

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie Alimentaire et santé



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Evaluation des aptitudes probiotiques des
lactobacilles isolés du beurre et du L'ben**

Présenté par :

ADOUR Kahina & DABOUZ Salima

Soutenu le : **13 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

M. BENDJEDDOU.K
Mme. BENACHOUR.K
Melle. BENDALI.F

MCB
MAA
MCA

Président
Encadreur
Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Bien que la réalisation d'un mémoire ait toute l'apparence d'un long parcours universitaire solitaire, diverses personnes ont contribué à différents degrés à mener à bien ce projet parfois périlleux, avec ses hauts et ses bas.

Nous Remercions, en premier lieu, Allah pour nous avoir donnée la force, le courage et la résolution pour réaliser se travail.

On tient aussi à remercier notre promotrice M^{me} BENACHOUK, d'avoir dirigé ce travail, on lui dit merci pour tous les moments qu'on a passé avec vous, ils sont gravés a jamais.

*Nos plus vifs remerciements vont aussi aux membres du jury :
M. BENDJEDDOU K , merci monsieur de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury et d'examiner ce travail , et un grand merci pour votre disponibilité et vos précieux conseils.*

M^{me}. BENDALI F , merci madame d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et de contribuer à améliorer sa qualité.

Ce travail a été réalisé au sein de Laboratoire de microbiologie générale,

Et cette étude a été menée grâce à la contribution de ces laboratoires cités ci-après :

Laboratoire de Microbiologie générale, Université de Bejaia, sous l'orientation de M^{me} REHMANI

Laboratoire Environnement, Université de Bejaia , sous la direction de M. NABTI H

Laboratoire de Biologie Physico-chimique (BPC), Université de Bejaia, sous l'orientation de M^{elle} TABTI N ,

On exprime notre profonde reconnaissance aux responsables de ces laboratoires pour l'aide et les moyens humains et matériel qui nous ont apporté, ce qui nous a permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Finalement, on remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à L'accomplissement de ce mémoire. A vous tous, un grand Merci

Dédicaces :

Louanges à Allah, seigneur de L'univers ; que la salutation d'Allah soient sur son messager qu'il a envoyé en qualité de miséricorde universelle, ainsi que sur ses compagnons et ses frères jusqu'à la résurrection.

Je dédie ce modeste travail à :

La mémoire de ma très chère mère, qui a veillé sur mon éducation, que dieu L'accueille dans son vaste Paradis.

A mon père qui ma encourager durant tous mon cursus universitaire, je souhaite qu'il soit heureux pour tout le reste de sa vie.

A mon cher frère Bilal , mes adorables petites sœurs Samira et Imen .

A ma binôme Kahina à qui je présente mes sincères remerciements de m'avoir supporté durant tout ce travail.

A toute ma familles plus élargie, mes amies

A toute la promotion microbiologie alimentaire et santé.

Salima

Dédicaces :

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, la lumière de ma vie, que Dieu vous gardes pour moi en bonne santé.

A mes frères Samir, Sofiane et Mourad.

A mon âme sœur Nabila je lui dis merci pour ton soutien et ta patience, je t'adore ma chérie.

A toutes mes amies en particulier Meriem, merci d'exister dans ma vie tout simplement !

A ma binôme Salima avec qui j'ai partagé ce travail, je lui souhaite la réussite et le bonheur dans sa vie.

A tous ceux qui m'ont soutenu de loin ou de près.

Kahina

Liste des abréviations

ATB : Antibiotique

BAL: Lactic Acid Bacteria

BHIB : Braint Heart Infusion Broth

DO : Densité Optique

Δ **DO** : delta de densité optique

E: *Escherichia*

Ec: *Enterococcus*

FAO : Food and Agriculture Organization

GRAS: Generally Regarded As Safe

KPC : *Klebsiella*.

Lb. *Lactobacillus*

MH : Muller Hinton

MRS : de Man-Rogosa et Sharp

N: normalité

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : phosphate buffered saline

rpm : reptation par minute

S : *Staphylococcus*

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

sp : species

ssp : Subspecies

T : Temps.

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des Lactobacilles.....	06
Tableau II : Principales espèces et sous espèces de lactobacilles utilisées en industrie laitière	07
Tableau III : Origine et charge initiale des souches pathogènes.....	12
Tableau IV : Liste d'antibiotiques utilisé	21
Tableau V : Les caractéristiques des souches de lactobacilles.....	23
Tableau VI : Résultats de l'activité inhibitrice des surnageants natifs	33
Tableau VII : Résultats de l'activité inhibitrice des surnageants neutralisés	35
Tableau VIII : diamètre de zones d'inhibition des antibiotiques vis à vis des lactobacilles..	36

Liste des Tableaux en Annexe

Tableau I : Résultats de la standardisation

Tableau II : Résultat de test de résistance au sel biliaire à 0, 3%

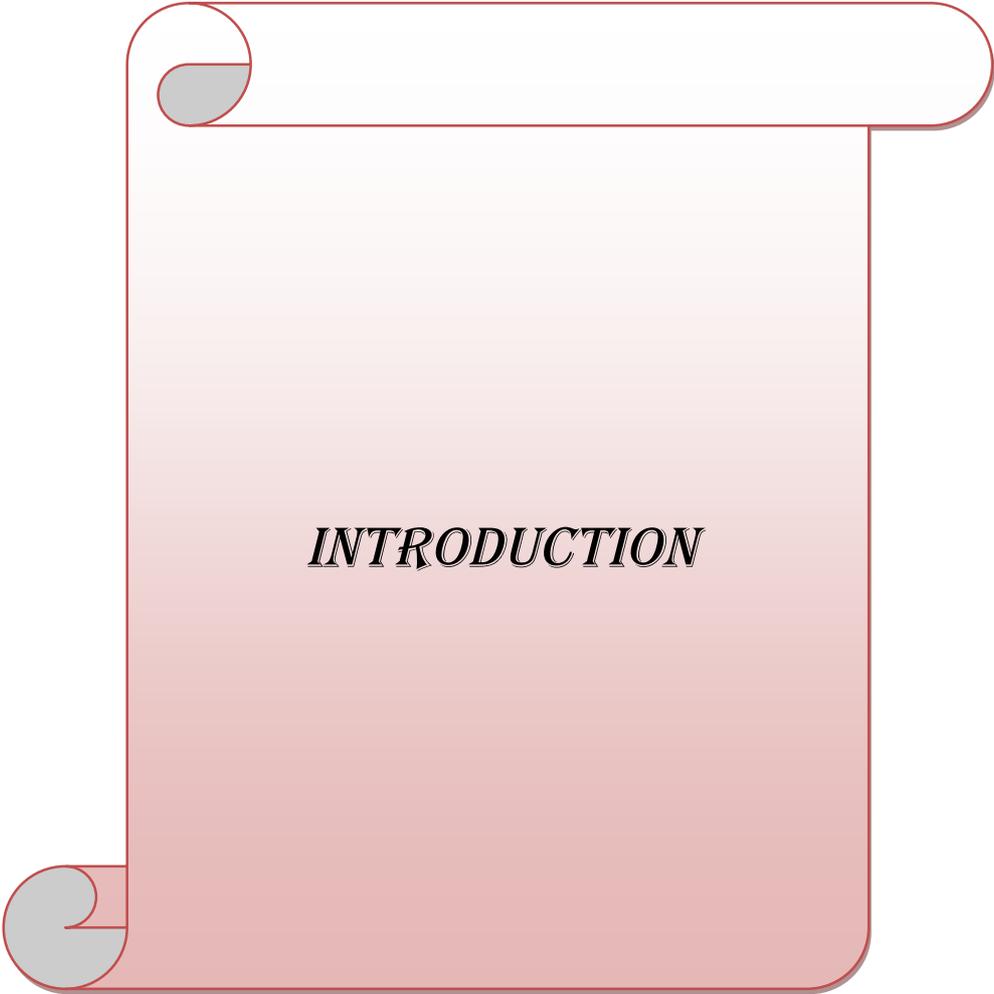
Tableau III : résultat de test de résistance au stimulus stomaco- duodéнал et aux sels biliaires à un pH= 3

Tableau IV : Résultat de test d'adhésion

Tableau V : Résultats de test de spot

Liste des figures

Figure 01 : Aspect morphologique de quelques espèces de Lactobacilles.....	05
Figure 02 : Mécanismes d'action des probiotiques contre les germes pathogènes.....	10
Figure03 : schéma explicatif des différentes étapes de la standardisation.....	16
Figure04 : Méthodes utilisé pour le test de l'activité antibactérienne.....	20
Figure 05 : Aspect de la culture de lactobacilles dans le bouillon MRS	22
Figure 06 : Aspect macroscopique des colonies sur gélose MRS.....	22
Figure 07 :Taux de survie des Lactobacilles dans le bouillon MRS à 0,3% de sels biliaires..	24
Figure 08 : Effet de stimulus stomaco-duodéal sur les lactobacilles	26
Figure 09 : Adhésion des lactobacilles aux cellules épithéliales	29
Figure 10 : Taux d'adhésion des lactobacilles aux cellules épithéliales	29
Figure 11 : Résultats du test de spots	29
Figure 12 : résultats de test des spots.....	30
Figure13 : activité inhibitrice des surnageants natifs	31
Figure14 : Exemple du résultat de l'antibiogramme des souches lactiques.....	37



INTRODUCTION

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction : 1

Chapitre I: synthèse bibliographique

1. Généralités sur les bactéries lactiques :	3
1.1. Habitat des bactéries lactiques :	3
1.2 .Taxonomie des bactéries lactiques :	4
2. Le genre <i>Lactobacillus</i> :	4
2.1 Les types fermentaires des Lactobacilles :	5
2.2 Intérêts technologiques des lactobacilles :	6
3. Les probiotiques :	7
3.1 Historique des probiotiques	7
3.2 Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques :	8
3.2.1. La résistance à l'acidité gastrique :	8
3.2.2. La résistance aux sels biliaires :	9
3.2.3. L'adhésion aux cellules épithéliales :	9
3.2.4. La production de substances antimicrobiennes :	9
3.2.5. Résistance aux antibiotiques :	9
3.2.6. Critères technologiques :	10
3.3. Les effets probiotiques :	10

Chapitre II: Matérielle et Méthode

1. Provenance des bactéries lactiques :	12
2. Provenance des souches pathogènes :	12

SOMMAIRE

3. Matériel utilisé :	13
3.1. Matériel biologique :	13
3.2. Milieux de culture :	13
3.3. Produits chimiques et réactifs :	13
4. Méthodes et protocoles utilisés :	14
4.1. Revivification et purification des souches.....	14
4.2. Examen macroscopique et microscopique :	14
4.3. Test de la catalase :	14
5. Standardisation des inocula :	15
6. Etude du potentiel probiotique :	15
6.1. Résistance aux sels biliaires :	17
6.2. Evaluation de la réponse au stimulus stomaco-duodéal	17
6.3 Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial	18
6.3.1 Préparation du tissu épithélial :	18
6.3.2. Préparation des souches bactériennes :	18
6.3.3. Réalisation du test :	18
7. Etude de l'activité antimicrobienne :	18
7.1. Test de spots :	19
7.2. Test de puits	19
8. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques :	20

Chapitre III : résultats et discussion

1 Revivification et purification des souches :	22
1.1. Aspect macroscopique des lactobacilles en milieu liquide et solide :	22
1.2 Aspect microscopiques des lactobacilles:	23
1.3. Test de la catalase :	23
1.4 Standardisation des inocula :	24

SOMMAIRE

2. Evaluation du potentiel probiotique :	24
2.1. Tolérance aux sels biliaire :	24
2.2. Réponse au stimulus stomaco-duodéal :	25
2.3. Adhésion aux cellules épithéliales.....	26
2.4. Activité antibactérienne :	28
2.4.1. Effet des surnageants natifs :	31
2.4.2.Effet des surnageants neutralisés:	34
2.5. Résistance aux antibiotiques :	36
Conclusion	39

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

De la naissance à la mort, l'être Humain vit continuellement avec une flore microbienne extrêmement dense et variée qu'il abrite, pour l'essentiel, dans la cavité de son tube digestif (**Robin et Rouchy, 2001**). Parmi les composants de cette flore on trouve les bactéries lactiques, ces bactéries qui furent découvertes par Pasteur en 1865, lors d'une contamination de jus de betteraves dans une distillerie du Nord de la France (**Matamoros, 2008**).

Les bactéries lactiques sont présentes depuis toujours dans l'alimentation Humaine et ont souvent montré un effet bénéfique sur la santé et en particulier sur l'équilibre de la flore intestinale (**Gournier-Château et al., 1994**). Ces derniers temps un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation des bactéries lactiques ayant des effets probiotiques et pharmaceutiques à travers le monde (**Wunwissa et al., 2003**). En Algérie, un intérêt particulier a été donné aux bactéries lactiques locales, dont assez de travaux sur ces bactéries des laits crus, ont été publiés (**Guessas et Kihal, 2004 ; Badis et al., 2005 ; Idoui, 2008**).

Les lactobacilles sont des bactéries lactiques représentatifs du microbiote intestinal bénéfique de l'Homme et par conséquent sont les microorganismes les plus en vue en tant que probiotiques (**Midassirou et al., 2012**). Les probiotiques sont définis comme « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, confèrent des effets bénéfiques pour l'hôte » (**FAO/OMS, 2001**).

Les bactéries au cours de leur passage dans le tractus gastro-intestinal, se heurtent aux problèmes de stress causés par le suc gastrique puis le suc biliaire suivi par la compétition avec les germes pathogènes et autochtones. Cependant, pour qu'un probiotique exerce son effet convenablement, il doit répondre aux critères suivants : de sécurité (non pathogène ,sensibilité aux antibiotiques) ; fonctionnels (résistance à l'acidité et à la bile, production de substances antibactériennes, adhésion aux cellules épithéliales) et technologiques (stabilité au cours de la production et conservation des propriétés probiotiques après production) (**Midassirou et al., 2012**).

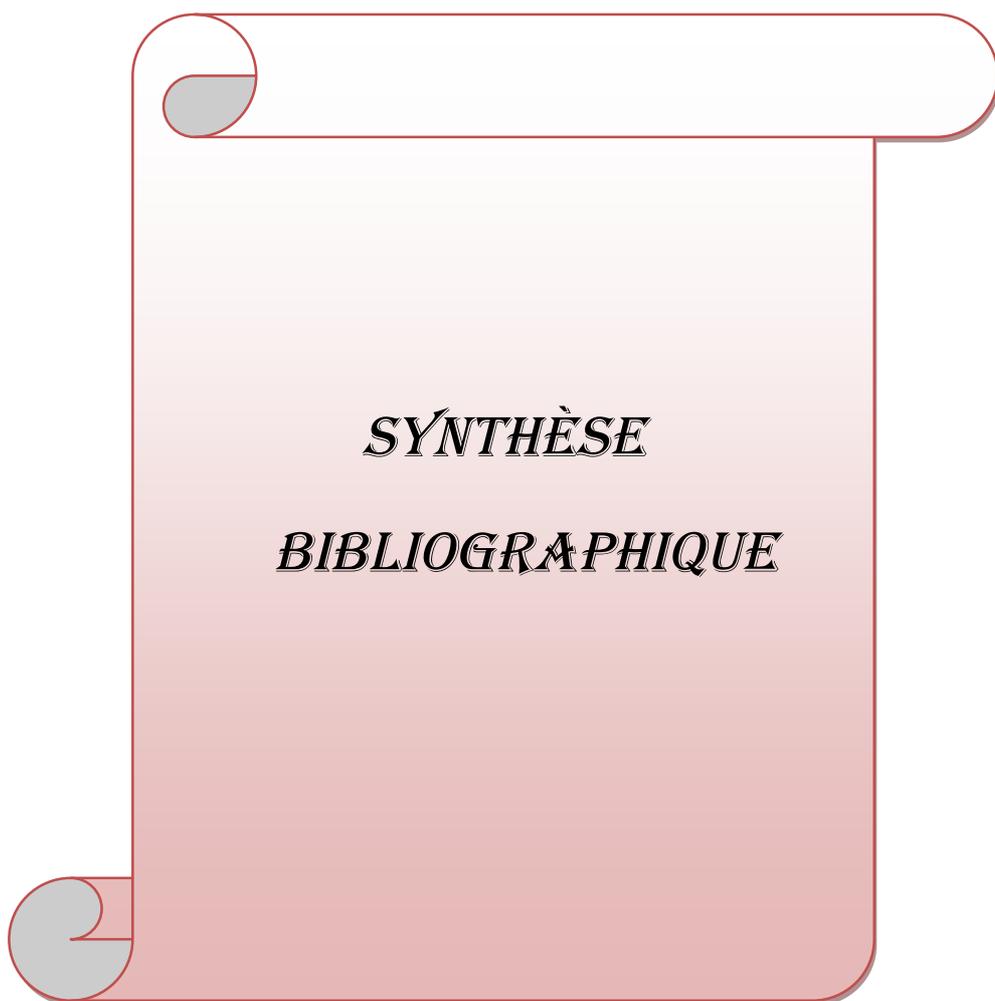
Le présent travail se focalisera sur l'évaluation de quelques aptitudes probiotiques des lactobacilles préalablement isolés et conservés au frais des produits laitiers locaux (beurre et L'ben).

Ce manuscrit se compose de 3 parties dont la première est consacrée à une synthèse bibliographique sur les bactéries lactiques et les probiotiques, la deuxième est prédestinée pour présenter le matériel et les méthodes mises en œuvre pour réaliser ce travail, la

INTRODUCTION

dernière partie comportera les différents résultats obtenus au cours de ce travail ainsi que leur discussion.

Finalement, une conclusion générale qui permet de récapituler les principaux axes de cette étude ainsi que les perspectives envisagées, afin de poursuivre et d'améliorer cette thématique de recherche au futur.



SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques occupent une place importante dans l'alimentation, elles sont responsables de la fermentation de produits alimentaires, qu'ils soient d'origine laitière, carnée ou végétale (**Garry et Le Guern, 1999**).

Les différentes actions enzymatiques (protéolyse, réduction des nitrites, activité peroxydasique, dégradation des lipides) exercées par les bactéries lactiques, permettent l'apparition de flaveur, texture et couleur intéressante pour le consommateur. De plus un développement rapide de la flore lactique permet d'assurer une maîtrise de la contamination par des organismes indésirables (**Garry et Le Guern, 1999**).

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen (1919), la caractéristique qui fait l'unité de ce groupe bactérien est sa capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Axelsson, 2004**). En dehors de ce point commun, les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité de caractéristiques morphologiques et physiologiques. Cela se traduit par l'existence au sein des espèces de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques et probiotiques différentes. (**Desmazeaud, 1998**).

Ce sont des cellules hétérotrophes dont les caractéristiques sont les suivantes: bacilles ou coques Gram positif, généralement immobiles, asporulés, catalase négative, oxydase négative, généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Dellaglio et al., 1994 ; Hogg, 2005**).

1.1. Habitat des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques (BAL) sont très fréquentes dans la nature, on les trouve généralement dans des aliments riches en sucres simples. Elles sont isolées fréquemment des produits laitiers, viandes et les végétaux (**Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001**). Comme elles se trouvent sur la peau, dans le système digestif et dans la muqueuse vaginale (**Nielsen et al., 2008**).

1.2 .Taxonomie des bactéries lactiques :

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dernières années (Pot, 2008).

Orla-Jensen (1919), a proposé une classification fondée sur les caractères morphologiques biochimiques et physiologiques (température de croissance, mode de fermentation du glucose et la forme de l'acide lactique produit).

Selon Sneath et al. (1986), les bactéries lactiques sont regroupées suivant une taxonomie basée sur les caractères :

- morphologiques (la forme, le diamètre cellulaire, la mobilité, la sporulation).
- physiologiques et biochimiques (la quantité de l'acide lactique produit, température de croissance, la tolérance à l'oxygène, production de gaz et d'arôme, la capacité de résisté aux sels biliaries et à différentes valeurs de pH)
- immunologiques : la sérologie a été utilisée pour la classification et l'identification des streptocoques, comme le cas des streptocoques lactiques qui sont rangés dans le groupe sérologique N.

Selon Carr et al. (2002) et Axelsson, (2004), quatorze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella*.

2. Le genre *Lactobacillus* :

Les lactobacilles sont présent naturellement dans de nombreux biotopes: eau, sol, surface des plantes, lait et dérivés, viande, fruits, les eaux d'égouts. Chez l'Homme et de nombreuses espèces animales, ils sont commensaux ou symbiotiques et sont rarement pathogènes. Ce sont des cellules allongées, régulières en forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chaînettes de taille variable (figure 01), asporogènes, immobiles ou mobiles grâce à des flagelles péritriches, anaérobies facultatifs. Leurs exigences nutritionnelles complexes (les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides (Dellaglio et al., 1994).), et leur température de croissance varie d'une espèce à

une autre allant de 2 à 53°C avec un optimum de 30 à 40°C et un pH optimal de croissance de 5,5 à 6,2. Leurs GC% se situent entre 36 et 47% (collins et al.,1989).

Ce genre fait partie de la famille des *lactobacilliaceae*, ordre des *Lactobacillales*, classe des *Baccilli*, phylum des *Firmicutes*. Cette famille regroupe trois genres différents : *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *pediococcus*. (Axelsson, 2004 ; Felis et Dellaglio, 2007).



Figure 01 : Aspect morphologique de *Lactobacillus acidophilus* (A), *Lb helveticus* (B) et *Lb casei* (C) observées au microscope électronique (Gx1250) (Kandler et Weiss,1986, In : Mami,2013)

2.1 Les types fermentaires des Lactobacilles :

Leur mode de fermentation est à la base de la subdivision en trois groupes (tableau I).

-Groupe I:(*Thermobacterium*) formé de lactobacilles homofermentaires stricts qui ne fermentent que les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof en produisant presque exclusivement du lactate (Valcheva et al., 2006).

-Groupe II:(*Streptobacterium*) renferme les lactobacilles homo-hétérofermentaires facultatifs qui fermentent les hexoses mais aussi les pentoses en lactate et acétate par la voie d'Embden-Meyerhof (Stiles et al., 1997).

-Groupe III:(*Betabacterium*) forme de lactobacilles hétérofermentaires stricts qui fermentent les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol) et CO₂. Les pentoses aussi sont fermentés en lactate et en acétate. Ces *Lactobacillus* ont un faible pouvoir acidifiant et produisent des substances aromatiques (Oheix, 2003).

Tableau I : classification des Lactobacilles (Kandler et Weiss, 1986, In : Mami,2013)

Les groupes	Caractéristiques	Les complexes	Exemple : espèces et sous-espèces
Groupe I	Homofermentaires strict fermentent les hexoses par voie E.M.P, ne fermentent ni gluconate ni les pentoses.	<i>Lb. delbrueckii</i>	Trois sous-espèces : <i>delbrueckii, lactis, bulgaricus</i>
		<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. acidophilus, Lb.heverticus Lb. amylovorus, Lb.crispatus, Lb. gassaeri, Lb. gallinarum, Lb. johnsonii</i>
		Autres espèces	<i>Lb. intestinalis, Lb. jonsonii, Lb.aviarius, Lb. hamsteri Lb. kefiranofaciens, Lb. mali, Lb. acetotolerans, Lb. ruminus, Lb. vitulinus.</i>
Groupe II	Hétérofermentaires facultatifs, fermentent les hexoses par E.M.P et les pentoses	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. plantarum, Lb. pentosus et Lb. agilis</i>
		<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. casei, Lb. paracasei, Lb. rhammosus.</i>
		<i>Lb.bavaricus</i>	<i>Lb. bavaricus, Lb. curvatus, Lb. sake</i>
		Autres espèces	<i>Lb.uli, Lb.graminis.</i>
Groupe III	Hétérofermentaires stricts fermentent les hexoses et les pentoses.	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb.fermentum, Lb.cellobiosis, Lb.reuteri et Lb.vavaginalis.</i>
		<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. brevis, Lb. buchneri, Lb. kefir Lb. hilgardii, Lb. collinoides Lb. oris, Lb. sanfrancisco Lb. malfermentans.</i>
		Autres espèces	<i>Lb. fructivorans, Lb. suebicus, Lb. bifermentans (seule espèce capable, selon le pH, de dégrader le glucose en acide acétique).</i>

(E.M.P : voie d'Embden-Meyrhof ; Lb : Lactobacillus)

2.2 Intérêts technologiques des lactobacilles :

Les lactobacilles sont utilisés dans plusieurs domaines dont la manufacture des produits laitiers (**Tableau II**), comme culture starters, ils participent aussi dans la fabrication du pain, les ensilages, et sont aussi proposés comme bioconservateurs dans les produits non fermentés car ils possèdent un pouvoir inhibiteur vis-à-vis des micro-organisme d'altération (**Dortu et Thonart,2009**) en plus de cela les Lactobacilles augmentent la valeur nutritive de l'aliment auquel elles sont ajoutées (**Slover et Danziger,2008**).

Dans les yaourts, *Lb .bulgaricus* forment des peptides utilisés en suite par les *Streptococcus therophilus* . L'arome du yaourt est dû à l'acétaldéhyde formé à partir de la

thréonine par l'aldolase de *Lb.bulgaricus* .Divers lactobacilles (*Lb.casei* ,*Lb.plantarum* ,*Lb.brevis* ,*Lb.buchneri*...)interviennent pendant l'affinage des fromages .*Lb.helveticus* , *Lb.lactis* et *Lb.bulgaricus* agissent avec *Streptococcus thermophilus* dans les fromages à pate cuite.(Leyral et Vierling, 2007)

A propos du Kéfir, les *Lactobacillus kéfir*, *Lb.kefiranofaciens* et les autres *Lactobacillus* mésophiles ont démontrés leur contribution à la fabrication du produit.

Le rôle des lactobacilles est également important dans la fermentation des fruits et légumes (raisins , choucroutes , cornichons) (Edwards et al.,2000 ; Rodas et al .,2005 ; Figueiredo et al .,2008)

Tableau II: Principales espèces et sous espèces de lactobacilles utilisées en industrie laitière (Kandler et Weiss,1986, In : Mami,2013)

Espèces	Fermentation du lactose	Croissance		
		A 15°C	A 45°C	
<i>Lb. helveticus</i>	Homofermentaire	-	+	Thermophile
<i>Lb. delbruekii subsp. bulgaricus</i>		-	+	
<i>Lb. delbruekii subsp. lactis</i>		-	+	
<i>Lb. acidophilus</i>		-	+	
<i>Lb. casei</i>	Hétérofermentaire	+	-	Mésophile
<i>Lb. plantarum</i>		+	-	
<i>Lb. kefir</i>		+	-	
<i>Lb. brevis</i>	Hétérofermentaire	+	-	
<i>Lb. fermentum</i>		-	+	

3. Les probiotiques :

3.1 Historique des probiotiques

Le terme probiotique est composé de racine grecque pro et bios qui signifient pour la vie. Par opposition au terme « antibiotique », signifiant contre la vie, plus spécifiquement contre la croissance et le développement de bactéries pathogènes. La consommation de bactéries probiotiques procure des effets positifs sur la santé (Millette, 2007).

Les premier travaux sur les probiotiques datent de 1905.Un scientifique russe nommé, Elie Metchnikoff, avait observé que les paysans bulgares qui consommaient une grande

quantité de lait fermenté, la forme ancestrale du yaourt, vivaient plus longtemps et en meilleure santé. En faisant des recherches sur leur alimentation, il découvrit une bactérie unique dans le lait fermenté bulgare qui produisait l'acide lactique (**Ait-Belgnaoui et al., 2005**).

Le terme probiotique a été proposé pour la première fois par Parker en 1974. Il désigne les microorganismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale, cette définition trop vaste englobe les cultures microbiennes mais aussi les métabolites produits par les microorganismes et par conséquent les préparations d'antibiotiques (**Vasiljevic et Shah, 2008**)

C'est pour quoi en 1989, Fuller redéfinit les probiotiques comme étant des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale (**Gournier-Chateau et al., 1994**)

La **FAO** et l'**OMS (2001)**, ont établi des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulent la définition suivante : « *les probiotiques sont des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère* ».

3.2 Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques :

L'effet probiotique est liée à la souche microbienne, toute fois les souche ayants un statut GRAS (*Generally Regarded As Safe*) sont les plus favorisés, ainsi que , le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques qui doivent arriver vivants à leur site d'action ,à savoir l'intestin, ce qui implique la capacités de ces derniers à résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte (la barrière intestinale , le pH acide , les sels biliaires , les enzymes pancréatiques ...etc) (**Percival, 1997 ; Lamoureux, 2000 ; Millette et al., 2008**).Le débat sur l'innocuité des probiotique reste encore ouvert ,car ils pourraient être des opportunistes notamment chez les patients immunodéprimés (**Cannon et al.,2005**).

3.2.1. La résistance à l'acidité gastrique :

La survie des bactéries dans le tube digestif dépend de leur capacité à tolérer les pH bas, cependant, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2,5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (**Ammor et Mayo, 2007**).

3.2.2. La résistance aux sels biliaires :

La tolérance aux sels biliaires est un facteur important pour la survie des probiotiques, car après leur échappement aux conditions acides de l'estomac, les probiotiques doivent faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras (**Ammor et Mayo, 2007 ; Gu et al., 2008**).

3.2.3. L'adhésion aux cellules épithéliales :

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est une condition pour la colonisation du tractus digestif, cette adhérence constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes (**Palomares et al., 2007 ; Reyes-Gavilan et al., 2011**).

3.2.4. La production de substances antimicrobiennes :

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques (acide lactique, acide acétique, acide formique) le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la conservation des aliments (**Titiek et al., 1996 ; Labioui et al., 2005**). Le genre *Lactobacillus* est connu pour son pouvoir antimicrobien à large spectre qui est due notamment à la production de ces substances inhibitrices des bactéries tel que les bactériocines (**Nissen- Meyer et al., 1997**).

Différentes définitions ont été attribuées aux bactériocines au cours du temps, cependant la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de **Klaenhammer (1988)** qui définit les bactériocines comme étant des molécules de nature protéique synthétisées par voie ribosomique dotées d'une activité antimicrobienne envers des espèces microbiennes phylogénétiquement proches de l'espèce productrice (**Dortu et Thonart, 2009**). Il faut noter donc que dans certains cas les bactériocines synthétisées par les lactobacilles agissent même sur des espèces très éloignées y compris les Gram⁽⁻⁾ (**Bendjedou, 2013**).

3.2.5. Résistance aux antibiotiques :

Les travaux de **Temmerman et al. (2003)**, ont montré que 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la kanamycine, à la tétracycline, à l'érythromycine et au chloramphénicol.

Il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autres espèces et genre, c'est pour cette raison qu'il faut choisir des souches manquantes du potentiel de transfert de résistance (**Denohue, 2004**).

3.2.6. Critères technologiques :

Selon **Saarela et al. (2000)**, ces critères sont :

- Bonnes propriétés sensorielles ;
- Résistance aux phages ;
- Viabilité durant le traitement technologique ;
- Stabilité dans le produit et durant le stockage

3.3. Les effets probiotiques :

Bien que les probiotiques représentent seulement une faible proportion de la masse microbienne du système gastro-intestinal de l'hôte, ils semblent y jouer des rôles biologiques déterminants par des mécanismes qui doivent être élucidés :

- Prévention de la colonisation et croissance des microorganismes pathogènes par les mécanismes illustrés dans la **figure 02**

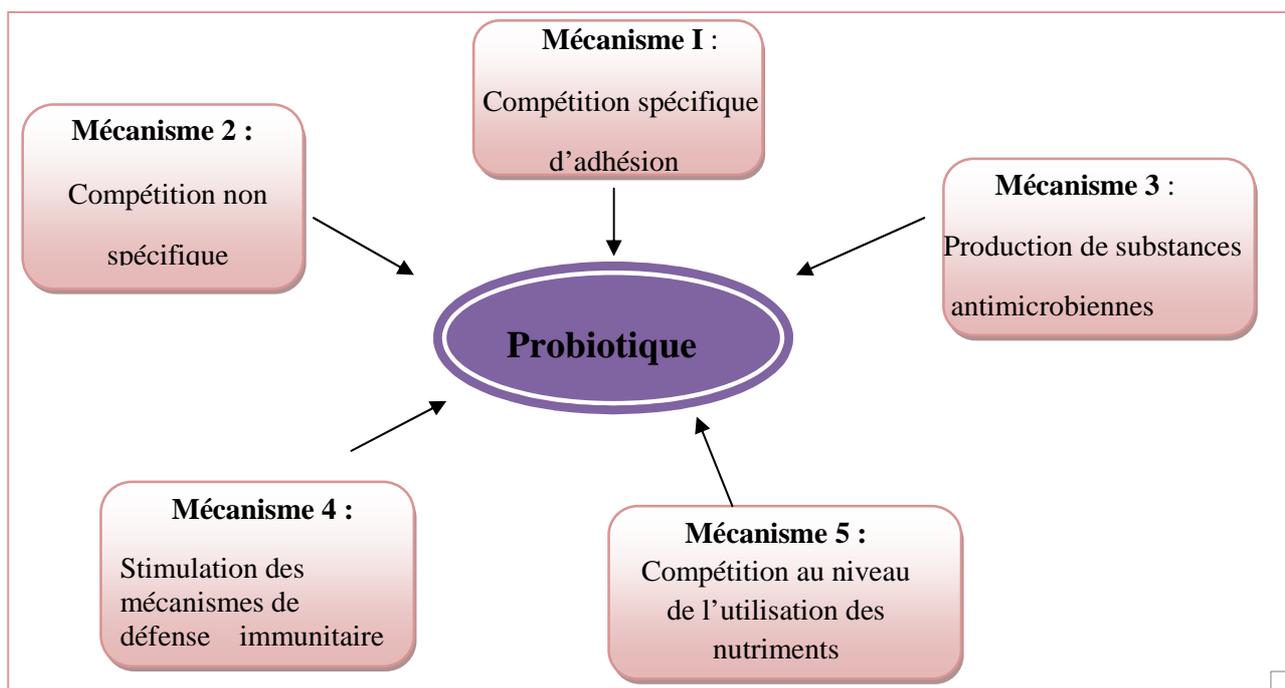


Figure 02 : Mécanismes d'action des probiotiques contre les microorganismes pathogènes (Kaur *et al.*, 2002).

- Ils établissent des interactions avec la barrière intestinale physique (interactions avec le mucus, action trophique sur la muqueuse, modulation de la perméabilité paracellulaire) et fonctionnelle (immunomodulation) locale et systémique (FAO/WHO, 2002) ;
- les probiotiques sont considérés comme des agents protecteurs vis-à-vis des risques d'apparitions de pathologies digestives (Gournier-Chateau *et al.*, 1994) ;
- Parmi les effets les mieux documentés figurent l'effet antidiarrhéique dans le cadre d'une antibiothérapie (Gill, 2003), ou encore l'amélioration des troubles intestinaux associés à l'intolérance au lactose (Pettoello *et al.*, 1989) ;
- Des études expérimentales et cliniques montrent une efficacité des traitements probiotiques dans le cadre des colites expérimentales (Matsumoto *et al.*, 2001) et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Gossum, 2007) ;
- Réduction de l'absorption du cholestérol en utilisant le cholestérol comme nutriment par le microbiote intestinal ainsi par la déconjugaison des Sels biliaires qui seront plus facilement excrétables dans les selles, ce qui induit l'épuisement des stocks de cholestérol de l'organisme (Gournier-Chateau *et al.*, 1994) ;
- Diminution de l'incidence du cancer du côlon (Gournier-Chateau *et al.*, 1994)
- La bioconservation des aliments : beaucoup de travaux ont eu pour objectif de trouver des applications agroalimentaires potentielles des lactobacilles douées d'activité antimicrobienne. On peut citer dans le domaine des produits laitiers, dans une étude menée par Bogovic *et al.* (2007), il a été démontré que *Lb. gasseri* K7 productrice de bactériocines inhibe la croissance de *Clostridium tyrobutyricum* et la formation de l'acide butyrique dans le fromage (Bogovic *et al.*, 2007) .



MATERIEL
ET
METHODES

L'objectif de ce travail consiste en, l'évaluation des aptitudes probiotiques des lactobacilles isolés du beurre et du L'ben, qui a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie générale (1) de l'Université de Bejaia. durant la période s'étalant du mois de Janvier jusqu'au mois de Mai 2016.

1. Provenance des bactéries lactiques : l'isolement des souches a été effectué l'année passé à partir de deux produits laitiers locaux de fabrication artisanale à savoir le beurre et L'ben, et la conservation a été réalisé à une température de 4°C.

2. Provenance des souches pathogènes : Les souches pathogènes utilisées durant ce travail ont deux origines différentes, une origine alimentaire (produits laitiers locaux) et une origine clinique (**Tableau III**)

Tableau III : Origine et charge initiale des souches pathogènes.

Souche	Origine	Charge initiale appliquée pour les différents tests
<i>Acenitobacter baumannii</i>	Clinique	10^7
<i>SARM 103911</i>	Clinique	10^7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinique	10^7
<i>S.aureus ATCC29213</i>	Clinique (souche de référence)	10^7
<i>E.coli ATCC25922</i>	Clinique (souche de référence)	10^6
<i>Klebsiella sp</i>	Clinique	10^6
<i>Ec.feacalis V533</i>	Clinique	10^7
<i>S.aureus 9Br</i>	Alimentaire	10^7
<i>S.aureus 16Lb</i>	Alimentaire	10^7
<i>Salmonella Typhi</i>	Alimentaire	10^6
<i>E.coli</i>	Alimentaire	10^6

3. Matériel utilisé :

3.1. Matériel biologique :

- bactéries lactiques, isolées préalablement du beurre et du L'ben.
- bactéries pathogènes d'origine alimentaire et clinique.
- Un segment d'intestin grêle et du côlon d'un mouton récupéré au marché près de l'université, afin de réaliser le test d'adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales.

3.2. Milieux de culture :

Bouillon MRS (Man-Rogosa et Sharpe) (Institut Pasteur d'Algérie) : utilisé pour la revivification, les repiquages ainsi que la croissance des bactéries lactiques.

Bouillon BHIB (Institut Pasteur d'Algérie) : bouillon cœur-cervele ou (Braint Heart Infusion), utiliser pour le repiquage des pathogènes.

Gélose MRS (Institut Pasteur d'Algérie) : est utilisée pour la culture et dénombrement des lactobacilles, dans les différents tests.

Gélose MH (Muller Hinton) (Institut Pasteur d'Algérie) : utilisé dans l'étude et l'évaluation de l'activité antibactérienne des souches lactiques.

Gélose M17 (Institut Pasteur d'Algérie) : utilisé comme une gélose de support dans le test des puits.

3.3. Produits chimiques et réactifs :

Colorant : Bleu de Méthylène, violet de gentiane, fuchsine, cristal violet. De la marque (Biochem chemopharma)

Autre produit : l'eau oxygénés H₂O₂ (Biochem chemopharma), eau physiologique, Huile à émersion(Biochem chemopharma), éthanol (SIGMA-ALORICH), HCl (Biochem chemopharma), NaOH (chem-LAB).

Tampon : tampon phosphate salin (PBS)

Appareillage : Agitateur(VELP), autoclave (Sihavx électronique), bain marie(GFL), balance(RADWAG), four Pasteur (memmet), pH mètre(BOECO), étuve (Incucell), microscope optique (ZEISS), frigo (Condor), centrifugeuse(SIGMA).

Outils de la microbiologie : Anse de platine, bec benzène, boîte pétri, écouvillon, épindorfs, falcons, pipette Pasteur, lame et lamelle, microscope optique, tubes à essai.

4. Méthodes et protocoles utilisés :

4.1. Revivification et purification des souches

Pour la revivification des souches de lactobacilles, des repiquages successifs sont réalisés dans des tubes de 5ml et 9ml de Bouillon MRS, puis incubé à 30°C/ 24 h à 48h, ces tubes nous ont servie par la suite pour le repiquage de ces bactéries sur gélose MRS.

Pour la purification des souches, une succession d'ensemencements en stries sur gélose MRS ont été effectués ce qui a permis d'obtenir des colonies uniformes.

4.2. Examen macroscopique et microscopique :

Après observation macroscopique qui a permis de décrire l'aspect des colonies sur gélose MRS, une coloration de Gram a servie dans l'observation microscopique au grossissement (Gx100) pour classer les bactéries selon leurs Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (**annexe II**).

4.3. Test de la catalase :

La **catalase** est une enzyme qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène :



Pour confirmer que les Lactobacilles sont catalase(-) une colonie de la culture bactérienne qui n'a pas dépassé 48h est mise en contact avec de l'eau oxygénée sur une lame. Une effervescence (dû à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase (**Larpent et al.,1997**)

5. Standardisation des inocula :

Afin de tester quelques aptitudes probiotiques des souches de lactobacilles, il est indispensable de connaître la charge de départ pour cela une standardisation des souches est effectué comme suite : L'inoculum des souches de lactobacilles sont revivifiés par ensemencement en stries sur gélose MRS. Après incubation à 30°C pendant 24h, deux à trois colonies bien isolées de chaque souche sont repiquées à chaque fois dans 10 ml du bouillon MRS, puis incubées à 30°C pendant 18 h. Au terme de l'incubation, des dilutions décimales sont réalisées dans l'eau physiologique stérile (10^{-1} jusqu'à 10^{-9}), 1 ml des dilutions (10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9}) sont ensemencé en masse dans une gélose MRS. Un dénombrement est effectué après incubation à 30°C pendant 48 h (**figure 03**)

6. Etude du potentiel probiotique :

Parmi les bactéries les plus fréquemment utilisées comme probiotiques on trouve les lactobacilles. Ces bactéries étant administrées par voie orale, il est obligatoire qu'elles franchissent les différentes conditions du transit digestif (l'acidité, sels biliaires et suc gastrique) et répondre à un certain nombre de propriétés (capacité d'adhésion, activité antagoniste, sensibilité vis-à-vis des antibiotiques...) pour être califier de probiotique (**Midassirou et al.,2012**)

Dans ce travail, 12 souches ont été sélectionnées en se basant sur le test de l'activité antibactérienne réalisé auparavant, ces souches ont fait l'objet de différents tests qui résument à peut près le parcours que peut suivre un microorganisme probiotique durant son passage dans le tractus digestif.

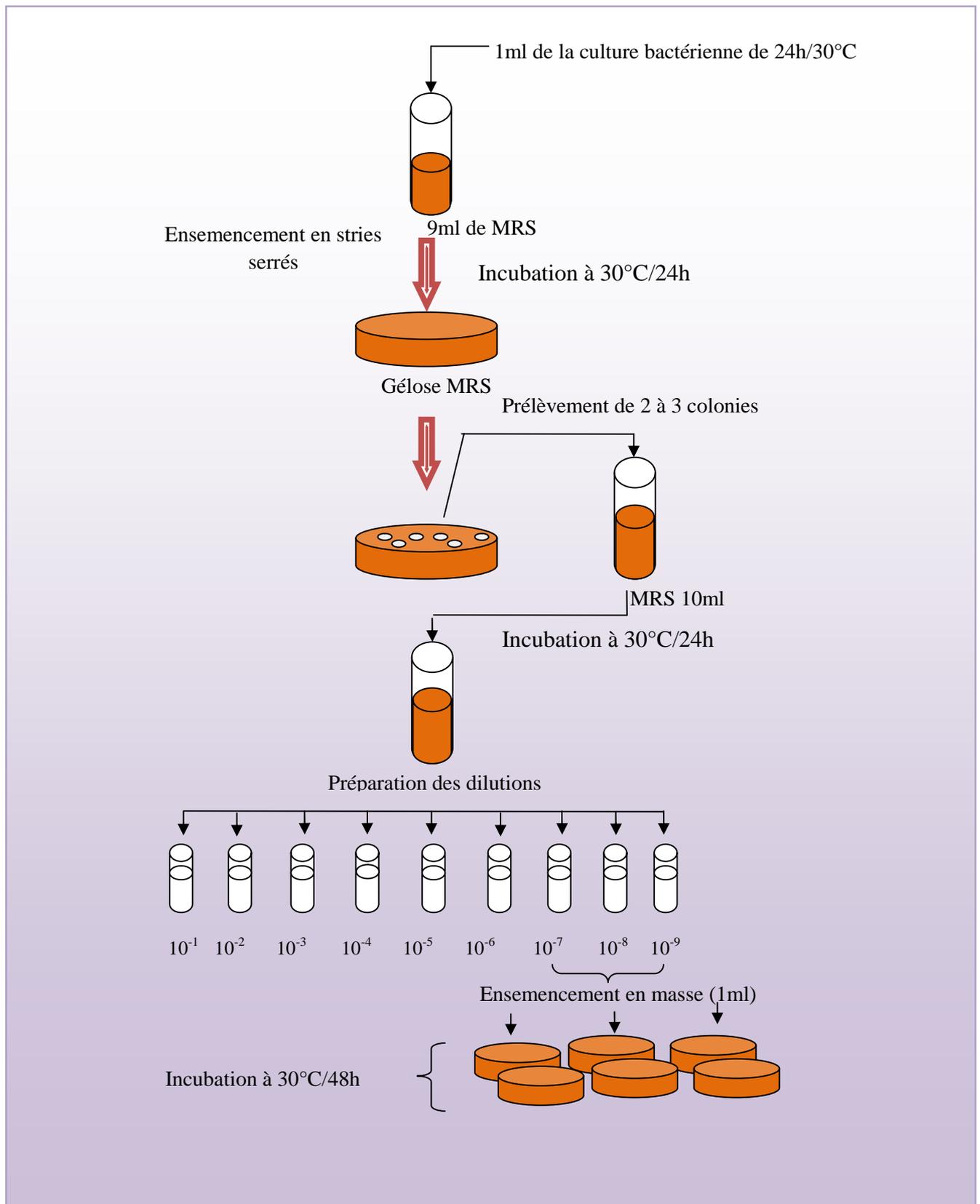


Figure03 :Schéma explicatif des différentes étapes de la standardisation des souches lactiques

6.1. Résistance aux sels biliaires :

Parmi les contraintes que doit surmonter un probiotique, c'est la résistance à la bile (Chafai, 2006). Pour tester cette caractéristique chez les 12 souches de lactobacilles le protocole décrit par Hyronimus et al.(2000) est réalisé avec certaines modifications.

1ml de chaque souche de lactobacilles a été centrifugé a 8000rpm pendant 10min et les culots obtenus ont est inoculé dans 9ml de MRS additionné de 0,3% de sels biliaires, puis incubés à 30°C/ 24h.

Pour déterminer le nombre de bactéries viables après 24h d'incubation, une série de dilutions décimale jusqu'à 10⁻⁴ a été effectué, puis 1ml des dilutions 10⁻³et 10⁻⁴ sont ensemencé en masse sur gélose MRS. Après 48h d'incubation à 30°C le taux de survie est calculé selon la formule suivante (Ustunol et Gandhi, 2001) :

$$\text{Taux de survie}\% = \left(\frac{\text{UFC à T24h}}{\text{UFC à T0h}} \right) \times 100$$

6.2. Evaluation de la réponse au stimulus stomaco-duodéal

Pour éprouver l'attitude des lactobacilles au stimulus stomaco-duodéal , la technique décrite par Vizoso Pinto et al. (2006) est appliqué avec une légère modification ;

5ml de MRS à pH 3 a été inoculé par 500µl des cultures bactériennes fraîches (10¹⁰ UFC/ml). Après une heure d'incubation à 30°C, on additionne 2ml de sels biliaires reconstitué à raison de 10% et 8,5ml d'une sécrétion duodénale artificielle (NaHCO₃ 6,4g/l , KCl 0,239g/l , NaCl 1,28g/l).

Suite a cette préparation, une série de dilutions décimales est réalisée jusqu'à 10⁻⁹ à t = 0h afin de déterminé la charge initiale et jusqu'à 10⁻⁶ après 3h d'incubation. Le tout est incubé à 30°C/48h et le taux de survie est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de survie}\% = \left(\frac{\text{UFC à T3h}}{\text{UFC à T0h}} \right) \times 100$$

6.3. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial

Cette étude est réalisée dans le but d'essayer d'évaluer la capacité des lactobacilles de s'adhérer aux cellules épithéliales, pour cela on a appliqué la méthode décrite par **Lin et al., (2007)** qui est subdivisée en 3 étapes :

6.3.1 Préparation du tissu épithélial :

un segment du côlon ainsi qu'une partie de l'intestin grêle sont mis dans du tampon phosphate salin stérile (PBS pH 7) pendant 30 minutes à 4°C avant d'être lavé, puis un lavage 10 fois avec ce tampon est réalisé, par la suite ils sont tenus une deuxième fois au repos à 4°C dans le PBS pendant 3h.

Les segments sont ouverts et les cellules sont récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin grêle et le côlon à l'aide d'une lame stérile dans 9ml du PBS. La suspension cellulaire est examinée sous microscope pour éviter les contaminants ainsi pour l'estimation de la concentration cellulaire qui doit être de 5×10^5 cellules/ml approximativement. Pour cela une série de dilutions décimales est effectuée jusqu'à 10^{-2} .

6.3.2. Préparation des souches bactériennes :

Après centrifugation des cultures fraîches (8000rpm/10min), le culot est récupéré dans 2ml de PBS suivie de deux dilutions pour avoir approximativement 10^8 cellule/ml.

6.3.3. Réalisation du test :

1ml de chaque culture est mélangé avec 1 ml de la dilution 10^{-2} de la suspension des cellules épithéliales (côlon et intestin grêle). Après incubation à 30°C pendant 40min, un frottis ainsi qu'une coloration au cristal violet 0,5% pendant 5 min est réalisée pour observer l'adhésion au microscope optique.

7. Etude de l'activité antimicrobienne :

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des souches étudiées, deux tests différents sont réalisés à savoir : test de spots et test de puits, pour cela nous avons confronté 12 souches de lactobacilles avec des souches pathogènes préalablement citées dans le **tableau (IV)**.

7.1. Test de spots :

Selon **Fleming et al.(1975)** et **Allende et al .(2007)**, le principe de cette méthode, consiste en un contact direct entre les souches de bactéries lactiques déposé sous forme de spots d'une quantité de 5µl(10^{10} UFC/ml environ) sur gélose MRS et incubé à 30°C/24h , versus chaque souche pathogène inoculé sur milieu Muller- Hinton (MH), conformément à la méthode de double couches après diffusion de la substance inhibitrice, au terme de l'incubation à 37°C/24h si on obtiens une zone claire autour du spot, son diamètre est mesuré pour évaluer le potentiel inhibiteur de la souche .

7.2 Test de puits :

Décrite par **Barfoot et Klaenhammer,(1983)**, cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique avec la souche pathogène.

Une culture fraîche de 18h est centrifugé (8000rpm/10min) par une centrifugeuse réfrigérée et le surnageant est conservé.

Dans une boîte Pétri contenant du MH et ensemencé par la souche pathogène (10^6 à 10^7 UFC/ml), des puits sont réalisés à l'aide d'un emporte pièce et sellé par la même gélose (MH) ces derniers seront remplis de 100µl de surnageant de la souche lactique et incubé à 4°C pendant 2h pour permettre une meilleure diffusion de la substance active puis incubé à 37°C/24h.

L'apparition d'une zone claire au tour des puits et ayant un diamètre supérieur à 2mm est considéré comme un résultat positif (**Figure 04**).

Cette expérience est réalisée en deux étapes, la première étape étant réalisée avec un surnageant natif, et la deuxième avec un surnageant neutralisé avec du NaOH stérile à 1N afin d'éliminer l'effet antimicrobien lié au pH acide des acides organiques.

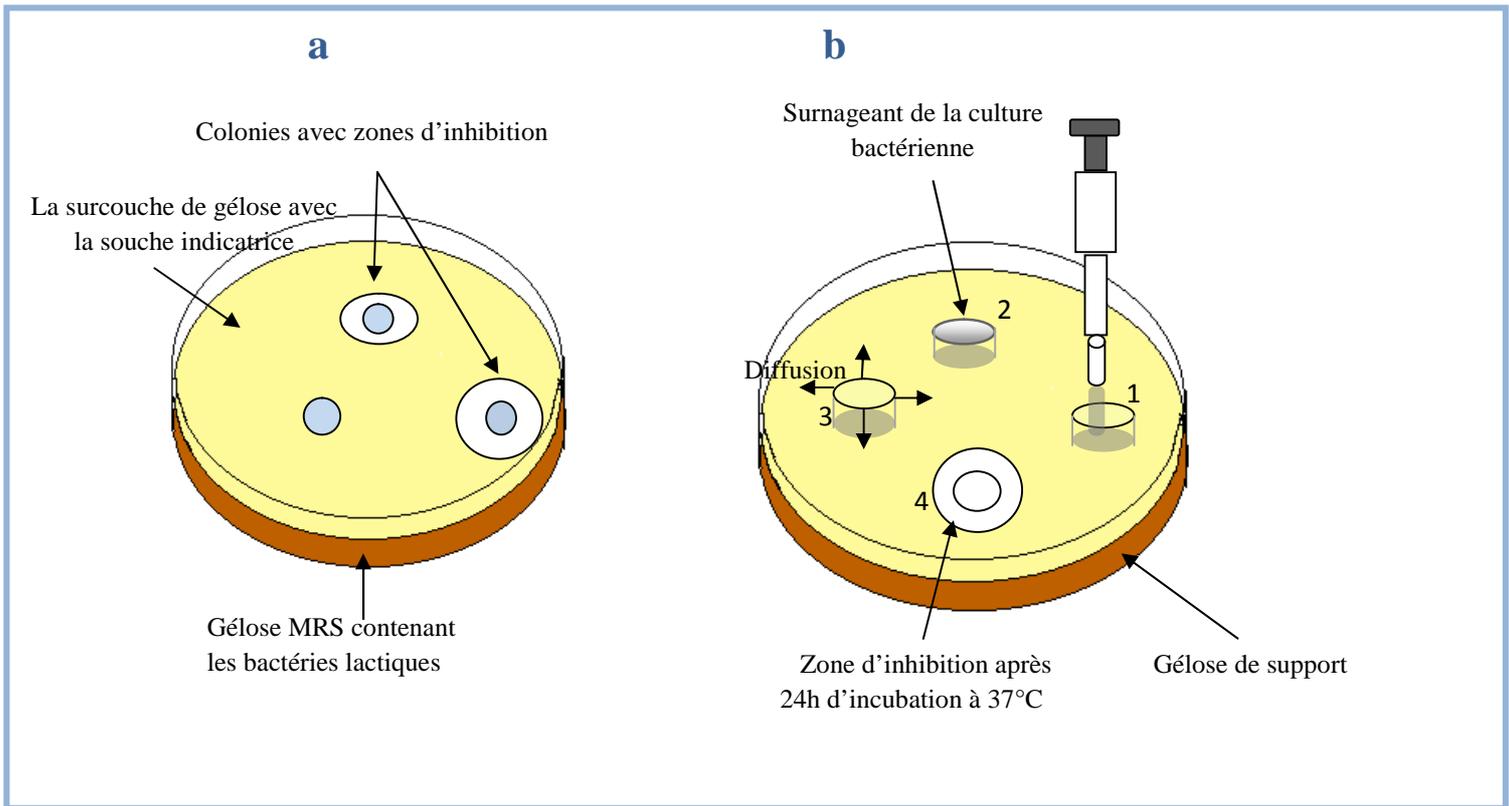


Figure04 : Méthodes utilisés pour le test de l'activité antibactérienne.

(a)méthode de la double couche (b) méthode de diffusion en puits.

8. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques :

La sensibilité des souches lactiques vis-à-vis des antibiotiques a été déterminée selon la méthode de l'antibiogramme par diffusion sur gélose MRS.

Des boîtes Pétri de gélose MRS préalablement coulées et solidifiées est ensemencé avec des cultures fraîches (18h) de lactobacilles à l'aide des écouvillons, de façon à réaliser des stries serrés, puis les disques d'antibiotiques(**Tableau V**) sont déposés à la surface à l'aide d'une pince stérile et l'ensemble est incubé à 30°C pendant 24h. Au terme de l'incubation, les résistances et sensibilités sont notées en mesurant les diamètres des zones d'inhibition.

Tableau IV : liste d'antibiotiques utilisés

Abréviation	Nom	Charge (µg)
OX	oxacilline	5
FOX	Cefoxitine	30
SPI	Spiramycine	100
CE	Cephotaxime	10
Sxt	Trimetoprim- sulfamethoxazole	25
Cp	Cephalixine	30
Néo	Néomycine	30
Do	Doxycycline- hydrochloride	30
Gm	Gentamicine	10
Kan	Kanamycine	30
Va	Vancomycine	30
PEf	Pefloxacin	5



RESULTATS

ET

DISCUSSION

1 Revivification et purification des souches :

1.1. Aspect macroscopique des lactobacilles en milieu liquide et solide :

Après 24h d'incubation, le bouillon MRS apparaît dense et troublé. La croissance bactérienne est facilement détectable, en remuant le tube légèrement. (**Figure 05**).



Figure 05 : Aspect de la culture de lactobacilles dans le bouillon MRS (T : témoin ; E : échantillon)

Sur gélose MRS, le totale de 12 souches de *Lactobacillus* apparaissent sous forme de colonies lisses, plus ou moins blanchâtres, crémeuses à bord arrondi, bombées, et elle dégage aussi une odeur agréable, semblable à celle des laits fermentés qui est due à la production de l'acide lactique (**Figure 06**).



Figure 06 : Aspect macroscopique des colonies de *Lactobacillus* sur gélose MRS

1.2 Aspect microscopiques des lactobacilles:

La coloration de Gram des isolats qui ont fait l'objet d'une observation microscopique a rapporté une forme de bacilles ou bâtonnet et parfois coccobacilles d'une couleur violette et dont le mode d'association varie d'une espèce à une autre (**Tableau V**).

1.3. Test de la catalase :

L'exploration des résultats de ce test a montré que la totalité des 12 souches de lactobacilles sont à catalase négative (**Tableau V**).

Il faut noter que ces tests ont été réalisés dans le but de confirmer et épargner toute contamination possible.

Tableau V: Caractéristiques des souches de lactobacilles étudiées

Souches	Forme et mode d'association	Gram	Catalase
Lactobacille 3Br	Bacille isolés	positif	Négative
Lactobacille 6Lb	Bacille isolés	positif	Négative
Lactobacille 7Br	Bacille très allongé isolé	positif	Négative
Lactobacille 8Lb1	Bacille	positif	Négative
Lactobacille 9Br	Coccobacille	positif	Négative
Lactobacille 10Lb	Bacille	positif	Négative
Lactobacille 12Lb	Bacille en chaînette	positif	Négative
Lactobacille 13Br	Coccobacille ± allongé	positif	Négative
Lactobacille 15Br	Coccobacille (petit bacille)	positif	Négative
Lactobacille 16Lb1	Bacille	positif	Négative
Lactobacille 16Lb2	Bacille	positif	Négative
<i>L. plantarum</i>	Bacille	positif	Négative

1.4 Standardisation des inocula :

Les résultats de la standardisation ont révélé que 2 à 3 colonies des différentes souches de lactobacilles, prélevées sur gélose MRS (24h/30°C) donnent en moyenne $3,6 \times 10^{10}$ UFC/ml.

2. Evaluation du potentiel probiotique :

2.1. Tolérance aux sels biliaires :

Les résultats du comportement des différentes souches soumises à 0,3% des sels biliaires sont illustrés dans la **Figure (07)**.

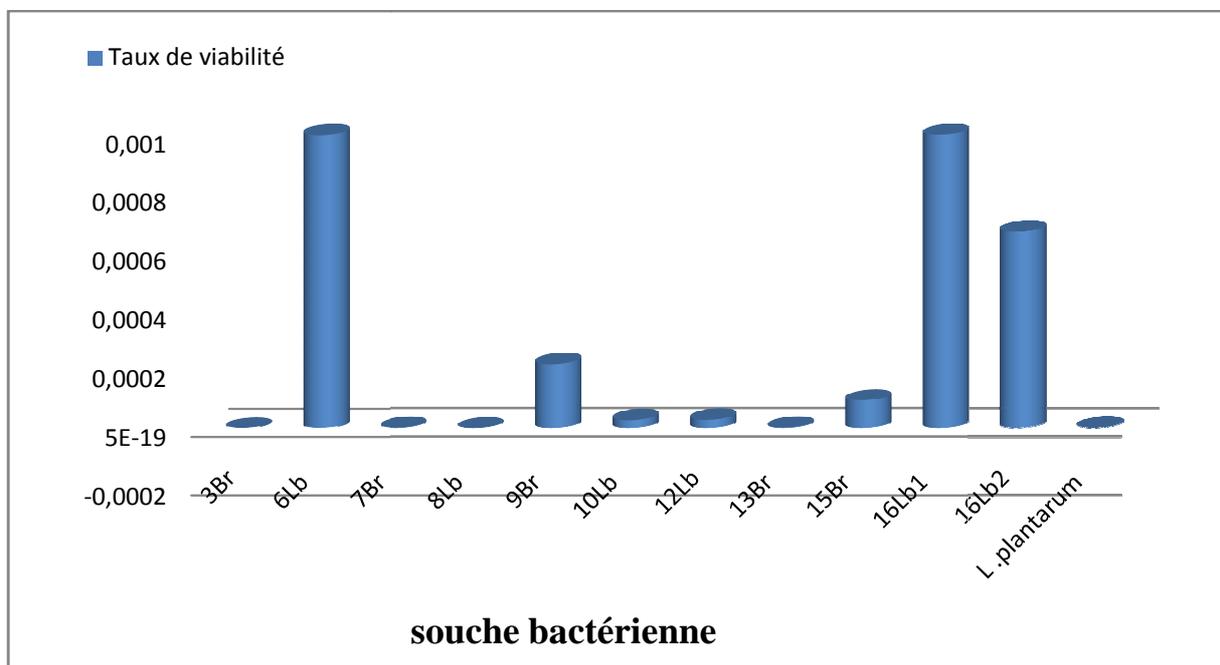


Figure 07: Taux de survie des lactobacilles dans le bouillon MRS à 0,3% de sels biliaires

Cette étude a révélé que 7 souches ont une tolérance à la bile avec des proportions différentes, et 5 souches n'ont pas pu résister à ce stress (3Br, 7Br, 8Lb, 13Br et *Lb.plantarum*) dont on a marqué aucune viabilité, cependant, on ne peut pas confirmer que ces souches ne sont pas résistantes à la bile car le temps d'incubation été très prolongé (24h). En effet, c'est possible qu'elles étaient résistantes au bout de 4h.

On remarque que la souche la plus résistante à ce stress est 6Lb avec un taux de viabilité de $1,48 \times 10^{-2}$ suivie par 16Lb1 avec un taux de $2,52 \times 10^{-3}$ et 16Lb2 d'un taux $6,68 \times 10^{-4}$.

En présence de sels biliaire, le taux de survie a diminué pour atteindre les valeurs de $2,18 \times 10^4$; $9,35 \times 10^5$; $2,86 \times 10^5$ et $2,73 \times 10^5$ pour les souches 9Br,15Br,12Lb et 10 Lb respectivement.

On constate que les souches testées présentent une sensibilité variable vis-à-vis des sels biliaires et que cette diminution de taux de survie remarquable chez certaines souches, est peut être liée à la durée d'exposition.

La concentration physiologique de la bile humaine est comprise entre 0,3% et 0,5% (Song et al., 2015). Par conséquent, la résistance aux sels biliaire est une caractéristique importante qui permet aux lactobacilles de survivre, grandir et rester actifs dans l'intestin grêle (Hyronimus et al., 2000). Les lactobacilles sont capables de métaboliser leurs acides biliaire ce qui les protèges contre la bile, l'un des mécanisme de cette résistance ; est la déconjugaison des acides biliaires pas les enzymes *hydrolase* des sels biliaires (BSH), ce qui a pour effet de diminuer la solubilité de la bile à pH bas et de réduire ses activités détergentes (Hamon et al.,2011) .

Midassirou et al. (2012) ainsi que Song et al. (2015) ont montrés une tolérance et une croissance de certaines souches de *Lactobacillus spp* testés sur MRS additionné de 0,3 % de sels biliaires. En contre partie, Burns et al. (2008) ont montré que la plus part des souches de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Lb. delbrueckii ssp. lactis* sont sensibles aux sels biliaires, pareil pour Zago et al. (2011) ont révélé une moyenne de survie de 40% chez des lactobacilles isolés à partir de lait et du fromage.

Tout cela nous a permis de déduire que la résistance aux sels biliaires reste un effet de souche.

2.2 Réponse au stimulus stomaco-duodéal :

Comme les deux contraintes (estomac et intestin grêle) pourrait interagir et affecter ainsi la viabilité des souches probiotiques, il est important d'évaluer tout les composants (sels biliaires, pH acide, suc gastrique) dans un seul système, plutôt que de testé l'effet de chaque composant dans des expériences séparées. Dans cette étude nous avons testé 6 souches de lactobacilles sélectionnés à l'égard de ces 3 composants.

Les résultats représentés dans la **figure (08)**, montrent que seulement 4 souches de lactobacilles testés présentent une légère résistance vis-à-vis du suc gastrique artificiel à pH 3

avec une moyenne de taux de survie de $1,86 \times 10^{-2}$, et les souches 10Lb et 15Br ont une très faible survie de l'ordre de $1,54 \times 10^{-4}$

Les souches 9Br, et 16Lb2 ont montré une tolérance de l'ordre de $4,54 \times 10^{-2}$ et $1,83 \times 10^{-2}$ respectivement, par contre les souches 6Lb et 16Lb1 présentent une tolérance moyenne dont on remarque un taux de survie de $6,81 \times 10^{-3}$ et $4,2 \times 10^{-3}$ respectivement.

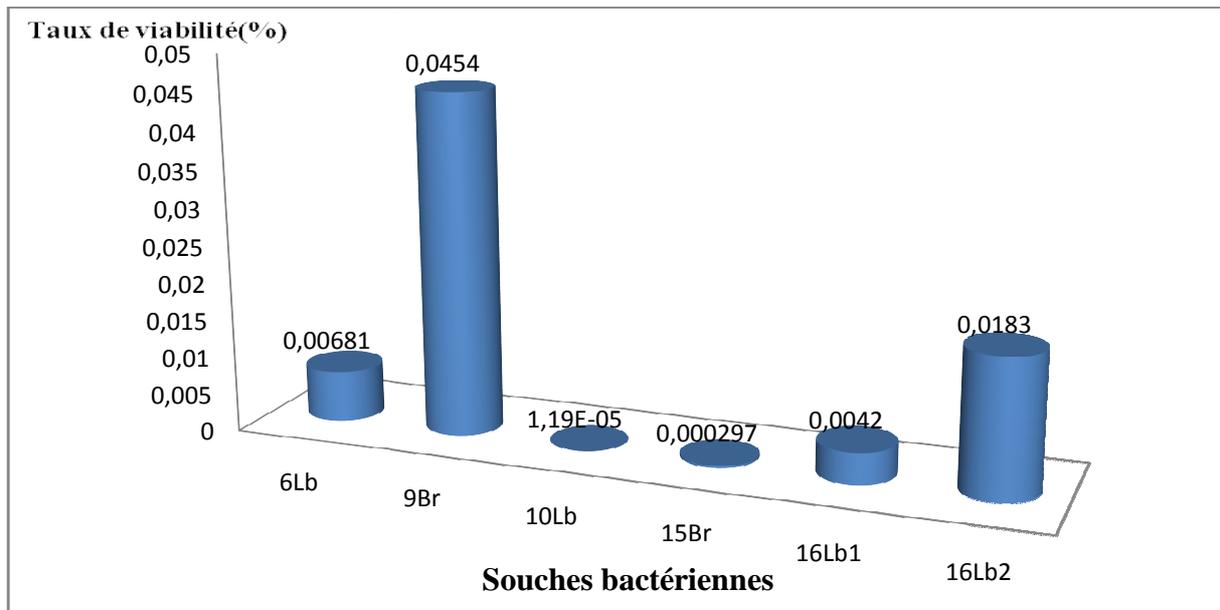


Figure 08: Effet de stimulus stomaco-duodéal sur les lactobacilles

Ces résultats sont en accord avec ceux rapporté par **Fernandez et al (2002)**, de même pour l'étude de **Zago et al (2011)** sur des souches de lactobacilles qui ont montré une bonne adaptation au suc gastrique simulé à pH 2,5.

Vizoso et al (2006) de leurs part, ont rapporté durant une étude effectuée sur trente cinq souches de *Lactobacillus* sp, que seulement sept souche ont toléré le stimulus stomaco-duodéal avec une survie qui varie entre 11% et 93%.

2.3. Adhésion aux cellules épithéliales

Pour réaliser ce test, nous avons utilisé des cellules épithéliales d'origine animale (cellules épithéliales d'un mouton), le choix de cet animal été en se basant sur le faite qu'il soit un mammifère et que la composition de sa paroi digestive se rapproche de celle de l'être humain.

Les résultats de cette étude sont représentés dans les figures 09 et 10. Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérees est supérieur à 15(Lin et al.,2007).

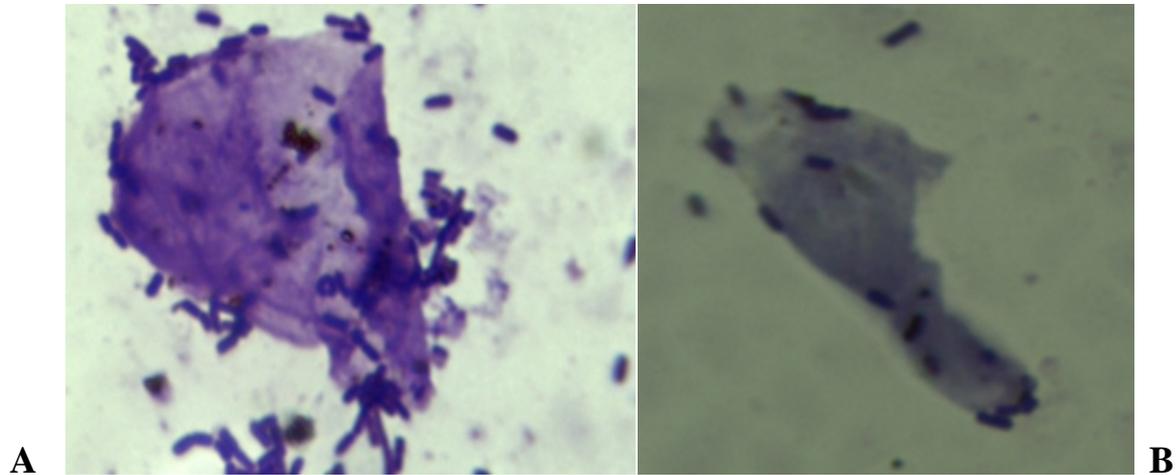


Figure 09 : Adhésion des lactobacilles aux cellules épithéliales observées au microscope optique (10X100)

A : Cellule du Colon B : Cellule de l'intestin grêle

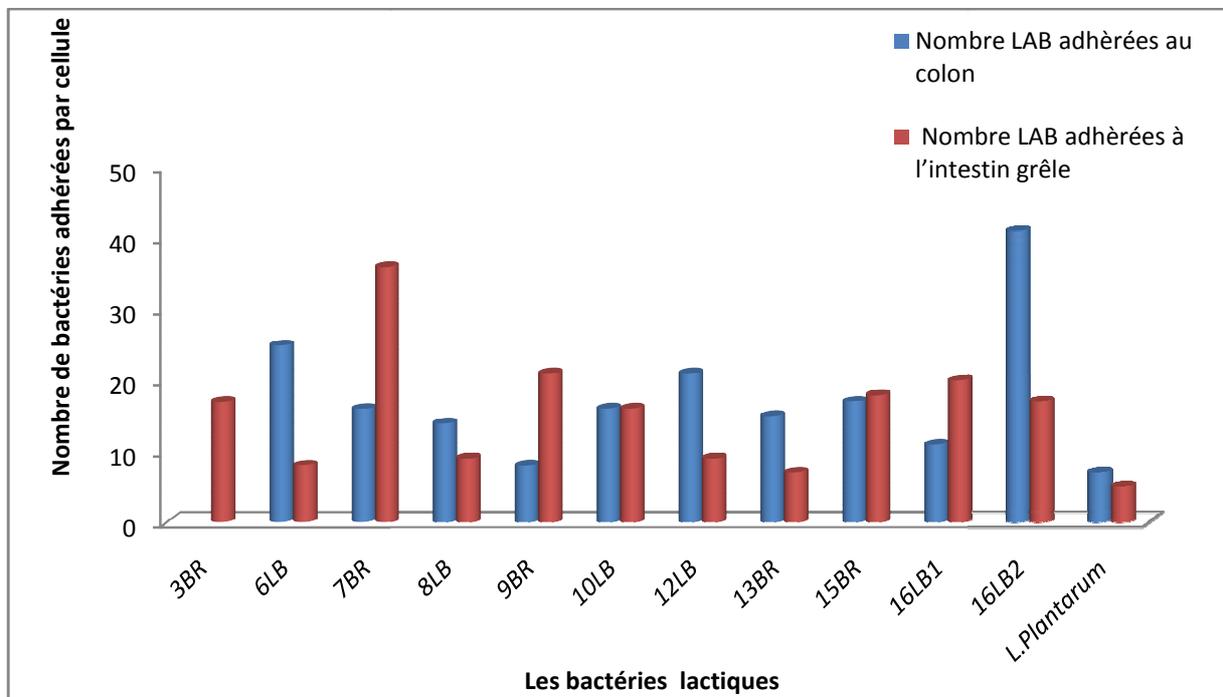


Figure 10: Taux d'adhésion des lactobacilles aux cellules épithéliales

Selon les résultats obtenus, on remarque que les taux d'adhésion sur les cellules épithéliale du colon sont relativement élevés comparés aux taux observés sur les cellules

épithéliales de l'intestin grêle dont 10 sur 12 souches testées ont adhéré au colon et seulement 7 sur 12 ont adhéré à l'intestin grêle avec quelques exceptions citant comme exemple les souches 7Br,9Br ainsi que 16Lb₁ qui favorisent l'adhésion à l'intestin grêle par rapport au côlon .

Un plus grand nombre de bactéries adhérentes aux cellules du côlon a été observé chez la souche 16Lb₂ et aux cellules de l'intestin grêle chez la souche 7Br avec 41 et 36 bactéries respectivement.

On remarque que la souche *Lb.plantarum* n'a pas atteint le seuil d'adhésion aux cellules épithéliales, alors que plusieurs travaux ont démontré sa forte adhésion aux cellules épithéliales de lignée humaine (Tuomola et Salminen,1998). Cela nous induit à supposer que cette souche testée dans ce travail a peut être perdu cette caractéristique après conservation pendant plusieurs mois à 4°C.

L'adhésion de ces souches aux cellules épithéliales *in vitro* nous permet de constater que ces souches de lactobacilles, peuvent adhérer aux cellules épithéliales intestinales humaine *in vivo* mais cette adhésion varie d'une espèce à une autre comme il a été rapporté par plusieurs auteurs (Coconnier et al., 1992 ; Fernandez et al.,2002).

Pour jouer leur rôle d'amélioration de l'hygiène intestinale, il est intéressant que les souches probiotiques puissent adhérer aux cellules de la paroi intestinale, d'une part pour faciliter la colonisation du tube digestif par le probiotique, et d'autre part pour obtenir un effet "barrière" optimal contre l'invasion de la muqueuse intestinale par des bactéries pathogènes (Huang et Adamst, 2003 ;Normande et al.,2006 ;Song et al.,2015).

2.4. Activité antibactérienne :

Une des caractéristiques intéressantes des bactéries lactiques est leur capacité de ralentir et d'inhiber l'activité et la croissance des bactéries pathogènes par la production de facteurs inhibiteurs (Dib et al., 2011). Les résultats de l'effet inhibiteur des 12 souches de lactobacille, contre 8 souches pathogènes confrontées durant un test direct (test de spots), sont illustrés dans les **figure 11** et **12**.



Figure 11: Résultats du test de spots

A : à l'égard de *Staphylococcus aureus*

B : à l'égard de *E.coli*, C : à l'égard de *Enterococcus faecalis*

D'après les résultats enregistrés, toutes les souches de lactobacilles testées ont une activité inhibitrice sur les différentes souches pathogènes, quelque soit leur Gram, négatif ou positif, avec des diamètres de zones d'inhibition remarquables allant de 8 à 45mm, à l'exception de la souche 6Lb qui est sans action sur le SARM et 7Br sur *S.aureus* 9B par contre on remarque une faible activité sur *Acénitobacter baumannii*.

La croissance de *E.faecalis* a été inhibé avec une zone d'inhibition de 45mm, par la souche 15Br et la plus réduite (25mm) par la souche 13Br, comparée aux diamètres des zones obtenu par **Midassirou et al.(2012)** qui ne dépassent pas 5mm durant une étude effectuée sur des lactobacilles d'origine animale ,ce qui indique que ces souches sont capable de synthétiser des substance antibactériennes envers les différents pathogènes.

Annuk et al.,(2002) et **Fernandez et al. (2002)**, dans leurs études, démontrent clairement que plusieurs espèces de lactobacilles, sont largement efficaces concernant l'inhibition des microorganismes pathogènes.

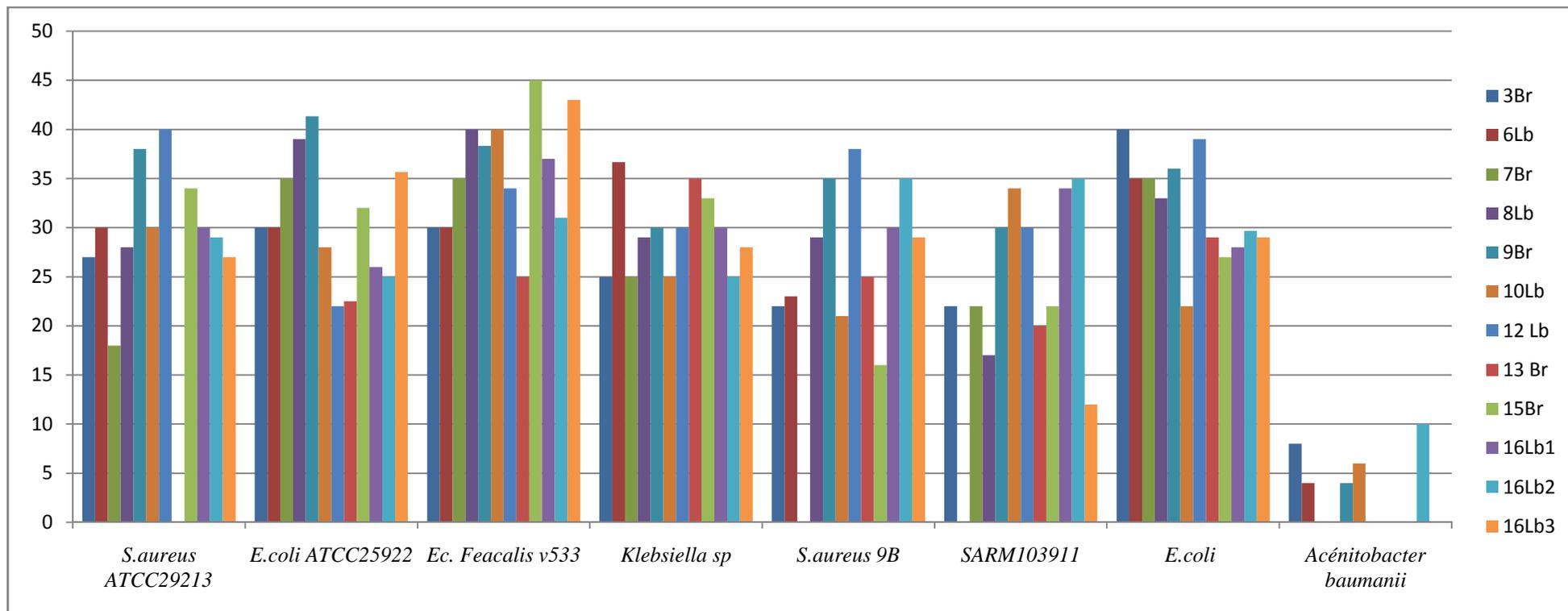


Figure 12 : résultats de test des spots

2.4.1. Effet des surnageants natifs :

Les résultats exposés dans le **tableau(VI)** illustrent la réaction des différentes souches pathogènes envers les surnageants natifs des lactobacilles.

D'après les résultats obtenus, on remarque que l'activité antibactérienne des surnageants natifs n'étaient pas semblables envers les souches pathogènes, en effet, les diamètres des zones d'inhibition étaient compris entre 2 et 14 mm.

Il paraît que les surnageants des 12 souches de lactobacilles, n'arrivent pas à inhiber la croissance de *Salmonella sp.*, alors qu'ils présentent une modeste activité vis-à-vis des autres souches testées, et une activité moyennement bonne envers *Pseudomonas aeruginosa* avec des diamètres de 9,5, 10, 11 et 12mm par les souches 10Lb, 12 Lb et 16Lb2, 8Lb, 16 Lb1 respectivement et *S.aureus ATCC29213* avec des diamètres de 8 à 13mm par la majorité des souches à l'exception de la souche 10Lb et 16 Lb1 qui n'avaient aucun effet sur cette souche. En ce qui concerne *E. coli* elle a été éliminée par 9Br avec un diamètre de 14mm qui est le plus grand diamètre marqué durant ce test et se suit par 7Br et 15Br avec 13mm de diamètre. Cette inhibition peut être due à la production d'un ou plusieurs métabolites qui peuvent être des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, ou encore des substances antibactériennes de nature protéique, comme elle peut être due à l'effet du pH acide.

La **figure 14** montre l'activité inhibitrice des surnageants sur *Pseudomonas aeruginosa* et *S.aureus ATCC29213*.



Figure 13 : Activité inhibitrice des surnageants natifs à l'égard de *Pseudomonas aeruginosa* (à gauche) et *S.aureus ATCC29213* (au milieu et à droite)

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres auteurs qui ont montré que les bactéries à effet probiotique sont capables d'empêcher la croissance des bactéries pathogènes *in vivo* et *in vitro* (Lin *et al.*, 2007 ; Balcazar et Luna-Rojas, 2007)

Midassirou et al. (2012) ont rapporté que l'effet inhibiteur des souches de lactobacilles été lié à la production d'acide lactique, et probablement aux bactériocines agissant dans les conditions acides.

Selon les résultats, on remarque que les diamètres des zones d'inhibition des surnageants ont diminué en comparaison avec les diamètres obtenus durant le test direct (test de spots), cela est peut être dû à :

- La différence de temps d'incubation des souches lactiques entre le test direct et le test de puits qui est de l'ordre de 6h environ.
- La dilution de la substance inhibitrice dans le surnagent.
- La synthèse de bactériocines chez certaines souches de lactobacilles est favorisée sur milieu solide que sur milieu liquide.
- la concentration des substances inhibitrice durant la présence et l'absence de la bactérie, en présence de la bactérie, les substances antimicrobiennes sont sécrétées d'une manière continue.

Tableau VI : Résultats de l'activité inhibitrice des surnageants natifs.

	<i>Acénitobactère bomanii</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Ecoli ATCC25922</i>	<i>E.coli</i>	SARM103911	<i>S.aureus 9Br</i>	<i>S.aureus16Lb</i>	<i>S.aureus ATCC</i>	<i>Salmonella</i>
3Br	5	0	6	0	12	0	11	0	11	0
6Lb	4	11	8	4	8	7	2	0	12	0
7Br	3	8	0	0	13	10	12	0	10	0
8Lb	0	9	11	2	12	8	0	2	12	0
9Br	5	12	9	2	14	0	0	0	9	0
10Lb	10	0	9,5	4	10	10	6	2	0	0
12Lb	6	8	10	0	8	0	8	2	10	0
13Br	4	13	0	0	10	0	0	0	8	0
15Br	0	0	0	3	13	11	0	0	13	0
16Lb1	0	10	12	0	0	0	0	0	0	0
16Lb2	2	8	10	0	0	0	0	0	11	0
<i>Lb.plantarum</i>	4	6	0	0	0	0	9	0	10	0

2.4.2.Effet des surnageants neutralisés:

Après l'élimination de l'effet de l'acidité par l'ajout de NaOH 1N stérile jusqu'à obtention d'un pH de 6,8 environ, les surnageants neutres, ont fait l'objet de ce test et les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau (VII)**.

Les résultats de la présente étude sur l'activité inhibitrice des surnageants neutres, a révélé un spectre d'inhibition étroit, dirigé notamment vis-à-vis des microorganismes cibles: *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Ces résultats se rapprochent notamment de ceux obtenus par **Allouche et al. (2010)**.

Ces résultats montrent également une perte d'activité inhibitrice des surnageants vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp* (à l'exception des souches 9Br, 10Lb et 15Br), SARM et *Acinetobacter baumannii* pour la majorité des souches de lactobacilles.

Ces résultats nous permettent de supposer que l'inhibiteur majeur de ces souches serait l'acide lactique. **Bhatia et al. (1989)** de leur part ont montré que l'acide lactique produit par *Lactobacillus acidophilus* est responsable de l'inhibition des bactéries pathogènes dans le tube digestif lors de leur étude réalisée *in vivo*.

L'apparition d'une inhibition de quelques souches pathogènes, après la neutralisation, confirme l'existence d'autres substances antibactériennes autres que l'acide lactique, telles que le peroxyde d'hydrogène, diacétyl et les bactériocines. Dans le même contexte, **Allouche et al. (2010)**, ont rapporté que les bactériocines produites par *Lactobacillus casei* développent une activité positive vis-à-vis de *staphylococcus aureus* et qu'il est également possible que la souche *Lactobacillus acidophilus* exerce uniquement une activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries taxonomiquement proches de la souche productrice.

Durant ce test on a remarqué l'inhibition de *Salmonella sp*, *E.coli ATCC25922* et *S.aureus* 9Br par la majorité des souches, alors que les surnageants natifs n'ont pas pu les éliminer. En effet, la neutralisation du surnageant n'entraîne pas de diminution du diamètre d'inhibition, comme on peut le remarquer chez la souche *Klebsiella sp*, la neutralisation des surnageants des souches 9Br, 10Lb et 15Br, tendent à augmenter l'inhibition de cette souche. Cependant ce phénomène a été expliqué par **Labioui et al. (2005)** en rapportant que

Tableau VII: Résultats de l'activité inhibitrice des surnageants neutralisés .

	<i>Acénitobactère bomanii</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Ecoli ATCC2 59222</i>	<i>Ecoli</i>	SARM 10391 1	<i>S.aureus 9Br</i>	<i>S.aureus16Lb</i>	<i>S.aureusATCC 29213</i>	<i>Salmonella</i>
3Br	0	0	0	5	2	0	0	0	4	6
6Lb	0	0	0	7	4	0	0	8	2	2
7Br	0	0	0	6	8	0	2	7	0	1
8Lb	0	0	0	0	0	0	1	3	2	0
9R	0	18	0	0	0	0	2	0	0	0
10Lb	0	10	0	6	7	0	2	9	4	0
12Lb	0	0	0	7	10	0	2	8	2	1
13Br	0	0	0	6	2	0	2	4	4	2
15Br	0	6	0	8	0	0	2	9	0	8
16Lb1	0	0	0	0	0	0	0	6	4	0
16Lb2	0	0	0	7	7	0	2	8	0	9
<i>Lb. plantarum</i>	0	0	0	9	9	0	0	9	4	7

L'élimination de l'effet de l'acide lactique et du peroxyde d'hydrogène favoriserait plutôt l'activité des substances antibactériennes.

2.5. Résistance aux antibiotiques :

Durant ce test, 12 souches de lactobacilles ont été confronté contre 12 antibiotiques différents.

Les résultats de ce test sont présentés dans **le tableau (VIII)** et figure 09.

Tableau VIII : diamètre de zones d'inhibition(mm) des antibiotiques vis à vis des lactobacilles

	OX5	FOX 3 0	SPI	CE10	SXT2 5	CP30	Néo	DO 30	GM	KAN	VA3 0	PEF
3Br	16	0	30	12	18	0	0	34	0	0	0	17
6Lb	0	0	16	13	IND	0	0	19	IND	IND	0	0
7Br	0	0	26	14	30	16	10	23	16	0	0	11
8Lb ₁	0	0	21	12	27	9	8	22	12	0	0	10
9Br	0	0	21	16	14	19	9	26	13	0	0	9
10Lb	0	0	21	0	IND	0	0	26	IND	IND	0	0
12Lb	14	0	26	12	0	0	0	40	8	0	0	21
13Br	0	0	23	0	26	13	0	27	12	0	0	8
15Br	0	0	20	9	22	11	0	23	11	IND	0	0
16Lb1	0	0	8	16	24	16	8	25	11	0	0	8
16Lb2	0	0	23	17	15	16	0	31	0	0	0	13
16Lb 3	0	0	22	0	IND	15	9	26	IND	IND	0	11

(IND : indéterminé)

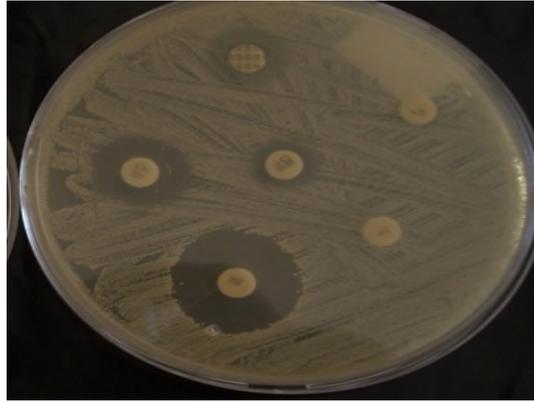


Figure14: Exemple du résultat de l'antibiogramme des souches lactiques

D'après les résultats du test, les souches étudiées étaient presque toutes sensibles aux antibiotiques suivants : Spiramycine , Trimetoprime-sulfamethoxazole (sauf 12Lb et 16Lb3),Cephotaxime (à l'exception de 16Lb3,10Lb et 13Br) ,Doxycycline –hydrochloride 30, Gentamicine (sauf 3Br et 16Lb2) ,Pefloxacin (sauf 10Lb, 15Br et 6Lb), avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 8 jusqu'à 40mm , par contre elles étaient résistantes au moins à 4 sur 12 antibiotiques testé qui sont les suivant : la Vancomycine, la Kanamycine, Cefoxitine et l'oxacyline (à l'exception de 12Lb et 3Br).Pour les autres antibiotiques les résultats étaient variables entre les souches .

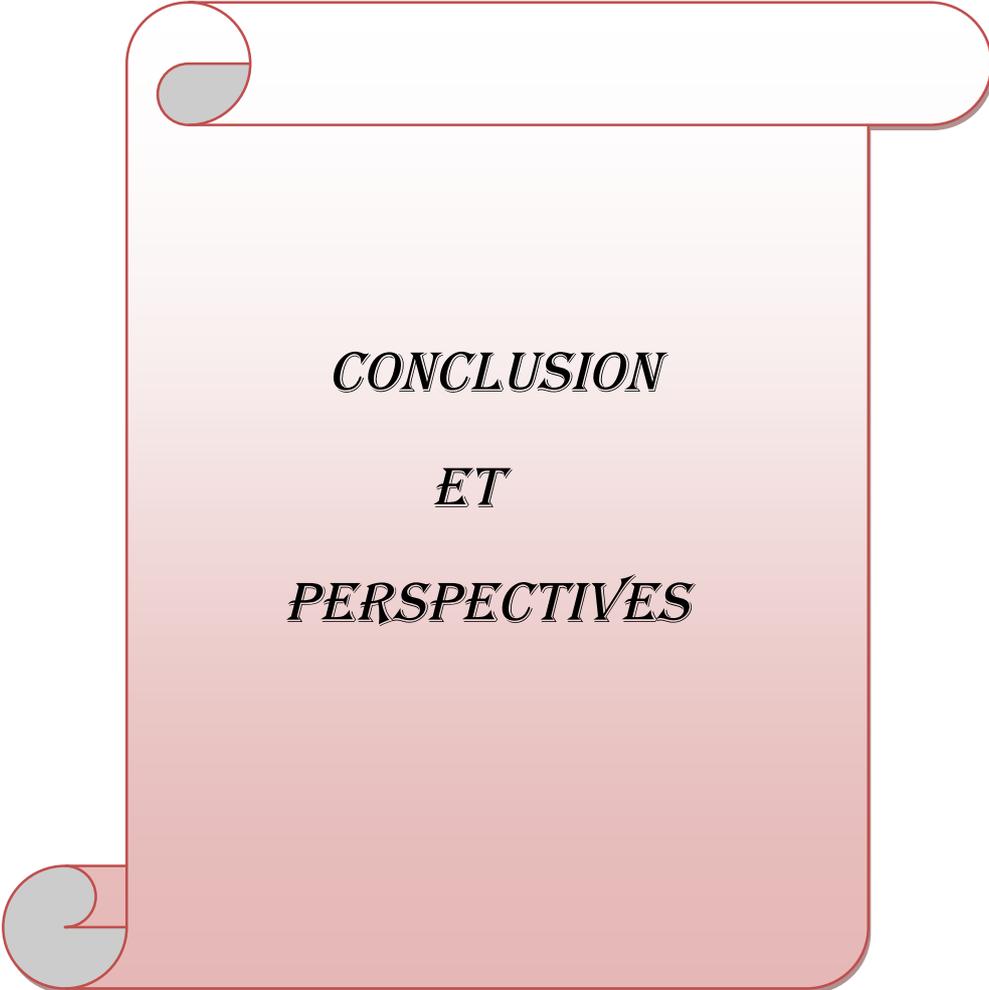
Il faut noter que cette résistance et sensibilité trouvées dans cette étude, peuvent être liées à la concentration de chaque antibiotique d'où la nécessité de tester plusieurs concentrations pour confirmer les résultats.

Les bactéries lactiques utilisé largement comme probiotiques ont le potentiel de servir d'hôte de gènes de résistance aux antibiotiques ce qui augmente le risque de transmettre ces gènes aux bactéries pathogènes de l'Homme, en revanche peut conduire à des conséquences néfastes sur la santé humaine et qui est la principale menace des bactéries lactiques (**Mathur et Singh, 2005**) .

Mikelsaar et al .(2004) , ont rapporté que des souches de *Lactobacillus* étudiées ont présenté une résistance à 100% à la Vancomycine et à la Cefoxitine, ce qui soutient nos résultats, de même pour **Mathur et Singh (2005)** qui ont signalé qu'une étude faite sur des espèces de lactobacilles isolés d'un yaourt turque a prouvé qu'elles étaient résistantes à la Vancomycine, tetracycline, la pénicilline G ainsi que la Kanamycine avec des proportions de (65%,26%,23% et 79%) respectivement.

Pour **Gureimond et al.(2013)** cette résistance à la vancomycine est due à la non liaison de cette dernière sur le peptidoglycane des Lactobacilles .

Il ya peut d'études effectuées sur la susceptibilité de certains antibiotiques qu'on a utilisé dans cette étude, cependant nos résultats pourraient aidés dans l'enrichissement des profils de sensibilités aux antibiotiques des lactobacilles.



CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En raison du fait que plusieurs espèces de lactobacilles sont des hôtes normaux de l'organisme humain, et au regard d'une longue histoire d'utilisation dans l'industrie alimentaire, ces bactéries d'origine laitières nous montrent après chaque étude effectuée des particularités surprenantes les unes que les autres. Dans ce contexte, certaines espèces de lactobacilles semblaient être les plus aptes à compléter les fonctions d'une souche probiotique par rapport à une autre.

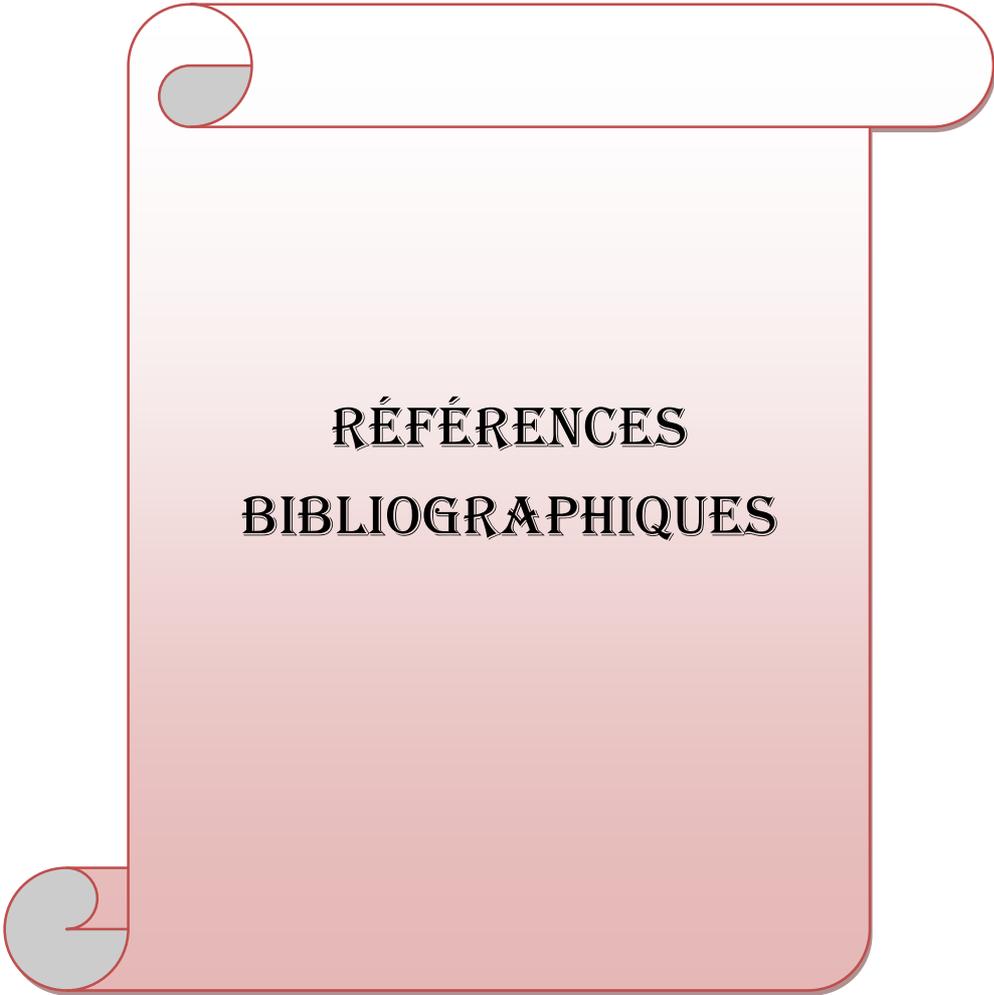
L'objet principal de cette étude était donc d'évaluer quelques aptitudes probiotiques des souches de lactobacilles isolées dans des produits laitiers locaux de fabrication artisanale Algérienne (Beurre, L'ben) et conservées à 4°C.

Cette recherche s'est intéressée principalement à l'étude de la résistance, des souches de lactobacilles, aux conditions gastriques et intestinales simulées, à leur adhésion aux cellules épithéliales de la ligné animale et leur activité antibactériennes contre des microorganismes pathogènes. L'aspect sécuritaire des souches probiotiques a été également étudié via leur résistance aux antibiotiques.

D'après les résultats de l'étude des aptitudes probiotiques *in vitro*, nous avons pu déduire que, même au sein d'une même espèce, il existe des variations entre les souches, cependant, la majorité des tests effectués ont rapporté des résultats plus au moins intéressants. Les souches lactiques ont montré une résistance modérée vis-à-vis des conditions hostiles telles que les sels biliaires à 0,3% dont on a remarqué une certaine résistance même après 24h d'exposition notamment la souche 6Lb qui a atteint un taux de survie de $1,48 \times 10^{-2}$ de même pour la sécrétion duodénale dont on a marqué une légère tolérance de la majorité des souches soumises à cette contrainte. Par ailleurs, l'étude de leurs activités antibactériennes a montré un profil d'inhibition intéressant contre les bactéries pathogènes testées notamment à l'égard d'*Ec.faecalis*, comme elles ont montré une bonne capacité de s'adhérer au tissu épithéliale à l'exception de *L.plantarum* et une modeste résistance aux antibiotiques.

Pour conclure, notre travail a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives. Donc pour compléter cette thématique de recherche sur la flore lactique du beurre et du L'ben, nous proposons :

- Etude de l'adhésion aux cellules épithéliales d'origine humaines
- La purification des substances antimicrobiennes synthétisées par ces souches afin de confirmer leur nature et leurs modes d'action ;
- La confirmation de leurs profils de résistance aux antibiotiques.
- L'étude des mécanismes d'action de ces différentes souches.



**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- **Ait-Belgnaoui A, Lamine F, Han W, Eutamene H, Fioramonti J, Bueno L et Theodorou V. (2005).** A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct.* 3, 59-63.
- **Allend A, Martinez B, Selmaa V, Gila MI, Suarezb JE et Rodriuez, A. (2007).** Growth and bacteriocin production by Lactic Acid Bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiol.* 24, 759-766.
- **Allouche FN, Hellal A, Laraba A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de Lactobacilles thermophiles utilisé dans l'industrie. *Nature et technologie.* pp. 13- 20.
- **Ammor MS et Mayo B. (2007).** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as Functional starter cultures in dry sausage production. *Meat Science.* 76, 138-146.
- **Annuk HS, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelsaar M. (2002).** Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidate. *J. Appl. Microbiol.* 94:402- 412.
- **Axelsson L. (2004).** Classification and physiology. *In: Lactic acid bacteria Microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 1-66.
- **Badis N., Laouabdia-Sellami, N., Guetrani, D., Kihal, M., Ouzarout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales Arabie et Kabyle. *Science & technologie.* pp. 30-37.
- **Balcazar JL, et Luna-Rojas T. (2007):** Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr Microbiol.* 55: 409- 412.
- **Barefoot SF, et Klaenhammer TR. (1983).** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1808-1815.
- **Bendjeddou K. (2013).** Effet anti-EPEC de *Lactobacillus paracasei* additionné à un lait infantile au lactosérum : caractéristiques de sa bactériocine. Thèse de doctorat en

science biologiques, Microbiologie, Université de Bejaia, Faculté des sciences de la nature et de la vie. 147p.

- **Bhatia S, Neena K, Abraham P, Nair NG, et Methcaah P. (1989).** *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* *in vitro*. *J clin microbiol* .27, 2328 – 2330.
- **Bogovici MB, Koman RM et Perko B. (2007).** inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *Int. Dairy J.*17, 157-166.
- **Burns P, Vinderola G, Binetti A, Quiberoni A, de los Reyes-Gavilan CG et Reinheimer J. (2008).** Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *Int. Dairy J.* 18,377-385.
- **Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT. & Danziger LH. (2005).** Pathogénic relevance of *Lactobacillus* :a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin microbiol infect Dis.*24 ,31-40.
- **Carr FJ, Chili D et Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev. Microbiol.*28, 281-370.
- **Chafia S.(2006).** effet de l’addition des probiotiques dans les régimes alimentaire sur les performances zootechniques du poulet de chair; mémoire de magister en science vétérinaires. Université El-hadj lakhdar – batna.
- **Coconnier MH, Klaenhammer TR, Kernéis S, Bernet MF and Servin AL. (1992).** Proten-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Applied and Environmental Microbiology* .58,2034–2039
- **Collins MD, Phillips BA et Zanoni P. (1989).** Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus pracasei* sp. Nov. subsp. *pracasei* and subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans* and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 39: 105-108
- **Dellaglio F, de Roissard H, Torriani S, Curk MC et Janssens D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). Lorica,Uriage. 1, 25-116.
- **Denohue DC. (2004).** Safety of novel probiotic bacteria. *In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright AV. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc.New York. pp. 531-546.
- **De Roissard H et Luquet FM. (1994).** Bactéries lactiques .,Lorica Uriage.1, 25-116.

- **Desmazeaud M. (1998).** Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. de recherches laitières, *INRA*.
- **Dib H, Hajj Semaan E, Marad R, Ayoub J, Choueiry L, Moussa H, Bitar G. (2012).** Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. *Libanese Science journal*, vol.13,N.1.43-58.
- **Dortu C et Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires (2009. *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement* .13,143-154.
- **Edwards CG, Collins MD, Lawson PA, Rodriguez AV. (2000).** *Lactobacillus nageli* ssp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine international Journal of systematic and Evolutionary Microbiology.,vol.50,699-709.
- **FAO/OMS (2001).** Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS) .*Working Group Report*. Cordoba, Argentina.
- **FAO/WHO (2002).** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). *Working Group Report*. London, Ontario, Canada.
- **Felis GE et Dellaglio F. (2007)** .Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria .*curr . Issues Intestinal Microbiol* . 8, 44-61.
- **Fernandez MF, Boris S, Barbes C.(2002).** Probiotic properties of human lactobacilli strains to be in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 94, 449-455.
- **Figueredo AR, compos F, Freitas V, Hogot, couto JA. (2008).** Effect Of Phenolique Aldehydes and Flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus Oeni* and *Lactobacillus hilgardii*.*Food Mycrobiologiy.*,Vol.25,105-112.
- **Fleming HP, Erchells JL et Caslilow RN. (1975).** Microbiol inhibition of isolate *pedicoccus* from cucumber bune .*Appl.Environ .Microbiol.*30, 1040 - 1042 .

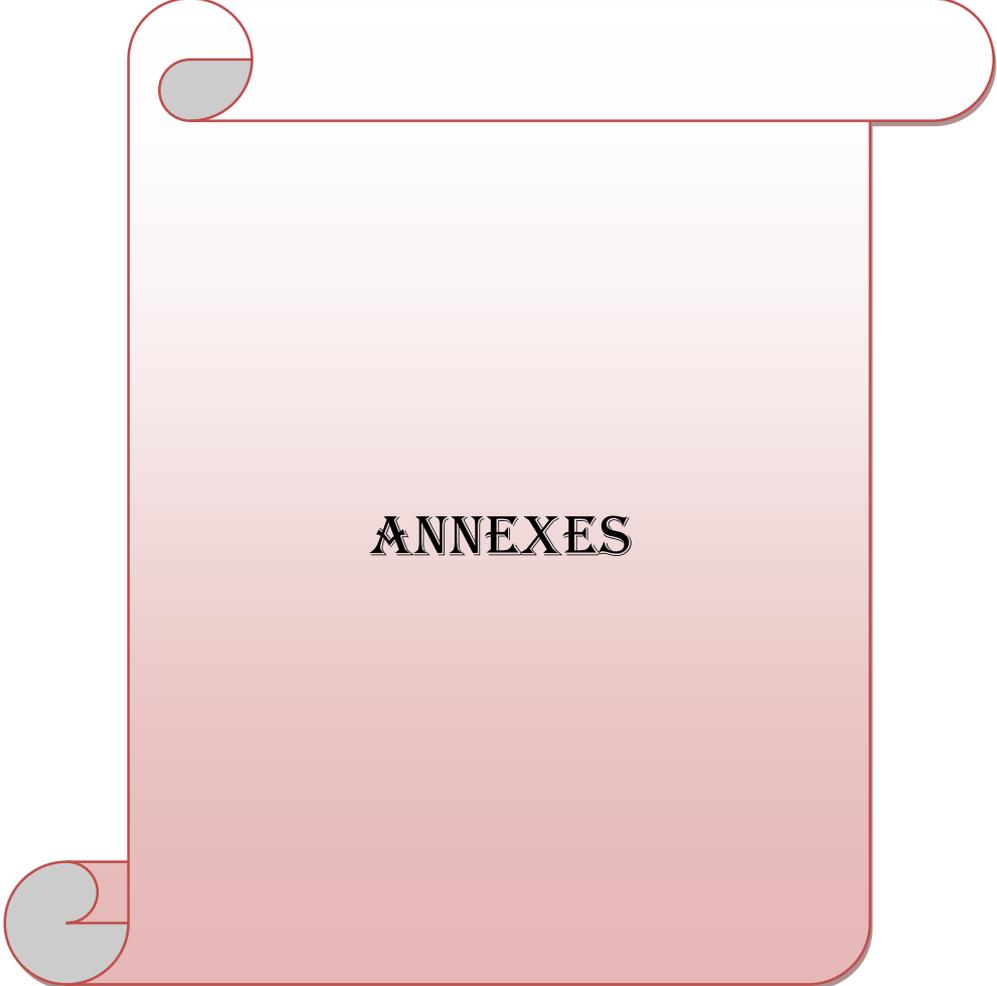
- **Garry p et Le guern. (1999).** Les bactéries lactiques. Bull. Liaison CTSCCV. pp .423.429.
- **Gill HS. (2003).** Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*17, 755-73.
- **Gournier-Chateau N, Larpent JP, Castellanos MI, et Larpent JL. (1994) .** Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Lavoisier Tec&Doc. Paris. 192p.
- **Gossum AV.(2007).** Probiotiques et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). *Nutrition Clinique et metabolisme.*21, 81- 84 .
- **Gu RX, Yang ZQ, Li ZH, Chen SL et Luo ZL. (2008).** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe.*14, 313-317.
- **Gueimond M , Sanchez B, de los Reyes-Gavilan C et Margolles ,A.(2013).** Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol.*18, 4 -202.
- **Guessas B. et Kihal M., 2004.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African J. Biotechnol.* 3(6) : 339-342.
- **Hadef S. (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques des bactéries lactiques locales, Thèse de magistère en microbiologie Appliquée, Faculté des sciences de la nature et de la vie et Science de la terre et de l'univers l'université kasdi Merbah, ouargla, 87p
- **Hamon E, Horvatovich P, Izquierdo E, Bringel F, Marchioni E, Aoude-Werner D, Ennahar S.(2011).** Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC. Microbiol.* 11(63) 191-201.
- **Hassan A .N et frank J.F. (2001).** starter cultures and their use in : applied dairy microbiology (marth E.H et steele J.L). 2^{ème} Ed, marceldekker Inc ,New york., 151-205.
- **Hogg T. (2005).** Essential microbiology. *John Wiley & Sons, Ltd.* 188-190.
- **Huang Y, Adams MC,(2003):** An in vitro model for investigating intestinal adhesion of potential dairy propionibacteria probiotic strains using cell line C2BBel, *Letters in Applied Microbiology* .36, 213–216.
- **Hyrominus B, Le Marrec P, Hadj Sassi A et Deschamps A. (2000).** Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 61 : 193-197.

- **Idoui T., 2008.** Les bactéries lactiques indigènes : Isolement, identification et propriétés technologiques. Effet probiotiques chez le poulet de chair ISA15, le lapin de souche locale et le rat Wistar. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie. 179.
- **Kandler O. et Weiss N. (1986).** genus *lactobacillus*. In : Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée. Université d'Oran.1- 156p. Edité par. Mami A.
- **Kaur IP, Chopra K, Saini A (2002).** Probiotics, potential pharmaceutical applications.*Eur. J. Pharm. Sci.* 15:1–9.
- **Kleanhammer TR. (1988).**Ge bacteriocins produced by lactic acid bacteria.*FEMS Microbiol.Rev.* 12, 39-86
- **Labioui H, Elmoualdi L, El Yachioui M. et Ouhssine M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 144 ,237-250.
- **Lamoureux L. (2000).** Exploitation de l'activité β -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto oligosaccharides.*National Library of Canada* .pp. 23-47.
- **Larpent SP. (1997).**Microbiologie alimentaire techniques de laboratoire.*Ed.Tech et Doc*, Lavoisier .Paris.1041p
- **Leyral G et Vierling E. (2007).**Microbiologie et toxicologie des aliments :Hygiène et sécurité alimentaire. Walters klumer France.p.287.
- **Lin WH, Yu B, Jang SH, Tsen HY. (2007).** Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* swine and poultry. *Anaerobe.* 13,107-113.
- **Leveau et Bouix. (1993).** microbiologie industrielles: les microorganismes d'intérêt industrielles .*Tec & doc*, Lavoisier. Paries., 85-87.
- **Malinen E. (2002).** Molecular methods for detection of probiotics and intestinal microbiota and evaluation of *lactobacillus brevis* as a potentiel probiotic dietary adjunct.University of Helsinki. 65p.
- **Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos, G, Pot, B. and Tsakalidou E.(2006).** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy. Journal*,16,189-199.

- **Matamoros S., 2008.**Caractérisation de bactéries lactiques psychotrophes en vu de leur utilisation dans a biopréservation des aliments. Etude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid. Thèse de Doctorat de Biotechnologie agroalimentaire, science de l'aliment. Université de Nantes, Faculté des sciences et techniques, 142p.
- **Matsumoto S, Watanabe N, Imaoka A, Okabe Y. (2001).**Preventive effects of Bifidobacterium- and Lactobacillus-fermented milk on the development of inflammatory bowel disease in senescence-accelerated mouse P1/Yit strain mice. *Digestion.*64,92-9. 1
- **Mathara JM, Schillinger U, Guigas C, Franz C, Kutima PM, Mbugua SK, Shin HK. et Holzapfel WH.(2008).** Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 126 ,57-64.
- **Mathur S. et Singh R.(2005).** Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 105 : 281–295.
- **Midassirou B, Mahdhi A, Chaieb K, Bakhrouf A.(2012).** Recherche de bactéries lactiques et étude *in vitro* de leurs propriétés probiotiques. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn* pp,147-163.
- **Mikelsaar M. et Zilmer M. 2004.** *Lactobacillus fermentum* ME-3-an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Micr. Ecol. Health Dis* 1 :1-27.
- **Millette M. (2007).** Etude de Bactérie Lactique , à potentiel probiotique et de leur métabolites .In :thèse présentée à l'INRS-Instituent Armand-Frappier.
- **Millette M, Luquet FM et Ruiz MT. (2008).** Characterization of probiotic properties of *Lctobacillus* strains. *Dairy Sci. Technol.*. 88 , 695-705.
- **Nielsen DS ,JacbsenT,Jespersen L ,Koch AG,Arneborg N.(2008).** Occurrence and growth of yeasts in processed meat products.Implications for potential spoilage.*Met Science.*vol., 80:919-926.
- **Nissen-Meyer J, Hauge HH., Fimland G, Eijsink V.G.H. et Nes IF. (1997) .** Ribosommally synthesiesd antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria :their function, structure, biogenesis, and their mechanism of action . *Recent Res . Devel. Microbiol.*, 1, 141-154.
- **Normand M, Roland N, Richoux R, Kerfean SR.(2006).**propriétés probiotiques des bactéries prpioniques laitières .programme Nutrition Santé en Brtagne.42p.

- **Oheix N. (2003).** Caractérisation moléculaire des bactéries lactiques des levains de panification. Mémoire d'ingénieur. ENITIAA., 81p.
- **Orla-Jensen S. (1919).** The lactic acid bacteria.A.F.hostand son Koenighichen Hof Bohandel, Copenhagen
- **Palorames IC, Pérez-Morales R.et Acedo félix E.(2007).**Evaluation of probiotic properties in lactobacillus isolated from small intestine of piglets.rev.latinoom microbiol., 49(3-4),46-54.
- **Percival M. (1997).** Choosing a probiotic supplement. *Clin. Nutr. Insights.*, 6(1), 95-100.
- **Pettoello MM, Guandalini S, Ecuba P, Corvino C. (1989).** di Martinol. Lactose malabsorption in children with symptomatic gardia lambia infection feasibility of yoghurt supplemenation. *J. Pediatr Gastroenterol*; 9,295-300.
- **Pot b. (2008).** the taxonomie of lacticacidbacteria.in:bacteria lactique aux ferments (corrieu g.et luquet F.M).*Tec & Doc,lavoisies.Parie.*,1-106.
- **Reyes-Gavilan CG, Suarez A, Fernandez-Garcia M, Margolles A, gueimande M. et Ruas Madiedo P. (2011).** Adhesion of bile-adapeted Bifidobacterium strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal Juices.*Res.Microbiol.*,162,514-519.
- **Robin JM. et Rouchy A.(2001).** Les probiotiques. *CEDN. Nutritherapie. Info.*1-4.
- **Rodas AM., Ferrer S, Pardo L.(2005).** polyphasic study of wine lactobacillus strains, taxonomieimplication.*Int J systEvol Microbiol.*,vol.55:197-207.
- **Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Matto J, et Mattila-Sandholm T. (2000).** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, 84,197-215.
- **Slover CM. et Danziger,L. (2008).** lactobacllus :a review .*Clin.Micro.New Slett.U.*, 23-27.
- **Sneath P.H.A, Mair NS,Sharpe ME. et Holt JG. (1986).** Bergey's Manual of systematic bacteriology , vol.2.Baltimore :Williams Et Wilkins.
- **Song M,Yun B,Moon JH, Park DJ, Lim K, Oh S.(2015).**Characterisation of selected Lactobacillus strains for use as probiotics. *Korean J. food .sci .Anim. Resours.* 35 (4): 551-556

- **Stiles M, Holzapfel W. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Areview J. Food Microbiol.*, 36: 1-29.
- **Temmerman R, Pot B, Huys G. et Swings J. (2003).** Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.*, 81 : 1-10.
- **Titiek FD, Endang SR, Djoko W. et Slamet S. (1996).** Antimicrobial substance produced by *lactobacillus* sp. *TGR-2* isoleted from *Growol*. *Indonesian. Food Nutr. Prog.* ,3(2) : 29-34.
- **Tuomola EM, Salminen SJ (1998).** Adhesion of some probiotics and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food. Microbiol.* 41: 45-51.
- **Ustunol Z. et Gandhi H, (2001).** Growth and viability of commercial Bifidobacterium spp in honey-sweetened skim milk, *Journal of Food Protection*, 64, 1775-1779..
- **Valcheva R, Ferchichi M, Korakli M, Ivanova I, Gänzle M, Vogel R, Prévost H, Onno B, Dousset X. (2006).** *Lactobacillus nantensis* sp. nov., isolated from French wheat sourdough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 56: 587-591.
- **Vasiljevic T, Shah NP (2008).** Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy. J.*18: 714–728.
- **Vizoso Pinto MG, Franz C.M.A.P, Schillinger U et Holzapfel WH (2006).** *Lactobacillus* spp.with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J.Food Microbiol.* 109, 205-214.
- **Wunwissa K, Bhesh B, et Hilton D. (2003):** Evaluation of encapsulation techniques of Probiotics for yoghurt. *Inter Dairy J.* 13: 3-13.
- **Zago M, Fornasari ME, Carminati D, Burns P, Suárez V, Vinderola G, Reinheimer J. et Giraffa G(2011).** Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28 , 1033-1040.



ANNEXES

Annexe1: composition des milieux de culture et tampon

I.1) Bouillon MRS (Man- Rogosa et Sharp) pH 6, 5 (Guiraud ,2003)

Peptone	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure	5g
Glucose.....	20g
Tween80.....	1ml
Phosphate dipotassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate triamonique.....	2g
Sulfate de magnésium.....	0,02g
Sulfate de manganèse.....	0,05g
eau distillée.....	1l

NB : Pour la gélose en ajoute 15g d'agar

Autoclavage à 120°C/20min

I.2) Le milieu BHIB (Bouillon cœur-cervelle ou Braient Heart Infusion) pH7, 6±0,2:

Extrait de cœur-cervelle.....	17,5g
Peptone pancréatique de gélatine	20g
Chlorure de sodium.....	5g
Phosphate dissodique.....	2,5g
Glucose.....	2g

Autoclavage à 120°C/20 min, pour 1L d'eau distillé en ajoute 37g de poudre BHI

I.3) Gèlose MH (Muller Hinton) pH 7.3±0.1:

Infusion de viande de bœuf.....	30g
Hydrolysate de caséine.....	17,5g
Amidon.....	1,5g
Agar.....	17g
eau distillée.....	1l

Autoclavage à 120°C/20min

I.4) Tampon phosphate PBS:

NaCl.....	8g/l
KCl.....	0,2g/l
Na ₂ HPO ₄	0,24g/l
KH ₂ PO ₄	0,24g/l
Eau distillée.....	Qsp

Autoclavage à 120°C/20min

I.5) Sécrétion duodénale synthétique (pH 7)

NaHCO ₃	6,4g
NaCl	1,28g
KCl	0,239g
Eau distillée qsp	1000ml

Autoclavage à 120°C/20min

Annexe 2: Coloration de Gram:

Appeler aussi la coloration double, son principe s'intitule comme suit :

1. Préparation d'un frottis (Fixation de la culture bactérien sur la lame par chaleur).
2. La lame est ensuite recouverte du violet de gentiane pendant 1 min.
3. Ajouter du lugol pendant 30 min .
4. décolorer avec une solution alcool 96° et rincer avec l'eau distillée.
5. ajouter la fuchsine et laisser agir 20 à 30 secondes .laver à l'eau.
- 6 .La lame après avoir été rincée et séchée, puis observée au microscope optique généralement à L'objectif x100, Avec l'huile à immersion.
7. Les bactéries à Gram(+) sont apparaissent en violet et les bactéries à Gram(-) en rose.

Annexe 3 : Données des résultats

Tableau I : Résultats de la standardisation

Souches bactériennes	3Br2c	6Lb 2c	7Br	8Lb1	9Br	10Lb
Nombre de cellules en UFC/ml	$1,34 \times 10^{10}$	2×10^{10}	$1,29 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{10}$	$1,04 \times 10^{10}$	$1,39 \times 10^{11}$
Souches bactériennes	12Lb2c	13Br	15Br 3c	16Lb1	16Lb2	<i>L .plantarum 3c</i>
Nombre de cellules en UFC/ml	$1,05 \times 10^{10}$	$4,98 \times 10^{10}$	$1,07 \times 10^{10}$	$1,55 \times 10^{10}$	$1,23 \times 10^{10}$	$0,9 \times 10^{10}$

Tableau II : Résultats de test de résistance au sel biliaire à 0,3%

Souches bactériennes	UFC/ml t=0h	UFC /ml t= 24h	Taux de viabilité
3Br	IND	0	0
6Lb	2×10^{10}	$2,96 \times 10^6$	0,0148
7Br	$1,29 \times 10^{11}$	3×10^3	0,00000232
8Lb	IND	0	0
9Br	$1,04 \times 10^{10}$	$2,27 \times 10^4$	0,000218
10Lb	$1,39 \times 10^{11}$	$3,81 \times 10^4$	0,0000274
12Lb	$1,05 \times 10^{10}$	3×10^3	0,0000286
13Br	$4,98 \times 10^{10}$	$1,36 \times 10^3$	0,00000273
15Br	$1,07 \times 10^{10}$	1×10^4	0,0000935
16Lb1	$1,55 \times 10^{10}$	$3,9 \times 10^5$	0,00252
16Lb	$1,23 \times 10^{10}$	$8,22 \times 10^4$	0,000668
<i>L .plantarum</i>	IND	0	0

Tableau III : résultats de test de résistance au stimulus stomaco- duodéal et aux sels biliaires à un pH= 3

LAB \ Nombre de Cellules en UFC	UFC /ml à t=0h	UFC /ml à t =3h	Taux de survie
6Lb	$1,08 \times 10^{11}$	$7,364 \times 10^6$	0,00681
9Br	$1,04 \times 10^{10}$	$4,727 \times 10^6$	0,0454
10Lb	$1,39 \times 10^{11}$	1×10^5	0,0000119
15Br	$1,07 \times 10^{10}$	$3,181 \times 10^6$	0,000297
16Lb1	$1,43 \times 10^{10}$	6×10^5	0,0042
16Lb2	$2,34 \times 10^{10}$	$4,272 \times 10^6$	0,0183

Tableau IV : Résultats de test d'adhésion :

Souche Bactérienne	Nombre BAL adhère au colon	Nombre de BAL adhère à l'intestin grêle
3Br	25	17
6Lb	25	8
7Br	16	36
8Lb1	14	9
9Br	8	21
10Lb	16	16
12Lb	21	9
13Br	15	7
15Br	17	18
16Lr1	11	20
16Lb2	41	17
<i>L.plantarum</i>	7	5

Tableau V : Résultats de test de spots.

LAB Souche pathogènes	3Br	6Lb	7Br	8Lb1	9Br	10Lb	12Lb	13Br	15Br	16L b1	16Lb 2	16Lb 3
<i>S.aureus</i> <i>ATCC29213</i>	27	30	18	28	38	30	40	0	34	30	29	27
<i>E.coli</i> <i>ATCC25922</i>	30	30	35	39	41, 33	28	22	22,5	32	26	25	35,66
<i>E .faecalis</i> <i>V533</i>	30	30	35	40	38,33	40	34	25	45	37	31	43
<i>KPC</i> <i>Klebsiella sp</i>	25	36,66	25	29	30	25	30	35	33	30	25	28
<i>S.aureus 9B</i>	22	23	0	29	35	21	38	25	16	30	35	29
<i>SARM103911</i>	22	0	22	17	30	34	30	20	22	34	35	12
<i>E.coli</i>	40	35	35	33	36	22	39	29	27	28	29,66	29
<i>Acénitobacter</i> <i>baumanii</i>	8	4	0	0	4	6	0	0	0	0	10	0

Résumé :

Au cours de ce travail 12 souches de Lactobacilles préalablement isolées du beurre et du L'ben et conservées à 4°C ont fait l'objet d'une étude sur quelques aptitudes probiotiques (tolérance vis-à-vis des sels biliaries, résistance aux conditions stomaco-duodénales et au pH3, adhésions aux cellules épithéliales, activité antibactérienne et la réaction envers les antibiotiques).

Les résultats obtenus semblent plus au moins intéressants, les souches soumises à 0,3% de sels biliaries avaient une légère résistance à ce stress à l'exception de la souche *L.plantarum*, 3Br,7Br, 8Lb et 13Br dont on a marqué une mortalité, de même, une croissance a été constatée en présence du stimulus stomaco-duodénales. La plupart des souches étudiées ont montrées une bonne adhésion aux cellules épithéliales de la lignée animale et une bonne activité inhibitrice contre les pathogènes testés en particulier à l'égard de *Ec. Feacalis*, *E.coli* et *S.aureus*. A la fin l'aspect sécuritaire des souches a rapporté une sensibilité acceptable envers les antibiotiques testés, sans négliger les résistances repérées notamment vis-à-vis de la Cefoxitine, Gentamicine et Vancomycine.

Mots clés : Lactobacilles, probiotiques, résistance, adhésion et inhibition.

Abstract:

Along the present study, 12 strains of lactobacilli previously isolated from buttermilk and preserved at 4°C have been subject of a study on few probiotics skills (tolerance towards bile salt, resistance to stomacho duodenal conditions at pH3, epithelial cells adhesion, antibacterial activity and response to antibiotics). The results obtained seem more or less interesting, strains submitted to 0.3% bile salts was a slight resistance to the stress except the strain *L.plantarum*, 3Br, 7BR, 8LB and 13Br which was labeled a mortality, similarly, a growth was observed in the presence of peptic stomacho stimulus. Most strains studied have shown a good adhesion to epithelial cells of animal line and a good inhibitory activity against the tested pathogens, especially towards *Ec. feacalis*, *E.coli* and *S.aureus*. In the end, the safety aspect of the strains has reported an acceptable sensitivity towards the tested antibiotics, without neglecting the resistance marked notably towards the Cefoxitin, Vancomycin and Gentamicine.

Keywords: *Lactobacillus*, probiotics, resistance, adhesion, inhibition.

