

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique

Université Abderrahmane Mira Bejaia  
Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département de Microbiologie

Mémoire de Master en Microbiologie Alimentaire et Santé

Thème

Etude de quelques Aptitudes probiotiques  
de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BMK  
2005

Membres de jury :

*Président : M. Touati A.*

*Promoteur : M. Bendjeddou K.*

*Examinatrices : M<sup>me</sup> Keramane B.*

*M<sup>elle</sup> Titeli F.*

Réalisé par :

M<sup>elle</sup> Ourtirane Roza

Promotion 2012 / 2013

## **Remerciements**

*Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire de Microbiologie appliquée équipe des produits laitiers et probiotiques, de l'université A. Mira de Bejaia.*

*Je remercie par l'occasion tout les membres du laboratoire ; à commencer par la responsable: Pr. Sadoun Djamilia ; Les enseignants les étudiants en post graduation, ainsi que les ingénieurs, pour leurs conseils et leur bonne humeur.*

*Je tiens à remercier particulièrement, M. Bendjeddou K. d'avoir accepté de m'encadrer durant ce travail. Merci monsieur pour vos précieux conseils et votre confiance placée en moi.*

*Mes plus vifs remerciements vont aussi aux membres du Jury :*

*M. Touati A. Merci Monsieur de nous avoir fait l'honneur de présider ce Jury.*

*Mme. Keramane B. Merci madame d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et de contribuer à améliorer sa qualité.*

*Melle Titelli F. Je tiens tout d'abord à vous remercier d'avoir accepté d'examiner ce travail, mais aussi pour tout vos précieux conseils et votre écoute durant ces deux dernières années.*

**Merci à tous**

## ***Dédicaces***

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A mes très chers parents, ma source de bonheur, signe de ma reconnaissance pour votre amour et vos encouragements, qui m'ont permis d'arriver à ce stade. Sachez qu'aucun mot ne peut exprimer l'amour et l'estime que j'ai pour vous. Papa, maman je vous aime tout simplement !*

*A à mes merveilleux grands parents, qui m'ont toujours soutenue et appris les vrais valeurs de la vie. Merci pour les chaleureux moments passés en votre compagnie, Que dieu vous garde en bonne santé.*

*A mon adorable frère Mokrane et mes petites princesses : Cylia, Kenza et Sonia, merci de m'avoir supporté durant toutes ces années je vous adores !*

*A mon ami, et âme sœur : Mustapha.*

*A mes amies, en particulier : Narimene, Sara, Nacera et Yousra avec lesquelles j'ai partagé des moments inoubliables.*

*A toute la promotion de Microbiologie 2012-2013.*

*A tous ceux qui cherchent leurs noms ici !*

## *Liste des abréviations*

AFSSA: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

ARN : Acide Ribonucléique

FAO: Food and Agriculture Organization

G+C: guanine+ cytosine

GRAS: Generally Recognized As Safe.

*Lb: Lactobacillus*

LMA : Laboratoire de Microbiologie Appliquée.

Log : Logarithme (décimal)

MRS: de Man Rogosa & Sharpe

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

pH: potentiel Hydrogène

Sp : species

Ssp : subspecies

UFC: Unité formant colonie

w/v : weight/ volume

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Différentes voies fermentaires retrouvées chez les Lactobacilles.....	p6
<b>Figure 2.</b> Schéma fonctionnel des différents organes intervenant dans la digestion chez l'humain.....	p13
<b>Figure 3.</b> Les récentes avancées dans la sélection des probiotiques.....	p14
<b>Figure 4.</b> Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.....	p15
<b>Figure 5.</b> Schéma de la standardisation de la souche de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005.....	p18
<b>Figure 6.</b> Etude de l'effet du pH sur la croissance de <i>Lb. Paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005.....	p20
<b>Figure 7.</b> Etude de la résistance de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005 aux différentes enzymes.....	p23
<b>Figure 8.</b> Effet de la bile sur la croissance de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005.....	p25
<b>Figure 9.</b> Préparation du matériel pour le yaourt.....	p29
<b>Figure 10.</b> Revivification du ferment.....	p29
<b>Figure 11.</b> Les étapes de préparation du yaourt.....	p30
<b>Figure 12.</b> Aspect de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005 sur milieu MRS.....	p31
<b>Figure 13.</b> Effet de l'acidité sur la croissance de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005.....	p33
<b>Figure 14.</b> Effet du pH neutre et alcalin sur la croissance de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005.....	p36
<b>Figure 15.</b> Comparaison entre l'effet de la pepsine et de l'acidité sur la croissance de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005.....	p38
<b>Figure 16.</b> Comparaison entre l'effet des enzymes sur la croissance de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005.....	p38
<b>Figure 17.</b> Effet des enzymes pancréatiques, sur la croissance de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005.....	p39
<b>Figure 18.</b> Aspect du yaourt obtenu.....	p43
<b>Figure 19.</b> Evolution du pH et du nombre de cellules de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005 dans le yaourt stocké à 4°C.....	p43

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Les principaux groupes formés au sein du genre <i>Lactobacillus</i> , sur la base des caractéristiques phénotypiques.....	p5
<b>Tableau II.</b> Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotiques.....	p10
<b>Tableau III.</b> Principaux critères utilisés pour la sélection des probiotiques.....	p11
<b>Tableau IV.</b> Résultats des tests utilisés pour confirmer la pureté de la souche.....	p31
<b>Tableau V.</b> Résultats des paramètres du yaourt.....	p42.

# Sommaire

	Pages
<b>Introduction</b> .....	1
<b>I. Partie bibliographique</b>	
<b>I : Les lactobacilles</b>	
I.1. Propriétés générales.....	3
I.2. Habitat.....	3
I.3. Historique.....	3
1.4. Taxonomie.....	4
1.5. Description des l'espèce <i>Lactobacillus paracasei</i> .....	7
1.6. Intérêt des lactobacilles.....	8
<b>II : Les probiotiques</b>	
II.1. Historique et définition.....	9
II.2. Les microorganismes probiotiques.....	10
II.3 Critères de sélection des probiotiques.....	11
II.3.1 Origine des souches.....	12
II.3.2. Survie au cours du transit intestinal.....	12
II.3.3. Survie des probiotiques dans l'aliment.....	13
II.4. Effets des probiotiques.....	15

## II. Partie pratique

Chapitre I. Matériel et méthodes	Pages
1. Origine de la souche.....	16
2. Revivification de la souche.....	16
3. Vérification de la pureté de la souche.....	16
4. La standardisation de l'inoculum.....	17
5. Etudes de quelques aptitudes probiotiques de <i>Lb. paracasei subsp paracasei</i> BMK2005.....	19
5-a. Evaluation de l'effet du pH sur la croissance de <i>Lb. paracasei subsp paracasei</i> BMK2005.....	20
5-b. Effet des enzymes digestives sur la croissance de <i>Lb. paracasei subsp paracasei</i> BMK2005.....	20
5-c. Effet de la bile sur la croissance de <i>Lb. paracasei subsp paracasei</i> BMK 2005.....	24
6. Suivit de la survie <i>Lb. paracasei subsp paracasei</i> BMK 2005 dans le yaourt stocké à 4°C pendant 15 jours.....	26
a. Préparation du yaourt probiotique.....	26
a-1. Préparation du lait.....	26
a-2. Préparation de l'inoculum.....	27
a-3. Préparation du ferment et ensemencement du lait.....	27
b. Etude des paramètres du yaourt.....	27

## **Chapitre II. Résultats et discussion**

1. Vérification de la pureté de la souche.....	31
2. Standardisation de l'inoculum.....	32
3. Etude de quelques aptitudes probiotiques de la souche de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005.....	32
3-a. Etude de la survie de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005aux pH acides.....	32
3-b. Etude de la croissance de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005 à pH neutre et alcalin.....	34
3-c. Etude de l'effet des enzymes sur la croissance de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005.....	35
3-d. Effet des sels biliaires sur la croissance de <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005.....	38
4. Etude de la croissance de <i>Lb. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> BMK 2005 dans le yaourt stocké à 4°C.....	41
<b>Conclusion.....</b>	<b>43</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

# Introduction

## Introduction

Le tractus digestif est un écosystème complexe et ouvert aux micro-organismes exogènes, de part sa surface totale estimée à 200-300 m<sup>2</sup>. Cet écosystème est généré par une alliance stable entre l'épithélium, le système immunitaire et une importante flore microbienne (Amrouche, 2005). Toutefois, lorsque cet équilibre est perturbé par des facteurs environnementaux ou physiologiques, la susceptibilité aux infections et aux maladies inflammatoires est accrue (Bouhnik, 2002).

Afin d'y remédier, les chercheurs se penchent d'avantage à des remèdes plus naturels, d'où l'intérêt porté à l'utilisation des probiotiques (Dunne et al, 2002).

Le terme "probiotique" fut introduit pour la première fois en 1965 par Lilly et Stillwell ; par opposition aux antibiotiques les probiotiques furent définis comme des acteurs dérivés des microorganismes et stimulant la croissance des autres organismes. En 1989, Roy Fuller a mis l'accent sur la nécessité de viabilité des probiotiques et a introduit l'idée qu'ils avaient un effet bénéfique sur l'hôte (Desai, 2008).

La majorité de micro-organismes probiotiques appartiennent principalement aux genres de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Il y a également d'autres genres de bactéries et de quelques levures employées couramment (Malago et al, 2011). Ils sont largement utilisés en alimentation humaine et sont administrés oralement par l'intermédiaire d'aliment fermentés (yaourts, fromages, choucroute...) soit additionnées à l'alimentation sous forme de préparations microbiennes comme pour les animaux (Gournier- château et al, 1994).

La valeur commerciale d'un produit de santé naturel ne dépend pas seulement du type de probiotique utilisé, mais aussi de sa concentration qui doit être suffisante et de son activité métabolique. Ainsi, lors de l'évaluation des probiotiques, il est nécessaire de déterminer leur capacité de survivre au passage dans l'estomac et l'intestin grêle et d'atteindre l'endroit cible (Corrieu et Luquet, 2005).

La viabilité et la survie des microorganismes probiotiques sont les paramètres les plus importants pour exercer leurs effets bénéfiques. Jusqu'ici la recherche s'est principalement concentrée sur la sensibilité des souches envers les enzymes protéolytiques, les sels biliaires et les pH acides (Morea et al, 2007).

Les souches de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* sont généralement connues pour leurs capacité à survivre dans les conditions gastro- intestinales, cependant, d'assez nombreux travaux (Bomba et *al* ,2002 ; Dunne et *al*, 2002 ; Liong, 2006 ; Desai, 2008 ; Jamaly et *al* 2011 ; Bendali et *al* 2011 etc.) ont montrés des différences entre les souches d'une même espèce.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude, qui consiste en l'évaluation de quelques aptitudes probiotiques de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005, Cette souche d'origine humaine est douée d'une bonne activité antibactérienne à l'égard de plusieurs espèces entéropathogènes (Bendjeddou et *al*, 2012).

Cependant pour pouvoir bénéficier de l'appellation probiotique, et l'utiliser en alimentation humaine, *Lb .paracasei* subsp *paracasei* BMK2005 a été testé en premier lieu, sur sa capacité à résister aux variations de pH (acide, neutre, et alcalin), aux enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine et chymotrypsine) ainsi qu'aux sels biliaires.

Et en second lieu, sur sa capacité à être incorporée au yaourt et de suivre ainsi sa croissance pendant 15jours de stockage à 4°C.

Partie

Bibliographique

## **I. Les lactobacilles**

### **I.1. Propriétés générales**

Les lactobacilles regroupent de nombreuses espèces bactériennes omniprésentes dans la nature, mais rarement pathogènes, dont les principales caractéristiques sont d'être : Gram positif, catalase négatif, en forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chaînes quelquefois très longues, immobiles ou mobiles grâce à des flagelles péritriches, asporogènes, anaérobies facultatives ou microaérophiles et incapables à réduire le nitrate et à hydrolyser la gélatine (de Roissart et Luquet, 1994).

Les Lactobacilles ont un métabolisme soit homofermentaire avec production uniquement d'acide lactique à partir du glucose, soit hétérofermentaire avec production d'acide lactique, d'acide acétique et de CO<sub>2</sub> (Hammes et Vogel, 1995 ; Desai, 2008).

En outre, ces bactéries ont des exigences nutritionnelles complexes, variables d'une espèce à une autre et un large spectre de température de croissance (2 à 53°C) ; elles sont acidophiles avec un pH optimal de croissance de 5,5 à 6,2 (de Roissart et Luquet, 1994).

### **I.2. Habitat**

Les lactobacilles sont isolés de diverses niches écologiques, ils sont principalement retrouvés dans les substrats riches en hydrates de carbone, ainsi que dans d'autres habitats tel que les muqueuses de l'homme et de l'animal (cavité buccale, intestinale et vaginale), ils sont retrouvés en faibles quantités sur les végétaux mais s'y développent rapidement lorsqu'ils sont abimés (Hammes et Vogel, 1995 ; Tailliez, 2004).

### **I.3. Historique**

L'intérêt primaire d'Orla-Jensen (1919) était d'identifier les bactéries lactiques utiles en industrie alimentaire ; en étudiant les bactéries du fromage Danois, Orla-Jensen a pu identifier 10 espèces du groupe des lactobacilles en son temps. Ce nombre a lentement augmenté, seulement 15 et 25 espèces ont été identifiées respectivement, dans la 7<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> édition de Bergey's Manual. Enfin dans sa 9<sup>ème</sup> édition, le Bergey's Manual a reconnu 44 espèces du groupe des Lactobacilles. Cependant ce nombre ne cesse d'augmenter, grâce à l'émergence des nouvelles méthodes taxonomiques (Hammes et Vogel, 1995).

Au début de l'année 2007, le genre de *Lactobacillus* comprenait 120 espèces. Ces dernières sont principalement différenciées par leurs profil de fermentation des glucides, mais d'autres critères ont été aussi pris en compte, comme la nature du peptidoglycane, type d'isomère d'acide lactique, l'exigence en facteurs de croissance et la composition des cellules en acide gras (Hammes et Hertel, 2009).

### 1.4. Taxonomie

Les lactobacilles sont groupés dans la subdivision des bactéries Gram positif à GC% inférieur à 50% et classées dans le phylum des Firmicutes, la classe des Bacilli, l'ordre des Lactobacilles et la famille des Lactobacillaceae (Hammes et Hertel, 2009). Le genre *Lactobacillus* a été divisé dès 1919 par Orla-Jensen en trois sous genres : *Thermobacterium*, *strptobacterium* et *Betabacterium*, suivant des critères de température optimale de croissance et de produit de fermentation des sucres. Cette subdivision a été confirmée par les travaux de Buyz et al. (1957) qui ont montré que ces groupes possèdent des équipements enzymatiques différents. Néanmoins, les travaux de taxonomie moléculaire ont incité Kandler et Weiss (1986) à abandonner la classification en sous-genre (de Roissart et Luquet, 1994).

Afin d'essayer de combiner les définitions de groupe de Kandler et de Weiss (1986) avec le groupement basé sur le rapport phylogénétique, les espèces ont été réarrangées suivant les groupes A, B, C correspondant aux groupes respectifs I, II, III de Kandler et de Weiss (1986) (Hammes et Vogel, 1995). Tableau I.

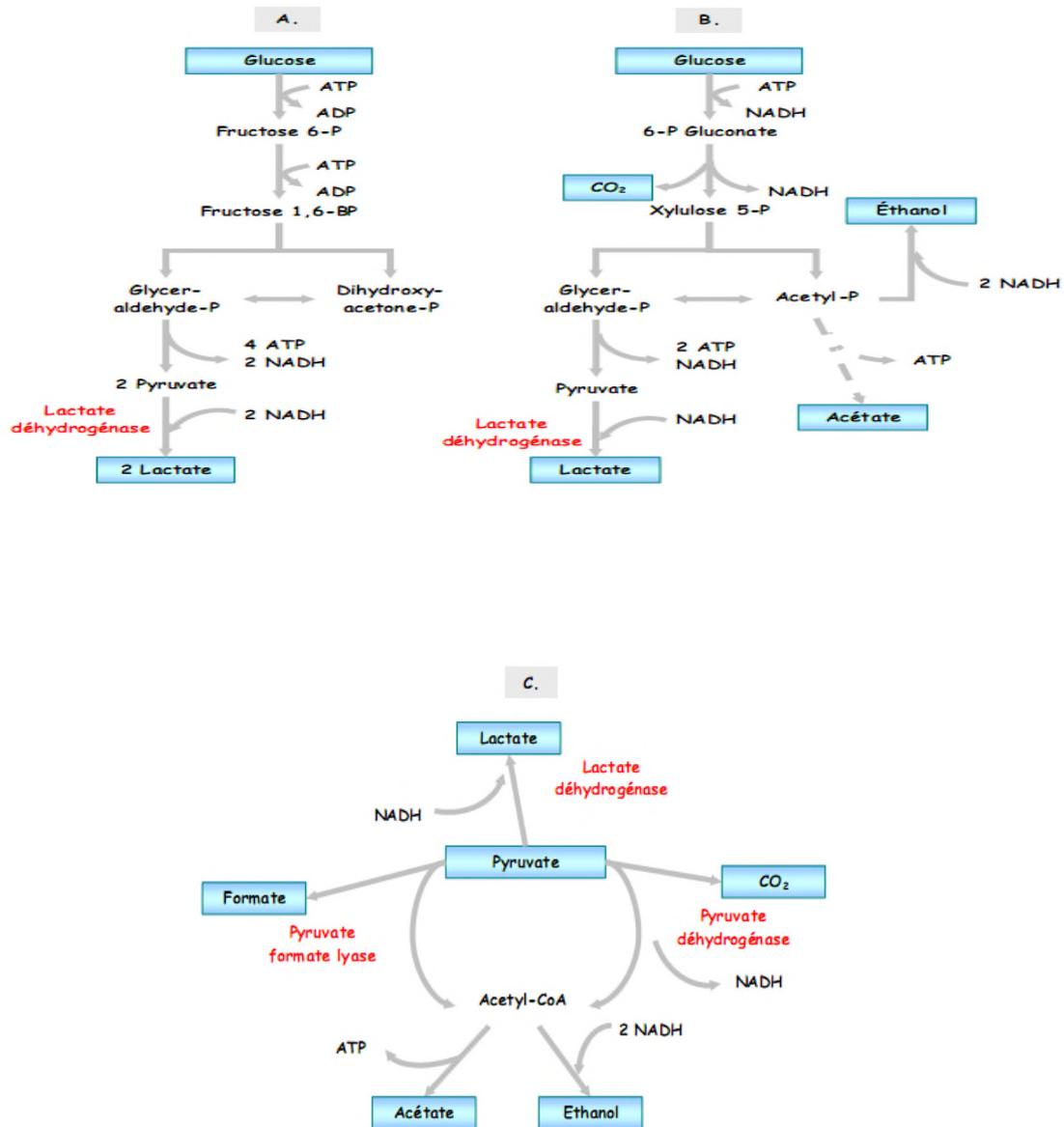
**Groupe I/A :** formé de lactobacilles homofermentaire stricts qui fermentent les hexoses, par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant presque exclusivement du lactate, mais ne fermentent ni les pentoses ni les gluconates.

**Groupe II/B :** formé de lactobacilles hétérofermentaire facultatifs qui fermentent les hexoses, par voie d'Embden-Meyerhof, en produisant presque exclusivement du lactate, et peuvent fermenter les pentoses en lactate et acétate par une phosphokétolase inductible.

**Groupe III/C :** formé de lactobacilles hétérofermentaire stricts qui fermentent les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol) et CO<sub>2</sub> et qui fermentent les pentoses en lactate et acétate, en faisant appel dans les deux cas à une phosphokétolase (de Roissart et Luquet, 1994). Les différentes voies fermentaires sont illustrées dans la (Fig.1).

**Tableau I :** Les principaux groupes formés au sein du genre *Lactobacillus*, sur la base des caractéristiques phénotypiques (Saad, 2010).

<b>Groupe I</b> <b>Homo-fermentaires strictes</b>	<b>Groupe II</b> <b>Hétéro-fermentaires facultatifs</b>	<b>Groupe III</b> <b>Hétéro-fermentaires strictes</b>
<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. amylophilus</i> <i>Lb. amylovorus</i> <i>Lb. aviarius</i> subsp. <i>araffinosus</i> <i>Lb. aviarius</i> subsp. <i>Aviarius</i> <i>Lb. crispatus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lb. farciminis</i> <i>Lb. gallinarum</i> <i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. jensenii</i> <i>Lb. johnsonii</i> <i>Lb. kefirano</i> <i>faciens</i> <i>Lb. kefir</i> <i>granum</i> <i>Lb. mali</i> <i>Lb. ruminis</i> <i>Lb. salivarius</i> subsp. <i>salicinus</i> <i>Lb. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> <i>Lb. sharpeae</i>	<i>Lb. acetotolerans</i> <i>Lb. agilis</i> <i>Lb. alimentarius</i> <i>Lb. bifementans</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> <i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> <i>Lb. cuvatus</i> <i>Lb. graminis</i> <i>Lb. hamsteti</i> <i>Lb. homohiochii</i> <i>Lb. intestinalis</i> <i>Lb. murinus</i> <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. sake</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. collinoides</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. fructivorans</i> <i>Lb. fructosus</i> <i>Lb. hilgardii</i> <i>Lb. kefir</i> <i>Lb. malefermentans</i> <i>Lb. oris</i> <i>Lb. panis</i> <i>Lb. parabuchneri</i> <i>Lb. parakefir</i> <i>Lb. pontis</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. sanfrancisco</i> <i>Lb. suebicus</i> <i>Lb. vaccino</i> <i>stercus</i> <i>Lb. vaginalis</i>



**Fig.1.** Différentes voies fermentaires retrouvées chez les lactobacille A - homofermentaire stricte, B - hétérofermentaire stricte et C - hétérofermentaire facultative (Givry, 2006).

Le genre *Lactobacillus* est divisé en sept groupes phylogénétiques : *Lb. casei*, *Lb. delbreuckii*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. sakei* et *Lb. salivarius*. Les autres espèces : *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. zae* forment un seul groupe phylogénétique, celui de *Lb. casei* (Hammes et Hertel, 2009).

### 1.5. Description des l'espèce *Lb. paracasei*

*Lb. paracasei* fait partie du groupe II (*Streptobacterium*) des bactéries lactiques de la classification d'Orla –Jensen. Ce groupe représente des lactobacilles homofermentaire mésophiles et ils peuvent être occasionnellement hétérofermentaire en fonction du substrat (Guiraud, 2003). Les souches de cette espèce sont généralement utilisées comme des cultures « non starter » dans la fabrication de fromages pour améliorer la production d'arômes (Bendali, 2009).

Les cellules de *Lb. paracasei* se présente sous forme de bacilles isolés ou en chaînettes, de taille moyenne ( $0,8-1,0 \times 2,0-4 \mu\text{m}$ ) souvent avec des extrémités à angles droits. Les souches sont immobiles et elles poussent généralement à des températures allant de 10 à 40°C, mais certaines souches peuvent pousser entre 5 et 45°C (Hammes et Vogel, 1995). Elles produisent des exopolysaccharides (EPS) en faible quantité (0,1 à 1,5 g/l). Le contenu de leurs ADN en G+C% est de 45-47%.

Deux sous espèces sont décrites :

- ***Lb. paracasei subsp paracasei*** : la plus part des souches produisent l'isomère L(+) de l'acide lactique, cependant certaines souches produisent un mélange racémique. Elles sont uréase négative et ne produisent pas d'ammoniac à partir de l'arginine.
- ***Lb. paracasei subsp. tolerans*** : les souches de cette sous- espèce résistent à un traitement thermique de 72°C pendant 40 secondes d'où le nom « tolerans ». elles poussent à des températures allant de 10 à 37°C, mais elles ne poussent pas à 40°C (Hammes et Hertel, 2009).

### 1.6. Intérêt des lactobacilles

Étant donné la diversité des propriétés métaboliques présentées par les membres du genre *Lactobacillus* ces bactéries ont été trouvées dans un certain nombre de produits alimentaires fermentés. Dans ces produits, les lactobacilles contribuent principalement à leur conservation, ou l'amélioration de leurs saveurs ou leurs propriétés nutritionnelles. Ces souches sont ajoutées en tant que démarreurs délibérés ou participent à la fermentation en raison de leur présence en tant que contaminants naturels des substrats (Givry, 2006).

Une autre propriété des lactobacilles qui est devenue très appréciée est leur pouvoir antimicrobien. En effet, selon plusieurs auteurs (de Roissart et Luquet, 1995, Collado et al, 2009, Bendali, 2009 ; Bendjeddou, 2013) l'activité antimicrobienne des lactobacilles est due à la production de plusieurs substances qui sont : les acides organiques, le diacetyl, le peroxyde d'hydrogène, et la production de bactériocines.

C'est pourquoi beaucoup d'attention a été orientée vers leurs rôle potentiel comme probiotiques (Givry, 2006).

## II. Les probiotiques

### II.1. Historique et définition

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs « pro » et « bios » et signifie littéralement « en faveur de la vie » par opposition au terme antibiotique signifiant « contre la vie » (Gournier-château et *al*, 1994).

La définition des probiotiques a évolué au cours du temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. La notion de probiotiques a été développée principalement grâce aux travaux de Metchnikoff ayant suggéré que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes accroît la longévité en réduisant, dans le tube digestif, la population de bactéries putréfiantes et/ou produisant des toxines (Belgnaoui, 2006 ; Saad, 2010).

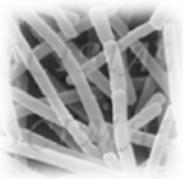
Une des premières définitions des probiotiques comme étant des « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposée par deux vétérinaires ; Lilly et Stillwell en 1965. Depuis ce temps, plusieurs définitions ont été données aux probiotiques (Malago et *al*, 2011). Selon Parker (1974) « probiotiques » désigne les microorganismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale (Amrouche, 2005). Cette définition trop vaste englobe les cultures microbiennes mais aussi les métabolites produits par les microorganismes et par conséquent les préparations d'antibiotiques. C'est pourquoi en 1989, Fuller redéfinit les probiotiques comme étant : des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale (Gournier-château et *al*, 1994).

Enfin, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) (Report of FAO/WHO, 2002), les probiotiques sont « des microorganismes vivants administrés qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates et procurent des bénéfices pour la santé de l'hôte » (AFSSA, 2005).

## II.2. Les microorganismes probiotiques

Les micro-organismes probiotiques sont principalement représentés par des bactéries à Gram positif appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Tableau II). Toutefois, d'autres micro-organismes tels que la souche non pathogène *E. coli* Nissle 1917, certaines souches de *Bacillus subtilis* et certaines levures sont également considérés comme probiotiques. Des mélanges de bactéries, comme VSL#3, qui est constitué de 8 souches bactériennes, sont également commercialisés comme probiotiques (Fernandez, 2011).

**Tableau II. Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotiques (Alegre, 2009).**

Genre	Espèces
<b><i>Bifidobacterium</i></b> 	<i>Bf. longum</i> BB536 <i>Bf. breve</i> <i>Bf. Lactis</i> Bb12 <i>Bf. Lactis</i> HNO19 <i>Bf. Animalis</i> DNI 73010 <i>Bf. Infantis</i> 35264
<b><i>Lactobacillus</i></b> 	<i>Lb. acidophilus</i> La5 <i>Lb. casei</i> DN114001 <i>Lb.renteri</i> ATTCC55730 <i>Lb.delbreckii subsp. bulgaricus</i> 2038 <i>Lb.gasseri</i> K7 <i>Lb. johnsonni</i> <i>Lb.paracasei</i> F19 <i>Lb.paracasei</i> 299V <i>Lb. rhamnosus</i> GG
<b>Autres bactéries lactiques</b> 	<i>Streptococcus thermophilus</i> 1131 <i>Enterococcus faecalis</i> symbioflor <i>E.faecium</i> SF68 <i>Pediococcus acidolactici</i>
<b>Microorganismes non lactiques</b> 	<i>Bacillus subtilis</i> <i>B. cereus</i> <i>Saccaromyces boulardii</i> <i>S. cerevisiae</i>

### II.3 Critères de sélection des probiotiques

En plus d'assurer l'absence totale de toxicité ou de pathogénicité de la souche et afin de satisfaire la définition des probiotiques (Alegre, 2009). Les microorganismes sont sélectionnés selon des critères particuliers pour garantir qu'ils parviennent dans le tractus intestinal sous une forme viable, qu'ils puissent y développer leur activité métabolique et, si possible, qu'ils possèdent également une certaine capacité d'adhésion (Saad, 2010).

Les critères de sélection des probiotiques sont représenté dans le Tableau III.

**Tableau III. Principaux critères utilisés pour la sélection des probiotiques(Alegre, 2009).**

<p><b>Critères de sécurité</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Historique de non pathogénicité (GRAS)</li> <li>• Souche d'origine humaine</li> <li>• Souche caractéristique par des méthodes phénotypiques et génotypiques</li> <li>• Souches déposée dans une collection de cultures internationale</li> <li>• Aucune possibilité de transmission de gène de résistance aux antibiotiques</li> </ul>
<p><b>Critères fonctionnels</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tolérance à l'acidité gastrique</li> <li>• Tolérance à la bile</li> <li>• Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes</li> <li>• Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et /ou au mucus</li> <li>• Stimulation du système immunitaire</li> </ul>
<p><b>Critères technologiques</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini</li> <li>• Conservation des propriétés probiotiques après production.</li> </ul>

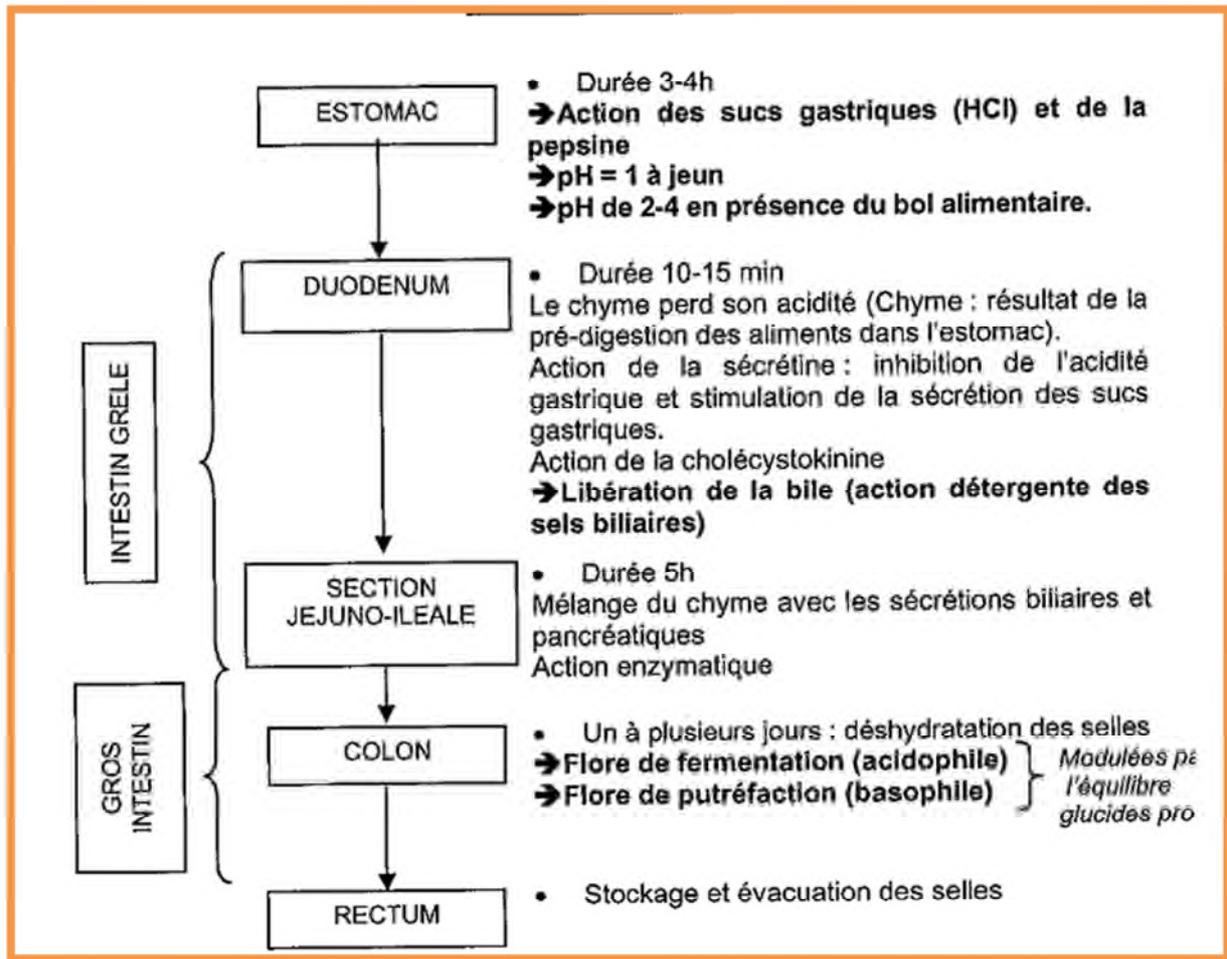
### II.3.1 Origine des souches

Les probiotiques utilisés dans les produits alimentaires sont des microorganismes appartenant à la flore intestinale. Cependant, l'innocuité de la souche microbienne doit être prouvée avant toute utilisation du probiotique dans l'aliment (Amrouche, 2005). Cependant la condition d'être d'origine humaine semble être sujet d'un débat, selon Malago et *al.* (2011), le fait que le probiotique soit d'origine humaine se rapporte réellement à l'isolement de la souche plutôt qu'à l'origine elle-même. Habituellement, les souches prétendues être « d'origine humaine » ont été isolées dans des échantillons fécaux de sujets humains en bonne santé et avoir été donc considérées comme une « partie du microbiote intestinal humain ». En réalité l'isolement d'une souche d'un échantillon fécal ne signifie pas nécessairement que celle-ci fait partie du microbiote normal de cet individu, puisque les microorganismes ingérés peuvent également se retrouver dans l'échantillon fécal (Malago et *al.*, 2009).

### II.3.2. Survie au cours du transit intestinal

Le tube digestif est équipé de nombreux moyens de défense contre des microorganismes pathogènes. La motricité gastro-intestinale est un moyen de contrôle des populations bactériennes dans l'intestin (Fig.2). L'acidité de l'estomac est une barrière à la survie des microorganismes. Toutefois certains microorganismes peuvent survivre durant la traversée de l'estomac, grâce à une capacité intrinsèque élevée de résistance à l'acidité, ou à la faveur d'une baisse de sécrétion d'acide de l'hôte, ou bien à la protection conféré par certains aliments à pouvoir tampon élevé (Gbassi, 2010).

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases.(Hadeif,2012). Cette activité enzymatique est la déconjugaison des sels biliaires grâce à la « Bile Salt Hydrolase ». De plus, il a été proposé que la déconjugaison des sels biliaires possède des effets bénéfiques sur l'hôte comme la diminution des niveaux de cholestérol (Collado et *al.*, 2009).



**Fig.2 :** Schéma fonctionnel des différents organes intervenant dans la digestion chez l'humain (Normand et al, 2006).

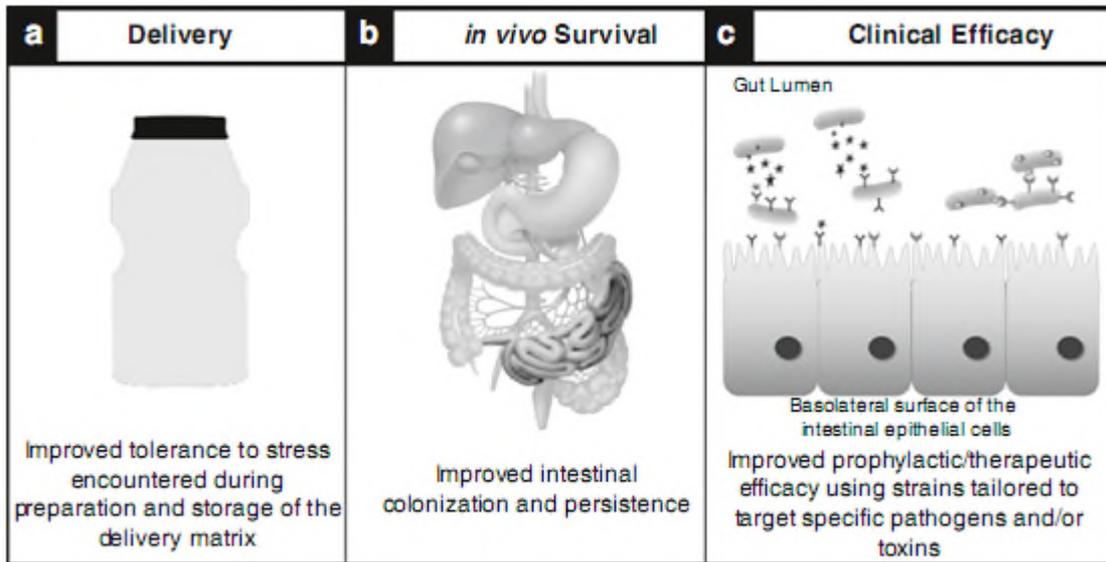
### II.3.3. Survie des probiotiques dans l'aliment

L'aliment doit permettre qu'un nombre suffisant de microorganismes survive jusqu'à sa date de péremption, mais permettrait aussi de résister aux conditions extrêmes qui règnent dans le tube digestif (Luquet et Corrieu, 2005). C'est pourquoi L'AFSSA définit la quantité minimale de bactéries vivantes pour garantir un effet bénéfique à :

- $\geq 10^6$  UFC/ml dans l'intestin grêle ;
- $\geq 10^8$  UFC/ml dans le côlon.

Dans le but d'augmenter le taux survie des probiotiques dans les aliments, l'addition des prébiotiques, l'adaptation aux différents stress et l'encapsulation font partie des méthodes à privilégier. De plus, les différentes propriétés intrinsèques et extrinsèques à l'aliment influencent beaucoup la survie de ceux-ci. Le pH de l'aliment, le pouvoir

tampon, le potentiel redox, la température d'entreposage, la perméabilité à l'air de l'emballage sont des caractéristiques à observer lors de l'incorporation de probiotiques à un aliment (Luquet et Corrieu, 2005 ; Collado et al, 2009 ; Malago et al, 2011 ; Champigny, 2011). La (Fig. 3) résume les critères les plus recherchés chez un probiotique.

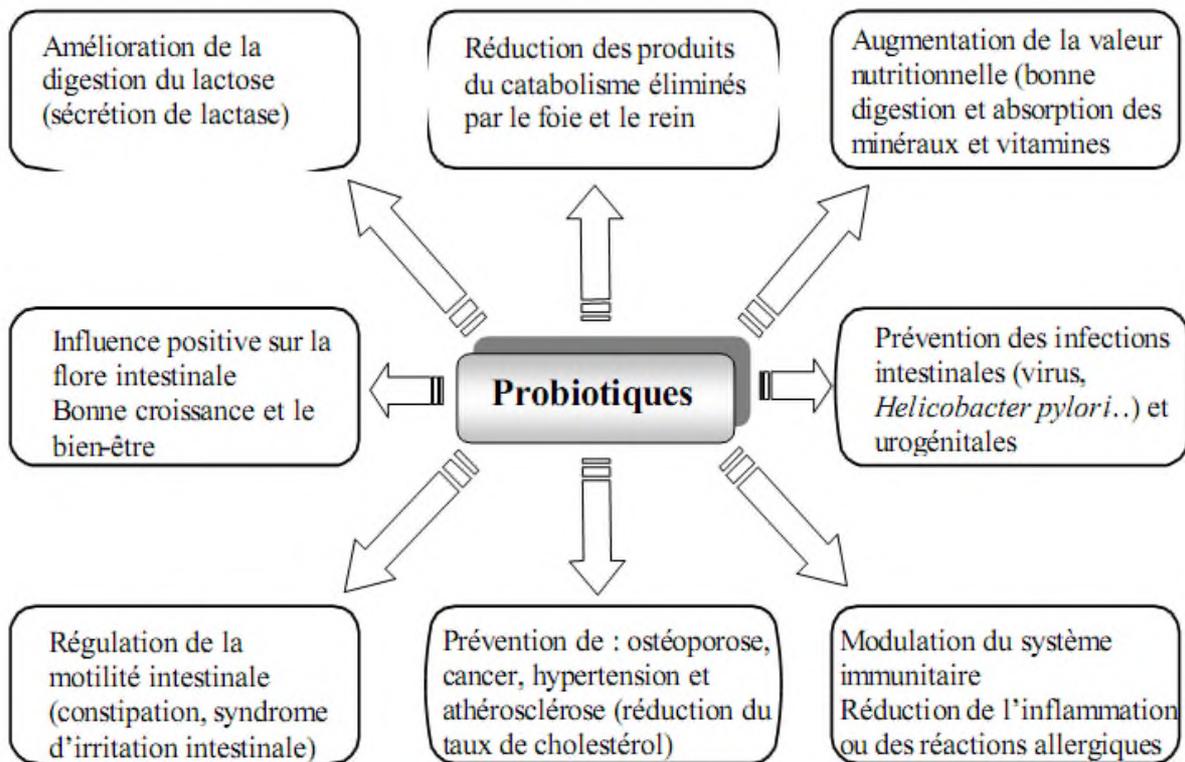


**Fig.3 :** les avancées récentes dans la conception des cultures probiotiques plus efficaces comportent **a)** amélioration de la résistance durant la fabrication et le stockage.

**b)** Amélioration de la résistance *in vivo* aux conditions gastro-intestinales, (facilitant la colonisation d'intestin). **c)** probiotiques qui visent spécifiquement des microbes pathogènes et/ou des toxines ; (améliorant les effets thérapeutiques) (Malago et al, 2011).

## II.4. Effets des probiotiques

Les effets bénéfiques attribués aux probiotiques sont nombreux, mais les preuves confirmant les différentes allégations qui leurs sont attribuées nécessitent de plus amples d'investigations (Bouhnik, 2002). La figure suivante (Fig. 4) illustre quelques effets bénéfiques attribués aux probiotiques dont la plus part demeures au stade hypothétique.



**Fig.4.** Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Amrouche, 2005).

# **Matériel & Méthodes**

## 1. Origine de la souche

La souche de *Lactobacillus* utilisée pour réaliser cette étude, fait partie de la collection des souches microbiennes du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA) de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia. Elle a été isolée à partir des selles d'un nourrisson âgé de 12mois allaité exclusivement au sein et identifiée génotypiquement par séquençage de son ADNr 16S comme étant *Lactobacillus paracasei subsp paracasei*. Elle est conservée à -18°C dans le bouillon MRS (Man Rogosa et scharpe) additionnée de 20% de glycérol.

## 2. Revivificationde la souche

La revivification de la souche consiste à la repiquer sur des milieux de culture appropriés puis à l'incuber jusqu'à l'obtention de culture fraîche.

La souche de lactobacille à été décongelée, puis revivifiée par repiquages successifs sur bouillon MRS à pH 6,2 additionné de 0,05% de chlorhydrate de cystéine afin de réduire le potentiel d'oxydoréduction du milieu, assurer ainsi l'anaérobiose pour la souche.

## 3. Vérification de la pureté de la souche

En plus de l'aspect macroscopique des colonies de *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* BMK 2005. trois testes sont effectués afin de vérifier la pureté de la souche :

- Coloration de Gram ;
- Observation à l'état frais ;
- Test de catalase.

#### 4. La standardisation de l'inoculum

Le but de la standardisation de l'inoculum est d'avoir le même nombre de cellules bactériennes vivantes dans un ml de culture durant toutes les étapes de l'expérimentation.

Pour cela, une culture de *Lb. paracasei subsp paracasei* de 24h à 37°C a été utilisée pour ensemercer, une boîte de gélose MRS cystéinée par stries serrés et incubée à 37°C pendant 48h. Quatre colonies bien isolées et identiques de cette boîte ont été repiquées sur 10ml de bouillon MRSc et incubées à 37°C pendant 18h. Au terme de la période d'incubation, des dilutions décimales ont été effectuées allant à 10<sup>-10</sup> dans l'eau physiologique à pH 7, et des géloses MRS sont ensemençées par 1ml de chaque dilution correspondant à 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup> et 10<sup>-10</sup>, puis sont incubées 48h à 37°C.

Les boîtes sont dénombrées par un compteur de colonies, et le nombre de cellules vivantes par un ml de culture est exprimé en UFC/ ml selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0,1n_2) d}$$

**C** : Nombre de colonies sur boîtes de chaque dilution retenue ;

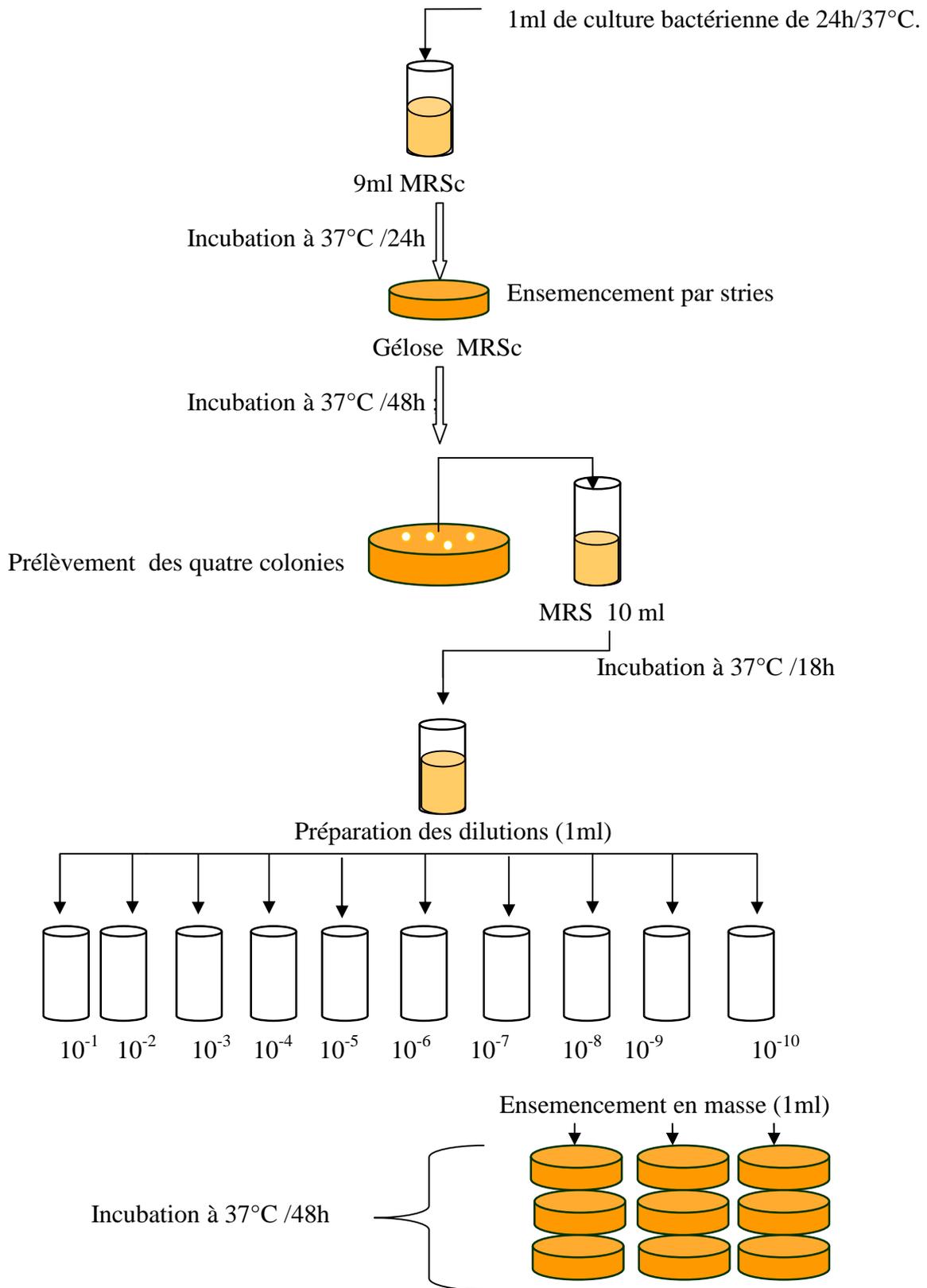
**V** : Volume de la suspension bactérienne déposée sur boîte (ml) ;

**n<sub>1</sub>** : nombre de boîtes correspondant à la plus faible dilution ;

**n<sub>2</sub>** : nombre de boîtes correspondant à la plus forte dilution ;

**d** : correspond à la plus faible dilution.

L'expérience a été refaite deux fois avant de valider les résultats.



**Fig.5 : Schéma de la standardisation de la souche de *Lb. paracasei subsp paracasei* BMK 2005.**

## 5. Etudes de quelques aptitudes probiotiques de *Lb. paracasei subsp paracasei* BMK2005.

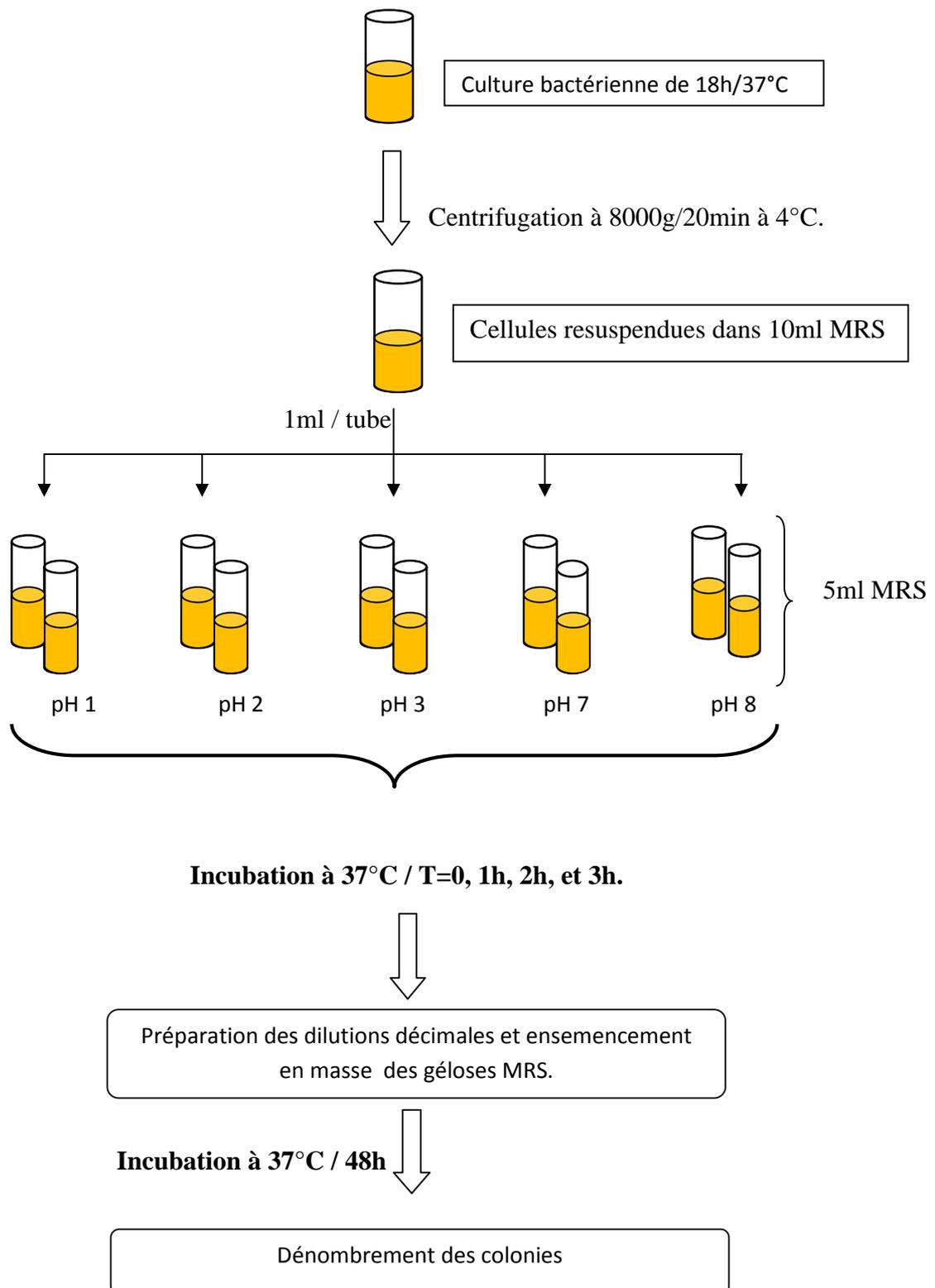
### a. Evaluation de l'effet du pH sur la croissance de *Lb. paracasei subsp paracasei*

Afin de rependre à la définition des probiotique établie par la FAO les bactéries doivent rester vivantes durant leurs passage dans le tractus gastro –intestinal pour exécrer leurs effets bénéfiques. Ainsi l'effet de différents pH sur la croissance de la souche de *Lb. paracasei subsp paracasei* à été testé selon la méthode utilisée par Bendali et *al.* (2011).

Pour ce faire, des cultures bactériennes de 18 h ont été préparées comme décrit précédemment ; puis centrifugées à 8000g pendant 20minutes à 4°C, et lavées deux fois à l'eau physiologique, dans le but d'éliminer en particulier les acides organiques produit par la souche au cours de sa croissance, ce qui pourra modifier le pH du milieu. Enfin Les cellules ont été resuspendues dans 9ml du bouillon MRS.

D'un autre coté, plusieurs tubes contenant 5ml du milieu MRS à différents pH à raison de deux tubes par pH, ont été préparés, en utilisant une solution du HCl à 1N et de NaOH à 1N. Les pH 1,2, et 3 ont été choisis pour simuler le pH gastrique, et les pH 7 et 8 pour simuler le pH intestinal.

Les tubes ont étéensemencés à une concentration finale de  $10^9$  UFC/ml, puis incubés à 37°C pendant T=0, T=1h, T= 2h et T= 3h. Après incubation des dilutions ont été réalisées ainsi les dilutions  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , sontensemencées en masse sur géloses MRS et incubées 48h à 37°C. Après incubation les colonies sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies, et le nombre obtenu est exprimé en UFC/ml.



**Fig.6 : Etude de l'effet du pH sur la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK2005.**

**b. Effet des enzymes digestives sur la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005.**

Afin d'évaluer la résistance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 à l'actions des protéases digestives, l'effet de trois enzymes à été testé, à savoir la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine et une combinaison des deux enzymes trypsine et chymotrypsine (Fig.7).

**✚ Préparations des solutions enzymatiques**

36mg de chaque enzyme sous forme lyophilisée est mises en suspension dans 2ml de tampon (glycine/ HCl) à pH 3 pour la pepsine et tampon phosphate sodium pH 7 pour la trypsine et la chymotrypsine (pH optimal d'activité pour chaque enzyme), puis stérilisées par filtration (0,45um, Millipore Corp., Bedford, Mass., USA).

- Effet de pepsine

Pour tester l'effet de la pepsine, un millilitre (1ml) de la solution a été ajouté pour un tube (2 tubes par enzyme) contenant 5ml du milieu MRS à pH 3, avec une concentration finale d'enzyme de 3mg/ml.

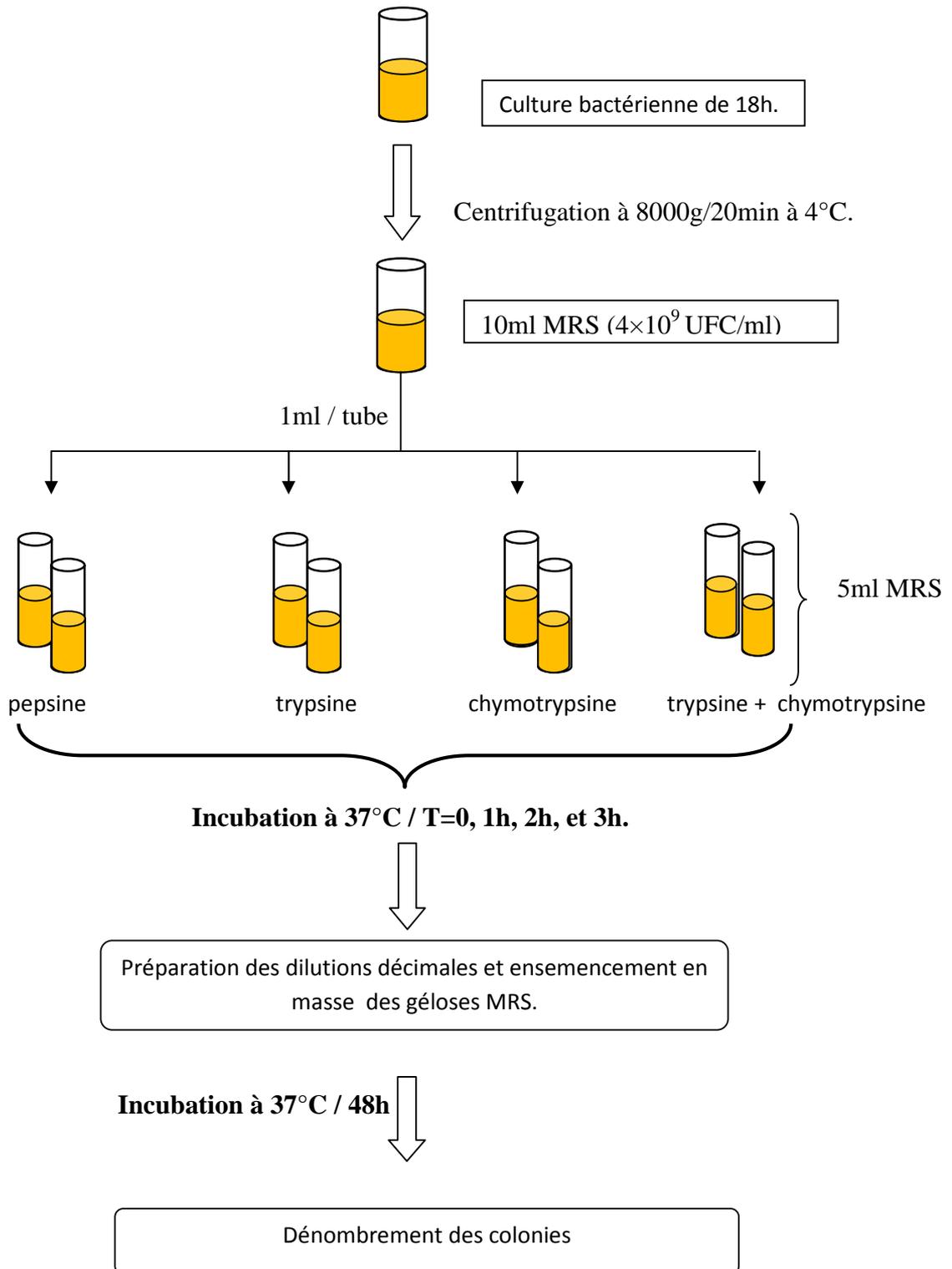
- Effet de trypsine et chymotrypsine

Un ml de la solution de trypsine est ajouté à un tube contenant 5ml du milieu MRS à pH 7, avec une concentration d'enzyme de (3mg/ml). La même procédure a été refaite pour la chymotrypsine.

Pour évaluer l'effet de la combinaison de trypsine et chymotrypsine, un ml contenant ses deux enzymes (18 mg de trypsine et 18 mg de chymotrypsine mélangés et dilués dans 2ml de tampon phosphate sodium) a été ajouté à un tube de 5ml du MRS ajusté a pH, 7 la concentration d'enzyme finale est de 3mg/ml.

Une culture bactérienne (10 ml) de *Lb. Paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 incubée pendant 18h à 37°C est préparée, les cellules sont lavées par centrifugation comme décrit précédemment, puis remises ne suspension dans 10 ml de bouillon MRS. Cette suspension bactérienne a été utilisée pour ensemenecer les tubes du milieu MRS contenant les différentes enzymes digestives, à un taux d'inoculation de  $4 \times 10^9$  UFC/ml. Ils sont alors incubés à 37°C pendant à T=0, T= 1h, T=2h, et T=3h. Pour chaque incubation des dilutions décimales et un ensemenecement en masse sur gélose MRS ont été réalisés, et la résistance de la souche aux

différentes enzymes, à été évaluée en terme de colonies viables sur gélose MRS, après incubation à 37°C pendant 48h.



**Fig.7 : Etude de la résistance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK2005 aux différentes enzymes.**

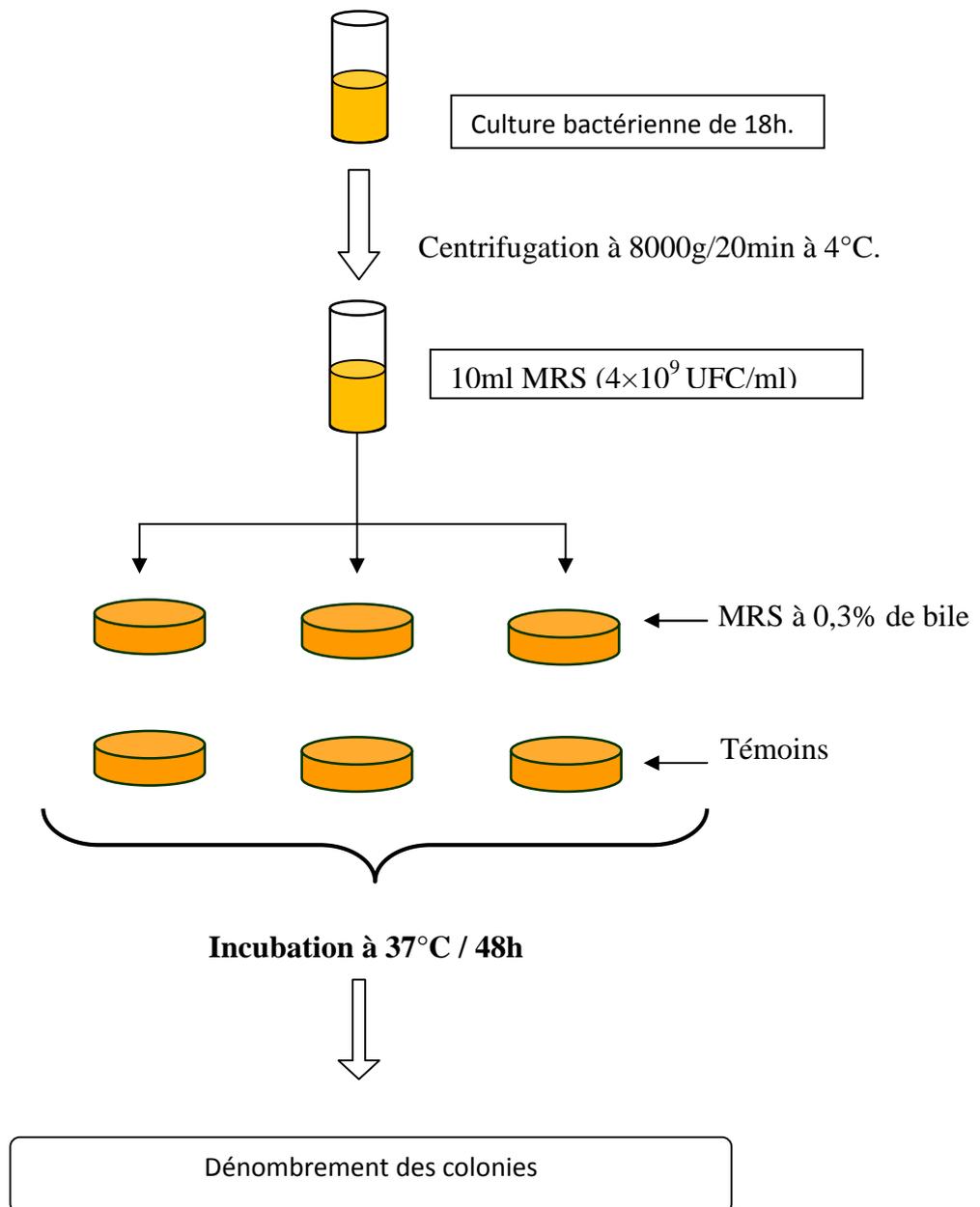
**c. Effet des sels biliaires sur la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005.**

L'un des critères les plus importants pour la sélection des probiotiques, est la résistance de ces derniers à l'actions des sels biliaires, *Lb. paracasei* a été testé sur sa capacité de survire en présence de sels biliaires.

Pour ce faire, Une culture de 18h incubé à 37°C a été préparé, les cellules sont ensuite centrifugées, lavées deux fois à l'eau physiologique, puis resuspendu dans du milieu MRS. D'un autre coté, des géloses MRS avec une concentration de 0,3% (w/v) de sels biliaires sont préparées.

1ml de la culture de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* estensemencé en masse sur gélose MRS aux sels biliaires, à raison de trois boites, elles sont ensuite incubées à 37°C /48h.

Des géloses MRS sans sels biliaires ont étéensemencées de la même façon, pour servir de témoins.



**Fig.8 : Effet de la bile sur la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005.**

## 6. Croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 dans le yaourt stocké à 4°C.

Considéré comme un aliment santé, et donc en mesure d'être consommé sur une base régulière, le yogourt est un pionnier des aliments probiotiques. Toutefois, ayant un pH aux environs de 4 et un emballage généralement perméable à l'oxygène, il n'est pas toujours excellent pour leur survie à long terme. Seulement les bactéries résistantes aux pH acides peuvent survivre sur une période d'environ 28 jours dans le yogourt (Givry, 2006).

Des études ultérieures (Bendjeddou, 2012), ont démontrées qu'il n'existe aucun effet antagoniste entre les ferments (*Lb. delbreukii* subsp *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) et la souche de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 utilisée.

Le but de ce test est d'essayer de fabriquer un yaourt à base de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005, de suivre ainsi les paramètres suivants :

- Croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 stockée à 4°C pendant 15 jours.
- pH du yaourt;
- Odeur;
- Texture.

### a. Préparation du yaourt

#### a-1. Préparation du lait

Le lait utilisé pour la préparation du yaourt, est un lait en poudre écrémé reconstitué, préparé à 10%(W/V). pour ce faire ,100g de poudre de lait ont été mélangés à de l'eau distillée pour une préparation d' un litre, le tout est homogénéisé et repartie dans des flacons d'une contenance de 200ml, ils sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 110°C pendant 15min. puis incubés à 37°C /24h, dans le but de confirmer leurs stérilité (**Fig. 8**).

Les flacons de lait stérilesont chauffés au bain marie à 45°C, la température idéale pour l'ensemencement des ferments du yaourt. Sous conditions d'asepsie, il est ensuite versé dans un Erlène stérile, toute en laissant un volume de 200 ml de coté, dont une moitié servira pour la revivification des ferments et l'autre comme témoin.

L'eau utilisée ainsi que les flacons sont stérilisés avant leurs utilisations, à l'autoclave à 120°C pendant 20min.

### **a-2. Préparation de l'inoculum**

Une culture de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 de 18h incubée à 37°C est préparée, les cellules sont centrifugées à 8000g/20min à 4°C, lavées deux fois à l'eau physiologique, puis resuspendu dans 1ml de lait écrémé. Le nombre de cellules est alors de 10<sup>10</sup> UFC/ml.

### **a-3. Préparation du ferment et ensemencement du lait**

Pour la préparation du yaourt, le ferment utilisé est sous forme lyophilisée de marque YALACTA d'un poids net de 4gr, dont la date de péremption est prévue pour septembre 2014, le mode opératoire est alors suivi.

#### Revivification du ferment

Dans 100ml de lait écrémé stérile, le ferment ainsi que l'inoculum de *Lb. paracasei* subsp *paracasei*, ont été revivifiés pendant 2h à température ambiante. En effet le ferment lyophilisé a besoin de ce temps pour retrouver son maximum d'activité (Fig.9).

#### Ensemencement du lait

Après revivification les 100ml sont ajoutées au reste du lait dans l'Erlène, puis homogénéisé sur une plaque agitatrice, pour bien répartir les cellules bactériennes ensemencées. La préparation est répartie dans des flacons stériles et incubé à 45°C pendant 18h (Fig. 10).

Au terme de l'incubation le yaourt est stocké à 4°C pendant 15 jours.

### **b. Etude des paramètres du yaourt :**

Une fois le yaourt prêt, les paramètres suivants sont étudiés :

-  Les propriétés de l'aliment : Texture, Odeur, Couleur et Mesure du pH à l'aide d'un pH mètre.
-  Suivi de la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005, à partir du premier jour de préparation jusqu'au 15eme jour.

Pour suivre la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* dans le yaourt, des géloses MRS mannitol sont préparées, ce sucre n'est utilisé que par *Lb. paracasei* subsp *paracasei*, ce milieu devient donc sélectif pour cette espèce.

Ainsi, 10g de yaourt prélevés dans les différents flacons, sont dilués dans 90 ml d'eau physiologique. Après homogénéisation, une série de dilutions décimales est effectuées, allant jusqu'à  $10^{-6}$ , les dilutions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  sont ensuite ensemencées sur gélose MRS à raison de trois boîtes par dilution et incubées à 37°C pendant 72h. Au terme de l'incubation les colonies sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies.

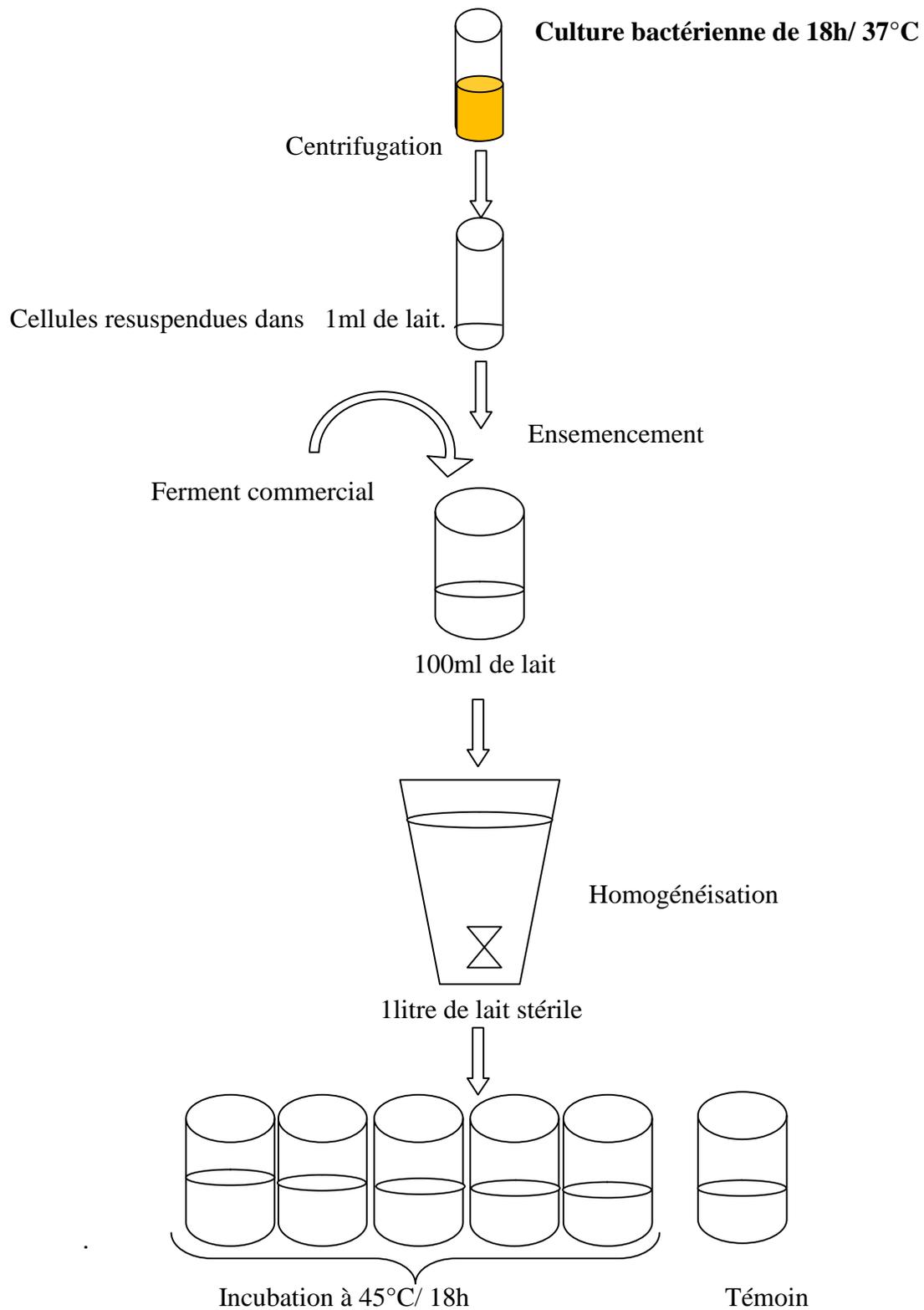
Avec un ferment de la même marque YALACTA et un lait préparé en même temps que le précédent et dans les mêmes conditions, un yaourt à été préparé pour servir de témoin négatif.



**Fig.9 : Préparation du matériel pour le yaourt**



**Fig.10 : Revivification du ferment**



**Fig. 11 : Les étapes de préparation du yaourt**

# Résultats & Discussion

**1. Vérification de la pureté de la souche**

La souche utilisée dans cette étude a donnée, sur gélose MRS, de petites colonies blanchâtres avec un diamètre de 1 mm ayant le même aspect, la même la forme et la même couleur (Fig.12). Les trois testes effectués afin de vérifier la pureté de la souche sont présentés dans le tableau IV.

**Tableau IV : résultats des tests utilisés pour confirmer la pureté de la souche.**

Coloration de Gram	Test de catalase	Observation à l'état frais
Bacilles à Gram positif	Catalase négative	Cellules en forme de bacilles, aux extrémités légèrement incurvées, en chaînette, immobiles.



**Fig.12 : Aspect de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 sur milieu MRS**

Ces caractères correspondent bien à ceux des lactobacilles, ce qui confirme la pureté de la souche utilisée.

### 2. Standardisation de l'inoculum

Les résultats de la standardisation de l'inoculum ont montré que quatre colonies de *Lb. paracasei* subsp *paracasei*, prélevées sur une gélose MRS (48h/37°C) puis ensemencées sur bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 18h, donnent environ  $4 \times 10^9$  UFC/ml.

### 3. Etude de quelques aptitudes probiotiques de la souche de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005.

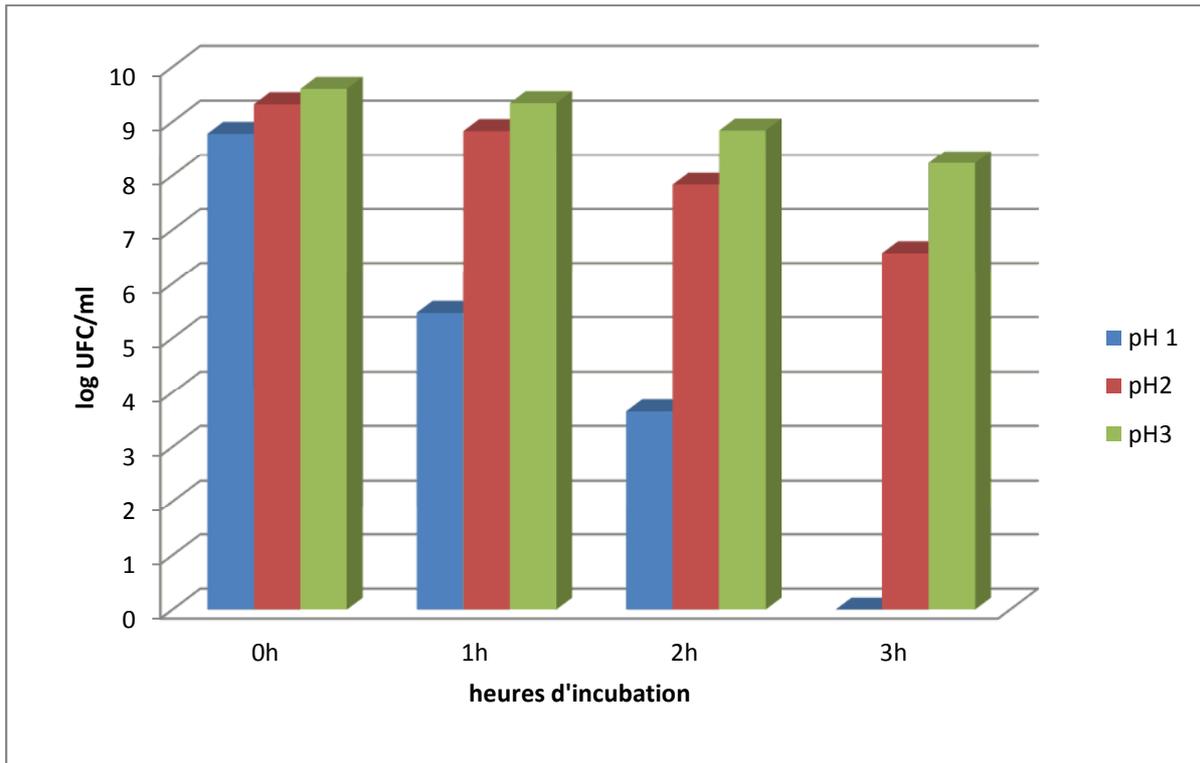
#### 3-a Effet du pH sur la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK2005

Les résultats de la survie de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 à l'acidité à des valeurs de pH allant de 1 à 3 sont présentés dans (Fig.13). Sur ces trois valeurs de pH, le nombre de cellules vivantes est en décroissance en fonction du temps d'incubation.

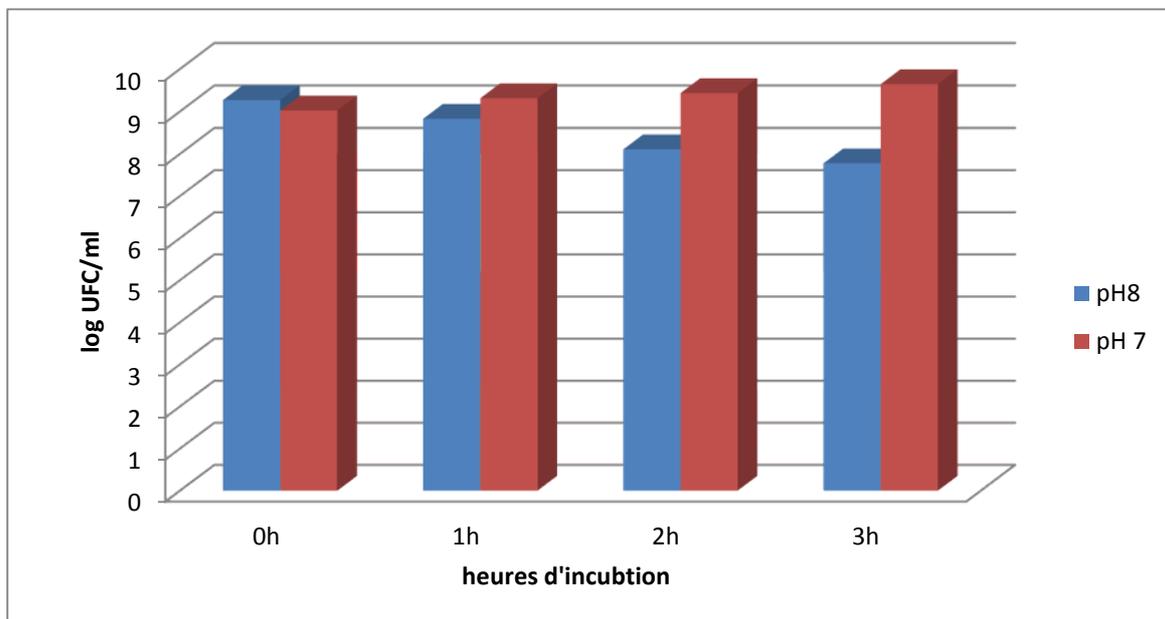
A pH1, le nombre de cellules viables de *Lb. paracasei* diminue de 4 log (UFC/ml) après 1h d'incubation. Au bout de 2h d'incubation une légère réduction du nombre de *Lb. paracasei* a été enregistrée. Cependant, une perte totale de viabilité des cellules a été observée après 3h d'incubation.

A pH 2, les résultats obtenus montrent que la viabilité des cellules de *Lb. paracasei* est meilleure que celle obtenue à pH 1. De ce fait, après une heure d'incubation il a été observé que le taux de réduction de nombre de cellules de *Lb. paracasei* n'est que de 0,5 log (UFC/ml). Après 2h d'incubation le taux de réduction est de 1,5 log (UFC/ml). Au bout de 3h d'incubation une diminution de 2,75 logs (UFC/ml) a été enregistrée.

A pH 3, les résultats obtenus suggèrent que la souche de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BMK 2005 est douée d'une bonne capacité de survie, cela est révélé par une réduction très faible du taux de viabilité des cellules, seulement 1,37 Log (UFC/ml) ont été enregistré après 3h d'incubation.



**Fig.13: Effet de l'acidité sur la croissance de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005.**



**Fig. 14: Effet du pH neutre et alcalin sur la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005.**

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Maragoudakis et *al.* (2006), qui ont démontré la capacité de certaines souches de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* (ACA-DC 119 et 3345, ACA-DC 130) de survivre à pH 2 et pH 3 et leur incapacité de survivre à pH 1 d'une façon qu'aucune cellule viable revivifiable n'a été obtenue après 3h d'exposition à pH 1.

Cependant d'autres études réalisées dans conditions proches, ont montrés que la résistance des bactéries lactiques à l'acidité dépend étroitement de l'espèce bactérienne voir les souches de la même espèce. Les travaux effectués par De Carvalho (2009) sur *Lb. Casei* ont montré que cette espèce présente une très faible viabilité des cellules à pH 2 après seulement 30min d'incubation.

Selon une étude réalisée par Liong (2006), l'effet de l'acidité sur la survie d'onze souches d'origine humaine d'ont dix d'entre elles appartiennent au genre de *Lactobacillus* est différent d'une souche à une autre. Cette étude réduction de 2log (UFC/ml) au bout de 2h d'incubation à pH 2. De leurs coté, Desai (2008) et Jamaly et *al.* (2011), ont également trouvé des résultats similaires.

Dans le même contexte, l'étude de Bendali et *al.* (2011) a montré qu'une souche de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* semble résister un peu plus longtemps à pH 2 pendant 3h d'incubation.

### **3-b. Etude de la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 à pH neutre et alcalin**

Les résultats de la survie de la souche à pH neutre et alcalin sont présentés sur la (Fig.14). À pH neutre la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* a montrés une augmentation progressive après chaque heure d'incubation pour une augmentation maximale de 0,62 log UFC/ml. Cette valeur de pH ne semble pas affecter la survie de la souche.

Par contre, à pH 8 le nombre de cellules diminue en fonction du temps. Des réductions de 0,44 log (UFC/ml) et 1,16 log (UFC/ml) correspondant à une 1 heure et 2 heures d'incubation respectivement ont été enregistrés. Au bout de 3 heures d'incubation, une diminution de 1,49 log UFC/ml a été notée.

Ces résultats sont similaires à ceux rapporté par Bendali et *al* (2011).

### 3-c. Etude de l'effet des enzymes sur la survie de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005.

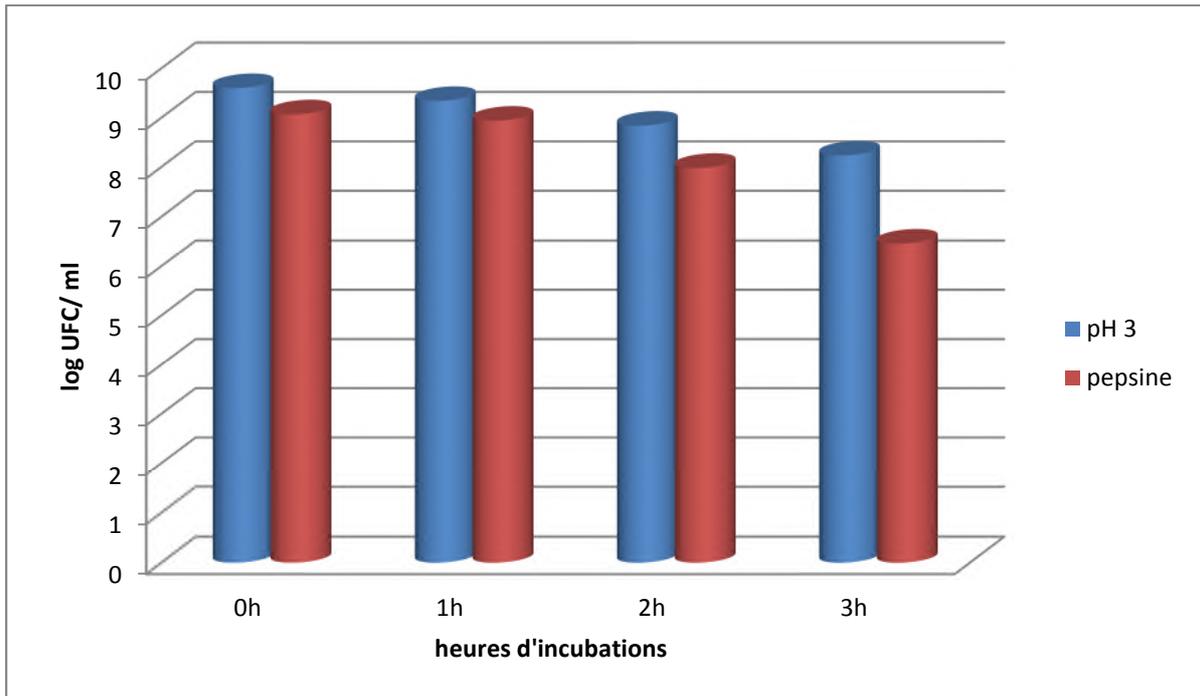
Les résultats de l'étude de l'effet des enzymes sur la souche de lactobacille ont montré que *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* une bonne capacité de survie en présence de pepsine à pH 3. La souche garde une bonne viabilité après 2h d'incubation où une réduction du compte cellulaire d'environ 1 log (UFC/ml) a été observée et 2log (UFC/ml) au bout de 3h. Comparé à l'effet du pH seul cette diminution est plus importante, cela est sûrement dû à l'effet synergique de la pepsine et de l'acidité (Fig.15).

Contrairement à la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine chacune a part, ne semblent pas avoir un effet drastique sur la survie de la souche. Une diminution d'environ 1log est observée après 3h d'incubation pour les deux enzymes (Fig.16).

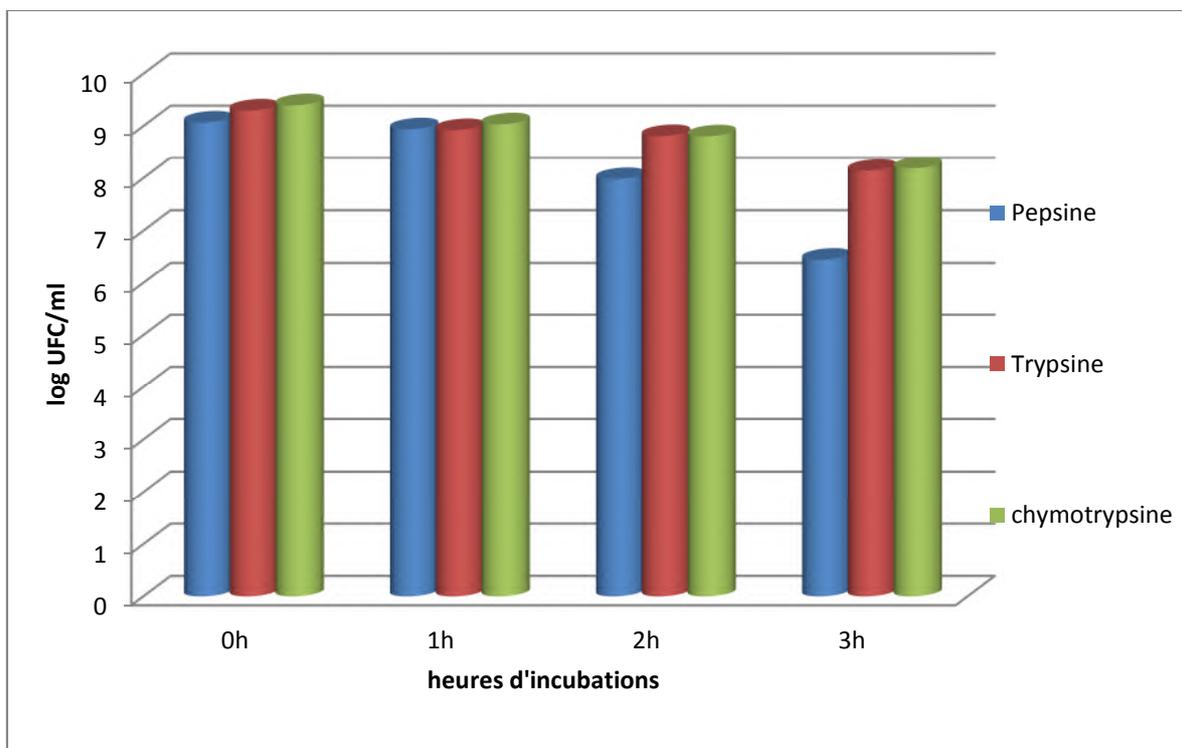
La souche de *Lb. paracasei* semble avoir plus de sensibilité à l'effet combiné des deux enzymes qu'à l'effet de chaque enzyme a part (Fig.17). On constate qu'après 1h d'incubation, le nombre de cellules vivantes diminue d'environ 1log (UFC/ml) alors que cette valeur est obtenue après 3h lorsque la souche de lactobacille est mise en contact séparément avec la trypsine et chymotrypsine. La diminution du nombre des cellules continue après 2h et 3h avec des valeurs respectives de 1,31 log (UFC/ml) et 2,06 log (UFC/ml). Cela est peut être dû à l'effet synergique de ces deux enzymes pancréatiques.

Bendali et *al.* (2011) ont étudié l'effet de la pancréatine sur la croissance de *Lb. paracasei* à pH 8, les résultats obtenus montre une différence non significative du nombre de cellules comparée à l'effet du pH. Ces résultats ne correspondent pas tout à fait aux notre ; mais cela peut se traduire par le fait que le pH optimum d'activité de ses deux enzymes est de pH 7, cependant à pH 8 les enzymes peuvent perdre de leurs activité.

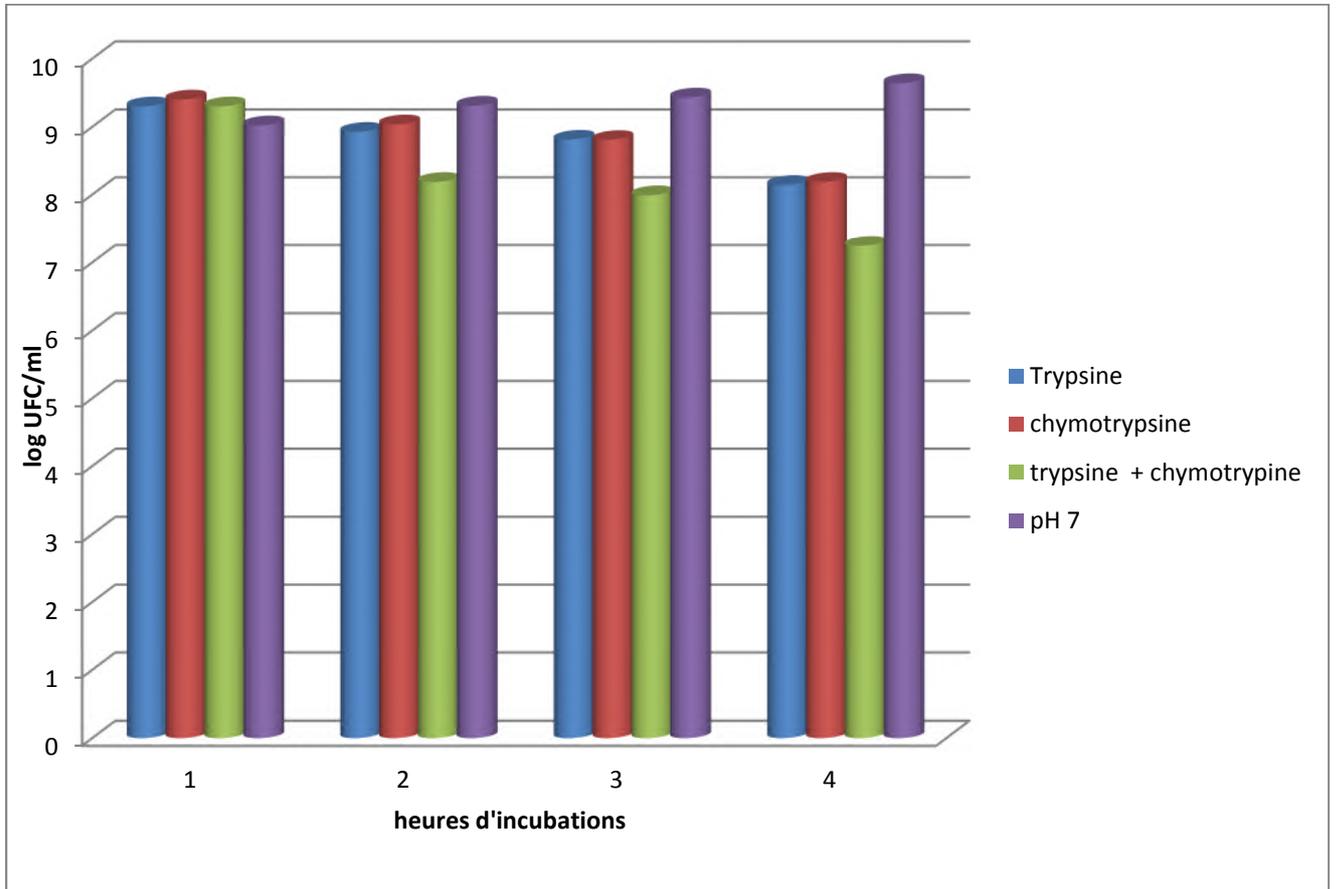
Pour Maragkoudakis et *al.* (2006) la plus part des souches de lactobacilles y compris *Lb. paracasei* ont pu survivre bien dans une solution pancréatine à pH 8.



**Fig.15 :** Comparaison entre l'effet de la pepsine et de l'acidité sur la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005.



**Fig.16:** Comparaison entre l'effet des enzymes sur la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005.



**Fig.17 : Comparaison entre l'effet des enzymes pancréatiques, sur la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005.**

### 3-d. Effet des sels biliaires sur la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005.

Pour les probiotiques destinés à des pathologies intestinales, les microorganismes doivent arriver vivant mais surtout rester vivant afin de pouvoir coloniser l'intestin et d'exercer leurs rôles bénéfiques. Ils doivent donc résister aux sels biliaires sécrétés au niveau de l'intestin.

Le test effectué est dans le but de voir la capacité de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* à croître dans une gélose à 0,3% de sels biliaires. Cette concentration a été choisie par rapport aux concentrations moyennes présentes dans l'intestin humain d'une personne saine qui varient entre 0,2 à 2%.

Les résultats obtenus montrent que *Lb. paracasei* a une bonne capacité de survie dans ces conditions. Les boîtesensemencées sont toutes indénombrables après 48h d'incubation à 37°C. Cependant, une petite réduction est observée en comparaison aux témoins.

Plusieurs travaux ont montré que la croissance des lactobacilles en présence de sels biliaires varie selon la souche, la concentration de la bile, mais aussi la nature de la bile.

Selon Dunne et al. (2001). La bile sous sa forme déconjuguée est beaucoup plus inhibitrice pour les bactéries que sa forme conjuguée. Dans leur étude effectuée sur plusieurs espèces de bactéries lactiques, 7% de *Lactobacillus paracasei* 212.3 ont pu survivre sur une bile bovine, et aucune n'a pu survivre dans une bile porcine avec la même concentration qui est de 0,3% (w/v).

Desai. (2008), a étudié l'effet de la bile (Oxgall) sur plusieurs souches de Lactobacille à différentes concentrations (0% ,1% et 1,5%) sur bouillon MRS. Les résultats ont montré qu'après 3h d'incubation seul 7 souche ont pu résister à 1,5% de bile, avec des réductions du taux de survie très importantes.

Bendali et al. (2011) ont également testé *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* sur sa capacité à survivre dans différentes concentrations de sels biliaires, celle-ci résistent très bien après 24h d'incubation à 0,3% de sels biliaires (oxgall). De leur côté Maragkoudakis et al. (2006) ont eu des résultats semblables avec 0,3% de bile.

Cette résistance ou sensibilité de ces bactéries aux sels biliaires pourrait se traduire par la capacité de celles-ci à les déconjuguer, hydroxyler, déshydrogéner ou les déglucorinider. Ainsi la caractéristique la plus recherchée chez les probiotiques est la déconjugaison des sels biliaires car celle-ci pourrait avoir un effet sur la diminution du taux de cholestérol dans le volume sanguin (Malago et *al*, 2011).

**4. Etude de la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 dans le yaourt stocké à 4°C pendant 15jours.**

La sélection de souches doit intégrer les critères technologiques comme la viabilité et la survie des souches dans le produit fini. En effet, les souches potentiellement intéressantes sur des critères fonctionnels, ne sont d’aucun intérêt si elles ne peuvent être utilisées en production industrielle (Corrieu et Luquet, 2005).

Dans cette présente étude la souche de *Lactobacillus paracasei* a été incorporée au yaourt, le choix de ce produit a été fait sur la base d’une recherche rapporté par de Roissart et Luquet (1994), celle-ci montre qu’après ingestion de 250 g de yaourt à pH 4,2 par quartes sujets sains, le pH gastrique monte immédiatement à 4 en moyenne, pour redescendre progressivement à 2, 6 en deux heures et rejoint la valeur de départ vers la 3eme heure. Sur ses mêmes sujets le pH gastrique monte à 5,3 après ingestion du lait à (pH 6,7) dans le premiers quart d’heur pour redescendre à pH 2 en heure environ.cet effet tampon protecteur du yaourt permet aux bactéries lactiques de survivre dans l’estomac de l’homme.

. Ce travail consiste donc à étudier les paramètres suivants : la survie de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* dans le yaourt stocké à 4°C, pH, texture, odeur. Les résultats obtenus sont représenté dans le tableau III

On constate que le nombre de cellules au 1er jour de la préparation du yaourt est de log (UFC/ml) = 6,84, ce nombre diminue l’égerment en fonction de la période de stockage dont une diminution de 0,80 log au bout de 15 jours est enregistré.

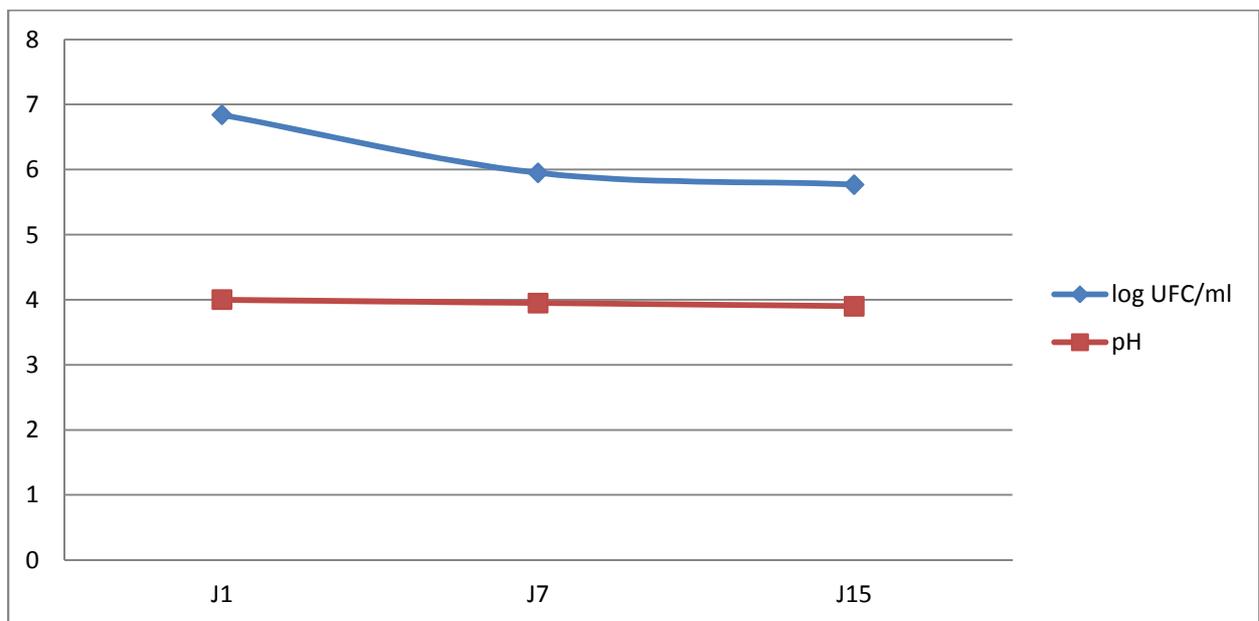
En ce qui concerne les autres paramètres la texture du yaourt ainsi que son odeur reste stable pendant 15jours de stockage (Fig.17). Par contre le pH diminue lentement (fig.18)

**Tableau V: résultats des paramètres du yaourt**

Jours	J1	J7	J15
pH	4	3,95	3,90
UFC/ml	4*10 <sup>6</sup>	9*10 <sup>5</sup>	6*10 <sup>5</sup>
Texture du yaourt	ferme	Ferme	ferme
Odeur	Ressemble au diacetyl	stable	stable



**Fig.18 : Aspect du yaourt obtenu (à gauche témoin)**



**Fig.19 : Evolution du pH et du nombre de cellules de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 dans le yaourt stocké à 4°C.**

D'après les résultats obtenus on remarque que *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* ne change pas les caractéristiques typique d'un yaourt, ce qui est très important pour la sélection des probiotiques, cependant le pH est un peu plus acide par rapport au pH du yaourt qui est de 4,2. Cela est peut être du aux acides lactique formés par les trois différentes souches. Pour avoir un yaourt à pH voulu, il faudra cependant étudier les différentes combinaisons entre la dose de l'inoculum, des ferments, et la quantité du lait à ensemercer et la période d'incubation..

En ce qui concerne la survie de la souche, les résultats montrent que la bactérie maintient une bonne viabilité, cependant la diminution peut être due à la compétions pour les nutriments et du pH qui pourrait influencer sur le nombre de cellules.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Desai (2008) qui a évalué la capacité de plusieurs souches à survivre dans un lait fermenté avec ou sans prébiotiques, une diminution d'environ 1 log est observée après 4 semaines dans le lait fermenté sans prébiotiques pour la plus part des souches.

Une étude effectuée par Ohlson et al. 2002 sur *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* F19 a démontré une excellente survie dans le yaourt et le lait fermenté.

D'après les résultats obtenus , *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 est donc en mesure d'être incorporée dans un yaourt sans pouvoir changer ces caractéristiques intrinsèques.

# Conclusion

## Conclusion

L'objectif de notre travail était d'évaluer quelques aptitudes probiotiques de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005. Celles-ci consistaient d'abord en l'étude de sa résistance aux conditions gastro-intestinales à savoir le pH (1, 2, 3, 7 et 8), les enzymes digestives (pepsine, trypsine et chymotrypsine) ainsi qu'à 0,3% de sels biliaires.

Ensuite l'étude de sa capacité à être incorporée au yaourt et le suivi de sa viabilité au cours du stockage à 4°C pendant 15 jours.

Au terme de cette étude les résultats obtenus, montrent que *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005, a une bonne résistance aux pH acides dont une réduction du compte cellulaire de seulement 1,5 log (UFC/ml) est obtenue après 2h d'incubation à pH 2 et une réduction de 1,37 log (UFC/ml) après 3h d'incubation à pH 3.

A pH neutre le nombre de cellules vivantes est en croissance continue, par contre à pH alcalin une légère diminution est obtenue après chaque heure d'incubation pour arriver à une réduction de 1,49 log (UFC/ml) au bout de 3h.

Pour les enzymes digestives, c'est l'effet de la pepsine seule et de la combinaison des deux enzymes (trypsine et chymotrypsine) qui influence le plus sur la croissance de *Lb. paracasei* avec une réduction d'environ 2log (UFC/ml) au bout de 3h d'incubation.

Enfin l'action de 0,3%(w/v) de sels biliaires ne semble pas influencer sur la croissance de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005.

Cependant pour optimiser sa survie dans l'estomac il est préférable de l'incorporer à un yaourt, celui-ci protège les bactéries de l'acidité gastrique par son pouvoir tampon.

L'incorporation de *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 dans le yaourt, ne lui a pas changé ses caractéristiques intrinsèques, mis à part l'odeur prononcée qui ressemble au diacetyl. Et le stockage à 4°C n'a pas beaucoup influencé sur le nombre de cellules de départ.

Pour conclure *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 pourrait être considéré comme un potentiel probiotique, Cependant le travail effectué est insuffisant pour confirmer ces résultats, car on ne peut vraiment simuler les vraies conditions intestinales, et les différents paramètres qui peuvent intervenir.

# Références bibliographiques

## À

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

**Alegre E. (2009).** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de Doctorat en chimie analytique, Université de Strasbourg, France. p 5.

**Amrouche T. (2005).** Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des Bifidobactéries : analyse *in vitro* et étude *ex vivo* des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de Doctorat en science et technologie des aliments. Université de Laval, faculté des sciences de l'agriculture et des aliments, Québec. 155p.

## B

**Belgnaoui A. (2006).** Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. Thèse pour obtenir Doctorat de l'institut National Polytechnique de Toulouse. Unité de Neuro-Gastroentérologie et Nutrition, INRA Toulouse, France. 191 p.

**Bendali F. (2009).** Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antagoniste à l'égard de *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat en Sciences biologiques, Université de A/Mira, Béjaia, Algérie. p15.

**Bendali F, Durand A, Hebraud M et Sadoun DJ. (2011).** *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*: an Algerian isolate with antibacterial activity against enteric pathogens and probiotic fitness. Journal of food and nutrition research .**50**, 139–149.

**Bendjeddou K. Fons M. strocker P. et Sadoun . (2012).** Characterization and purification of a bacteriocine from *lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005, an intestinal isolate active against multidrug- resistant pathogenes. World J Microbiology Biotechnology. **28**, 1543,1552.

## Ç

**Champigny PL. (2011).** Biocompatibilité des bactéries lactiques probiotiques et d'affinage avec des mycètes du camembert isolées de laits de terroir Québécois. Mémoire présenté dans le cadre du programme de maîtrise en sciences et technologie des aliments pour l'obtention du grade de maître ès sciences. Université Laval, faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Québec, 90p.

**Collado M C, Isolauri E, Salminen S and Sanz Y. (2009).** The Impact of Probiotic on Gut Health. *Current Drug Metabolism*. **10**.68-78.

**Corrieu G et Luquet F M. (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. Ed : Tec&Doc. Paris. 302p.

*Đ*

**De Cavalho K G, Kreuger M F, Furtado D N, Todorov D et Gombossi B. (2009).** Evaluation of the role of environmental factors in the human gastrointestinal tract on the behaviour of probiotic cultures of *Lactobacillus casei* Shirota and *Lactobacillus casei* LC01 by the use of a semi-dynamic in vitro model. *Annals of microbiologie*, **59** supp 3 :439-445.

**De Roissart H. et Luquet F. M. (1994).** Bactéries lactiques : Aspect fondamentaux et technologiques. (I) : Tome I : 25-590. Ed. *Lorica*. France.

**De Roissart H. et Luquet F. M. (1994).** Bactéries lactiques : Aspect fondamentaux et technologiques. (II): Tome II: 2.

**Desai A. (2008).** Strain Identification Viability and Probiotics Properties of *lactobacillus casei*. Thesis doctorat of philosophy. University Werrabee Campus Victoria School of Biomedical and Health Sciences, Australia. 228p.

**Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, C O'Sullivan G, Shanahan F et Collins J K. (2001).** *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings 1-4. *Am J Clin Nutr*. **73**, 386-392.5-33. Ed. *Lorica*. France.

## G

**Gbassi G K. (2010).** Aspects physicochimiques de l'encapsulation et de la désencapsulation des probiotiques. Thèse de doctorat en chimie. Université de Strasbourg, école doctorale des sciences chimiques. 160p.

**Givery S, (2006).** Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé. Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*. Thèse de doctorat. Université de Reims champagne-ardenne. 221p.

**Gournier-château N, Larpent J P, Castellanos M I, et Larpent J L. (1994).** Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Édition Technologie et documentation Lavoisier pp. 1-192, Paris, France.

**Guiraud J-P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Ed: *Dunod*. Paris. France. 656p.

## H

**Hammes W.P. et Hertel C. (2009).** Genus I. *Lactobacillus*. Dans: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second edition, vol. 3 (The *Firmicutes*). Springer Science-Business Media, New York. 465-511p.

**Hammes W P et Vogel R F. (1995).** The genera of lactic acid bacteria, Chapitre3: Genus *Lactobacillus*. 54p.

**Hadef S. (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister. Université KasdiMerbah-Ouargla, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Algérie. 135p.

## I

**Izequierdo Alegre E. (2011).** Les protéines bactériennes autant que biomarqueur de l'activité probiotique. Thèse de Doctorat en chimie analytique. Université de Strasbourg, France. 230p.

## L

**Liong MT. (2006).** *In-vivo* and *in-vitro* cholesterol removal by lactobacilli and bifidobacteria. Thesis doctor of philosophy. School of molecular sciences Victoria University, Australia. 345p.

*M*

**Malago J, Koninkx J F J G et Marinsek L. (2011).** Probiotic bacteria and enteric infections. Springer. London New York. ISBN 978-94-007-0385-8.

**Maragkoudakis P, Zoumpopoulou L. Miarisa C., Kalantzopoulou G., Potp B. et Tsakalidou E. (2006).** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Journal international de laiterie. **16**: 189-199.

**Morea M., Matarante A., Di Cagno R., Barruzzi F. et Miniervini F. (2007).** Contribution of autochthonous non-starter *Lactobacillus* to proteolysis in Cassiocavallo Pugliese cheese. International Dairy Journal. **17**: 525-534.

**Macho Fernandez E. (2011).** Rôle du peptidoglycane et du récepteur NOD2 dans les capacités immunorégulatrices des lactobacilles. Thèse de Doctorat en biochimie et biologie moléculaire. Université du Droit et de la Santé de Lille II, 128p.

**Normand M, Roland N, Richoux R et Kerjean J-R. (2006).** Propriétés probiotiques des bactéries propioniques laitières. Programme nutrition santé. Bretagne. 41p.

*O*

**Ohlson K, Bjorneholm SFonden R et Svensson U. (2002).** Lactobacillus F19 a probiotic strain suitable for consumer products. Microbial ecology in health and disease. suppl.3:27-32.

*S*

**Saad N. (2010).** Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299V avec l'hôte : approche *in vitro*. Thèse de Doctorat de l'université de Limoges, Ecole doctorale Biologie – Santé, faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, France. 266p.

**Tailliez P. (2004).** Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. Masson, Paris. **6**. 35-41.



# Annexes

Tableau I. effet du pH sur *Lb. paracasei subsp paracasei* BMK 2005

pH	Tube	Temps d'incubation (heure)			
		UFC/ml			
		0h	1h	2h	3h
pH 1	T1	$6,7 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^3$	0
	T2	$5,4 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^3$	0
pH 2	T1	$1,72 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$
	T2	$2,5 \cdot 10^9$	$6,7 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^6$
pH 3	T1	$4 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$
	T2	$4 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
pH 8	T1	$2 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$5,6 \cdot 10^7$
	T2	$1,7 \cdot 10^9$	$6,5 \cdot 10^8$	$1,26 \cdot 10^8$	$6,4 \cdot 10^7$

Tableau II. Effet des enzymes sur *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* BMK2005

Enzyme	Tube	Temps d'incubation (heure)			
		T=0	1h	2h	3h
Pepsine	T1	$1,3 \cdot 10^9$	$9,8 \cdot 10^8$	$9,75 \cdot 10^7$	$1,24 \cdot 10^6$
	T2	$1,2 \cdot 10^9$	$9,5 \cdot 10^8$	$9,6 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^6$
Trypsine	T1	$3 \cdot 10^9$	$8,5 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$
	T2	$3,9 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$
Chymotrypsine	T1	$4,1 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$
	T2	$3,9 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$9,5 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$
Trypsine + chymotrypsine	T1	$3 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^7$
	T2	$2,9 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$	$8,9 \cdot 10^7$

## Annexes

**Tableau III :** Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe ) pH = 6,8 (Guiraud, 2003)

<b>composition</b>	<b>Quantité g /l</b>
peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween	1 ml
Acétate de sodium	5
Phosphate dipotassique	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05

Autoclaver à 121°C pendant 20 minutes

Pour le milieu gélosé on ajoute 15 g/l d'agar

**Tableau IV. Eau physiologique (Guiraud, 2003)**

Chlorure de sodium	8,5g
Eau distillée	1 L

Autoclaver 20 minutes à 120°C

## **Annexes**

### **Appareillage**

L'appareillage utilisé est le suivant :

- Autoclave (Shiavax Electronic) ;
- Bain Marie (Mettler) ;
- Balance (Denver) ;
- Balance analytique (Kerns 220.4N) ;
- Centrifugeuse électrique (Rotina 3600)
- Compteur de colonies (Funk Gerber) ;
- Etuves (Mettler) ;
- Four Pasteur (Controls) ;
- Micropipettes (Microlit) ;
- Microscope optique (Motic) ;
- pH mètre (Hanna) ;
- Réfrigérateur (Condor) ;
- Vortex électrique (MS2 Minishaker).

### **Matériel biologique**

#### **Le lait**

lait en poudre écrémé qui provient ( CANDIA )

#### **Le ferment industriel**

Ferment pour yaourt de marque YALACTA

Dont les ingrédients sont :

Maltodextrine

*Streptococcus thermophilus*

*Lactobacillus bulgaricus*

Date de péremption : 11. 2014

## Annexes

Lot N° : A452



## **Résumé :**

*Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 est douée d'une bonne activité antibactérienne à l'égard de plusieurs souches entéropathogènes. Afin d'exploiter cette propriété et de l'utiliser en alimentation humaine, elle devrait tout d'abord reprendre aux critères de sélection des probiotiques.

Le but de cette étude est d'évaluer certaines propriétés probiotiques de la souche, Pour cela plusieurs tests ont été effectués à savoir la résistance aux pH, enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine et chymotrypsine), bile et survie durant le stockage à 4°C.

Les résultats obtenus ont montrés que *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005résiste bien aux pH acides et alcalins, aux enzymes digestives ainsi qu'à 0,3% (w/v) de sels biliaries. Et une très bonne survie est observée, dans le yaourt après 15 jours de stockage à 4°C.

*Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* pourrait correspondre aux critères de sélection des probiotiques.

**Mots clés :** *Lb. paracasei* subsp *paracasei*, probiotiques, entéropathogènes, yaourt, Croissance.

## **Abstract:**

*Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* is endowed with a good antibacterial activity against several enteropathogenic strains. To exploit this property and use it for human consumption, it should first spread to the selection criteria for probiotics.

The purpose of this study is to evaluate some probiotic properties of the strain, For that several tests were conducted to know the resistance to pH, proteolytic enzymes (pepsin, trypsin and chymotrypsin), 0,3% (w/v) bile and survival during storage at 4 ° C.

The results have shown that *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BMK2005 resist to acidic and alkaline pH, the bile and the pancreatic enzymes. And a very good survival was observed in yogurt after 15 days of storage at 4 ° C. *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BMK 2005 could correspond to the selection criteria of the probiotic ones.

**Keywords:** *Lb. paracasei* subsp *paracasei*, probiotic, enteropathogenic, yoghurt, Growth.