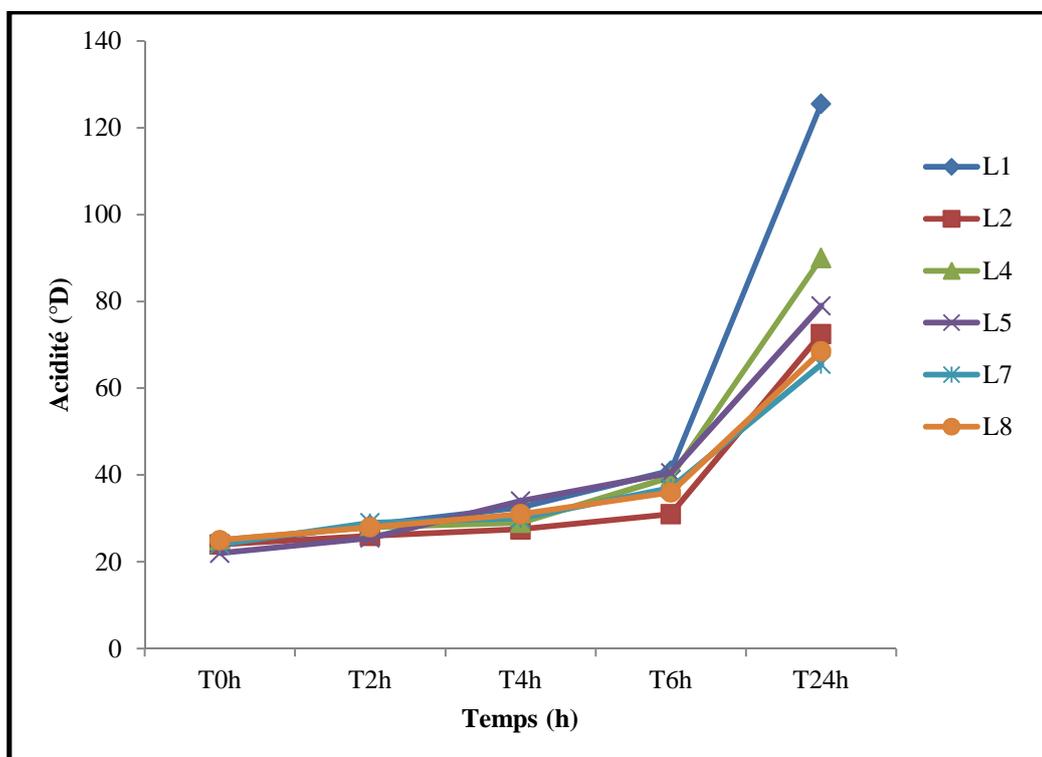


Figure 20 : Production d'acide lactique par les souches *Lactobacillus* sp. codées L1, L2, L4, L5, L7 et L8.

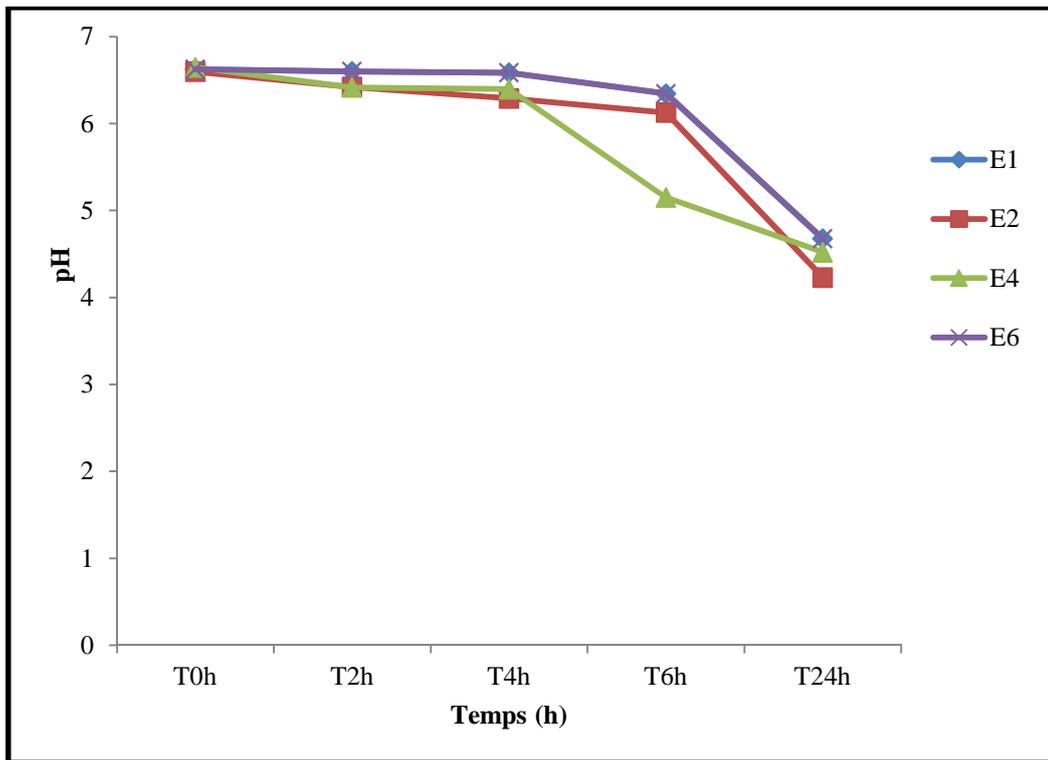


Figure 21 : Evolution de pH au cours de temps chez les souches *Enterococcus* sp codées E1, E2, E4 et E6

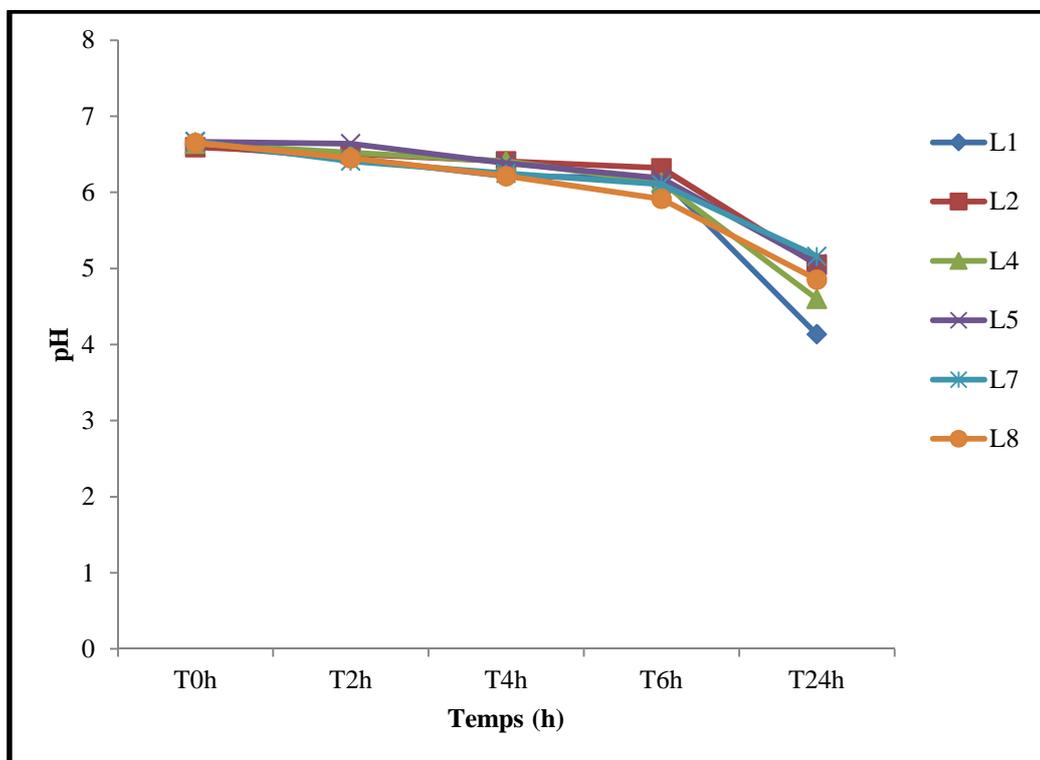


Figure 22 : Evolution de pH au cours de temps chez les souches *Lactobacillus* sp codées L1, L2, L4, L5, L7 et L8.

Les espèces d'*Enterococcus* produisent moins d'acide lactique que celles des *Lactobacillus*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Bouzaine et al. (2004)** et **Lin et al. (2007)**.

La production d'acide lactique par les bactéries lactiques est l'un des critères importants pour leur utilisation comme des souches probiotiques, puisque cet acide est un métabolite secondaire qui joue souvent un rôle important dans le mécanisme de défense, en inhibant les bactéries pathogènes et aide ainsi à la colonisation des BL. Le maximum d'acide lactique est produit pendant la phase stationnaire (**Gautam et Sharma, 2015**).

Une étude réalisée par **Handa et Sharma (2016)** a montré que la souche *Lactobacillus plantarum* F22 isolé d'un produit traditionnel produit une quantité de 7.1g/l d'acide lactique avec un pH 4.42 après 24h.

Les études ont révélé qu'il existait une relation négative entre la concentration d'acide lactique et le pH pendant la phase de croissance, c'est-à-dire que la production d'acide lactique est minimale lorsque le pH est maximal et vice versa (**Handa et Sharma, 2016**). La présente étude est conforme à ces observations.

Une différence dans la réduction du pH et la production d'acides entre les genres, les espèces et parfois entre les souches de la même espèce a été soulevée par de nombreux auteurs (**Arthur et al., 2002 ; Luquet et Corrieu, 2005**).

Des études menées par **Cannon et al. (2006)** et **Lange-Starke et al. (2014)**, ont montré le potentiel antiviral de l'acide lactique et l'abaissement du pH par différentes souches de bactéries lactiques.

D'après **Marianelli et al. (2010)**, l'effet antimicrobien complet de la souche probiotique *L. rhamnosus* testée est induit par sa production d'acide lactique au cours de la fermentation. Cependant, cet effet est indépendamment lié avec la concentration en acide lactique.

La coagulation du lait par les bactéries lactiques peut être provoqué soit par la transformation progressive du lactose du lait en acide lactique qui provoque l'abaissement du pH et la coagulation du lait, soit par un système enzymatique ou enzymes protéolytiques qui ont la propriété de coaguler le lait (**Sarkar, 2008 ; Mohammadi et al., 2012**).

Les souches ayant un profil d'acidification du lait rapide se révèlent comme étant de bonnes candidates pour l'industrie des aliments fermentés, et pourront être utilisées comme

cultures starters. De la même manière, les souches ayant montré un pouvoir d'acidification faible sont utilisées, mais en cultures mixtes, pour d'autres propriétés importantes, par exemple l'activité aromatisante (Hassain, 2013).

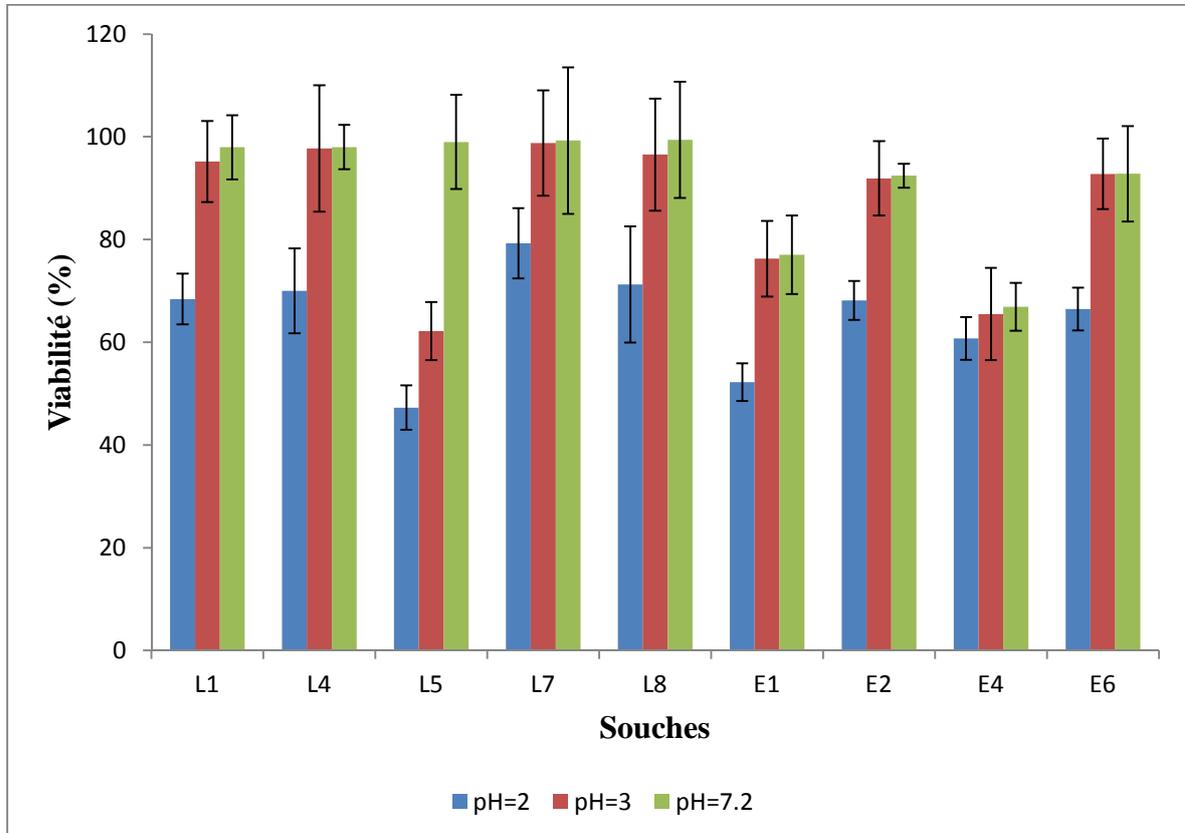
### III.4.2. Résistance des bactéries lactiques aux conditions hostiles gastro-intestinales

#### III.4.2.1. Tolérance à l'acidité

Une des caractéristiques importantes d'une bactérie lactique à effet probiotique est sa capacité de survivre dans des conditions difficiles d'acidité simulant celles du jus gastrique, ce dernier pouvant varier entre pH 1 après un jeûne et pH 4.5 à la suite d'un repas (Courtin et Rul, 2004 ; Guo *et al.*, 2010).

L'étude de l'exposition prolongée des souches lactiques aux conditions acides similaires à celles de l'estomac a été réalisée par incubation dans le tampon PBS à différents pH pendant 3h.

Les résultats représentés par la figure 23 montrent une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) du taux de viabilité de chaque souche bactérienne lorsque le pH augmente.



**Figure 23** : La tolérance des différentes souches lactiques à l'acidité.

Les souches étudiées ont montré une différence de comportement selon le pH acide (2 et 3). Les résultats obtenus montrent clairement la diminution progressive du nombre des cellules viables pour toutes les souches mise en contact avec les deux pH acides 2 et 3 avec le temps de contact, en comparaison avec le pH 7.2 (témoin) ou la perte de viabilité était négligeable.

En fait, à pH 2, le taux de viabilité de toutes les souches s'est montré le plus faible (compris entre  $47.28\% \pm 4.32\%$  et  $79.27\% \pm 6.85\%$ ) comparé à ceux à pH 3 et à pH 7.2, où le taux de viabilité le plus élevé a été enregistré à pH 7.2. Notant que les valeurs de pourcentage de viabilité enregistrées à pH 3 et à pH 7.2 sont très proches avec toutes les souches à l'exception de la souche L5. Le pH 2 a influencé fortement le taux de survie de la souche L5 (47.28). La diminution de la viabilité des souches à pH 2 est expliquée par le stress important exercé par l'acidité sur les cellules empêchant toute croissance.

Les souches mises en contact avec le pH 3 ont montré une excellente viabilité après 3h de contact, dont le plus faible taux de survie est de l'ordre de  $62.2\% \pm 5.65$ , cela est enregistré par la souche L5, les autres souches ont maintenu une très bonne portion de cellules viables. La souche L7 a inscrit une bonne viabilité de 79.27%, puis L8 de  $71.26\% \pm 10.89$  de sa charge initiale, par contre les entérocoques étaient les moins viables par rapport aux Lactobacilles.

D'une façon générale, il est bien établi que malgré qu'il y ait eu une perte de viabilité de l'ensemble des bactéries lactiques à pH acide, le nombre de cellules viables reste toujours important et supérieur à 80%. Donc, elles peuvent résister ultérieurement aux conditions d'acidité de l'estomac.

Ces résultats sont partiellement en accord avec ceux trouvés par **Lin et al. (2007)**, **Idoui et Sifour (2016)**, et **Idoui et al. (2016)** qui ont montré que le pH 3 est toléré par certaines espèces du genre *Lactobacillus* du tractus gastro-intestinal des poulets. De même, l'étude réalisée par **Bouridane et al. (2016)** sur des *Lactobacillus* a montré une résistance de ces dernières à pH 2 avec une viabilité qui oscille entre 40% et 82%.

**Ramakrishnan et al. (2014)** ont trouvé que les souches d'*Enterococcus faecium* tolèrent un pH 2.5 avec des taux de survie allant de 38% à 42%, cela est en accord avec nos résultats.

Il est admis pour que la majorité des probiotiques puissent avoir des rôles bénéfiques sur la santé humaine, il faut qu'ils gardent une certaine viabilité lors du transit intestinal. De ce

fait, les probiotiques doivent pouvoir passer sans dommage irréversible la barrière acide de l'estomac (Succi *et al.*, 2005 ; Klingberg *et al.*, 2006 ; Nuraida, 2015).

Des études réalisées ont montrées que la résistance au pH acide de l'espèce *B. animalis* peut être reliée à son excellente survie au passage du tractus gastro-intestinal de l'homme, chez cette espèce, une forte induction de l'activité des ATPases membranaires a été observée, pouvant ainsi expliquer la résistance élevée au pH acide. Cette activité n'étant pas induite chez les souches moins résistantes aux environnements acides (Ashraf et Shah, 2011).

L'étude menée par Metlef et Dilmi Bouras (2009) a montré que le matériel génétique et la capacité de produire une réponse adaptative au stress acide des bactéries lactiques jouent aussi un rôle très important dans leur résistance aux changements des conditions environnementales où plusieurs mécanismes interviennent dont les plus importants sont :

- L'activité de l'ATPase qui contribue à l'homéostasie du pH grâce à un échange de cations convertissant un potentiel transmembranaire en gradient de pH.
- la décarboxylation des acides et la présence des antiports électrogéniques chez les bactéries lactiques les aident à contrecarrer la baisse du pH intracellulaire.
- Le développer d'une réponse adaptative au stress acide, cette réponse est en stricte relation avec des protéines spécifiques responsables au maintien du pH intracellulaire à des valeurs approximatives du pH extracellulaires.

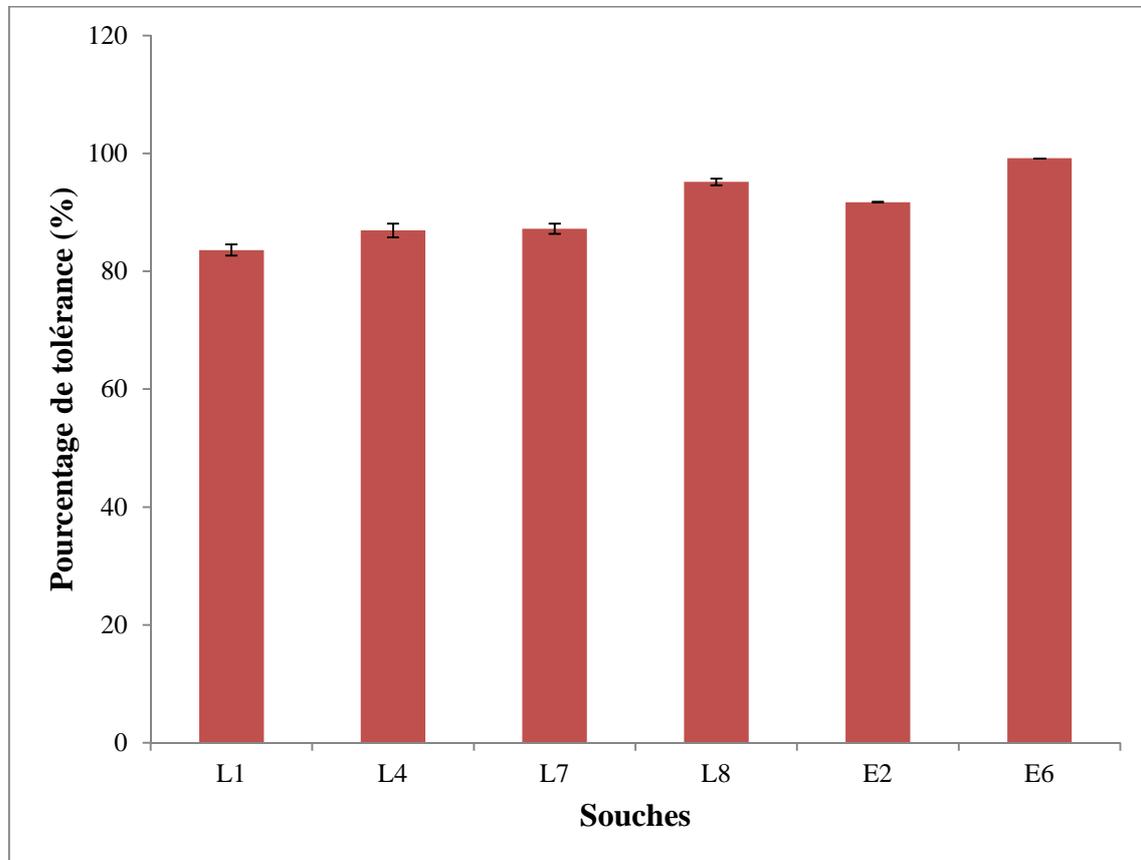
Les souches testées ayant une tolérance remarquable à l'acidité se révèlent comme étant de bonnes candidates pour continuer les tests qui restent, donc les souches sélectionnées sont : E2, E6, L2, L4, L7, L8.

#### **III.4.2.2. Tolérance aux sels biliaires**

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérées dans duodénum après ingestion des repas gras (Tambekar *et al.*, 2009).

La tolérance à la bile est un critère déterminant de sélection des bactéries probiotiques,

permettant ainsi la survie pendant le passage à travers le tractus gastro intestinal et la colonisation de l'environnement intestinal. Les résultats de la tolérance des souches lactiques à la bile sont mentionnés dans la figure 24.



**Figure 24 :** Tolérance des différentes souches lactiques envers les sels biliaires.

D'après les résultats inscrits, il apparaît clairement que les souches lactiques mises en contact avec une solution de PBS additionné de 0.5% de sels biliaires pendant 3h, montrent un pourcentage de tolérance différent varie entre  $83.605\% \pm 0.94$  et  $99.2\%$ .

Nous pouvons constater que la souche E6 est la plus résistante aux sels biliaires avec un pourcentage de tolérance égal à  $99.2\%$  suivie de la souche L8 ( $95.16\% \pm 0.56$ ). Cependant, la souche L1 est montrée la moins résistante avec un pourcentage de tolérance égal à  $83.605\% \pm 0.94$ . Une différence significative ( $p < 0.0001$ ) a été enregistrée entre les différents pourcentages de tolérance.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Bouzaine et al. (2004)** qui ont montré une tolérance et une croissance de certaines souches de *Lactobacillus* sp. et *Enterococcus* sp. sur le milieu MRS-agar additionné de la solution de sels biliaires à 0.3%.

Des résultats similaires ont déjà été rapportés par d'autres auteurs analysant des souches lactiques de différents environnements (**Delgado et al., 2007; Vinderola et al., 2008; Zago et al., 2011; Ramos et al., 2013**).

Les études de **Wang et al. (2010), Argyri et al. (2013) et Idoui et Sifour (2016)** ont montré des différents taux de tolérance aux sels biliaries à 0.5% allant de 1.71% à 99.79%.

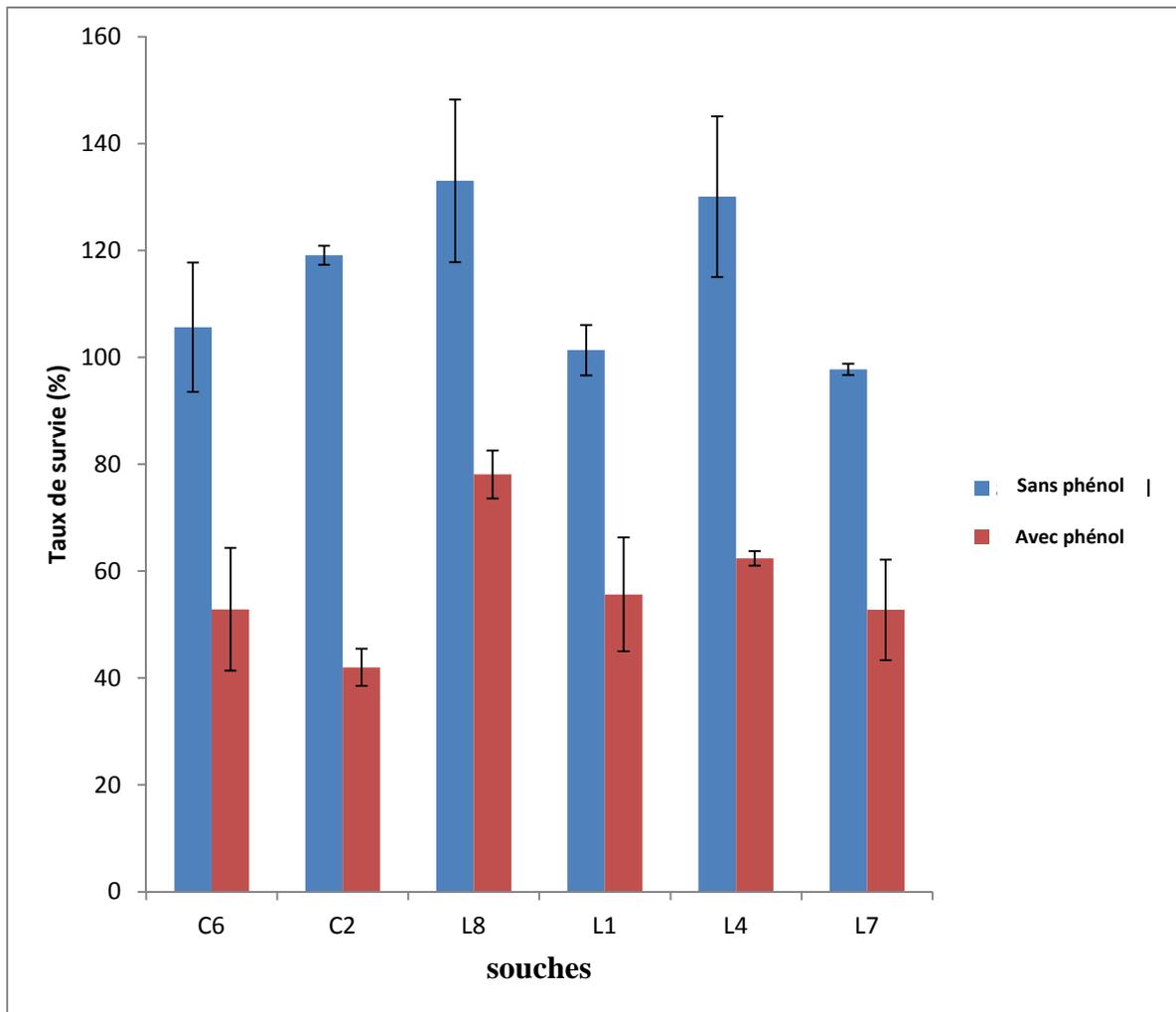
Le flux biliaire assure un rôle physiologiques très important puisque facilitant la digestion des composés lipophiles provenant de l'alimentation. La concentration moyenne de la bile intestinale est considérée comme étant de 0.3%-0.5% p/v, en outre, le temps de passage est suggéré être de 4 heures. C'est également un agent antimicrobien influençant l'établissement du microbiote intestinal (**Pfeiler et Klaenhammer, 2009**).

Les mécanismes de résistance des lactobacilles aux sels biliaries sont de mieux en mieux connus. Les lactobacilles sont capables de métaboliser les acides biliaries ce qui les protègent contre la bile. L'un des mécanismes de cette résistance, est la déconjugaison des acides biliaries par les enzymes *biles salts hydrolase* (BSH). L'hydrolyse libère les glycines et/ou les taurines du noyau stéroïde ce qui a pour effet de diminuer la solubilité de la bile à pH bas et de réduire ses activités détergentes (**Begley et al., 2006 ; Hamon et al., 2011**).

Un autre mécanisme responsable de la résistance des lactobacilles aux sels biliaries est l'extrusion de la bile. Ce mécanisme est réalisé grâce aux systèmes *multidrug resistance* (MDR). Les MDR sont responsables de la résistance à de nombreux composés toxiques comme les antibiotiques, les solvants organiques, les détergents et les sels biliaries (**Whitehead et al., 2008**). L'adaptation à la bile chez les probiotiques a été corrélé à des changements stables au niveau du profil de fermentation des sucres, de l'activité glycosidase, ainsi qu'au niveau de la composition en acides gras et du profil protéique membranaire (**Sánchez et al., 2010**).

#### III.4.2.3. Résistance au phénol

La résistance au phénol est un indicateur supplémentaire pour tester la survie des bactéries dans les conditions intestinales. Par conséquent, nous avons testé la capacité des souches de bactéries lactiques à croître en présence de 0.4% de phénol pendant un temps de contact de 24h en comparant avec un témoin sans phénol (figure 25).



**Figure 25** : Tolérance des différentes souches lactiques envers le phénol

La figure 25 montre qu'en l'absence du phénol les souches L8 et L4 ont enregistré les taux de survie les plus élevés ( $133.015 \pm 15.215\%$  et  $130.065\% \pm 15.035\%$ ). En présence du phénol, la souche L8 a un taux de survie égal à  $78.08 \pm 4.48\%$  et supérieur à ceux des autres souches, une différence non significative a été enregistrée entre les différentes souches ( $p=0.187$ ).

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Vizoso Pinto et al. (2010)** qui ont testé des souches de *Lactobacillus* spp. d'origine humaine et de produits traditionnels. Ils ont trouvé que la majorité des souches ont pu survivre dans 0.4% de phénol pendant 24h. Cependant, ces souches n'ont pas pu croître dans ce milieu durant toute la période d'incubation.

Pour qu'une souche soit probiotique, elle doit survivre à l'action des métabolites toxiques, principalement les phénols, produits pendant les processus de digestions. Quelques acides aminés aromatiques dérivés de protéines alimentaires ou endogènes peuvent être

désaminés dans l'intestin par des bactéries menant à la formation des phénols ayant des propriétés bactériostatiques. Ainsi, le test de la résistance au phénol peut générer plus d'informations sur le potentiel de survie des bactéries dans les conditions gastro-intestinales (Xanthopoulos, 2000 ; Aswathy *et al.*, 2008 ; Vizoso Pinto *et al.*, 2010).

### III.4.3. Tests de sécurité

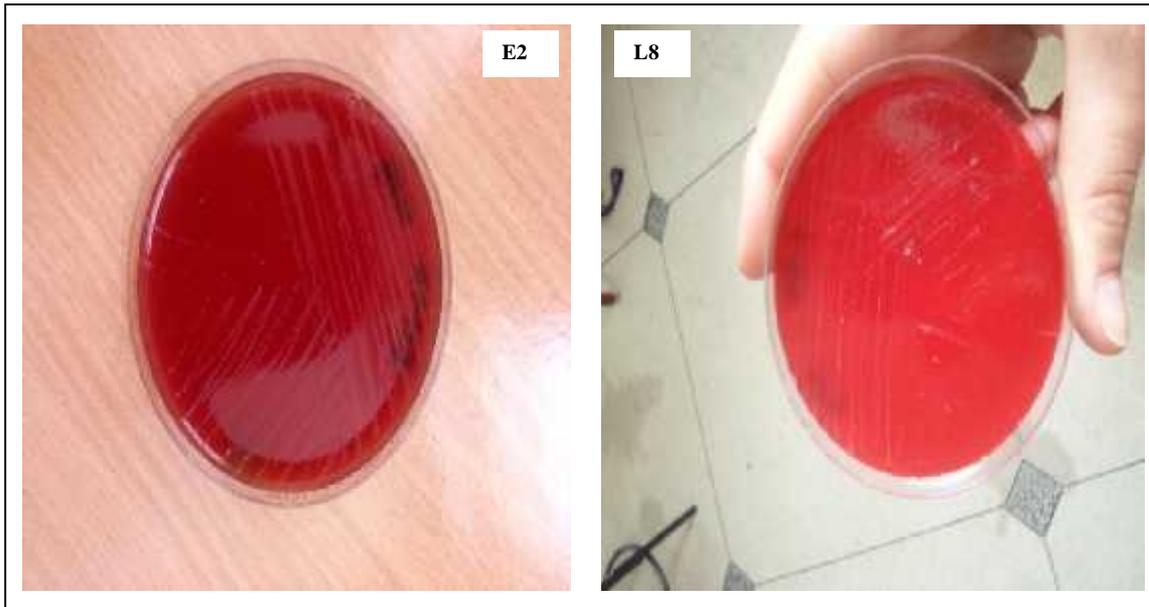
#### III.4.3.1. Test d'hémolyse

L'absence d'activité hémolytique est considéré comme une condition préalable de sécurité pour la sélection d'un probiotique (FAO / OMS, 2002). L'étude de l'activité hémolytique a été étudiée sur gélose Columbia au sang. Ce milieu est utilisé pour la détection et la détermination des caractéristiques hémolytiques d'une souche bactérienne donnée. Les zones d'hémolyse se manifestent comme suit : -hémolyse (zones claires autour des colonies), -hémolyse (zone avec reflets verdâtres) (tableau 08 et figure 26).

**Tableau 08** : Activité hémolytiques des bactéries lactiques

Souches	Activité hémolytique		
	hémolytique	-hémolytique	γhémolytique
E2	-	-	+
E6	-	-	+
L1	-	-	+
L4	-	-	+
L7	-	-	+
L8	-	-	+
(+) : Présence d'activité		(-) : Absence d'activité	

Nos souches testées n'ont pas présenté activité hémolytique. Köll *et al.*, (2010) ont rapporté des résultats similaires aux nôtres sur des souches isolées chez l'Homme. Aussi, Ouwehand *et al.*, (2004) n'ont observé aucun type d'hémolyse avec des souches de lactobacilles isolées chez des patients avec des cas de bactériémies par comparaison de leur caractères phénotypiques avec la souche commerciale *L. rhamnosus* GG. En revanche d'autres études ont rapporté des cas d' -hémolyses chez des souches vaginales de lactobacilles (Ashraf et Shah., 2011 ; Argyri *et al.*, 2013 ; Fang., 2015). L'absence de tout signe d'hémolyse indique l'aspect sécuritaire de nos souches.



**Figure 26** : Activité hémolytique de quelques souches lactiques sur gélose Colombia au sang

#### III.4.3.2. Résistance aux antibiotiques

Un autre aspect important de la sécurité sanitaire des probiotiques destinés à l'homme est le profil de la résistance aux antibiotiques. En effet, comme pour toutes les bactéries ; les souches probiotiques ont montré une résistance aux antimicrobiens (**Monteagudo et al., 2011 ; Morrow et al., 2012**). Dans ce contexte, il est recommandé d'étudier le profil de résistance des probiotiques pour les antibiotiques (**FAO/OMS, 2002**).

L'antibiogramme a été effectué sur les six souches lactiques, nous avons utilisé 10 antibiotiques, le test a été effectué sur gélose MRS. Après une culture de 24h, nous avons mesuré les diamètres des auréoles (zones d'inhibition de croissance de la souche microbienne).

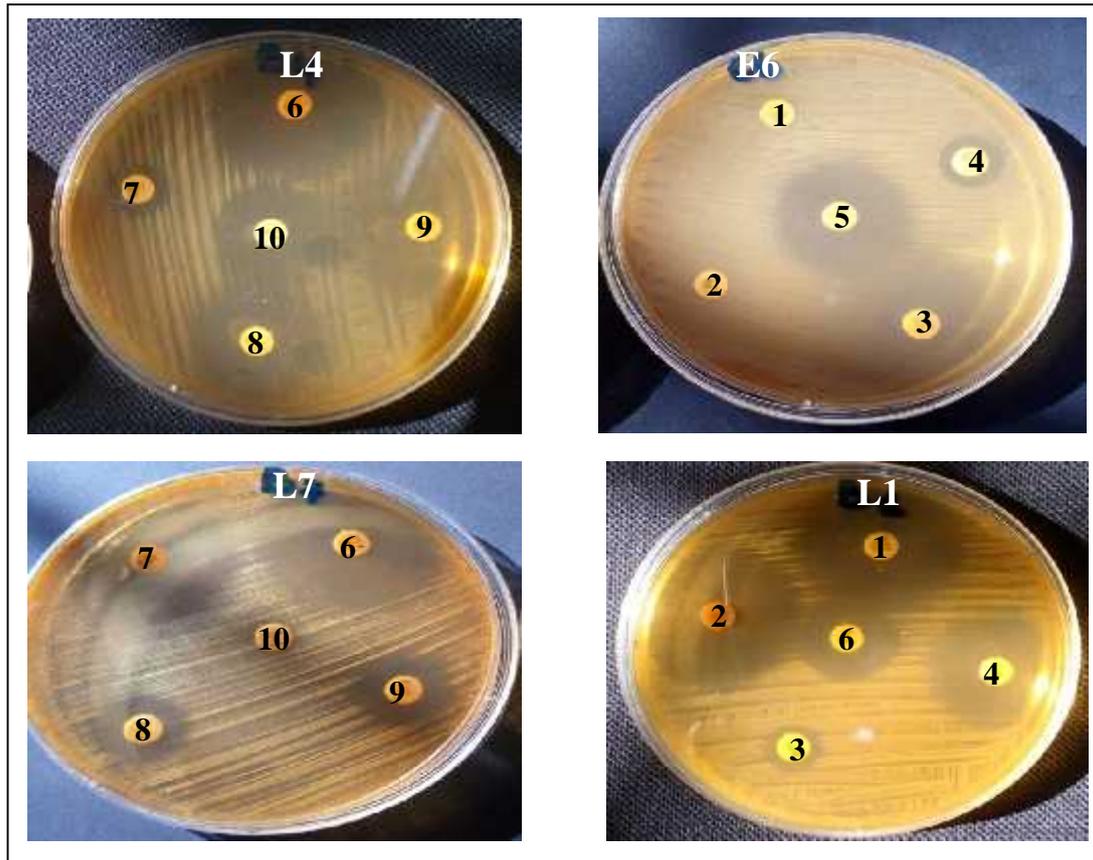
Les résultats de la résistance et la sensibilité des souches lactiques aux antibiotiques sont groupés dans le tableau 09. Les souches présentant un diamètre de zone d'inhibition inférieur à 15mm sont considérées comme résistantes (figure 27).

**Tableau 09:** les résultats de l'antibiogramme ainsi que la sensibilité et la résistance des souches lactiques vis -à-vis dix antibiotiques (les rayons de la zone d'inhibition).

Antibiotiques	Concentration (µg)	Zone d'inhibition (mm)					
		E6	E2	L1	L8	L7	L4
<b>Inhibition de la synthèse de parois</b>							
- cefotaxime	30	S	R	S	S	S	S
- cefazoline	30	S	R	S	R	S	S
-oxacilline	5	S	R	S	R	R	S
	1	R	R	R	R	R	R
<b>Inhibition de la synthèse protéique</b>							
- lincomycine	2	R	S	S	R	R	S
- amikacine	30	R	R	S	R	R	R
- gentamicine	15	R	R	S	R	S	R
<b>Inhibition de la synthèse nucléique</b>							
- rifampicine	30	S	S	S	S	S	S
- ciprofloxacine	5	S	S	R	R	R	S
- acide Nalidixique	30	R	R	R	R	R	R
R : Résistante				S : Sensible			
R : Zone d'inhibition 15				S : Zone d'inhibition 15			

La souche L8 est la plus résistante aux différents antibiotiques restés avec une résistance totale enregistrée envers 8 antibiotiques, les autres antibiotiques ont provoqué des zones d'inhibition avec des diamètres compris entre 8 mm et 25 mm.

L'oxacilline et l'acide nalidixique sont les antibiotiques dont aucune souche n'en a été montrée sensible. Les antibiotiques où aucune résistance n'a été constatée sont la rifampicine, la gentamicine et l'amikacine.



**Figure 27** : Zone d'inhibition de quelques souches lactiques sur gélose MRS.

[1 : NAL30 ; 2 : OX1 ; 3 : CZ30 ; 4 : AK30 ; 5 : L2]

[6 : CTX30 ; 7 : RD30 ; 8 : CN15 ; 9 : OX5 ; 10 : CTP5]

Nos résultats sont en accord avec l'étude d'**Aimmo (2007)** qui a rapporté que les lactobacilles sont généralement sensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la paroi. Les lactobacilles testés par **Handa et Sharma (2016)** sont révélés modérément sensibles à la gentamicine et résistants à la kanamycine et l'acide nalidaxique. Cependant, les recherches de **Bouridane et al. (2016)** ont montré une sensibilité des lactobacilles vis-à-vis le céfotaxime et une résistance envers la gentamicine.

Certains chercheurs ont signalé des cas de résistances de *Lactobacillus* à ces deux antibiotiques (céfotaxime et la gentamicine) (**Coppola et al., 2005**). Pour certains auteurs, un probiotique doit être résistant aux antibiotiques (**Wang et al., 2010 ; Balamurugan et al., 2014**).

Les bactéries lactiques peuvent résister aux antibiotiques en produisant des enzymes qui ont la capacité de modifier les antibiotiques telles les  $\beta$ -lactamase qui hydrolysent l'anneau

lactamine de la pénicilline, certaines bactéries vont modifier la cible moléculaire de l'antibiotique l'empêchant ainsi d'adhérer à la bactérie, ou l'expulsion de l'antibiotique vers l'extérieur de la bactérie à l'aide de pompes membranaires (Tulini *et al.*, 2013).

Finalement la résistance aux antibiotiques est une propriété due à la présence intrinsèque de gènes de résistance principalement acquis par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons) (Tulumoglu *et al.*, 2013).

La plasticité du génome des bactéries lactiques leur permet de s'adapter constamment à leur environnement et de résister à une large variété d'antibiotiques appartenant à différentes classes comme les bêta-lactames, les aminoglycosides, les lincosamides ou les glycopeptides (Inoue *et al.*, 2006 ; Sánchez *et al.*, 2010).

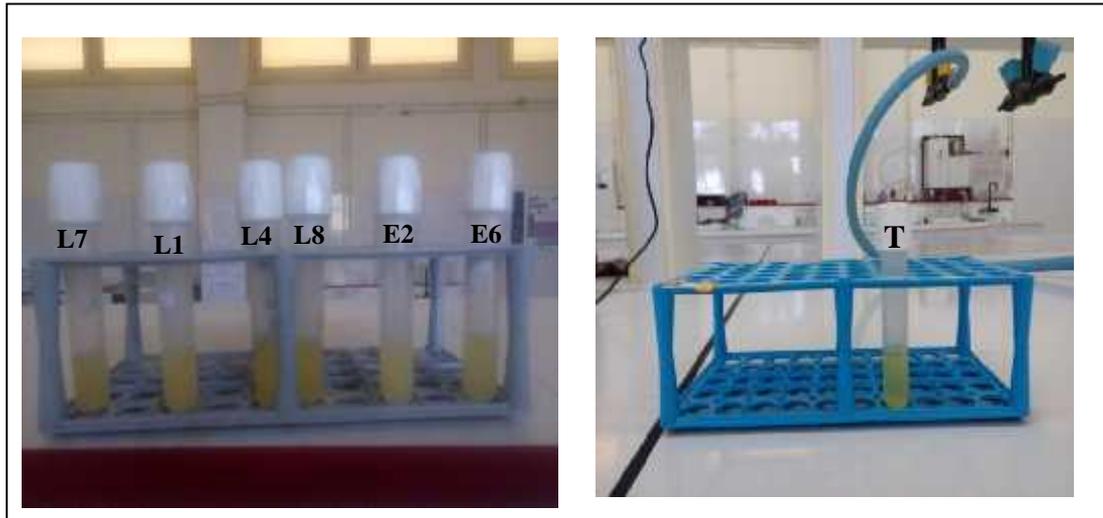
Il est nécessaire avant de lancer un produit probiotique de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne contiennent pas des gènes de résistance aux antibiotiques (Ammor et Mayo, 2007). Mais, selon Donohue (2004), le criblage de telles souches n'est pas encore entrepris actuellement, à cause de la difficulté de l'évaluation *in vivo* du potentiel de transfert de gènes de résistance.

#### **III.4.4. Tests de propriétés fonctionnelles et physiologiques**

##### **III.4.4.1. Activité $\beta$ -galactosidase**

Il s'agit d'une recherche particulière de la dégradation du lactose, souvent encore appelée recherche de la  $\beta$ -galactosidase ou communément test ONPG (ortho-nitrophényl- $\beta$ -D galacto-pyranoside). Ce composé possède un radical  $\beta$ -galactosidase comme le lactose, il est incolore, une fois scindé par l'enzyme en question, il libère du galactose et de l'orthonitrophénol. ONPG est incolore, tandis que le produit ONP est un composé chromogène jaune.

Le résultat de notre test est présenté dans la figure 28.



**Figure 28** : Activité -galactosidase des souches lactiques.

T : Témoin « *E. coli* »

Dans notre travail, les six souches lactiques ont montré un résultat positif pour l'activité de la -galactosidase. Le changement de couleur dans les 3 à 4 heures, cela signifie que l'activité de la -galactosidase est présente avec un niveau élevé chez les bactéries lactiques et justifie leurs capacité à améliorer la tolérance au lactose (**Rizkalla et al., 2000**).

Les lactobacilles ont été fortement producteurs de -galactosidase selon les travaux de **Vizoso Pinto et al. (2006)** ; **Leite et al., (2015)**.

D'après **Vandenplas et al. (2015)** la carence en lactase provoque une intolérance au lactose, ce qui entraîne des crampes abdominales, des nausées et des ballonnements. Les souches probiotiques qui sont lactase positives ont été appliquées avec succès pour soulager l'inconfort causé par l'intolérance au lactose.

Il a été rapporté que la consommation de lait ou de yogourt enrichis en probiotiques améliore l'absorption de lactose chez les patients déficients en lactase et réduit les symptômes digestifs dus à l'intolérance au lactose. La consommation de lait contenant des souches probiotiques réduit les symptômes du mal absorption de lactose chez des sujets humains suite à une élévation de la sécrétion de -galactosidase (**Mechai, 2009** ; **Leite et al., 2015**).

### III.4.4.2. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial

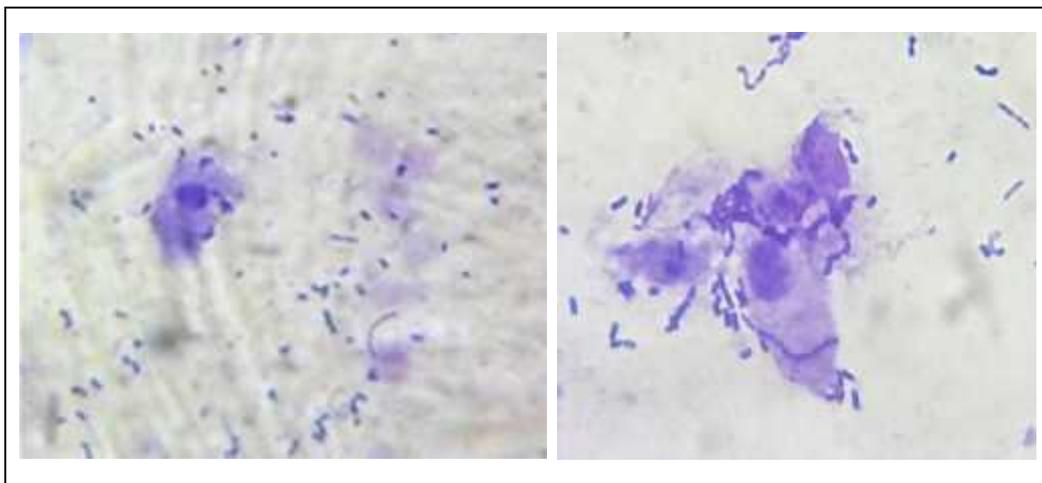
Afin d'exercer leurs effets bénéfiques, les probiotiques doivent adhérer aux cellules épithéliales ou au mucus intestinal et persister dans l'intestin (Collado *et al.*, 2005; Xiaodong *et al.*, 2009). La capacité des probiotiques à adhérer aux surfaces des muqueuses empêche leur évacuation rapide par la contraction intestinale et après écoulement péristaltique du digeste.

La méthode appliquée pour cette étude nous a permis d'avoir les résultats groupés dans le tableau 10 et la figure 29.

**Tableau 10:** Adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales de l'iléum.

Iléum		
Souches	Test	lecture
E2	-	Absence d'adhésion
E6	+++	Forte adhésion
L1	++	Bonne adhésion
L4	+	Moyenne adhésion
L7	+	Moyenne adhésion
L8	+++	Forte adhésion

D'après les résultats obtenus, il apparaît que les souches E6 et L8 présentent une excellente adhésion aux cellules épithéliales de l'iléum du poulet de chair, caractérisées par un nombre assez important de cellules fixé sur les cellules épithéliales. Tandis que les souches L4 et L7 présentent une adhésion modérée, alors que la souche E2 ne présente aucune capacité d'adhésion.



**Figure 29:** L'adhésion des bactéries lactiques au tissu épithélial du iléum observée par microscope (X100) après coloration au cristal violet (0.5%).

L'adhésion entre les cellules épithéliales du iléum et les bactéries probiotiques se fait par des interactions entre récepteurs spécifiques eucaryotes et ligands bactériens. Les mécanismes d'adhésion impliquent plusieurs protéines des structures de surface. Parmi ces protéines ; les adhésines retrouvées chez plusieurs souches de lactobacilles (**Ton-That et al., 2004 ; Marraffini et al., 2006**). D'autres protéines de surface ont été décrites impliquant la liaison des *Lactobacillus* à l'un des composants des cellules épithéliales ; la mucine (**Roos et Jonsson, 2002**).

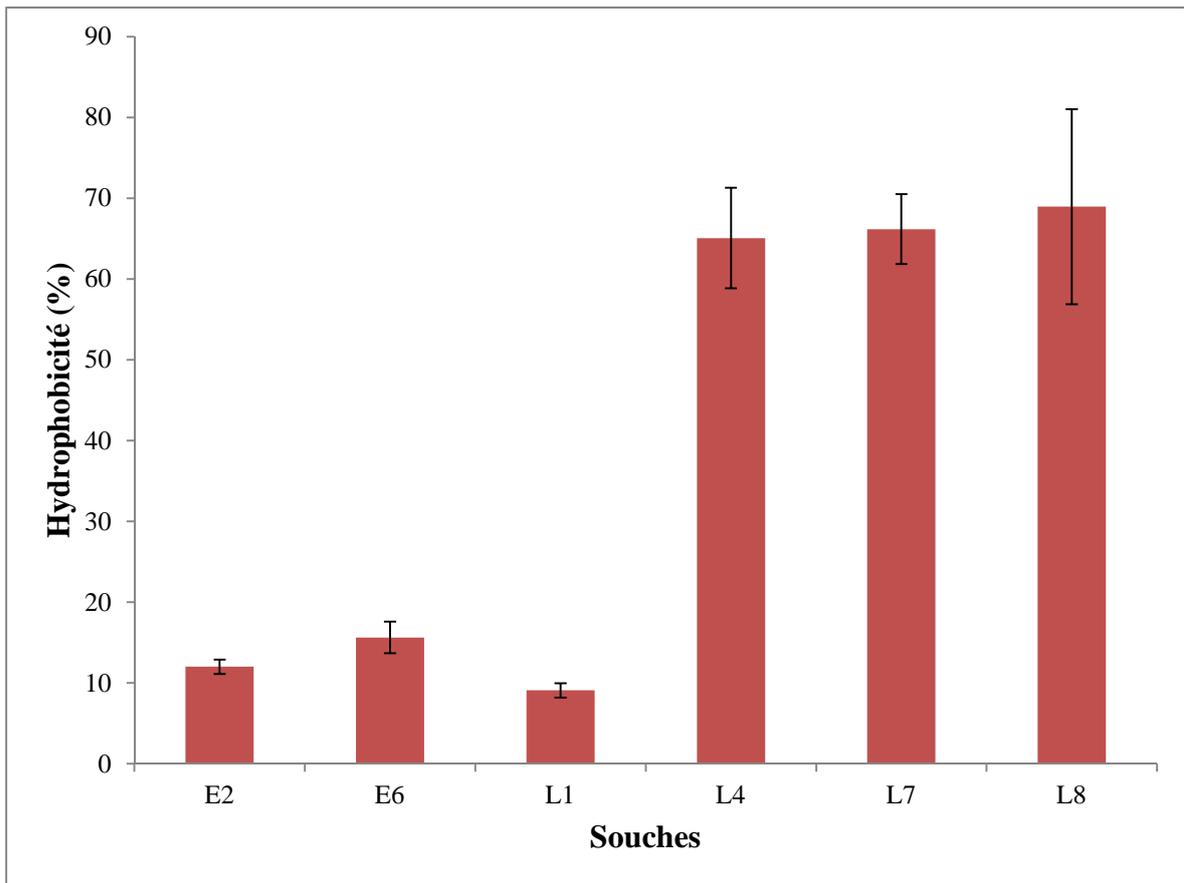
Des molécules non protéiques (fractions saccharidiques de surfaces, acide lipotéichoïque) ont été décrites comme favorisant l'adhésion des lactobacilles mais elles ne sont pas pour l'instant précisément identifiées. D'autres structures de surface comme les fimbriae ont été supposées être impliqués dans l'adhésion des lactobacilles (**Velez et al., 2007**).

Nos résultats sont en accord avec plusieurs travaux qui ont démontré l'adhésion aux cellules de lignées humaines de certaines souches appartenant genre *Lactobacillus* et *Enterococcus* (**Verdenelli et al., 2009 ; Ramakrishnan et al., 2014 ; Nuraida, 2015 ; Vandenplas et al., 2015 ; Idoui et Sifour, 2016 ; Bouridane et al., 2016**).

#### **III.4.4.3. Test d'hydrophobicité**

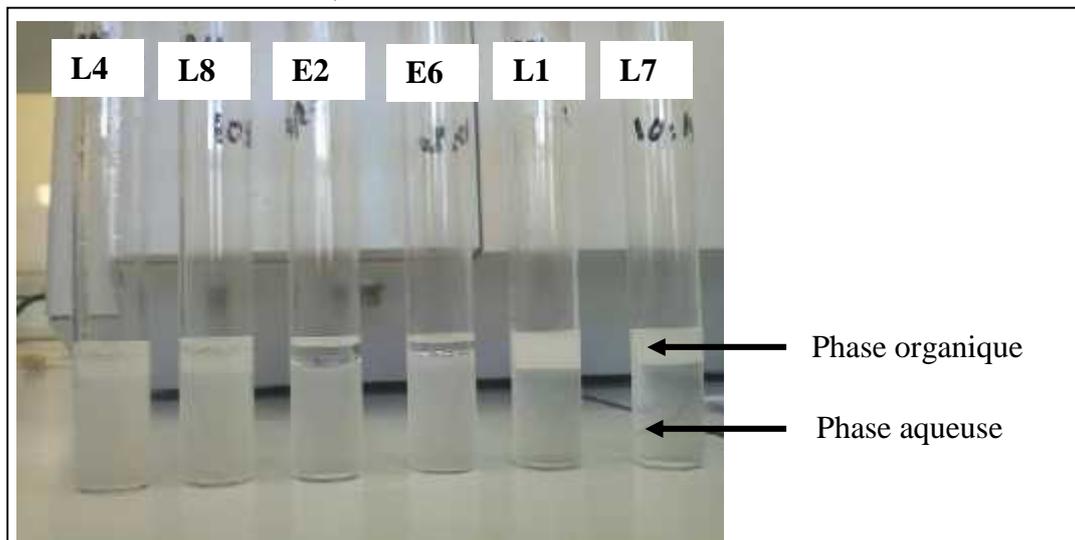
Ce test permet d'évaluer l'hydrophobicité de la surface cellulaire des ferments mixtes et des souches pures vis-à-vis du toluène qui peut refléter le potentiel de colonisation des ferments aux mucus intestinale.

La répartition des cellules entre la phase aqueuse et le toluène résulte de l'interaction hydrophobe entre les microorganismes et les hydrocarbures. Les pourcentages obtenus de l'adhérence des souches lactiques au toluène indiquent l'hydrophobicité de leur surface. Les résultats de ce test sont illustrés par les figures 30 et 31.



**Figure 30:** Pourcentage de l'hydrophobicité des différentes souches testées

En lisant les résultats représentés par l'histogramme de la figure 30, on peut remarquer ce qui suit : Les souches L4, L7 et L8 ont enregistré les pourcentages d'hydrophobicité les plus élevés (entre  $65.07\% \pm 6.23$  et  $68.95\% \pm 12.06$ ). Alors que, les pourcentages d'hydrophobicité enregistrés avec les souches : E2, E6 et L1 ont été les plus faibles (entre  $9.09\% \pm 0.88$  et  $15.64\% \pm 1.96$ ).



**Figure 31 :** Interaction des souches lactiques avec le toluène

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Rondón et al. (2008)** qui ont trouvé une hydrophobicité de 55,03% Pour la souche C65 de *Lactobacillus salivarius*, le même auteur a observé une variation entre les souches de la même espèce. Alors que **Sifour et Idoui (2016)** ont enregistré des valeurs d'hydrophobicité des souches de *Lactobacillus* spp. de 35% à 70%. Une hydrophobicité de 36.1% vis-à-vis le toluène est marqué chez la souche *L. plantarum* F22 dans les travaux de **Handa et Sharma (2016)**.

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes. Ainsi, elle semble être un facteur aidant à l'adhérence, mais elle ne contribue pas à une bonne adhésion (**Roos et Jonsson, 2002 ; Gueimonde et al., 2007 ; Vandenplas et al., 2015**).

Il est intéressant de noter que la capacité d'adhérence de Lactobacilles a été corrélée à l'hydrophobicité des cellules, qui Représente un avantage pour la maintenance bactérienne dans le gastro-intestinal (**Kos et al., 2003**).

#### **III.4.5. Mise en évidence des activités d'agrégation**

L'agrégation est un processus de collecte réversible de cellules bactériennes de la même souche (autoagrégation) ou deux souches bactériennes différentes (Coagrégation). La capacité d'autoagrégation de la bactérie probiotique est en corrélation avec l'adhérence qui est une condition préalable pour la colonisation et la protection de tractus gastro-intestinal, alors que la coagrégation assure une interaction étroite avec les bactéries pathogènes.

Les résultats sont présentés aux figures 32 et 33.

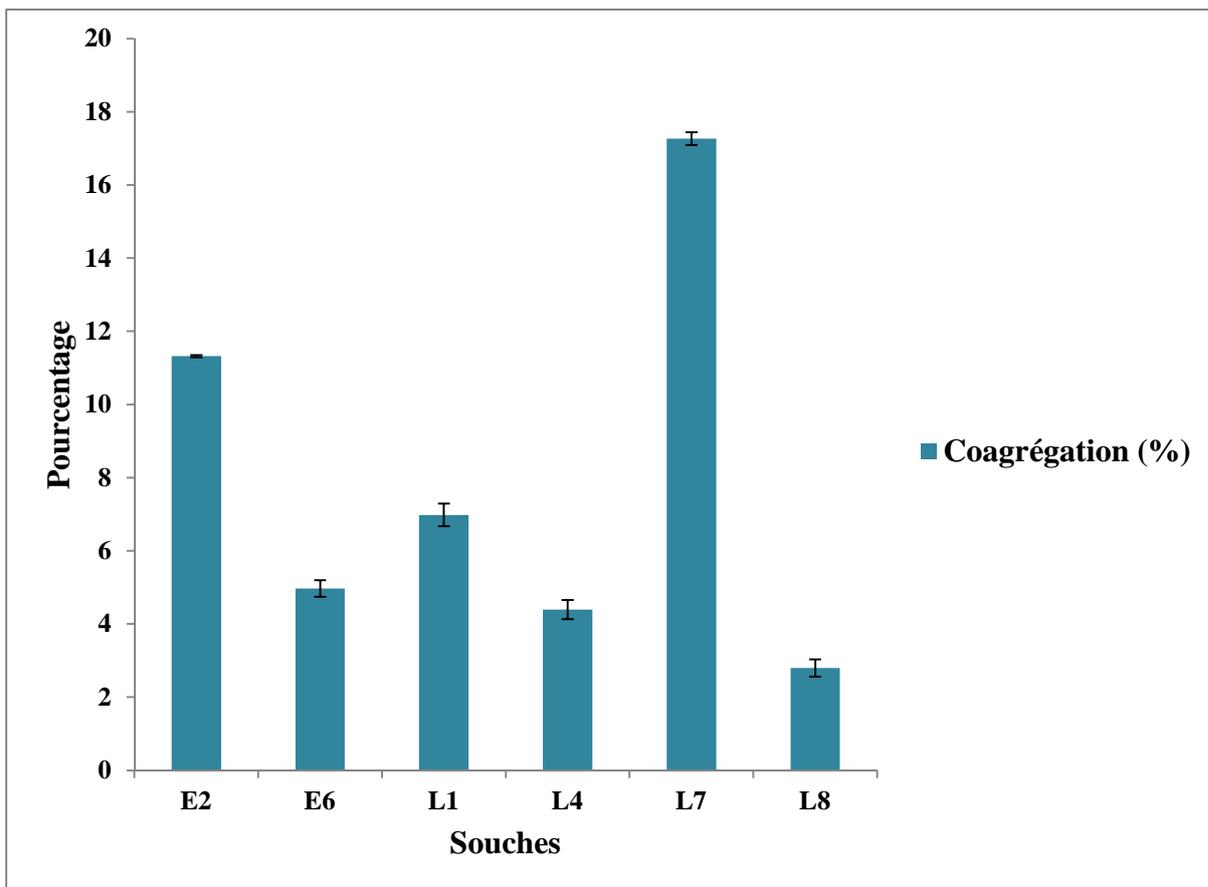


Figure 32 : Pourcentage de coagrégation des souches lactiques avec l’*E.coli*.

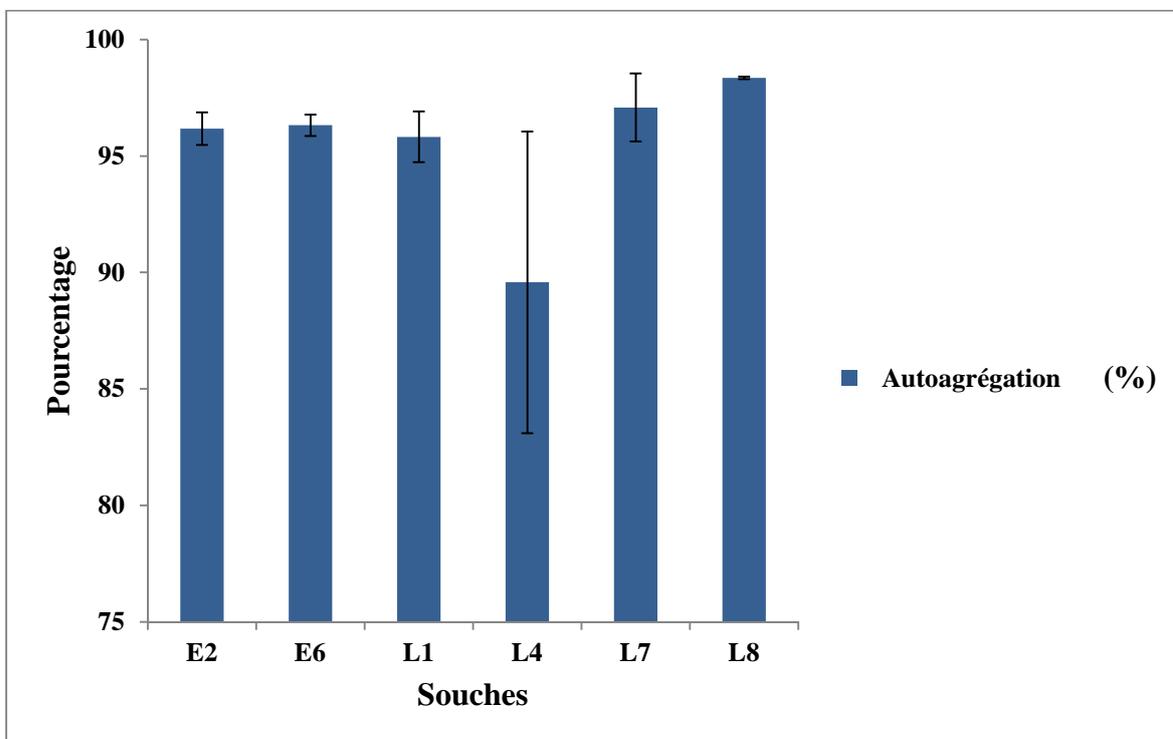


Figure 33 : Pourcentage de l’autoagrégation des souches lactiques

La figure 33 représente le résultat de test d'autoagrégation, elle montre que les valeurs de pourcentage d'autoagrégation sont très proches et varient entre 89.75% et 98.35%. Une différence non significative entre les souches testées ( $p > 0.05$ ) a été enregistrée.

Pour le test de coagrégation, les résultats représentés par la figure ci-dessus nous ont permis de dire qu'il y a une différence significative ( $p < 0.0001$ ) entre les différentes souches dont le pourcentage de coagrégation est compris entre 2.79% et 17.26%. Le pourcentage de coagrégation le plus élevé est observé chez la souche L7 (17.26 %  $\pm$  0.17%) alors que celui le plus faible a été observé chez la souche L8 (2.79%  $\pm$  0.23%).

Plusieurs chercheurs sont déclarés que la capacité de co-agrégation de bactéries lactiques en présence d'agents pathogènes intestinaux améliorera les propriétés probiotiques de ces bactéries. (Cesena *et al.*, 2001; Collabo *et al.*, 2005 ; Tareb *et al.*, 2012).

La substance d'agrégation (SA) est une glycoprotéine codée par un gène plasmidique régulé par des phéromones. Ces dernières favorisent le lien à des récepteurs de la surface des eucaryotes, jouent un rôle essentiel dans la colonisation de l'hôte (Collado *et al.*, 2008 ; Das *et al.*, 2016 ; Teles *et al.*, 2016).

Les résultats de co-agrégation de notre étude concordent avec celles rapportées par d'autres auteurs (Angmo *et al.*, 2016 ; Ben Taheur *et al.*, 2016). La capacité des bactéries lactiques de se co-agréger avec des agents pathogènes peut être attribuée aux composants de la surface cellulaire, mais les mécanismes nécessitent encore mal connus.

Dans notre étude, aucune corrélation n'a été observée entre l'hydrophobicité de la surface cellulaire, la capacité d'adhérer *in vitro* au tissu épithélial intestinal et à l'agrégation automatique car tous les souches ont une faible hydrophobicité alors que certains souches ont une très forte capacité d'adhésion (tableau 11). La souche E6 qui possède une forte adhésion aux cellules, cependant sa coagrégation est faible est un exemple.

La relation entre l'autoagrégation, l'adhésion et l'hydrophobicité a été rapportée par plusieurs auteurs (Kaewsrichan *et al.*, 2006 ; Collado et Meriluoto., 2008 ; Kaewnopparat *et al.*, 2013 ), mais cette corrélation n'a pas été trouvée ou rapportée par les autres (Kaushik *et al.*, 2009 ; Balakrishna, 2013).

Les résultats obtenus étaient en accord avec ceux rapportés par Blakrishna, (2013) et Idoui et Sifour (2016), qui n'ont montré aucune corrélation entre ces paramètres.

**Tableau 11:** Aptitude des souches lactiques pour adhérer *in vitro* au tissu épithélial, pourcentage d'hydrophobicité et la capacité d'autoagregation.

Souches	Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial	Autoagrégation %		Hydrphobicité %	Coagrégation après 5h d'incubation (%) <i>E.coli</i>
		1h	5h		
E2	-	95,48	96,87	12,01	11,29
E6	+++	95,86	96,78	15,64	4,74
L1	++	96,91	94,73	9,09	12,29
L4	+	83,10	96,05	65,07	4,13
L7	+	95,62	98,54	66,18	17,44
L8	+++	98,29	98,41	68,95	2,56

### III.4.6. Etude des interactions bactériennes

#### III.4.6.1. L'activité antimicrobienne

La capacité inhibitrice *in vitro* des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes semble être une bonne propriété probiotique, comme elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires (Ammor *et al.*, 2006).

L'activité antibactérienne d'un probiotique est primordiale pour la colonisation réussie des muqueuses intestinales. Elle lui assure un effet de barrière et de défense contre les pathogènes (Handa et Sharma, 2016 ; Valan Arasu *et al.*, 2016).

Dans ce travail, la révélation du spectre d'activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques a été réalisée sur des bactéries pathogènes Gram positifs et Gram négatifs après la purification de ces dernières.

La méthode de **Tadesse et al, (2004)** a été utilisée pour la détection des inhibitions. L'activité inhibitrice se traduit par la formation d'un halo autour des disques, la lecture des résultats consiste à mesurer le rayon de l'halo d'inhibition.

Les résultats de l'activité antibactérienne sont représentés dans le tableau 12.

**Tableau12** : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques vis-à-vis les souches pathogènes.

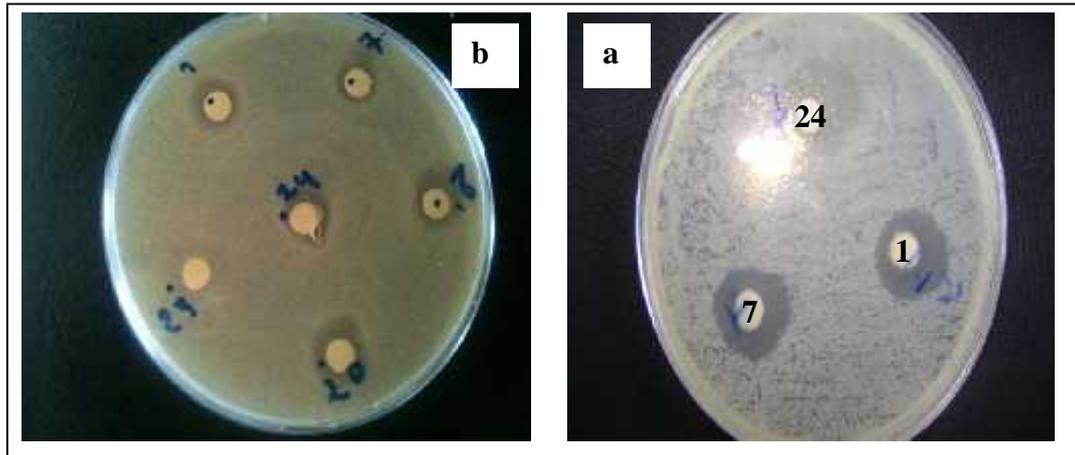
Souches	Zone d'inhibition (mm)				
	Gram positif			Gram négatif	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>E. coli</i>
E6	-	++	+	+	+
E2	++	++	+	+	-
L1	++	++	++	+	+
L4	+	++	+	+	+
L7	+	++	+	+	+
L8	++	++	+	+	+

(-) : absence d'activité antimicrobienne, diamètre 0 ; (+) : faible, diamètre compris entre 0 et 9 mm ; (+ +) : bon, diamètre compris entre 9 et 15 mm.

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont révélé que ce n'est pas tous les souches étudiées produisent et excrètent dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance des souches pathogènes cibles.

Les résultats représentés dans le tableau, montrent que les cultures bactériennes de six souches avaient des activités antibactériennes faibles. Elles ont présenté des spectres d'activité modeste sur toute la collection des souches pathogènes ; aussi bien les Gram négatifs que les Gram positifs, avec des zones d'inhibition de 7mm et plus, traduisant un faible potentiel antagoniste. Sauf contre listeria ou toutes les souches ont montrées une bonne activité.

Les souches E6 et E2 ont montrées une absence d'activité antimicrobienne où le diamètre est 0mm (figure 34).



**Figure 34 :** Activité antibactérienne (mm) des souches lactiques

[1 : L1 ; 7 : L8 ; 8 : L4 ; 20 : L7 ; 23 : E6 ; 24 : E2]

(a) : *Listeria innocua*      (b) : *Staphylococcus aureus*

Plusieurs études ont montré l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes (**Rodrigues et al., 2005 ; Hernandez et al., 2005**). leurs propriétés sont dérivées de la concurrence pour les nutriments et la production d'un ou plusieurs métabolites antimicrobiennes actifs tels que les acides organiques (principalement l'acide lactique et l'acide acétique), le diacétyle qui possède aussi un pouvoir d'inhibition, le peroxyde d'hydrogène inhibant les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et d'autres composants de nature protéique (bactériocines) et les peptides antifongiques (**REIS et al., 2012 ; Ouwehand et Vesterlund, 2004**). Douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes (**Askouul et Saiah, 2014**).

**Onda et al. (2003)** suggèrent que les bactéries Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques.

#### III.4.6.2. Test de coexistence

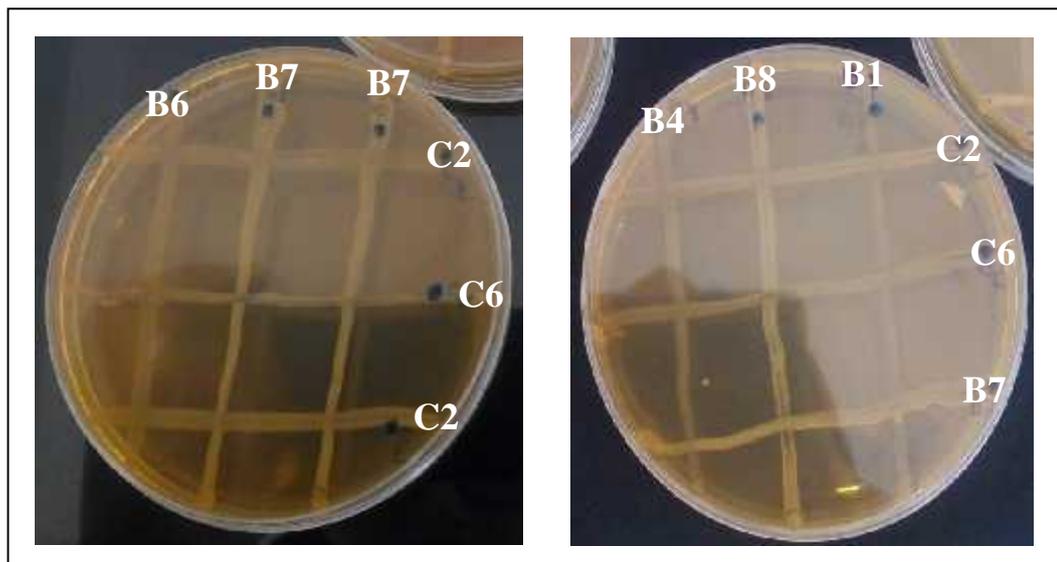
Ce test va mettre en évidence les caractéristiques que possèdent certaines souches de bactéries lactiques à stimuler ou inhiber d'autres souches de même espèce ou d'espèce différente, une fois mise en contact. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 13 et la figure 35.

Il est assez rare que l'on utilise pour la fabrication des produits laitiers une seule souche de bactéries lactiques. En règle générale, on associe plusieurs souches, voir plusieurs espèces et genres bactériens (**Brashears *et al.*, 2003**).

**Tableau 13** : Interactions entre les bactéries lactiques.

Souches	E2	E6	L1	L4	L7	L8
E2		+	+	+	+	+
E6	+		+	+	+	+
L1	+	+		+	+	+
L4	+	+	+		+	+
L7	+	+	+	+		+
L8	+	+	+	+	+	

+ : Symbiose



**Figure 35** : Résultats des interactions entre quelques souches lactiques.

En analysant les résultats, nous constatons que toutes les souches lactiques testées peuvent être symbiotiques avec les souches lactiques de la même collection. Cela est en accord avec les résultats trouvés par **Guo *et al.* (2010)** et **Hadef (2012)** qui ont analysé des souchiers de bactéries lactiques.

Ces résultats peuvent aider à combiner entre les souches lactiques étudiées pour obtenir des collections de probiotiques ou des starters mixtes probiotiques.

---

***Conclusion et  
Perspectives***

---

Les bactéries lactiques, pourraient être, par excellence, de bons candidats probiotiques par considération qu'ils sont des composants normaux et bénéfiques du microbiote intestinal humain et en vue de leur longue histoire d'utilisation comme microorganismes « surs » dans l'industrie alimentaire.

L'objectif de cette étude était d'évaluer les principales aptitudes probiotiques de quelques souches indigènes de bactéries lactique pour une éventuelle exploitation industrielle de ces dites souches. Pour atteindre ce but, dix souches locales ont été obtenues à partir de beurre de chèvre et Klila et ont été identifiées par les techniques de la microbiologie classiques.

La purification des souches a été réalisée par la détermination des caractéristiques morphologiques et biochimiques. Les résultats de ces tests ont indiqués que toutes les souches sont des Gram positives, catalase et oxydase négatives, ce qui permet de confirmer l'appartenance au groupe des bactéries lactiques.

Ces souches ont été mises à une évaluation *in vitro* de leurs propriétés probiotiques dont nous citons : la production d'acide, la résistance aux conditions gastro-intestinales hostiles (pH acide, sels biliaires et phénol), agrégation (autoagrégation et coagrégation), les propriétés fonctionnelles et physiologiques (hydrophobicité, Adhésion *in vitro* au tissu épithélial et activité -galactosidase), interactions bactériennes (coexistence et activité antibactérienne). L'aspect sécuritaire des souches probiotiques a été également étudié via leur activité hémolytique et leur résistance aux antibiotiques.

Les résultats fournis par cette étude sont notamment intéressants. Les souches indigènes ont montré une résistance remarquable vis-à-vis les conditions acides où elles ont pu préserver un taux de survie proche de 98.77% avec le pH3 et de 79.27% avec le pH2. Ce test permet de sélectionner les meilleurs candidats (E2, E6, L1, L4, L7 et L8) qui ont une résistance parfaite à l'acidité.

Une excellente viabilité des souches indigènes dépassant les 99.20% (enregistré par la souche E6) a été notée après 3h de contact avec 0.5% des sels biliaires. Encore une résistance notable des souches lactiques sélectionnées de 82.56% (la souche L8) a été notée après 24h de contact avec 0.4% de phénol.

Par rapport à leur aspect sécuritaire, les six souches sélectionnées étaient non hémolytiques et leur résistance aux antibiotiques se diffère, aucune des souches n'en a été montrée sensible à l'oxacilline et l'acide nalidixique.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne envers les souches pathogènes ont désigné l'existence d'une faible activité inhibitrice. Cette activité inhibitrice semble à être lié à la production des acides organiques et à un abaissement de pH du milieu ainsi que d'autre substances.

L'étude des interactions des souches a montré que toutes les souches lactiques testées peuvent être symbiotiques avec les souches de la même collection. L'adhésion aux cellules épithéliales des souches candidates a permis de sélectionner deux d'entre elles exhibant une forte adhérence, il s'agit de : E6 et L8. De même, elles ont montré une bonne hydrophobicité et une activité  $\beta$ -galactosidase positive, une autoagrégation remarquable et une coagrégation modérée.

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les souches bactériennes testées peuvent être considérées comme potentiels candidats probiotiques.

Les perspectives pour continuer cette étude sont très larges, puisque la recherche sur les probiotiques représente un domaine qui intéresse les scientifiques, les législateurs, les technologues/ industriels ainsi que les spécialistes du business et marketing. Nous nous contenterons de suggérer ici les perspectives les plus pertinentes aux résultats obtenus dans notre étude :

- Confirmer l'effet probiotique des souches lactiques par la réalisation d'autres tests *in vitro* et *in vivo* ;
- Utilisation de nouvelles techniques et méthodes d'identification moléculaires et génotypiques des bactéries lactiques qui ont une valeur probiotique ;
- Exploitation des outils biotechnologiques modernes pour mieux caractériser les souches probiotiques ;
- Mener des essais préliminaires en cultures cellulaires et chez des animaux pour évaluer les bienfaits de ces souches ;
- Elucidation des mécanismes d'interaction avec l'hôte ainsi que l'identification des gènes impliqués ;
- Essayer de fabriquer un produit probiotique à l'aide des souches lactiques testées.

---

*Références*  
*Bibliographiques*

---

**A-B**

- Adeniyi B.A., Adetoye A. et Ayeni F.A., 2015.** Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow faeces against potential enteric pathogens. *African Health Sci.* **15** (3): 888-95.
- Adnan A.F.M., et Tan I.K.P., 2007.** Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian food and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology.* **98**: 1380-1385.
- Aires J., Doucet-Populaire F. et Butel MJ., 2007.** Tetracycline resistance mediated by tet(W), tet(M), and tet(O) genes of Bifidobacterium isolates from humans. *Appl Environ Microbiol.* **3**: 2751-2760.
- Ait-Belgnaoui A., Lamine F., Han W., Eutamene H., Fioramonti J., Bueno L. et Theodorou V., 2005.** A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct.* **3** : 59-63.
- Akalin A.S. et Erisir D., 2008.** Effects of Inulin and Oligofructose on the Rheological Characteristics and Probiotic Culture Survival in Low-Fat Probiotic Ice Cream. *J Food Sci.* **73**: M184–M188.
- Amara A.A. et Shibl A., 2015.** Role of probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharm J.* **23**:107–14.
- Ammor M.S. et Mayo B., 2007.** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* **76**: 138-146.
- Ammor S., Tauveron G., Dufor E. et Chevalier I., 2006.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control.* **17**: 454-461.
- Ana B., Mario Ulcuango., Lucía Y. et Gabriela Tenea., 2016.** Assessment of the *in vitro* bioactive properties of lactic acid bacteria isolated from native ecological niches of Ecuador. *Rev Argent Microbiol.* **48**(3): 236-244.

- Anal A.K. et Singh H., 2007.** Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Science & Technology* .**18**: 240-251.
- Angmo, K., Kumari, A. et Bhalla T.C., 2016.** Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT – Food Sci. Technol.* **66** : 428–435.
- Anthoula A., Georgia Zoumpouloulou., Efstathios Z. et Chrysoula C., 2013.** Selection of potentiel probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests.
- Apolinaria García., Karen Navarro., Enrique Sanhueza et Susana Pineda., 2017.** Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helibacter pylori* activity. *Electronic J. of Biotechnology*. **25** :75-83.
- Arena M.P., Caggianiello G., Russo P., Albenzio M., Massa S., Fiocco D., Capozzi V. et SpanoG., 2015.** Functional starters for functional yogurt. *Foods*. **4**: 15-33.
- Argyri A.A., Zoumpopoulou G, Karatzas K.A.G., Tsakalidou E., Nychas G.J.E, Panagou E.Z et Tassou C.C., 2013.** Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiol* **33**:282–291.
- Ashraf R et Shah N. P., 2011.** Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt a review. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 194e208.
- Ashwell M., 2002.** Concepts of functional foods. Brussels. International Life Science Institute (ILSI) Europe.
- Askouul I. et Saiah,A., 2014.** Isolation and Characterization of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria from some Syrian fermented foods. *International Journal of ChemTech Research*, Vol.6, No.4, pp 2507-2520
- Aswathy R.G., Ismail B., John P.J et Nampootheri K.M., 2008.** Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid Bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **10** : 8183–8186.
- Arthur C.O., Tarja S., Satu T et Seppo S., 2002.** *In vitro* adhesion of propionic acid bacteria to human intestinal mucus. *Lait*. **82**: 123-130.

- Atlan D., Béal C., Gadu P., Gilbert C., Goffin P. et Maguin E., 2008.** Métabolisme et ingénierie métabolique. In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec et Doc, Lavoisier*. Paris. 271-447.
- Axelsson L., 2004.** Classification and physiology. In : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3<sup>ème</sup> Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 1-66.
- Bailiang Li., Fei Lin., Yaru Tang., Smith Evivie., Nana Wang., Wan Li. et Guicheng Huo., 2015.** Complete genome sequence of *Lactobacillus helveticus*. Probiotic strain producing bacteriocin. *J. of Biotech* **212** : 90-91
- Balakrishna A., 2013.** In vitro evaluation of adhesion and aggregation abilities of four potential probiotic strains isolated from guppy (*Poeciliareticulata*). *Braz Arch Biol Technol* .**56** (5):793-800.
- Balamurugan R., Chellappan G., Rajaram K., Ramamoorthi G. et Ramakrishna B. S., 2014.** Probiotic potential of lactic acid bacteria present in home made curd in southern India. *Indian J. Med. Res.* **140** : 345-355.
- Barreau, G., T. A. Tompkins, et Carvalho V., 2012.** Draft genome sequence of probiotic strain *Pediococcus acidilactici*. MA18/5M. *J Bacteriol.* **194**:901.
- Benasla A., 2012.** Production d'exopolysaccharides par des souches de lactobacilles. Thèse de Magister en Biotechnologie. Université d'ORAN ES-Senia.
- Ben Taheur F., Kouidhi B., Fdhila K., Elabed H., Ben Slama R., Mahdouani K et al., 2016.** Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *391 Microbial Pathogenesis*, 97, 213-220
- Bergey, 2009.** Manuelle de la systématique bactérienne. 1<sup>er</sup> Ed. *RE Buchanan and N.E Gibbons*. 600.
- Bibiloni R., Fedorak R.N., Tannock G.W., Madsen K.L. et Gionchetti M., 2005.** VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* **100**:1539-46.
- Bouchefra A., 2012.** Yaourts probiotiques algériens et ferments commerciaux utilisés dans leur fabrication: contrôle de qualité et de l'étiquetage. [Thèse]. Biotechnologie

Alimentaire. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA).135p.

**Boudjema K., 2008.** Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus*. Mémoire de magister. Université M'Hamed Bougara Boumerdès.

**Boudouhi R., Ferreira C., Morel E., Szymanski A. et Tizaoui S., 2005.** Aliments fonctionnels : « réalité et/ou allégation ». Lille : Université Lille 1 Sciences et Technologies. 202 p.

**Bourel G., Henni S., Krantar K., Oraby M., Divies C. et Garrmyn D., 2001.** Métabolisme sucre-citrate chez *Lenconostoc mesenteroides*. Le lait **81** : 75-82.

**Bouzaine T, ELMajdoub T., Thonart P.H., et Damdi M., 2004.** Sélection des bactéries lactiques probiotiques d'origine animale. Microbio. Hyg. Alim. **16**: 28

**Boylston T., Vinderola C.G., Ghoddusi H.B. et Reinheimer J.A., 2004.** Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. Int. Dairy J. 14 :375e387, 396 pp.

**Brashears M.M., Jaroni D. et Trimble J., 2003.** Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. J Food Prot.66:355e63.

**Bridget O. et Lordsday C., 2011.** Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from selected commercial Nigerian bottled yoghurt. Afr J of Food Science Vol 5 (6): 340-348.

**Bron P.A., P. van Baarlen., 2011.** "Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa." Nat Rev Microbiol. **10**(1): 66-78.

**Burgain J., Gaiani C., Jeandel C., Cailliez-grimal C., Revol A.-N., Scher J., 2012.** «Mal digestion du lactose : formes cliniques et solutions thérapeutiques ». Cahier de nutrition et de Diabétique. Septembre. Vol. 47, n°4, p. 201 -209.

### C-D

**Calvez S., Belguesmia Y. Prévost H., Drider D. et Kergourley G., 2009.** Les bactériocines : de la synthèse aux applications. Bacteries lactiques: physiologique,

metabolisme, génomique et applications industrielles édition : Economica. Paris.

**Camille Delarras., 2007.** Microbiologie pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. *1<sup>er</sup> Ed.* TEC et DOC, Lavoisier. Paris. 396-400.

**Camille Delarras., 2014.** Pratique en microbiologie de laboratoire Recherche de bactéries et de levures-moisissures. *1<sup>er</sup> Ed.* TEC et DOC, Lavoisier. Paris. 66-68.

**Cannon J. L., Papafragkou E., Park G. W., Osborne J., Jaykus L.A., et Vinje J., 2006.** Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J. Food Protection.* **69**(11): 2761-2765.

**Castex M., Panes J., 2012.** Producing quality probiotics is an art and science. July/August AQUA Culture Asia Pacific Magazine.35-37p.

**Champagne C.P et Moineau S., 2003.** Production de ferments lactique dans l'industrie laitière : bactériophages. *Ed.* Fondation des Gouverneurs. P 89-116.

**Chanez P., Wenzel SE., Anderson GP., Anto JM., Bel EH. et Boulet LP., 2007.** Severe asthma in adults: what are the important questions? *J Allergy Clin Immunol.* **119**(6): 1337e48.

**Chapman T. M., G. L. Plosker., and D. P. Figgitt., 2006.** VSL#3 probiotic mixture: a review of its use in chronic inflammatory bowel diseases. *Drugs.* **66**:1371-87.

**Chervaux C., Grimaldi A., Bolotin B., Quinquis S. et Legrain-Raspaud., 2011.** Genome sequence of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* CNCM I-2494. *J Bacteriol.* **193**:5560-1.

**Ciszek-Lenda M., Nowak M., Gamian A. et Marcinkiewicz J., 2011.** Immunoregulatory potential of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KL37: effects on the production of inflammatory mediators by mouse macrophages. *Int J Exp Pathol.* **92**:382-91.

**Cizeikiene D., Juodeikiena G., Pakevicius A. et bartkiene Elena., 2013.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food control.* **31** (2): 539-545.

- Coccorullo P.C., Strisciuglio M., Martinelli E. et Greco A., 2010.** *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938) in infants with functional chronic constipation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Pediatr* **157**:598-602.
- Codex alimentarius ., 2003.** Codex standard for fermented milk. CODEX STAN.243: 1-5.
- Collado M.C. et Meriluoto J., 2008.** Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol.* **226**:1065-1073.
- Cook MT., Tzortzis G. et Charalampopoulos D., 2012.** Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J Control Release.* **162**:56-67.
- Coppola R., Succi M., Tremonte P., Reale A., Salzano G. and Sorrentino E. Courtin P et Rul F., 2004.** Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait*, **84** :125-134.
- Coudeyras, S. et Forestier C., 2010.** "[Microbiota and probiotics: effects on human health]." *Can J Microbiol.* **56**(8): 611-50.
- Czerucka, D., T. Piche., 2007.** "Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*." *Aliment Pharmacol Ther* **26**(6): 767-78.
- D'Aimmo MR., Modesto M. et Biavati B., 2007.** Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *Int. J. Food. Microbiol.* **115**: 35-42.
- Das P., Khowala S. et Biswas S., 2016.** In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. *LWT - Food Science and Technology.* **73** :383-390. 41.
- De Vrese, M. et Schrezenmeir J., 2008.** Probiotics, prebiotics, synbiotics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 111, 1e66.
- Deegan LH., Cotter PD., Hill C. et Ross P., 2006.** Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *Int Dairy J*, **16**: 1058-1071.
- Delgado S., O'Sullivan E., Fitzgerald G. et Mayo B., 2007.** Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *J. Food Sci.* **72**: M310–M315.

- Denohue D.C., 2004.** Safety of novel probiotic bacteria. *In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3<sup>e</sup> Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 531-546.
- Desar I.M.E., De boer M., Bens C.C.P.M., 2008.** Rapid and reliable identification of *Streptococcus anginosus* group isolates to the species level by real-time PCR and melting curve analysis. *J. Microbiol. Methods.* **75**: 372-374.
- Dhamale K.S., Sonawane P.D., Jaybhaye A.S. et Akkiraju P.C., 2015.** Lactic Acid Bacteria: Antimicrobial activity and in vitro, in vivo studies of LAB activity on *Fusarium oxysporum* infected tomato seeds. *Int. J. Adv. Res.* **3** (5): 954-963.
- Duskova M. et Karpiskova R., 2013.** Antimicrobial resistance of lac-tobacilli isolated from food. *Czech J Food Sci.* **1**: 27-32.

**E-F**

- El-Ghaish S., Ahmadova A., Hadji-Sfaxi I., Mecherfi K.E. et Bazukyane I., 2011.** Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Tre Food Sci Technol*: 1-8.
- Ennahar S., 2011.** Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1694**: 269-278.
- Ercolini D., Russo F., Ferrocino I. et Villani F., 2009.** Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol.* **26**: 228-23
- Espeche M.C., Pellegrino M., Larriestra A. et Bobnic., Meddings L., Dmytrash A. et Backer J., 2012.** Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **295**: G1025-34.
- Ezendam, J., and H. van Loveren., 2006.** Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. *Nutr Rev.* **64**:1-14.
- FAO/OMS., 2002.** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization

(Organisation Mondiale pour la Santé OMS). *Working Group Report*. London, Ontario, Canada.

**FAO/WHO working group., 2002.** Guidelines for the evaluation of probiotic in food  
*ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf.*

**Fang Z., Hongfei Z., Junyu Z., Dziugan P., Shanshan L et Bolin Z., 2015.** Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional Chinese cheese. *Ann Microbiol* **65**:1419–1426.

**Figueiredo A.R., Campos F., De freitas V., Hogg T. et Couto J.A., 2008.** Effect of uphenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiol.* **25**: 105-112.

**Francois-Marie Luquet et Georges Carrieu., 2005.** Bactéries lactiques et probiotiques, 1<sup>er</sup> Edition TEC et DOC Lavoisier-Paris. P: 22-98-99

**Franz C., Huch M., Abriouel H., Holzzapfel W. et Galvez A., 2011.** Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol.* **151**:125-40.

**Freitas, A. C. 2011.** Metabolic profiling of potential probiotic or synbiotic from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait* **85**, 193–204.

### G-H

**Gallelli L, Busceti MT, Vatrella A, Maselli R. et Pelaia G., 2013.** Update on Anticytokine Treatment for Asthma. *Biomed Res Int.* **13**:104-315.

**Gao Y., Lu Y., Teng K.L., Chen M.L., Zheng H. J., Zhong J., 2011.** Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CV56, a probiotic strain isolated from the vaginas of healthy women. *J Bacteriol.* **193**: 2886-7.

**Gautam N. et Sharma N., 2015.** Evaluation of Probiotic Potential of New Bacterial Strain, *Lactobacillus spicheri* G2 Isolated from *Gundruk*. *N. Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* **85** (4): 979-986.

**Gemechu T., 2015.** Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *Afr. J. Food sci.* **9** (4): 170-175.

**Gevers D., 2002.** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from

fermented dry sausages. *Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.*

**Goel A. et Mittal A., 2009.** "In vivo effects of mesalazine or E.coli Nissle 1917 on microsatellite instability in ulcerative colitis." *Aliment Pharmacol Ther.* **30(6)**: 634-42.

**Granato D., Branco G.F., Nazzaro F., Cruz A. G. et Faria J., 2010.** Functional foods and nondairy probiotic fooddevelopment: trends, concepts and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.***9** : 292–302.

**Guarner F., Khan A.G., Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson Aet Le Mair T., 2008.** Recommendation Pratique: Probiotiques et Prébiotiques. *WGO Practice Guidelines.***3.**

**Gueimonde M., Noriega L., Margolles A., de los Reyes-Gavila´C et Salminen S., 2007.** Ability of Bifidobacterium strains with acquired resistance to bile to adhere to human intestinal mucus. *International Journal of Food Microbiology.* **101** : 341–346.

**Guerra N.P., Bernardez P.F., Mendez J., Cachaldora P. et Castro P.L., 2007.** Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Scie. Tech.* **134** : 89-107.

**Guiraud J.P. et Rosec J.P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR.* 237-251.

**Guiraud J.P. et Rosec J.P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR.* 237-251.

**Guiraud J.P., 2003.** Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie, Paris : Dunod, série Agro-alimentaire, p. 387-433.

**Guiraud J.P., 2003.** Microbiologie Alimentaire. *Tec &Doc, Dunod.* Paris. 90-292.

**Guo X.H., Kim J.M., Nam H.M., Park S.Y et Kim J.M., 2010.** Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties.

**Guo Y., Pan D., Zeng X. et Tanokura M., 2010.** Purification and characterization of CEP from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Food Chem.* **112** : 533-538.

- Guo Z., J Wang L., Yan W., Chen et al., 2009.** In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *Lebenson. Wiss. Technol.* **42**: 1640–1646.
- Guy Leyral et Elisabeth Vierling., 2007.** Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. 4<sup>ème</sup> Ed. Rueil Malmaison. P-290.
- Hoover D., 2003.** Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. FoodSci. Food Saf.* **2**: 82-100.
- Hadef S., 2012.** Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister. Université Kasdi Merbah Ouargla.
- Hamida Bouridane., Mohamed Sifour., Tayeb Idoui et Lejeune Annick., 2016.** Technological and Probiotic Traits of the Lactobacilli Isolated From Vaginal Tract of the Healthy Women for Probiotic Use. *Iran J Biotechnology.***14** (3) : 1432.
- Hamon E., Horvatovich P., Izquierdo E., Bringel F., Marchioni E., Aoude-Werner D et HASSAINE O., 2013.** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries. **45** :120-125.
- Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Djilali B., 2009.** Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn., Congrès international BIOMED 1 Marrakech* du 2-5 Novembre, p. 37-55.
- Hassaine O., 2013.** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien. Thèse de doctorat en biotechnologie : l'université d'Oran-Essenia, p. 57-102.
- Hassan A.N. et Frank J.F., 2001.** Starter Cultures and their use. In: *Appl. Dairy Microbiol* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2<sup>ème</sup> Ed. *Marcel Dekker. Inc.* New York.151-205.
- Hassan A.N., Awad S. et Muthukumarappan K. 2005.** Effects of exopolysaccharide producing cultures on the viscoelastic properties of reduced-fat Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **88**: 4221–4227.

**Hegar B., Waspada I .M. et Gunardi H., 2014.** A double blind randomized trial showing probiotics to be ineffective in acute diarrhea in Indonesian children. *Indian J Pediatr.* [Epub ahead of print].

**Henning C., Gautam D. et Muriana P., 2015.** Identification of Multiple Bacteriocins in *Enterococcus* spp. Using an *Enterococcus*-Specific Bacteriocin Array. *Microorganisms.* 1-16.

**Henning C., Gautam D. et Muriana P., 2015.** Identification of Multiple Bacteriocins in *Enterococcus* spp. Using an *Enterococcus*-Specific Bacteriocin PCR Array. *Microorganisms.* **3**: 1-16.

**Hernandez D, Cardell E, Zarate V. 2005** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantacin TF 711, a bacteriocin-like identification of key proteins in bile tolerance. *BMC. Microbiol.* **11** (63): 191-201.

**Ho T.N.T., Tuan N., Deschamps A. et Caubet R., 2007.** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134-142.

**Hogg T., 2005.** Essential microbiology. John Wiley & Sons, Ltd. 188-190.

**Hugenholtz J., Sybesma W., Groot M.N., Wisselink W., Burgess K., Sinderen D. et Piard J.C., 2002.** Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* 82. P 217-235.

**Huys G., Vancanneyt M., D'haene K., Vankerckhoven V., Goossens H. et Swings J., 2006.** Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res in Microbiol.* **157**: 803-810.

### **I-J**

**Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E., 2009.** Lactic acid bacteria from “Sheep’s Dhan”, a traditional butter from sheep’s milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites.* **60**(2) : 177-183.

**Ingrassia I., Leplingard A. et Darfeuille-Michaud A., 2005.** *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's

disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**(6) : 2880-2887.

**Inoue T., Tomita H. & Ike Y., 2006.** Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**(4), 1202-1212.

**Ishikawa H., Akedo I., Otani T., Nakamura T., Takeyama I., 2005.** Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. *Int J Cancer* .**116**(5) : 762–7.

**Iyer R., Tomar S.K., UmaMaheswari T. et Singh R., 2010.** *Streptococcus*

**Izquierdo E., 2009.** Les protéines bactériennes entant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de Doctorat, *Université de Strasbourg* : 8-141  
*J. Dairy Sci.* **98** :36226-3632.

**Jamaly N., Benjouad A. et Bouksaim M., 2011.** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from known popular traditional Moroccan dairy products. *Br J Microbiol.***1**:79-94.

**Jean-Noel Joffin et Guy Leyral., 2006.** *Microbiologie Technique. 4<sup>eme</sup> Ed.* CRDP, Aquitaine. Paris. 217-227.

### K-L

**Kaewsrichan J., Peeyananjarassri K et Kongprasertkit J., 2006.** Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **48**:75-83.

**Kaktcham PM, Zambou FN, Tchouanguép MF, El-Soda M. et Choudhary IM., 2012.** Antimicrobial and Safety Properties of Lactobacilli isolated from Cameroonian Traditional Fermented Foods. *J of Dairy Foods science* article, **80** (1): 189-203.

**Kang H., Choi H.S., Kim J.E. et Han N.S., 2011.** Exopolysaccharide-overproducing *Lactobacillus paracasei* KB28 induces cytokines in mouse peritoneal macrophages via modulation of NF-kappabeta and MAPKs. *J Microbiol Biotechnol.* **21**:1174-8.

- Kaushik J.K., Kumar A, Duary R.K., Mohanty A.K., Grover S et Batish V.K., 2009.** Functional and Probiotic Attributes of an Indigenous Isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PLoS ONE*.
- Kayodé APP., Deh DC., Baba-Moussa L., Kotchoni SO. et Hounhouigan JD., 2012.** Stabilization and preservation of probiotic properties of the traditional starter of African opaque sorghum beers, in *African Journal of Biotechnology*. **11**: 7725-7730.
- Khaksar V., Golian A. et Kermanshahi H., 2012.** Immune response and ileal microflora in broilers fed wheat-based diet with or without enzyme Endofeed W and supplementation of thyme essential oil or probiotic PrimaLac. *African Journal of Biotechnology*. **11**(81): 14716– 14723.
- Kingsley C. et Anukam G.R., 2007.** "Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation." Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.
- Klein G., 2003.** Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* **88**:123–131.
- Klein M. et Sanders M. E., 2010.** "Probiotics: from bench to market." *Ann N Y Acad Sci* 1212 Suppl. **1**: E1-14.
- Koort J., Coenye T. et Santos E.M., 2006.** Diversity of *Weissella viridescens* strains associated with "Morcilla de Burgos". *Int. J. Food Microbiol.* **109**: 164-168.
- Korterink JJ., Ockeloen L., Benninga MA., Tabbers MM. et Hilbink M., 2014.** Probiotics for childhood functional gastrointestinal disorders: a systematic review and metaanalysis. *Acta Paediatr.* **103**: 365-72.
- Kos B., Suskovic J., Vukovic S., Simpraga M., Frece J et Matosic S., 2003.** Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* **94**: 981–987.
- Kouidhi B., Ben Taheur F., Fdhila K., Elabed H., Ben Slama R et Chaieb K., 2016.** Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microbial Pathogenesis.* **97** : 213-220.

- Kourelis A., Kotzamanidis C., Litopoulou-Tzanetaki E. et Yiangou M., 2010.** Immunostimulatory activity of potential probiotic yeast strains in the dorsal air pouch system and the gut mucosa. *J Appl Microbiol.***109**: 260-71.
- Krieg N.R., 2001.**The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria - Identification of procaryotes. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Garrity G.M., Boone D. R., Castenholz R. W. Williams and Wilkins, Baltimore. 720*: 33 - 38.
- Krogh-Andersen K., Marcotte H., Hammarstrom L et Mikelsaar M., 2010.** Screening and Evaluation of Human Intestinal Lactobacilli for the Development of Novel Gastrointestinal Probiotics. *Curr. Microbiol.* **61**(6): 560-566.
- Kruis W., Chrubasik S., Boehm S., Stange C. et Schulze J., 2012.** A double-blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome. *Int J Colorectal Dis.* **27**:467-74.
- Kuitunen M., 2013.** Probiotics and prebiotics in preventing food allergy and eczema. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.***13**: 280-6.
- Kumar M., Nagpal R., Kumar R., Hemalatha R. et Kumar A., 2012.** Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp Diabetes Res.* **2012**: 902-917.
- Kumar M., Nagpal R., Verma V., Kumar A., Kaur N. et Hemalatha., 2013.** Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutr Rev.***71**:23-34.
- Kumar M., Rakesh S., Nagpal R., Hemalatha R., Ramakrishna A., 2013.** Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and Aloe vera gel improve lipid profiles in hypercholesterolemic rats. *Nutrition.* **29**: 574-579.
- Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S. and Wright A.V., 2012.** *Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects* Fourth edition Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York
- Lamoureux L., 2000.** Exploitation de l'activité -galactosidase de cultures de Bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. National Library of Canada. 23-47.

- Langella P., Nouaille S., Commissaire J., Bolotine A., Gruss A. et Le Loir Y., 2001.** Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Le lait* **81** : 19-28.
- Lange-Starke A., Petereit A., Truyen U., Braun P.G., Fehlhaber K. et Albert T., 2014.** Antiviral Potential of Selected Starter Cultures, Bacteriocins and D, L-Lactic Acid. *Food Environ. Virol.* **6**:42-47.
- Larpent J.P., 1997.** Microbiologie alimentaire. *Tec & doc, Lavoisier*. Paris. 10-72.
- LeBlanc D., 2006.** Enterococcus. *Prokaryotes*. **4**:175-204.
- Lee JY, Kim CJ, et Kunz B., 2006.** Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Sci*, **72**: 437-445.
- Lee K.W., Park J.Y., Jeong H.R., Heo H. J., Han N. S. et Kim J.H., 2012.** Probiotic properties of Weissella strains isolated from human faeces. *Anaerobe*. **18**: 96-102.
- Leghouchi E., Idoui T., Karem NE., 2007.** Selection of *Lactobacillus Plantarum* BJ0021 for rabbit probiotic adjuncts. *Int J Probiotics Prebiotics*. **2** : 188-93
- Leite A. M. O., Miguel M. A. L., Peixoto R. S., Paschoalin V. M. F., Mayo B. et Delgado S., 2015.** Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *J. Dairy Sci.* **98**: 3622-3632.
- Len A.C., L.D., W.S. Harty et N.A. Jacques., 2007.** "Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance." *Microbiology* **150**(5): 1353-1366.
- Leroy F. et De Vuyst L., 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Treat. Food Sci. Technol.* **15**: 67-78.
- Leroy S., Lebert I., Chacornac J.P. et Talon R., 2007.** Identification et caractérisation de la flore d'intérêt technologique : bactéries lactiques et staphylocoques à coagulase négative. *Sci. Tec. V. Prod. Carnés.* **25**(5) : 172.
- Ley RE., Peterson DA. Et Gordon JL., 2006.** Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. **124**(4): 837-848.

- Limsowtin G.Y., Broome M. et Powell I.B., 2004.** Lactic acid bacteria, taxonomy. In Encyclopedia of Dairy Sci. Roginski H. Oxford, Elsevier. 1470-1478.
- Lin T.Y. et Chien M.F.C., 2007.** Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food .Chem.* **100** : 1419-1423.
- Lin W.H., Shen H.J., et Hang T., 2007.** Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe.* **13**: 107-113.
- Liu C.F., Tseng K.C., Chiang S.S., Lee B.H., Hsu W.H., Pan T.M., 2011.** Immunomodulatory and antioxidant potential of Lactobacillus exopolysaccharides. *J Sci Food Agric.* **91**: 2284-91.
- Lo Vecchio A., Cohen MB., 2014.** Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: benefits and barriers. *Curr Opin Gastroenterol.* **30**:47-53.
- Ludwig W., Schleifer K-H. et Whitman W.B., 2008.** Bergey's taxonomic outlines - Revised Road Map to the Phylum Firmicutes. **3**.
- Luquet F.M. et Corrieu G., 2005.** Bactéries lactiques et probiotiques. *Santé et Nutrition.* France. **72**:1729–1738.
- Lye HS, Rusul G., Liong MT., 2010.** Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *J Dairy Sci.* **93**: 1383-1392.

#### M-N

- Makino S., Ikegami S., Kume A., Horiuchi H. et Sasaki H., 2010.** Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Br J Nutr.* **104**: 998-1006.
- Makras L. et De Vuyst L., 2006.** The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int Dairy J.* **16**:1049-1057.
- Manhar AK., Saikia D., Borah A., Das AS., Gupta K. et Roy R., 2016.** Assessment of goat milk- derived potential probiotic *L. lactis* AMD17 and its application for preparation of dahi using honey. *Ann Microbiol* **66**: 1217–1228.
- Maria M, and Janakiraman S., 2012.** Detection of heat stable bacteriocin from

Lactobacillus acidophilus NCIM5426 by liquid chromatography/mass spectrometry. Indian J of sci and Tec, Vol 5 N°3 ISSN: 0974-6846.

**Marianelli C., Cifani N. et Pasquali P., 2010.** Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Res. in Microbiol.* **161**: 673-680.

**Marraffini L.A, Dedent A.C. et Schneewind O., 2006.** Sortases and the art of anchoring meat small-scale facility, 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. **276**: 140-148

**Marteau P. et Shanahan F., 2003.** Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Practice et Research Clinical Gastroenterology.***17** : 725-740.

**Marteau P. et Seksik P. 2004.** Place des probiotiques dans la prevention et le traitement des diarrhees postantibiotiques. *Revue Francaise des Laboratoires.* 73-76.

**Marteau P. et Seksik P., 2005.** « Probiotiques et alicaments ». In : Bactéries lactiques et probiotiques. Paris : Lavoisier. p. 255-289.

**Ma lanka S., KOSA., Ba czyk M., Czopek I. et AdamŁ., 2015.** Study of concentration of lactic acid obtained in the process of lactic fermentation of lactose contained in the spent whey using Lactobacillus. *Chemik.* **69** (4): 241–251.

**McFarland L.V., 2010.** "Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients." *World J Gastroenterol.***16**(18): 2202-22.

**Mechai A., 2009.** Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques. Thèse de doctorat. Université Badji-Mokhtar-Annaba. 99.

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

**Mirnejad R., Vahdati AR., Erfani M. et Piranfar V., 2013.** The antimicrobialeffect of *Lactobacillus casei* culture supernatant against multi-ple drug resistant clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* in vitro. *Iran Red Crescent Med J.***15**:122-6.

- Monteagudo-Mera A, Caro I, Rodríguez-Aparicio LB, Rúa J, Ferrero MA. et García-Armesto MR., 2011.** Characterization of certain bacterial strains for potential use as starter or probiotic cultures in dairy products. *J Food Protect* **74**:1379–1386.
- Mookiah S., Siew C.C., Ramasamy K., Abdullah N. et Ho Y.W., 2014.** Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **94**(2): 341348.
- Moreno M.R.F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E. et De vuyst L., 2006.** The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 1-24
- Morrow L.E., Gogineni V., Malesker M.A., 2012** Probiotics in the intensive care unit. *Nutr. Clin. Pract.* **27** (2) : 235-241.
- Mountzouris K., Tsitrsikos P., Palamidi I., Arvaniti A., Mohnl M. et Fegeros K., 2010.** Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poultry Science*. **89**(1): 58–67.
- Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M., 2010.** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. *Blackwell. Publishing.* 13.
- Nagpal R., Yadav H., Puniya A.K., Singh K., Jain S. et 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.
- Nakamura S., Kuda T., Kanno T., Takahashi H. et Kimura B., 2012.** Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from narezushi, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice. *Anaerobe*. **18**:19-24.
- Nam, H., M. Ha, O. Bae, and Y. Lee., 2002.** Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 46-42.
- Natarajan P. et Parani M., 2014.** First complete genome sequence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain T-110 and its comparative genome analysis with

pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus faecium* genomes. *J. Genet. Genomics*. doi:10.1016/j.jgg.2014.07.002.

**Navarro L., Zarazaga M., Sanez J., Ruiz-Larrea F. et Torres C., 2000.** Bacteriocin of dominants lactic acid bacteria isolated from Algerian raw milk. Journal algérien des oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1313-1318.

**Nematollahi A., Sohrabvandi S., Mortazavian A. M. et Jazaeri S., 2016.** Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. *Electronic J. Biotechnol.* **21**: 49–53.

**Ng S.C., Hart A.L., Kamm M.A., Stagg A.J., et Knight S.C., 2009.** Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis.* **15**:300-10.

**Nicoli J.R., Villela Dias C et al., 2016.** Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. *LWT - Food Science and Technology.* **73** : 259-266.

**Nielsen D.S., Jacobsen T., Jespersen L., Koch A.G. et Arneborg N., 2008.** Occurrence and growth of yeasts in processed meat products - Implications for potential spoilage. *Meat Science*, vol. 80,9 19-926.

**Ninane V., Mukandayambaje R. et Berben G., 2009.** Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement.* Vol. 13, n°3, p. 8.

**Nousiainen J., Javanainen P., Setälä J. et Wright A.V., 2004.** Lactic acid bacteria as animal probiotics. *In* : Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects

**Nuraida L., 2015.** A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Sci. Human Wellness.* **4**: 47–55.

### **O-P**

**O' May GA. et Macfarlane GT., 2005.** Probiotic efficacy :are the claims justified. *Probiotic Dairy products*, pp: 138-166.

**Ogier J.C., Casalta E., Farrokh C. et Saihi A., 2008.** Safety assessment of dairy

- microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**: 286-290.
- Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T. et Yokotsuka K., 2003.** Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. *Int. J. Food Microbiol.* **87**(1-2) : 153-159.
- Otani IM, Anilkumar AA, Newbury RO, Bhagat M, Beppu LY, Dohil R, et al., 2013.** Anti-IL-5 therapy reduces mast cell and IL-9 cell numbers in pediatric patients with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol.***131**(6):1576e82.
- Ouwehand AC., Salminen S. et Isolauri E., 2002.** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.***82**(1):279-289.
- Oyetayo VO., Adetuyi FC. et Akinyosoye FA., 2003.** Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo*. *Afr J Biotech*, **2**: 448-452.
- Patel PJ., Singh SK., Panaich S. et Cardozo L., 2014.** The aging gut and the role of prebiotics, probiotics, and synbiotics: A review. *J Clin Gerontol Geriatr.***5**: 3–6.
- Peres CM., Alves M., Hernandez-Mendoza A., Moreira E. et Silva S., 2014.** Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *LWT-Food Sci Technol.***59**: 234–46.
- Pfeiler E.A et Klaenhammer T.R., 2009.** Role of transporter proteins in bile tolerance of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *Int J Food Microbiol.***105**: 419–31.
- Phavichitr N, Puwdee P., 2013.** Tantibhaedhyangkul R. Cost-benefit analysis of the probiotic treatment of children hospitalized for acute diarrhea in Bangkok. Thailand Southeast Asian J Trop Med Public Health. **44**:1065-71.
- Pilet M.F., Magras C., Federigh M., 2005.** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2<sup>ème</sup> Ed., *Economica*. Paris. 219-240.
- Pitino I, Randazzo CL., Mandalari G., Lo Curto A. et Faulks RM., 2010.** Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiology* **27**: 1121-1127.

- Piquepaille C., 2013.** Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales [Thèse]. Pharmacie .Limoge .183p.
- Pot B., 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 1-106.
- Prajapati J.B., Khedkar C.D., Chitra J., Mishra V., Sreeja V. et Koringa P. G., 2012.** Whole-genome shotgun sequencing of *Lactobacillus rhamnosus* MTCC 5462, a strain with probiotic potential. *J Bacteriol.* **194**:1264-5.

**R-S**

- Rahman M., Mustari A., Salauddin M. et Rahman M., 2013.** Effects of probiotics and enzymes on growth performance and haematobiochemical parameters in broilers. *Journal of the Bangladesh Agricultural University.* **11**(1): 111–118.
- Ramadass Balamurugan., Gowri Chellappam., Krithika Rajaram et Balakrishnan S., 2014.** Probiotic potential of lactic acid bacteria present in home made curd in southern India. *India J. Med Res.* PP 345-355.
- Ramakrishnan V., Goveas L.C., Prakash M., Halami P. M. et Narayan B., 2014.** Optimization of conditions for probiotic curd formulation by *Enterococcus faecium* MTCC 5695 with probiotic properties using response surface methodology. *J. Food Sci. Technol.* **51**(11): 3050-3060.
- Ramos., C.L., L Thorsen., R.F. Schwan et L Jespersen., 2013.** Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol.* **36**: 22–29.
- Ramya Iyer., Tomar K., Suman Kapila et Jiju Mani., 2010.** Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Research International.* **43**: 103-110.
- Reis J.A., Paula A.T., Casarotti S.N. And Penna A.L.B., 2012.** Lactic Acid *reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology.* **148**: 433-442.
- Report of a joint FAO/WHO., 2001.** expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba (Argentina) : FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization).

- Rodas A.M., Ferrer S. et Pardo I., 2005.** Polyphasic study of wine *Lactobacillus*. strains, taxonomic implications. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 197 - 207.
- Roos S. et Jonsson H., 2002.** A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology.* **148**: 433-442.
- Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam NE., 2009.** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European. J Sci Res*, **34** (2) : 218-227.
- Ruggiero P., 2014.** Use of probiotics in the fight against *Helicobacter pylori*. *World J Gastrointest Pathophysiol.* **5**:384–91.
- Ruiz-Moyano S., Martin A., Benito M.J., Nevado F.P. et Cordoba M.G., 2008.** Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Sci.* In Press, Corrected Proof.
- Sachindra N.M., Sakhare P.Z., Yashoda K.P. et Narasimha RAO D., 2005.** Microbial profile of buffalo sausage during processing and storage. *Food Control*, vol. **16** : 31-35.
- Sánchez A. et al., 2010.** Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol.* **27** : 955-961
- Sánchez B., M Fernández-García, A Margolles., C.G. de los Reyes- Gavilán et P. Ruas-Madiedo., 2010.** Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* strain. *Int. Dairy J.* **20**: 800–805.
- Sarkar S., 2008.** Effect of probiotics on biotechnological characteristics of yoghurt: a review. *British Food Journal.* **110** : 717e740.
- Schultz M. et Strauch U.G., 2004.** "Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis." *Clin Diagn Lab Immunol* **11**(2): 372-8.
- Schultz M., 2008.** Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* **14**:1012-8.

- Schwartz A, Gruhl B, Lobnitz M, et al., 2003.** Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res.* **54**:393-9.
- Servin A.L., 2004.** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* **28**:405-40.
- Settachaimongkon S., Robert Nout M.J., Hooijdonk T.M. et Zwietering M. 2014.** The impact of selected strains of probiotic bacteria on metabolite formation in set yoghurt. *Int. Dairy J.***38**: 1-10.
- Shanahan F. A., 2012.** commentary on the safety of probiotics. *Gastroenterol Clin North Am.***41**: 869-76.
- Shehata M.G., El Sohaimy S.A., Malak A. et Youssef M.M., 2016.** Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Science.* **61**(1) : 65-75.
- Shweta Handa et Nivedita Sharma., 2016.** In vitro of *Lactobacillus plantarum* F22 isolates from chhang-A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. *Genetic Engineering and biotechnology.***14** : 91-97.
- Sieladie V.D., Zambou F.N., Kaktcham P.M., Cresci A. et Fonteh F., 2011.** Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the Western Highlands of Cameroon. *Innovative Romanian Food Biotech* Vol 9.
- Sieladie V.D., Zambou F.N., Kaktcham P.M., Cresci A. et Fonteh F., 2011.** Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the Western Highlands of Cameroon. *Innovative Romanian Food Biotech* Vol 9.
- Siezen R., Starrenburg M.J., Boekhorst J., Renckens B. et Molenaar D., 2008.** Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from plants identifies mechanisms of adaptation to the plant niche. *Appl Environ Microbiol.* **74**: 424-36.
- Socol C., Vandenberghe L., Spier M., Medeiros A., Lindner J., Pandey A. et Thomaz-Socol V., 2010.** The potential of probiotics: A Review. *Food Technology and Biotechnology.* **48**: 413-434.

- Sommer F, Backhed F., 2013.** The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol.***11**: 22- 38.
- Stamatova I. et Meurman JH., 2009.** Probiotics: health benefits in the mouth. *Am J Dent.* **22**:329-38.
- Streit F., 2008.** Influence des conditions de récolte et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolérance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CF11. Thèse de Doctorat. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- Streit F., Corrieu G. and Béal C., 2008.** Acidification improves cryo tolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CF11. *J. Biotechnol.* **128** : 659-667.
- Succi M., Tremonte P., Reale A., Sorrentino E., Grazia L., Pacifico S. et Coppola R., 2005.** Bile sodium chloride and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiol Lett.* **244**:129-37
- Sveje M., 2007.** Probiotic and prebiotics improving consumer health through food consumption. *Nutracos, sept/oct*: 28-31.
- Szajewska H., Guarino A., Hojsak I., Indrio F., Kolacek S. et Shamir R., 2014.** Use of probiotics for management of acute gastroenteritis: a position paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.***58**: 531-9.

#### T-U

- Tabak Souhila et Bensoltane Ahmed., 2011.** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature & Technology.*
- Tadesse G., Ephraim E. et Ashenafi M., 2004.** Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shamita, traditional Ethiopian fermented beverages, on some foodborne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity. *Int. J. Food Safety.* **5** : 13-20.
- Tambekar D.H., Bhutada S.A., Choudhary S.D., Khond M.D., 2009.** Assessment of potential probiotic bacteria isolated from milk of domestic animals. *J. Appl. Biosci.* **15**, 815–819

- Tamime A.Y., 2002.** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3<sup>ème</sup> Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.
- TanasupawatS., Phoottosavak M. et Keeratipibul S., 2015.** Characterization and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat. *J. Appl. Pharmaceutical Sci.* **5** (03): 006-012.
- Tareb R., Bernardeau M., Gueguen M et Vernoux J.P., 2013.** In vitro characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic Lactobacillus strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially. **5** : 82-90.
- Tayeb Idoui et Mohamed Sifour., 2016.** Novel Isolates of Lactobacilli from Crop of Algerian Poultry as Potential Probiotic for Food Industry. *Biotechnology for wellness in dustries.* **5** : 82-90.
- Tayeb Idoui., Houria Ouled-Haddar., Mohamed Sifour., Hamida Bouridane et Somia Arid., 2016.** *Lactobacillus plantarum* G1 Microencapsulation enhanced its Viability during Storage and Gastrointestinal Transit. *Sains Malaysiana.***45**(7):1049-
- Teuber M. et Geis A., 2006.** The genus *lactococcus*. In: Dworkin et al. (Eds.), *Prokaryotes*, Springer, New York, NY. **4**: 205-228.
- Todorov S. D., Botes M., Danova S. T. et Dicks L. M., 2007.** Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. *J Appl Microbiol.* **103**: 629-39.
- Toscano M., De Vecchi E., Gabrieli A., Zuccotti G. et Drago L., 2015.** Probiotic characteristics and in vitro compatibility of a combination of *Bifidobacterium breve* M-16 V, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* M-63 and *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536. *Ann Microbiol* **65**: 1079-1086.
- Tosukhowong A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D. et Sonomoto K., 2005.** Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *J. Biosci Bioengin.* **99**: 30-37.

**Tulini FL, Winkelströter LK, De Martinis ECP., 2013.** Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese. *Anaerobe* **22**: 57–63

**Tulumoglu S, Yuksekdog ZN, Beyatli Y, Simsek O, Cinar B, Yasar E., 2013** Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe* **24**: 36–42

**Turhan I., Öner Z., 2014.** Determination of starter culture properties of lactic acid bacteria isolated from cheese. *Gida*. **39** (1): 9-15.

**UNICEF/OMS., 2009.** United Nations Children's Fund / Organisation mondiale de la santé. Diarrhoea : why children are still dying and what can be done. *Lancet*. **14** : 1-2

## V

**Valan Arasu M., Al-Dhabi N. A., Ilavenil S., Choi K. C. et Srigopalram S., 2016.** In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. *Saudi J. Biol. Sci.* **23**: 6-10.

**Van Reenen CA. et Dicks LM., 2011.** Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities. A review. *Arch Microbiol.***193**: 157-68.

**Vandenplas Y., 2012.** Author's reply: Identification of probiotics by specific strain name. *Aliment Pharmacol Ther.***35**: 860.

**Vandenplas Y., 2014.** *Lactobacillus reuteri* is an effective option for the prevention of diarrhoea in preschool children but may not be cost-effective in all settings. *Evid Based Med.*

**Vandenplas Y., Huys G. et Daube G., 2015.** Probiotics: an update. *J. Pediatr (Rio J.)*. **91**(1): 6-21.

**Vijaya Kumar., Vijayendra b. et Reddy O., 2015.** Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology*, **52**(10): 6112-6124.

**Vinderola G., B Capellini., F Villarreal., V Suárez., Quiberoni et J Reinheimer., 2008.** Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *Lebenson. Wiss. Technol.* **41**:1678–1688.

**Vizoso Pinto M.G., Franz C.M.P. et Holzapfel W.H., 2006.** *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol* **109** : 205-214.

**Vollenweider S., 2004.** Hydroxypropionaldehyde applications and perspectives of biotechnological production *Appl Microbiol. Biotech*, **64**: 16-27.

**Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezem M. et de Vos W.M., 2006.** *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int. Dairy J.* **16** : 1018–1028.

W-X

**Wang C.Y., Lin P.R., Ng C.C. et Shyu Y.T., 2010.** Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*. **16** : 578-585.

**Wang J., Ji H., Zhang D., Liu H., Wang S., Shan D. et Wang Y., 2011.** Assessment of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* ZLP001 isolated from gastrointestinal tract of weaning pigs. *African J. Biotechnol.* **10** (54):11303-11308.

**Wang J., Zhang H., Chen X., Chen Y. et Menghebilige Bao Q., 2012.** Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. *J Dairy Sci.* **95**: 1645-1654.

**Wee Y.J., Kim J. N. et Ryu H.W., 2006.** Biotechnological production of lactic acid and Its Recent Application. *Food tech.* **44** (2) : 163-172.

**Whitehead K., Versalovic J., Roos S. et Britton R.A., 2008.** Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC55730. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1812-1819.

**Wong C., Ustunol Z., 2006.** Mode of inactivation of probiotic bacteria affects interleukin 6 and interleukin 8 production in human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. *Journal of biotech.* **30** :1233-1245

**Woraharn, S., Chaiyasut, C., Sirithunyalug B. et Sirithunyalug, J., 2010.** Survival enhancement of probiotic *Lactobacillus plantarum* CMU-FP002 by granulation and encapsulation techniques. *African Journal of Microbiology Research.* **4**: 2086-2093.

- Wu C.T., Chen P.J., Lee Y.T., Ko J.L. et Lue K.H., 2016.** Effects of immunomodulatory supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* on airway inflammation in a mouse asthma model. *J. Microbiol., Imm. Inf.* **49**: 625-635.
- Wu X. et Vallance B. A., 2008.** "Saccharomyces boulardii ameliorates Citrobacter rodentium-induced colitis through actions on bacterial virulence factors." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **294**(1): G295-306.
- Xanthopoulos V., Litopoulou-Tzanetaki E. et Tzanetakis N., 2000.** Characterisation of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiol.* **17**: 205-215.
- Xiao-Hua Guo., Jong-Man Kim., Hyang-Mi Nam. et Jae-Myung Kim., 2010.** Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe.* **16** : 321-326.

**Y-Z**

- Yang Z., 2000.** Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic dissertation, Department of Food Sciences and Technology, Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki.
- Zago M., M.E. Fornasari., D Carminati., P Burns., V Suárez., G Vinderola., J Reinheimer et G Giraffa., 2011.** Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* **28**: 1033–1040
- Zalan Z, Barath A, Halasz A., 2005.** Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotech.* **43**(3) : 219-225.
- Zhennai Y., 2000.** Antimicrobial compounds and Extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic Dissertation. Department of Food Technology. University of Helsinki, pp: 61.

---

# *Annexes*

---

**ANNEXE 01**Milieux de culture et tampon

<b>Bouillon MRS</b>	
<b>Bouillon de Man Rogosa et Sharpe</b>	
Peptone	10.0 g
Extrait de viande	10.0 g
Extrait de levure	5.0 g
Glucose	20.0 g
Tween 80	1.0 ml
Phosphate dipotassique	2.0 g
Acétate de sodium	5.0 g
Citrate triammonique	2.0 g
Sulfate de magnésium	200.0
Sulfate de manganèse	50.0 mg
Gélose	15.0 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH 6,5	
Stérilisation : 120°C pendant 15 minutes	
<b>(Guiraud, 2003).</b>	
<b>Bouillon M17</b>	
<b>Bouillon de Terzaghi</b>	
Peptone de soja	5.0 g
Peptone de viande	2.5 g
Peptone de caséine	2.5 g
Extrait de viande	5.0 g
Extrait de levure	2.5 g
Lactose	5.0 g
Acide ascorbique	0.50 g
Glycérophosphate de sodium	19.0 g
Sulfate de magnésium	0.25 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH 7,2	
Stérilisation : 120°C pendant 15 minutes	
<b>(Guiraud, 2003).</b>	

**Gélose MH****Gélose Mueller-Hinton**

Extrait de viande	2.0 g
Hydrolysate acide de caséine	17.5 g
Amidon	1.5 g
Gélose	10.0 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH 7,4	
Stérilisation : 115°C pendant 15 minutes	
<b>(Guiraud, 2003).</b>	

**BN****Bouillon nutritive**

Extrait de viande	1.0 g
Extrait de levure	2.0 g
Peptone	5.0 g
Chlorure de sodium	5.0 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH=7,4	
Stérilisation : 115°C pendant 15 minutes	
<b>(Jean-Noel et Guy, 2006)</b>	

**Gélose Columbia au sang**

Peptones	23.0 g
Amidon	1.0 g
Chlorure de sodium	5.0 g
Agar	10.0 g
Sang	50 cm <sup>3</sup>
Eau distillée qsp	1000 ml
pH=7,3	
Stérilisation : 115°C pendant 15 minutes	
<b>(Jean-Noel et Guy, 2006).</b>	

---

---

**Lait écrémé à 10%**

Poudre de lait (0% MG) 100.0 g

Eau distillée qsp 1000 ml

Tyndallisation : 90°C pendant 20 minutes  
(Camille, 2014).

---

**PBS**

**phosphate buffered saline**

phosphate disodique 1.44g

phosphate de monopotassium 0.24g

Eau distillée qsp 1000ml

pH : 7.2 ; 3 ; 2

Stérilisation : 120°C pendant 20 minutes

---

(Ana *et al.*, 2016).

---

**ANNEXE 02**Réactifs et autres produits**Réactifs de la coloration de Gram (Guiraud, 2003)**

<b>Solution de cristal violet</b>	
Cristal violet	2 g
Ethanol	20 ml
Oxalate d'ammonium	0,8 g
Eau distillée	80 ml

<b>Solution d'iode ou de Lugol (ou liquide de Gram)</b>	
Iode	1 g
Iodure de potassium	2 g
Eau distillée	100 ml

<b>Solution de Fuchsine</b>	
Fuchsine basique	10 g
Ethanol	100 ml
phénol	50 g
Eau distillée	1 L

<b>Phénolphtaléine</b>	
Phénolphtaléine	10g
Alcool 70°	1000ml

(Camille, 2007)

**ANNEXE 03**

Protocoles

**Coloration différentielle de Gram**

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame propre.
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau physiologique, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.
- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- Couvrir de Lugol pendant 30 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Rincer immédiatement le frottis avec l'alcool absolu en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Couvrir avec de la Fuschine pendant 15 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope.
- Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres (Camille, 2014).

Les bactéries majoritairement utilisées comme potentiels probiotiques appartiennent au groupe des bactéries lactiques. Afin de remplir cette fonction, ces bactéries doivent répondre à un certain nombre de critères de sélection : technologiques, sécuritaires et fonctionnelles. Dans ce travail, dix souches de bactéries lactiques d'origine locale (six souches de *Lactobacillus* sp. et quatre souches d'*Enterococcus* sp.) ont été purifiées et examinées pour leurs aptitudes probiotiques afin d'évaluer leurs intérêts sanitaire et nutritionnelle. D'après les résultats, les souches ont montré une résistance remarquable vis-à-vis des conditions hostiles : l'acidité, les sels biliaires, 0.4% de phénol. Elles ont montré une bonne production d'acide, une bonne hydrophobicité et une capacité de s'adhérer au tissu épithélial. Les tests d'auto-agrégation, de coaggrégation, d'activité -galactosidase, d'activité antibactérienne et de coexistence ont été aussi révélés intéressants. Une résistance modérée aux antibiotiques et une absence du caractère hémolytique ont été enregistrées. Ces résultats renforcent leur choix en tant que probiotiques « sûrs » pour une éventuelle utilisation dans plusieurs domaines de la vie.

**Mots clés :** Bactéries lactiques, probiotique, locale, résistance, conditions hostiles.

---

**Abstract**

The most bacteria used as probiotic potentials belong to the group of lactic acid bacteria. To fulfill this function, these bacteria must meet a number of selection criteria: technological, safe and functional. In this work ten strains of lactic acid bacteria of local origin (six strains of *Lactobacillus* sp. And four strains of *Enterococcus* sp.) Were purified and examined for their probiotic abilities in order to assess their health and nutritional value. According to the results, the strains showed remarkable resistance to hostile conditions: acidity, bile salts, 0.4% phenol. They showed good acid production, good hydrophobicity and ability to adhere to epithelial tissue. The tests of self-aggregation, coaggregation, -galactosidase activity, antibacterial activity and coexistence were also found to be advantageous. Moderate resistance to antibiotics and absence of hemolytic trait were recorded. These results reinforce their choice as "safe" probiotics for a possible use in several life areas.

**Keywords:** lactic bacteria, probiotic, local, resistance, hostile conditions.

---

**المخلص**

البكتيريا التي تستخدم أساساً في الإمكانية البروبيوتكية تنتمي إلى مجموعة البكتيريا اللبنية. لتحقيق هذه المهمة، يجب على هذه البكتيريا الاستجابة إلى عدد معين من معايير الانتقاء: التكنولوجية، الأمانة و الوظيفية. في هذا العمل، عشر سلالات من البكتيريا اللبنية ذات المنشأ المحلي (ست سلالات من جنس *Lactobacillus* sp. وأربعة سلالات من جنس *Enterococcus* sp.)، تم تنقيتها واختبار قدراتها البروبيوتكية و هذا لتقييم أهميتها الصحية و الغذائية. من خلال النتائج، أظهرت السلالات مقاومة ملحوظة إزاء الظروف العدائية: الحموضة، الأملاح الصفراوية، 0.4 % من الفينول. إنتاج جيد للحمض، hydrophobicité معتبرة ضف إلى ذلك القدرة على الالتصاق بالأنسجة الطلائية. إختبارات التجميع الذاتي، coaggregation، النشاط  $\beta$  غالاكتوزيداز، النشاط ضد المكروبات والتعايش مثيرة للاهتمام أيضاً، كما سجلت مقاومة معتدلة للمضادات الحيوية وغياب الطابع الانحلالي للكريات الحمراء. هذه النتائج تعزز اختيارها كبروبيوتيك "آمنة" وإمكانية استخدامها في العديد من مجالات الحياة. **الكلمات المفتاحية:** البروبيوتيك، اللبنية، المحلية، مقاومة وظروف معادية.

