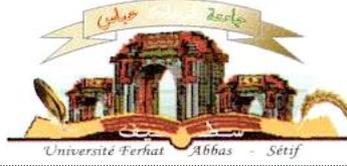


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N° ...../SNV/2017

THÈSE

Présentée par

**BELHAMRA Zineb**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT 3<sup>ÈME</sup> CYCLE**

**Filière: Biologie**

**Spécialité: MICROBIOLOGIE**

THÈME

**Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants  
et des additifs alimentaires**

Soutenue publiquement le **09/11/2017**

DEVANT LE JURY

Président	<b>ZERROUG Mohamed Mihoub</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Directeur	<b>HARZALLAH Daoud</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Examineurs	<b>BENOUADAH Ali</b>	<b>Pr. U. Bordj Bou-Arreidj</b>
	<b>BENDJEMANA Katia</b>	<b>Pr. U. Khenchela</b>
	<b>GHADBANE Mouloud</b>	<b>MCA. U. M'sila</b>

*Laboratoire de Microbiologie Appliquée*

## *Remerciements*

*Je tiens à exprimer mes plus chers et vifs remerciements à:*

*Mr. Harzallah Daoud. Pour m'avoir encadrée, en me faisant bénéficier de ses connaissances, de son aide et de ses conseils.*

*Mr. Zerroug Mouhamed mihoub de me faire l'honneur de présider le jury.*

*Mr. Benouadah Ali, Mme. Bendjemana Zatia et Mr. Ghadbane Mouloud.*  
*D'avoir accepté, malgré leurs préoccupations et leurs tâches d'enseignement et d'encadrement, de lire et de juger ce travail.*

*J'aimerais également exprimer mes vifs remerciements à tous les membres du laboratoire de microbiologie appliquée.*

*Un énorme merci à mes parents, mon mari, mes sœurs, ma belle-famille, toute ma famille.*

*Et Toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail.*

## نمو و معيشة بكتيريا البروبيوتيك في وجود المحليات و المضافات الغذائية

### ملخص

تم عزل في هذه الدراسة ، سبعة وثلاثون سلالة بكتيريا حمض اللبن من عينات طلع النحل جمعت من اربع مناطق في الجزائر. مكنت اختبارات الخصائص الفيزيولوجية و البيو كيميائية من تحديد الانواع التالية : *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus farciminis* و *Lactobacillus paraplantarum*

تم تقييم الخصائص التكنولوجية لسلاسلات حمض اللبن حيث اثبتت *Lactobacillus plantarum* LB9 قدرة تحميض عالية ، تمكنت جميع سلالات البكتيريا من تحليل البروتين، بينما اثبتت خمس سلالات *Pediococcus pentosaceus* LB32, *Enterococcus faecalis* LB16, *Enterococcus faecalis* LB40, *Enterococcus faecalis* LB21 و *Lactobacillus casei* LB38 القدرة على تحليل الدهون في حين لم تظهر أي سلالة القدرة على تحليل النشاء. اظهرت عزلات حمض اللبن نشاط مضاد للفطريات بنسبة 35.13% ضد *Aspergillus* و *Aspergillus flavus*. اظهرت جميع العزلات من جنس *Lactobacillus* نشاطية تثبيطية للبكتيريا الممرضة و بكتيريا فساد الأغذية سجلت اكبر هالة تثبيط (48 سم) ضد *Salmonella typhimurium*. تم انتقاء عشر سلالات من نوع *Lactobacillus plantarum* لتقييم خصائص التعزيز الحيوي. حافظت جميع السلالات على حيويتها بعد تعريضها لمدة 3 ساعات في وسط ذي حموضة عالية pH 3 و وسط يحتوي على 0.3% املاح صفراوية. في حين، التعرض ل pH 2 افقد حيوية خمسة سلالات. اظهرت جميع السلالات مقاومة للسيبروفلوكساسين، التوبراميسين، حمض الناليديكسيك والكوليستين بينما 50% من السلالات اظهرت حساسية للكلورامفينيكول، النيتروكزولين، البنسلين G، السيفوكسيتين، البريستيناميسين، السيفيكسيم و 80% للستربتومايسين. تم اختيار خمس سلالات بروبيوتيك تابعة للنوع *Lactobacillus plantarum* ، LB27، LB12، LB8، LB15، LB11 لتقييم تأثير المضافات الغذائية المستخدمة في الصناعة الغذائية على النمو و الحيوية. النتائج التي تم الحصول عليها أظهرت أن المحليات (الأسبارتام، اسيسولفام)، المضافات الغذائية ( السكروز، كلوريد الصوديوم)، المنكهات (الفراولة، والخوخ والفانيليا) غير مؤثرة على النمو و التكاث، التكتل الذاتي *l'autoagrégation* ، تحليل البروتين و التخميض لسلاسلات *Lactobacillus plantarum* المستخدمة في هذه الدراسة. في حين تاثرت الخاصية اللامائية *l'hydrophobicité* والنشاط المضاد للبكتيريا بشكل ملحوظ.

**كلمات المفتاح :** *Lactobacillus plantarum* , طلع النحل , بروبيوتيك , مضافات غذائية , بكتيريا حمض اللبن , نشاطية عدائية .

## Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires

### RESUME

Dans cette étude, trente-sept souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir des échantillons de pollen frais collectés dans quatre régions en Algérie. Les tests d'identification physiologiques et biochimiques ont permis de caractériser les espèces; *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *L. paraplantarum*, *L.farciminis*. Les propriétés technologiques des souches lactiques ont été évaluées, une seule souche *Lactobacillus plantarum* LB9 a présenté un pouvoir acidifiant fort. Toutes les souches ont été protéolytiques, aucune n'était amylolytique et seulement cinq souches *Pediococcus pentosaceus* LB32, *Enterococcus faecalis* LB16, *Enterococcus faecalis* LB40, *Enterococcus faecalis* LB21 et *Lactobacillus casei* LB38 ont été lipolytiques. L'activité antifongique des isolats envers *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* a montré que 35,13% ont été actifs contre les deux champignons. Les espèces du genre *Lactobacillus* ont été testées pour leur antagonisme vis-à-vis des bactéries pathogènes et d'altération, la totalité ont été efficaces, un diamètre maximale (48mm) a été observé contre *Salmonella typhimurium*. Afin d'évaluer le potentiel probiotique *in vitro*, dix souches appartenant à l'espèce *Lactobacillus plantarum* ont été sélectionnées, elles ont été toutes capables de maintenir leur viabilité après exposition 3h à pH 3 et 4h en présence de 0,3% de sels biliaires, tandis que, à pH 2 et après 3h, seulement cinq pourraient survivre avec des pertes de viabilité. La plupart des souches ont montré une hydrophobicité et une capacité d'autoaggrégation élevées. Une résistance à la ciprofloxacine, tobramycine, l'acide nalidixique et à la colistine a été enregistrée chez toutes les souches, 50% étaient sensibles au chloramphénicol, nitroxoline, pénicilline G, céfoxitine, pristinomycine, et au céfexim, et 80% à la streptomycine. Aucun signe d'hémolyse n'a été observé. Les souches probiotiques *Lactobacillus plantarum* LB15, *L. plantarum* LB27, *L. plantarum* LB8, *L. plantarum* LB12 et *L. plantarum* LB11 ont été choisies pour évaluer l'effet des additifs utilisés en industrie alimentaire sur leur croissance et survie. En effet, les résultats obtenus ont montrés que les édulcorants (Aspartame, Acésulfame), les additifs (saccharose et NaCl), les arômes (fraise, pêche et vanille) n'ont aucune influence sur la croissance et la viabilité, l'autoaggrégation, la protéolyse et l'acidification des souches probiotiques. Tandis que, l'hydrophobicité et l'activité antibactérienne ont été significativement influencés.

**Mots clés :** *Lactobacillus plantarum*, probiotique, pollen, additifs alimentaire, bactérie lactique, activité antibactérienne.

## Growth and survival of probiotics in the presence of sweeteners and food additives

### Abstract

In this study, thirty-seven strains of lactic acid bacteria were isolated from samples of fresh pollen collected from four regions in Algeria. The physiological and biochemical identification tests were used to characterize the following species; *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus farciminis*. The technological properties of the LAB strains were evaluated, one strain *Lactobacillus plantarum* LB9 showed a strong acidifying power. Whereas, all strains were proteolytic, none were amyolytic and only five strains *Pediococcus pentosaceus* LB32, *Enterococcus faecalis* LB16, *Enterococcus faecalis* LB40, *Enterococcus faecalis* LB21 and *Lactobacillus casei* LB38 were lipolytic. The antifungal activity of LAB isolates against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* showed that 35.13% were active against both fungi. Species of the genus *Lactobacillus* were tested for their antagonism effect against pathogenic and spoilage bacteria, the results obtained showed that all of them were effective. A higher diameter of inhibition (48 mm) was observed against *Salmonella typhimurium*. Ten strains belonging to the species *Lactobacillus plantarum* were selected to evaluate their probiotic potential *in vitro*; all strains were able to maintain their viability after 3h exposure to pH 3 and 4h in the presence 0.3% of bile salts. While, only five could survive with losses in cell viability after 3h exposure to pH 2. Most strains showed a high hydrophobicity and autoaggregation ability. All strains were resistant to ciprofloxacin, tobramycin, nalidixic acid and colistin, while 50% were susceptible to chloramphenicol, Nitroxolin, penicillin G, Cefoxitin, pristinomycin, cefexim and 80% susceptible to streptomycin. No haemolysis was observed on blood agar. Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* LB15, *Lactobacillus plantarum* LB27, *Lactobacillus plantarum* LB8, *Lactobacillus plantarum* LB12 and *Lactobacillus plantarum* LB11 were selected to evaluate the effect of food additives used in the food industry on their growth and survival. Indeed, the results obtained have shown that sweeteners (aspartame, acesulfame), additives (Sucrose, NaCl), flavorings (Strawberry, peach and vanilla) have no influence on growth and viability, autoaggregation, proteolysis and acidification of probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. While, hydrophobicity and antibacterial activity were significantly influenced.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*, probiotic, bee pollen, food additives, lactic acid bacteria, antibacterial activity.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ATCC</b>	American type culture collection
<b>BHI</b>	brain heart infusion
<b>BSH</b>	bile salts hydrolase
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>G+C</b>	Guanine + Cytosine (coefficient de Chargaff)
<b>GRAS</b>	generally recognized as safe
<b>MII</b>	maladies inflammatoires de l'intestin
<b>MRS</b>	Man Rogosa Sharp
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>p /v</b>	poids /volume
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCA</b>	plate count agar
<b>PDA</b>	potato dextrose agar
<b>TSA</b>	triptic soy agar
<b>ufc</b>	Unité Formant Colonie
<b>v/v</b>	volume /volume
<b>sp.</b>	Espèce non précisée
<b>spp.</b>	Plusieurs espèces non précisées
<b>Ped.</b>	Pediococcus
<b>GIT</b>	Gastro-intestinal tract
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°	Titre	page
<b>Tableau 1</b>	Les souches probiotiques.	<b>11</b>
<b>Tableau 2</b>	Colorants synthétiques autorisé à utiliser dans le monde entier	<b>30</b>
<b>Tableau 3</b>	Liste des antibiotiques utilisés.	<b>44</b>
<b>Tableau 4</b>	Liste des additifs alimentaires.	<b>45</b>
<b>Tableau 5</b>	Caractéristiques morphologiques, biochimiques, physiologiques et profil fermentaire des sucres d' <i>Enterococcus faecalis</i> .	<b>50</b>
<b>Tableau 6</b>	Caractéristiques morphologiques, biochimiques, physiologiques et profil fermentaire des sucres de <i>Pediococcus pentosaceus</i> .	<b>52</b>
<b>Tableau 7</b>	Caractéristiques, biochimiques et physiologiques des isolats appartenant au genre <i>Lactobacillus</i> .	<b>54</b>
<b>Tableau 8</b>	Profil fermentaire de dix souches de <i>Lactobacillus</i> (API 50CHL).	<b>57</b>
<b>Tableau 9</b>	Activités protéolytique, lipolytique et amylolytique des souches lactiques.	<b>64</b>
<b>Tableau 10</b>	Activité antifongique des souches lactiques.	<b>68</b>
<b>Tableau 11</b>	Activité antibactérienne des <i>Lactobacillus</i> contre les bactéries pathogènes.	<b>71</b>
<b>Tableau 12</b>	Viabilité (log ufc / ml) et taux de survie des souches de <i>Lactobacillus plantarum</i> en pH faible en présence de 0,3% bile.	<b>77</b>
<b>Tableau 13</b>	sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>Lactobacillus plantarum</i> .	<b>82</b>
<b>Tableau 14</b>	Survie des souches de <i>L. plantarum</i> dans un milieu liquide (bouillon MRS, 30°C) en présence des additifs utilisés dans l'industrie laitière, après 24h d'incubation.	<b>88</b>
<b>Tableau 15.</b>	Hydrophobicité des souches de <i>L. plantarum</i> en présence des additifs utilisés dans l'industrie alimentaire	<b>92</b>
<b>Tableau 16.</b>	Activité antibactérienne des souches de <i>L. plantarum</i> en présence des additifs contre <i>E. coli</i> et <i>Salmonella typhimurium</i>	<b>95</b>
<b>Tableau 17.</b>	Activité protéolytique des souches de <i>L. plantarum</i> en présence des additifs alimentaires	<b>98</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure N°	Titre	page
<b>Figure 1</b>	Mécanisme d'inhibition d'adhésion des pathogènes (a) par compétition spécifique (b) compétition non spécifique.	<b>16</b>
<b>Figure 2</b>	Les principaux mécanismes d'action des probiotiques.	<b>18</b>
<b>Figure 3</b>	Mise en évidence de l'activité antifongique.	<b>39</b>
<b>Figure 4</b>	Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des spots sur agar.	<b>41</b>
<b>Figure 5</b>	Variation du pH en fonction du temps des souches lactiques.	<b>59</b>
<b>Figure 6</b>	Cinétique d'acidification des souches lactiques.	<b>60</b>
<b>Figure 7</b>	Activité protéolytique sur MRS lait écrémé (a), PCA lait écrémé (b).	<b>65</b>
<b>Figure 8</b>	Activité lipolytique sur gélose au tween 80 (a), gélose au tween 20 (b).	<b>65</b>
<b>Figure 9</b>	Activité antifongique contre <i>Aspergillus niger</i> .	<b>69</b>
<b>Figure 10</b>	Activité antifongique contre <i>Aspergillus flavus</i> .	<b>69</b>
<b>Figure 11</b>	Activité antibactérienne des souches de <i>Lactobacillus</i> contre les bactéries pathogènes. (Gram +) et (Gram -).	<b>72</b>
<b>Figure 12</b>	Activité inhibitrice des <i>Lactobacillus</i> contre les bactéries pathogènes.	<b>72</b>
<b>Figure 13</b>	Activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes ; (a) <i>Bacillus cereus</i> , (b) <i>E coli</i> , (c) <i>Staphylococcus aureus</i> , (d) <i>Salmonella typhimurium</i> .	<b>75</b>
<b>Figure 14</b>	Hydrophobicité des souches <i>Lactobacillus plantarum</i> .	<b>79</b>
<b>Figure 15</b>	Autoaggregation des souches de <i>Lactobacillus plantarum</i> .	<b>81</b>
<b>Figure 16</b>	Croissance des souches LB 15, LB27, LB8, LB11, LB12 en présence des différentes concentrations d'Aspartame et d'acésulfame.	<b>86</b>
<b>Figure 17</b>	Croissance des souches LB 15, LB 8, LB12, LB 27, LB11 en présence des différentes concentrations de saccharose (6,12%) et de NaCl (1,2%).	<b>87</b>
<b>Figure 18</b>	Croissance des souches LB 15, LB27, LB 8, LB11, LB12 en présence des différentes concentrations (0,1% et 0,4%) des arômes fraise vanille et pêche.	<b>89</b>
<b>Figure 19</b>	acidification du lait par les souches de <i>Lactobacillus plantarum</i> LB11, LB12, LB8, LB15 et LB27 en présence des additifs alimentaires	<b>97</b>

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
1. Bactéries lactiques	3
1.1 Genre <i>Lactobacillus</i>	4
2. Place des bactéries lactiques en biotechnologie alimentaire	5
2.1. Production d'acide lactique	5
2.2. Activité protéolytique	5
2.3. Activité lipolytique	5
2.4. Production des exopolysaccharides	6
2.5. Production des bactériocines	6
2.6. Production des polyols	6
3. Probiotiques	7
3.1. <i>Bifidobacterium</i>	8
3.2. <i>Pediococcus</i>	8
3.3. <i>Enterococcus</i>	9
3.4. <i>Bacillus</i>	9
3.5. <i>Escherichia coli</i> Nissle	10
3.6. <i>Saccharomyces boulardii</i>	10
4. Critères de sélection des souches probiotiques	11
4.1. Critères fonctionnels	12
4.2. Critères technologiques	13
5. Mécanismes d'action des probiotiques	13
5.1. Renforcement de la barrière épithéliale	13
5.2. Production de substances antimicrobiennes	14
5.3. Exclusion compétitive des micro-organismes pathogènes	15
5.4. Augmentation de l'adhésion à la muqueuse intestinale	15
5.5. Modulation du système immunitaire	16
6. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine	18
6.1. Amélioration de l'intolérance au lactose	18
6.2. Réduction des diarrhées	19
6.2.1. Diarrhées à Rotavirus	19
6.2.2. Diarrhées associées aux antibiotiques	20
6.3.3. Diarrhées du voyageur	20
6.3 Infection à <i>Helicobacter pylori</i>	21
6.5. Constipation	22
6.6. Maladies inflammatoires de l'intestin	22
6.7. Maladies allergiques	23
6.8. Cancer	23
7. Application des probiotiques dans les aliments	24
8. Facteurs affectant la viabilité des probiotiques dans les laits fermentés	25
8.1. Taux d'inoculation	25

8.2. les ingrédients alimentaires et les additifs	26
8.3. Oxygène	26
8.4. Température de stockage	26
8.5. pH	26
8.6. La durée de conservation	27
8.7. Température de fermentation	27
8.8. L'interaction entre les souches	27
9. Système international de numérotation des additifs alimentaires	28
10. Types d'additifs alimentaires	28
10.1. Conservateurs	28
10.2. Additifs nutritionnels	29
10.3. Colorants	30
10.4. Aromatisants	31
10.5. Texturisant	31
11. Les bienfaits des additifs alimentaires	32
12. Risques d'additifs alimentaires	32

## **MATERIEL ET METHODES**

1. Isolement des bactéries lactiques	34
1.1. Origine des échantillons	34
1.2. Isolement des bactéries lactiques	34
1.3. Conservation des isolats	34
1.4. Identification des bactéries lactiques	35
1.4.1. Examen macroscopique	35
1.4.2. Examen microscopique	35
1.4.3. Recherche de la catalase	35
1.4.4. Production de CO <sub>2</sub> à partir de glucose	35
1.4.5. Températures de Croissance	35
1.4.6. Croissance à pH 9.6 et 4.4	35
1.4.7. Croissance en présence du NaCl	36
1.4.8. Hydrolyse de l'arginine	36
1.4.9. Hydrolyse de l'esculine	36
1.4.10. Identification biochimique	36
2. Potentiel technologique	37
2.1. Pouvoir acidifiant	37
2.2. Activité protéolytique	37
2.3. Activité lipolytique	37
2.4. Activité amylolytique	38
2.5. Activité antifongique	38
2.6. Activité antibactérienne	40
3. Potentiel probiotique	42
3.1. Résistance au pH acide	42
3.2. La tolérance aux sels biliaires	42
3.3. Hydrophobicité	42
3.4. Autoaggregation	43
3.5. Sensibilité aux antibiotiques	43

3.6. Activité hémolytique	43
4. Croissance et survie des probiotiques en présence des additifs alimentaires	44
5. effet de présence des additifs sur l'hydrophobicité	45
6. effet de présence des additifs sur l'Autoagrégation	45
7. Effet de présence des additifs alimentaires sur l'activité antibactérienne	46
8. Effet de présence des additifs alimentaires sur l'activité protéolytique	46
9. Effet de présence des additifs alimentaires sur l'acidification	46

## **RESULATS ET DISCUSSIONS**

1. Isolement des bactéries lactiques	48
1.1. Examen macroscopique et microscopique des cultures	48
1.2. Identification biochimiques et physiologiques des isolats	48
1.2.1. Caractéristiques des isolats rattachés au genre <i>Enterococcus</i>	49
1.2.2. Caractéristiques des isolats rattachés au genre <i>Pediococcus</i>	51
1.2.2. Caractéristiques des isolats rattachés au genre <i>Lactobacillus</i>	53
2. Potentiel technologique	58
2.1. Pouvoir acidifiant	59
2.2. Activité protéolytique	62
2.3. Activité lipolytique	62
2.4. Activité amylolytique	63
2.5. Activité antifongique	66
2.6. Activité antibactérienne	70
3. Potentiel probiotique	76
3.1. Résistance à faible pH	76
3.2. Résistance aux sels biliaires	78
3.3. Hydrophobicité	79
3.4. Autoaggregation	80
3.5. Sensibilité aux antibiotiques	81
3.6. Activité hémolytique	83
4. Croissance et survie des probiotiques en présence des additifs alimentaire	83
4.1. Effet des édulcorants	84
4.2. Effet de saccharose et du NaCl	85
4.3. Effet des arômes	88
5. Effet des additifs alimentaires sur l'autoagrégation et l'hydrophobicité	90
6. Effet des additifs alimentaires sur l'activité antibactérienne	93
7. Effet des additifs alimentaires sur les l'acidification	96
8. Effet des additifs alimentaires sur l'activité protéolytique	98
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	99
<b>CONCLUSION</b>	104
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	106
<b>ANNEXES</b>	

# **INTRODUCTION**

## Introduction

La découverte de la relation symbiotique entre l'homme et les bactéries a conduit à une nouvelle façon de voir les bactéries comme potentiellement bénéfiques, plutôt que pathogènes. Au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, un intérêt pour les microorganismes a eu lieu avec la découverte des « bactéries d'acides lactiques ». En 1857, Louis Pasteur a montré que le processus de fermentation est provoqué par des microorganismes, peu après l'isolement réussi d'une bactérie lactique est survenu. En 1887, Joseph Lister a isolé la souche *Bacterium lactis* à partir du lait fermenté (Smolyansky, 2010).

La naissance des probiotiques a été souvent liée aux travaux du scientifique et prix Nobel Elie Metchnikoff. Environ les années 1900, Metchnikoff a émis l'hypothèse du concept des probiotiques, lorsqu'il a remarqué la longévité et la bonne santé des paysans bulgares résultants de leurs consommation des produits laitiers fermentés. Plus tard, il a constaté que le yaourt contient des microorganismes nécessaires pour protéger l'intestin contre les effets néfastes d'autres bactéries nocives (Tripathi et Giri, 2014).

Le rôle principal de l'alimentation est de fournir les éléments nutritifs pour répondre aux besoins physiologiques de l'hôte. L'évolution des recherches sur le régime alimentaire et la santé, ont fait que la notion des « aliments fonctionnelles » est devenue populaire, notamment que, les consommateurs modernes sont de plus en plus intéressés par leur santé. Les aliments fonctionnels sont définis comme « des aliments qui contiennent certain(s) composant(s) favorisant la santé » au-delà des éléments nutritifs traditionnels (Shah, 2007).

Littéralement le mot probiotique signifie «pour la vie», l'organisation mondiale de la santé (OMS) a défini les probiotiques comme des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates confèrent un avantage pour la santé de l'hôte". Les aliments contenant des probiotiques sont classés comme aliments fonctionnels, Fuller (1992) a défini les aliments probiotiques « des Aliments contenant des micro-organismes vivants présumées améliorer activement la santé en améliorant l'équilibre de la microflore dans le tube digestif ». En raison de la sensibilisation accrue des consommateurs, la demande sur les aliments fonctionnels probiotiques s'est rapidement développé. Le marché mondial des aliments et des boissons fonctionnels a augmenté de 33 milliards \$ en 2000 à 176,7 milliards \$ en 2013 qui représente 5% de l'ensemble du marché alimentaire, Il est estimé que les aliments probiotiques comprennent entre 60% et 70% du marché total des aliments fonctionnels (Tripathi et Giri, 2014).

La majorité des microorganismes probiotiques appartiennent principalement aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Prasad *et al.*, 1998; Rubio *et al.*, 2014), ce dernier présente le genre le plus grand des bactéries lactiques comprenant les bâtonnets Gram positif, catalase négative et microaérophiles. Les lactobacillus sont couramment trouvés dans des environnements diversifiés tels que les produits laitiers, les surfaces muqueuses humaines, ainsi que dans les plantes et le sol (Lahtinen *et al.*, 2012).

Les bactéries lactiques probiotiques ont attiré une grande attention pour les propriétés promotrices pour la santé de certaines espèces. Plusieurs caractéristiques sont essentielles lors de la sélection des souches probiotiques potentielles; le micro-organisme doit être non pathogène, pourrait survivre dans le tractus gastro-intestinale; tolérer le pH faible dans l'estomac et les concentrations physiologiques de la bile, devraient présenter une bonne hydrophobie de surface pour la colonisation et doit présenter une activité antagoniste contre les agents pathogènes intestinaux (Mishra et Prasad, 2005).

Au cours des dernières décennies, les bactéries lactiques probiotiques ont été très intensivement étudiées. La plupart des bactéries lactiques isolées à partir des plantes et des produits végétaux ont constitué une source de nouvelles bactéries fonctionnelles importantes qui peuvent jouer un rôle dans le tractus gastro-intestinale des humains et des animaux ou dans l'industrie alimentaire (Leroy et De Vuyst, 2004).

L'objectif visé dans se présent travail est :

- L'isolement et l'identification phénotypiques des bactéries lactiques isolées à partir des grains de pollen frais.
- L'étude des propriétés technologiques des isolats lactiques.
- L'étude du potentiel probiotique des souches de *Lactobacillus*.
- L'évaluation de l'influence des additifs alimentaires utilisés en industries alimentaires sur la croissance et la viabilité des souches probiotiques et sur certaines propriétés fonctionnelles.

Le travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Sétif 1.

**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) constituent un groupe de bactéries à Gram positif, non sporulée, catalase négative, dépourvues de cytochromes, tolérants à l'acide, sont des anaérobies mais aérotolestants, en forme de bâtonnets ou de coques, au cours de la fermentation des glucides ces bactéries produisent de l'acide lactique comme produit final principal. Les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* forment la base du groupe des bactéries lactiques, d'un point de vue de technologie alimentaire, les genres *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* sont considérés comme les principales bactéries lactiques (Axelson, 2004).

Les bactéries lactiques sont dépourvues de système de respiration fonctionnelle, leur énergie est obtenue par la phosphorylation au niveau du substrat (Axelson, 2004). Le mode de fermentation du glucose présente une caractéristique importante pour la différenciation des genres, il permet de les classer en deux grands groupes :

**Les bactéries lactiques homofermentaires** : les espèces des genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, et certaines de *Lactobacillus* dans les conditions standard de croissance fermentent les sucres par la voie de Embden-Meyerhof-Parnas en pyruvate, ce dernier est converti en acide lactique par la lactate déshydrogénase (LDH). Dans certaines conditions de croissance (limitation de carbone, excès du carbone des sucres lentement métabolisé), le métabolisme homolactique peut se transformer en métabolisme mixte caractérisé par la production d'acétate, formiate, éthanol, et /ou du CO<sub>2</sub> en plus de l'acide lactique (Kowalczyk *et al.*, 2015).

**Les bactéries lactiques hétérofermentaires** : les *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et certaines espèces de *Lactobacillus* fermentent les sucres généralement par la voie de phosphocétolase. Les pentoses sont fermentés conduisant à la production de pyruvate et acétyl-p qui sont convertis ultérieurement en lactate et acétate respectivement. Les Hexoses peuvent être convertis en lactate, éthanol et CO<sub>2</sub> (Kowalczyk *et al.*, 2015).

Les bactéries lactiques se retrouvent dans un large éventail de différentes niches écologiques en raison de leur bonne capacité d'adaptation, elles sont généralement associées à des habitats riches en nutriments, comme les produits alimentaires, certains sont membres de la flore normale buccale, intestinale et vaginale de l'homme et des animaux (Axelson, 2004).

## 1.1 Genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* appartient au phylum des *Firmicutes*, la classe des *Bacilli*, et l'ordre *Lactobacillales*. Il présente le genre plus grand et le plus hétérogène des bactéries lactiques incluant des espèces ayant des propriétés phénotypiques, biochimiques et physiologiques largement variées (Axelson, 2004).

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulés, leur forme peut aller de bâtonnet long et fin, court au coccobacille, groupés en paires ou en chaînes, immobiles, catalase négatif (certains possèdent une pseudocatalase), ils ont une teneur en guanine-cytosine (G+C) habituellement inférieure à 50%. Ils sont aérotolérants ou anaérobies, acidophiles, ils ont des besoins nutritionnels complexes (pour les glucides, les acides aminés, les peptides, les esters d'acides gras, des sels, des dérivés d'acides nucléiques et vitamines) (Hammes et Vogel, 2012). Leur température de croissance optimale est souvent comprise entre 30 et 40°C bien que la température générale de croissance peut varier de 2 à 53°C; ils peuvent se développer sur un intervalle de pH allant de 3 à 8 (Pot *et al.*, 2014).

Orla-Jensen en 1919 a subdivisé le genre de *Lactobacillus* en trois groupes selon la morphologie et la température de croissance en : *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, et *Betabacterium* (Guiraud, 2003).

- Le groupe *Thermobacterium* : comprend les lactobacilles homofermentaires obligatoires, thermophiles qui se développent à 45°C et non à 15°C. fermentent le glucose et le gluconate sans production de CO<sub>2</sub>. Les espèces les plus fréquentes sont *Lactobacillus helveticus*, *L.jugurti*, *L.bulgaricus*, *L.lactis*, *L.acidophilus*, *L.leichamni*, *L.delbrueckii*, *L.kifirofaciens*, *L.mali*
- Le groupe *Streptobacterium* : regroupe les lactobacilles homofermentaires mais qui peuvent être hétérofermentaires facultatives en fonction du substrat, mésophiles qui se développent à 15°C, le CO<sub>2</sub> est dégagé lors de la fermentation de gluconate et non produit lors de la fermentation du glucose. Il comporte les espèces *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. sake*, *L. acetotolerans*, *L. graminis* *L. rhamnosus*...
- Le groupe *Betabacterium* comprend les lactobacilles hétérofermentaires stricts qui sont *Lactobacillus fermentum*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. viridiscens*, *L. kefir*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. sanfrancisco*.

## 2. Place des bactéries lactiques en biotechnologie alimentaire

### 2.1. Production d'acide lactique

Les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique comme produit finale de fermentation des glucides. L'acide lactique a un goût légèrement acide, il est utilisé comme acidulant, aromatisant, un très bon conservateur et un inhibiteur de l'altération bactérienne dans une grande variété d'aliments transformés (Das et Goyal, 2012).

### 2.2. Activité protéolytique

Les bactéries lactiques ont des capacités limitées pour la synthèse des acides aminés, elles possèdent un système protéolytique complexe capable d'hydrolyser les protéines alimentaires en peptides et acides aminés contribuant à la texture, le goût et l'arôme des produits fermentés. Le système protéolytique comprend des protéases associé à l'enveloppe cellulaire qui dégradent les protéines en oligopeptides et des peptidases intracellulaires hydrolysant les peptides en acides aminés (Savijoki *et al.*, 2006). Comparativement aux espèces du genre *Bacillus* et *Pseudomonas*, les bactéries lactiques sont faiblement protéolytiques (Antoine, 2011).

### 2.3. Activité lipolytique

Les enzymes produites par les bactéries lactiques ont une importance majeure en industrie alimentaire. La lipolyse joue un rôle crucial dans l'affinage du fromage, les acides gras sont convertis en méthyl-cétones, des lactones et des thioesters qui contribuent, en plus des acides gras, à la saveur du produit fermenté (Holzapfel et Wood, 2014). Bien que les bactéries lactiques possèdent une variété d'enzymes lipolytiques capables d'hydrolyser divers esters d'acide gras, des substrats de tri-, di- et mono-acylglycerol (Holzapfel et Wood, 2014), ils sont généralement considérés comme faiblement lipolytiques en comparaison avec d'autres microorganismes tels que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium* et *Candida* (Meyers *et al.*, 1996).

Contrairement au lipases des *Pseudomonas* et *Bacillus* qui sont extracellulaires les bactéries lactiques produisent des lipases intracellulaires (Meyers *et al.*, 1996). Les enzymes lipolytiques sont produites au cours de la phase exponentielle de croissance, la production est fortement influencée par les conditions de croissance (Kenneally *et al.*, 1998).

## 2.4. Production des exopolysaccharides

Les bactéries lactiques produisent différents types d'exopolysaccharides qui possèdent de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. La glucanase qui est une enzyme extracellulaire produit à partir du saccharose trois types de glucanes qui sont le dextran, le mutane et alternane. Quatre genres de bactéries lactiques sont connus pour produire les glucanes ; *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* (Das et Goyal, 2012).

Les exopolysaccharides sont des agents thérapeutiques potentiels, ils ont la capacité de réduire le taux de cholestérol sanguin diminuant ainsi le risque de maladies cardiovasculaires. L'aspect naturel visqueux des glucanes rend le contenu gastrique épais ce qui aide à ralentir le taux d'absorption de glucose. En industrie alimentaire ils ont une grande importance ; ils sont utilisés comme viscosifiant, stabilisants, émulsifiants, gélifiant et édulcorants (Das et Goyal, 2012).

## 2.5. Production des bactériocines

Au cours de dernières années, un grand nombre de substances de type bactériocines ou bacteriocines-like produites par les bactéries lactiques ont été identifiées et caractérisées. En raison de leur activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes et d'altération, ces substances ont suscité un intérêt considérable pour leur application dans la conservation des aliments contribuant à réduire l'ajout des conservateurs chimiques et /ou l'intensité des traitements thermiques ou physiques (Dortu et Thonart, 2009).

Les bactériocines sont ajoutées aux aliments sous forme de préparation concentrée comme conservateurs alimentaires ou des allongeurs de durée de conservation. Seulement la nisine et la pédiocine sont utilisées comme bioconservateurs, l'U.S Food and Drug Administration a accordé le statut GRAS (generally recognized as safe) pour un usage alimentaire à la nisine qui est une bactériocine produite par *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, cette substance a trouvé une variété d'applications dans la conservation des aliments (Das et Goyal, 2012).

## 2.6. Production des polyols

Les polyols sont connus comme les alcools de sucre et bien qu'ils aient la structure de l'alcool, ils imitent la douceur du sucre lorsqu'ils sont ajoutés à la nourriture. Dans l'industrie

alimentaire sont le plus couramment utilisés comme agents de remplacement du sucre. Les plus courants sont le maltitol et le sorbitol qui sont produits par les bactéries lactiques. Le mannitol est produit par les homo- et hétérofermentaires. En présence de grandes quantités de glucose ou de saccharose, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus lactis* produisent le mannitol (Das et Goyal, 2012).

### 3. Probiotiques

L'histoire des probiotiques remonte à des centaines d'années avec la consommation des aliments fermentés, leurs bienfaits pour la santé ont été connus depuis longtemps, Hippocrate et autres scientifiques ont rapporté que le lait fermenté pourrait guérir certains troubles du système digestif (Ranadheera *et al.*, 2010).

En 1907 le chercheur russe et prix Nobel Elie Metchnikoff a proposé pour la première fois le concept des probiotiques (Ranadheera *et al.*, 2010), il a émis l'hypothèse que la longévité des paysans Bulgares était liée à leur consommation de grandes quantités de produits laitiers fermentés par des bactéries lactiques qui remplacent les microorganismes pathogènes intestinaux, réduisant ainsi la production des toxines qui conduit à la maladie (Singh *et al.*, 2011).

Le mot «probiotique» est dérivé du grec qui signifie «pour la vie» à l'opposé des « antibiotiques », au fil des années il a eu plusieurs significations. Kollath en 1953 et la Vierge en 1954 ont été probablement les premiers à introduire le terme «probiotique» (Otlés, 2013). Il a été utilisé par Lilley et Stillwell en 1965 pour décrire les substances sécrétées par un microorganisme stimulant la croissance de l'autre à l'opposé des antibiotiques, Sperty (1971) a utilisé le mot probiotique pour décrire des extraits de tissus qui ont stimulé la croissance microbienne. Le terme probiotique, comme il est utilisé aujourd'hui a été d'abord utilisé par Parker (1974) qui a défini les probiotiques comme « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre microbien intestinal ». Cette définition a mis le lien entre l'utilisation des microorganismes avec la flore intestinale, mais l'inclusion des substances produites a élargi le concept en englobant les microorganismes et leurs métabolites qui sont les antibiotiques (Fuller, 1992). En 1989, Fuller a redéfini les probiotiques comme des « suppléments alimentaires contenant des bactéries vivantes qui peuvent être bénéfiques pour l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale », cette définition a souligné la nécessité d'un probiotique d'être viable. Havenaar et Huisin't Veld (1992) ont décrit un probiotique

comme « une mono- ou culture mixte de microorganismes vivants bénéfiques pour l'homme et l'animal en améliorant les propriétés de la microflore indigène » (Rusch, 2002).

Un comité d'experts organisé par l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) des Nations Unies et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (2002), ont établi des lignes directrices pour l'utilisation du terme « les probiotiques sont des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (Pintado *et al.*, 2014).

Les principaux microorganismes probiotiques qui sont utilisés appartiennent principalement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Bien que d'autres espèces des genres *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Bacillus* et *Saccharomyces* (Senok *et al.*, 2005; Shah, 2007; Ranadheera *et al.*, 2010) (Tableau 1).

### **3.1. *Bifidobacterium***

Les Bifidobactéries sont des bâtonnets en formes variées dont la forme Y est la plus caractéristique, elles sont Gram positives, non sporulées, strictement anaérobies, hétérofermentaires produisent de l'acide lactique ou acétiques. Bien que, les bactéries du genre *Bifidobacterium* partagent des caractéristiques phénotypiques avec les bactéries lactiques, il est regroupé dans la subdivision des bactéries ayant un pourcentage de (G+C) supérieur ce qui lui inclut dans le phylum des Actinobactéries (Lee et Salminen, 2009). Les bifidobactéries présentent un composant de la flore normale de l'Homme, chez le nourrisson elles prédominent sa flore intestinale.

### **3.2. *Pediococcus***

Les *Pediococcus* sont des bactéries Gram positif, catalase négative et oxydase négative, anaérobies facultatives à microaérophiles, produisent de l'acide lactique en tant que produit final majeur de la fermentation du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof, elles sont homofermentatives; ne produisent pas de CO<sub>2</sub> à partir du glucose, et nitrates négatives. Elles se distinguent des autres bactéries lactiques par forme sphérique des cellules et qui se divisent en deux directions perpendiculaires formant des tétrades. Elles sont immobiles et ne forment pas de spores ou de capsules.

### 3.3. *Enterococcus*

Les entérocoques sont des cocci ovoïdes Gram positif isolées, en paires ou en chaînes courtes, non sporulées, non mobiles à l'exception d'*Enterococcus gallinarum* et *Enterococcus casseliflavus*, homofermentaires produisant de l'acide lactique avec dominance comme produit finale de fermentation des carbohydrates (Švec et Franz, 2004).

L'importance industrielle des entérocoques est basée sur leur utilisation en tant que cultures starter pour la production des aliments fermentés et probiotiques pour améliorer la santé humaine ou animale (Švec et Franz, 2004).

Les entérocoques probiotiques sont utilisés comme des compléments alimentaires sous forme de préparations pharmaceutiques. Les deux espèces les plus connus, étudiées et commercialisées sont particulièrement *E. faecium* (SF68 cerbo-pharma, Suisse) et *E. faecalis* (*symbioflor*, symbio-pharma, Allemagne). Elles sont utilisées pour le traitement des diarrhées aiguës, les diarrhées associées à l'antibiothérapie, traitement du côlon irritable et pour réduire le taux du cholestérol sérique (Franz *et al.*, 2011).

L'utilisation des entérocoques chez l'homme reste controversée (Izquierdo, 2009), car ces microorganismes sont associés à la contamination fécale, aux maladies nosocomiales, ils possèdent des gènes de résistances aux antibiotiques ainsi que des facteurs de virulence (Holzapfel et Wood, 2012). C'est pour cette raison que la sélection correcte et l'innocuité totale de ces microorganismes est d'une grande importance.

### 3.4. *Bacillus*

Les espèces les plus largement étudiées sont *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* et *Bacillus licheniformis*. Elles sont utilisées chez l'homme en tant que compléments alimentaires. Chez les animaux sont utilisées comme promoteurs de croissance et agents d'exclusion compétitive et dans l'aquaculture leur utilisation est pour l'amélioration de la croissance et la résistance aux maladies de la crevette (Cutting, 2011).

Les spores de *B. clausii* sont utilisées comme supplément médical commercialisé sous le nom Enterogermina®, il est indiqué pour aider à prévenir la gastro-entérite chez les nourrissons et les enfants (Cutting, 2011).

### **3.5. *Escherichia coli* Nissle**

*Escherichia coli* Nissle 1917 est une bactérie Gram négatif non pathogène appartenant à la famille des entérobactéries (Schultz, 2008). C'est une souche probiotique bien connue avec de multiples effets bénéfiques sur l'homéostasie intestinale. Contrairement à d'autres souches de *E. coli*, elle ne produit pas de facteurs de virulence, donc elle est incapable d'induire des dommages à la surface de l'épithélium intestinal (Grozdanov, 2004). Elle peut stimuler la production de bêta-défensine 2 humaine, une molécule qui se révèle être cruciale dans la protection de la barrière muqueuse contre l'adhérence et l'invasion par les bactéries pathogènes (Schlee *et al.*, 2007). En outre, elle peut sécréter des facteurs (microcines, adhésines, protéases) qui améliorent la production de l'adénosine triphosphate (ATP), améliorant ainsi la disponibilité de l'énergie, ainsi qu'elle peut moduler la réponse inflammatoire de la muqueuse par une action directe sur les lymphocytes T activés (Schlee *et al.*, 2007).

### **3.6. *Saccharomyces boulardii***

La Levure *Saccharomyces boulardii* a été utilisée au cours des 30 dernières années pour la prophylaxie et le traitement des maladies diarrhéiques causées par les bactéries et d'autres troubles gastro-intestinaux provoqués par l'administration d'agents antimicrobiens (Kelesidis et Pothoulakis, 2012).

**Tableau 1.** Les souches probiotiques (Ranadheera *et al.*, 2010).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ,	<i>Bifidobacterium bifidum</i> ,	<i>Escherichia coli</i> Nissle,
<i>Lactobacillus casei</i> ,	<i>Bifidobacterium breve</i> ,	<i>Saccharomyces boulardii</i> ,
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i> ,	<i>Streptococcus thermophilus</i> ,
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> ,	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>subsp Bulgaricus</i> ,	<i>Bifidobacterium lactis</i> ,	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i> ,	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i> ,	<i>adolescentis</i> ,	<i>freudenreichii</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i> ,	<i>Bifidobacterium essensis</i> ,	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i> ,	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>laterosporus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>		<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactobacillus rhamnous</i> ,		
<i>Lactobacillus helveticus</i> ,		
<i>Lactobacillus lactis</i> ,		

#### 4. Critères de sélection des souches probiotiques

L'effet probiotique est souche- spécifique, les effets exercés par une souche ne peuvent pas être extrapolés pour une autre souche même si elles appartiennent au même genre et à la même espèce (Izquierdo, 2009).

La première étape dans la sélection des souches probiotiques est la détermination de la classification taxonomique par des méthodes phénotypiques et génotypiques, qui peuvent donner une indication sur l'origine, l'habitat et la physiologie de la souche.

De nombreux travaux ont suggéré que les souches probiotiques d'origine humaine sont plus sécuritaires et mieux adaptées pour coloniser le tractus gastro-intestinale de l'homme, la spécificité de l'action du probiotique est plus importante que la source de micro-

organisme (FAO/OMS, 2002). Les souches probiotiques peuvent être d'origine animale, alimentaire, ou végétale du fait qu'aucune donnée scientifique n'atteste de leur dangerosité pour la santé humaine.

Depuis que les probiotiques sont consommés comme aliment, et non pas comme médicament, tout facteur qui peut constituer un risque pour la santé humaine doit être exclu dans les produits probiotiques. Le comité d'experts FAO/OMS 2002 recommande une caractérisation pour les souches probiotiques, afin d'éliminer toute possibilité de résistance aux antibiotiques, de transfert de résistance, de production des toxines, d'activité hémolytique ou métabolique.

#### 4.1. Critères fonctionnels

- **Survie au cours du transit digestif**

Afin d'atteindre le site d'action et exercent leurs effets bénéfiques, les probiotiques doivent d'abord surmonter un certain nombre de barrières physiques et chimiques dans le tractus gastro-intestinal (Huckle et Zhang, 2011).

La capacité de survie des probiotiques est variable d'une souche à l'autre. Certains sont détruits dès leur passage dans l'estomac par contre, d'autres peuvent résister et survivent tout au long du transit. Au niveau de l'estomac, plus de deux litres de suc gastrique avec un pH aussi bas que 1,5 est sécrété chaque jour, tout microorganisme probiotique doit avoir une tolérance élevée à l'acidité pour qu'il puisse survivre. Les microorganismes qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum. Des modèles *in vitro* stimulants les conditions gastro-intestinales sont utilisées pour la sélection des souches probiotiques.

- **Activité d'hydrolase des sels biliaires**

Les BSH sont généralement des enzymes intracellulaires, insensibles à l'oxygène qui catalysent l'hydrolyse des sels biliaires. Un certain nombre de BSH ont été identifiés et caractérisés chez des bactéries probiotiques, la capacité des souches probiotiques à produire des BSH a été souvent considérée comme critère de sélection des souches probiotiques.

- **Adhésion au mucus et/ou cellules épithéliales humaines**

La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale est l'un des principaux critères de sélection des souches probiotiques ; elle est considérée comme une condition préalable à la

colonisation (Ouwehand *et al.*, 1999). Plus la bactérie passe le temps dans le tractus gastro-intestinale plus elle aura la chance d'exercer un effet bénéfique pour l'hôte (Izquierdo, 2009), l'adhésion peut être importante pour la stimulation du système immunitaire, permettrait de prévenir l'implantation de pathogènes sur les cellules épithéliales intestinales via des mécanismes de compétition.

L'adhésion des souches au mucus ou à l'épithélium est habituellement étudiée *in vitro* en utilisant des mucus humain ou animal et des cultures cellulaires comme les Caco2 ou HT29 (Servin et Coconnier, 2003).

#### ▪ **Activité antimicrobienne**

L'activité antimicrobienne est l'un des critères de sélection les plus importants pour les probiotiques. Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide ou bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines.

## **4.2. Critères technologiques**

Plusieurs aspects technologiques doivent être pris en compte dans la sélection des souches probiotiques. En effet, les souches probiotiques doivent garder leurs caractéristiques durant tous les procédés de production, de conservation et de distribution.

La plupart des définitions des probiotiques, soulignent que les microorganismes doivent être viables et atteindre leur site d'action vivants. Un nombre minimal de  $10^7$  cellules viables /g de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique. Les souches doivent garder leurs viabilités sans se multiplier pour ne pas provoquer d'effet indésirable sur la qualité organoleptique du produit (Ouwehand *et al.*, 1999).

Les produits doivent être conservés dans des conditions appropriées, il est nécessaire de contrôler régulièrement l'identité de la souche et ses propriétés.

## **5. Mécanismes d'action des probiotiques**

### **5.1. Renforcement de la barrière épithéliale**

La barrière intestinale présente un mécanisme de défense majeur impliqué dans le maintien de l'intégrité épithéliale et dans la protection de l'organisme contre les agressions de l'environnement. Les défenses de la barrière intestinale sont constituées par la couche

muqueuse, les peptides antimicrobiens, IgA sécrétoires et le complexe d'adhérence de jonction épithéliale (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Les probiotiques ont été largement étudiés pour leur implication dans le maintien de cette barrière. Cependant, les mécanismes par lesquels les probiotiques améliorent la fonction de barrière intestinale ne sont pas complètement comprises (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Il a été rapporté que l'incubation des cellules intestinales avec les *Lactobacillus* influe de façon différentielle la phosphorylation des protéines de jonction d'adhérence et l'abondance de la protéine kinase C (PKC), modulant ainsi positivement la fonction de barrière épithéliale (Hummel *et al.*, 2012; Bermudez-Brito *et al.*, 2012)

L'utilisation des probiotiques, prévient l'altération de l'épithélium induite par les cytokines qui caractérise les maladies inflammatoire de l'intestin, peut également contribuer au renforcement de la barrière muqueuse. Les mucines (Glycoprotéines) sont les principaux constituants macromoléculaires de mucus épithéliaux. Les probiotiques peuvent favoriser la sécrétion de mucus comme un mécanisme pour améliorer la fonction de la barrière et l'exclusion des agents pathogènes (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

## **5.2. Production de substances antimicrobiennes**

Les acides organiques, en particulier l'acide acétique et l'acide lactique, ont un effet inhibiteur contre les bactéries Gram-négatives, ils ont été considérés comme les principaux composés antimicrobiens responsables de l'activité inhibitrice des probiotiques contre les agents pathogènes (Alakomi *et al.*, 2000; Makras *et al.*, 2006; Bermudez-Brito *et al.*, 2012). L'acide organique pénètre dans la cellule bactérienne à travers la membrane bactérienne, il se dissocie à l'intérieur de son cytoplasme. L'éventuelle diminution du pH intracellulaire ou l'accumulation intracellulaire de la forme ionisée de l'acide organique peut conduire à la mort de l'agent pathogène (Ouweland, 1998; Russell et Diez-Gonzalez, 1998). En outre, certains probiotiques sont capables de générer du peroxyde d'hydrogène en présence d'oxygène. L'effet bactéricide du peroxyde d'hydrogène est dû à son effet oxydant sur la surface cellulaire bactérienne, le dioxyde de carbone est produit par les bactéries hétérofermentaires, et son activité antimicrobienne est due à l'inhibition de décarboxylation enzymatique et son accumulation dans la membrane provoquant un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (Collado *et al.*, 2010).

Un grand nombre de bactéries lactiques produisent des peptides antibactériens qui sont les bactériocines inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes. Les bactériocines agissent au niveau de la membrane cellulaire par un mécanisme commun qui comprend la destruction des cellules cibles par la formation des pores et / ou l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

### **5.3. Exclusion compétitive des micro-organismes pathogènes**

Les mécanismes utilisés par une espèce de bactéries pour exclure ou réduire la croissance d'une autre espèce sont variés, y compris ; la création d'une micro-écologie hostile pour rendre l'environnement moins adapté à leurs concurrents, l'élimination des sites récepteurs bactériens disponibles, la production et la sécrétion de substances antimicrobiennes et des métabolites sélectifs, l'épuisement compétitif des nutriments essentiels (Rolfe, 1991; Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Les propriétés d'adhésion spécifiques qui sont due à l'interaction entre les protéines de surface et les mucines peuvent inhiber la colonisation des bactéries pathogènes et sont le résultat d'une activité antagoniste par certaines souches probiotiques contre l'adhésion des pathogènes gastro-intestinaux (Servin, 2004).

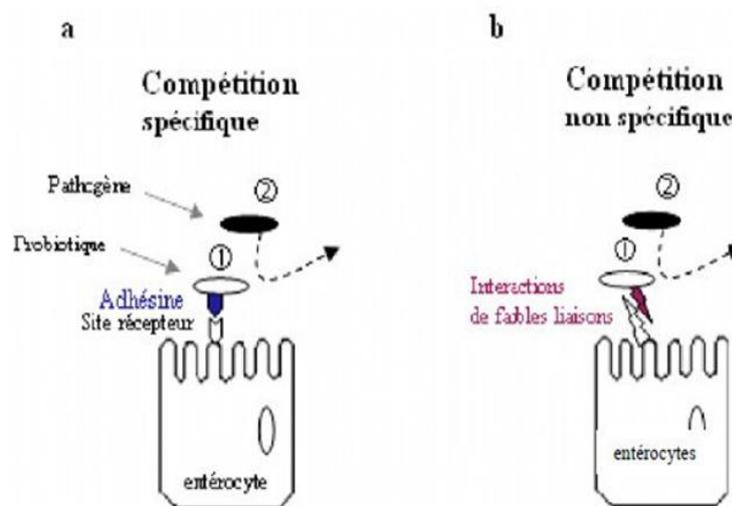
### **5.4. Augmentation de l'adhésion à la muqueuse intestinale**

L'adhésion à la muqueuse intestinale est indispensable pour la colonisation et elle est importante pour l'interaction entre les souches probiotiques et l'hôte. La plupart des infections intestinales sont initiées par l'adhésion des pathogènes aux cellules entérocytaires de l'hôte.

Les bactéries lactiques présentent divers déterminants de surface impliquées dans leur interaction avec les cellules épithéliales intestinales (servine, 2004). Les cellules épithéliales intestinales produisent la mucine qui est un mélange complexe de glycoprotéine qui constitue un composant principale de la muqueuse, empêchant ainsi l'adhésion des bactéries pathogènes (Collado *et al.*, 2005; Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

L'interaction spécifique a indiqué un lien possible entre les protéines de surface des bactéries probiotiques et l'exclusion compétitive des agents pathogènes du mucus (Ouwehand *et al.*, 2002), les bactéries présentent des adhésines de surface qui assurent la fixation à la muqueuse, l'exemple le plus étudié des adhésines bactériennes ciblant le mucus est une protéine produite par *Lactobacillus reuteri* (mucus-binding protein) (Buck *et al.*, 2005;

Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Les probiotiques, telles que *L. plantarum*, ont la capacité d'induire MUC2 et MUC3 et d'inhiber l'adhérence de *E. coli* entéro-pathogène. Ces observations indiquent que l'amélioration des couches muqueuses et du glycocalyx recouvrant l'épithélium intestinal, ainsi que l'occupation des sites de liaison microbiennes par *Lactobacillus spp.* fournir une protection contre l'invasion par des agents pathogènes (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Le processus d'adhésion microbienne des bactéries lactiques comprend également des interactions non spécifiques par des forces passives, des interactions électrostatiques, hydrophobes et des forces stériques (Figure 1) (Servin et Coconnier, 2003).



**Figure 1.** Mécanisme d'inhibition d'adhésion des pathogènes (a) par compétition spécifique (b) compétition non spécifique (Servin et Coconnier, 2003).

## 5.5. Modulation du système immunitaire

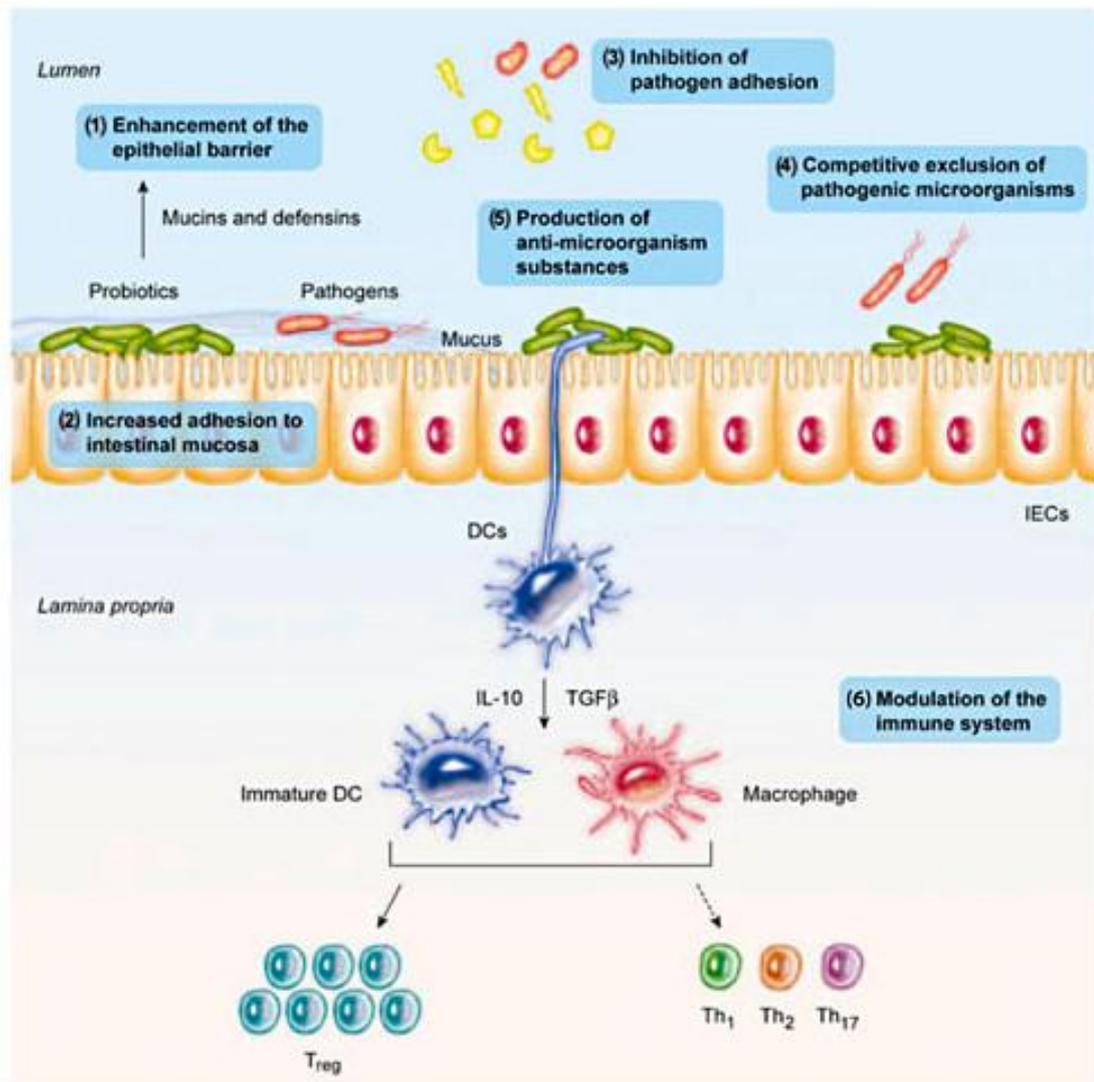
Le système immunitaire peut être divisé entre les systèmes innés et adaptatifs. La réponse immunitaire adaptative (ou acquise) dépend des lymphocytes B et T, qui sont spécifiques pour des antigènes particuliers. En revanche, le système immunitaire inné (ou naturel) répond à des structures communes appelées motifs moléculaires associés aux pathogènes (Gómez *et al.*, 2010; Bermudez-Brito *et al.*, 2012). La régulation immunitaire se traduit par une homéostasie entre l'activité des cellules Th1 et celle des cellules Th2 qui jouent un rôle principal dans le mécanisme de régulation immunitaire. Les cellules Th1 produisent des IFN- $\gamma$  et confèrent une protection contre les pathogènes intracellulaires par activation des macrophages (Kawakami, 2003). Alors que, les Th2 sécrètent IL-4, IL-5 et

sont plus impliquées dans l'immunité humorale par activation et différenciation des cellules B, et particulièrement dans la production des anticorps IgE et IgA, au recrutement des éosinophiles, des mastocytes. Une inhibition croisée entre les cellules Th1 et Th2 induite par IFN- $\gamma$  et IL-10 respectivement permet de maintenir un équilibre entre les Th1 et Th2 (Kidd, 2003).

Les probiotiques, grâce à leurs composants intra ou extracellulaires actifs, sont capables d'influencer le système immunitaire par contact avec les cellules immunocompétentes, en transmettant des signaux qui modifient la réponse immunitaire de l'organisme-hôte (Figure 2). De nombreuses études ont rapporté que la prolifération des lymphocytes et la production des cytokines par les cellules du système immunitaire peuvent être sensiblement modifiées par l'ingestion de probiotiques (Amrouche, 2005).

Jijon et ses collaborateurs (2004) ont démontré que l'ADN issu d'un mélange de 8 souches probiotiques (*L. acidophilus* MB 443, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MB 453, *L. casei* MB 451, *L. plantarum* MB 452, *B. longum* Y10, *B. infantis* Y1, *B. breve* Y8 et *S. salivarius* subsp. *thermophilus* MB 455), réduits *in vitro* et *in vivo* les réponses inflammatoires au niveau de l'épithélium intestinal. Une étude clinique de Mastrandrea *et al.* (2004) a montré les effets positifs des probiotiques dans le traitement des maladies allergiques. En effet, une administration quotidienne d'un mélange de *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* et *Streptococcus thermophilus* ( $1.10^9$  bactéries vivantes) a permis de réduire significativement le taux de précurseurs circulants de lymphocytes CD34+ impliqués dans l'inflammation allergique systémique.

Lee *et al.* (2004) ont étudié *in vitro* l'activité anti-prolifération des fractions cytoplasmiques de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Bifidobacterium longum* sur les lignées de cellules tumorales SNUC2A, SNU1, NIH/3T3. Ils ont constaté que toutes les fractions cytoplasmiques, particulièrement celles de *L. casei* et *B. longum*, inhibent la prolifération des cellules tumorales.



**Figure 2.** Les principaux mécanismes d'action des probiotiques (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

## 6. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine

### 6.1. Amélioration de l'intolérance au lactose

Le lactose est un disaccharide présent exclusivement dans le lait et ses dérivés, la digestion de lactose nécessite une lactase qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. L'hypolactasie conduit à une digestion incomplète du lactose et qui a pour conséquence une intolérance au lactose qui se traduit par des symptômes digestifs après l'ingestion de lait : ballonnements, digestion difficile, diarrhée. Ce problème touche près de 70% de la population mondiale (Singh *et al.*, 2011).

L'amélioration de l'intolérance au lactose et de la malabsorption de ce sucre par les bactéries lactiques est le premier effet démontré avec haut niveau de preuve (Sondergaard, 2005). Certaines bactéries lactiques comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* ont la possibilité d'utiliser le lactose et soulager les symptômes d'intolérance au lactose, ils sont généralement ajoutés dans les produits laitiers pour augmenter la digestibilité du lactose (Rolfe, 2000). Parmi beaucoup d'études qui ont confirmé le rôle des probiotiques dans l'atténuation de l'intolérance au lactose en 1984, Kolars *et al.* (1984) et Savaiano *et al.* (1984) ont montré que chez des sujets déficients en lactase, le lactose a été absorbé beaucoup mieux à partir de yaourt que du lait, probablement à cause de la digestion du lactose par la lactase libérée par les microorganismes du yaourt.

Pelletier *et al.* (2001) ont constaté que l'ingestion de yaourt avec *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* ( $10^8$  UFC / ml) conduit à une réduction de l'excrétion de l'hydrogène et une diminution des symptômes de l'intolérance au lactose.

## **6.2. Réduction des diarrhées**

De nombreuses études cliniques visant le traitement ou la prévention des maladies diarrhéiques par l'utilisation des probiotiques ont été publiées. Le soulagement des symptômes et le raccourcissement des infections sont les effets probiotiques les plus importants (Fung *et al.*, 2011).

### **6.2.1. Diarrhées à Rotavirus**

Rotavirus est l'un des virus entériques les plus importants, il est responsable d'environ un tiers des cas de diarrhée sévère chez l'enfant dans les pays développés et en développement (Pintado *et al.*, 2014). Le traitement commun des diarrhées à rotavirus comprend principalement la réhydratation orale. Cependant, plusieurs études ont rapporté que des combinaisons avec des microorganismes probiotiques réduisent la durée de la diarrhée (Pintado *et al.*, 2014). Dans une étude multicentrique menée en Europe, 291 nourrissons âgés 1-3 mois hospitalisés pour des diarrhées ont été divisés au hasard en deux groupes. Une dose de  $10^{10}$  ufc de *L. rhamnosus* GG ou un placebo ont été administrés après un traitement de réhydratation. La durée des diarrhées a été significativement réduite dans le groupe *L. rhamnosus* GG, par rapport au groupe placebo (Guandalini *et al.*, 2000).

Une autre étude réalisée sur des patients âgés de 6 - 36 mois dont 75% souffrant d'une diarrhée à rotavirus ; l'ingestion de *L.reuteri* SD2222 ( $10^{10}$ - $10^{11}$  ufc) pendant 5 jours a raccourci la durée des diarrhées, par rapport au groupe placebo (Shornikova *et al.*, 1997).

### 6.2.2. Diarrhées associées aux antibiotiques

Les diarrhées associée aux antibiotiques (DAA), survient généralement au cours du traitement antibiotique en particulier les antibiotiques à large spectre tels que l'ampicilline, l'amoxicilline, la céphalosporine, et la clindamycine (Fung *et al.*, 2011; McFarland, 2009). L'antibiothérapie modifie l'équilibre écologique de la microflore normale, ce qui peut entraîner les diarrhées et l'émergence d'agents pathogènes tels que *Clostridium difficile*, (Pintado *et al.*, 2014) qui existe normalement dans l'intestin mais à un niveau faible. *C. difficile* produit des toxines A et B qui provoquent des lésions au niveau des muqueuses et l'inflammation du côlon, les probiotiques produisent des protéases qui dégradent directement les toxines et augmentent la réponse immunitaire (Fung *et al.*, 2011).

L'effet préventif des probiotiques sur l'infection par *C. difficile* a été étudié. Les probiotiques tels que *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium longum*, et *Enterococcus faecium* SF 68 ont diminué de façon significative l'incidence des diarrhées chez des patients traités avec des antibiotiques (Pintado *et al.*, 2014). Selon une méta-analyse sur les *Lactobacillus* probiotiques, les lactobacilles peuvent prévenir efficacement la DAA chez les enfants et les adultes (Lyra *et al.*, 2011). McFarland et Elmer (1997) ont mentionné que le traitement combiné des antibiotiques standards (vancomycine ou métronidazole), ainsi que *S. boulardii* est révélé être efficace, dans un essai clinique contrôlé par placebo de 124 patients avec infections à *C. difficile* (Pintado *et al.*, 2014).

### 6.2.3. Diarrhées du voyageur

La diarrhée du voyageur, ou «turista», est une maladie commune qui affecte principalement les personnes voyageant des pays développés vers les régions les moins développées du monde. L'utilisation des probiotiques contre la diarrhée du voyageur est populaire (Lyra *et al.*, 2011). Différents probiotiques ont démontré un intérêt dans la prévention de la diarrhée du voyageur. Cependant, les preuves cliniques sont encore peu limitées. La diversité des causes potentielles de la diarrhée du voyageur et les difficultés des volontaires en adhérant aux protocoles d'étude pendant le déplacement apportera des défis

supplémentaires pour les interventions probiotiques ciblant la diarrhée du voyageur (Lyra *et al.*, 2011).

Une étude a testé l'efficacité d'un mélange de probiotiques (*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaris*, *Bifidobacterium bifidum* et *Streptococcus thermophilus*) contre un placebo chez 94 touristes qui voyageaient deux semaines en Egypte. L'incidence de la diarrhée était réduite de manière significative dans le groupe qui recevait les probiotiques par rapport au groupe placebo (Piquepaille, 2013).

### 6.3 Infection à *Helicobacter pylori*

*H. pylori* a été associée en tant qu'agent majeur de la gastrite et ulcère peptique et également considérée comme un facteur de risque pour le cancer de l'estomac. L'utilisation de probiotiques pour l'inhibition de *H. pylori* a été explorée. Les données *in vitro* et *in vivo* obtenues, rapportent un effet inhibiteur des probiotiques sur l'adhésion de *H. pylori* aux cellules gastriques et la réduction de viabilité (Pintado *et al.*, 2014).

Des études *in vitro* ont proposé que les probiotiques pourraient agir sur *H. pylori* par la production d'acides organiques et / ou bactériocines et l'inhibition de la croissance et l'attachement de *H. pylori* aux cellules épithéliales gastriques. La plupart des études impliquent des lactobacilles, en raison de leur aptitude à adhérer à la muqueuse gastrique et leur résidence transitoire dans l'estomac comprennent des souches de *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. salivarius* (Francavilla *et al.*, 2013). Les lactobacilles sont connus pour produire des quantités relativement importantes d'acide lactique, qui a été considéré comme un inhibiteur et / ou un agent bactéricide. En effet, l'acide lactique inhibe l'uréase de *H. pylori* et exerce son effet antimicrobien par abaissement du pH (Francavilla *et al.*, 2013). Lorca *et al.* (2001) ont montré que *L. acidophilus* CRL 639 peut exercer son action anti *H.pylori* par la sécrétion d'une autolysine, un composé protéiné libéré après la lyse des cellules (Francavilla *et al.*, 2013). *L. reuteri* ATCC 55730 exerce un effet inhibiteur significatif sur la croissance de *H. pylori* suite à l'effet d'une substance appelée la reuterine (Johnson *et al.*, 2003; Francavilla *et al.*, 2013).

Fondé sur la preuve que l'ingestion des bactéries lactiques exerce un effet inhibiteur sur l'infection à *Helicobacter pylori*, Wang *et al.* (2004) ont examiné l'effet de l'administration de l'AB-yaourt contenant  $10^7$  ufc/mL de *Lactobacillus acidophilus* La5 ou *Bifidobacterium lactis* Bb12 sur 59 adultes volontaires infectés par *H. pylori*, recevant le yaourt deux fois par

jour après les repas pendant 6 semaines. L'administration d'AB-yaourt diminue l'activité de l'uréase de *H. pylori* après 6 semaines de traitement, l'examen des biopsies antrales a montré une réduction de la densité de *H. pylori* et l'activité de la gastrite, les auteurs ont conclu qu'une consommation régulière du yaourt contenant *Bifidobacterium lactis* Bb12 et *Lactobacillus acidophilus* La5 réprime efficacement l'infection à *H. pylori* chez l'homme (Francavilla *et al.*, 2013).

### 6.5. Constipation

Les bifidobactéries et les lactobacilles produisent l'acide lactique, acétique et d'autres acides conduisant à un abaissement du pH dans le côlon, qui peut améliorer le péristaltisme et diminue ensuite le temps de transit colique (Salvatore et Vandenplas, 2010).

Une étude sur 45 enfants souffrant de constipation a montré que l'administration de la souche *L. rhamnosus* Lcr35 ( $8.10^8$  cfu/jour) et de l'oxyde de magnésium produisent une augmentation significative similaire dans la fréquence des défécations ( $p = 0.03$ ), utilisation moindre de lavement ( $p = 0,04$ ), et moins de selles dures ( $p = 0,01$ ) par rapport au groupe placebo. Bien que, dans le groupe des probiotiques, il y avait une diminution significative de la douleur abdominale ( $p = 0,03$ ) (Bu *et al.*, 2007; Salvatore et Vandenplas, 2010). Inversement, et dans une autre étude sur 84 enfants souffrant de constipation, l'ajout de *Lactobacillus rhamnosus* GG ( $10^9$  ufc / jour) au lactulose comme traitement standard n'a donné aucun avantage supplémentaire (Banaszkiewicz et Szajewska, 2005; Salvatore et Vandenplas, 2010).

### 6.6. Maladies inflammatoires de l'intestin

La maladie inflammatoire de l'intestin est une inflammation chronique et récurrente qui affecte généralement le côlon ou l'intestin grêle. Elle comprend la rectocolite hémorragique qui se définit comme une atteinte inflammatoire du rectum, et la maladie de Crohn où l'inflammation est localisée dans tout le tube digestif et se manifeste par des symptômes comme les diarrhées, des douleurs abdominales, et la perte de poids.

De nombreuses préparations différentes de probiotiques dont *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. johnsonii* LA1, *E. coli* Nissle 197, VSL#3 (une combinaison de *S.thermophilus*, *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, and *L. bulgaricus*), *L. reuteri*, et *L. salivarius* ont été étudiées dans les maladies inflammatoires de l'intestin soit dans des études sur les animaux ou des essais cliniques (Pintado *et al.*, 2014).

Le mécanisme d'action qui prend en charge les effets positifs des probiotiques sur les MII est encore peu claire. Cependant, il est bien évident que les différentes bactéries probiotiques agissent par des voies multiples plutôt que, par un seul mécanisme commun. Les principaux mécanismes d'action possibles des probiotiques comprennent l'antagonisme contre les agents pathogènes via la sécrétion de composés bactéricides, la suppression des médiateurs pro-inflammatoires, l'induction des facteurs de protection, l'amélioration de la prolifération des cellules épithéliales et l'inhibition de l'apoptose (Pintado *et al.*, 2014).

### **6.7. Maladies allergiques**

Les maladies atopiques comme l'eczéma, la rhinite allergique et l'asthme sont des troubles allergiques chroniques dont la prévalence a augmenté considérablement au cours des 20 dernières années. Nombreuses preuves suggèrent que les souches probiotiques vivantes sélectionnées peuvent être efficaces dans la prévention des maladies allergiques (Lahtinen et Endo, 2012).

Certaines études suggèrent qu'il existe une relation entre les maladies allergiques et la composition de la microflore intestinale. Sepp *et al.* (2005) ont constaté que les bifidobactéries ont été moins détectés chez les enfants souffrant de maladies allergiques que chez les enfants en bonne santé (Brunser et Gotteland, 2010).

Une diminution de l'eczéma atopique chez les nourrissons issus de familles atopiques a été observée, lorsque les mères ont reçu *Lactobacillus rhamnosus GG* avant l'accouchement et pendant l'allaitement. Kalliomaki *et al.* (2007) ont démontré que l'administration de *Lactobacillus GG* confère un effet protecteur contre le développement de l'eczéma, persistant jusqu'à 7 ans d'âge. Ce qui signifie que l'administration de microorganismes probiotiques avant l'accouchement, et 6 mois après, laisse une empreinte dans le système immunitaire de l'hôte qui persiste pendant des années et empêche le développement des manifestations atopiques (Brunser et Gotteland, 2010).

### **6.8. Cancer**

La consommation de viande rouge cuite, en particulier la viande grillée au barbecue, et une faible consommation de fibres sont rapportées à jouer un rôle majeur dans l'apparition du cancer colorectal. La flore colique est également signalée pour provoquer la carcinogénèse médiée par des enzymes microbiennes telles que  $\beta$ -glucuronidase, azoréductase et nitroreductase, qui convertissent les procarcinogènes en carcinogènes (Shah, 2007).

L'effet anticancéreux des bactéries probiotiques est rapporté comme étant due à la suppression des sources de procarcinogènes ou les enzymes qui conduisent à leur formation, l'amélioration de l'équilibre de la microflore intestinale, la normalisation de la perméabilité intestinale conduisant à la prévention ou le retardement de l'absorption des toxines, le renforcement des mécanismes de barrière intestinale, et l'activation de facteurs cellulaires non spécifiques (telles que les macrophages et les cellules natural killer par l'intermédiaire de la régulation de la production d'interféron-  $\gamma$  (Shah, 2007).

Il a été rapporté que certaines souches de *L. acidophilus* et *Bifidobacterium spp* ont la capacité de diminuer le taux des enzymes telles que la  $\beta$ -glucuronidase, la azoréductase et nitroréductase responsable de l'activation des procarcinogènes et par conséquent, réduire le risque de développement de tumeurs (Yoon *et al.*, 2000; Shah, 2007). Des études sur l'homme ont montré que l'ingestion de *L. acidophilus* ou *Lactobacillus casei* entraîne une réduction des niveaux des enzymes dans les selles de volontaires (Senok et Botta, 2005). *L. acidophilus*, *L. plantarum* *L. rhamnosus* et *Bifidobacterium* produisent des acides gras à chaîne courte, ces composés sont rapportés à inhiber la production de produits cancérigènes en réduisant les activités enzymatiques (Fotiadis *et al.*, 2008).

Une étude portant sur l'impact de la consommation de probiotiques sur le cancer a montré des résultats prometteurs, elle a démontré que l'utilisation de *L. casei* Shirota (présente dans la préparation «Yakult») a réduit le taux de récurrence du cancer superficiel de la vessie (Aso *et al.*, 1995; Senok et Botta, 2005).

## **7. Application des probiotiques dans les aliments**

L'intérêt pour les bactéries probiotiques et leur application dans des produits alimentaires a augmenté tout au long des deux dernières décennies, Avec la mise au point actuelle sur les aliments fonctionnels, les produits probiotiques sont plus populaires que jamais (Sondergaard, 2005).

Les produits contenant des bactéries probiotiques se trouvent généralement sous deux formes: les compléments alimentaires sous forme de comprimés ou de gélules et les produits alimentaires comme le yogourt et le lait fermenté, la gamme des produits disponibles continue à s'élargir, des progrès importants ont été réalisés au cours des dernières décennies dans le développement de produits laitiers contenant des probiotiques, telles que les laits fermentés, crème glacée, divers types de fromages, formules pour bébés, lait en poudre, les desserts

laitiers glacés, boissons à base de lactosérum, la crème sure, le babeurre, le lait liquide normal et aromatisé (Mohammadi et Mortazavian, 2011). Toutefois, en gardant à l'esprit la forte prévalence de l'intolérance au lactose, différents produits probiotiques non laitiers tels que les produits végétariens, produits à base de céréales, jus de fruits, des produits à base de soja, desserts à base d'avoine, produits de confiserie, céréales pour petit déjeuner et les aliments pour bébé ont été développés au cours des dernières années (Tripathiet Giri, 2014). Il est estimé que en 2008, le marché mondiale des compléments probiotiques (Pilules, gélules) lui seul valait environ 1,5 milliard \$ (Heller, 2009; Champagne *et al.*, 2011).

Afin d'obtenir les effets souhaités pour la santé, les bactéries probiotiques doivent être capables de se développer dans le lait (certains organismes peuvent ne pas être en mesure de croître dans le lait, par exemple *Lb. rhamnosus GG*), et de survivre en nombre suffisant. Il a été suggéré que les organismes probiotiques doivent être présents dans le produit alimentaire à une concentration minimale de  $10^6$  ufc g /1, ou une dose journalière devrait être d'environ  $10^9$  ufc g/1, l'association Japonaise des laits fermentés et des bactéries lactiques a mis le point sur un chiffre standard qui recommande la présence d'un minimum de  $10^7$  ufc/ml de bactéries lactiques viables dans les produits laitiers (Tamime *et al.*, 2005).

Le développement des aliments avec des doses adéquates de probiotiques au moment de la consommation constitue un défi. Car, Plusieurs paramètres du processus alimentaire, les ingrédients et les conditions de stockage peuvent influencer négativement la viabilité des souches probiotiques dans le produit pendant le traitement et la durée de conservation (Sondergaard, 2005).

## **8. Facteurs affectant la viabilité des probiotiques dans les laits fermentés**

Plusieurs facteurs sont présumés avoir une influence sur la survie des souches probiotiques dans les laits fermentés et d'autres aliments probiotiques. Dans les produits laitiers fermentés la viabilité dépend principalement de:

### **8.1. Taux d'inoculation**

Le niveau d'inoculation des probiotiques doit être suffisamment élevé pour assurer un nombre de cellule minimum  $1.10^6$  ufc/g à la fin de la période de conservation. Etant donné qu'une diminution de la viabilité d'environ 1 unité de log à la fin d'une longue durée de conservation est fréquente, Le taux initial devrait être min  $1.10^7$  ufc / g de lait, pour assurer

une bonne viabilité dans le lait fermenté pendant la fermentation et la période de conservation, il est recommandé d'ajouter les souches probiotiques avant la fermentation.

### **8.2. Les ingrédients alimentaires et les additifs**

les ingrédients dans les aliments peuvent avoir un effet protecteur, neutre, ou nuisible à la stabilité des probiotiques (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002), d'où la compatibilité des probiotiques avec différents ingrédients alimentaires joue un rôle important dans leur survie. Les additifs généralement utilisés dans l'industrie alimentaire comprennent différents types de sucres, les édulcorants, les sels, les composés aromatiques (diacétyle, l'acétaldéhyde et l'acétoïne), des agents aromatisants et des colorants naturels ou artificiels, la nisine, la natamycine et le lysozyme (vinderola *et al.*, 2002). Ces additifs peuvent affecter considérablement la croissance et la viabilité des bactéries probiotiques.

### **8.3. Oxygène**

L'exposition à l'oxygène pendant la fermentation joue un rôle majeur dans la perte de la viabilité des bactéries sensibles à l'oxygène (Gaudreau *et al.*, 2013; Tripathi et Giri, 2014). La tolérance de l'oxygène chez les bactéries probiotiques est souche dépendante, mais en général les lactobacilles sont plus tolérants à l'oxygène que les *Bifidobacterium spp* en raison de la nature anaérobie de ce dernier (Sondergaard, 2005). Plusieurs méthodes ont été utilisées pour réduire la teneur en oxygène pendant la fermentation. Le plus important est l'accomplissement de la fermentation sous vide (Cruz *et al.*, 2007; Tripathi et Giri, 2014). Pour réduire la teneur en oxygène pendant le conditionnement et le stockage des aliments probiotiques, des méthodes comprennent l'emballage sous vide, utilisation des matériaux d'emballage avec une faible perméabilité à l'oxygène, l'ajout d'antioxydants et fixateurs d'oxygène au produit, et le contrôle du processus de production de telle sorte de minimiser l'entrée d'oxygène dissous dans le produit (Tripathi et Giri, 2014).

### **8.4. Température de stockage**

La viabilité des bactéries probiotiques pendant le stockage est inversement proportionnelle à la température de stockage (Gardiner *et al.*, 2000). Les produits alimentaires contenant les probiotiques doivent être de préférence conservés à une température de 4-5 °C (Tripathi et Giri, 2014).

### **8.5. Le pH**

La survie des probiotiques au cours du stockage est considérablement influencée par le pH et l'acidité titrable des produits (Mortazavian *et al.*, 2010). Une très faible valeur du pH augmente la concentration d'acides organiques non dissociés dans les produits fermentés, en améliorant ainsi l'effet bactéricide de ces acides. Les boissons comme les jus de fruits avec de

faibles valeurs de pH possèdent un défi important pour les probiotiques (Tripathi et Giri, 2014).

### **8.6. La durée de conservation**

La durée de conservation des produits fermentés peut aller jusqu'à 42 jours, il est important que le taux d'inoculation des probiotiques doit être suffisamment élevé pour assurer un nombre de cellule minimum  $1.10^6$  ufc/g à la fin de la période de conservation (Sondergaard, 2005).

### **8.7. Température de fermentation**

La température de fermentation est l'un des facteurs importants qui affectent la viabilité des micro-organismes probiotiques et même autres paramètres qualitatifs des produits fermentés contenant des probiotiques. La température favorable pour la croissance de la plupart des probiotiques est comprise dans l'intervalle de 37- 43 °C (Tripathi *et al.*, 2014). La température de fermentation optimale pour les cultures starter de yaourt est comprise entre 40-43°C, cette température est adaptée pour certains probiotiques, mais pas tous les probiotiques. *L.casei* et *L.rhamnosus* sont mésophiles préférant une température d'environ 37°C, pour les *bifidobacterium* et *L. acidophilus* la température optimale est souche dépendante (Sondergaard, 2005). De ce fait, le temps d'exposition à une température plus élevée doit être plus court afin de sauver les probiotiques.

### **8.8. L'interaction entre les souches**

Des cultures mixtes des ferments lactiques et de bactéries probiotiques sont couramment utilisées dans la fabrication des laits fermentés et des fromages probiotiques. Dans ces combinaisons bactériennes, les interactions entre les différentes souches peuvent entraîner une stimulation, inhibition ou une absence d'effets sur le taux de croissance microbienne et l'activité métabolique (Vinderola *et al.*, 2002).

La combinaison la plus appropriée de ferments starter et bactérie probiotique doit être déterminée en utilisant un processus de sélection pour évaluer l'impact des différents starters sur les propriétés sensorielles et sur la survie de la souche probiotique. L'impact négatif sur la survie probiotique *in vitro* et *in vivo* devrait également être prise en considération, car la survie des bactéries probiotiques peut être influencée par des métabolites formés par le ferment starter tel que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

## 9. Système international de numérotation des additifs alimentaires

Le système E, développé par l'Union européenne (Officiellement la Communauté économique européenne) fournit une liste de nombreux additifs couramment utilisés, elle comprend les additifs qui sont généralement reconnus comme sûr dans les États membres permettant ainsi aux aliments de se déplacer d'un pays à l'autre au sein de l'Union européenne qui a adopté des directives fixant les critères d'évaluation des additifs. Le Comité scientifique européen de l'alimentation humaine (SCF) surveille la sécurité des additifs en fonction des critères établis, des directives spécifiques ont été établies pour les édulcorants, les colorants et autres additifs alimentaires (Larry Branen et Haggerty, 2001).

Le comité du codex sur les additifs alimentaires et les contaminants (CCFAC) a mis au point un système international de numérotation pour les additifs alimentaires (SIN) en vue de fournir un système numérique, internationalement reconnu, permettant l'identification des additifs alimentaires dans les listes d'ingrédients, au lieu et place de la déclaration du nom spécifique qui est souvent assez longue et d'une structure chimique complexe (codex alimentarius). Le système (SIN) est basé sur le système E mais il est plus large, conçu comme système d'identification pour les additifs alimentaires approuvés pour être utilisés dans un ou plusieurs pays (Larry Branen et Haggerty, 2001).

## 10. Types d'additifs alimentaires

Les additifs peuvent être divisés en six grandes catégories: les conservateurs, additifs nutritionnels, agents aromatisants, agents colorants, agents texturants, additifs divers. Plusieurs additifs servent souvent plus d'une fonction dans les aliments.

### 10.1. Conservateurs

Ces additifs sont regroupés dans la catégorie des conservateurs dans le système SIN. Il existe essentiellement trois types de conservateurs ajoutés aux aliments (Larry Branen et Haggerty, 2001);

- Les antimicrobiens, avec des numéros E et SIN allant de 200 à 290, sont utilisés pour contrôler ou empêcher la croissance des microorganismes. Ils jouent un rôle majeur dans l'extension de la durée de vie de nombreux snacks et plats cuisinés (Davidson *et al.*, 2001).

- Les antioxydants (SIN 300-326 et E300-E326), sont utilisés pour empêcher l'oxydation des lipides et / ou des vitamines dans les produits alimentaires. Ils sont utilisés principalement pour prévenir l'auto-oxydation et le développement ultérieur du rancissement et de la saveur désagréable. Ils varient des substances naturelles telles que les vitamines C et E aux produits chimiques synthétiques comme l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT). Les antioxydants sont particulièrement utiles pour conserver les aliments secs et surgelés pendant une période de temps prolongée (German, 2001).
- Les agents anti-brunissement sont des produits chimiques utilisés pour prévenir le brunissement enzymatique et non enzymatique dans les produits alimentaires, en particulier les fruits secs ou les légumes. Les plus couramment utilisés dans cette catégorie sont la vitamine C (E300), l'acide citrique (E330) et le sulfite de sodium (E221), ces additifs sont classés comme des antioxydants ou des conservateurs dans le système SIN, conservant les mêmes nombres que dans le système E.

## **10.2. Additifs nutritionnels**

Le terme «additif nutritionnel» peuvent être utilisés pour désigner l'addition de vitamines, de minéraux, d'acides aminés, d'acides gras, ainsi que d'autres composés chimiques purs aux aliments afin d'améliorer ou de maintenir la qualité nutritionnelle des aliments (Swanson et Evenson, 2001). Les additifs nutritionnels ne sont pas inclus comme classe fonctionnelle dans les systèmes de numérotation SIN ou E, bien que plusieurs sont inclus dans d'autres classes fonctionnelles et servent plusieurs fonctions dans les produits.

Les additifs nutritionnels peuvent être utilisés pour restaurer les nutriments aux niveaux trouvés dans l'aliment avant le stockage, l'emballage, la manipulation et le traitement comme l'enrichissement des produits céréaliers, des farines de maïs et du riz, aussi pour améliorer l'état nutritionnel ou de corriger l'infériorité nutritionnelle dans un aliment qui remplace un aliment plus traditionnel nutritionnel. L'exemple est la fortification des boissons de petit déjeuner avec la folacine (vitamine B9) et la vitamine C, ils sont également ajoutés pour d'autres fins, les vitamines C et E peuvent être utilisé pour des propriétés antioxydantes; le bêta-carotène peut être utilisé pour donner la couleur. Dans ces cas, les consommateurs obtiennent à la fois un avantage fonctionnel et un avantage nutritif (Swanson et Evenson, 2001).

### 10.3. Colorants

La plupart des colorants sont utilisés pour améliorer l'attractivité globale de l'aliment. Un certain nombre d'additifs naturels et synthétiques sont utilisés pour colorer les aliments. Les colorants sont inclus dans le système E comme E100-E180 et dans le SIN comme 100-182, il y a eu beaucoup de controverse concernant leur utilisation. Bien que les colorants synthétiques continuent à être largement utilisés, un intérêt significativement accru pour les colorants naturels a été constaté (Lee et Khng, 2001).

**Tableau 2. Colorants synthétiques autorisés à utiliser dans le monde** (Thorngate, 2001).

Nom commun	Numéro E	Les pays permettant
Rouge allura AC	E129	C, US
Bleu Brillant FCF	E133	C, EEC, <sup>b</sup> J, US
Erythrosine	E127	C, EEC, J, US
Le vert solide FCF	E143	US
Indigotine	E132	C, EEC, J, US
jaune Couché de soleil FCF	E110	EEC, US
Tartrazine	E102	C, EEC, <sup>c</sup> J, US
Amarante	E123	C, EEC <sup>e</sup>
Noir Brillant BN	E151	EEC <sup>ef</sup>
Le brun FK	E154	EEC <sup>d</sup>
Carmoisine	E122	EEC <sup>efg</sup>
Brun Chocolat HT	E155	EEC <sup>f</sup>
Le bleu patenté V	E131	EEC <sup>f</sup>
Ponceau 4R, Rouge cochenille A	E124	EEC, <sup>e</sup> J
Jaune de quinoléine	E104	EEC <sup>f</sup>
Rouge 2G, Azogéranine	E 128	EEC <sup>d</sup>
Jaune 2G	E107	EEC <sup>d</sup>
Vert S	E142	EEC <sup>efg</sup>

<sup>a</sup> :C-Canada, CEE-Communauté économique européenne, J-Japon, US-États-Unis, <sup>b</sup> autorisés uniquement au Danemark, en Irlande et aux Pays-Bas, <sup>c</sup> autorisé uniquement en Irlande et aux Pays-Bas, <sup>d</sup> autorisé uniquement en Irlande, <sup>e</sup> non autorisé en Finlande, <sup>f</sup> Non autorisée au Portugal, <sup>g</sup> Non autorisé en Suède.

#### 10.4. Aromatisants

Les agents aromatisants comprennent le plus grand nombre d'additifs utilisés dans les aliments. Il existe trois principaux types d'additifs aromatisants, les édulcorants, les arômes naturels et synthétiques, et les exhausteurs de saveur ;

- **Édulcorants** : les plus couramment utilisés sont le saccharose, le glucose, le fructose et le lactose, Le saccharose étant le plus populaire. Cependant, ces substances sont généralement classées comme des aliments plutôt que comme des additifs. Les additifs les plus couramment utilisés comme édulcorants sont les édulcorants à faible teneur en calories ou non caloriques tels que la saccharine et l'aspartame (Salminen et Hallikainen, 2001).

Il y a plus de 1700 substances naturelles et synthétiques utilisé pour aromatiser les aliments. Ces additifs sont, dans la plupart des cas, des mélanges de plusieurs produits chimiques et sont utilisés pour remplacer les arômes naturels (Larry Branen et Haggerty, 2001).

- **Les exhausteurs de saveur** (SIN 620-642 et E620-E640), un exhausteur de saveur est une substance qui est ajoutée à un aliment pour compléter ou améliorer son goût ou sa saveur originale. Les substances les plus couramment utilisées sont le L-glutamate monosodique, le 5'-inosinate disodique et le 5'-guanylate disodique. (Sugita, 2001).

#### 10.5. Texturisant

Sont utilisés pour ajouter ou modifier la texture générale des produits alimentaires, Les émulsifiants et les stabilisants sont les principaux additifs dans cette catégorie (Larry Branen et Haggerty, 2001);

- **Emulsifiants** (SIN 429–496) comprennent des substances naturelles telles que la lécithine (SIN 322) et des mono- et diglycérides ainsi que d'autres dérivés synthétiques. Le rôle principal de ces agents est de permettre la dispersion des arômes et des huiles dans le produit alimentaire.
- **Stabilisateurs** comprennent plusieurs gommes naturelles telles que le carraghénane et des amidons modifiés, ils ont été utilisés pendant plusieurs années pour fournir la texture désirée dans des produits tels que la crème glacée. Ils sont également utilisés pour empêcher l'évaporation et la détérioration des huiles aromatiques volatiles.

Il existe de nombreux autres produits chimiques utilisés dans les produits alimentaires à des fins spécifiques mais limitées, inclus les différents adjuvants de traitement tels que les agents chélatants, les enzymes et les agents antimousse, agents de finition de surface, Catalyseurs, et divers solvants, lubrifiants et propulseurs (Larry Branen et Haggerty, 2001).

### **11. Les bienfaits des additifs alimentaires**

Les avantages tirés de l'utilisation des additifs alimentaires se répartissent généralement en :

- Les avantages pour la santé qui réduisent certains risques pour la santé ou fournissent certains avantages comme l'amélioration de la nutrition ; Les nitrites qui ont des effets antibotulinaux et peuvent donc réduire le risque de botulisme dans les viandes traités, La salubrité nutritionnelle est augmentée par l'enrichissement et la fortification de certains aliments de base, tels que le pain, le lait et le sel, avec des vitamines et des minéraux elle pourrait être considérée comme un moyen de prévention des maladies de carence comme le scorbut, le béribéri ou le goitre (Sumner et Eifert, 2001).
- Fournir des avantages liés à l'abondance, la diversité et la disponibilité économique : La disponibilité des additifs a permis la production de nombreux aliments hors-saison et une variété de nouveaux produits alimentaires (Larry Branen et Haggerty, 2001).

### **12. Risques d'additifs alimentaires**

Bien qu'il soit admis que, grâce aux additifs, un plus grand choix et une plus grande variété d'aliments ont été rendus disponibles, il existe un certain nombre de préoccupations concernant les risques potentiels à court et à long terme de l'utilisation des additifs.

Les réactions d'hypersensibilité à certains additifs peuvent avoir un impact direct et sévère sur les personnes sensibles, même lorsque les produits chimiques sont utilisés à des niveaux légalement acceptables. Les gens qui sont sensibles aux additifs contenant du soufre, en particulier ceux qui souffrent d'asthme, sont à un plus grand risque de souffrir d'une réaction allergique à des niveaux élevés de sulfites (Larry Branen et Haggerty, 2001).

L'hyperactivité est définie comme un trouble complexe appelé trouble déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité associant trois symptômes majeurs dont l'intensité varie selon la personne: le déficit de l'attention ; l'hyperactivité motrice ; l'impulsivité. Certaines études ont lié certains additifs alimentaires à l'hyperactivité chez les enfants. Une étude britannique récente a révélé que les enfants sans antécédents d'un trouble hyperactif ont

montré des degrés divers de l'hyperactivité après avoir consommé des boissons aux fruits avec différents niveaux d'additifs, parmi ceux qui ont été étudiés sont: benzoate de sodium (E211), tartrazine (E102), jaune de quinoléine (E104), jaune Couché de soleil (E110), Carmosine (E122), rouge Allura (E129). Ces additifs interviendraient au niveau du système nerveux, provoquant une anomalie des récepteurs neuronaux, responsables de l'hyperactivité (McCann *et al.*, 2007).

Le cancer et les problèmes de reproduction sont des préoccupations majeures, bien qu'il n'existe aucune preuve directe liant la consommation d'additifs et leur occurrence chez l'homme, il existe cependant des études sur les animaux qui ont indiqué des problèmes potentiels avec certains additifs. Bien que la plupart de ces additifs aient été interdits, certains continuent d'être utilisés, le plus notable étant la saccharine (Larry Branen et Haggerty, 2001).

# **MATERIEL ET METHODES**

## **Matériel et Méthodes**

### **1. Isolement des bactéries lactiques**

#### **1.1. Origine des échantillons**

Les échantillons du pollen frais ont été collectés durant la période qui s'étale du mois d'avril au juin de l'année 2013. Les échantillons ont été prélevés dans quatre régions en Algérie ; Constantine, Guelma, Blida et Bordj Bou Arreridj. Le pollen frais a été récupéré par la technique de trappe à pollen, Les prélèvements ont été effectués aseptiquement dans des flacons stériles, transporté au laboratoire à une température de 4 °C et examinés dans un délai de 24 h.

#### **1.2. Isolement des bactéries lactiques**

Deux gramme de chaque échantillon de pollen sont ajoutés à 100 ml de bouillon MRS; Après agitation vigoureuse le mélange est mis à incuber pendant 72 heures à 30°C. Une série de dilution décimale est réalisée dans de l'eau physiologique stérile, 100µl de chaque dilution est étalé sur le milieu MRS agar précédemment stérilisé et coulé dans des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre. Les boîtesensemencées sont incubées à 30°C / 48h dans des conditions d'anaérobiose.

Les colonies isolées représentatives des bactéries lactiques sont sélectionnées et purifiées sur gélose MRS. Seulement les bactéries à Gram positif et catalase-négatives sont maintenues dans un bouillon MRS.

#### **1.3. Conservation des isolats**

Les souches pures des bactéries lactiques sontensemencées sur une gélose MRS inclinée incubées à 30°C, maintenues à 4°C pour une conservation de courte durée, un repiquage des souches est nécessaire chaque quatre semaine sur bouillon MRS.

Pour une conservation de longue durée les souches pures sont conservées dans un bouillon MRS contenant 20% (v/v) de glycérol et maintenues à -20°C.

## **1.4. Identification des bactéries lactiques**

### **1.4.1. Examen macroscopique**

Les colonies bien isolées obtenues sont observées sous la loupe binoculaire pour déterminer leurs caractéristiques culturelles.

### **1.4.2. Examen microscopique**

Chaque colonie est observée sous microscope optique (au grossissement x100) après une coloration de Gram pour déterminer le caractère Gram, la forme des cellules ainsi que leur mode de regroupement.

### **1.4.3. Recherche de la catalase**

Elle est mise en évidence en émulsionnant une colonie à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Guiraud, 2003).

### **1.4.4. Production de CO<sub>2</sub> à partir de glucose**

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires, il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO<sub>2</sub>). Le milieu MRS sans citrate et extrait de viande contenant des cloches de Durham inversées et remplis entièrement de bouillon est utilisé. Après l'inoculation avec une culture bactérienne jeune et incubation à 30°C pendant 48h, les tubes sont examinés (Müller, 1990). Les souches hétérofermentaires croissent et produisent le CO<sub>2</sub> qui s'accumule dans la cloche, contrairement aux homofermentaires qui croissent sans produire le CO<sub>2</sub>.

### **1.4.5. Températures de croissance**

Le bouillon MRS en tube est inoculé par une culture jeune de bactéries et incubé à 45, 10, et 15°C pendant 48 h et 7 jours respectivement. La croissance est appréciée par comparaison à un tube témoin du milieu non inoculé et incubé sous les mêmes conditions (Carr *et al.*, 2002).

### **1.4.6. Croissance à pH 9.6 et 4.4**

Le bouillon MRS en tubes ajusté à pH 9.6 par une solution de NaOH, et à 4.4 par une solution de HCl, est inoculé par une culture jeune des bactéries lactiques et incubé à 30°C pendant 72h (Carr *et al.*, 2002).

#### **1.4.7. Croissance en présence du NaCl**

Le bouillon MRS à 6,5% et 18% NaCl est inoculé par une culture jeune des bactéries. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 72h, la croissance est vérifiée par la formation de trouble et comparaison à un tube témoin non inoculé et incubé dans les mêmes conditions (Carr *et al.*, 2002).

#### **1.4.8. Hydrolyse de l'arginine**

Le test est mis en évidence sur le bouillon de Reddy. Des tubes contenant 5ml de milieu sont inoculés avec une culture jeune et incubés à 30°C pendant 5 jours. Les bactéries utilisant l'arginine libèrent l'ammoniac ce qui alcalinise le milieu et entraîne un changement de couleur vers le pourpre (Meyer *et al.*, 2004).

#### **1.4.9. Hydrolyse de l'esculine**

Le test est réalisé sur le milieu gélose à l'esculine, les souches sont ensemencées par touche à la surface de la gélose (Joffin et Leyral, 2006). Après incubation à 30°C pendant 24 à 48 h, un résultat positif se traduit par l'apparition d'un noircissement autour de la colonie.

#### **1.4.10. Identification biochimique**

L'utilisation des hydrates de carbone par les bactéries lactiques isolées a été étudiée sur microplaque selon la méthode de Parente *et al.* (1997). Les cellules d'une culture bactérienne jeune sont récupérées par centrifugation (3000g / 15min), lavées deux fois avec de l'eau physiologique stérile pour se débarrasser de toute trace de milieu de culture, le culot bactérien est remis en suspension dans de l'eau physiologique. 1ml d'une solution stérile (par filtration sur membrane 0,22µm) des sucres (Galactose, Fructose, Arabinose, Maltose, Xylose, Mannose, saccharose, Raffinose, Sorbitol, Ribose, glucose, Lactose et Mannitol) est ajouté à 9 ml MRS sans extrait de viande et additionné de 0,16 g/L pourpre de Bromocresol (BCP) à pH 7. Le mélange MRS-BCP+ sucre est distribué dans les puits de la microplaque (180µl), qui sont ensuite inoculés par la suspension bactérienne (2µl). Pour créer les conditions de l'anaérobiose, les puits sont recouverts par l'huile de paraffine. Les plaques sont incubées à 30°C pendant 48h.

La galerie biochimique API 50 CHL (BioMérieux, France) est un système standardisé associant 49 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone

des microorganismes. L'ensemencement de la galerie a été réalisée selon les instructions du fabricant, une première lecture est faite après 24 heures et la seconde après 48 heures.

## 2. Potentiel technologique

### 2.1. Pouvoir acidifiant

Des pré-cultures sont préparées par l'inoculation des souches lactiques (1%) dans des tubes contenant le lait écrémé (10 ml) et incubées à 30°C jusqu'à la coagulation du lait. le contenu du tube (lait coagulé) est transvasé stérilement dans 100 ml de lait écrémé stérile (Sahnouni, 2013). Après homogénéisation. Le mélange est réparti dans des tubes stériles à raison de 10 ml/tube, les cinétiques d'acidification sont réalisées simultanément aux intervalles de temps réguliers suivants : 0h, 2h, 4h, 6h, 8h et 24h. L'acidité est déterminée par ;

- Titrimétrie en mesurant la quantité d'acide lactique produite ,05 gouttes de phénolphthaléine (1% dans l'éthanol) sont ajoutées à l'échantillon du lait et le titrage se fait avec du NaOH (N /9) goutte à goutte et sous agitation magnétique jusqu'à la neutralisation de l'acide qui se traduit par l'apparition d'une couleur rose persistante (Figure 3). le volume de NaOH utilisé est noté. L'acidité est exprimée en degré Dornic ;  $1^{\circ}\text{D} = V_{\text{NaOH}} \times 10$  dont  $V_{\text{NaOH}}$  est le volume de la soude coulée pour neutraliser l'acidité.  $1^{\circ}\text{D} = 0,1 \text{ g/1}$  d'acide lactique.
- pH-métrie en mesurant le pH directement par pH-mètre, à chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique.

### 2.2. Activité protéolytique

Le test est réalisé sur gélose PCA et gélose MRS additionnées de lait écrémé stérile, à 1% et 2% lait, l'ensemencement se fait par touche. La protéolyse est révélée par la présence d'un halo claire autour des colonies (Gessass *et al.*, 2012).

### 2.3. Activité lipolytique

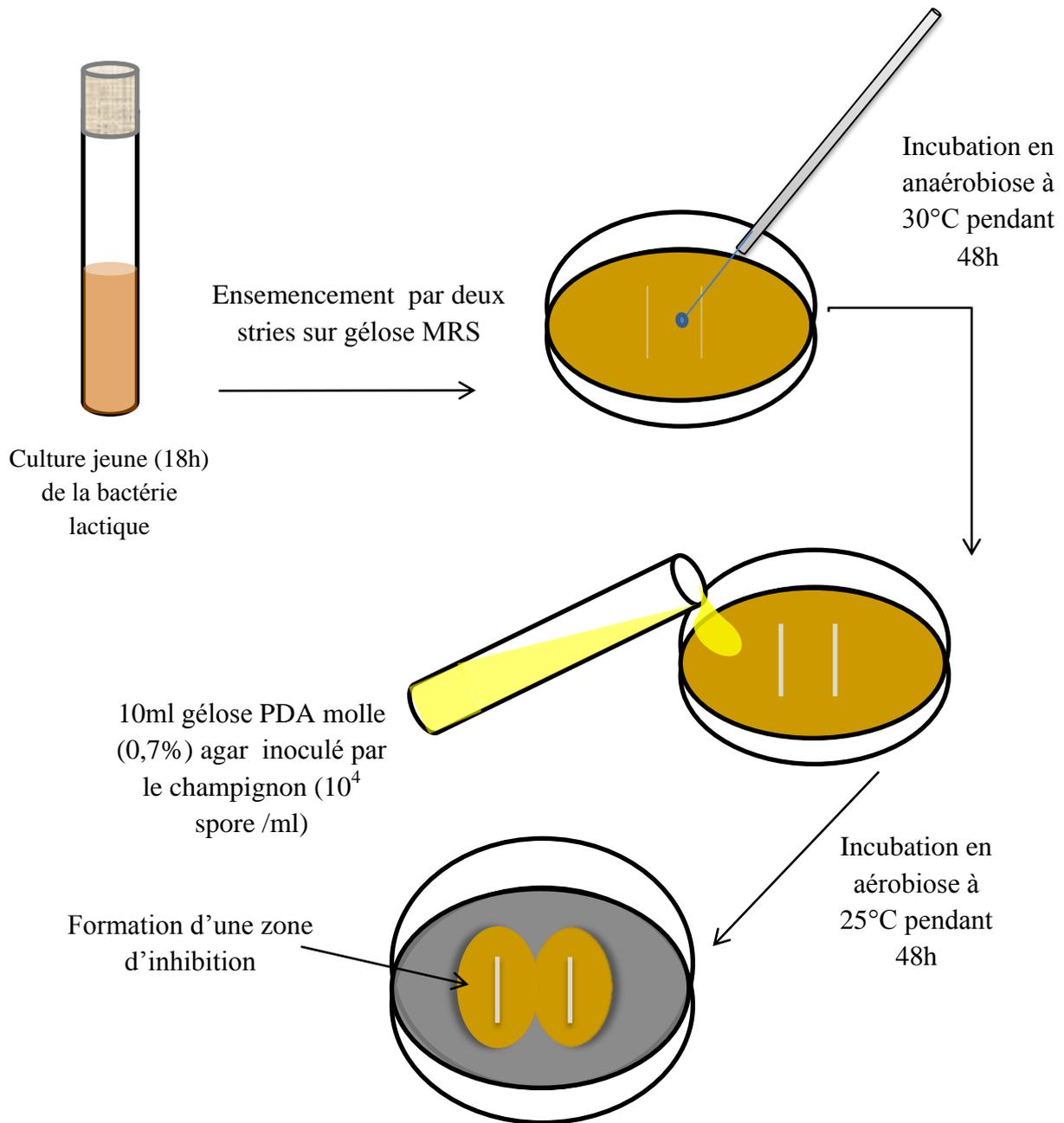
Cette activité a été recherchée sur un milieu gélose au tween 20 et tween 80 (Gessass *et al.*, 2012). Les souches sont ensemencées par touche à la surface de la boîte de Pétri, l'activité lipolytique est révélée par la présence d'un précipité blanc autour des colonies.

#### **2.4. Activité amylolytique**

L'activité amylolytique a été recherchée sur un milieu gélose à l'amidon selon la méthode de (Taheri *et al.*, 2009). Les souches sont ensemencées en strie, après une incubation de 24h à 30°C, la solution de Lugol est versée sur les plaques pour détecter les zones claires d'activité amylolytique.

#### **2.5. Activité antifongique**

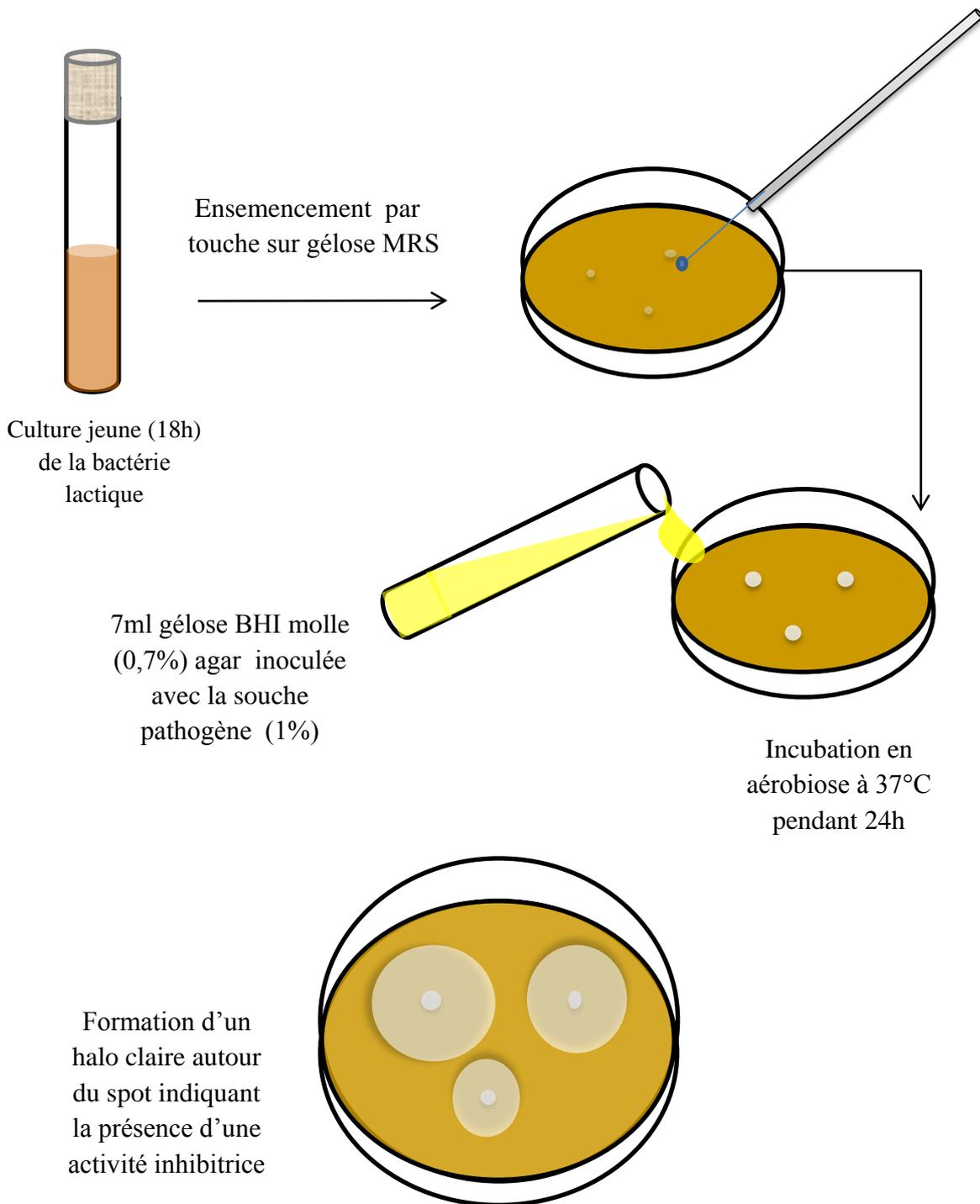
La méthode de double couche décrite par Magnusson et Schnürer, (2001) a été utilisée pour l'évaluation de l'activité antifongique des bactéries lactiques isolées. Chaque souche de bactérie lactique (culture de 18h) est ensemencée en deux stries de 2 cm à la surface sèche du milieu MRS, après une incubation à 30°C pendant 48h en anaérobiose (figure 4). Les boîtes sont ensuite recouvertes avec 10 ml PDA agar (0.8% agar) contenant  $10^4$  spore/ml du champignon *Aspergillus niger* 2CA936, *Aspergillus flavus* NRRL3357 (collection des souches du laboratoire de microbiologie appliquée). Après une incubation pendant 48 h à 25°C les zones d'inhibition sont évaluées autour de chaque strie.



**Figure 3.** Mise en évidence de l'activité antifongique (Magnusson et Schnürer, 2001).

## 2.6. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées contre six bactéries pathogènes ; *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Listeria innocua* CLIP 74915 (collection des souches du laboratoire de microbiologie appliquée), a été évaluée par la méthode des spots sur agar décrite par Fleming *et al.* (1975), qui consiste à cultiver deux souches bactériennes dans le même milieu en double couche (figure 5). Une culture jeune des bactéries lactiques est ensemencée en touche sur la surface sèche de la gélose MRS, après une incubation en anaérobiose à 30°C pendant 24 h, les plaques de gélose ensemencées sont recouvertes avec 7 ml de BHI en gélose molle (0,7% agar) inoculée avec 1% d'une culture jeune de bactéries pathogènes. Après 24 heures d'incubation à 37°C, l'apparition d'une zone claire autour des spots est considérée comme une inhibition positive.



**Figure 4.** Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des spots sur agar  
(Fleming *et al.*, 1975).

### 3. Potentiel probiotique

#### 3.1. Résistance au pH acide

La Résistance des souches lactiques aux conditions de pH bas a été évaluée selon la méthode décrite par Maragkoudakis *et al.* (2006) et Guo *et al.* (2010) avec quelques modifications. Les cellules d'une culture jeune de chaque souche sont recueillies par centrifugation (3000 g, 15 min). Les culots sont lavés deux fois avec une solution stérile du PBS (pH 7.2) et remises en suspension. 1 ml de chaque suspension est ajouté à 9 ml d'une solution de PBS stérile dont le pH est ajusté à 2.0 et 3.0 respectivement par du HCl (4N). Les suspensions sont agitées au vortex pendant 10s et ensuite incubées à 37°C pendant 3 h. La viabilité des bactéries est déterminée par des dilutions en cascade et dénombrement sur gélose MRS.

#### 3.2. La tolérance aux sels biliaires

La tolérance aux sels biliaires a été déterminée selon la méthode de Tulumoglu *et al.* (2013) et Argyri *et al.* (2013). Les cellules d'une culture bactérienne jeune sont collectées par centrifugation (3000g, 15 min). Le culot est lavé deux fois et remis en suspension dans une solution stérile de PBS (pH7.2). 1 ml de la suspension bactérienne est ajouté à 9ml PBS stérile additionné de 0.3% sels biliaires. Après incubation à 37°C pendant 4h, la viabilité des souches est déterminée par des dilutions en cascade et dénombrement sur gélose MRS.

#### 3.3. Hydrophobicité

L'hydrophobicité a été mesurée selon la méthode de Rosenberg *et al.* (1980). Les bactéries lactiques sont cultivées dans un bouillon MRS à 30°C en anaérobiose pendant 18 à 24 h, les cellules sont récupérées après centrifugation à 3000 g pendant 15 min, lavées deux fois et remises en suspension dans du tampon K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (50 mM, pH 6.5) . La densité optique de la suspension (A<sub>0</sub>) a été ajustée entre 0,8 et 1,0 à 560 nm. Un volume de 0,6 ml de toluène est ajouté à 3 ml de la suspension bactérienne. Le mélange est agité par vortex pendant 120 secondes. Les tubes sont laissés au repos à 37°C pendant 30 minutes pour séparer les deux phases. La phase aqueuse est soigneusement récupérée et la densité optique (A) est mesurée à 560 nm. Le pourcentage d'hydrophobicité est calculé selon l'équation suivante ;

$$H (\%) = [(A_0 - A)/A_0] \times 100.$$

### 3.4. Autoagrégation

L'autoagrégation a été réalisée selon la méthode de Xu *et al.* (2009) avec des modifications mineures. Les cellules d'une culture bactérienne fraîche sont récupérées par centrifugation à 4000 g pendant 10 min, le culot bactérien est lavé deux fois avec du tampon PBS et remis en suspension dans la même solution. La densité optique de la suspension est ajustée ( $A_{0h}$ ) =  $0,5 \pm 0,02$  à 600 nm. La suspension bactérienne (3 ml) est agitée par vortex pendant 10 s. Après incubation à 37°C pendant 2 h, la densité optique du surnageant est mesurée à 600 nm ( $A_{2h}$ ) et le pourcentage d'auto-agrégation est exprimé en ;

$$\% \text{Autoagrégation} = 1 - (A_{2h}/A_{0h}) \times 100.$$

### 3.5. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été évaluée selon la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur milieu gélosé, selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (2013).

Une suspension bactérienne est préparée à partir d'une culture jeune de 18-24h dans une solution d'eau physiologique stérile. Les disques d'antibiotique ; **chloramphénicol, streptomycine, Nitroxoline, Céfotaxime, Pénicilline G, Pristinamycine, Céfixime, Ciprofloxacine, Tobramycine, l'acide Nalidixique et colistine** (Tableau 3) sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur la surface du milieu MRSensemencé préalablement par la culture bactérienne par la méthode d'écouvillonnage.

Après incubation à 30°C pendant 24h les zones d'inhibition observées autour des disques sont mesurées et les résultats sont exprimés en sensible (S) ou résistante (R) selon les normes du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (2013).

### 3.6. Activité hémolytique

Des cultures fraîches sont étalées en stries sur gélose TSA additionnée de 5% sang humain, incubées pendant 48 h à 30°C. Les boîtes sont examinées pour des signes de  $\beta$ -hémolyse (zones claires autour des colonies),  $\alpha$ -hémolyse (zones de tons verts autour des colonies), ou  $\gamma$ -hémolyse (pas de zones autour des colonies).

**Tableau 3.** Liste des antibiotiques utilisés.

Antibiotique	Symbole	Charge du disque	Famille	Cible
Céfixime	CFM	5µg	Céphalosporine	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire
Céfotaxime	CTX	30µg		
Pénicilline G	P	10UI	Pénicillines	
streptomycine	S	10µg	Aminosides	inhibition de la synthèse des protéines
Tobramycine	TOB	10µg		
chloramphénicol	C	30 µg	Phénicoles	
Pristinamycine	RP	15 µg	Streptogramines	
Nitroxoline	NO	30µg	quinolones	inhibition de la synthèse de l'ADN
Ciprofloxacine	CIP	5µg	fluoroquinolones	
l'acide Nalidixique	NA	30µg		
colistine	CL	15µg	Polypeptide	La membrane

#### 4. Croissance et survie des probiotique en présence des additifs alimentaires

L'effet des édulcorants et des additifs alimentaires sur la croissance des probiotiques a été évalué par la méthode de croissance en milieu liquide décrite par Vinderola *et al.* (2002) et Georgieva *et al.* (2009). Des cultures jeunes (18h) des souches probiotiques sont inoculées (2%) dans des tubes à essai contenant le milieu MRS additionné des additifs alimentaires avec les concentrations appropriées mentionnées dans le tableau 4, Un tube contenant la culture microbienne sans additif est utilisé comme témoin. La croissance des souches est mesurée par spectrophotomètre (600 nm) après incubation à 30°C pendant 24 h en présence et absence des additifs. La viabilité des souches est exprimée en pourcentage de densité optique par rapport au témoin ;

$$\% \text{ Cellules viables} = (\text{D.O. échantillon} / \text{D.O. témoin}) \times 100$$

Les valeurs inférieures à 30% sont inacceptables, supérieures à 70% sont considérées satisfaisantes, les valeurs comprises entre les deux limites sont considérées comme faibles.

**Tableau 4.** Liste des additifs alimentaires

	additif	Origine	Concentrations			%
<b>Edulcorants</b>	aspartame	Unité de production de boissons gazeuses ANNOUNA (Guelma)	0.03	0.06	0.1	(p/v)
	acésulfame-K	Unité de production de boissons gazeuses ANNOUNA (Guelma)	0.018	0,035		(p/v)
<b>Sucre</b>	Saccharose	PROLABO	6	12		(p/v)
<b>Sel</b>	NaCl	SIGMA	1	2		(p/v)
<b>Arômes</b>	Fraise	CHR HANSEN	0.1	0.4		(v/v)
	pêche	CHR HANSEN	0.1	0.4		(v/v)
	vanille	CHR HANSEN	0.1	0.4		(v/v)

### 5. Effet de présence des additifs alimentaire sur l'hydrophobicité

Les souches probiotiques sont cultivées dans un bouillon MRS à 30°C additionné des additifs alimentaires avec les concentrations appropriées mentionnées dans le tableau 4 pendant 18 à 24 h, les cellules sont récupérées après centrifugation à 3000 g pendant 15 min, lavées deux fois et remises en suspension dans du tampon K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (50 mM, pH 6.5). La densité optique de la suspension (A<sub>0</sub>) est ajustée entre 0,8 et 1,0 à 560 nm. Un volume de 0,6 ml de toluène est additionné à 3 ml de la suspension bactérienne. Le mélange est agité par vortex pendant 120 secondes. Les tubes sont laissés au repos à 37°C pendant 30 minutes pour séparer les deux phases. La phase aqueuse est soigneusement récupérée et la densité optique (A) est mesurée à 560 nm. Le pourcentage d'hydrophobicité est calculé selon l'équation ;

$$H (\%) = [(A_0 - A)/A_0] \times 100.$$

### 6. Effet de présence des additifs alimentaires sur l'Autoagrégation

Les souches probiotiques sont cultivées dans un bouillon MRS additionné des additifs alimentaires avec les concentrations appropriées (tableau 4) à 30°C pendant 18 à 24 h. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 g pendant 10 min, le culot bactérien est lavé deux fois avec du tampon PBS et remis en suspension dans la même solution. La densité

optique de la suspension est ajustée ( $A_{0h}$ ) =  $0,5 \pm 0,02$  à 600 nm. La suspension bactérienne (3 ml) est agitée par vortex pendant 10 s. Après incubation à 37°C pendant 2 h, la densité optique du surnageant est mesurée à 600 nm ( $A_{2h}$ ) et le pourcentage d'auto-agrégation est exprimé en ;

$$\% \text{ Autoagrégation} = 1 - (A_{2h}/A_{0h}) \times 100.$$

### **7. Effet de présence des additifs alimentaires sur l'activité antibactérienne**

L'activité antibactérienne en présence des additifs alimentaires a été évaluée contre deux bactéries pathogènes ; *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922, par la méthode des spots sur agar décrite par Fleming *et al.* (1975). Une culture jeune des bactéries lactiques estensemencée en touche sur la surface sèche de la gélose MRS additionné des additifs alimentaires avec les concentrations appropriées mentionnées dans le tableau 4, après une incubation en anaérobiose à 30°C pendant 24 h. Les plaques de géloseensemencées sont recouvertes avec 7 ml de BHI en gélose molle (0,7% agar) inoculée avec 1% d'une culture jeune de la bactérie pathogène. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le diamètre de la zone claire autour des spots est mesuré.

### **8. Effet de présence des additifs alimentaires sur l'activité protéolytique**

L'évaluation de l'activité protéolytique a été réalisée sur la gélose PCA –lait écrémé (2%) additionné des additifs alimentaires avec les concentrations appropriées mentionnées dans le tableau 4, les souches probiotiques sontensemencées par touche sur la surface sèche de la gélose. La protéolyse est révélée par la présence d'un halo clair autour des colonies.

### **9. Effet de présence des additifs alimentaires sur l'acidification**

Des pré-cultures sont préparées par l'inoculation des souches lactiques (1%) dans des tubes contenant le lait écrémé (10 ml) et incubées à 30°C jusqu'à la coagulation du lait. Les souches (lait coagulé) sontensemencées dans 100 ml de lait écrémé stérile additionné des additifs alimentaires avec les concentrations appropriées mentionnées dans le tableau 4. Après homogénéisation. Les flacons sont incubées à 30°C pendant 24h, des prélèvements du lait sont réalisées simultanément aux intervalles de temps réguliers suivants : 0h, 2h, 4h, 6h, 8h et 24h. L'acidité est déterminée en mesurant le pH directement par pH-mètre.

Pour évaluer l'effet des additifs alimentaires sur l'autoagrégation, l'hydrophobicité et l'activité antibactérienne, les données sont analysés par le logiciel GraphPad Prism (5.00.288), le test ANOVA-2 ways a été utilisé avec le post-test de Bonferroni ( $P < 0,05$ ).

# **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## **1. Isolement des bactéries lactiques**

Cinquante souches de bactérie lactique ont été isolées à partir du pollen frais sur milieu MRS, seulement 37 souches ont été retenues et conservées.

### **1.1 Examen macroscopique et microscopique des cultures**

L'observation macroscopiques des cultures sur milieu solide sous la loupe binoculaire, nous a permis d'observer des colonies de taille variable de 0.5 mm à 2 mm, de forme arrondie à contour régulier et de couleur blanchâtre.

L'observation microscopique des isolats sous microscope optique et après coloration de Gram a révélé deux formes de cellules; la forme bâtonnet qui prédomine avec 89.18% qui varie entre bacille court et coccobacille, les cellules sont isolées ou en chaînettes. La forme cocci présente 10.81% de la totalité des souches, les cellules sont disposées en paires ou en chaînettes.

### **1.2. Identification biochimiques et physiologiques des isolats**

Tous les isolats se sont révélés être Gram positif et catalase négative ce qui est caractéristique des bactéries lactiques.

Le type fermentaire des bactéries lactiques isolées a été déterminé sur bouillon MRS sans citrate et extrait de viande, les résultats montrent que tous les isolats se développent sans production de gaz ce qui confirme leur caractère homofermentaire.

Les bactéries lactiques isolées ont été identifiées en se référant aux ouvrages " The prokaryotes " (Dworkin *et al.*, 2006), " The genera of lactic acid bacteria " (Holzapfel et Wood, 2012) et " Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy " (Holzapfel et Wood, 2014).

### 1.2.1. Caractéristiques des isolats rattachés au genre *Enterococcus*

Trois isolats (LB16, LB21, LB40) sont homofermentaires, ADH positif, se développent à 10°C bien que à 45°C. Capables de croître à 6.5% NaCl et non à un pH de 9.6, sous microscope ils se présentent en forme de cocci en paire, formant parfois des petites chainettes. Ces caractéristiques sont attribuées au genre *Enterococcus*. Ils sont pré-identifiés à l'espèce *Enterococcus faecalis* ; ils sont ADH positives, fermentent le mannitol mais pas l'arabinose, le raffinose, et le xylose. Le tableau (5) résume les caractéristiques des souches *Enterococcus faecalis*.

Les deux espèces classique bien connue *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sur lesquels la description du genre a été fondée, partagent un certain nombre de caractéristiques communes qui les distinguent des autres cocci à Gram positif et catalase négative, anaérobie facultative ; leurs capacité à croître, les deux à 10°C et 45°C, à 6,5% NaCl et à un pH de 9,6. Les autres espèces, ajoutées par la suite au genre, peuvent ne pas présenter une ou plusieurs de ces caractéristiques. (Holzapfel et Wood, 2012)

Les *Enterococcus* sont des bactéries ubiquistes associées à des habitats variés tels que le sol, plantes, l'ensilage, les eaux, le tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux (Giraffa, 2003). Elles ont des implications importantes dans l'industrie laitière, dont elles jouent un rôle important dans le développement des caractéristiques organoleptiques dans une variété de fromages. Les *Enterococcus* productrices de bactériocines sont utilisés en co-culture dans la fabrication des fromages pour minimiser le risque de contamination du lait et du fromage par les bactéries d'altération (*Listeria spp*, *Clostridium sp*) (Lauková, 2011).

Les entérocoques sont aussi des pathogènes opportunistes pour l'homme, sont considérés parmi les bactéries les plus impliquées dans les infections nosocomiales, telles que la bactériémie, l'endocardite et les infections des voies urinaires (Morandi *et al.*, 2006).

**Tableau 5.** Caractéristiques morphologiques, biochimiques, physiologiques et profil fermentaire des sucres *d'Enterococcus faecalis*

Caractéristiques morphologiques				Caractéristiques biochimiques et physiologiques								profil fermentaire des sucres												
isolat	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Gram	catalase	Type fermentaire	ADH	10°C	45°C	NaCl 6.5%	pH 4.4	pH 9.6	D-Galactose	D -Fructose	Arabinose	Maltose	Xylose	Mannose	saccharose	Raffinose	Sorbitol	Ribose	D-glucose	Lactose	Mannitol
LB16	Petite colonies, lisse, rondes, contour régulier	Cocci en paires	+	-	homo	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+
LB40		Cocci en Paires,	+	-	homo	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+
LB21		Cocci en paires	+	-	homo	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-

homo: homofermentaire, ADH: production de l'arginine dihydrolase,

### 1.2.2. Caractéristiques des isolats rattachés au genre *Pediococcus*

Une seule souche (LB32) cocci sphérique dont les cellules sont divisées dans deux directions perpendiculaires pour former des tétrades, homofermentaire, elle est ADH positive, capable de croître à 6.5% NaCl, à 10°C et à 45°C, ne se développe pas à pH 9.6, ni à 18% NaCl (ces caractéristiques distinguent le genre *Pediococcus* du genre *Tetragenococcus* (Dworkin, 2006). Cette souche est rattachée au genre *Pediococcus* (Holzapfel et Wood, 2012).

L'étude du profil fermentaire de la souche a montré qu'elle fermente le maltose, le mannose, le fructose, le galactose, et le ribose, ne fermente pas le xylose, le raffinose, le mannitol, et le sorbitol. Elle est pré-identifiée à l'espèce *Pediococcus pentosaceus*, le tableau (6) résume les caractéristiques de la souche.

Les *Pediocoques* partagent leurs habitats avec de nombreuses bactéries lactiques, elles peuvent être isolées des matières végétales, des boissons fermentées, de la viande, des produits laitiers, de l'homme et des animaux (Franz *et al.*, 2014). Wilderdyke *et al.* (2004) ont rapporté que les espèces *Pediococcus acidilactici*, *Ped. pentosaceus*, *Ped. parvulus*, *Ped. inopinatus* et *Pediococcus stilesii* font partie de la flore normal des plantes, des fruits et des végétaux.

*Pediococcus pentosaceus* joue un rôle primordial dans la fermentation de nombreux aliments, elle peut jouer un rôle dans la fermentation et la maturation des fromages, notamment dans les mélanges où l'arôme forte est nécessaire (Ogier *et al.*, 2002; Franz *et al.*, 2014).

**Tableau 6.** Caractéristiques morphologiques, biochimiques, physiologiques et profil fermentaire des sucres de *Pediococcus pentosaceus*

Caractéristiques morphologiques				Caractéristiques biochimiques et physiologiques								profil fermentaire des sucres													
isolat	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Gram	catalase	Type fermentaire	ADH	10°C	45°C	NaCl 6.5%	NaCl 18%	pH 4,4	pH 9,6	D-Galactose	D -Fructose	Arabinose	Maltose	Xylose	Mannose	saccharose	Raffinose	Sorbitol	Ribose	D-glucose	Lactose	Mannitol
LB32	Colonies large, lisses,	Cocci en paires formant des tétrades	+	-	homo	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-

Homo: homofermentaire, ADH : production de l'arginine dihydrolase

### 1.2.2. Caractéristiques des isolats rattachés au genre *Lactobacillus*

Les 33 bacilles lactiques sont homofermentaires, ADH négatif à l'exception de 3 souches, capables de croître à 6.5% NaCl et à pH 4.4. Toutes les souches peuvent se développer à 10°C, la majorité à 45°C. Ne peuvent pas croître à pH 9.6. Ces résultats, permettent de rattacher les isolats au genre *Lactobacillus*. Le tableau (6) regroupe les caractéristiques des souches *Lactobacillus*.

- vingt isolats n'hydrolysent pas l'arginine à l'exception de deux, hydrolyse l'esculine, se développent à 15°C, fermentent le ribose, le raffinose à l'exception d'un seul isolat, le mannitol, le mannose, le maltose et le saccharose. Ne fermentent pas le xylose et l'arabinose. Ils ont été pré-identifiés à *Lactobacillus plantarum*.
- Cinq isolats n'hydrolysent pas l'arginine, mais hydrolysent l'esculine, peuvent se développer à 15°C et non à 45°C. fermentent le mannitol, le ribose et le saccharose. ne fermentent pas le raffinose, le xylose et le sorbitol. Ces isolats ont été pré-identifiés à *Lactobacillus paraplantarum*.
- Sept isolats n'hydrolysent pas l'arginine, hydrolysent l'esculine, se développent à 15°C et à 45°C, fermentent le ribose, le saccharose, le galactose, le glucose, le fructose et le mannitol. Ces isolats ont été pré-identifiés à *Lactobacillus casei*.
- Un seul isolat hydrolyse l'arginine et l'esculine, croît à 15°C et non à 45°C, fermente le saccharose, le mannose et le galactose. Ne fermente pas le sorbitol, le xylose, l'arabinose et le ribose. Il a été pré-identifié à l'espèce *Lactobacillus farciminis*.

**Tableau 7.** Caractéristiques, biochimiques et physiologiques des isolats appartenant au genre *Lactobacillus*

isolat	T.F	ADH	ESC	15°C	45°C	NaCl 6.5%	pH 4.4	pH 9.6	Galactose	Fructose	Arabinose	Maltose	Xylose	Mannose	saccharose	Raffinose	Sorbitol	Ribose	glucose	Lactose	Mannitol	L'espèce
LB1	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LB2	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB3	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB4	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB5	-	-	+	+	±	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB6	-	-	+	+	±	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB7	-	-	+	+	±	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB8	-	-	+	+	±	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB9	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB10	-	-	+	+	±	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB11	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB12	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB14	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB15	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB17	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB18	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB19	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB20	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB22	-	+	+	+	±	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
LB24	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	
LB25	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>L.casei</i>
LB27	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	
LB29	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	
LB30	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	
LB36	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	

isolat	T.F	ADH	ESC	15°C	45°C	NaCl 6.5%	pH 4.4	pH 9.6	Galactose	Fructose	Arabinose	Maltose	Xylose	Mannose	saccharose	Raffinose	Sorbitol	Ribose	glucose	Lactose	Mannitol	L'espèce
LB35	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>L.plantarum</i>
LB46	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>L.casei</i>
LB38	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	
LB31	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>L.paraplantarum</i>
LB42	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	
LB43	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	
LB45	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	
LB37	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	

Dix isolats appartenant au genre *Lactobacillus* ont été sélectionnés selon les résultats de l'activité antimicrobienne pour être identifiés par API50 CHL, les résultats montrent que toutes les souches sont identifiées en tant que *Lactobacillus plantarum*. Le tableau (8) représente les résultats de profil fermentaires des souches sur API50 CHL.

Dans la littérature, peu d'informations sont disponibles sur les bactéries lactiques provenant des fleurs et du pollen. Stirling et Whittenburg (1963) ont suggéré que les bactéries lactiques ne font pas partie de la microflore normale de la plante, ils ont indiqué le rôle des insectes dans la propagation de ces microorganismes.

Vásquez et Olofsson (2009) ont étudié la présence des bactéries lactiques dans le pollen et le pain d'abeille, ils ont constaté que la flore lactique isolée du pollen et du pain d'abeille est semblable à celle de l'estomac des abeilles, les deux genres isolés sont *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Ils ont confirmé par cette étude le rôle important de ces bactéries dans la fermentation lactique du pain d'abeille répondant ainsi, à la question de comment les abeilles ont standardisé le processus de fermentation du pain d'abeille.

Belhadj *et al.* (2010) ont isolé à partir du pollen 90 souches de bactéries lactiques, appartenant aux genres *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*.

Dans une étude récente Belhadj *et al.* (2014) ont isolé 567 isolats de bactéries lactiques à partir des grains de pollen cru, parmi 216 souches actives contre les bactéries pathogènes, 54 isolats ont présenté une activité dans leurs surnageant neutre. 10 souches représentatives ont été identifiées par séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S, ils ont été attribuées à sept espèces *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus ingluviei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus acidipiscis* et *Weissella cibaria*.

Nilsson (1956) a constaté que les bactéries lactiques prédominantes pendant la fermentation de l'ensilage sont les streptocoques et les Lactobacilles, l'espèce la plus fréquemment identifiée était bien *Lactobacillus plantarum*.

**Tableau 8.** Profil fermentaire de dix souches de *Lactobacillus* (API 50CHL)

Tests \ Souche	LB8	LB11	LB12	LB15	LB27	LB5	LB18	LB35	LB45	LB22
Glycérol	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Méthyl-βd-Xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Méthyl-Ad-Mannopyranoside	+	+	±	+	+	+	+	-	-	-
Méthyl-Ad-Glucopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Acétylglucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdaline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculine	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Salicine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mélézitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Amidon (Starch)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	±	-	±	±	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Potassium Gluconate	±	+	-	+	+	-	±	-	-	-
Potassium 2-Céto gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
potassium 5-KetoGluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L. plantarum</i>									

## 2. Potentiel technologique

### 2.1. Pouvoir acidifiant

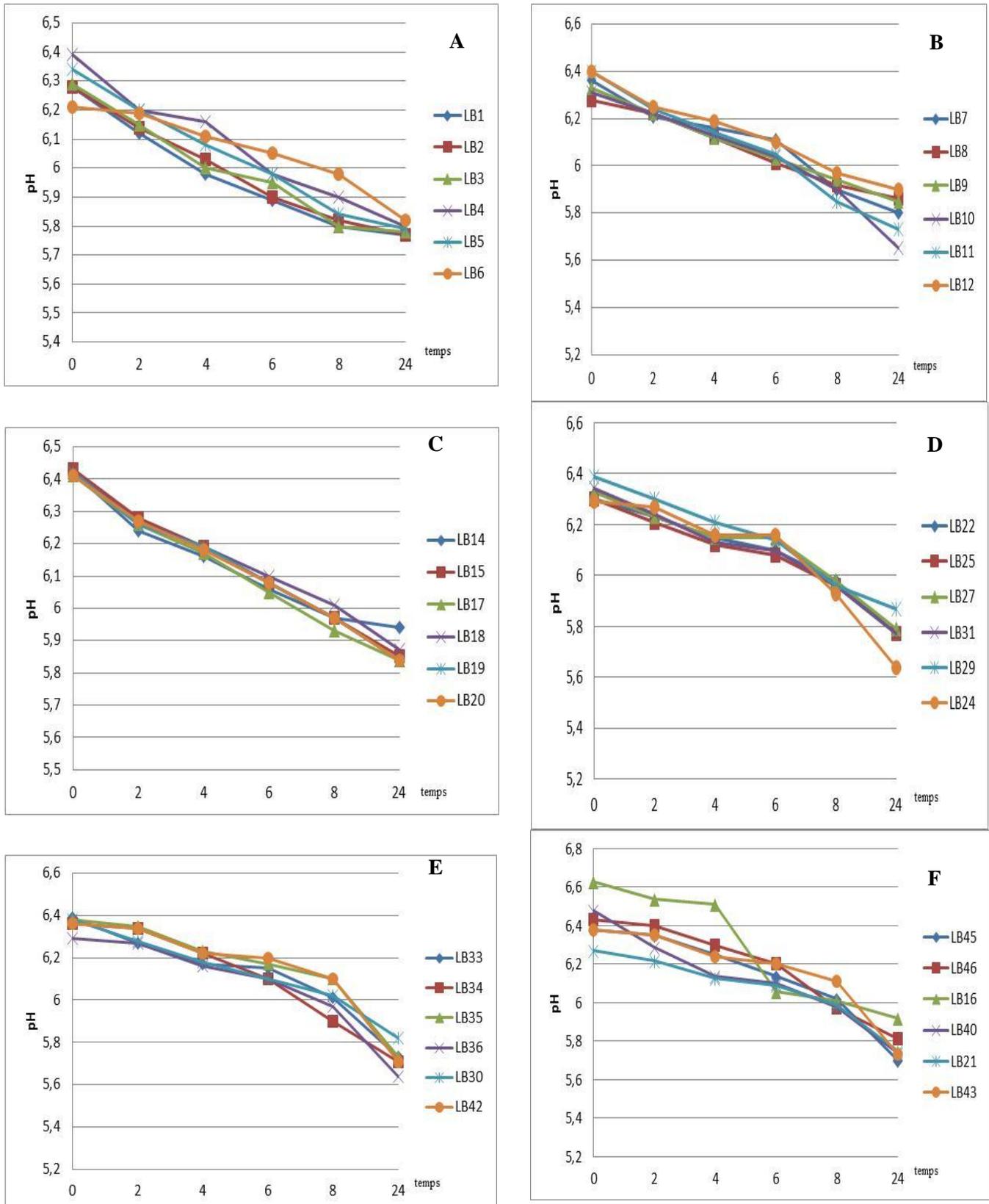
L'acide lactique est l'élément principal de tous les produits laitiers acidifiés, auxquels il donne leurs caractéristiques fondamentales (Djidel ,2007). Sa découverte en tant que «acide de lait» par Carl Wilhelm Scheele en 1780 et les travaux ultérieurs par Louis Pasteur, Joseph Lister, et Max Delbriick ont conduit à l'identification des bactéries lactiques comme les micro-organismes impliqués dans la fermentation de l'acide lactique (Litchfield, 1996). Il occupe une position privilégiée en raison de ses multiples applications dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, textile et chimique (John *et al.*, 2007). Le pouvoir acidifiant des bactéries lactiques est un critère principal lors de la sélection des souches à intérêt pour l'industrie agroalimentaire.

L'activité acidifiante de trente-six souches de bactéries lactiques a été évaluée ; par pH-métrie en mesurant le pH (figure 5), et par titrimétrie en mesurant la quantité d'acide lactique produite exprimée en degré DORNIC (D°) en fonction du temps (figure 6). Nous avons exclu La souche *Pediococcus pentosaceus* qui n'a pas coagulé le lait écrémé stérile après 24h d'incubation.

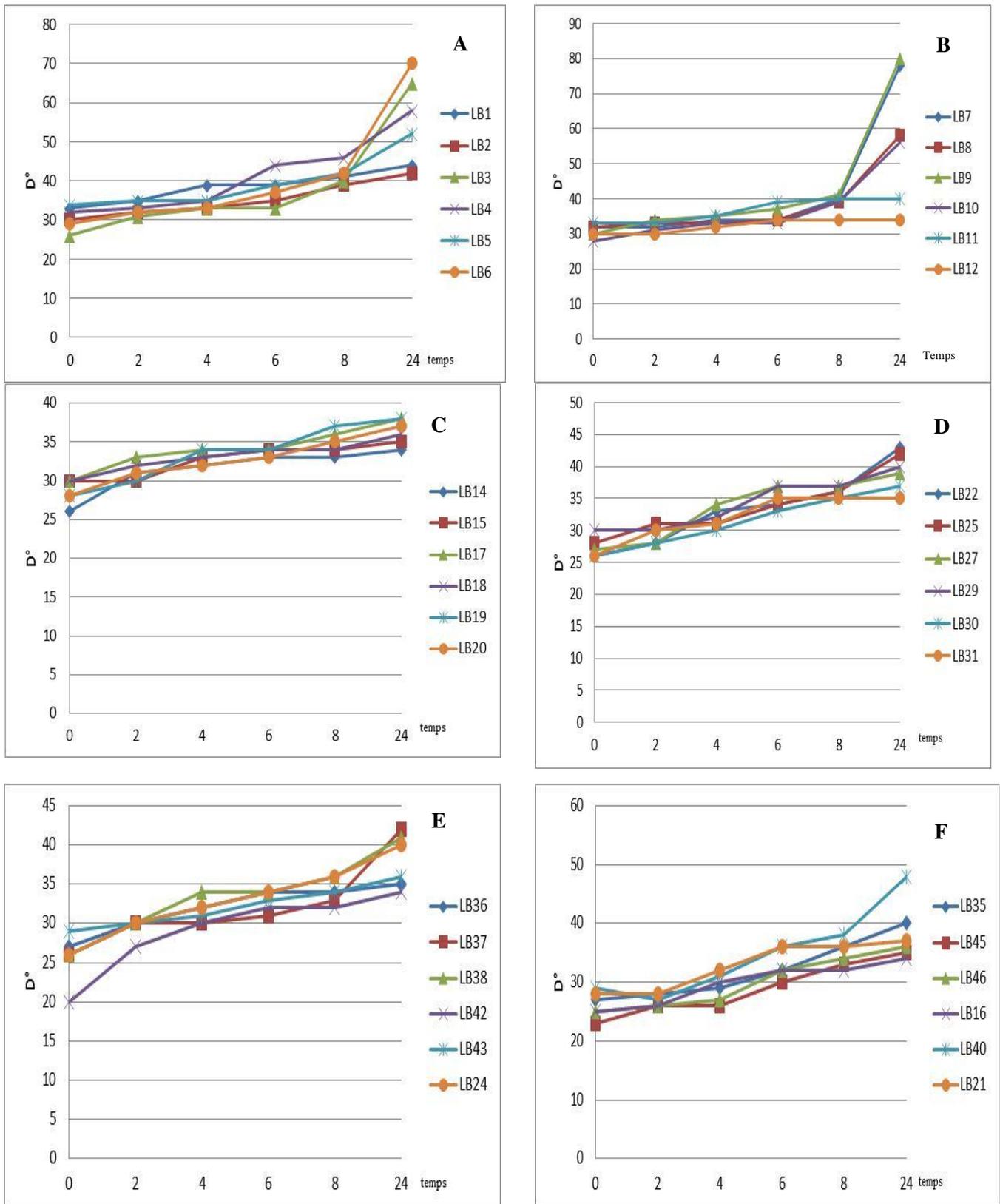
Les résultats montrent qu'au cours de 24h d'incubation dans le lait écrémé à 30°C, la totalité des souches ont produit progressivement de l'acide lactique. Cette production a été accompagnée par l'abaissement de pH du milieu.

Pour les lactobacilles, après 24h la quantité maximale produite d'acide lactique a atteint une valeur de 80, 78,70 D° par les souches LB9, LB8, LB6 respectivement. Tandis que la quantité la plus faible 34 D° a été enregistrée par les souches LB14 et LB12. La valeur maximale d'acide lactique produite par Les entérocoques a été de l'ordre de 48 D° par LB40, alors que la plus faible a été 34D° par LB 16.

Les résultats du suivi de pH ont montrés une diminution progressive jusqu'à atteindre après 24h une valeur minimale de 5.64 et 6.65 par LB36, LB24 et LB10 respectivement pour les lactobacilles et pour les entérocoques la valeur minimale du pH atteinte est 5.74 par la souche LB40.



**Figure 5.** Variation du pH en fonction du temps des souches lactiques ; A : *Lactobacillus* LB1, LB2, LB3, LB4, LB5, LB6. B : *Lactobacillus* LB7, LB8, LB9, LB10, LB11, LB12. C : *Lactobacillus* LB14, LB15, LB17, LB18, LB19, LB20. D : *Lactobacillus* LB22, LB25, LB27, LB29, LB24, LB31. E : *Lactobacillus*, LB30, LB33, LB34, LB35, LB36, LB42. F : *Lactobacillus*, LB43, LB45, LB46 et d' *Enterococcus* LB16, LB40, LB21.



**Figure 6.** Cinétique d'acidification des souches lactiques ; A : *Lactobacillus* LB1, LB2, LB3, LB4, LB5, LB6. B : *Lactobacillus* LB7, LB8, LB9, LB10, LB11, LB12. C : *Lactobacillus* LB14, LB15, LB17, LB18, LB19, LB20. D : *Lactobacillus* LB22, LB25, LB27, LB29, LB30, LB31. E : *Lactobacillus* LB36, LB37, LB38, LB42, LB43, LB24. F : *Lactobacillus* LB35, LB45, LB46 et d'*Enterococcus* LB16, LB40, LB21.

Les résultats obtenus de l'acidité produite après 24h d'incubation, nous ont permis de classer les souches de *Lactobacillus* en 3 groupes:

Groupe 1 : représenté par une seule souche LB9 (3,03%) qui est classé tant que souche fortement acidifiante dont l'acidité  $>79^{\circ}\text{D}$

Groupe 2 : comprend 11 souches (33,33%) elles sont considérées moyennement acidifiantes dont leur acidité se situe entre  $40^{\circ}\text{D} < \text{acidité} < 79^{\circ}\text{D}$ .

Groupe 3 : contient 21 souches (63,63%) elles sont faiblement acidifiantes car leur acidité est  $\leq 40^{\circ}\text{D}$

Les souches d'*Enterococcus* sont considérées comme faiblement acidifiantes (acidité est  $\leq 40^{\circ}\text{D}$ ) à l'exception de la souche LB40 qui est moyennement acidifiante.

La diminution rapide du pH durant les étapes initiales de la préparation du fromage est d'une importance cruciale, car elle est essentielle pour la coagulation et la prévention ou la réduction de la croissance de la microflore indésirable. Tandis que, la dégradation de la caséine joue un rôle important dans le développement de la texture du fromage (Sarantinopoulos *et al.*, 2001). La totalité des souches montrent une vitesse d'acidification lente  $\Delta \text{pH} < 1$  après six heures d'incubation dans le lait écrémé. La capacité d'acidification de la totalité des souches des bactéries lactiques s'est révélée généralement faible. Car, aucune souche n'a montré la capacité d'abaisser le pH au-delà de pH 5 après 24 heures d'incubation dans le lait écrémé.

Dans cet esprit, les bactéries lactiques isolées du pollen semblent avoir peu d'importance en tant que culture starter pour l'industrie des produits laitiers. Mais leur utilisation en tant que culture mixte est possible.

Les résultats obtenus pour les *Enterococcus* rejoignent ceux de Ayad *et al.* (2004) et Franciosi *et al.* (2009). Sarantinopoulos *et al.* (2001) ont trouvé qu'un total de 129 souches d'*Enterococcus faecium*, *E. faecalis* et *E. durans* de différentes origines ont montré une faible capacité d'acidification du lait.

Kandler et Weiss, (1986) ont signalé que les lactobacilles hétérofermentaire facultatifs présentent un profil d'acidification lent. Cela peut expliquer en fait la faible capacité d'acidification observé pour nos souches.

## 2.2. Activité protéolytique

L'activité protéolytique des isolats a été recherchée sur deux milieux; le milieu MRS à 1% et 2% lait écrémé, et sur le milieu PCA à 1% et 2% lait écrémé. L'activité protéolytique positive se traduit par l'apparition d'une zone claire qui entoure les colonies de la souche testée ensemencée en touche (figure 7).

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches testées ont présentés une activité protéolytique positive sur les deux milieux MRS et PCA et avec les deux concentrations du lait écrémé. Nos résultats sont en concordance avec plusieurs études (Boulares *et al.*, 2012; Essid *et al.*, 2009; Ben moussa *et al.*, 2008).

Le système protéolytique des bactéries lactiques comprend trois composants principaux; des protéases liées à la paroi cellulaire qui initient la dégradation de la caséine en oligopeptides, des transporteurs de peptides et des peptidases intracellulaires qui hydrolysent les peptides en acides aminés (Liu *et al.*, 2010).

La protéolyse des bactéries lactiques joue un rôle important dans la génération des peptides, et des acides aminés nécessaires à leur croissance et à la production des métabolites qui contribuent à la formation de saveur dans les produits fermentés (Liu *et al.*, 2010). Cependant, il est important de prendre en compte que les souches hautement protéolytiques ne sont pas toujours plus adaptées à une utilisation en tant que ferments lactiques. Car, une protéolyse excessive peut provoquer une production incontrôlée de peptides amers et d'autres composés indésirables (Nieto-arribas *et al.*, 2009; Buffa *et al.*, 2005).

## 2.3. Activité lipolytique

L'activité lipolytique des isolats lactiques a été recherchée sur le milieu gélose au tween 20 et au tween 80. La lipolyse se manifeste par la formation d'une zone de précipitation visible autour de la colonie résultant de la formation de cristaux du sel de calcium de l'acide gras libéré (Janda, 2005).

Les résultats obtenus ont montré que l'activité lipolytique n'a été détectée que seulement chez 13,51% des isolas, représenté par *Pediococcus pentosaceus* (LB32), *Enterococcus faecalis* (LB16, LB40, LB21), Parmi les *Lactobacillus* seulement *Lactobacillus casei* (LB38) a été lipolytique (figure 8).

Il est généralement admis que l'activité lipolytique des microorganismes est importante au cours de la maturation du fromage, elle contribue au développement de la saveur (De Apodaca *et al.*, 1993). Les estérases ont été associées au développement de la saveur et la texture du fromage grâce à la lipolyse de la graisse du lait et la conversion des acides gras libres produits en méthylcétones et thioesters, qui ont des implications en tant que composés d'arôme de fromage (Giraffa, 2003).

L'activité lipolytique faible présentée par les souches pourrait être en fait un avantage pour leur utilisation en tant starters en industrie laitier. Car, une dégradation très limitée de la matière grasse est suffisante pour induire la production d'arôme, sans provoquer le rancissement du produit final (Herrero *et al.*, 1996).

L'activité lipolytique des entérocoques a été signalée précédemment (Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Giraffa, 2003; Morandi *et al.*, 2006), *E. faecalis* étant l'espèce la plus lipolytique, suivi de *E. faecium* et *E. durans*. Les *Enterococcus* sont reconnues pour leur rôle dans le développement des caractéristiques organoleptiques pendant la maturation de nombreux fromages (Giraffa, 2003). Montel *et al.*, (1998) ont rapporté que les espèces du genre *Lactobacillus* sont faiblement lipolytique.

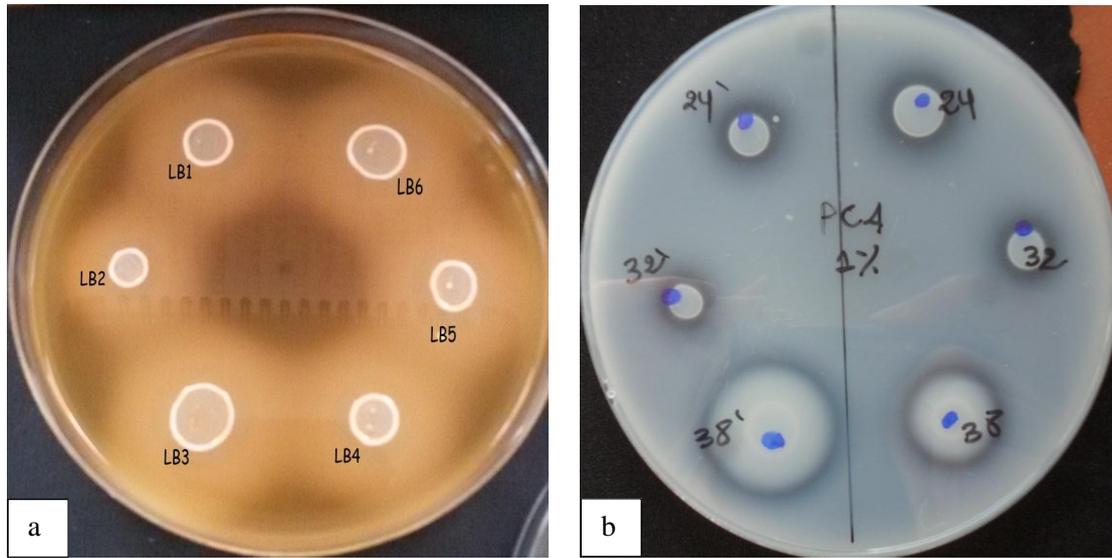
#### **2.4. Activité amylolytique**

Aucune souche n'a présenté une activité amylolytique. Giraud *et al.*, (1994) a rapporté que la synthèse de l'amylase est une caractéristique rare des bactéries lactiques. L'absence de l'activité amylolytique peut être expliquée par l'absence de l'inducteur approprié dans le milieu de culture. Car, les activités enzymatiques sont généralement inductible (Herrero *et al.*, 1996).

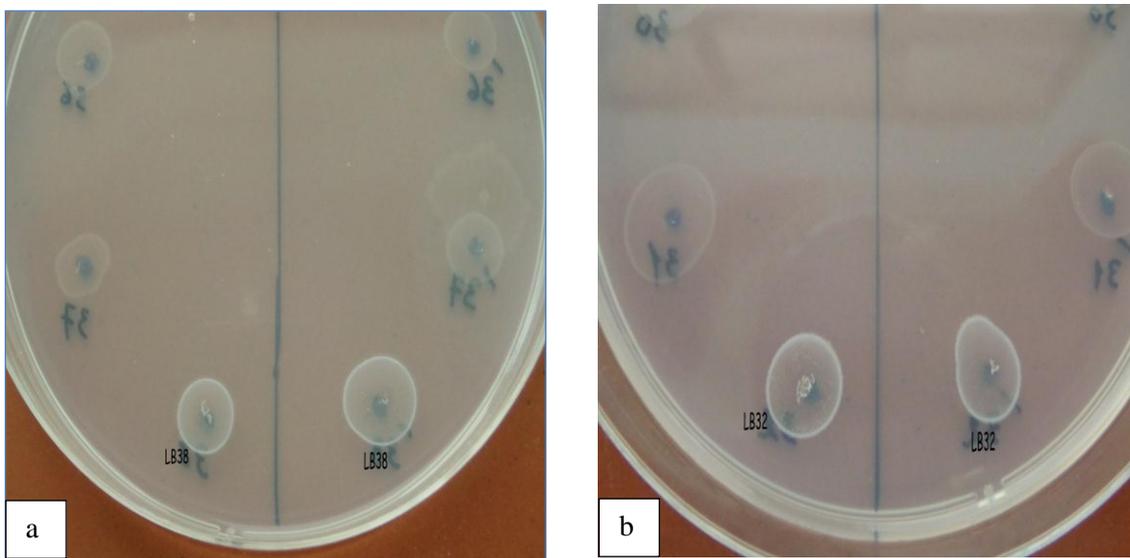
Le tableau (9) résume les résultats obtenu pour l'activité protéolytique, lipolytique et amylolytique.

**Tableau 9.** Activités protéolytique, lipolytique et amylolytique des souches lactiques.

souche	Activité Protéolytique				Activité Lipolytique		Activité amylolytique
	MRS 1%	MRS 2%	PCA 1%	PCA 2%	Tween 20	Tween 80	
LB32	+	+	+	+	+	+	-
LB16	+	+	+	+	+	-	-
LB40	+	+	+	+	+	+	-
LB21	+	+	+	+	+	+	-
LB1	+	+	+	+	-	-	-
LB2	+	+	+	+	-	-	-
LB3	+	+	+	+	-	-	-
LB4	+	+	+	+	-	-	-
LB5	+	+	+	+	-	-	-
LB6	+	+	+	+	-	-	-
LB7	+	+	+	+	-	-	-
LB8	+	+	+	+	-	-	-
LB9	+	+	+	+	-	-	-
LB10	+	+	+	+	-	-	-
LB11	+	+	+	+	-	-	-
LB12	+	+	+	+	-	-	-
LB14	+	+	+	+	-	-	-
LB15	+	+	+	+	-	-	-
LB17	+	+	+	+	-	-	-
LB18	+	+	+	+	-	-	-
LB19	+	+	+	+	-	-	-
LB20	+	+	+	+	-	-	-
LB22	+	+	+	+	-	-	-
LB24	+	+	+	+	-	-	-
LB25	+	+	+	+	-	-	-
LB27	+	+	+	+	-	-	-
LB29	+	+	+	+	-	-	-
LB30	+	+	+	+	-	-	-
LB36	+	+	+	+	-	-	-
LB35	+	+	+	+	-	-	-
LB46	+	+	+	+	-	-	-
LB38	+	+	+	+	-	+	-
LB31	+	+	+	+	-	-	-
LB42	+	+	+	+	-	-	-
LB43	+	+	+	+	-	-	-
LB45	+	+	+	+	-	-	-
LB37	+	+	+	+	-	-	-



**Figure 7.** Activité protéolytiques sur MRS lait écrémé (a), PCA lait écrémé (b)



**Figure 8.** Activité lipolytique sur gélose au tween 80 (a), gélose au tween 20 (b)

## 2.5. Activité antifongique

L'altération fongique des aliments et des aliments destinés aux animaux est un phénomène mondial commun qui, en plus de ses conséquences financières négatives, pose un problème de santé grave.

*Aspergillus niger* est connu comme contaminant des pâtes, des aliments transformés, des aliments conservés et des produits de boulangerie en particulier dans les pays tropicaux. Ce champignon peut se développer même à basse température et à un pH de 2.5, il est l'un des champignons les plus résistants (Pitt et Hocking, 1999; Muhialdin *et al.*, 2011).

*Aspergillus flavus* est la principale espèce productrice d'aflatoxines B qui est l'un des plus puissants cancérigènes génotoxiques naturels. Il est responsable de la contamination des céréales, des graines oléagineuses, et des fruits à coques (comme les arachides et les pistaches), des épices de toutes sortes, des fruits secs, du café, des fèves de cacao et des produits laitiers (Anses, 2012).

Un grand nombre de conservateurs chimiques qui ciblent la croissance des champignons dans les aliments ont été approuvés et utilisés depuis de nombreuses années, les consommateurs cherchent et exigent des produits sans conservateurs chimiques et qui maintiennent une bonne durée de vie (Muhialdin *et al.*, 2011). Les bactéries lactiques ont été utilisées pendant des siècles pour leur fermentation et leurs propriétés de conservation, à travers la production des composés antimicrobiens.

L'activité antifongique de 37 bactéries lactiques envers *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* a été recherchée par la méthode de double couche. Les résultats obtenus ont montré que 35,13% ont présenté une activité contre les deux champignons. Divers degré d'inhibition ont été notés (figures 9, 10), 91,89% ont été actives contre *Aspergillus flavus*. Tandis que, l'activité antifongique contre *Aspergillus niger* n'a été décelée que chez 40,54%. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau (10).

Six souches de *Lactobacillus plantarum* (LB14, LB15, LB10, LB8, LB7 et LB4) ont présenté une forte inhibition contre les deux champignons testés.

Deux souches d'*Enterococcus faecalis* ont inhibé *A. flavus*, aucune n'a pu inhiber la croissance d'*A. niger*. *Pediococcus pentosaceus* a faiblement inhibé *A. flavus*.

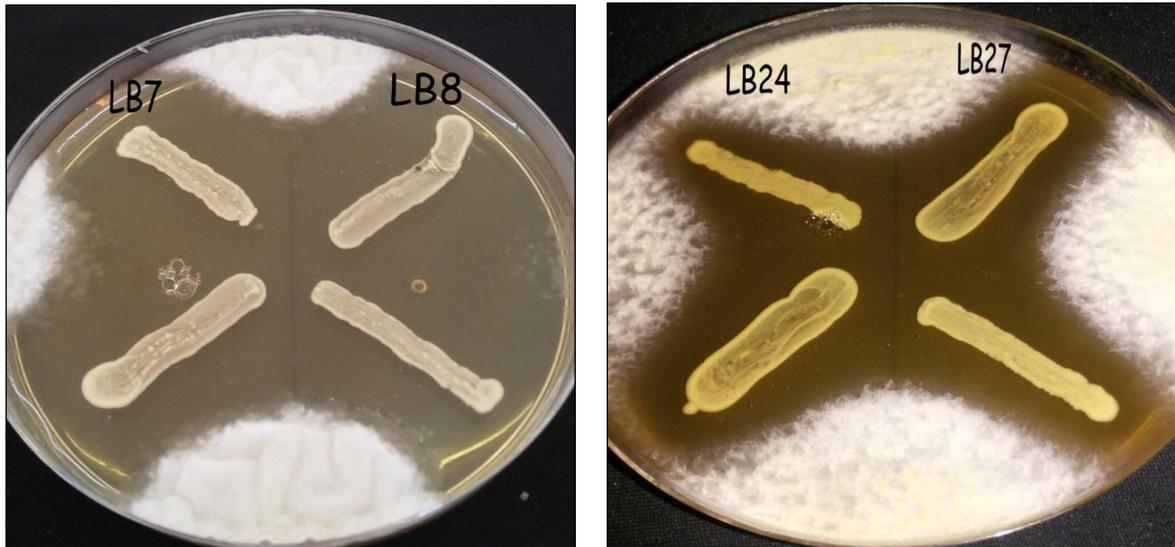
Les bactéries lactiques produisent un large éventail de composés qui pourraient agir de manière synergique envers les levures et les champignons filamenteux (Magnusson *et al.*, 2003). Cabo *et al.* (2002) ont suggéré que l'activité antifongique des bactéries lactiques est due à un effet synergique entre l'acide lactique produit par les bactéries et l'acide acétique issu du milieu de culture MRS. De nombreuses études ont montré que les bactéries lactiques produisent des composés antifongiques qui sont différents des acides organiques, ces composés sont difficiles à isoler et à caractériser à cause de leurs faibles concentrations, leurs composition chimique, étant des molécules actives en synergie avec une faible activité individuelle, ou d'autres raisons inconnues (Nes *et al.*, 2011). La majorité des substances antifongiques purifiées ont été des composés de faible poids moléculaire comme ; l'acide phénylacétique, des dipeptides cycliques et des acides gras à chaîne courte ou moyenne (Schnürer et Magnusson, 2005).

Niku-Paavola *et al.* (1999) ont rapporté la production de composés antimicrobiens à faible poids moléculaire autres que les acides organiques par *Lactobacillus plantarum*. La fraction active contenant, l'acide benzoïque, méthylhydantoïne, mévalonolactone et cyclo- (glycyl-L-leucyl) agissant en synergie avec l'acide lactique, elle était active à la fois contre *Fusarium avenacum* et la bactérie Gram négative *Pantoea agglomerans*.

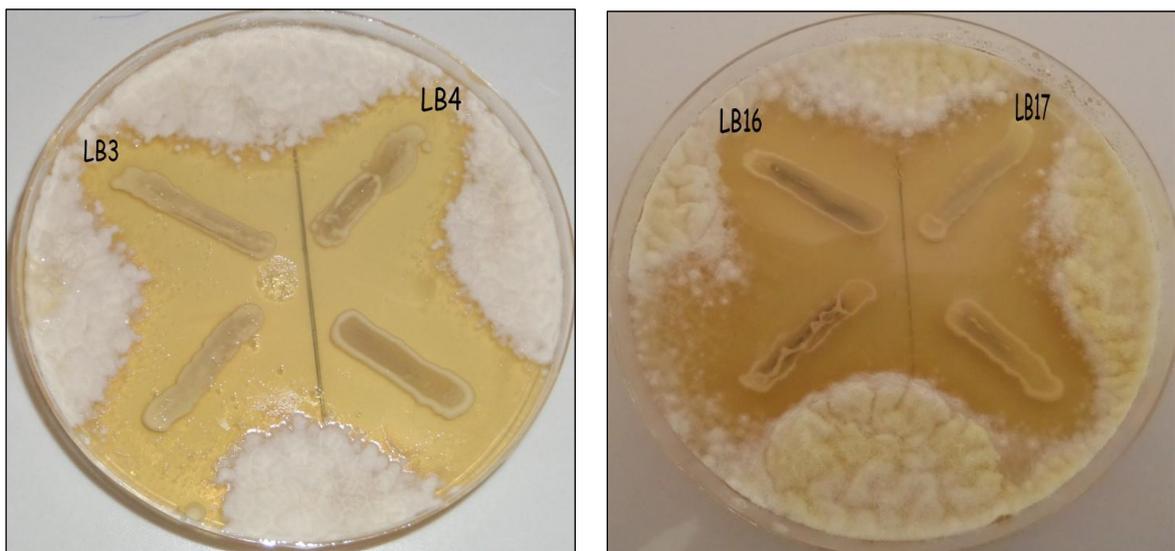
L'activité antifongique de *Lactobacillus plantarum* isolées à partir de matières végétales a été rapportée par d'autres auteurs (Magnusson *et al.* 2003; Sathe *et al.*, 2007; Yang et Chang, 2008; Laref et Guessas, 2013). Lavermicocca *et al.* (2000) a constaté que le filtrat 10 fois concentré d'une culture de *Lactobacillus plantarum* 21B isolée à partir de levain, cultivée sur un milieu à base d'hydrolysate de farine de blé, a montré une activité antifongique efficace contre *Penicillium corylophilum*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Fusarium graminearum*. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Sahnouni, 2013), qui a signalé que l'activité inhibitrice des bactéries lactiques contre *A.niger* est faible.

**Tableau 10.** Activité antifongique des souches lactiques

Les souches	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
LB32	+	-
LB16	+++	-
LB40	+	-
LB21	-	-
LB1	++	+++
LB2	++	+++
LB3	+++	-
LB4	+++	+++
LB5	+	-
LB6	+++	-
LB7	+++	+++
LB8	+++	+++
LB9	++	-
LB10	+++	+++
LB11	++	-
LB12	++	++
LB14	+++	+++
LB15	+++	+++
LB17	+++	+
LB18	++	-
LB19	+++	+
LB20	+	-
LB22	+	-
LB24	-	++
LB25	+	-
LB27	+	++
LB29	++	-
LB30	+	+++
LB36	+	-
LB35	++	-
LB46	+	-
LB38	+	-
LB31	+	-
LB42	++	+++
LB43	+	-
LB45	+	-
LB37	-	-



**Figure. 9** Activité antifongique des souches lactiques LB7, LB8, LB24, et LB27 contre *Aspergillus niger*



**Figure. 10** Activité antifongique des souches lactiques LB3, LB4, LB16 et LB17 contre *Aspergillus flavus*

## 2.6. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées du pollen a été étudiée par antagonisme direct suivant la méthode décrite par Fleming *et al.* (1975). Seulement les souches du genre *Lactobacillus* ont été testées pour leur action contre les bactéries pathogènes suivantes : *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Listeria innocua* CLIP 74915.

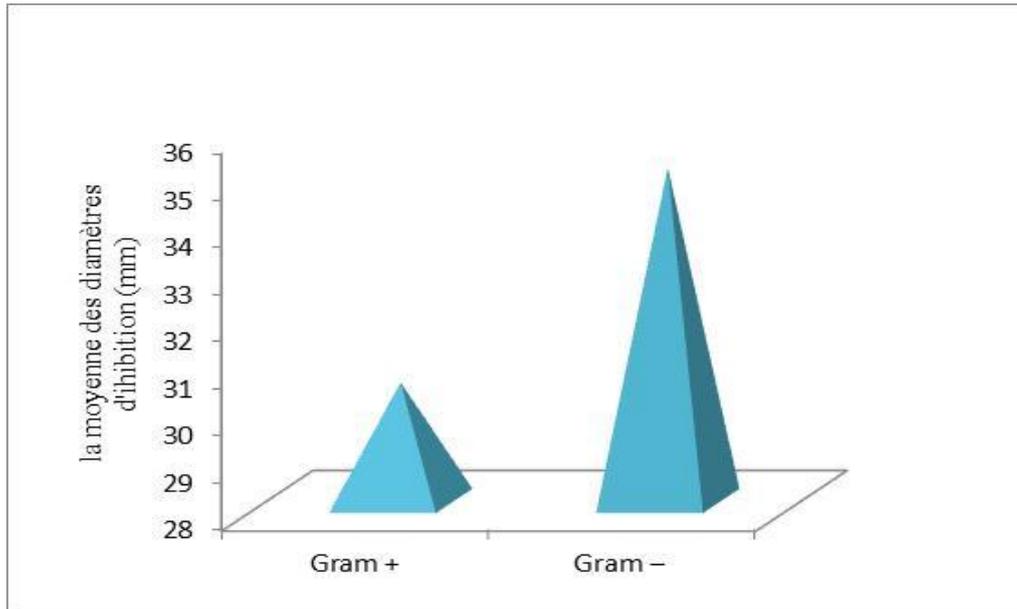
Les résultats obtenus (tableau 11), ont montré que toutes les souches ont été efficaces contre les bactéries pathogènes Gram-positives et Gram-négatives testées (figure 13). Les diamètres des zones d'inhibition varient entre les souches, une zone d'inhibition maximale était de 48 mm observée contre *Salmonella typhimurium* par la souche LB42. Un diamètre minimum égal à 15,5 mm a été obtenu par la souche LB43 *Lactobacillus paraplantarum* contre *Listeria innocua*.

Les résultats de l'effet inhibiteur sont illustrés dans la figure (12), Les lactobacilles ont présenté un effet inhibiteur meilleur contre *Staphylococcus aureus* (38,30mm) suivis par *Salmonella typhimurium* (36,75mm) et *Citrobacter freundii* (36,22mm). Un effet similaire a été enregistré contre *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* (33,74 mm), (32,39mm) respectivement. L'effet le plus faible a été obtenu contre *Listeria innocua* (19,5mm).

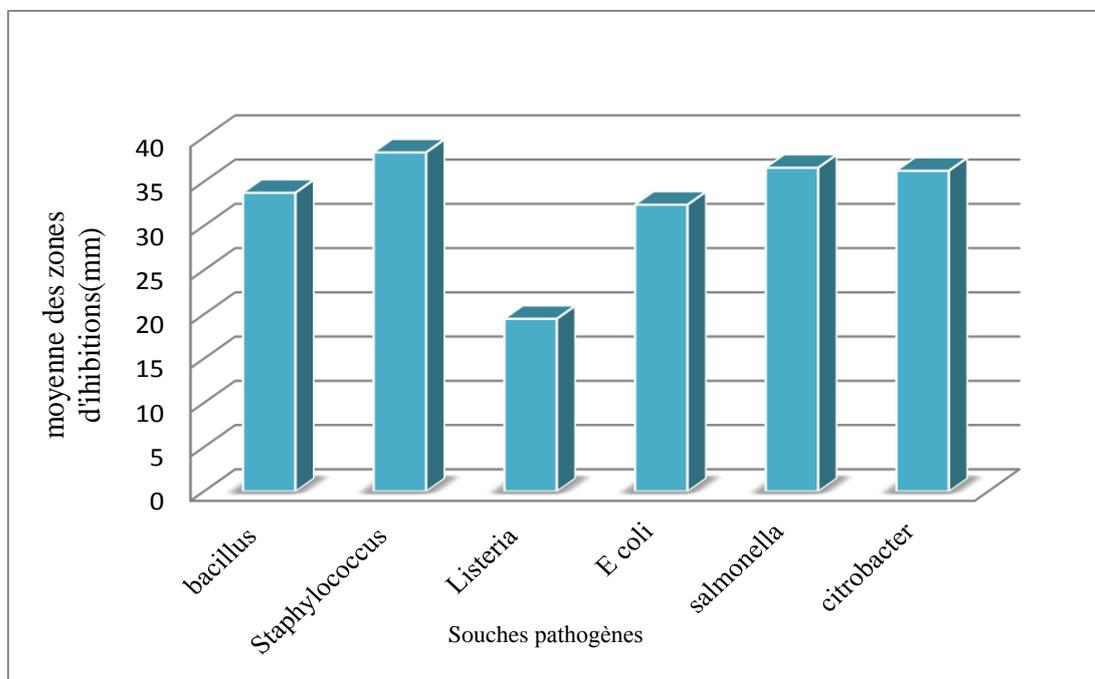
Parmi les bactéries indicatrices testées, *Staphylococcus aureus* a été la plus sensible envers l'action inhibitrice des souches de *Lactobacillus* les diamètres d'inhibition varient de 30,5 à 43,5mm. *Salmonella typhimurium* et *Citrobacter freundii* ont présenté une sensibilité similaire dont les diamètres d'inhibitions varient de 27 à 48mm et de 29,5 à 40mm respectivement. *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* avaient le même niveau de sensibilité leurs diamètres d'inhibition allant de 28,5 à 41mm et de 24,5 à 36,5 mm respectivement.

**Tableau 11.** Activité antibactérienne des *Lactobacillus* contre les bactéries pathogènes.

espèces	code	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
		<i>B.cereus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>L.innocua</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.typhimurium</i>	<i>C.freundii</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LB1	30,5	38	21,5	34	34	31,5
	LB2	31,5	33	23	32	41	35,5
	LB3	34,5	38	17	35,5	37	31
	LB4	29	41	17	34	36,5	34,5
	LB5	40	42	22	31	37	39,5
	LB6	41	40	19	31	36	37,5
	LB7	31	30,5	18,5	28	32	39
	LB8	34,5	40	21	30	41	39
	LB9	33,5	38,5	18,5	31	39	37,5
	LB10	29	38	19,5	34	40	39,5
	LB11	41	39	21,5	30	40,5	37
	LB12	37	40	22	32,5	35,5	34
	LB14	36	41,5	19,5	36	41	37
	LB15	38	41,5	19,5	35	39	40
	LB17	30	38,5	18,5	28	36	29,5
	LB18	35	41	24,5	32,5	38	33
	LB19	30,5	36,5	18	33	38,5	33,5
	LB20	28,5	39,5	19,5	36,5	39,5	31
	LB22	36,5	40	19,5	33,5	34	36
	LB35	30,5	31	17	32,5	30,5	39
LB45	35	41	22	34,5	36	40	
<i>L.farciminis</i>	LB24	31,5	34	18	29,5	42	39,5
<i>L.casei</i>	LB25	31,5	38	20	35,5	37,5	39
	LB27	36	39,5	18,5	34	41	40
	LB29	30,5	38	23	36,5	40	32,5
	LB46	29,5	38,5	17,5	24,5	35	40
	LB38	35,5	31	19	25,5	31	34
	LB30	35,5	36	17	35	33	34,5
	LB36	35	43,5	23	33	33	40
<i>L.paraplantarum</i>	LB31	32	41	20	34	33	33,5
	LB42	34,5	40	16,5	32	48	31
	LB43	35	36	15,5	31	30,5	39,5
	LB37	34,5	40	17	34	27	37,5



**Figure 11.** Activité inhibitrice des *Lactobacillus* contre les bactéries pathogènes (Gram +) et (Gram -).



**Figure 12.** Activité antibactérienne des souches de *Lactobacillus* contre les bactéries pathogènes

Divers facteurs peuvent être impliqués dans l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques, parmi ces facteurs la concurrence pour les nutriments, la diminution du pH suite à la production d'acides organiques notamment l'acide lactique et acétique, en plus de la production de divers composés tels que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui est connu comme l'agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques particulièrement celle des lactobacilles, le diacétyle (2,3-butanedione) qui est plus actif quand le pH du milieu est inférieur à 7 (Salminen *et al.*, 2004), des substances avec une action bactéricide ou bactériostatique y compris les bactériocines et les bactériocine-like. (Ammor *et al.*, 2006; tulumoglou, 2013).

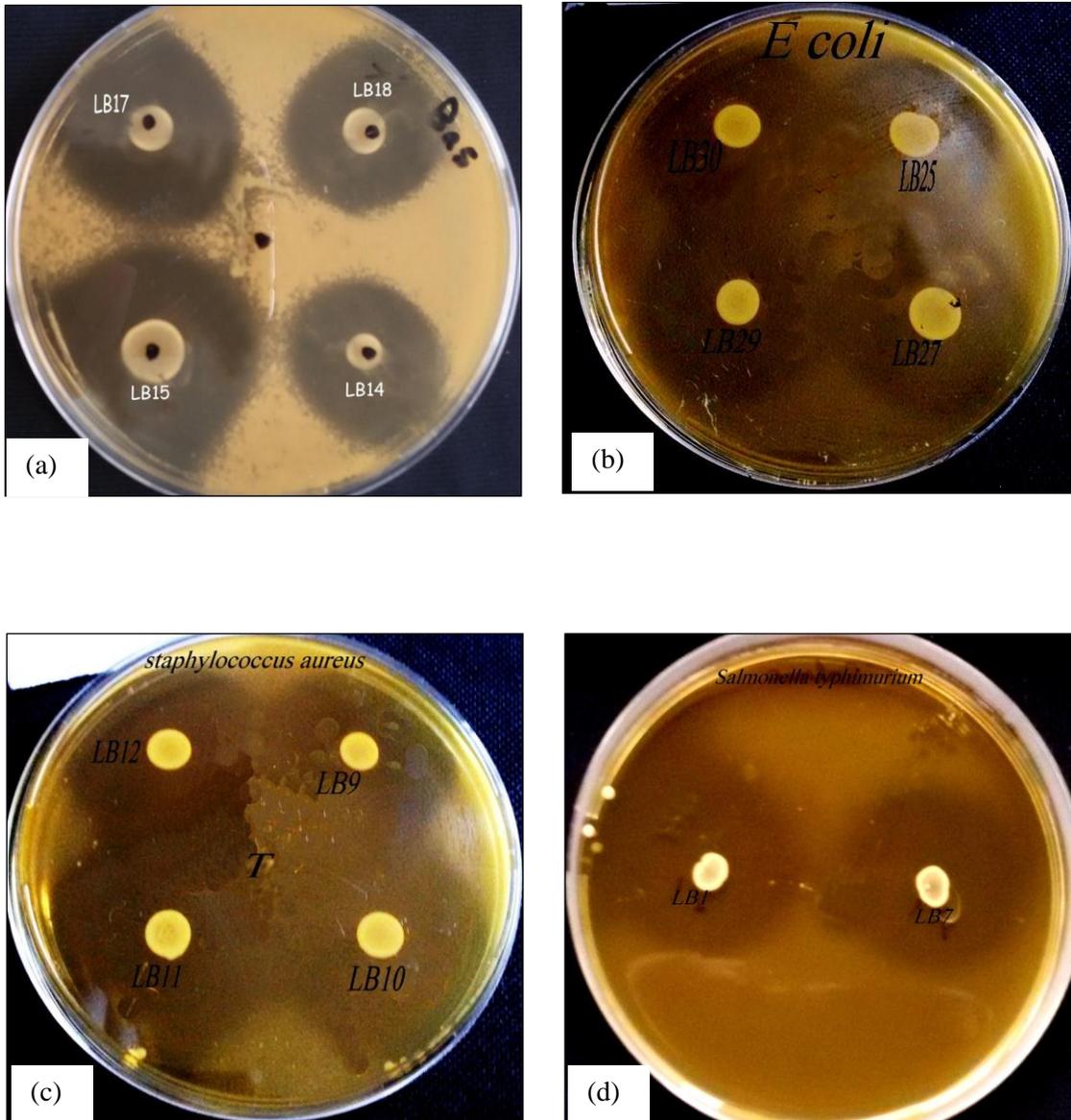
Il est accepté que les lactobacilles ont une activité inhibitrice contre de multiple microorganismes entéropathogènes (Drago *et al.*, 1997). Belhadj *et al.* (2014) ont constaté que les bactéries à Gram négatif *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Shigella sp* ont été très sensibles à l'action des surnageants cellulaires de *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* et *Pediococcus pentosaceus* isolées du Pollen. Trias *et al.* (2010) ont rapporté une bonne activité inhibitrice des bactéries lactiques provenant des fruits et légumes contre les bactéries pathogènes et d'altération, tels que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*. Ren *et al.* (2014) ont trouvé que les cultures jeunes de dix souches de lactobacillus isolées des aliments fermentés et des intestins humain ont fortement inhibées *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Klebsiella pneumoniae*.

Il est bien connu dans la littérature que l'inhibition des bactéries lactiques est meilleure pour les bactéries à Gram négatif que pour les Gram positif, ceci est dû à la composition de la membrane externe des bactéries à Gram positif qui contiennent beaucoup de peptidoglycanes qui protègent la membrane cytoplasmique de l'action des agents antimicrobiens (Ammor *et al.*, 2006; Ben moussa *et al.*, 2008). Dans notre cas, l'activité inhibitrice des *Lactobacillus* était plus importante envers les bactéries à Gram négatif (figure 12), Nous suggérons que cela peut être associé à l'action de diacétyle, qui est produit par les lactobacilles et qui est plus actif contre les bactéries Gram négatif, ce composé réagit avec les protéines fixatrices de l'arginine des bactéries Gram négatif limitant ainsi l'utilisation de cet acide aminé (Salminen *et al.*, 2004).

Nous avons trouvé que *listeria innocua* a été moins sensible à l'action antimicrobienne des *Lactobacillus*. Çon *et al.* (2001) ont rapporté que *L. plantarum* 77 et 116 isolées de sucuk

(saucisse sèche épicée), présentait une activité inhibitrice faible à moyenne contre *Listeria spp.* par antagonisme direct. Il a été signalé précédemment que *Listeria monocytogenes* est plus sensible à certains composés antibactériens des bactéries lactiques comparant à *Listeria innocua* (Mataragas *et al.*, 2003).

Les souches de *Lactobacillus* isolées du pollen ont présenté un large spectre d'inhibition contre les bactéries pathogènes, on peut attribuer l'effet inhibiteur à n'importe quel facteur antimicrobien produit par les souches ; la diminution du pH suite à la production des acides organiques, le diacétyl, une bactériocine ou à une synergie entre ces facteurs. Sachant que l'incubation des bactéries lactiques dans des conditions d'anaérobiose minimise la production de peroxyde d'hydrogène.



**Figure 13.** Activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes ; (a) *Bacillus cereus*, (b) *E. coli*, (c) *Staphylococcus aureus*, (d) *Salmonella typhimurium*.

### 3. Potentiel probiotique

Dix souches de *Lactobacillus* identifiées en tant que *Lactobacillus plantarum* présentant les meilleurs diamètres de l'activité antibactérienne vis à vis les six bactéries pathogènes, ont été sélectionnées afin d'étudier leur potentiel probiotique.

Pour survivre le passage à travers le tractus gastro-intestinal et exercer leurs activités physiologiques, les probiotiques doivent être capables de résister aux conditions acide de l'estomac et aux sels biliaires dans le duodénum (Ren *et al.*, 2014).

#### 3.1. Résistance à faible pH

La résistance à l'acidité de l'estomac constitue l'un des principaux critères de sélection des souches probiotiques. L'acidité de l'estomac humain varie de pH 1 à 4,5, la digestion des aliments peut prendre jusqu'à 3h (Lin *et al.*, 2006; Maragkoudakis *et al.*, 2006). L'étude de la survie des souches par des tests *in vitro* simulant les conditions du tractus gastro-intestinal, pourrait donner une prédiction sur la survie effective de la souche *in vivo* lorsqu'elle est consommée de façon non protégée (Zhang *et al.*, 2011). Le pH du suc gastrique est souvent maintenu à 3, un pH 2 pendant 3 h est souvent utilisé comme une condition extrême de simuler les conditions dans l'estomac (Guo *et al.*, 2010).

Dix souches de *Lactobacillus plantarum* ont été étudiées pour leur résistance aux conditions acides à pH 2 et pH 3. Les résultats obtenus (tableau 12) ont montré que ; à pH 2 la viabilité de toutes les souches a été affectée, après une exposition de 3h seulement cinq souches pourraient résister avec des réductions dans leur nombre (ufc /ml) LB 8, LB 11, LB 12, LB 15 et LB 27. Alors que, les cinq autres souches n'ont pas survécu du tout. Le taux de survie le plus élevé 6.30 ufc log / ml (70,86%) a été observé pour la souche LB8. Toutes les souches de *Lactobacillus plantarum* examinés ont été résistantes à pH 3 après 3 heures d'exposition. ces résultats sont en accord avec des études précédentes (Guo *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2014).

Maragkoudakis *et al.* (2006) ont étudiés le potentiel probiotique de 29 souches de *Lactobacillus* isolées des produits laitiers, la résistance de ces bactéries à un pH entre 1 et 3 a révélé que toutes les souches sont résistantes à pH 3 pendant 3h, et la plupart ont perdu leur viabilité à 1 h dans un pH 1.

Wang *et al.* (2010) ont déclaré la survie de 11 souches de *Lactobacillus* isolées des selles de nourrissons et de la choucroute Taiwanaise à pH 3, seulement 7 isolats ont survécu à pH 2.

A pH 2 la plupart des souches ont résisté avec des diminutions dans leur viabilité, ce résultat a été rapporté dans plusieurs études antérieures (Tsai *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2010; Tulomoglou *et al.*, 2013).

Nous avons testé la capacité de survie des souches de *Lactobacillus plantarum* en conditions acides, les souches ont été mises en culture dans une solution du tampon PBS dont le pH (2 et 3) a été ajusté avec du HCl. Conway *et al.* (1987) ont signalé que le suc gastrique peut conférer une certaine protection aux souches comparant avec le tampon à pH faible. Cependant, Les souches probiotiques peuvent être protégées par incorporation dans des matrices alimentaires, ou par encapsulation afin d'éviter leur exposition aux pH extrêmes dans l'estomac (Prasad *et al.*, 1998).

La capacité des bactéries lactiques de survivre à un pH bas est souche spécifique, ce résultat a été suggéré par plusieurs études (Mishra et Prasad, 2005; Guo *et al.*, 2010). La tolérance des bactéries à l'acidité est également une condition préalable à leur utilisation en co-culture. Elle permet aux souches de survivre pendant de longues périodes dans les aliments très acides, tels que le yaourt, sans une réduction importante dans leur nombre (Minelli *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010).

**Tableau 12.** Viabilité (log ufc / ml) et taux de survie des souches de *Lactobacillus plantarum* à pH faible et en présence de 0,3% bile.

souche	(log ufc/mL) initial	pH 2.0 (log ufc/mL)	taux de survie <sup>a</sup>	pH 3.0 (log ufc/mL)	taux de survie <sup>a</sup>	0.3% bile (log ufc/mL)	taux de survie <sup>a</sup>
LB5	8,76	0	0%	8.46	96.57%	8.04	91.78%
LB8	8,89	6.30	70.86%	8.08	90.89%	7.62	85.71%
LB11	8.52	4.69	55.04%	8.18	96%	7.84	92.01%
LB12	8.65	4.52	52.25%	8.34	96.41%	8.32	96.18%
LB15	8.81	5.06	57.43%	8.54	96.93%	7.22	81.95%
LB18	9.32	0	0%	9.26	99.35%	8.29	88.94%
LB22	9.26	0	0%	9.17	99.02%	7.81	84.34%
LB27	9.27	4.95	53.33%	9.17	98.92%	8.07	87.05%
LB35	9.26	0	0%	8.98	96.97%	8.52	92%
LB45	9.49	0	0%	9.26	97.57%	8.06	84.93%

a: taux de survie = (ufc/mL) finale/ (ufc/mL) initiale x 100

### 3.2. Résistance aux sels biliaires

La résistance à la bile est l'une des caractéristiques recherchées lors de la sélection des bactéries probiotiques pour que le plus grand nombre possible de bactéries traversent le duodénum en direction de leur site d'action, tout en restant viables et capables de se multiplier (Izquierdo, 2009).

Les concentrations physiologiques appropriées de la bile humaine sont comprises entre 0,3% et 0,5% (Dunne *et al.*, 1999). Une concentration de 0,3% est souvent considérée comme critique pour la sélection des souches résistantes (Guo *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus (tableau 12), ont montré que la concentration de 0,3% de sels biliaires n'a pas une grande influence sur la totalité des souches. LB12 était plus tolérante (96.18%), suivie par LB11 (92.01%), LB35 (92%) et LB5 (91.78%).

Les souches de *Lactobacillus plantarum* examinées présentaient une bonne survie dans l'environnement simulant les conditions du duodénum à une concentration de 0.3%. L'effet de la bile sur la viabilité des lactobacilles a été étudié par plusieurs auteurs (Maragkoudakis *et al.*, 2006). La plupart des études ont montré que la majorité des souches ont survécu bien dans ces conditions.

Ren *et al.* (2014) ont révélé que les souches de *Lactobacillus* étudiées pour leur potentiel probiotique ont présentait une excellente tolérance à la bile à des concentrations de 0,3% et 0,5%, ils ont même présenté une résistance à 1% de sels biliaires, cette concentration qui est d'environ trois fois la concentration de la bile dans l'intestin humain.

Guo *et al.* (2010) ont constaté qu'une concentration de 0.3% sels biliaire n'a présenté aucun effet sur la totalité des bactéries lactiques obtenu à partir des excréments d'animaux, et la plupart d'entre eux ont même développé en présence de 1% bile.

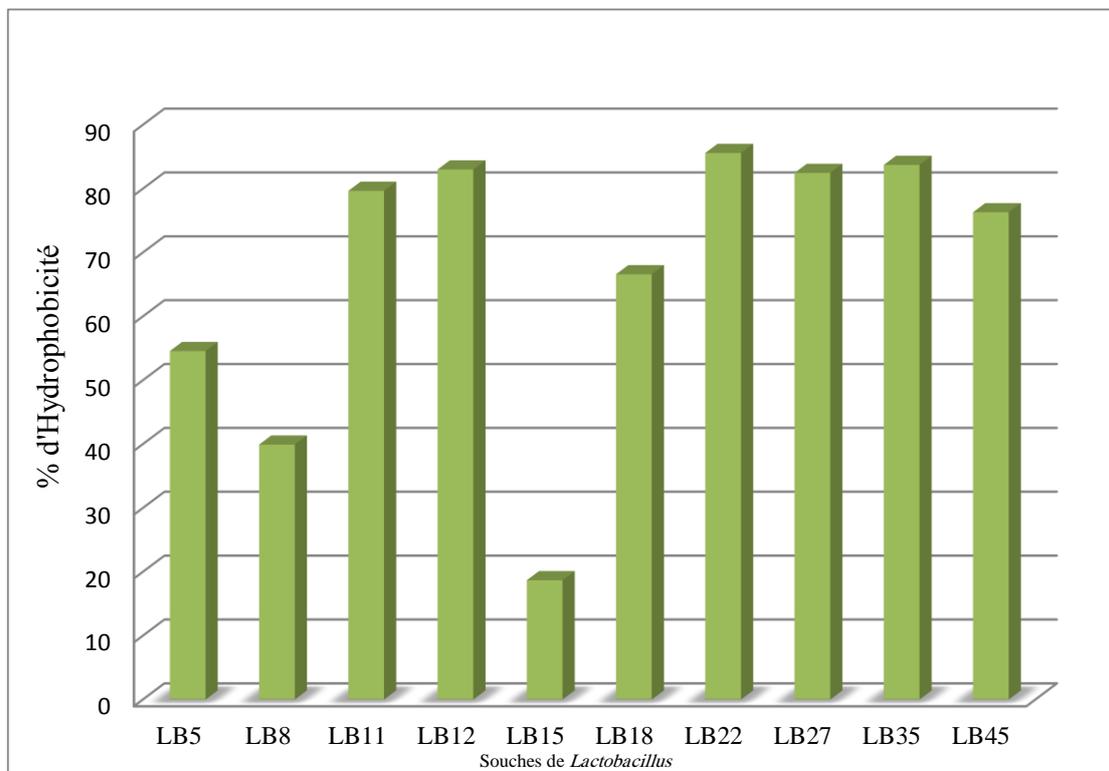
Maragkoudakis *et al.* (2006) ont trouvé que la plupart des souches de *Lactobacillus* d'origine laitière pourraient bien survivre en présence de 0.3% de sels biliaires.

La capacité des lactobacilles à croître dans la présence de la bile peut être liée à la capacité des souches de produire la bile hydrolase (BSH) (Tannock *et al.*, 1989), qui est une enzyme responsable de la déconjugaison des sels biliaires. Il a été supposé que la déconjugaison des sels biliaires peut contribuer à la diminution du taux du cholestérol sanguin, bien que le mécanisme d'action précis reste incertain (Du toit *et al.*, 1998).

### 3.3. Hydrophobicité

L'hydrophobicité de la surface bactérienne peut être un bon indicateur pour le screening des souches probiotiques potentielles (Xu *et al.*, 2009). La capacité d'adhérer à la muqueuse intestinale est un critère important pour la sélection des souches probiotiques (Tuomola *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2009). L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est l'une des propriétés physico-chimiques qui facilitent le premier contact entre le microorganisme et les cellules hôtes (Guglielmotti *et al.*, 2007). Kaushik *et al.* (2009) a suggéré que l'hydrophobicité permet aux probiotiques d'adhérer et de résider dans les intestins de l'hôte plus longtemps pour délivrer leurs effets bénéfiques. En effet, plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'adhésion des microorganismes aux cellules de l'épithélium intestinal (Vinderola *et al.*, 2008).

La détermination de l'adhésion microbienne aux hydrocarbures est un moyen pour estimer la capacité d'une souche à adhérer aux cellules épithéliales (Vinderola et Reinheimer, 2003). L'hydrophobicité des souches de *Lactobacillus plantarum* vis-à-vis le toluène a été évalué. Les résultats obtenus (Figure 14) ont été entre 18% et 85%. Toutes les souches ont présenté des valeurs élevées d'hydrophobicité à l'exception de LB15 qui a montré une hydrophobicité faible (18%).



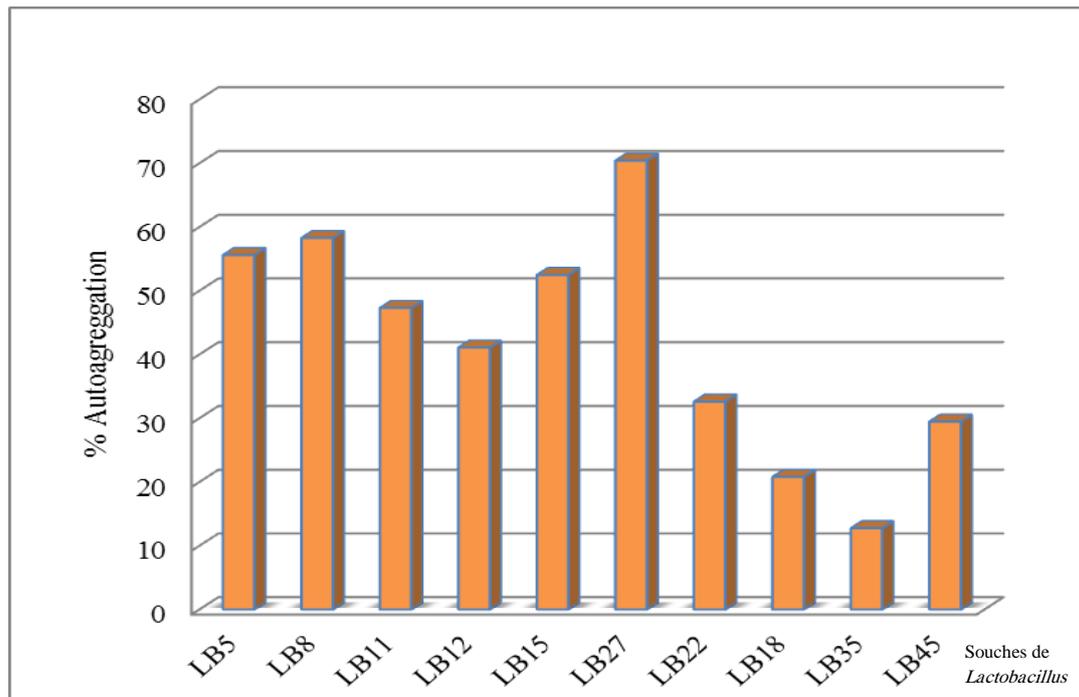
**Figure 14.** Hydrophobicité des souches *Lactobacillus plantarum*.

Vinderola *et al.* (2008) ont constaté que l'hydrophobicité de 19 souches de lactobacilles d'origine humaine varie de 14% à 53%. Les mêmes résultats sont trouvés par Ren *et al.* (2014) avec des souches de *Lactobacillus* isolées à partir des aliments fermentés et des intestins humains (14% - 59%). Nos résultats montrent qu'à l'exception d'une seule souche, toutes les souches de *Lactobacillus plantarum* présentaient une hydrophobicité élevée. Les différences dans l'hydrophobicité peuvent être dues à des variations dans le niveau d'expression des protéines de la surface cellulaire des souches d'une espèce (Kaushik *et al.*, 2009).

### 3.4. Autoagrégation

Les résultats de l'autoagrégation des souches de *Lactobacillus plantarum* sont présentés dans la figure (15), les valeurs d'autoagrégation sont comprises entre 12,75% et 70,39%. LB27 a montré la plus grande capacité d'autoagrégation parmi toutes les souches testées (70,39%) LB35 a été la plus faible (12,75%).

L'hydrophobicité et l'autoagrégation sont considérés comme des caractères nécessaires à l'adhérence. Car, ils facilitent la colonisation temporaire et protègent le système hôte par la formation de biofilm sur le tissu hôte (Ren *et al.*, 2014). La souche LB27 a présenté une hydrophobicité et une autoagrégation élevée 82% et 70% respectivement. Notre résultat s'accorde avec Ren *et al.* (2014) qui ont trouvé que parmi 9 souches de *Lactobacillus* deux qui sont *L. salivarius subsp. Salicinius* et *L. plantarum* d'origines différentes (la première isolée des intestin tandis *L. plantarum* est d'origine végétale), ont montré des valeurs d'hydrophobicité et d'autoagrégation (59% et 43%, 46% et 34% respectivement) et une capacité d'adhérence relativement élevées, les auteurs ont suggéré leur activité immunomodulatrice dans le tractus gastro-intestinal. La capacité des souches de *Bifidobacterium spp.* d'origine humaine pour adhérer aux lignées cellulaires Caco-2 et HT29 a été associée à des valeurs élevées d'auto-agrégation et d'hydrophobicité (Pérez *et al.*, 1998; Del Re *et al.*, 2000).



**Figure 15.** Autoagrégation des souches de *Lactobacillus plantarum*.

### 3.5. Sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques de dix souches de *Lactobacillus plantarum* (tableau 13) dénotent qu'aucune souche n'était totalement sensible à tous les antibiotiques. Toutes les souches se sont révélées sensibles au chloramphénicol, nitroxoiline, pénicilline G, céfotaxime, pristinamycine et à la streptomycine à l'exception de LB15, LB18, LB22. Les souches LB15, LB18, LB27 ont été résistantes au céfixime, une résistance intermédiaire a été enregistrée chez les deux souches LB22, et LB45. Cependant, toutes les souches ont été résistantes à la ciprofloxacine, la tobramycine, l'acide nalidixique et la colistine. Des résultats similaires sont signalés précédemment (Herreros *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005; Ben moussa *et al.*, 2008). Ces résultats s'accordent aussi avec divers rapports indiquant que les bactéries lactiques sont normalement résistantes aux principaux types d'antibiotiques, tels que  $\beta$ -lactamine, les céphalosporine, aminoside, quinolone, imidazole, nitrofurantoïne et fluoroquinolone (Halami *et al.*, 2000). La résistance des lactobacilles aux aminosides a été signalée par Baumgartner *et al.* (1998), Katala *et al.* (2001), Coppola *et al.* (2005) et Zhou *et al.* (2005).

Le chloramphénicol a exercé une action inhibitrice sur la totalité des souches testées, la sensibilité des espèces de *Lactobacillus* au chloramphénicol et à la Pénicilline G a été

constatée par de nombreux auteurs (Baumgartner *et al.*, 1998; katala *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2005).

**Tableau 13.** Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Lactobacillus plantarum*

	C	NO	P	CFM	CTX	CIP	RP	TOB	NA	CL	S
LB5	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S
LB8	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S
LB11	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S
LB12	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S
LB15	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R
LB18	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R
LB22	S	S	S	I	S	R	S	R	R	R	R
LB27	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S
LB35	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	/
LB45	S	S	S	I	S	R	S	R	R	R	S

S : sensible

I : intermédiaire

R : résistante

La résistance à un certain antibiotique peut être expliquée par la capacité d'un microorganisme à se développer en présence de l'agent antimicrobien. Elle peut être intrinsèque (naturelle) inhérente à un genre ou une espèce bactérienne, ou acquise présente dans certaines souches d'une espèce habituellement sensible à un antibiotique donné (Matheur et Singh, 2005). La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale). Contrairement à l'acquise qui est souvent instable et peut survenir soit par mutation spontanée, soit par l'acquisition de gènes par un autre micro-organisme, elle est transférable d'une bactérie à l'autre et même à des bactéries d'espèces différentes (Carle, 2009).

Les bactéries lactiques participent à la production et la conservation des aliments fermentés et des aliments destinés aux animaux, elles sont soit ajoutées entant que ferments ou probiotiques pour aider l'homme et les animaux à reconstruire l'équilibre et la composition du microbiote intestinal, en conférant un bien-être et une capacité de résistance à l'invasion des pathogènes. Toutefois, l'attention est actuellement accordée aux bactéries lactiques par rapport à leur rôle potentiel dans la propagation et la transmission des

déterminants de la résistance aux antibiotiques dans les matrices alimentaires et dans le tractus gastro-intestinale (Teuber *et al.*, 1999; Ammor *et al.*, 2007).

Des résistances probablement intrinsèques aux céphalosporines, aminosides et fluoroquinolones ont été observées chez les souches de *Lactobacillus plantarum* et qui ont été rapportées dans la littérature. La résistance intrinsèque n'est pas horizontalement transférable, et elle ne pose aucun risque pour les bactéries non pathogènes (Mathur and Singh, 2005).

### **3.6. Activité hémolytique**

L'absence d'activité hémolytique est considérée comme une condition de sécurité pour la sélection des souches probiotiques (FAO/WHO, 2002). Aucune souche n'a présenté une activité  $\beta$ -hémolytique sur gélose TSA au sang (5%). Des résultats similaires ont été déjà signalés (Maragkoudakis *et al.*, 2006; Argyri *et al.*, 2013).

### **4. Croissance et survie des probiotique en présence des additifs alimentaire**

L'incorporation des bactéries probiotiques dans les différents produits laitiers fermentés est actuellement un thème important avec des conséquences industrielles et commerciales (Georgieva *et al.*, 2009). Un certain nombre de produits laitiers sont commercialisés comme contenant des bactéries probiotiques, le lait fermenté et les fromages ont été décrits comme les plus appropriés pour l'administration de ces microorganismes (Saarela *et al.*, 2000; Lourens-Hattingh et Viljoen, 2001; Georgieva *et al.*, 2009). Lors de la conception d'un produit laitier les propriétés sensorielles souhaitées doivent être pris en compte en même temps que la tolérance des microorganismes spécifiques aux produits chimiques utilisés pour atteindre ces propriétés. En effet, ces produits contiennent une grande variété de composés ajoutés dont leur influence sur les ferments lactiques et les souches probiotiques ne sont pas très bien connue. De ce fait, l'évaluation adéquate de chaque souche probiotique devient une étape importante pour une mise en œuvre plus loin.

L'effet des additifs couramment utilisés en industrie alimentaire sur la croissance des ferments lactiques et probiotiques a fait l'objet de plusieurs études (Samona et Robinson, 1993; Gomes *et al.*, 1998; Rada et Dlabal, 1998; Vachon et Ustunol, 1998; Vinderola *et al.*, 2002)

*Lactobacillus plantarum* est l'une des espèces de bactéries lactiques non starter et parmi les probiotiques utilisés industriellement, les souches de *L.plantarum* sont souvent

incorporés dans les différents produits présentant un intérêt pour la santé humaine (De Vries *et al.*, 2006).

Cinq souches de *Lactobacillus plantarum* (LB15, LB27, LB8, LB12 et LB11) sélectionnés sur la base des critères *in vitro* communément admise, sont utilisées pour l'évaluation de l'effet des additifs alimentaires utilisés en industries laitiers sur leur croissance. En effet, les concentrations ont été choisies selon les normes utilisées en industrie laitiers autorisés par la loi Algérienne (Décret exécutif n° 12-214 du 23 Jomada Ethania 1433 correspondant au 15 mai 2012 fixant les conditions et les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine et ANNEXE III comprenant une liste des additifs pouvant être incorporés dans les denrées alimentaires ainsi que leurs limites maximales autorisée) , des concentrations plus élevées ont été utilisées pour vérifier une éventuelle influence.

#### **4.1. Effet des édulcorants**

Les édulcorants artificiels sont largement utilisés en industries alimentaires à travers le monde, les consommateurs choisissent les aliments à faible teneur en calories, additionnés d'édulcorants artificiels pour diminuer l'apport calorique contrôlant ainsi le poids, et certains cas médicaux comme le diabète et l'hyperglycémie.

Les résultats de l'influence des édulcorants Aspartame et Acésulfame-K sur la croissance des probiotiques LB15, LB27, LB8, LB12 et LB11 sont illustrés dans la figure (26), le tableau (14) résume les résultats de taux de viabilité après 24h d'incubation.

D'après les résultats obtenus, les édulcorants testés aspartame et acésulfame-K à toutes les concentrations testées n'ont pas interféré avec la croissance ni sur la viabilité des souches probiotiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Vinderola *et al.* (2002) qui ont trouvé que l'aspartame et l'acésulfame-K à une concentration de 0,03% n'ont pas d'influence sur la croissance des souches probiotiques et des ferments lactiques, la plus forte concentration testée (0,12%) de l'aspartame était seulement inhibitrice pour les trois souches de bactéries lactiques et une souche probiotique.

Samona *et al.* (1993) ont constaté que les concentrations de 0,04 et 0,08% d'aspartame n'ont présenté aucune influence sur la croissance des *Bifidobacterium* dans le lait.

El-Kholy *et al.* (2003) ont constaté que les édulcorants acésulfame-K à 0,04 et 0,15% et l'aspartame à 0,04% ne présentent aucun effet sur la croissance des ferments lactique et des bactéries probiotiques.

#### 4.2. Effet de saccharose et du NaCl

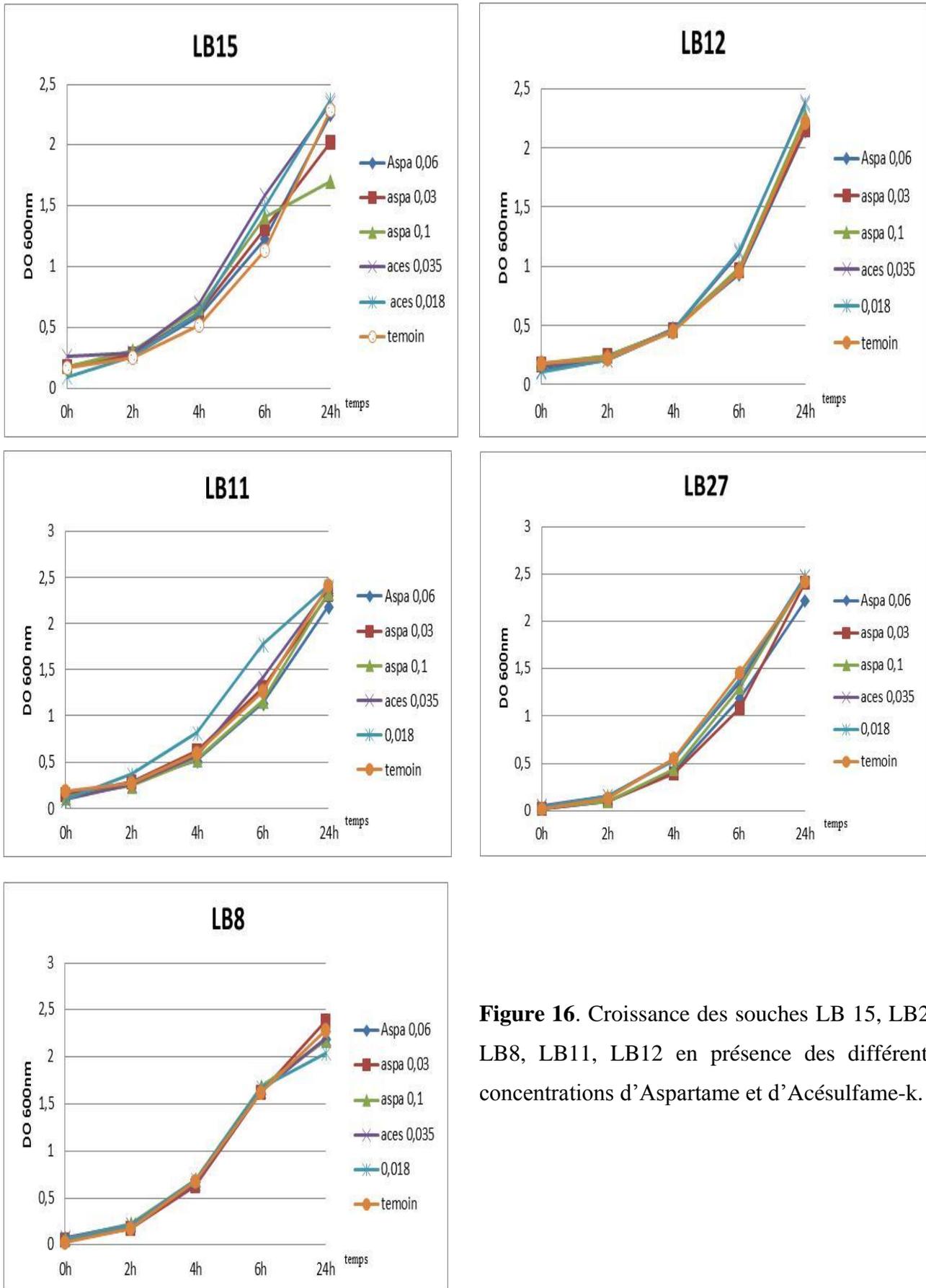
Les résultats obtenus sont illustré dans les figures (17) et tableau (14). Les bactéries probiotiques testées se sont révélées insensible à la présence de saccharose à 6 et 12% et a 1% et 2% NaCl. Vinderola *et al.* (2002) ont rapporté que les probiotiques ont été moins sensibles à la présence des sucres comparant aux ferments lactiques, les concentrations de 15 et 20% saccharose ont inhibé la croissance de certains souches de *Bifidobacterium*, alors que la croissance des différentes espèces et souches de ferments lactiques en présence de 15 et 20% de saccharose était souche dépendante, la concentration de 5% n'a présenté aucun effet sur l'ensemble des souches.

Shah et Ravula (2000) ont étudié l'effet de l'activité de l'eau sur les ferments starter (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) et les probiotiques (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.*) du yaourt par la production d'un yaourt avec des différentes concentrations de saccharose (0, 4, 8, 12 et 16%), ils ont trouvé que à 12 et 16% sucre, la survie des deux types de bactéries testés a été négativement influencée.

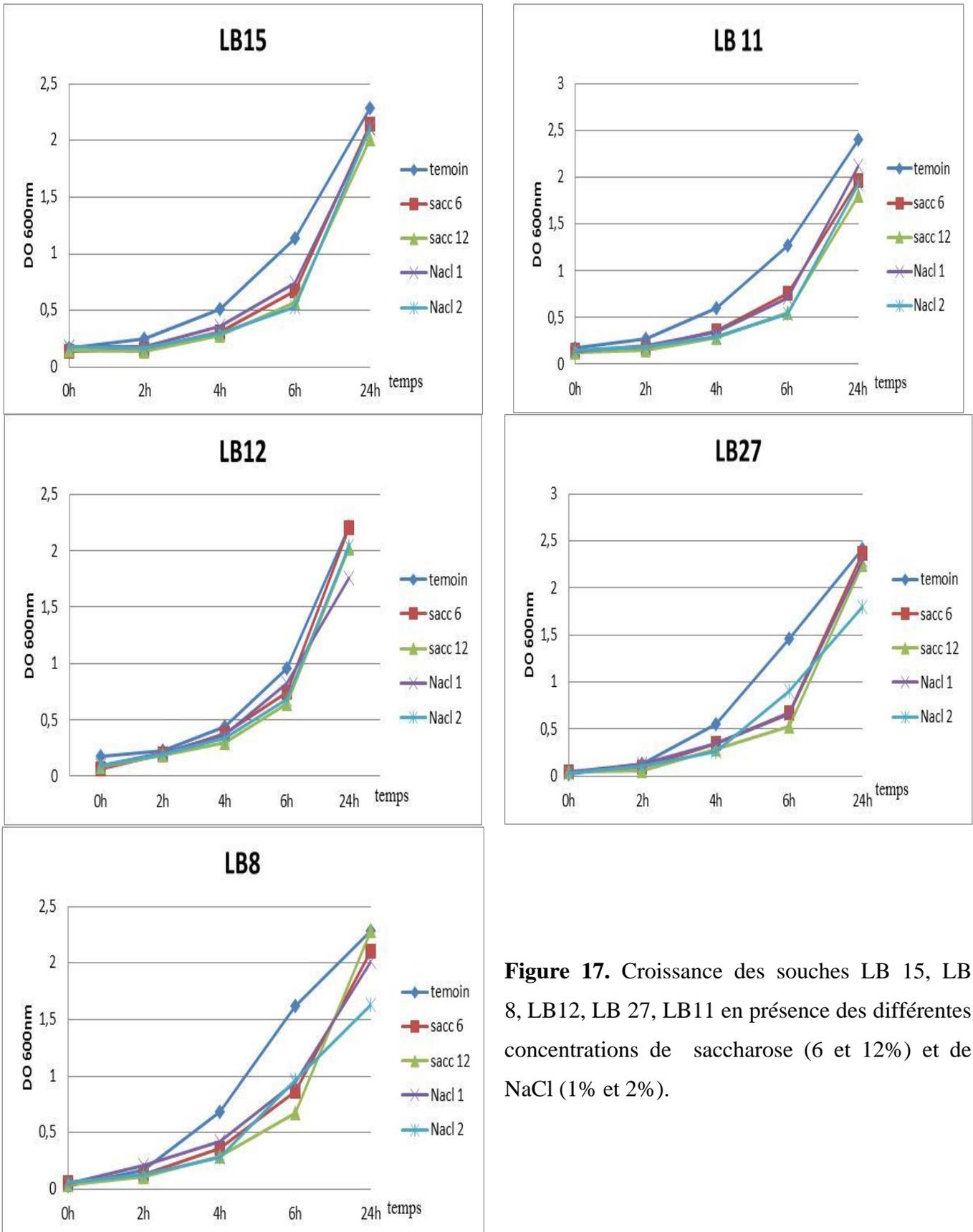
Le NaCl est utilisé en industrie alimentaire comme étant un agent de conservation pour renforcer les caractéristiques organoleptiques et répondre aux besoins quotidiens de l'homme. En outre, son utilisation est importante pour contrôler l'affinage du fromage. Gomes *et al.* (1988) ont signalé que La teneur en sel des produits laitiers fermentés pourrait influencer la viabilité des cultures probiotiques.

Georgieva *et al.* (2009) ont constaté que les souches de *L. plantarum* probiotiques ont été sensibles uniquement aux concentrations les plus élevées de NaCl (10%), et que les concentrations de 3, 6, 8% sel généralement utilisés dans les procédés de fabrication de fromage, n'ont pas affecté leur viabilité.

Vinderola *et al.* (2002) ont trouvé qu'une concentration de 2% NaCl a inhibé la croissance des souches *Bifidobacterium* probiotiques.



**Figure 16.** Croissance des souches LB 15, LB27, LB8, LB11, LB12 en présence des différentes concentrations d'Aspartame et d'Acésulfame-k.



**Figure 17.** Croissance des souches LB 15, LB 8, LB12, LB 27, LB11 en présence des différentes concentrations de saccharose (6 et 12%) et de NaCl (1% et 2%).

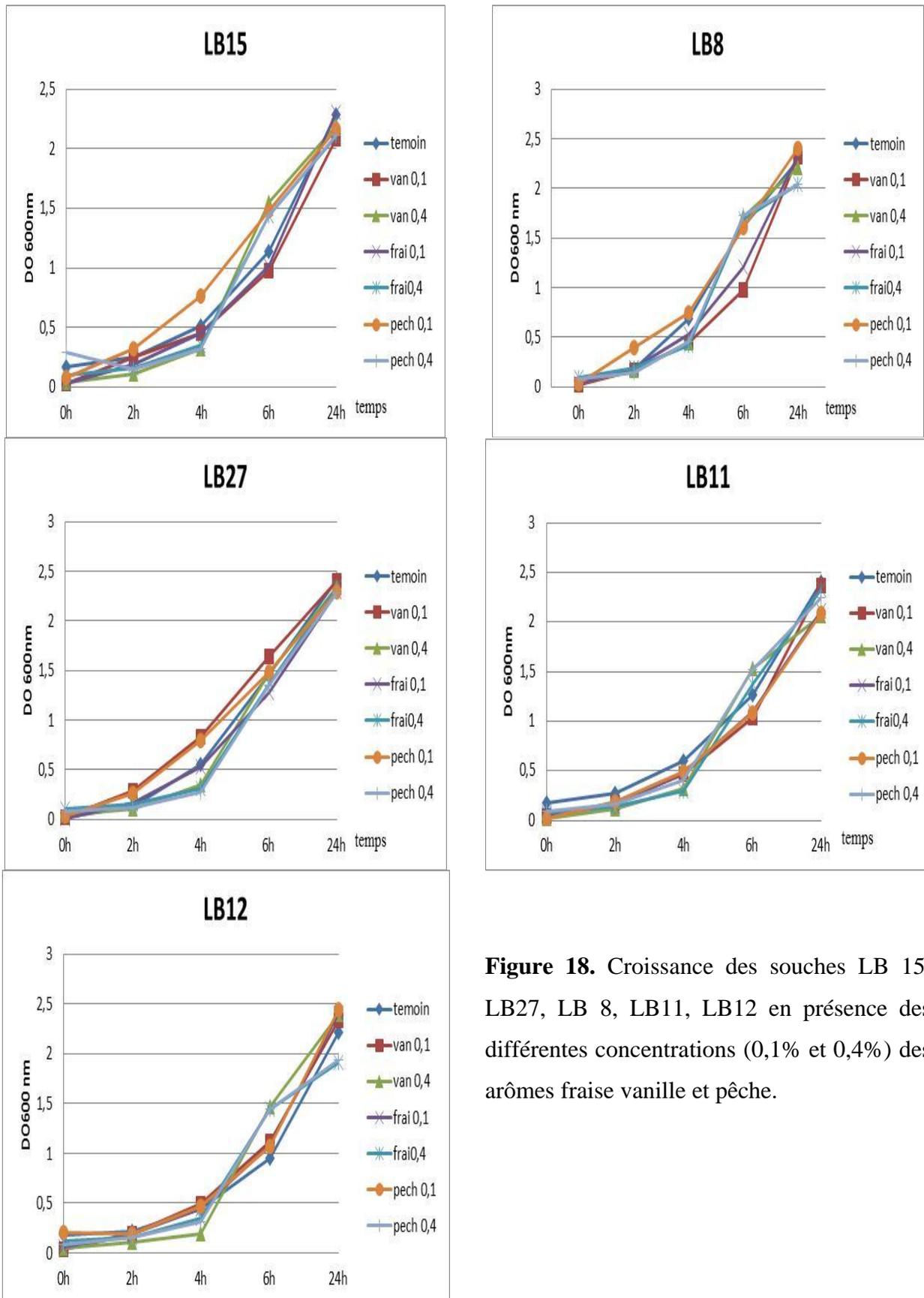
### 4.3. Effet des arômes

Les arômes testés fraise, pêche et vanille aux concentrations 0,1 et 0,4% utilisés en industries laitiers n'ont présenté aucune influence sur la croissance (Figures 18), ni sur la viabilité (tableau 14) des souches probiotiques de *Lactobacillus plantarum*. Ces résultats concordent partiellement avec ceux obtenus par El-Kholy *et al.*(2003) qui ont montré que les aromatisants n'ont présenté aucun effet sur le développement de ferments starter et des bactéries probiotiques à l'exception de l'arôme d'abricot et de la goyave qui ont inhibé la croissance de *Bifidobacterium bifidum* Bb-11.

Vinderola *et al.* (2002) ont rapporté que les arômes pêche et fraise n'ont pas affecté la croissance des ferments lactiques et des souches probiotiques, les arômes vanille, banane et deux autres arômes fraise (1 et 2) ont affectés seulement quelques souches de bactéries de yaourt (*S. thermophilus* et *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*). D'une autre part, les auteurs ont signalé que les mélanges commerciaux aromatisants-colorants se sont avérés avoir une inhibition importante, même aux concentrations recommandées par les fournisseurs.

**Tableau 14.** Survie des souches de *L. plantarum* dans un milieu liquide (bouillon MRS, 30°C) en présence des additifs utilisés dans l'industrie laitière, après 24h d'incubation.

L'additif	Concentration (% : p /v, v /v)	% Survie des souches de <i>L. plantarum</i>				
		LB15	LB27	LB8	LB12	LB11
Aspartame	0.03	88,52	100	104	97	96
	0.06	98,30	92	96	97	96
	0.1	74,55	101	95	102	97
Acésulfame-K	0.018	103	102	89	106	100
	0,035	104	102	96	107	99
Saccharose	6	93	98	92	82	99
	12	88	93	100	75	91
NaCl	1	92	95	88	88	79
	2	92	74	71	80	92
vanille	0,1	91	99	101	105	98
	0,4	96	97	97	108	85
fraise	0,1	100	95	102	108	88
	0,4	92	97	89	86	96
Pêche	0.1	94	95	105	110	86
	0,4	92	94	89	87	93



**Figure 18.** Croissance des souches LB 15, LB27, LB 8, LB11, LB12 en présence des différentes concentrations (0,1% et 0,4%) des arômes fraise vanille et pêche.

## 5. Effet des additifs alimentaires sur l'autoagrégation et l'hydrophobicité

La présence des édulcorants aspartame et acésulfame-K, saccharose, NaCl, et des arômes (fraise, vanille, pêche) n'a pas affecté de manière significative l'autoagrégation des souches *Lactobacillus plantarum* (tableau 15), à l'exception de la souche LB27 dont son autoagrégation a été significativement affecté en présence de 0,06 aspartame ( $P<0.05$ ), de 0,035 acésulfame-K ( $P<0.01$ ), en présence de 6 et 12% saccharose ( $P<0.001$ ) et en présence des arômes: 0,1 et 0,4% vanille ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), 0,1% fraise ( $P<0.01$ ), et 0,1% pêche ( $P<0.05$ ).

Les valeurs d'autoagrégation obtenues pour les souches *lactobacillus plantarum* probiotiques LB15, LB8, LB11, LB12, LB27 ont été déterminées à 2 h, allant de 7 à 65%, il est possible que le pourcentage d'autoagrégation augmente avec un temps expérimental plus long. Jankovic et al. (2012) ont rapporté, pour les souches de *L. plantarum*, des valeurs d'autoagrégation de 20 à 30% pendant 5 h et de 80 à 90% après 24 h.

Sous les conditions de contrôle, les souches *Lactobacillus plantarum* présentent des valeurs d'hydrophobicité allant de 39,89 à 82,97 %. L'hydrophobicité des souches varie en présence des édulcorants de 29,21 à 73,59%, de 61,12% à 74% en présence de saccharose et du NaCl et de 53% à 74,4% en présence des arômes (vanille, fraise et pêche).

Les résultats obtenus (tableau 15) montrent que la présence des additifs utilisés en industrie alimentaire affecte très significativement ( $P<0.001$ ) l'hydrophobicité des probiotiques *Lactobacillus plantarum*.

L'édulcorant aspartame aux concentrations 0,03, 0,06 et 0,1% influe significativement sur l'hydrophobicité de la souche LB12 ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$  et  $P<0.001$ ) respectivement, à la concentration 0,1% l'hydrophobicité des souches LB27 et LB11 a été significativement affecté ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ). L'acésulfame-K à 0,035% affecte l'hydrophobicité des souches LB11, LB12 ( $P<0.001$ ). Tandis qu'aucun effet significatif n'a été enregistré en présence de 0,018%.

Pas d'effet significatif sur l'hydrophobicité en présence des additifs alimentaires saccharoses (6 et 12%), NaCl (1 et 2%) et les arômes de la vanille, fraise et pêche (0,1 et 0,4 %) sur l'ensemble des souches probiotiques *Lactobacillus plantarum* à l'exception de de la souche LB27 où l'hydrophobicité étaient significativement influencé en présence de l'arôme pêche à 0,4%. Dans cette étude l'influence des édulcorants aspartame et acésulfame-K sur

l'hydrophobicité des *Lactobacillus plantarum* probiotiques peut être dose-dépendante, et souche- dépendante.

Il est connu que la capacité des bactéries à adhérer à l'épithélium intestinal joue un rôle important dans la colonisation du tractus gastro-intestinal, en empêchant l'élimination des bactéries par le péristaltisme et en fournissant un avantage concurrentiel dans l'écosystème (Del Re *et al.*, 2000). La paroi cellulaire des lactobacilles est composée d'une couche épaisse de peptidoglycane, décorée de divers composants de surface, y compris les acides (lipo-) téichoïques, des polysaccharides, des protéines liées par covalence et les protéines de la couche S.5 (Schaer-Zammaretti et Ubbink, 2003). L'interaction de ces éléments avec le milieu environnant est responsable de l'attachement des bactéries aux surfaces de la muqueuse intestinale, et aux composants alimentaires (Deepika *et al.*, 2011). Selon des études antérieures, les propriétés de surface des cellules bactériennes sont déterminées par la composition de leur paroi cellulaire (Schaer-Zammaretti et Ubbink, 2003; Deepika et Charalampopoulos, 2010; Deepika *et al.*, 2011). L'altération de l'une de ces structures présentes à la surface des cellules bactériennes peut affecter les propriétés physico-chimiques et donc affecter la capacité des bactéries à adhérer à la muqueuse intestinale (Deepika *et al.*, 2011).

Les probiotiques sont communément introduits dans des matrices alimentaires comme les produits laitiers fermentés, Il n'y pas d'information concernant l'effet du support alimentaire et en particulier les composants spécifiques sur les propriétés de surface et d'adhésion des probiotiques, nous avons évalué l'interaction entre les additifs alimentaire et les propriétés de surface bactérienne des *Lactobacillus plantarum* probiotiques. Les édulcorants aspartames et acésulfame-K qui sont des substituts du sucre artificiels utilisés en industrie alimentaire pouvaient influencer l'hydrophobicité des probiotiques, ainsi affectant les propriétés d'adhérence au mucus et réduire le nombre de bactéries capables d'adhérer aux cellules épithéliales, cette dernière qui est une étape clé pour renforcer le fonctionnement des probiotiques.

**Tableau 15.** Hydrophobicité et Autoagrégation des souches de *L. plantarum* en présence des additifs utilisés dans l'industrie laitière.

souche	Témoïn	aspartame			acésulfame-K		saccharose		NaCl		vanille		Fraise		pêche	
		0,03	0,06	0,1	0,018	0,035	6	12	1	2	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,4
Hydrophobicité																
LB15	54,54	33,18	43,52	49,4	36,16	43,77	69,89	73,56	73,82	69,88	63,94	68,27	58,32	51,72	54,67	62,53
LB8	39,89	49,45	34,86	43,5	43,38	38,1	66,68	61,12	62,95	62,37	60,99	64,31	68,59 <sup>a</sup>	52,91	60,34	66,2
LB11	79,62	63,21	52,37	43,7 <sup>b</sup>	56,61	34,23 <sup>c</sup>	74,47	67,08	65,93	68,35	72,64	74,01	69,36	66,75	65,73	74,4
LB12	82,97	42,62 <sup>b</sup>	37,08 <sup>c</sup>	29,21 <sup>c</sup>	55,45	40 <sup>c</sup>	71,99	72,34	69,97	68,93	56,48	61,41	65,10	55,83	57,31	67,69
LB27	82,43	54,67	73,59	37,2 <sup>c</sup>	69,57	68,17	74,32	66,05	64,43	73,28	66,86	54,50	64,43	62,25 <sup>a</sup>	56,75	53
Autoagrégation																
LB15	55,58	45,81	46,46	51,72	51,68	33,48	39,66	47,81	31	45,3	27,97	64,10	40,08	7,08 <sup>c</sup>	21,26	40,88
LB8	58,26	45,74	42,15	42,92	57,74	35,04	63,88	52,86	45,79	33,7	46,	49,53	40,1	65,6	43,48	50,81
LB11	47,29	31,70	32,80	35,31	37,32	40,2	58,8	55,5	60,55	55,1	63,10	29,54	63,38	27,71	63	63,05
LB12	41,07	32,01	28,60	30,01	31,18	48,9	27,1	21,76	23,8	48	43,5	43,59	44,5	53,8	47,85	43,46
LB27	70,39	45,74	42,15 <sup>a</sup>	42,92	57,74	35,04 <sup>b</sup>	23,02 <sup>c</sup>	9 <sup>c</sup>	45,99	51,2	32 <sup>b</sup>	17,06 <sup>c</sup>	32,2 <sup>b</sup>	43,67	39,83 <sup>a</sup>	44,65

<sup>a</sup>: P < 0.05, <sup>b</sup>: P < 0.01, <sup>c</sup>: P < 0.001

## 6. Effet des additifs alimentaires sur l'activité antibactérienne

L'activité antibactériennes des probiotiques *Lactobacillus plantarum* contre les deux bactéries pathogènes *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 en présence des additifs alimentaires par antagonisme direct.

Toutes les souches probiotiques ont présenté une action inhibitrice vis-à-vis *E.coli* et *S. typhimurium* (tableau 16). L'analyse des résultats par le test ANOVA a montré que la présence des édulcorants aspartame et acésulfame-K, le saccharose, NaCl et les arômes (vanille, fraise et pêche) dans le milieu MRS a affecté significativement ( $P < 0.0001$ ) les zones d'inhibition.

Les diamètres d'inhibition de *E.coli* ont été augmentés significativement en présence de 0,03% d'aspartame pour les souches LB11, LB12 et LB15 par rapport aux témoins, à 0,06 % aspartame pour la souche LB15, à 0,1% vanille pour LB12 et à 0,1% fraise pour LB8.

En présence d'une concentration de 0,035% acésulfame-K, 12% saccharose et 2% NaCl les zones d'inhibition de la souche LB27 ont été significativement diminuées ( $P < 0.01$ ).

Les diamètres d'inhibitions de *Salmonella typhimurium* ont été significativement diminués par rapport aux témoins en présence de 0,03% aspartame pour LB8 et LB27, en présence de 0,1% aspartame pour LB11 et LB27.

Une réduction significative dans les diamètres d'inhibitions a été observée pour les souches LB11, LB27 et LB8 en présence de 0,018% et 0,035% acésulfame-K, une zone d'inhibition réduite a été notée pour LB12 à 0,035% acésulfame-K.

L'addition de saccharose à 6 et 12% affecte significativement l'activité antibactérienne des souches LB8, LB11, LB27 et LB8, LB11, LB12, LB27 respectivement. Le NaCl à 1% et 2% avait un impact significatif sur l'activité des souches LB11, LB27 et LB8, LB11, LB27 respectivement.

Les arômes vanille et pêche utilisés industriellement à une concentration de 0,4% ont présenté un effet significatif sur les zones d'inhibition de *Salmonella typhimurium* pour les souches LB8 et LB11 et LB8 respectivement.

La consommation de produits probiotiques a considérablement augmenté à l'échelle mondiale, certains des avantages thérapeutiques proposés sont conférés par des bactéries

vivantes contenues dans les produits. Parmi les facteurs qui pourraient influencer l'efficacité probiotique ; les méthodes et les matrices utilisées pour cultiver, préserver et distribuer l'organisme probiotique dans les produits de consommation (Tachon *et al.*, 2014). La composition du produit et la présence des additifs sont rapportées pour affecter la croissance et la viabilité des ferments lactiques et des bactéries probiotiques, mais il n'y a pas de rapport sur l'impact des additifs alimentaires sur les caractéristiques fonctionnelles des probiotiques comme l'activité antagoniste, cette dernière qui présente un critère important lors de la sélection des souches probiotiques. La présence de l'aspartame, l'acésulfame-K l'arôme vanille et pêche semble avoir un impact sur l'activité antagoniste des souches *Lactobacillus plantarum* probiotiques.

**Tableau16.** Activité antibactérienne des souches de *L. plantarum* en présence des additifs contre *E. coli* et *Salmonella typhimurium*

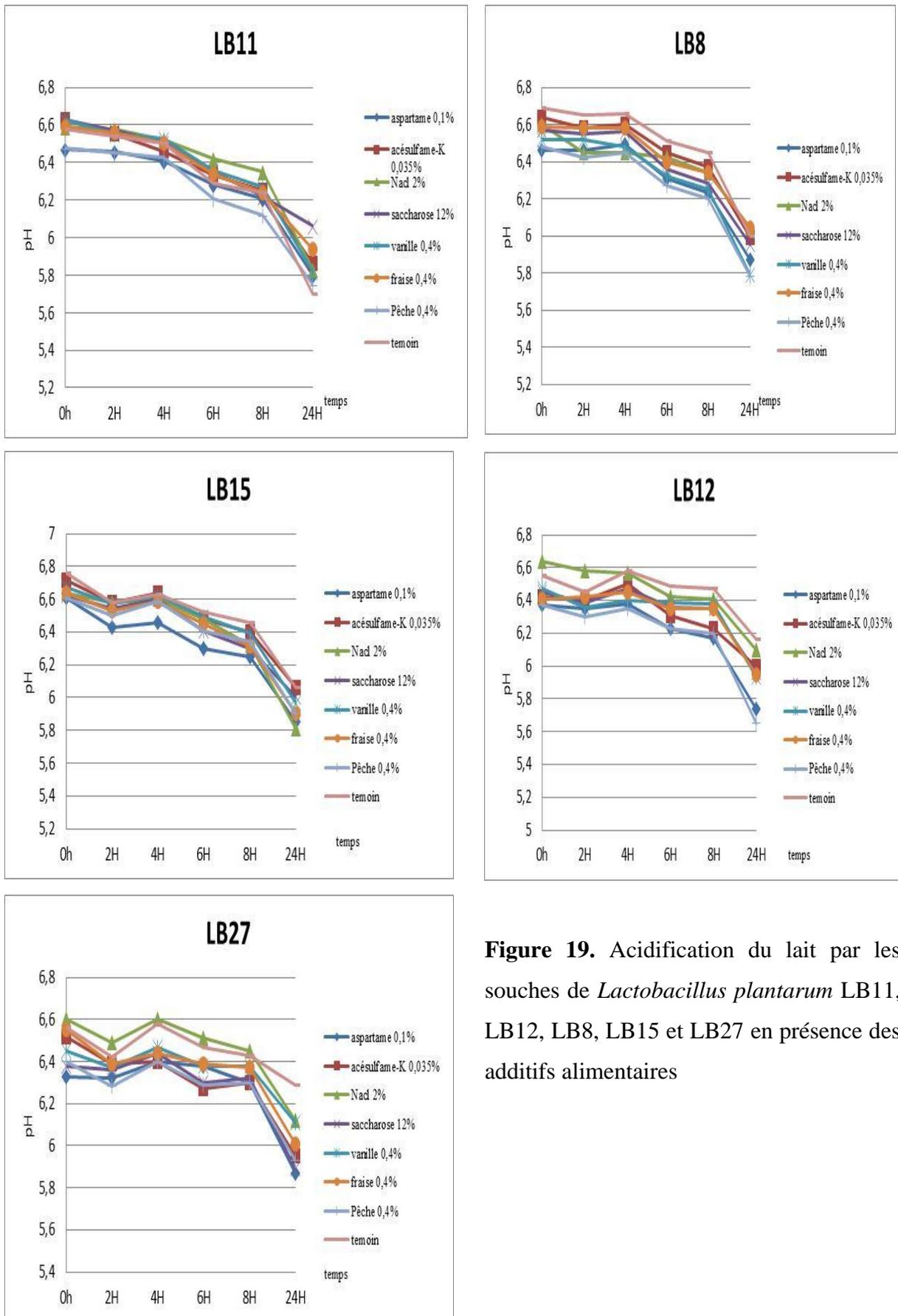
souche	Témoin	aspartame		acésulfame-K			saccharose		NaCl		vanille		Fraise		pêche	
		0,03	0,06	0,1	0,018	0,035	6	12	1	2	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,4
<i>Escherichia coli</i>																
LB15	31	40,5 <sup>a</sup>	29,5	37	32	32,5	29	27	28,5	31	35,5	32	36,5	28	32	30
LB8	30	39 <sup>a</sup>	38,5 <sup>a</sup>	34,5	33	35,5	27,5	24	27	28	37	37	38 <sup>a</sup>	26	30	33,5
LB11	30	38 <sup>a</sup>	38,5 <sup>a</sup>	34	34	33,5	29	28,5	27	26	36	36,5	36	30	31	31,5
LB12	32	38,5	36	37,5	32	36	30	27	27	28	40 <sup>a</sup>	38	39	37,5	30	35,5
LB27	34	35,5	37	39,5	27	24 <sup>b</sup>	29	25 <sup>a</sup>	28,5	25,5 <sup>a</sup>	40	40	39,5	35	32	34,5
<i>Salmonella typhimurium</i>																
LB15	37	30	29,5	32	28	30	28	35	30	30,5	29	32	34,5	32	30,5	34,5
LB8	41	31 <sup>a</sup>	35	40	30 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	29 <sup>b</sup>	29,5 <sup>a</sup>	32	26 <sup>c</sup>	33	31 <sup>a</sup>	33	35	35	26 <sup>c</sup>
LB11	40,5	35	33	26 <sup>c</sup>	30 <sup>a</sup>	28 <sup>b</sup>	30 <sup>a</sup>	27 <sup>b</sup>	26,5 <sup>b</sup>	26 <sup>c</sup>	33	33	35	39	34,5	28,5 <sup>b</sup>
LB12	35,5	28	29	28	32	25 <sup>a</sup>	28	25 <sup>a</sup>	30	27,5	36	33	30	28	34	34,5
LB27	41	30 <sup>a</sup>	33	30 <sup>a</sup>	24 <sup>c</sup>	17,5 <sup>c</sup>	30 <sup>a</sup>	24 <sup>c</sup>	30 <sup>a</sup>	23 <sup>c</sup>	35,5	38	36	31	38	37

<sup>a</sup>: P < 0.05, <sup>b</sup>: P < 0.01, <sup>c</sup>: P < 0.001

## 7. Effet des additifs alimentaires sur l'acidification

L'activité acidifiante des souches de *Lactobacillus plantarum* en présence des additifs alimentaires : édulcorants, saccharose, NaCl et aromes (fraise, pêche et vanille) a été évalué par mesure de la variation du pH en fonction du temps. Les résultats obtenus (figure 19) montrent qu'au cours de 24 heures d'incubation à 30°C dans le lait écrémé le pH a diminué progressivement, les valeurs du pH varient du 6,12 – 5,65 enregistrées par LB 27 en présence du NaCl et LB12 en présence de l'arôme pêche. En comparant l'acidification des souches en présence des additifs alimentaires avec leurs témoins nous remarquons que les additifs alimentaires n'interfèrent pas avec la production d'acides par les souches probiotiques *Lactobacillus plantarum*.

El-Kholy *et al.* (2003) ont rapporté que les édulcorants acesulfame-k à 0,04 et 0,15% et l'aspartame à 0,04% n'ont pas eu d'effet sur la production d'acide par les ferments lactique et des bactéries probiotiques, La concentration 0,15% d'aspartame a réduit la croissance de trois ferments lactiques: *S. thermophilus*, *Lb. Plantarum* et *Lb. Helveticus* et quatre bactéries probiotiques (*Lb. Acidophilus La-5*, *Lb. casei*, *B. bifidum Bb-11* et *B. lactis Bb-12*) mais n'ont pas eu d'effet sur leur production d'acide. Le chlorure de sodium à 2% n'affecte pas la croissance et le développement d'acide des ferments lactiques et des bactéries probiotiques à l'exception de *B. bifidum Bb-11* et *Lb. paracasei* pour lesquels leur croissance et leur production d'acide ont été inhibés. Le même auteur a rapporté que les agents aromatisants ne présentaient aucun effet sur la croissance et le développement d'acide des ferments lactiques et des probiotiques à l'exception des arômes d'abricot et de la goyave qui ont inhibé la croissance et la production d'acide de *B. bifidum Bb-11*.



**Figure 19.** Acidification du lait par les souches de *Lactobacillus plantarum* LB11, LB12, LB8, LB15 et LB27 en présence des additifs alimentaires

### 8. Effet des additifs alimentaires sur l'activité protéolytique

Dans le lait, les quantités d'acides aminés et de peptides libres sont très faibles. La caséine est la source principale d'acides aminés libres pour la croissance des bactéries lactiques dans le lait (Ramchandran et Shah, 2008), elles dépendent par conséquent, sur un système protéolytique qui permet la dégradation des protéines du lait. Le système protéolytique des lactobacilles est constitué d'une sérine-protéinase extracellulaire, des systèmes de transport spécifiques de di-tripeptides et d'oligopeptides, et une multitude de peptidase intracellulaire. (Kunji *et al.*, 1996). Dans le cadre des processus industriels, les bactéries lactiques sont contestées par diverses conditions de stress qui sont susceptibles d'affecter leurs activités métaboliques, y compris la protéolyse (Savijoki *et al.*, 2006).

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches de *Lactobacillus plantarum* ont présenté une activité protéolytique sur le milieu PCA-lait écrémé additionné des additifs alimentaires. Cela signifie que les additifs utilisés en industries alimentaires n'influent pas l'activité protéolytiques des souches. Gobbettia *et al.* (1999) ont rapporté que dans des conditions semblables à celle du fromage, l'augmentation de la concentration du NaCl (2,5- 7,5%) a eu un effet négatif sur l'activité protéolytique de la souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* T12 contrairement à *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B397 et *Lactobacillus plantarum* 2739 qui n'ont pas significativement affecté.

**Tableau 17.** Activité protéolytique des souches de *L. plantarum* en présence des additifs alimentaires

souche	PCA lait + aspartame			PCA lait + acésulfame-K		PCA lait + saccharose		PCA lait + NaCl		PCA lait + vanille		PCA lait + Fraise		PCA lait + pêche	
	0,03	0,06	0,1	0,018	0,035	6	12	1	2	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,4
	LB15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LB8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LB11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LB12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LB27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



# **DISCUSSION GENERALE**

## Discussion générale

Trente-sept souches de bactéries lactiques sont isolées à partir des graines de pollen frais, l'étude des caractères physiologiques et biochimiques a permis de pré-identifier trois genres : *Enterococcus* contenant trois isolats représentés par l'espèce *Enterococcus faecalis*, le genre *Pediococcus* représenté par une seule espèce *Pediococcus pentosaceus* et le genre *Lactobacillus* qui comporte 33 souches représentées par les espèces *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *L. paraplantarum* et *L.farciminis*.

L'activité acidifiante des trente-six isolats lactiques a été évaluée par mesure du pH et dosage de l'acidité Doronic, les résultats ont montré qu'après 24h d'incubation dans le lait écrémé la valeur maximale du pH enregistré était 5,64 pour les lactobacilles et 5,75 pour les entérocoques, aucune souche n'a montré la capacité d'abaisser le pH au-delà de pH 5. La capacité d'acidification de la totalité des souches des bactéries lactiques est considérée comme faible. Les résultats obtenus de l'acidité produite après 24h d'incubation ont montré que la quantité maximale d'acide lactique enregistré a été 80°D pour les lactobacilles et de 48°D pour les entérocoques. Une seule souche est considérée comme étant fortement acidifiante, les autres souches sont considérées comme moyennement à faiblement acidifiantes.

Toutes les souches lactiques ont présentés une activité protéolytique positive sur les deux milieux MRS et PCA additionnés de lait écrémé, ces résultats concordent avec plusieurs études (Boulares *et al.*, 2012; Essid *et al.*, 2009; Ben moussa *et al.*, 2008). L'activité lipolytique n'a été détectée que seulement chez *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecalis* (LB16, LB40, LB21) et *Lactobacillus casei* (LB38). L'activité lipolytique des entérocoques a été signalée par plusieurs auteurs (Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Giraffa, 2003; Morandi *et al.*, 2006), il a été rapporté que les espèces du genre *Lactobacillus* sont faiblement lipolytique (Montel *et al.*, 1998). La synthèse de l'amylase est une caractéristique rare des bactéries lactiques (Giraud *et al.*, 1994) cela s'accorde avec nos résultats qui ont montré qu'aucune souche n'a été amylolytique.

L'activité antifongique de 37 bactéries lactiques envers les deux champignons *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* a montré que 35,13% ont été active contre les deux champignons, 91,89% ont été actives contre *Aspergillus flavus* et 40,54% contre *Aspergillus niger*. L'activité antifongique des *Lactobacillus plantarum* isolées à partir de matières

végétales a été rapportée précédemment (Magnusson *et al.* 2003; Sathe *et al.*, 2007; Yang et Chang, 2008; Laref et Guessas, 2013) .

Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne des *Lactobacillus* isolées du pollen contre les bactéries pathogènes : *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Listeria innocua* CLIP 74915 ont montré que toutes les souches ont été efficaces contre les bactéries pathogènes Gram-positives et Gram-négatives, le meilleur effet inhibiteur est obtenu contre *Staphylococcus aureus* (38,30mm) suivis par *Salmonella typhimurium* (36,75mm) et *Citrobacter freundii* (36,22mm). Un effet similaire a été enregistré contre *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* (33,74 mm), (32,39mm) respectivement. L'effet le plus faible est obtenu contre *Listeria innocua* (19,5mm). Les *Lactobacillus* isolées du pollen ont présenté un large spectre d'inhibition contre les bactéries pathogènes, on peut attribuer l'inhibition à n'importe quel facteur antimicrobien produit par les souches ; la diminution du pH suite à la production des acides organiques, le diacétyle, une bactériocine ou à une synergie entre ces facteurs.

Dix isolats appartenant au genre *Lactobacillus* identifiées en tant que l'espèce *Lactobacillus plantarum* ont été sélectionnées selon leur action antimicrobienne vis-à-vis les six bactéries pathogènes pour étudier leur potentiel probiotique.

La résistance à l'acidité de l'estomac et à la bile constituent les principaux critères de sélection des souches probiotiques. Parmi les dix souches seulement cinq ont été capables de résister à un pH 2 pendant 3 heures avec une réduction dans leurs nombre, le taux de viabilité le plus élevé était 70,86% présenté par la souche LB8. Ce résultat a été rapporté dans plusieurs études antérieures (Tsai *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2010; Tulomoglou *et al.*, 2013). Tous les isolats ont été résistants à pH 3 pendant 3h avec un taux de viabilité qui varie de 90.89% à 99.35%, ces résultats sont en accord avec des études précédentes (Guo *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2014). La concentration de 0,3% de sels biliaires n'a pas une grande influence sur la totalité des souches, le taux de viabilité varie de 91.78% à 92.01%. plusieurs études ont montré que la majorité des souches lactiques ont survécu bien dans la concentration de 0.3% sels biliaire (Maragkoudakis *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2014) .

La détermination de l'adhésion microbienne aux hydrocarbures est un moyen efficace pour estimer la capacité d'une souche à adhérer aux cellules épithéliales (Vinderola et Reinheimer, 2003). L'hydrophobicité des souches de *Lactobacillus plantarum* vis-à-vis le

toluène a été évaluée, elle varie de 18% et 85%. Les valeurs d'autoagrégation sont comprises entre 12,75% et 70,39%. L'hydrophobicité et l'auto-agrégation sont considérés comme des caractères nécessaires à l'adhérence (Ren *et al.*, 2014), La souche LB27 a présenté une hydrophobicité et une autoagrégation élevée 82% et 70% respectivement. La capacité des souches de *Bifidobacterium spp.* d'origine humaine pour adhérer aux lignées cellulaires Caco-2 et HT29 a été associée à des valeurs élevées d'auto-agrégation et d'hydrophobicité (Pérez *et al.*, 1998; Del Re *et al.*, 2000).

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques de dix souches de *Lactobacillus plantarum* montrent qu'aucune souche n'était totalement sensible à tous les antibiotiques. Une sensibilité a été enregistrée pour le chloramphénicol, nitroxoline, pénicilline G, céfotaxime et pristinamycine et à la streptomycine à l'exception de 3 souches (LB15, LB18, LB22). Toutes les souches ont été résistantes à la ciprofloxacine, la tobramycine, l'acide nalidixique et la colistine, les souches LB15, LB18, LB27 ont été résistantes au céfixime, une résistance intermédiaire a été enregistré chez les deux souches LB22 et LB45. Des résultats similaires sont signalés précédemment (Herreros *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005; Ben moussa *et al.*, 2008). Ces résultats s'accordent aussi avec divers rapports indiquant que les bactéries lactiques sont normalement résistantes aux principaux types d'antibiotiques, tels que les  $\beta$ -lactamines, les céphalosporines, aminosides, quinolones, imidazoles, nitrofurantoïnes et fluoroquinolones (Halami *et al.*, 2000). La résistance des lactobacilles aux aminosides a été signalée par (Coppola *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005; Baumgartner *et al.*, 1998; Katala *et al.*, 2001).

Les édulcorants testés aspartame et acésulfame-k à toutes les concentrations testées n'ont pas interféré avec la croissance ni sur la viabilité des souches probiotiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Vinderola *et al.* 2002; Samona *et al.*, 1993; El-Kholy *et al.*, 2003). Les souches probiotiques se sont révélées insensible à la présence de saccharose à 6 et 12%. Vinderola *et al.* (2002) a rapporté que les probiotiques ont été moins sensibles à la présence des sucres comparant aux ferments lactiques, Shah et Ravula (2000) a rapporté que que à 12 et 16% sucre la survie des ferments starter (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) et les probiotiques (*Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium spp.*) a été négativement influencée. Le NaCl à 1 et 2% n'a pas affecté la viabilité et la croissance de toutes les souches *Lactobacillus plantarum*, Georgieva *et al.* (2009) a constaté que les concentrations de 3, 6, 8% sel généralement utilisés dans les procédés de fabrication de fromage n'ont pas affecté la viabilité des souches *L. plantarum*

probiotiques, elles ont été sensibles uniquement aux concentrations les plus élevées de NaCl (10%). Vinderola *et al.* (2002) ont trouvé qu'une concentration de 2% NaCl a inhibé la croissance des souches probiotiques de *Bifidobacterium*. Les arômes fraise, pêche et vanille aux concentrations 0,1 et 0,4% utilisés en industries laitiers n'ont présenté aucune influence sur la croissance ni sur la viabilité des *Lactobacillus plantarum* probiotiques. Vinderola *et al.* (2002) ont rapporté que les arômes pêche et fraise n'ont pas affecté la croissance des ferments lactiques et des souches probiotiques, El-Kholy *et al.* (2003) ont montré que les aromatisants n'ont présenté aucun effet sur le développement de ferments starter et des bactéries probiotiques.

La présence des édulcorants aspartame et acésulfame-K, saccharose, NaCl, et des arômes (fraise, vanille et pêche) n'a pas affecté de manière significative l'autoagrégation des souches *Lactobacillus plantarum*. Contrairement à l'hydrophobicité qui a été très significativement influencé par les édulcorants, aspartame et acésulfame-K cette influence était dose-dépendante, et souche- dépendante.

L'activité antibactériennes des probiotiques *Lactobacillus plantarum* contre les deux bactéries pathogènes *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 en présence des additifs alimentaires a été évaluée, les résultats ont montré que la présence de l'aspartame, acésulfame-K, saccharose, NaCl et les aromes (vanille, fraise et pêche) dans le milieu MRS a affecté significativement les zones d'inhibition contre les deux souches. En présence d'une concentration de 0,035% acésulfame-K, 12% saccharose et 2% NaCl seulement les zones d'inhibition de la souche LB27 contre *E. coli* ont significativement diminué.

L'activité de la totalité des souches contre *Salmonella typhimurium* à l'exception de la souche LB5 a été affecté en présence de l'aspartame et de l'acésulfame-K, saccharose à 6 et 12% et NaCl à 1% et 2%, Un effet souche dépendant et dose dépendant a été observé. À une concentration de 0,4%, les aromes vanille et pêche utilisés industriellement ont significativement affecté l'activité des souches LB8 et LB11 contre *Salmonella typhimurium*.

Toutes les souches de *Lactobacillus plantarum* ont présenté une activité protéolytique sur le milieu PCA-lait écrémé additionné des additifs alimentaires. Cela signifie que les additifs utilisés en industries alimentaires n'influent pas sur l'activité protéolytique des souches et ils n'interfèrent pas avec la capacité d'acidification du lait écrémé par les *Lactobacillus plantarum*.

L'application réussie des souches probiotiques dans l'industrie alimentaire dépendra de leur capacité à maintenir leur viabilité et leurs propriétés fonctionnelles intéressantes, en assurant la qualité et les allégations potentielles de santé probiotique du produit final (Ferrando *et al.*, 2016). À cet égard, les informations disponibles sur l'effet de divers additifs alimentaires sur les propriétés fonctionnelles des ferments lactiques et souches probiotiques restent limitées.

**CONCLUSION**

**ET**

**PERSPECTIVES**

## Conclusion et perspectives

L'objectif visé dans cette étude était d'isoler et d'identifier phénotypiquement des souches de bactéries lactiques à partir du pollen frais, évaluer leurs propriétés technologiques, étudier le potentiel probiotique des souches de *Lactobacillus* et enfin, étudier l'effet des additifs alimentaires utilisés en industrie alimentaire sur la croissance et la viabilité ainsi que certaines propriétés fonctionnelles des souches probiotiques.

L'identification phénotypique et biochimique nous a permis de caractériser trente-sept souches lactiques dont les espèces appartiennent principalement à ; *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *L. paraplantarum* et *L.farciminis*.

L'étude des propriétés technologiques des souches lactiques a montré qu'une seule souche a présenté un pouvoir acidifiant fort, toutes les souches sont protéolytiques, aucune n'est amylolytiques et seulement cinq sont lipolytiques.

Les souches lactiques ont présenté des résultats d'activité antifongique importants contre *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*. De même que, Des résultats remarquables sont enregistrés pour l'activité antibactérienne des lactobacillus contre les bactéries pathogènes et d'altération. Ceci renforce leur éventuelle utilisation pour des fins de bio-préservation et de bio-contrôle.

Pour l'étude du potentiel probiotique, dix souches appartenant à l'espèce *Lactobacillus plantarum* ont été sélectionnées. Les résultats ont montré que cinq souches ont présenté une bonne résistance aux conditions de l'environnement gastro-intestinal, la tolérance des souches à l'acidité peut être due à l'adaptation des souches à l'acidité connue des grains de pollen, de bons résultats d'hydrophobicité et d'autoagrégation ont été enregistrés.

Pour l'aspect sécuritaire des souches probiotiques ; un bon profil de résistance aux antibiotiques a été obtenu pour l'ensemble des souches, ceci peut être expliqué, au fait que nos souches sont d'origine végétale loin de l'utilisation des antibiotiques. L'absence de tout signe d'hémolyse indique l'aspect sécuritaire de nos souches.

Cinq souches de *Lactobacillus plantarum* ont été choisies à la base des critères *in vitro* communément admise pour évaluer l'effet des additifs alimentaires utilisés en industrie alimentaire sur leur croissance et survie, ainsi que pour évaluer d'éventuel effet sur les

propriétés fonctionnelles. En effet, aucune influence n'a été enregistré sur la croissance et la viabilité, l'autoagrégation, la protéolyse et l'acidification des souches probiotiques, tandis que l'hydrophobicité a été affecté par les édulcorants et l'activité antibactérienne a été influencée par la présence des édulcorants, du saccharose, NaCl et des arômes, L'effet a été souche dépendant et dose dépanadant.

Devant ces résultats, il semble que le pollen présente une source importante pour l'isolement des bactéries lactiques avec des applications potentielles.

La présente étude nous a permis d'ouvrir les perspectives suivantes :

- ✓ Une caractérisation des activités enzymatiques des souches lactiques ; car, un bon produit fermenté nécessite une meilleure connaissance des activités métaboliques des souches.
- ✓ Une caractérisation des métabolites intervenant dans les activités antifongique et antibactérienne des isolats lactiques.
- ✓ Il est intéressant d'étudier l'effet des additifs alimentaires sur d'autres bactéries probiotiques et ferments lactiques, avec une gamme large d'additifs alimentaires.
- ✓ les produits alimentaires contiennent plusieurs additifs simultanément, il est nécessaire d'évaluer l'éventuelle influence de cette combinaison sur les probiotiques et les ferments lactiques.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

**Alakomi H L, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander I M. 2000.** Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 2001-2005.

**Ammor M S, Flórez A B, Van Hoek A H, De Los Reyes-gavilán C G, Aarts H J, Margolles A, Mayo B. 2007.** Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 14(1-3),6-15

**Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. 2006.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food control*. 17, 6, 454-461.

**Amrouche T. 2005.** Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries: analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de doctorat. Université Laval.

**Anses. 2012.** *Aspergillus flavus* et autres moisissures productrices d'aflatoxines , Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments.

**Antoine JM. 2011.** Current challenges for probiotics in food. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. CRC Press London, UK.220-221.

**Argyri A A, Zoumpopoulou G, Karatzas K A G, Tsakalidou E, Nychas G J E, Panagou E Z, Tassou C C. 2013.** Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology*, 33(2): 282-291.

**Aso Y, Akaza H, Kotake T, Tsukamoto T, Imai K, Naito S. 1995.** Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a doubleblind trial. The BLP Study Group. *European urology*. 27, 104–109.

**Axelsson L. 2004.** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, Salminen S, von Wright A, and Ouwehand A. (Eds), Marcel Dekker, Inc. New York. pp.19-85.

- Ayad E H E, Nashat S, El-Sadek N, Metwaly H, El-Soda M. 2004.** Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food microbiology*. 21,6, 715-725.
- Banaszkiewicz A, Szajewska H. 2005.** Ineffectiveness of LGG as an adjunct to lactulose for the treatment of constipation in children: a doubleblind, placebo-controlled randomized trial. *The Journal of Pediatrics*, 146, 364–369.
- Baumgartner A, Kueffer M, Simmen A, Grand M. 1998.** Relatedness of *Lactobacillus rhamnosus* Strains Isolated from Clinical Specimens and Such from Food-stuffs, Humans and Technology. *LWT-Food Science and Technology*. 31, 5, 489-494.
- Belhadj H, Harzallah D, Bouamra D, Khennouf S, Dahamna S, Ghadbane M. 2014.** Phenotypic and genotypic characterization of some lactic acid bacteria isolated from bee pollen: a preliminary study. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 33,1:11-23.
- Belhadj H, Harzallah D, Khennouf S, Dahamna S, Bouharati S, Baghiani A.2010.** Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from Algerian honeybee collected pollen. *Acta Hort (ISHS)*. 854: 51-58.
- Ben Moussa O, Mankai M, Setti K, Boulares M, Maher M, Hassouna M. 2008.** Characterisation and technological properties of psychotropic lactic acid bacteria strains isolated from Tunisian raw milk. *Annals of microbiology*. 58, 3, 461-469.
- Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Gil A. 2012.** Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 61(2): 160-174.
- Bettache G, Fatma A, Miloud H, Mebrouk K. 2012.** Isolation and identification of lactic acid bacteria from Dhan, a traditional butter and their major technological traits. *World Applied Sciences Journal*, 17(4) : 480-488.
- Boulares M, Aouadhi C, Mankai M, Ben Moussa O, Essid I, Hassouna M. 2012.** Characterisation, identification and technological properties of psychotropic lactic acid bacteria originating from Tunisian fresh fish. *Journal of Food Safety*. 32(3): 333-344
- Brunser O, Gotteland M.2010.** Probiotics and Prebiotics in Human Health: An Overview. *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*, 73.

- Bu LN, Chang M H, Ni YH, Chenh L, Cheng CC. 2007.** *Lactobacillus caseirhamnosus*Lcr35 in children with chronic constipation. *Pediatrics International*. 49(4): 485-490.
- Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. 2005.** Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCNCFM. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 8344–8351.
- Buffa M, Morais J, Jimenez-Belenguer A, Hernandez-Gimenez E, Guamis B. 2005.** Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from raw ewes' milk for cheese making. *Milchwissenschaft*, 61, 404–407.
- Cabo M L, Braber A F, Koenraad P M F J. 2002.** Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *Journal of Food Protection*. 65, (8) :1309-1316.
- Carle S. 2009.** La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel*. 42.
- Carr F J, Chill D, Maida N. 2002.** The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4) : 281-370.
- Chen T, Isomaki P, Rimpilainen M, Toivanen P. 1999.** Human cytokine responses induced by gram-positive cell walls of normal intestinal microbiota. *Clinical and Experimental Immunology*.118: 261–267.
- codex Alimentarius. 1995** . systeme international de numérotation des additifs alimentaires section 5.2, Volume 1A .
- Collado M C, Gueimonde M, Salminen S. 2010.** Probiotics in adhesion of pathogens: mechanisms of action. *Bioactive Foods in Promoting Health*. 23: 353-370.
- Collado MC, Gueimonde M, Hernández M, Sanz Y, Salminen S.2005.** Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in entéropathogène exclusion. *Journal of Food Protection*. 68: 2672–2678.
- Comité De L'antibiogramme De La Societe Francaise De Microbiologie, Recommandations 2013.**

- Çon A H, Gökalp H Y, Kaya M. 2001.** Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua* of a bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. *Meat science*. 59, (4): 437-441.
- Conway P L, Gorbach S L, Goldin B R. 1987.** Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of dairy science*. 70, (1): 1-12.
- Coppola R, Succi M, Tremonte P, Reale A, Salzano G, Sorrentino E. 2005.** Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Le Lait*. 85(3), 193-204.
- Cruz A G, Faria JA F, Van Dender A G F. 2007.** Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*. 4: 951–956.
- Cutting SM. 2011.** Bacillus probiotics. *Food Microbiology*. 28(2): 214-220.
- Das D, Goyal A. 2012.** Lactic acid bacteria in food industry. In: *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Springer Netherlands. 757-772.
- Davidson M P, Juneja V K, Branen J K. 2001.** Antimicrobial Agents. In *Food Additives*. CRC Press.
- De Apodaca M O, Selgas M D, Ordoñez J A. 1993.** Lipolytic and proteolytic activities of micrococci isolated from cheese. *Food research international*. 26, (5): 319-325.
- De Vries M C, Vaughan E E, Kleerebezem M, de Vos W M. 2006.** *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*. 16, (9): 1018-1028.
- Deepika G, Charalampopoulos D. 2010.** Surface and adhesion properties of lactobacilli. *Advances in applied microbiology*, 70: 127-152.
- Deepika G, Rastall R A, Charalampopoulos D. 2011.** Effect of food models and low-temperature storage on the adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG to Caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(16): 8661-8666.
- Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. 2000.** Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in applied microbiology*, 31(6): 438- 442.

**Djidjel Aicha. 2007.** Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* sur jus de datte : Cinétique et optimisation en cultures discontinues, semi-continues et continues. these de doctorat, institut national polytechnique de lorraine, France.

**Dortu C, Thonart P. 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1) : 143.

**Drago L, Gismondo MR, Lombardi A, de Haen C, Gozzini L. 1997.** Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiology Letters*. 153: 455–463.

**Du Toit M, Franz C M A P, Dicks L M T, Schillinger U, Haberer P, Warlies B, Ahrens F, Holzapfel W H. 1998.** Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International journal of food microbiology*. 40, (1): 93-104.

**Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, Morrissey D, Thornton G, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Quigley E MM, O'Sullivan G C, Shanahan F, Collins J K. 1999.** Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. In: *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Springer Netherlands, 279-292.

**Dworkin M. 2006.** The Prokaryotes ,Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.). Springer Science & Business Media.

**El-Kholy A M, Shatta A A, Osman M M.** Fermented food products: influence of some food additives on the growth and acid development of lactic acid starter and probiotic bacteria. Proc. *The 1st International Conf. "Food for Better Health"*, NRC, 18-20 October 2003, Cairo, Egypt.

**Essid I, Medini M, Hassouna M. 2009.** Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat science*. 81, (1), 203-208.

**FAO/WHO. 2002.** Guidelines for the evaluation of probiotics in food – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Meeting Report, London Ontario, Canada.

**Ferrando V, Quiberoni A, Reinheimer J, Suárez V. 2016.** Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: A study in vitro of heat stress influence. *Food Microbiology*, 54:154-161.

**Fleming H P, Etchells J L, Costilow R N. 1975.** Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Applied microbiology*, 30( 6):1040-1042.

**Fotiadis C I, Stoidis C N, Spyropoulos B G, Zografos E D. 2008.** Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 14(42): 6453-6457.

**Francavilla R, Tripaldi M E, Praitano M, Lionetti E, Miniello V L. 2013.** Probiotics and *Helicobacter pylori*. *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health*, 325.

**Franciosi E, Settanni L, Cavazza A, Poznanski E. 2009.** Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International dairy journal*. 19(1): 3-11.

**Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. 2011.** Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International journal of food microbiology*. 151(2), 125-140.

**Fuller R. 1992.** History and development of probiotics. In: Probiotics, the scientific basis, Fuller R. (Ed.), Chapman & Hall. London, UK. pp 1–8.

**Fuller, R .1989.** Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66:365-78.

**Fung WY, Lye H S, Lim T J, Kuan C Y, Liong M T. 2011.** Roles of Probiotic on Gut Health. In Probiotics. Springer Berlin Heidelberg. 139-165

**Gardiner G E, O’Sullivan E, Kelly J, Auty M A, Fitzgerald G F, Collins J K, Ross R P, Stanton C. 2000.** Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*.66: 2605– 2612.

**Gaudreau H, Champagne CP, Remondetto G E, Bazinet L, Subirade M. 2013.** Effect of catechins on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria. *Food Research International*. 53, 751–757.

- Georgieva R, Iliev I, Haertlé T, Chobert J M, Ivanova I, Danova S. 2009.** Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Dairy Journal*. 19 (11): 696-702.
- German B J. 2001.** Antioxidants. In Food Additives. CRC Press.
- Giraffa G. 2003.** Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of food microbiology*. 88 (2): 215-222.
- Giraud E, Champailler A, Raimbault M. 1994.** Degradation of raw starch by a wild amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental microbiology*. 60(12): 4319-4323.
- Gobbettia M, Lanciotti R, De Angelis M, Corbo M R, Massini R, Fox P. 1999.** Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and a w on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(10): 795-809.
- Gomes A M P, Teixeira M G M, Malcata F X. 1998.** Viability of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in milk: sodium chloride concentration and storage temperature. *Journal of food processing and preservation*. 22(3): 221-240.
- Gómez L C, Muñoz S, Gil A. 2010.** Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(03), 381-389
- Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U. 2004.** Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Journal of bacteriology*. 186(16): 5432-5441.
- Guandalini S, Pensabene L, Zikri M A, Dias J A, Casali L G, Hoekstra H, Kolacek S, Massar K, Micetic-Turk D, Papadopoulou A, de Sousa J S, Sandhu B, Szajewska H, Weizman Z. 2000.** *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 30(1): 54-60.

**Guglielmotti D M, Marcó M B, Golowczyc M, Reinheimer J A, Quiberoni A D L. 2007.** Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *International Dairy Journal*, 17(8): 916-925

**Guiraud J P. 2003.** Microbiologie alimentaire. dunod. Paris

**Guo X H, Kim J M, Nam H M, Park SY, Kim J M. 2010.** Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties. *Anaerobe*. 16(4): 321-326.

**Hammes W P, Vogel R F. 2012.** The genus *Lactobacillus*. In: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Holzapfel, W H N, Wood B J. (ed), Springer Science & Business Media , vol 2, p 19.

**Herrero M, Mayo B, Gonzalez B, Suarez J E. 1996.** Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*. 81(5): 565-570.

**Holzapfel W H, Wood B J. 2014.** Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. (Ed), John Wiley & Sons.

**Holzapfel, W. H. N., & Wood, B. J. 2012.** The genera of lactic acid bacteria. Springer Science & Business Media.

**Huckle B D, Zhang Z. 2011.** Maintenance and protection of probiotics. In: *Probiotics*. Springer Berlin Heidelberg. 87-108

**Hummel S, Veltman K, Cichon C, Sonnenborn U, Schmidt M A. 2012.** Differential targeting of the E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex by Gram-positive probiotic lactobacilli improves epithelial barrier function. *Applied and environmental microbiology*. 78(4) : 1140-1147.

**Izquierdo Alegre E. 2009.** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de doctorat. Institut pluridisciplinaire Hubert Curie, Strasbourg.

**Janda K. 2005.** The lipolytic activity of *Thermomyces lanuginosus* strains isolated from different natural sources. *International biodeterioration & biodegradation*. 55( 2): 149-152.

**Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. 2004.** DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology*. 26: 1358-1373

**Joffin J N, Leyral G. 2006.** Microbiologie technique « Tome 1 »: Dictionnaire des techniques. CRDP Aquitaine, Bordeaux.

**John Rp, Nampoothiri K M ,Pandey A.2007.** Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*.74(3): 524-534.

**Johnson-Henry K C, Mitchell DJ, Avitzur Y, Galindo-Mata E, Jones NL, Sherman PM. 2004.** Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori* infected mice. *Digestive diseases and sciences*.49: 1095–102.

Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 1-4 October 2001

**Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Isolauri E. 2007.** Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 119(4): 1019-1021.

**Kalliomaki, M., Salminen, S., Poussa, T., & Isolauri, E. 2007.** Probiotics during the first 7 years of life: A cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo controlled trial. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119: 1019–1021.

**Kandler O, Weiss N.1986.** Genus lactobacillus, in Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2, p. 1209-1234.

**Katla A K, Kruse H, Johnsen G, Herikstad H. 2001.** Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *International journal of food microbiology*. 67,(1):147-152.

**Kaushik J K, Kumar A, Duary R K, Mohanty A K, Grover S, Batish V K. 2009.** Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PloS one*.4, 12, e8099.

**Kawakami K. 2003.** Promising immunotherapies with Th1-related cytokines against infectious diseases. *Journal of Infections and Chemotherapy*. 9: 201-209 .

- Kelesidis T, Pothoulakis C. 2012.** Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic advances in gastroenterology*. 5(2): 111-125.
- Kenneally P M, Leuschner R G, Arendt E K. 1998.** Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. *Journal of Applied Microbiology*. 84(5): 839-846.
- Kidd P. 2003.** Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative Medicine Review*. 8: 223-246.
- Kolars JC, Levitt M D, Aouji M, Savaiano D A. 1984.** Yogurt—an autodigesting source of lactose. *New England Journal of Medicine*, 310(1): 1-3.
- Kowalczyk M, Mayo B, Fernández M, Aleksandrak-Piekarczyk T. 2015.** Updates on Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Light of “Omic” Technologies. In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Mozzi F, Raya R R, Vignolo G M.
- Kunji E R, Mierau I, Hagting A, Poolman B, Konings W N. 1996.** The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4): 187-221.
- Lahtinen S J, & Endo A. 2012.** Health effects of nonviable probiotics. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 4<sup>th</sup> Ed, 671-688.
- Lahtinen S, Ouwehand A C, Salminen S, von Wright A. 2012.** Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 4<sup>th</sup> Ed. CRC Press.
- Laref N, Guessas B. 2013.** Antifungal activity of newly isolates of lactic acid bacteria. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 13: 80.
- Larry Branen A, Haggerty R J. 2001.** Introduction to Food Additives. In Food Additives.
- Lauková Andrea. 2011.** Potential applications of probiotic, bacteriocin-producing enterococci and their bacteriocins. In: *lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press , p39-61.
- Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobbetti M. 2000.** Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough

*Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9): 4084-4090.

**Lee W, Shin J G, Kim E H, Kang H E, Yim I B, Kim J Y, Joo H G, Woo H J. 2004.** Immunomodulatory and antitumor effects *in vivo* by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* . *Journal of Veterinary Sciences*. 5: 41- 48 .

**Lee Y K, Khng H P. 2001.** Natural color additives. In Food Additives. CRC Press.

**Lee YK, Salminen S. 2009.** Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley & Sons.

**Leroy F, De Vuyst L. 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2): 67-78.

**Lilly D M, and Stillwell RH. 1965.** Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147(3659): 747-748

**Lin W H, Hwang C F, Chen L W, Tsen H Y. 2006.** Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology*. 23(1): 74-81.

**Litchfield J H. 1996.** Microbiological production of lactic acid. *Advances in applied microbiology*. 42:45-95.

**Liu M, Bayjanov J R, Renckens B, Nauta A, Siezen R J. 2010.** The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC genomics*. 11(1):1.

**Lorca GL, Wadstrom T, Valdez GF, Ljungh A. 2001.** *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter Pylori in vitro*. *Current Microbiology*. 42: 39–44.

**Lourens-Hattingh A, Viljoen B C. 2001.** Yogurt as probiotic carrier food. *International dairy journal*. 11, 1, 1-17.

**Lyra A, Lahtinen S, Ouwehand A C. 2011.** Gastrointestinal Benefits of Probiotics—Clinical Evidence. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* . Von Wright A (Ed.), 4<sup>th</sup> .CRC Press. 509-523

**Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjögren J, Schnürer J. 2003.** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 219 (1): 129-135.

- Magnusson, J., & Schnürer, J. 2001.** *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1) : 1-5.
- Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, Adriany T, Zoumpopoulou G, Tsakalidou E., Servin A, De Vuyst L. 2006.** Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enteric serovar Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*. 157(3): 241-247.
- Maragkoudakis P A, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. 2006.** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*. 16 (3):189-199.
- Mastrandrea F, Coradduzza G, Serio G, Minardi A, Manelli M, Ardito S, Muratore L. 2004.** Probiotics reduce the CD34 + hemopoietic precursor cell increased traffic in allergic subjects. *Allergy and Immunology*. 36: 118-122
- Mataragas M, Drosinos E H, Metaxopoulos, J. 2003.** Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2 C. *Food Microbiology*. 20(2): 259-265.
- Mathur S, Singh R. 2005.** Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International journal of foodmicrobiology*. 105(3): 281-295.
- Mattila-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M. 2002.** Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. 12(2): 173-182.
- McCann D, Barrett A, Cooper A, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K, Sonuga-Barke E. 2007.** Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The lancet*, 370(9598) : 1560-1567.
- McFarland LV. 2009.** Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe*. 15: 274–280
- Meyer A, Deiana J, Bernard A. 2004.** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. *Doin*, France.

- Meyers S A, Cuppett S L, Hutkins R W. 1996.** Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. *Food Microbiology*. 13(5): 383-389.
- Minelli E B, Benini A, Marzotto M, Sbarbati A, Ruzzenente O, Ferrario R, Hendriks H, Dellagli F. 2004.** Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal*. 14(8): 723-736.
- Mishra V, Prasad D N. 2005.** Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1):109-115.
- Mohammadi R, Mortazavian A M. 2011.** Technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks. *Food Reviews International*. 27: 192–212.
- Montel M C, Masson F, Talon R. 1998.** Bacterial role in flavour development. *Meat Science*.49: S111-S123.
- Morandi S, Brasca M, Andrighetto C, Lombardi A, Lodi R. 2006.** Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north–west Italian dairy products. *International Dairy Journal*. 16(8): 867-875.
- Mortazavian A M, Khosrokhvar R, Rastegar H, Mortazaei G R. 2010.** Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of freshly made probiotic Doogh (Iranian fermented milk drink). *Italian Journal of Food Science*. 22: 98–102.
- Muhialdin B J, Hassan Z, Sadon S Kh. 2011.**Antifungal Activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004, and *L. paracasi* D5 on Selected Foods. *Journal of food science*. 76(7) : M493-M499.
- Müller T. 1990.** Comparison of methods for differentiation between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 145 (5) : 363-366.
- Nes I F, Kjos M, Diep D B.** Antimicrobial components of lactic acid bacteria. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 4th ed. CRC Press, London, 2011, p. 285-329.

- Nieto-Arribas P, Poveda J M, Seseña S, Palop L, Cabezas L. 2009.** Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*. 20(12): 1092-1098.
- Niku-Paavola M L, Laitila A, Mattila-Sandholm T, Haikara A. 1999.** New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 86 (1):29-35
- Nilsson P E. 1956.** Some characteristics of the silage microflora. *Archives of Microbiology*. 24(4): 396-411.
- Ogier JC, Son O, Gruss A, Tailliez P, Delacroix-Buchet A. 2002.** Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3691–701.
- Otles S. 2013.** Probiotics and prebiotics in food, nutrition and health.(ed). CRC Press.
- Ouwehand AC, Salminen S, Tolkkio S, Roberts P, Ovaska J, Salminen E. 2002.** Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*.9: 184–186.
- Ouwehand AC. 1998.** Antimicrobial components from lactic acid bacteria, in: Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects Salminen S, von Wright A (eds).. New York, Dekker, 139–159
- Ouwehand, A C, Kirjavainen P V, Shortt C, Salminen S. 1999.** Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*. 9(1): 43-52.
- Parente E, Rota M A, Ricciardi A, Clementi F. 1997.** Characterization of natural starter cultures used in the manufacture of Pasta Filata cheese in Basilicata (Southern Italy). *International Dairy Journal*, 7(12) : 775-783.
- Parker R B. 1974.** Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health*, 29(29): 4-8.
- Pelletier X, Laure-Boussuge S, Donazzolo Y. 2001.** Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactose intolerant male subjects: importance of the live flora. *European journal of clinical nutrition*, 55(6): 509-512.

- Pérez P F, Minnaard Y, Disalvo E A, De Antoni G L. 1998.** Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 21-26.
- Pintado M M, Gomes A M, Freitasb A C. 2014.** Probiotics and Their Therapeutic Role. In: *Probiotic Bacteria: Fundamentals, Therapy, and Technological Aspects*,e Silva J P S, Freitas A C. (Ed). CRC Press.
- Piquepaille C.** Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales .thèse de doctorat. Université de limoges.
- Pitt J I, Hocking A D. 2009.** Fungi and food spoilage. New York: Springer. 519
- Pot B, Felis G E, Bruyne K D. 2014.** The genus *Lactobacillus*. In: *Lactic Acid Bacteria; Biodiversity and Taxonomy*. Holzapfel W H, Wood B J. (Ed). John Wiley & Sons. p. 249-353.
- Prasad J, Gill H, Smart J, Gopal P K. 1998.** Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal*, 8(12): 993-1002.
- Rada V, Dlabal J.1998.** Susceptibility of bifidobacteria to nisin. *Letters in applied microbiology*. 26(2): 123-125.
- Ramchandran L, Shah N P. 2008.** Effect of Versagel® on the growth and metabolic activities of selected lactic acid bacteria. *Journal of food science*, 73(1).
- Ranadheera R D C S, Baines S K, Adams M C. 2010.**Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*. 43(1): 1-7.
- Ren D, Li C, Qin Y, Yin R, Du S, Ye F, LIU C, liu H,Wang M, Li L, Sun Y, Li X, Tian M, Jin N. 2014.** *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*. 30: 1-10.
- Rolfe R D. 2000.**The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of nutrition*. 130 (2): 396S- 402.

**Rolfe RD.1991.** Population dynamics of the intestinal tract; in Blankenship LC (ed) : Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry. San Diego, Academic Press, pp 59–75.

**Rosenberg M, Gutnick, D, Rosenberg E. 1980.** Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology letters*, 9(1): 29-33.

**Rubio R, Jofré A, Martín B, Aymerich T, Garriga M. 2014.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food microbiology*. 38: 303-311.

**Rusch V. 2002.** Probiotics and definitions: a short overview. *Herborn Litterae*.

**Russell J B, Diez-Gonzalez F. 1997.** The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in microbial physiology*, 39: 205-234.

**Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. 2000.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*. 84 (3): 197-215.

**Sahnouni f.2013.** Isolement, identification biochimique et technologique des bactéries lactiques isolées de poissons marins (*Sardina pilchardus* et *Boopsboops*) pêchés dans la côte occidentale algérienne et mise en évidence de leur pouvoir bioconservateur Cas de la crevette rose (*Aristeus antennatus*). These de doctorat. Université d’Oran, Algerie.

**Salminen S, Hallikainen A. 2001.** Sweeteners. In *Food Additives*. CRC Press.

**Salminen S, Wright A V, Ouwehand A. 2004.** Lactic acid bacteria microbiological and functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., U.S.A.

**Salvatore S, Vandenplas Y. 2010.** Prebiotics and Probiotics in Therapy and Prevention of Gastrointestinal Diseases in Children. in: *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*, 181.

**Samona A, Robinson R K.1993.** Effect of sweetening agents on the growth and survival of *Bifidobacterium* spp. *Journal of Dairy Science*.76(1): 120.

- Sarantinopoulos P, Andrighetto C, Georgalaki M D, Rea M C, Lombardi A, Cogan TM, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E. 2001.** Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*. 11: 621–647.
- Sathe S J, Nawani N N, Dhakephalkar P K, Kapadnis B P. 2007.** Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of applied microbiology*. 103(6): 2622-2628.
- Savaiano D A, AbouElAnouar A, Smith D E, Levitt M D. 1984.** Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *The American journal of clinical nutrition*. 40(6): 1219-1223.
- Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P. 2006.** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(4): 394-406.
- Schaer-Zammaretti P, Ubbink J. 2003.** Imaging of lactic acid bacteria with AFM—elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. *Ultramicroscopy*, 97(1): 199-208.
- Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger T A, Stange E F, Fellermann K. 2007.** Induction of human  $\beta$ -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infection and immunity*. 75(5): 2399-2407.
- Schnürer J, Magnusson J. 2005.** Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*. 16 (1): 70-78.
- Schultz M. 2008.** Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 14(7): 1012-1018.
- Senok A C, Ismaeel A Y, Botta G A. 2005.** Probiotics: Facts and myths. *Clinical Microbiology and Infection*. 11(12): 958-966.
- Sepp E, Julge K, Mikelsaar M, Bjorksten B. 2005.** Intestinal microbiota and immunoglobulin E responses in 5-year-old Estonian children. *Clinical and Experimental Allergy*. 35: 1141–1146.
- Servin A L, Coconnier M H. 2003.** Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 17(5): 741-754.

- Servin AL. 2004.** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS microbiology reviews*. 28: 405–440.
- Shah N P, Ravula R R. 2000.** Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*. 55(3): 127.
- Shah N P. 2007.** Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 17(11): 1262-1277.
- Shornikova A V, Casas I A, Isolauri E, Mykkänen H, Vesikari T. 1997.** *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 24: 399–404.
- Singh K, Kallali B, Kumar A, Thaker V. 2011.** Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1(2): 287-S290.
- Smolyansky J. 2010.** Probiotics: A Historical Perspective. In: *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*, Watson R R, Preedy V R. (Ed), Elsevier, USA. pp 43.
- Sondergaard A k. 2005.** Application of probiotics in food.in: *Bacteries lactiques et probiotiques*, ed Lavoisier .
- Sperty G S. 1971.** Probiotics. *West Point, Conn.: Avi Publishing*.
- Stirling A C, Whittenbury R. 1963.** Sources of the lactic acid bacteria occurring in silage. *Journal of applied bacteriology*. 26(1): 86-90.
- Sugita Y H. 2001.** Flavor enhancers. In *Food additives*. CRC Press.
- Sumner S S, Eifert J D. 2001.** Risks and benefits of food additives. In *Food Additives*. CRC Press.
- Švec P C, Franz M AP.2004.** The genus *Enterococcus*. In: *Lactic Acid Bacteria biodiversity and taxonomy*. 3 edition. P 175-211
- Swanson M A, Evenson P. 2001.** Nutritional additives. In *Food Additives*. CRC Press.
- Tachon S, Lee B, Marco M L. 2014.** Diet alters probiotic *Lactobacillus* persistence and function in the intestine. *Environmental microbiology*, 16(9): 2915-2926.

- Tamime A Y, Saarela M A K S, Sondergaard A K, Mistry V V, Shah N P. 2005.** Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. *Probiotic dairy products*. 39-72.
- Tannock G W, Dashkevich M P, Feighner S D. 1989.** Lactobacilli and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(7): 1848-1851.
- Teuber M, Meile L, Schwarz F. 1999.** Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76(1-4): 115-137.
- Thorngate J H. 2001.** Synthetic Food Colorants. In Food Additives. CRC Press.
- Trias R, Bañeras L, Seguí E M, Romanyó E B. 2008.** Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*. 11(4): 231-236.
- Tripathi M K, Giri S K. 2014.** Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*. 9: 225-241.
- Tulumoglu S, Yuksekdog Z N, Beyatli Y, Simsek O, Cinar B, Yaşar E. 2013.** Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe*. 24: 36-42.
- Tuomola E M, Salminen S J. 1998.** Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. *International journal of food microbiology*. 41(1): 45-51.
- Vachon H, Ustunol Z. 1998.** Effect of sweetener type on lactic and acetic acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. 82: 7.
- Vásquez A, Olofsson TC. 2009.** The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of apicultural research*. 48(3):189-195.
- Vinderola C G, Mocchiutti P, Reinheimer J A. 2002.** Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*. 85(4): 721-729.
- Vinderola C G, Reinheimer J A. 2003.** Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*. 36 (9): 895-904.

**Vinderola G, Capellini B, Villarreal F, Suárez V, Quiberoni A, Reinheimer J. 2008.** Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT-Food Science and Technology*. 41(9):1678-1688.

**Wang C Y, Lin PR, Ng CC, Shyu YT. 2010.** Probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*. 16(6): 578-585.

**Wang K Y, Li S N, Liu C S, Perng D S, Su Y C, Wu D C, Jan C M, Lai C H, Wang T N, W M Wang. 2004.** Effects of ingesting Lactobacillus and Bifidobacterium containing yoghurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *American Society for Clinical Nutrition*, 80: 737-41.

**Wilderdyke MR, Smith DA, Brashears MM. 2004.** Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria from alfalfa sprouts for competitive inhibition of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 67: 947-51.

**Xu H, Jeong H S, Lee H Y, Ahn J. 2009.** Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in applied microbiology*, 49(4): 434-442.

**Yang E J, Chang H C. 2008.** Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Korean Society for Microbiology and Biotechnology*. 36(4): 276-284.

**Yoon H, Benamouzig R, Little J, Francois-Collange M, Tome D. 2000.** Systematic review of epidemiological studies on meat, dairy products, and egg consumption and risk of colorectal adenomas. *European Journal of Cancer Prevention*. 9: 151-164.

**Zhang Y, Zhang L, Du M, Yi H, Guo H, Tuo Y, Han X, Li J, Zhang L, Yang L . 2011.** Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiological research*. 167(1): 27-31.

**Zhou J S, Pillidge C J, Gopal P K, Gill H S. 2005.** Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. *International journal of food microbiology*. 98(2): 211-217.

# **ANNEXE**

## Annexe

### Principaux Milieux de culture

#### Boullion de Reddy

Peptone	5.0 g
Extrait de levure	5.0 g
K <sub>2</sub> HP04	1.0 g
Arginine hydrochloride	5.0 g
Citrate de sodium	2.0 g
Pourpre de bromocrésol	0.002 g
Eau distillée	1000 mL
pH ajusté à 6.2. 5ml. Autoclavage (121°C-15 min)	

#### Gélose a l'esculine

Peptones	10g
Esculine	1.0g
Citrate de fer ammoniacal	1,0g
Agar-agar	15g
Eau distillée (qsp)	1000 ml
pH 7.5 ,autoclavage (121°/15min)	

#### Gélose au tween

peptone	10g
Nacl	5g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0, 1g
Agar	20g
H <sub>2</sub> O distillée qsp	1000 ml
Tween	10 ml
pH ajusté a 6	

le tween est stérilisé séparé parement, ajouté au milieu après autoclavage

#### Lait écrémé à 10%

Lait écrémé en poudre	100 g
H <sub>2</sub> O distillée qsp	1000 ml
pH 7, sterilistaion par autoclavage à 110°C/ 10 min	

#### Gélose à l'amidon

Peptone	5g
Extrait de levure	7g
NaCl	2g
Amidon soluble	20 g
agar	15g
H <sub>2</sub> O	1000ml

