

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences biologiques



Mémoire

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par : HADJ SAID Omar

BECHOUNI Oum el kheir

Thème :

Activité prébiotique des hydrolysats des polysaccharides extraits de quelques plantes spontanées à caractère médicinal récoltées dans le Sahara Algérien (région de Ghardaïa)

Soutenu publiquement

Le : 18 / 09 / 2013

Devant le jury:

| | | | | |
|-----------------|--------------------|--------|-----------|-------------|
| M _{me} | SIBOUKEUR O. E. K. | Pr. | Président | UKM Ouargla |
| M. | BOUAL Z. | MA (A) | Encadreur | UKM Ouargla |
| M. | BOURICHA M. | MA (B) | Examineur | UKM Ouargla |

Année universitaire: 2012 / 2013



Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous tenons à remercier particulièrement Mr BOUAL Zakaria, Maître Assistant au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, qui a encadré ce travail depuis les premiers instants, sa pédagogie, son écoute, son ouverture d'esprit et sa vision de la recherche scientifique, ont été importants pour nous que ses connaissances éclectiques et ont largement contribué à l'évolution de cette étude.

Nous exprimons nos profondes reconnaissances à M^{me} SIBOUKEUR OUM EL KHIR, Professeur au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, qui nous fait l'honneur de présider ce jury.

Nous tenons à remercier profondément Mr BOURICHA Mohamed Maître Assistant au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, d'avoir accepté d'examiner ce travail

Nous remercions le Laboratoire de Protection des Écosystèmes en Zones Arides et Semi Arides, en particulier son Directeur, Mr OULD EL HADJ Mohamed Didi de nous avoir accueilli au sein du Laboratoire.

Nous remercions Dr. AMI SAID Mustapha, Directeur du Laboratoire d'Analyse Médicale IBN ROCHD GHARDAJA.

Nos remerciements s'adressent aussi à nos collègues de Master microbiologie, à nos amis (e) du laboratoire et à tous ce qui est contribué à l'évolution de cette étude.

MERCI



DEDICACES

Je rends grâce à ALLAH le TOUT PUISSANT pour tous les bienfaits dont il m'a comblé.

Ce mémoire ayant été rédigé, je le dédie:

à mes chers parents : ma mère et mon père ; je vous aime beaucoup pour m'avoir soutenu tout au long de mes études. Qu'ALLAH le tout puissant vous bénisse.

particulièrement à mes frères et sœurs qui a beaucoup souffert pour que je réussisse dans mes études.

à ma famille et à tous ceux qui m'ont, jusqu'à ce jour, soutenu avec peine et courage.

à toutes la promotion de master 2012-2013

à mes encadreurs Monsieur BOUAL ZAKARIA et OULED HADJ qui, m'ont accompagné dans la réalisation de ce travail.

à tous mes chers amis et toutes les personnes qui m'ont soutenu durant mon parcours scolaire et académique.

OMAR

DEDICACES

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon travail à mes parents "père et mère", en particulier et à toute la famille, mes frères et sœurs :

Fatima, Yamina, Bouti, Lamine, Zakaria, Tamadeur, Omar et Khaoula.

A mes beaux frères : Nettari Farhat et Bouteraa Mohamed El-Habib. Ma belle sœur : Nassima. Ma grande mère : Halima. Ma collègue : Hadj said Omar. A mes encadrateurs Monsieur BOUAL ZAKARIA et OULED HADJ qui m'ont accompagné dans la réalisation de ce travail.

A toutes mes cousines, mes cousines et mes oncles. Mes amis : Houda, Bahria, Imane, Alia et Mouna. Mr : Begarri El-Aiche.

Ainsi à toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études.

Oum El-Kheir

Liste des abréviations

| | |
|------------|--|
| AGCC | Acide gras à chaîne courte |
| DO | Densité Optique |
| FAO | Food and Agriculture Organization (United Nations) |
| FOS | Fructooligosaccharide |
| GOS | Galactooligosaccharide |
| IMO | Isomaltooligosaccharides |
| M | Molarité |
| Milieu MRS | Milieu de Man, Rogosa et Sharp |
| N | Normalité |
| nm | Nanomètre |
| rpm | Rotation par minute |
| TFA Acide | Trifluoroacétique |
| UFC | Unité formant colonie |
| WHO | World Health Organization |
| XOS | Xylooligosaccharide |
| XOS | Xylooligosaccharide |
| TOS | Transgalactooligosaccharide |
| SOS | Oligosaccharide de soja |
| DP | Degré de polymérisation |

Liste des tableaux

| N° | Titre | Page |
|-------------|--|-----------|
| I | Micro-organismes considérés comme probiotiques (AIT BELGNAOUI, 2006). | 9 |
| II | Position systématique et usages thérapeutiques des espèces de plantes spontanées à caractère médicinal choisies dans la région de Ghardaïa (BATANDIER, 1882 ; QUEZEL et SANTA, 1962 ; QUEZEL et SANTA, 1963 ; OZENDA, 1977 ; VOISIN, 1987) | 15 |
| III | Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation | 16 |
| IV | Origine et type d'appareil utilisé au cours de l'expérimentation | 17 |
| V | Composition de la galerie API 20 C AUX | 27 |
| VI | Principaux oligosaccharides commercialement disponibles (HOLM, 2001) | 30 |
| VII | Caractères macroscopique et microscopique de la souche isolée | 36 |
| VIII | Différents résultats des tests biochimiques et physiologiques classiques et à l'aide des tests de la galerie API 20 C Aux | 38 |
| IX | Acidité produite par la fermentation des différentes sources carbonées | 42 |

Liste des figures

| N° | Titre | Page |
|----|--|------|
| 01 | bacilles Gram-positif réguliers non sporulants. (a) <i>L. acidophilus</i> (x1000). (b) <i>L. lactis</i> , coloration de Gram (x 500). (c) <i>L. bulgaricus</i> contraste de phase (x 600) (PRESCOTT et al., 2003). (d) <i>L. plantarum</i> (WATTERLOT, 2010) | 11 |
| 02 | <i>Bifidobacterium adolescentis</i> (DELCENSERIE et al., 2002) | 12 |
| 03 | <i>Bifidobacterium longum</i> (WATTERLOT, 2010) | 12 |
| 04 | Voies homofermentaire et hétérofermentaire simplifiées (ROUSSEAU, 2004). | 25 |
| 05 | Colonies de souches isolées sur milieu MRS. | 36 |
| 06 | Aspect des souches isolées sous microscope photonique (Gx100). | 36 |
| 07 | Type fermentaire | 37 |
| 08 | Tolérance à la salinité | 37 |
| 09 | Tolérance à l'acidité | 39 |
| 10 | Croissance de souche de <i>Lactobacillus brevis</i> en présence de différentes sources de carbones (3 extraits polysaccharidiques appartient aux espèces <i>Urginea noctiflora</i> , <i>Astragalus armatus</i> , <i>Plantago notata</i> et glucose, lactulose comme témoin) (incubation à 37°C). | 40 |
| 11 | Valeurs de pH des différents milieux mesuré à température de 27°C | 41 |

Table de matière

| | |
|---|----|
| Remerciements | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des figures | |
| Introduction..... | 1 |
| Chapitre I: Synthèse bibliographique | |
| I.1.- Prébiotiques et symbiotique..... | 5 |
| I.1.1- Définitions, composition | 5 |
| I.1.2.- Différentes familles prébiotiques oligosaccharidiques | 5 |
| I.1.2.1.- Fructooligosaccharide et inuline | 5 |
| I.1.2.2.- Lactulose | 6 |
| I.1.2.3.- Galactooligosaccharides (GOS) | 6 |
| I.1.2.4.- Prébiotiques émergents | 7 |
| I.1.2.4.1.- isomaltooligosaccharides (IMO)..... | 7 |
| I.1.2.4.2.- Oligosaccharides de soja (SOS)..... | 7 |
| I.1.2.4.3.- Xylooligosaccharides (XOS) | 7 |
| I.2.- Probiotique..... | 8 |
| I.2.1.- Définitions | 8 |
| I.2.2.- Caractéristiques des principaux genres probiotiques | 10 |
| I.2.2.1.- Le genre <i>lactobacillus</i> | 10 |
| I.2.2.2.- Le genre <i>Bifidobactérium</i> | 11 |
| I.3.- Effect de prébiotique sur la flore intestinale | 12 |
| Chapitre II: Matériel et méthodes | |
| II.1.- Principe adopté | 14 |
| II.2.- Matériel biologique | 14 |
| II.2.1.- Extraits végétaux | 14 |
| II.2.2.- Souche bactérienne..... | 15 |
| II.3.- Matériel d'étude..... | 16 |
| II.3.1.- Produits chimique et réactifs | 16 |
| II.3.2.- Appareillage..... | 17 |
| II.3.3.- Milieux de culture | 18 |

| | |
|---|----|
| II.4.- Méthodes | 19 |
| II.4.1.- Isolement des souches probiotiques..... | 19 |
| II.4.2.- Identification | 19 |
| II.4.2.1.- Moyens d'identification des bactéries | 19 |
| II.4.2.1.1.- Examen macroscopique | 20 |
| II.4.2.1.2.- Examen microscopique..... | 21 |
| II.4.2.1.3.- Test d'endospores | 22 |
| II.4.2.1.3.1.- Principe | 22 |
| II.4.2.1.3.2.- Mode opératoire..... | 22 |
| II.4.2.1.4.- Test de catalase | 22 |
| II.4.2.1.4.1.- Principe..... | 22 |
| II.4.2.1.4.2.- Méthode | 23 |
| II.4.3.- Purification d'isolat | 23 |
| II.4.4.- Tests biochimiques..... | 23 |
| II.4.4.1.- Etude de types fermentaires | 23 |
| II.4.4.1.1.- Principaux type fermentaires des bactéries lactiques | 24 |
| II.4.4.1.2.- Mode opératoire..... | 24 |
| II.4.4.2.- Pouvoir coagulant et acidifiant | 25 |
| II.4.4.3.- Identification par la galerie API 20 C Aux | 25 |
| II.4.4.3.1.-Galeries d'identification, système API..... | 26 |
| II.4.4.3.1.1.- Principe | 26 |
| II.4.4.3.1.2.- Galerie d'identification du genre lactobacillus et germes apparentés | 26 |
| II.4.4.3.1.3.- Mode opératoire..... | 27 |
| II.4.4.3.1.3.1.- Préparation de milieu de culture..... | 28 |
| II.4.4.3.1.3.2.- Inoculation de la galerie..... | 28 |
| II.4.5.- Aptitudes probiotiques..... | 28 |
| II.4.5.1.- Test de résistance à l'acidité | 29 |
| II.4.5.2.- Test de tolérance à l'NaCl | 29 |
| II.4.6.- Contrôle de l'effet des oligosaccharides sur la souche probiotique | 29 |
| II.4.6.1.- Test de croissance | 30 |
| II.4.6.1.1- Préparation des extraits végétaux | 30 |
| II.4.6.1.2.- Préparation du milieu de culture..... | 31 |
| II.4.6.1.3.- Suivi de croissance..... | 31 |

| | |
|--|----|
| II.4.6.2.- Mesure du pH du milieu..... | 32 |
| II.4.6.3.- Dosage de l'acide lactique..... | 33 |

Chapitre III: Résultats et discussion

| | |
|--|----|
| III.1.- Identification de la souche probiotique isolée | 35 |
| III.1.1.- Critères morphologique..... | 35 |
| III.1.1.1.- Caractérisation macroscopique | 35 |
| III.1.1.2.- Caractérisation microscopique..... | 35 |
| III.1.2.- Critères physiologiques et biochimique | 35 |
| III.2.- Contrôle de l'effet des oligosaccharides sur <i>lactobacillus brevis</i> | 38 |
| III.2.1. Test de croissance..... | 38 |
| III.2.2.- pH de milieu de culture..... | 40 |
| III.2.3.- Dosage de l'acide lactique..... | 41 |
| Conclusion..... | 44 |
| Références bibliographiques | |
| Annexes | |
| Résumé | |

Introduction

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie, elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus. Les effets curatifs de certaines plantes sont bien connus. La camomille, par exemple, est utilisée depuis des milliers d'années contre les troubles digestifs (ISERIN et *al.*, 2001).

Or, ce n'est que récemment que les éléments actifs à l'origine des actions thérapeutiques des plantes ont été isolés et étudiés. Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme (ISERIN et *al.*, 2001). Les polysaccharides font partie de ces éléments, ils sont des polymères organiques les plus abondants obtenus par biosynthèse, disponibles de différentes sources végétales et animales à des structures variables.

La plupart des polysaccharides isolés à partir des plantes médicinales, ont des activités non structurales supplémentaires, tels que les pectines possèdent des propriétés immunomodulatrices, anti-complément, anti-VSH (virus de l'herpès simplex) et des activités anti-inflammatoires (BOUAL et *al.*, 2012).

La notion de " probiotiques" a été développée grâce aux travaux de METCHNIKOFF (1907) qui avait constaté que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé. Ainsi, METCHNIKOFF avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie (AMROUCHE, 2005). 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), les probiotiques sont « des microorganismes vivants qui administrés en quantités adéquates sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » (FAO/WHO, 2002).

Certains composants de la microflore intestinale, particulièrement les bifidobactéries, sont capables de fermenter des substances essentiellement non digestibles (glucide complexe) dans le colon grâce à leur pouvoir saccharolytique important. Cette propriété permet

d'augmenter la croissance ou l'activité des microorganismes spécifiques du tractus gastro-intestinal en influençant positivement la santé de l'hôte. Les effets bénéfiques générés par ces interactions ont permis le développement du nouveau concept « prébiotiques » (AMROUCHE, 2005). Les prébiotiques doivent être non digestibles pour servir de substrat aux bactéries spécifiques, principalement les bifidobactéries et les lactobacilles, qui sont actives et améliorent la santé de l'hôte. Les fibres alimentaires comme les polysaccharides tels que l'amidon, l'inuline, les pectines, les gommes, et les oligosaccharides non digestibles sont ainsi fermentées par les bactéries intestinales en produisant des acides gras à courte chaîne notamment les acides acétique, propionique et butyrique...qui sont alors utilisés par les différents tissus de l'hôte comme substrats énergétiques, ou comme facteurs de régulation cellulaire. Par exemple, le butyrate est non seulement utilisé par les cellules épithéliales du colon à des fins énergétiques, mais aussi joue un rôle majeur dans la régulation de leur processus de prolifération et de différenciation cellulaire. Pour être considéré comme prébiotique, un ingrédient alimentaire doit:

- a- être ni hydrolysé ni absorbé dans le tractus gastro-intestinal ;
- b- être sélectif pour un nombre limité de bactéries endogènes ;
- c- modifier la microflore intestinale en améliorant sa composition ;
- d- induire des effets intestinaux ou systémiques bénéfiques pour la santé de l'hôte

(AMROUCHE, 2005).

Notre travail consiste à isoler une souche probiotique (*Lactobacillus*) à partir d'un yaourt et de déterminer l'effet des extraits oligosaccharidiques de trois espèces de plantes spontanées à caractère médicinal sur cette souche, ces espèces choisies de la région de Ghardaïa et qui sont *Astragalus armatus*, *Plantago notata*, *Urginea noctiflora*.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

I.1.-Prébiotiques et symbiotique

I.1.1.-Définitions

Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de manière sélective, au niveau du côlon, la multiplication ou l'activité d'un ou d'un nombre limité de groupes bactériens susceptibles d'améliorer la physiologie de l'hôte. À ce jour, les groupes bactériens concernés sont essentiellement les bifidobactéries (on parle alors d'effet bifidigène) et les autres bactéries lactiques.

Les prébiotiques les plus connus et déjà utilisés sont les fructanes – fructo-oligosaccharides (FOS), oligofructose, inuline – et d'autres oligosides de galactose et transgalactose (GOS et TOS). De nombreux autres glucides pourraient revendiquer l'appellation de prébiotiques (xylo-oligosaccharides, isomalto-oligosaccharides, gluco-oligosaccharides, etc.). Des sucres alcools pourraient aussi avoir des propriétés prébiotiques. Certains prébiotiques sont naturellement présents dans les aliments et d'autres ajoutés dans des aliments à visée fonctionnelle ou dans des suppléments alimentaires.

Les symbiotiques se définissent comme l'association d'un probiotique et d'un prébiotique dont l'ingestion concomitante pourrait favoriser la multiplication du premier dans le tractus digestif (par exemple, une association de *bifidobactérium* ou de *lactobacillus* et fructo-oligosaccharides) (RAMBAUD et *al.*, 2004).

I.1.2.-Différentes familles des prébiotiques oligosaccharidiques

Plusieurs familles d'oligosaccharides ont été testées par méthodes *in vitro* et sur des modèles animaux et humains. On peut classer les prébiotiques en deux grands groupes : les prébiotiques connus, dont certains sont commercialisés, et les prébiotiques émergents. Le premier groupe est essentiellement constitué de trois familles : les fructooligosaccharides (FOS), les galactooligosaccharides (GOS) et le lactulose (GENESTIE, 2006).

I.1.2.1.- Fructooligosaccharide et inuline

Les **Fructooligosaccharides** sont des oligomères de D-fructose associés par des liaisons β -(1→2) avec un résidu D-glucose en bout de chaîne lié en α -(1→2). Ils sont obtenus par réaction d'hydrolyse enzymatique de l'inuline, mais ils ont également été synthétisés par transfert de résidus fructosyl de molécules de saccharose par voie enzymatique. L'inuline est

un ensemble de polymères de fructose de degré de polymérisation > 20 , elle est extraite industriellement de la chicorée, mais on la trouve également dans l'ail, l'oignon, la tomate, la banane et l'artichaut.

Ce sont les prébiotiques les plus étudiés et leur aptitude à stimuler la croissance de *bifidobacterium* a été établie par de nombreuses études tant *in vitro* que *in vivo*. Ils ont été testés sur des cocultures à pH contrôlé, où ils induisent non seulement une stimulation de la croissance de *Bifidobacterium infantis* mais aussi inhibent celle d'*Escherichia coli* et de *Clostridium perfringens*. Toujours en test *in vitro*, leur effet bifidogène a été mis en évidence sur des systèmes bactériens complexes simulant la diversité microbienne de l'intestin humain.

Une étude récente, publiée par ROSSI (2005), fait état d'une comparaison de la fermentation de FOS et d'inuline en cultures pures et inoculum fécal. Cinquante cinq souches de bifidobactéries ont été testées, la plupart sont capables de fermenter les FOS, mais seulement huit d'entre elles se développent bien sur l'inuline. En culture sur inoculum fécal, les FOS et l'inuline affectent la production d'acide gras à chaîne courte, le butyrate est le produit majeur de fermentation de l'inuline, alors que ce sont l'acétate et le lactate qui sont majoritairement produits avec les FOS (GENESTIE, 2006).

I.1.2.2.-Lactulose

C'est un disaccharide synthétique galactose- fructose liés en β -(1 \rightarrow 4) dérivé du lactose. Il est connu pour ses effets laxatifs lorsqu'il est pris à fortes doses (supérieures à 20g par jour). Mais à plus faibles doses, il agit en tant que prébiotique en augmentant le nombre de bifidobactéries alors que le nombre de *Clostridium perfringens*, de Bactéroïdes, de spérocoques et d'enterobactéries décroît (GENESTIE, 2006).

I.1.2.3.-Galactooligosaccharides (GOS)

Ce sont des oligomères de la forme $\text{Glc } \alpha$ -(1 \rightarrow 4)-[β -(1 \rightarrow 6) Gal] $_n$, avec n de 2 à 5. Ils sont naturellement présents dans le lait mais également obtenus par synthèse enzymatique à partir du lactose. Ils sont non digestibles. Sur des rats porteurs d'une microflore humaine, ROWLAND a montré que les transgalactooligosaccharides augmentaient le nombre de bifidobactéries et de lactobacilles mais en outre diminuaient le nombre d'entérobactéries (GENESTIE, 2006).

I.1.2.4.- Prébiotiques émergents

Parmi les prébiotiques émergents on peut citer : les isomaltooligosaccharides (IMO), les oligosaccharides de soja (SOS) et les xylooligosaccharides (XOS). On ajoutera, dans une moindre mesure en termes de travaux d'expertise, les glucooligosaccharides et les pectiologosaccharides. Il a également été avancé que les amidons résistants pouvaient entrer dans cette catégorie (GENESTIE, 2006).

I.1.2.4.1.- Isomaltooligosaccharides (IMO)

Ils sont constitués de résidus glucose liés en α -(1→6). Leur production industrielle fait appel à l'action d' α -amylase, de pullulanases et d' α -glucosidases sur l'amidon de maïs. Tous les IMO testés sur des cultures bactériennes pures induisent un accroissement de la plupart des bifidobactéries à l'exception de *Bifidobacterium bifidum*. RYCROFT en 2001 a montré qu'avec les IMO de DP moyen égal à 2, le nombre de bifidobactéries augmentait après 24h de culture en batch ainsi que la concentration en acide lactique et lactate.

Les résultats d'études *in vitro* réalisées avec des produits commerciaux vont dans le même sens quant à l'effet bifidogène, mais une légère augmentation des *Bacteroides* est également observée (GENESTIE, 2006).

I.1.2.4.2.- Oligosaccharides de soja (SOS)

Les deux principaux oligosaccharides extraits du soja sont le trisaccharide raffinose et le tétrasaccharide stachyose, ils sont constitués de résidus glucose, galactose et fructose. Les tests *in vitro* et *in vivo* conduisent au même constat d'un effet bifidogène, avec dans certains cas une décroissance concomitante non seulement des *Bacteroides et clostridia* mais aussi de certains métabolites toxiques (GENESTIE, 2006).

I.1.2.4.3.- Xylooligosaccharides (XOS)

Ils sont constitués de formes oligomériques de résidus xylose liés en β -(1-4), dans cette famille on incluse également les arabinoxylanes (AXOS) qui peuvent être eux-mêmes différemment substitués selon l'origine et les procédés d'obtention. Ils sont essentiellement obtenus par hydrolyse des hétéroxylanes constituant les parois cellulaires végétales.

Ils semblent encore mieux répondre que les FOS et les IMO au tout premier critère de définition d'un prébiotique, à savoir sa non digestibilité. En effet ils ne sont pas du tout dégradés par aucune enzyme digestive alors que certains FOS et la plupart des IMO subissent une digestion partielle dans l'intestin grêle. L'une des activités les plus importantes des XOS est leur effet bifidogène (GENESTIE, 2006).

I.2.- Probiotiques

I.2.1.- Définitions

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et d'avancées technologiques. Une des premières définitions des probiotiques comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposée par LILLY et STILLWELL en 1965. Ensuite, PARKER élargit cette définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». Cette définition inclut potentiellement des produits métaboliques microbiens y compris les antibiotiques. Plus tard, FULLER propose une définition très proche du sens actuel : « supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ». La FAO (Food and Agriculture Organisation) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé ; WHO) ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme «Probiotique» dans les aliments (FAO/OMS, 2002) et formulent la définition suivante : « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère » (AIT BELGNAOUI, 2006).

Les probiotiques sont le plus souvent des bactéries ou des levures vivantes, bien que quelques parasites aient été étudiés chez l'animal (RAMBAUD, 2004). Le tableau I montre différentes micro-organismes considérés comme probiotiques.

Les espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont plus communément utilisées comme probiotiques, mais l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et quelque espèces telle que *E.coli* et quelque genres tel que *Bacillus* sont également utilisées comme des probiotiques (GUARNER et al., 2008).

Tableau I : Micro-organismes considérés comme probiotiques (AIT BELGNAOUI, 2006).

| <i>Lactobacillus</i> | <i>Bifidobactérium</i> | Autres bactéries lactique | Autres microorganismes |
|-----------------------|------------------------|------------------------------------|---|
| <i>L. acidophilus</i> | <i>B. adolescentis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Bacillus spp</i> |
| <i>L. amylovirus</i> | <i>B. animalis</i> | <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Escherichia coli strain Nissle</i> |
| <i>L. brevis</i> | <i>B. bifidum</i> | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Propionibacterium freudenreichii</i> |
| <i>L. casei</i> | <i>B. breve</i> | <i>Leuconstoc mesenteroides</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| <i>L. cellobius</i> | <i>B. infantis</i> | <i>Pediococcus acidilactici</i> | <i>Saccharomyces boulardii</i> |
| <i>L. crispatus</i> | <i>B. lactis</i> | <i>Sporolactobacillus inulinus</i> | |
| <i>L. curvatus</i> | <i>B. longum</i> | <i>Streptococcus thermophilis</i> | |
| <i>L. delbrueckii</i> | <i>B. thermophilum</i> | | |
| <i>L. farciminis</i> | | | |
| <i>L. gallinarum</i> | | | |
| <i>L. gasseri</i> | | | |
| <i>L. johnsonii</i> | | | |
| <i>L. paracasei</i> | | | |
| <i>L. plantarum</i> | | | |
| <i>L. reuteri</i> | | | |
| <i>L. rhamnosus</i> | | | |

I.2.2.- Caractéristiques des principaux genres probiotiques

I.2.2.1.- Le genre *Lactobacillus*

Il regroupe de nombreuses espèces isolées d'habitats variés : cavité buccale, tractus digestif, organes génitaux chez l'homme, produits végétaux, lait et produits laitiers, produits carnés, poissons marinés ou fumés, eaux usées, sol...etc (FEDERIGHI, 2005).

Les lactobacilles se présentent sous forme de bacilles ou coccobacilles, isolés ou en chaînettes (WATTERLOT, 2010). Ils sont généralement immobiles à Gram positif, leur type respiratoire est microaérophile anaérobie facultatif (SUMBALI, 2009).

Ce sont des bactéries non-sporulantes, caractérisées par l'absence d'activité de catalase (catalase négative) et la présence de l'acide lactique comme acide principal produit à partir de la fermentation du glucose. L'acide acétique, l'acide succinique et l'acide formique peuvent être détectés en quantités mineures dans certaines cultures (TANNOCK, 1999). Ils sont répartis en trois groupes :

- Groupe I : il comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces généralement thermophiles, comme *Lb.delbrueckii*, et *Lb. helveticus* qui participent à la fermentation des produits laitiers, et *Lb.acidophilus* issu de la flore intestinale.

- Groupe II : ce sont les espèces hétérofermentaire à partir du gluconate. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces majoritairement mésophiles dont *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* et *Lb.plantarum*, intervenant dans la fermentation des produits carnés et céréaliers, et *Lb.casei* utilisé pour ses propriétés probiotiques.

- Groupe III : il est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires utilisent la voie des pentoses phosphate. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. sanfransiscensis* et *Lb. brevis*, qui font partie de la flore des levains de panification, et *Lb. kefir* isolé du grain de kéfir (FEDERIGHI, 2005).

L'isolement des espèces de *Lactobacilles* se fait par l'utilisation du milieu Rogosa en anaérobiose (jarre) (LARPENT, 1997) ou milieu MRS qui possède des sources de carbone, de glucose, acétate, citrate, et du tween 80 comme source d'oléate. Il est ajusté à pH 6,5 ou 5,5 (FEDERIGHI, 2005).

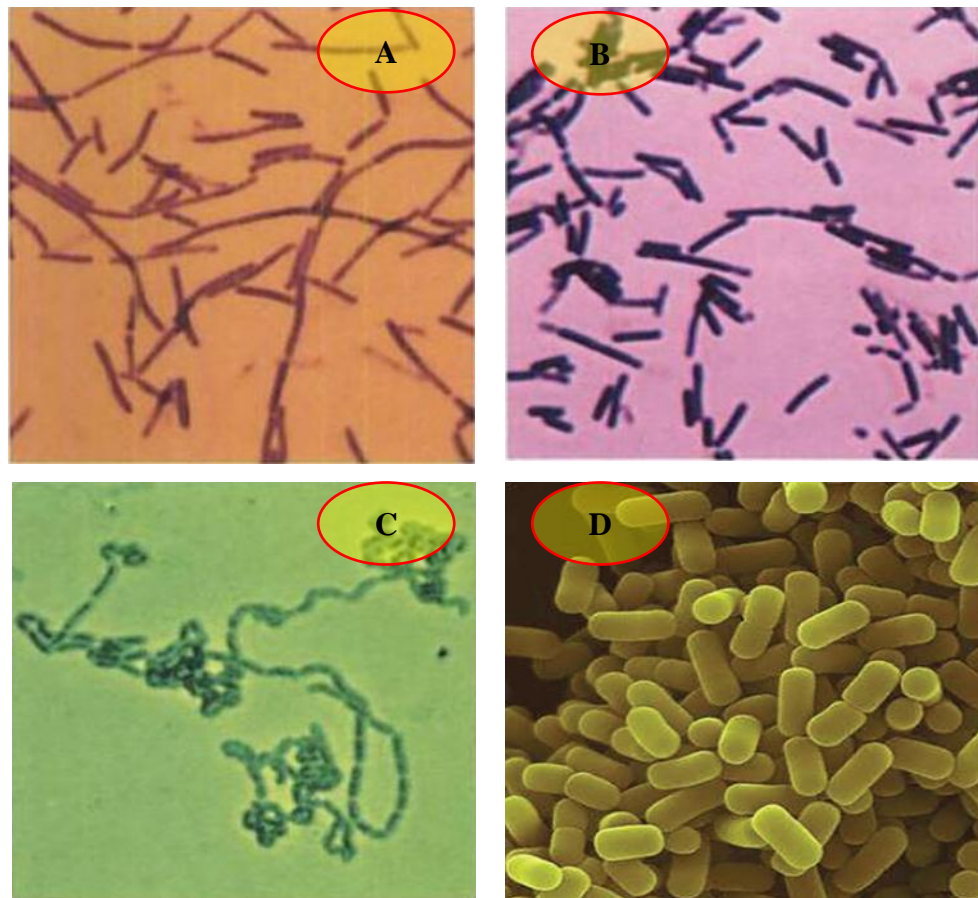


Fig. 1- bacilles Gram-positifs réguliers non sporulants. (a) *L. acidophilus* (x1.000). (b) *L. lactis*, coloration de Gram (x 500). (c) *L. bulgaricus* contraste de phase (x 600) (PRESCOTT et al., 2003). (d) *L. plantarum* (WATTERLOT, 2010).

I.2.2.2.-Le genre *Bifidobacterium*

Les bifidobactéries sont des bacilles anaérobies stricts à Gram positif non sporulés. Les cellules sont de morphologie variable selon le milieu de culture : La forme caractéristique est un bâtonnet à extrémité renflée, spatulée voire divisée deux branches (forme bifide en Y) (LARPENT, 1997).

Bifidobacterium spp. est présent naturellement dans l'intestin qu'il colonise durant la première semaine après la naissance. Il fait partie des Actinobactéries, possède un haut pourcentage en base GC (entre 55 et 64%). Il représente 95% du microbiote de l'enfant et 3% de l'adulte. On dénombre environ 30 espèces différentes dont certaines sont considérées comme probiotiques (WATTERLOT, 2010).

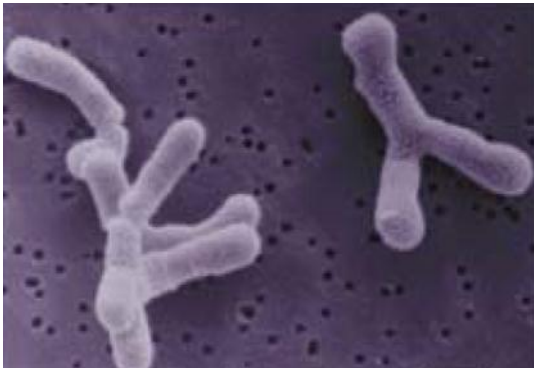


Fig. 2- *Bifidobacterium adolescentis*.
(DELCENSERIE et al., 2002).

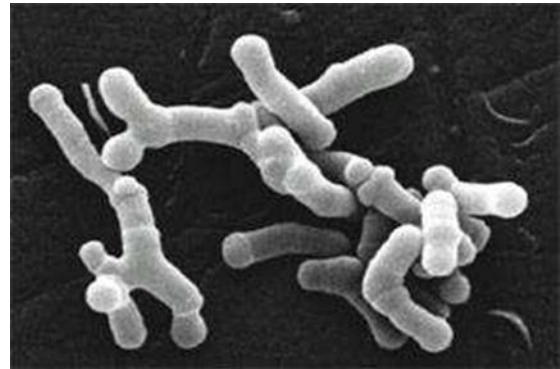


Fig. 3- *Bifidobacterium longum*
(WATTERLOT, 2010).

I.3.- Effet de prébiotique sur la flore intestinale

Les prébiotiques sont des composants alimentaires naturels indigestes (oligosaccharides) censés améliorer la santé en influençant favorablement la flore intestinale par la stimulation de certaines bactéries à l'activité probiotique.

L'apport d'inuline et de FOS, chez l'adulte en raison de 10g/jour, stimule la prolifération des bactéries lactiques, surtout des bifidobactéries, dans l'intestin. Ces bactéries fermentent les fibres prébiotiques et les réduisent à des acides gras à chaîne courte. Se forment ainsi acétate, butyrate, lactate et propionate. Ces prébiotique ont des effets secondaires sur l'intestin ce que par fermentation bactérienne des oligo-saccharides prébiotiques provoque la formation de gaz (H_2 , méthane et d'autre) qui peuvent, lors d'un dosage trop élevé, provoquer des ballonnements, des douleurs abdominales et des diarrhées (BRAEGGER, 2004).

Chapitre II

Matériel et méthodes

II.1.- Principe adopté

La qualité non digestibles d'oligosaccharides signifie qu'ils ont des effets similaires aux fibres alimentaires, et donc prévenir la constipation l'un des effets bénéfiques des prébiotiques ; comme par exemple le lactulose est actuellement utilisé principalement comme produit pharmaceutique pour le contrôle de la constipation et L'encéphalopathie hépatique (CRITTENDEN et PLAYNE, 1996) (OLIVEIRA et *al.*, 2010).

Ce travail a pour objectif d'étudier l'effet d'oligosaccharides extrait des plantes à caractère médicinale utilisé pour améliorer le transit intestinal et prévenir la constipation, sur une souche probiotique isolé localement. Les espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont plus communément utilisées comme probiotiques (GUARNER et *al.*, 2008).

Pour cela on a isolé une souche appartenant au genre *Lactobacillus* à partir d'un yaourt locale et suivre d'une part sa croissance par la mesure de la densité optique dans des milieux à base d'hydrolysats des polysaccharides hydrosolubles d'*Urginea noctiflora*, d'*Astragalus armatus*, et de *Plantago notata*, et d'autre part de mesurer sa capacité à produire des acides gras à chaîne courte (GENESTIE, 2006), suivant ces étapes essentielles:

1. Isolement et identification d'une souche probiotique à partir du yaourt ;
2. Estimation de la charge bactérienne au cours de la croissance dans différentes sources carbonées par la mesure de la densité optique à 620 nm ;
3. Mesure de pH de milieux ;
4. Dosage d'acide lactique.

II.2.-Matériel biologique

Le matériel biologique se compose d'extraits de polysaccharides hydrosolubles végétaux et de souche bactérienne.

II.2.1.- Extraits végétaux

Des oligosaccharides issus de l'hydrolyse partielle des 3 extraits de polysaccharides hydrosolubles, appartient aux espèces *Urginea noctiflora*, *Astragalus armatus*, et *Plantago notata* (tableau II).

II.2.2.-Souche bactérienne

La souche bactérienne choisie comme probiotique appartient au genre *Lactobacillus* isolée à partir du yaourt "Dialna" dans la masse de gélose MRS (NOWROOZI et al., 2004).

Tableau II - Position systématique et usages thérapeutiques des espèces de plantes spontanées à caractère médicinal choisies dans la région de Ghardaïa (BATANDIER, 1882 ; QUEZEL et SANTA, 1962 ; QUEZEL et SANTA, 1963 ; OZENDA, 1977 ; VOISIN, 1987)

| Famille | Nom scientifique | Nom Mزاب/Arabe | Vivace/éphémère | Répartition | Partie utilisée | Mode d'utilisation | Indications traditionnelles |
|----------------|---------------------------|----------------|-----------------|---|-----------------|--------------------|--|
| Fabaceae | <i>Astragalus armatus</i> | Kandoul | Éphémère | Nord du Sahara, en bordures des hauts plateaux | Graines | compresse | Anti hémorragique, anti inflammatoire, dysenterie |
| Plantaginaceae | <i>Plantago notata</i> | Adan/ Inim | Éphémère | Commun dans tous le Sahara septentrional et central | Graines | Poudre | cicatrisation, anti-inflammatoire, constipations |
| Liliaceae | <i>Urginea noctiflora</i> | Basicifar | Vivace | Commun au Sahara septentrional | Bulbe | Poudre, compresses | Traitement des plaies, des maux d'oreilles, troubles gastrique |

II.3.- Matériel d'étude

II.3.1.- Produits chimiques et réactifs

Tableau III - Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation

| Produit | Fournisseur | Caractéristiques | | | | |
|-------------------------------|---------------|------------------|--|--------------------|------------------------------|------------|
| | | Forme | Formule chimique | M. molaire (g/mol) | Densité (g/cm ³) | Pureté (%) |
| Acétone | GPR RECTAPUR | Liquide | C ₃ H ₆ O | 58.08 | 0.792 | 100 |
| Acide acétique | EDEN-LABO | Liquide | CH ₃ COOH | 60,05 | 1.048-1.051 | 99.5 |
| Hydroxyde de sodium | | poudre | NaOH | 39.99 | | 99 |
| Acide chloro- hydrique | SIGMA-ALDRICH | Liquide | HCl | 36.46 | 1,20 – 1,21 | 37 |
| Acide citrique | | Poudre | C ₆ H ₈ O ₇ | 192,124 | | |
| Acide lactique | | Liquide | C ₃ H ₆ O ₃ | 90,08 | | |
| Bleu de bromophénol | | Poudre | C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ | 669.96 | | |
| phénolphtaléine | | Poudre | C ₂₀ H ₁₄ O ₄ | 318.33 | | |
| Éthanol | SIGMA ALDRICH | Liquide | CH ₃ CH ₂ OH | 46,06844 | 789,00 | 96 |
| Chlorure de sodium | | Poudre | NaCl | 58.44 | | 99,5 |
| Acide trifluoroacétique (TFA) | | Liquide | C ₂ HF ₃ O ₂ | 114,03 | 1,5351 | |
| Éthanol | SCHARLAU | Liquide | CH ₃ CH ₂ OH | 46,06844 | 789,00 | 96 |
| Fuschine | | Liquide | C ₂₀ H ₂₀ CIN ₃ | 337,86 | | |
| Méthanol | | Liquide | CH ₃ OH | 32.04 | 0.79 | 99.9 |

| | | | | | | |
|------------------------------------|----------|---------|----------------------|--------|-----------|----|
| Rouge de méthyle | SCHARLAU | Poudre | $C_{15}H_{15}N_3O_2$ | 269.3 | 1,01 | 99 |
| Lugol | | Liquide | $I_2 + KI$ | | | |
| Violets de Gentiane | | Liquide | $C_{25}H_{30}ClN_3$ | 407,99 | | |
| LactuloseNom commercial « Ezilax » | EL KENDI | liquide | $C_{12}H_{22}O_{11}$ | 342,30 | 0.67 g/ml | |

II.3.2.-Appareillage

Tableau IV - Origine et type des appareils utilisées au cours de l'expérimentation

| Appareil | Fournisseur | Type | Lieu de fabrication |
|-------------------|--------------|---|---------------------|
| Autoclave | WEBECO | WEBECKE. P : 2.5BAR, T :138°C | / |
| Bain marie | MEMMERT | MEMMERTGMBH. WB 7. NENNTEMP ; 100 °C | GERMANY |
| Balance | OHAUS | DISCOVERY DV 215CD OHAUS. | USA. |
| Centrifugeuse | SIGMA | SIGMA. 15PK, 14000 RPM. | GERMANY |
| Distillateur | LABORTECHNIC | D30-BURGWEDL, 2108 | GERMANY |
| Étuve | MELAG | MELAG815.220V, 50HZ, 12.3A, 2700w. | GERMANY |
| Hotte | TEL STAR | TELSTAR AV-100. MODELE50/60 HZ, 0.6KW. | SPAIN |
| Lyophilisateur | CHRIST | CHRIST.ALPHA 1-2LD. 101021.230V, 50HZ, 0.7. KW. | GERMANY |
| Micropipette | SOCOREX | ACURA 821. 200-1000ML | SWIS |
| pH-mètre | WTW | WTW.D-82362. PH 1970. | GERMANY |
| Spectrophotomètre | SHIMADZU | UV-MINI-1240.UV-VIS SPECTROPHOTOMETRE | CHINA |

II.3.3.- Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour réaliser les différents tests sont :

II.3.3.1.- Milieu de culture utilisé pour l'isolement de *Lactobacillus*

La gélose MRS (de Man, Rogosa et Sharpe) (Annexe I) est utilisée pour la culture et le dénombrement des *Lactobacillus* dans les produits laitiers et les autres produits alimentaires. Ce milieu permet de cultiver des germes à croissance ralentie tels que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus fermentum*. Acidifié à pH 5,4, il permet également de dénombrer *Lactobacillus bulgaricus* dans les yaourts (Biokar Diagnostics, 2009) (HOQUE et al., 2010).

II.3.3.2.- Milieux de culture pour réaliser les tests de tolérance à l'NaCl

Le milieu MRS sous forme bouillon est utilisé pour tester la tolérance de la bactérie à le NaCl (HOQUE et al., 2010).

II.3.3.3.- Milieu de culture utilisé pour l'étude de type fermentaire

Le milieu MRS sous forme bouillon est utilisé pour étudier le type fermentaire ; homo et hétérofermentaire (SQUID, 2011).

II.3.3.4.- Milieux de culture pour réaliser les tests de croissance

Les tests de croissance sont effectués dans des milieux MRS sans glucose sous forme bouillon additionnés de sources carbonées à tester.

Milieux MRS sous forme bouillon avec glucose comme témoin de croissance (GENESTIE, 2006).

Milieux MRS sans glucose sous forme bouillon avec le lactulose est utilisé comme témoin prébiotique (GENESTIE, 2006).

II.4.- Méthodes

II.4.1.- Isolement des souches probiotiques

Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO/WHO, 2002). Dans le lait cru et les produits laitiers tels que les fromages, yaourts et laits fermentés, les lactobacilles sont naturellement présents (HOQUE, 2010).

L'isolement de la souche probiotique « *Lactobacillus sp.* » est effectué à partir de yaourt "Dialna" en utilisant la méthode d'ensemencement dans la masse de gélose MRS.

Après avoir fondu le flacon qui contient la gélose MRS dans le bain marie à 90°C et laissé refroidir jusqu'à une température près de 45°C (pour maintenir le milieu gélosé en surfusion), et à l'aide d'une pipette graduée est prélevée 1mL du liquide superficiel de yaourt et on le disperse au fond d'une boîte de Pétri, puis le milieu de culture en surfusion est ensuite coulé par-dessus (MEYER et *al.*, 2004), en respectant les conditions d'asepsie (le coulage se fait dans la zone de stérilisation du bec bunsen sur la paillasse préalablement nettoyée et désinfectée ; avec la stérilisation du col de flacon). Après homogénéisation de la culture par un simple mouvement circulaire horizontal, la boîte ensemencée est étuvée à 37°C et la lecture se fait après 24 heures d'incubation. Cette méthode est utilisée pour isoler les germes anaérobies ou lorsque l'on veut réaliser une culture en anaérobiose (BONNEFOY et *al.*, 2002).

II.4.2.- Identification

L'identification est pour but de déterminer l'espèce de la bactérie et sa place dans la taxonomie pour avoir une idée de ces caractéristiques.

II.4.2.1.- Moyens d'identification des bactéries

Contrairement aux animaux et aux végétaux, la morphologie des microorganismes est en général simple pour permettre une identification fiable et pour servir de base à une bonne classification ; cependant avec une caractérisation rigoureuse par une approche phénotypique ou phylogénétique permet de les différencier malgré leurs apparences très similaires :

➤ L'approche phénotypique utilise une combinaison des caractères culturels (milieux, températures ...), des caractéristiques morphologiques (aspect, coloration de gram ...), des propriétés physiologiques (types respiratoires) et des propriétés biochimiques (activités

enzymatiques simples : catalase et oxydase, activités enzymatiques métaboliques ...) comme clé d'identification (LABANOWSKI, 2004).

➤ L'approche phylogénétique repose sur des techniques de biologie moléculaire, Ces techniques se basent sur la spécificité des acides nucléiques, ont révolutionné la taxonomie en partant du principe qu'il existe des séquences conservées pour un domaine (*Eucarya*, *Eubacteria* et *Archaea*), et La molécule la plus étudiée est généralement L'ARNr 16S, car elle est plus facile à analyser que 23S et plus riche en information que 5S ; en effet L'ARNr 16S contient 1500 nucléotides contre 120 et 2900 pour des ARNr respectivement 5S et 23S. Cependant l'identification d'une telle quantité d'information génétique nécessite des techniques d'études appropriées : hybridation par des sondes nucléiques ou séquençage de l'ADN....ce qui nous ayant conduit à choisir la 1^{ère} approche (LABANOWSKI, 2004).

II.4.2.1.1.- Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées.

Une colonie est l'amas de cellules, visible à l'œil nu, constitué des milliards de descendants d'une seule cellule bactérienne et dont la taille, la forme, la couleur, la consistance sont caractéristiques de chaque espèce ; L'étude de l'aspect nécessite l'observation à l'œil nu. La description se fait comme la suite :

- La taille : approximative en millimètre;
- la forme : caractérisée par l'allure des contours qui peuvent être lisses, dentelés, déchiquetés. La surface (forme en relief) peut être bombée ou plate. Le centre est parfois surélevé, parfois « Ombiliqué » ou « creux »;
- l'aspect de la surface : qui peut être lisse, brillant (type S «smooth» : lisse), rugueux ou mate (type R «rough»: rugueux);
- la coloration : la plupart des colonies n'ont pas de couleur définie. Elles sont jaunâtres, grisâtres, ou blanchâtres mais certaines élaborent un pigment qui donne à la colonie une teinte franche : jaune, rouge, violette ; parfois le milieu lui-même se colore, cas fréquent d'un pigment bleu-vert. La pigmentation est un caractère d'identification important ;
- la consistance : les colonies peuvent avoir un aspect muqueux comme elles peuvent être filantes, grasses, crémeuses (qui se mettent facilement en suspension) sèches, pulvérulents (qui se dissocieront mal dans l'eau) (SIBOUKEUR, 2011) ;

- l'opacité : les colonies sont dites opaques si elles ne laissent pas passer la lumière, translucides si elles laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, transparentes, si elles laissent passer la lumière et on voit les formes au travers (SIBOUKEUR, 2011).

II.4.2.1.2.-Examen microscopique

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce microbienne. Elle comprend :

- ✓ L'examen à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivantes).
 - ✓ L'examen après coloration (le plus souvent sur frottis séchés et fixés). Il s'effectue sur un frottis bactérien, préparé à partir des colonies suspectes, fixé et coloré par coloration différentielle type Gram (Annexe II) (TABAK et BENSOLTANE, 2012). L'observation microscopique réalisée à l'aide d'un microscope optique avec un objectif de grossissement 100 en utilisant l'huile à immersion. Il permet d'observer sur les cellules vivantes:
1. la forme des cellules : qu'on peut distinguer
 - une forme sphérique : les cocci (ordres de Micrococcales)
 - une forme allongée en bâtonnet : les bacilles (ordre des Bactériales)
 - une forme intermédiaire : les coccobacilles
 - une forme incurvée en virgule (vibrio) ou en ondulation (ordre des Spirillales)
 - une forme spiralée (ordre des Spirochaetales)
 - une forme ramifiée (ordre des Actinobactériales).
 2. leur mode de groupement.
 3. de diviser les bactéries en deux grands groupes taxonomiquement différents:
 - bactéries Gram-positives : Gram +
 - bactéries Gram-négatives : Gram -

Les bactéries qui retiennent le colorant basique utilisé (cristal-violet) après lavage à l'alcool sont dites Gram-positives, celles qui ne le retiennent pas sont dites Gram-négatives.

Les bactéries Gram-négatives peuvent prendre la couleur d'un second colorant. Leur paroi ne présente pas de barrière de perméabilité à l'éluion du complexe colorant-mordant par l'alcool. La paroi des bactéries Gram positif est imperméable au complexe colorant-mordant, elles ne sont pas décolorées.

II.4.2.1.3.- Test d'endospores

Les bactéries appartenant à certains genres, notamment le genre *Bacillus* et le genre *Clostridium*, sont capables de former des endospores. Les bactéries sporulées subissent un cycle de différenciation en réponse aux conditions d'environnement : en l'absence d'aliments, une spore se forme à l'intérieur de chaque bactérie et est libérée lorsque la bactérie s'autolyse.

La spore est une cellule bactérienne au repos, hautement résistante à la dessiccation, à la chaleur et aux agents chimiques. Quand des conditions favorables se manifestent de nouveau, la spore germe et redonne une bactérie identique à celle qui lui a donné naissance. La spore est donc une forme de résistance aux conditions défavorables de vie, avec conservation de toutes les aptitudes génétiquement déterminées (LABANOWSKI, 2004).

II.4.2.1.3.1.- Principe

L'examen macro et microscopique ne sont pas suffisant pour distinguer entre les bactéries du genre *Lactobacillus* et *Bacillus* vu la large ressemblance, ce test permet de le faire par la mettre en évidence des spores (HART et SHEARS, 1996). Il consiste à soumettre la souche bactérienne à étudier dans des conditions défavorable comme la température élevée, pour donner l'aptitude de sporuler. Les espèces de *Bacillus* sont des bacilles à Gram positif sporulés (ABEE, 2010) (MAUGHAN, 2011), mais les *Lactobacillus* sont asporulés (COULIBALY, 2010).

II.4.2.1.3.2.- Mode opératoire

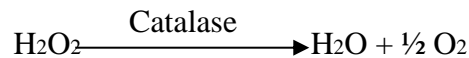
- Préparer une suspension bactérienne dans un tube à essai ;
- Mettre le tube dans le bain marie à une température qui tue les bactéries et ne détruit pas les spores (généralement ne dépasse pas les 100 °C) pendant 30 minutes à une heure ;
- Prendre quelques gouttes de cette suspension et l'ensemencer sur le milieu MRS ;
- La lecture sur milieu MRS se fait après 48 heures d'incubation à 37°C (BONNEFOY et al., 2002).

II.4.2.1.4.- Test de catalase

II.4.2.1.4.1.- Principe

Le test de catalase est utilisé pour détecter la présence de l'enzyme catalase. La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en oxygène gazeux

et en eau (ALLEN et *al.*, 1997), un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (SIBOUKEUR, 2011) suivant la réaction :



II.4.2.1.4.2.- Méthode

Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase (TABAK et BENSOLTANE, 2012).

II.4.3.- Purification d'isolat

Les bactéries, bâtonnets, gram-positives, catalase négative; ne produisant pas de dégagement d'oxygène lorsqu'elles sont dissociées sur une goutte d'eau oxygénée, sont retenues comme étant des bactéries lactiques (SAKILI et ISSOUAL, 1996). Après isolement de germe recherché des repiquages successifs ont été effectués sur la gélose MRS, avec une incubation à 37°C pendant 48 heures, 4 ou 5 fois jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches (OLLIVIER, 1987). L'identification précise est effectuée par les tests biochimiques.

II.4.4.- Tests biochimiques

Les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, il n'en demeure pas moins qu'ils sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines espèces et sous-espèces des bactéries. Grâce à ces tests, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées.

II.4.4.1.- Etude de types fermentaires

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle, elles sont hétérotrophes tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose,

ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose) (HADEF, 2012).

II.4.4.1.1.- Principaux types fermentaires des bactéries lactiques

Selon les espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres :

- La voie homofermentaire (voie d'Embden Meyerhof Parnas) emprunte la glycolyse dans sa totalité (du glucose-6-P jusqu'au pyruvate) et conduit en condition optimale de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose. Le métabolisme est qualifié d'homolactique lorsqu'au moins 90% du glucose consommé est converti en lactate. En condition de croissance non optimale (par exemple en limitation de carbone ou sur certains sucres), le métabolisme des bactéries homofermentaires peut se diversifier vers un métabolisme appelé mixte, avec production, en plus du lactate, de formiate, de CO₂, d'acétate et d'éthanol (ROUSSEAU, 2004).
- La voie hétérofermentaire emprunte la partie oxydative de la voie des pentoses-phosphate à partir du glucose-6-phosphate conduisant à la formation de xylulose-5-phosphate. Ce dernier peut être converti en éthanol ou acétate, et peut rejoindre la glycolyse pour être converti en acide lactique. La voie hétérofermentaire conduit à la production d'un lactate, d'un éthanol, d'un CO₂ et d'un ATP par mole de glucose (ROUSSEAU, 2004).

II.4.4.1.2.- Mode opératoire

Le test adopté pour étudier le type fermentaire de la souche isolée ressemble à celui utilisé pour déterminer le type métabolique, qui permet de différencier les bactéries qui ont le type de métabolisme fermentaires de celles qui ont le type oxydatif, il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂) ; mais lorsque les bactéries lactiques ont un métabolisme exclusivement fermentaire (HADEF, 2012) on a l'utilisé pour déterminer le type fermentaire (homo et hétérofermontaire).

Pour cela, 10 ml de milieu MRS liquide sont versé dans 3 tubes à essais contenant des cloches de Durham renverser pour assembler le gaz produit par la fermentation bactérienne si elle aura lieu, puis les tubes sont stérilisé pendant 20 minutes à 120°C. Après la stérilisation, les tubes sontensemencés, une colonie par tube d'une préculture à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Après homogénéisation et d'être sûr que les ne contiennes pas des bulles d'air ; l'ensemencement est suivi d'une incubation pendant 2 jours à 37°C (SOUID, 2011).

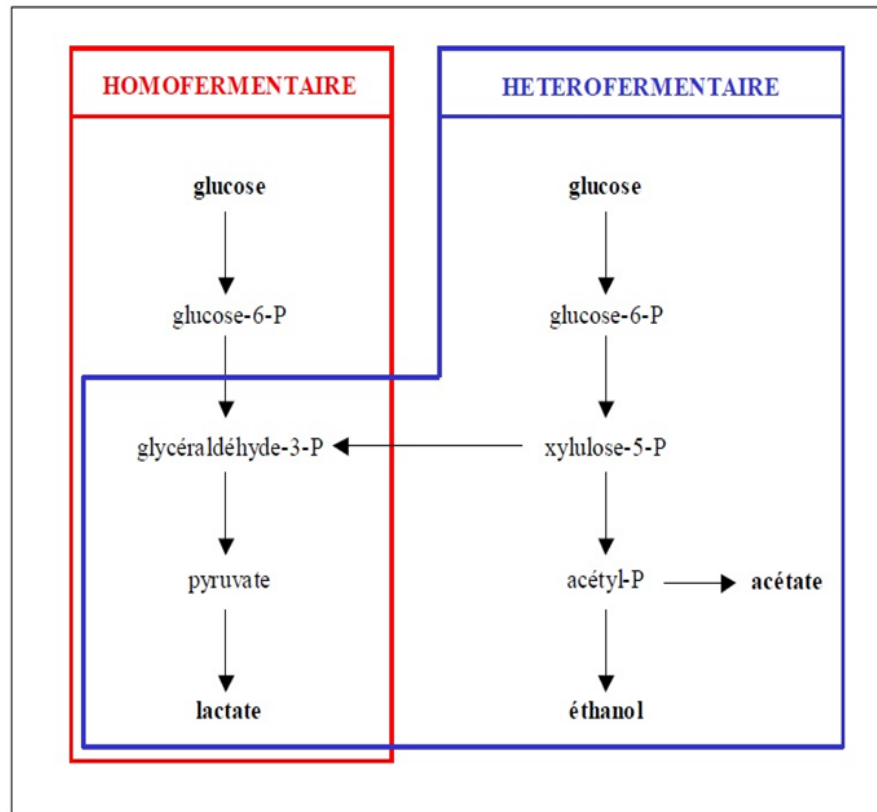


Fig. 4 : Voies homofermentaire et hétérofermentaire simplifiées (ROUSSEAU, 2004).

Le métabolisme homofermentaire se traduit par l'absence de gaz et les cloches restent au fond des tubes. Le flottement des cloches signifie la présence des gaz et un métabolisme hétérofermentaire.

II.4.4.2.- Pouvoir coagulant et acidifiant

Pour réaliser ce test, 100 ml du lait écrémé stérile a été inoculé par 3ml de ferment. Après une incubation à 37°C pendant 24h, on mesure le volume de lactosérum exsudé et on note l'aspect du coagulum obtenu (BOURGEOIS et LEVEAU, 1991).

II.4.4.3.- Identification par la galerie API 20 C Aux

Dans toutes les étapes précédentes on a pu identifier la bactérie isolée jusqu'au niveau du genre. Avec les systèmes API on peut identifier même l'espèce, cependant il existe plusieurs types de galerie d'identification API et selon le type de galerie, l'inoculum et le milieu de suspension varie.

II.4.4.3.1.- Galeries d'identification, système API

II.4.4.3.1.1.- Principe

Les galeries d'identification utilisent le même principe que les techniques biochimiques conventionnelles d'identification des bactéries. Elles se présentent sous forme de cupules prêtes à l'emploi contenant le substrat lyophilisé nécessaire aux différents tests biochimiques ; le microorganisme à tester est mis en suspension dans le milieu puis inoculé avec chaque test biochimique à étudier. Pendant l'incubation, le catabolisme des substrats lyophilisés conduit à des acides organiques (cas des glucides) ou autre substances qui provoquent le virage de l'indicateur coloré. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique permettant l'identification du microorganisme à l'aide du logiciel d'identification.

II.4.4.3.1.2.- Galerie d'identification du genre *Lactobacillus* et germes apparentés

Chaque galerie est spécialisée pour identifier une famille microbienne ou un genre dans une famille ou même une espèce précise ; c'est le fabricant qui rattache une liste des espèces propre pour chaque galerie.

L'identification du genre *Lactobacillus* et germes apparentés est effectué en principe avec la galerie API 50 CH ; elle permet l'étude de la fermentation des 49 sucres et l'identification de plus de 50 espèces (bioMérieux® SA. Ref 50 410, 2007).

Le rendu des résultats repose sur le principe de l'identification numérique, il repose sur le calcul pour le profil observé :

- De sa proximité relative aux différents taxons de la base de données (% id) ;
- De sa proximité au profil le plus typique dans chaque taxon (indice T). Il reflète le nombre de tests atypiques par rapport à l'espèce étudiée. Les seuils retenus sont :
- Excellente identification si $T > 0,75$;
- Très bonne identification $T < 0,5$;
- Bonne identification $T < 0,25$;

Cette méthode est facile à appliquer et ses résultats sont obtenus dans un bref délai. Comme il est bien connu du diagnostic des espèces peuvent être attendus elle est particulièrement utile à des fins cliniques. Cependant, pour l'identification de nouveaux isolats

de nature les résultats obtenu par ces tests peuvent être trompeuses car il y a une forte probabilité de détection une nouvelle espèce, qui n'a pas été inclus dans la base de ces systèmes, mais possède un profil d'utilisation de substrat similaire à celui utilisé par une souche au sein de la base de données (BUSSE et *al.*, 1996).

II.4.4.3.1.3.- Mode opératoire

La galerie qu'on a utilisé pour identifier notre germe est la galerie API 20 C AUX, cette micro galerie est utilisée pour l'identification des levures, celle-ci permettent d'effectuer 19 tests d'assimilation qui sont les tests suivants :

Tableau V - Composition de la galerie API 20 C AUX

| TESTS | SUBSTRATS | QTE(mg/cup.) |
|-------|------------------------------------|--------------|
| 0 | Aucun | - |
| GLU | D-GLUcose | 1,2 |
| GLY | GLYcérol | 1,2 |
| 2KG | calcium 2-céto-Gluconate | 1,2 |
| ARA | L-ARAbinose | 1,2 |
| XYL | D-XYLose | 1,2 |
| ADO | ADOnitol | 1,2 |
| XLT | XyLiTol | 1,2 |
| GAL | D-GALactose | 1,9 |
| INO | INOsitol | 2,36 |
| SOR | D-SORbitol | 1,2 |
| MDG | Méthyl- α D-Glucopyranoside | 1,2 |
| NAG | N-Acétyle-Glucosamine | 1,2 |
| CEL | D-CELLobiose | 1,2 |
| LAC | D-LACTose (origine bovine) | 1,2 |
| MAL | D-MALtose | 1,2 |
| SAC | D-SACcharose | 1,2 |
| TRE | D-TREhalose | 1,2 |
| MLZ | D-MÉLÉZitose | 1,2 |
| RAF | D-RAFFinose | 1,9 |

Il est bien que tous ces tests existent aussi dans la galerie API 50 CH, ce qui nous permet ultérieurement d'interpréter les résultats obtenues par cette galerie à l'aide du logiciel d'identification selon la galerie API 50 CH.

II.4.4.3.1.3.1.- Préparation de milieu de culture

Le milieu utilisé pour la préparation de l'inoculum est le milieu MRS reconstitué sans glucose additionné d'une quantité adéquate du bleu de bromothymol comme indicateur coloré. Le milieu est reconstitué comme suite ;

- Peser 0.17 mg du bleu de bromothymol et ajouter 10 ml du milieu sans glucose ;
- Prélever 100 µl de cette préparation avec une micropipette et diluer dans 9.9 ml du milieu MRS sans glucose et sans indicateur ;
- Stériliser à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C ;

Donc, On obtient 10 ml de milieu conforme à celui fournie par le fabricant.

II.4.4.3.1.3.2.- Inoculation de la galerie

Pour créer un atmosphère humide, toutes les alvéoles du fond de la boîte sont rempli par l'eau distillée, puis on place la galerie sur le fond de la boîte, par la suite le milieu stérile est inoculé par l'ajout d'une colonie à l'un des tubes, et le tube est homogénéisé par agitation, puis la galerie estensemencé avec une pipette Pasteur stérile ouverte chargée en suspension, pointe posée sur un côté de la cupule, en laissant couler doucement la suspension dans la cupule et tenant la boîte légèrement inclinée pour éviter la formation de bulles, en fin recouvrir la boîte avec son couvercle et l'incuber à 37°C. La lecture se fait après 48 heures.

Les lactobacilles poussent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant, on a recherché dans chaque cupule l'acidification produite par le germe qui se traduit par le virage au jaune du bleu de bromothymol contenu dans le milieu et le test considéré comme positif. L'identification est obtenue à l'aide du logiciel d'identification apiweb™ (Annexe III).

II.4.5.- Aptitudes probiotiques

Afin de fournir des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, les bactéries probiotiques doivent survivre dans le tractus gastro-intestinal, et tolérant l'acide, la bile et les enzymes gastriques, puis adhèrent et colonisent l'épithélium intestinal, et les aliments qu'ayant un pH approprié (> 5) et un pouvoir tampon élevé peuvent augmenter le pH du tractus gastrique et améliorer ainsi la stabilité des probiotiques et peuvent également offrir une certaine protection aux probiotiques en réduisant leur exposition physique à l'environnement gastro-intestinale sévère.

Il est clair que, la capacité de la tolérance à l'acidité et à les sels biliaires et de s'adhère à la muqueuse intestinal sont des considérations essentielles dans l'évaluation d'efficacité des organismes probiotiques, et comme tel, il y a eu de nombreuses études in vitro de ces propriétés fonctionnelles des potentiels probiotiques avant l'incorporation dans les aliments porteurs (RANADHEERA, 2012).

II.4.5.1.- Test de résistance à l'acidité

Pour déterminer la résistance de la souche isolée à l'acidité, deux tubes à essai contenant 10 ml de milieu MRS liquide ajusté à différentes valeurs de pH (4,5 et 6,5) par une solution d'acide chlorhydrique et à l'aide de pH mètre. Les tubes préparés sont stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 121 °C. Après la stérilisation et à l'aide d'une pipette pasteur stérile, on ensemence chaque tube par une colonie d'une préculture (d'un âge de 24 à 48 heures) puis les tubes sont incubés dans l'étuve à 37 °C. L'habilité à croître sur les deux milieux est observée pendant 2 à 3 jours d'incubation (BADIS *et al.*, 2005).

II.4.5.2.- Test de tolérance à l'NaCl

Pour déterminer la tolérance de la souche à l'NaCl, 3 tubes à essai contenant bouillon MRS sont ajustés avec différentes concentrations de NaCl (2%, 4%, 6,5%). Après stérilisation, chaque tube à essai est inoculé avec une colonie de lactobacilles d'une préculture et incubé à 37°C pendant 24 heures. Après 24 heures d'incubation, leur croissance est déterminée par l'observation de leur turbidité. Une croissance maximale est désignée comme double signe positif (+ +), une croissance normale comme un seul signe positif (+) et une croissance nulle comme un seul signe négatif (-) (HOQUE *et al.*, 2010).

II.4.6.- Contrôle des effets d'oligosaccharides sur la souche probiotique

Du fait du métabolisme des bactéries lactiques et des différentes enzymes digestives, les prébiotiques ne peuvent pas être de nature protéinique ou lipidique mais plutôt glucidique. La majorité des prébiotiques sont des oligosaccharides (enchaînement de 2 à 20 résidus de pentose ou d'hexose) (ROUSSEAU, 2004).

La plupart des prébiotiques employés à ce jour sont des composants naturels de nombreux produits alimentaires végétaux et un grand nombre d'entre eux sont désormais

commerciallement disponibles comme composants alimentaires pour les alicaments (Tableau VI).

Tableau VI - Principaux oligosaccharides commerciallement disponibles (HOLM, 2001)

| Oligosaccharides | Production, tonnes (1995) |
|-----------------------------------|---------------------------|
| Fructo-oligosaccharides (FOS) | 12 000 |
| Galacto-oligosaccharides (IOS) | 15 000 |
| Isomalto-oligosaccharides (IOS) | 11 000 |
| Xylo-oligosaccharides (XOS) | 300 |
| Oligosaccharides de soja (SOS) | 2 000 |
| Glycosylsucrose (GS) | 4 000 |
| Lactosucrose (LS) | 1 600 |
| Lactulose (LA) | 20 000 |
| Palatinose-oligosaccharides (PAO) | 5 000 |
| Malto-oligosaccharides (MOS) | 10 000 |

De nombreuses publications scientifiques ont documenté les effets prébiotiques d'un grand nombre des oligosaccharides mentionnés dans le Tableau VI (par exemple, FOS, GOS, LA, IOS, SOS, XOS), mais ce sont les fructo- oligosaccharides (FOS) dont les effets ont été les mieux démontrés par les études d'intervention chez l'homme (HOLM, 2001)

II.4.6.1.- Test de croissance

II.4.6.1.1.- Préparation des extraits végétaux

L'extraction des polysaccharides à partir des plantes spontanées à caractère médicinale est préalablement effectué (BOUAL et *al.*, 2012). L'hydrolyse partielle de ces polysaccharides avec l'acide Trifluoroacétique à 0.5N, a donné des oligosaccharides qu'on veut contrôler leurs effets prébiotiques sur la souche.

- Peser 50 mg de chaque extrait et faire l'hydrolyse avec 1 ml de l'acide Trifluoroacétique 0.5N ;
- Placer les milieux réactionnelles dans le bain marie réglé à 60°C pendant 30 minutes ;
- Après l'hydrolyse, verser les hydrolysats dans des petites biotes de pétri en verre ;
- Placer les boites dans l'étuve pour accélérer l'évaporation de l'acide.

II.4.6.1.2.- Préparation de milieu de culture

Les tests sont effectués en milieu MRS liquide reconstitué sans glucose en substituant le glucose par la source carbonée dont on souhaite étudier l'effet sur la croissance du probiotique, en raison de 1% (w/v). La préparation est comme suite :

- Ajouter 1 ml de milieu MRS sans glucose à 50 mg d'hydrolysats des polysaccharides de chaque extrait (*Urginea noctiflora*, *Astragalus armatus*, *Plantago notata*) pour les dissoudre ;
- Verser ces solution dans 3 tubes et compléter jusqu'à 5 ml par l'ajout de 4 ml du milieu MRS sans glucose ; on obtient une concentration finale d'environ 1% ;
- Dans le 4^{ème} tube, ajouter 75µl du sirop lactulose « control positif» à 5 ml du milieu MRS (Annexe IV) ;
- Le 5^{ème} tube est considéré comme témoin de croissance contient 5 ml de MRS avec glucose) ;
- La stérilisation de ces tubes s'effectue à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C (GENESTIE, 2006).

II.4.6.1.3.- Suivi de croissance

Après qu'on a préparé les milieux de cultures au laboratoire de l'université ; on a réalisé ce test au niveau de laboratoire IBEN ROCHD à Ghardaïa en raison de sa disponibilité pour suivre le protocole expérimental.

L'inoculation est effectué par l'ensemencement d'une colonie à partir d'une préculture dans chaque tube à l'aide d'un fil d'ensemencement stérilisé, puis les tubes sont homogénéisé par agitation manuel jusqu'à la dissolution complète de la colonie ; en respectant toujours les conditions d'asepsie pendant toutes les manipulations.

Le suivi de la croissance est fait par la mesure de la densité optique à 620 nm de chaque tube pendant 24 heures à un intervalle de temps régulier (toutes les 5 heures) et une dernière mesure est effectuée après 48 heures, par un spectrophotomètre UV-VIS.

Cette méthode est utilisable uniquement si:

- La suspension est diluée.
- Les bactéries sont libres en solution et ne pas former d'agrégats importants.

➤ Principe de détermination de la concentration bactérienne par spectrophotométrie

Des techniques plus sensibles et plus rapides sont basées sur le fait que les cellules bactériennes dispersent la lumière incidente. Comme dans une population bactérienne, les

cellules ont approximativement la même taille, la quantité de lumière diffractée est proportionnelle à la concentration en cellules. Lorsque la concentration en bactéries atteint 10^7 cellules/ml, le milieu apparaît légèrement trouble. Une augmentation supplémentaire de la concentration donne une plus grande turbidité et il y a moins de lumière transmise à travers le milieu. L'importance de la diffraction de la lumière est mesurée dans un spectrophotomètre est toujours linéaire en fonction de la concentration bactérienne à des valeurs faibles d'absorbance (PRESCOTT *et al.*, 2003).

➤ **Prélèvements et mesure de densité optique**

Pour établir le blanc de la culture, environ 500 μ l sont prélevé avec une seringue stérile de chaque tube avant l'ensemencement pour effectuer la première mesure à la longueur d'onde 620 nm, en utilisant une cuve semi-micro lavé à l'eau distillée avant chaque mesure.

Pour déterminer la charge initiale de la culture, juste après l'ensemencement et homogénéisation des tubes, à l'aide d'une seringue stérile de 5ml environ 500 μ l sont prélevé de chaque tube et dans la même longueur d'onde initiale les mesures sont effectuées qui corresponde à T_0 ; ensuite les tubes sont placé dans l'étuve à 37°C en aérobiose (GENESTIE, 2006). Après chaque 5 heures on suit les mêmes étapes ; homogénéisation, prélèvement et de mesure.

Après 48 heures de suivi, les milieux de cultures sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes puis le surnageant est récupéré et congelé dans des petits tubes.

II.4.6.2.- Mesure de pH de milieux

➤ **Le pH-mètre**

Le pH permet de déterminer l'acidité d'une solution. Le dispositif de mesure utilisé est le pH-mètre, c'est un dispositif qui permet de déterminer avec exactitude le pH d'une solution en immergeant l'électrode dans la solution inconnue. Les électrodes en verre sont couramment utilisées pour la mesure du pH des produits laitiers. Ces électrodes ont une bonne sélectivité vis-à-vis des protons H^+ . Elles permettent des mesures directes de l'échantillon sans une préparation préalable de celui-ci (GBASSI, 2010).

➤ **Prélèvements et mesure de pH**

Du fait du processus de fermentation bactérienne (bactéries du côlon, probiotique parmi eux) de certains constituants des fibres conduit à la formation de nombreux produits qui jouent un rôle dans la physiologie du gros intestin et dans le métabolisme, parmi eux les

acides gras à courtes chaînes (AGCC) font partie des substances bénéfiques les mieux identifiées ; diminuent le pH et altèrent ainsi l'équilibre de la flore intestinale du côlon. Leur nature dépend de celle des polysaccharides fermentés (GENESTIE, 2006).

Pour but d'estimer la quantité des acides gras produites par la souche probiotique, mesurer l'acidité des milieux de culture à l'aide d'un pH-mètre (OUHSSINE et *al.*, 2006). Prélever environ 1 ml de chaque milieu ; en utilisant le bouchon d'un tube à vis lavé avec l'eau distillée et séché avant chaque mesure, comme récipient et à l'aide d'un pH-mètre mesurer leurs acidités à la température 27°C.

II.4.6.3.- Dosage de l'acide lactique

Le dosage d'acide lactique produit par la fermentation des sources carboniques est effectué par Titration acido-basique colorimétrique avec une solution de NaOH. Le principe d'un dosage colorimétrique repose sur le changement de couleur de l'indicateur coloré au point d'équivalence ; on considère qu'un indicateur coloré convient pour un dosage si le pH du point d'équivalence est situé dans sa zone de virage (DUMAS et GEDEON, 2003), on peut utiliser la Phénolphthaléine pour détecter le point d'équivalence d'un titrage acide faible-base forte (ATKINS et JONES, 1998). Les concentrations $C_{\text{échantillon}}$ et C_{NaOH} ainsi que les volumes $V_{\text{échantillon}}$ et V_{NaOH} sont reliés entre eux par la relation suivante:

$$C_{\text{échantillon}} \cdot V_{\text{échantillon}} = C_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} \text{ (à l'équivalence)}$$

Avec « C » est la concentration et « V » est le volume. La relation précédente permet d'en déduire la concentration d'échantillon « $C_{\text{échantillon}}$ ».

➤ **Mode opératoire**

- Placer la solution de NaOH au 0.1 mol.L⁻¹ dans la burette ;
- Ajuster la burette à zéro ;
- Dans l'erlen contenant 10 ml d'échantillon dilué à 1/9, ajouter 3 gouttes de Phénolphthaléine (solution à 5% dans l'éthanol) ;
- Mettre sous agitation ;
- Verser doucement la solution de NaOH jusqu'à apparition d'une coloration rose persistant plus de 30 s ;
- Relever le volume versé (noté V en ml) ;

La concentration des échantillons exprimée en mol.L⁻¹ est calculée avec la relation suivante :

$$C_{\text{échantillon}} = (C_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}) / V_{\text{échantillon}}$$

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1.- Identification de la souche probiotique isolée**III.1.1.- Critères morphologiques**

L'étude de la morphologie bactérienne est le premier acte effectué pour identifier une bactérie. Elle comprend une caractérisation macroscopique et microscopique.

III.1.1.1- Caractérisation macroscopique

La caractérisation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité).

Les souches isolées produisent sur milieu MRS solide à pH 6,5 après 24 heures d'incubation à 37°C des petites colonies de forme ronde, de couleur blanche à crème, avec une surface lisse et pâteuse et un pourtour régulier (fig. 5). Ces critères macroscopiques de *lactobacillus* ont été obtenus aussi par MAMI en 2013 et BADIS et *al* en 2005.

III.1.1.2.- Caractérisation microscopique

L'examen microscopique révèle que les souches testées sont GRAM positif, présentent une forme cellulaire en bâtonnet, isolés ou réparties en paires (fig. 6). Ces critères microscopiques de *lactobacillus* selon MAMI en 2013.

Les résultats des examens microscopiques et macroscopiques de la souche isolée sont illustrés dans le tableau VI.

III.1.2.- Critères physiologiques et biochimiques

Les critères biochimiques et physiologiques sont basés sur des tests biochimiques (test de catalase) et physiologiques (test de tolérance de NaCl, test de résistance à l'acidité). Pour le test d'endospore, la souche isolée incapable de former des colonies sur milieu MRS après 48 heures d'incubation, qui indique que la souche asporulée. Le test de catalase révéler une réaction négatif (absence de bulles de gaz), alors que la souche isolée est dénuée de catalase.

Pour le test d'étude de type fermentaire, on note l'existence de bulle de gaz au fond des cloches, qui signifie que la souche utilise la voie hétérofermentaire dans leur métabolisme (fig.7). Ce qui concerne la tolérance de NaCl, une bonne croissance est observé en présence

de 2% de NaCl, une croissance normale en présence de 4% et nulle en présence de 6,5% de NaCl (fig.8).

Tableau VII - Caractères macroscopique et microscopique de la souche isolée

| Examen Macroscopique | |
|------------------------------|---------------------------------|
| Forme des colonies | Ronde |
| Taille (mm) | Des petite colonies environ 1mm |
| Couleur | Blanche à crème |
| Consistance | Pâteuse |
| Contour | Régulier |
| Surface | Lisse |
| Opacité | Opaque |
| Relief | Plate |
| Examen Microscopique | |
| Forme unitaire | Bâtonnet |
| Détermination Gram | Positif |
| Mode de rassemblement | En paires ou en chainette |



Fig. 5- Colonies de souches isolées sur milieu MRS.



Fig. 6- Aspect des souches isolées sous microscope photonique (Gx100).

En outre, la souche isolée a une bonne capacité de survie en milieu acide (pH 6,5, pH 4,5). Les mêmes résultats des tests ont été obtenus par BADIS et *al* en 2005. La croissance en milieu MRS liquide est caractérisée par l'apparition du trouble (fig.9).



Fig. 7 - Type fermentaire

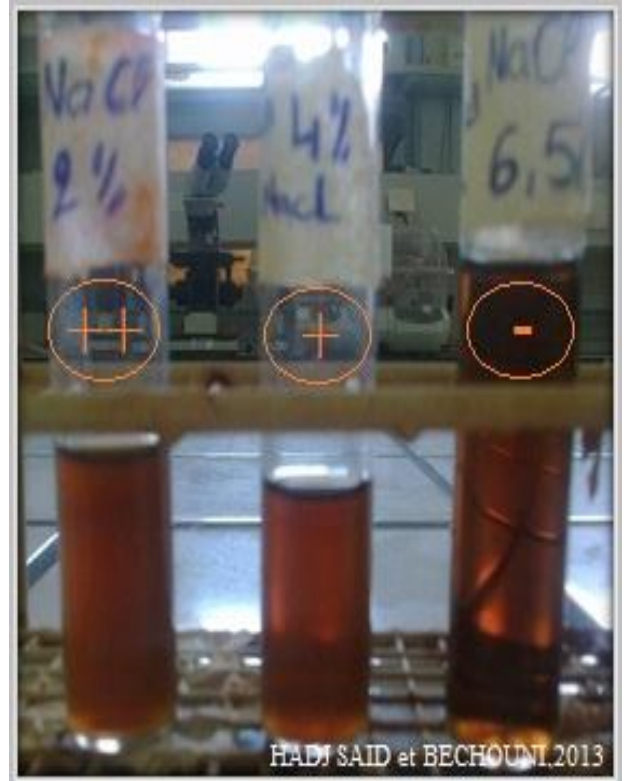


Fig. 8 - Tolérance à la salinité

Le test de coagulation révèle que cette souche est incapable de coaguler le lait, cependant SOUSTRE en 1957, montre que les bactéries lactiques capables de faire la coagulation de lait, c'est principalement l'acide lactique qui joue sur la texture. Au fur et à mesure qu'il s'accumule dans le lait, le pH diminue ce qui déstabilise les micelles de caséines du lait qui finissent par précipiter en formant un gel.

A partir de test API 20 C AUX, on remarque que la souche isolé utilise 6 sources d'énergie, elle fermente le glucose, le L-arabinose, le L-xylose, le N-Acétyl-Glucosamine, D-Maltose et le Calcium 2-céto-Gluconate.

La lecture des résultats de test API 20 C AUX est se fait par logiciel apiweb™, elle permet de déterminer le nom totale de l'espèce.

Le tableau VIII comprend les différents résultats des tests biochimiques et physiologiques classiques et à l'aide des tests de la galerie API 20 C AUX.

Tableau VIII - différents résultats des tests biochimiques et physiologiques classiques et à l'aide des tests de la galerie API 20 C Aux

| Test | | Résultat |
|---|-----|-------------------|
| Test de catalase | | - |
| Etude de type fermentaire | | hétérofermentaire |
| tolérance de NaCl (2%) | | + |
| tolérance de NaCl (4%) | | + |
| tolérance de NaCl (6,5%) | | - |
| résistance à l'acidité de 6,5 à 4,5 | | + |
| Pouvoir coagulant et acidifiant | | - |
| La galerie API 20 C Aux (après incubation à 48 heures) | GLU | + |
| | GLY | - |
| | ARA | + |
| | XYL | + |
| | ADO | - |
| | XLT | - |
| | GAL | - |
| | INO | - |
| | SOR | - |
| | MDG | - |
| | NAG | + |
| | CEL | - |
| | LAC | - |
| | MAL | + |
| | SAC | - |
| | TRE | - |
| MLZ | - | |
| RAF | - | |
| 2KG | + | |

A partir des caractères morphologiques obtenus et les différents résultats des tests biochimiques et physiologiques, on peut identifier la souche isolée comme étant une souche appartenant à l'espèce *lactobacillus brevis*. La même souche a été identifiée par MAMI en 2013.

III.2.- Contrôle des effets d'oligosaccharides sur *lactobacillus brevis*

III.2.1.- Test de croissance

Le suivi de croissance de *lactobacillus brevis*, au cours de la croissance en présence de différentes sources de carbones, se fait par mesure de la densité optique à 620 nm par spectrophotomètre UV-VIS dans chaque milieu MRS.



Fig. 9 - Tolérance à l'acidité

Le 1^{er} milieu MRS testé est un milieu où le glucose considéré comme un source de carbone, Le 2^{ème}, Le 3^{ème} et le 4^{ème} milieux MRS sont des milieux où le glucose dans chaque milieu est substitué par des oligosaccharides issus à l'hydrolyse partielle des polysaccharidiques, ces composées polysaccharidiques a été extraites à partir des espèces végétales médicinale (*Plantago notata*, *Astragalus armatus*, *Urginea noctiflora*), le 1^{er} milieu MRS est un milieu où le glucose est substitué par le lactulose (disaccharide). Le 1^{er} et le 5^{ème} milieu sont considérés comme des témoins, le glucose est un témoin de croissance et le lactulose est un témoin prébiotique.

Il est possible de tracer graphiquement la courbe de croissance, les résultats de mesure de l'absorbance obtenus après chaque 5 heures d'incubation à 37°C en aérobiose sont traduire en graphe (fig. 10)

L'analyse de graphie (fig. 10) qui représente la croissance de la souche de *Lactobacillus brevis* dans différentes sources de carbones montre que la souche est capable d'utiliser tous les oligosaccharides apportés au milieu MRS, mais l'effet de ces dernier est varié l'un de l'autre.

La variabilité de comportements de *Lactobacillus brevis* en fonction d'oligosaccharide ajouté au milieu, est que au début de temps de 0 à 5 heures, on note une augmentation lente de la vitesse de croissance en présence de 3 d'oligosaccharides extrait à partir d'*Urginea noctiflora* et *Plantago notata* et *Astragalus armatus* et lactulose.

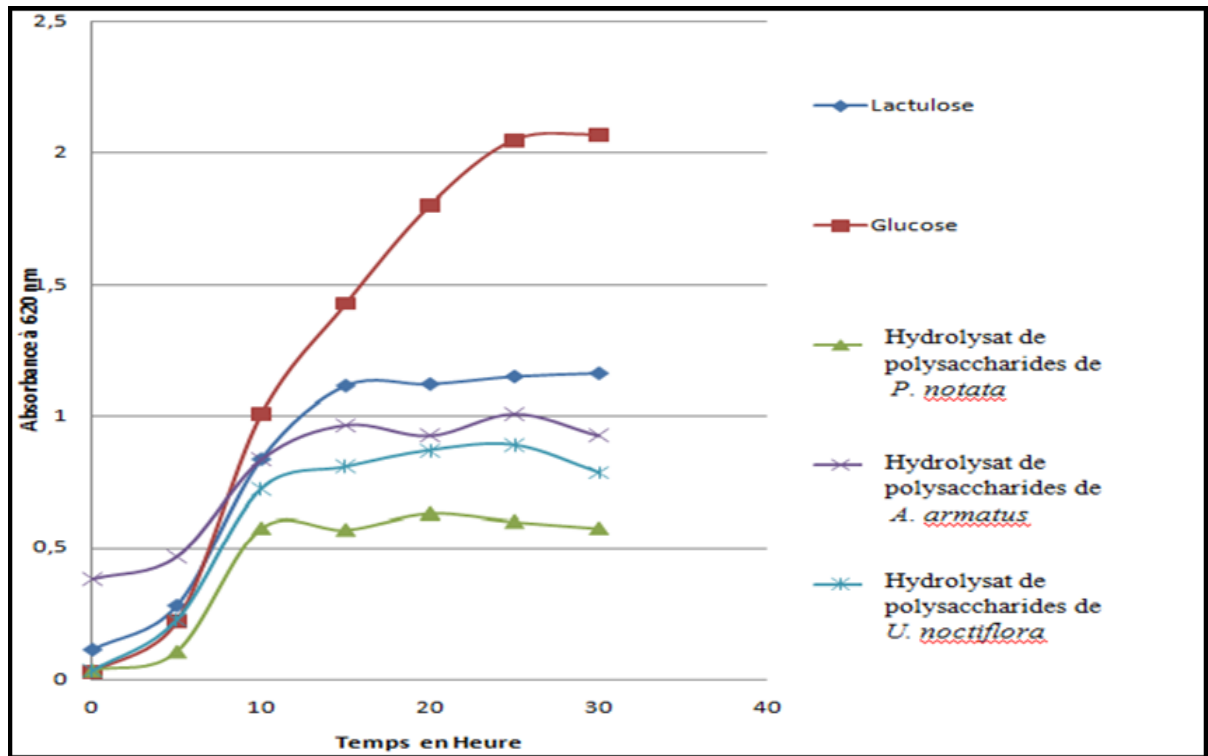


Fig. 10 - Croissance de souche de *Lactobacillus brevis* en présence de différentes sources de carbones (3 extraits polysaccharidiques appartient aux espèces *Urginea noctiflora*, *Astragalus armatus*, *Plantago notata* et glucose, lactulose comme témoin) (incubation à 37°C).

De 5 heures à 15 heures, la vitesse de la croissance de la souche augmente rapidement avec les trois extraits oligosaccharidiques et lactulose.

De 15 heures à 30 heures, on remarque que la vitesse de croissance est presque constante dans des valeurs convergentes pour les trois oligosaccharides et lactulose, elle est plus active avec l'oligosaccharide d'*Astragalus armatus* et moins active avec l'oligosaccharide de *Plantago notata*.

Bien que la croissance de la souche en présence de glucose (témoin de croissance) est significative. Si l'on se réfère aux travaux de GENESITE (2006), le glucose ne peut être considéré comme prébiotique du fait de leur absorption précoce au niveau intestinal et par conséquent de leur indisponibilité pour stimuler la croissance de la flore endogène au niveau du côlon principalement.

III.2.2.- pH de milieux de culture

Les résultats de pH des différents milieux sont présentés dans la (fig. 11)

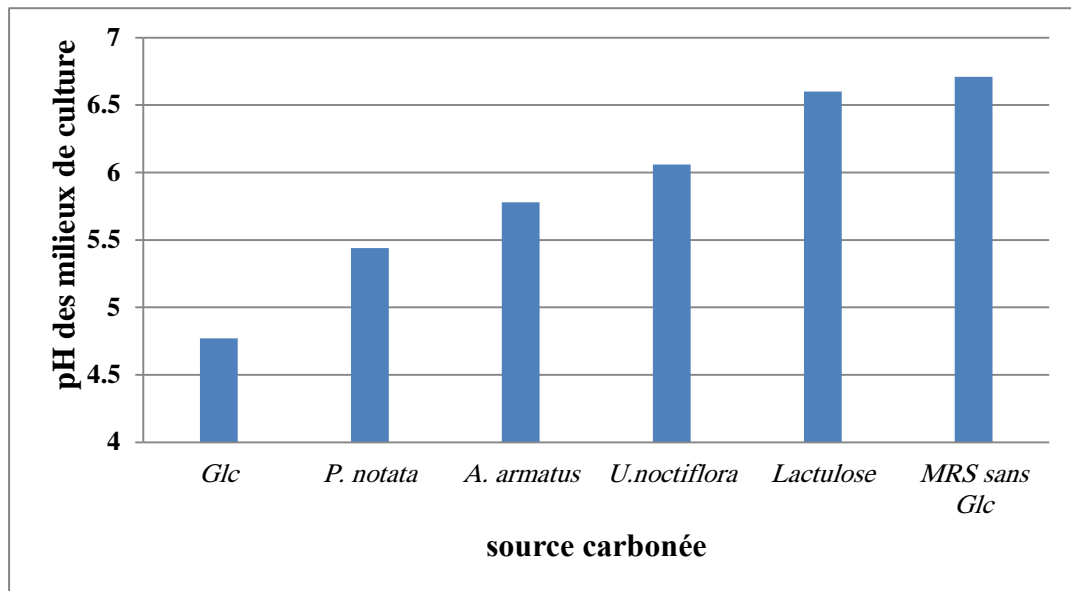


Fig. 11 - Valeurs de pH des différents milieux mesuré à température de 27°C

A l'observation de la figure 11 qui présente les valeurs de pH des différents milieux mesuré à température de 27°C, on remarque que ces valeurs sont variées selon la source de carbone apporté au milieu MRS, ce qu'explique la variation de l'acidité provoquée par la souche lactique (production d'acide gras) en fonction de sources carbonées.

Généralement l'acidité produite par *Lactobacillus brevis* est très grande dans le cas que le glucose considéré comme source de carbone et moins si le milieu MRS est dénué de source de carbone, mais par la comparaison entre l'acidité produite par la souche en présence de 3 oligosaccharides et avec l'acidité produite dans le cas de glucose (témoin de croissance) et lactulose, on observe que l'acidité est plus grande avec l'oligosaccharide *Plantago notata*, cette l'acidité est plus importante par rapport au lactulose et moins importante par rapport au glucose, puis elle est grande avec l'oligosaccharide de *Astragalus armatus*, elle est plus importante par rapport au lactulose et moins importante par rapport au glucose, et enfin moins d'acidité avec l'oligosaccharide de *Urginea noctiflora*, elle est importante par rapport au lactulose et moins importante par rapport au glucose.

III.2.3.- Dosage de l'acide lactique

Le mesure de l'acidité se fait par une titration de l'acide lactique par de la soude en présence de phénolphtaléine (RICHER et al.). Les résultats de mesure de l'acidité produits par la fermentation des différentes sources carboniques sont illustrés dans le tableau IX.

Tableau IX - l'acidité produite par la fermentation des différentes sources carboniques

| | V NaOH versé en ml | C échantillon dilué en mol/L | C échantillon mère mol/L |
|----------------------|--------------------|------------------------------|--------------------------|
| glucose | 2,8 | 0,028 | 0,56 |
| lactulose | 0,9 | 0,009 | 0,35 |
| <i>A. armatus</i> | 1,6 | 0,016 | 0,32 |
| <i>U. noctiflora</i> | 1,4 | 0,014 | 0,28 |
| <i>P. notata</i> | 1,7 | 0,017 | 0,34 |

L'analyse de tableau qui représente l'acidité produits par la fermentation des différentes sources carboniques, montre que *lactobacillus brevis* produits une acidité élève, si l'oligosaccharide utilisé est *Plantago notata* et de mois d'acidité si l'oligosaccharide utilisé est *Urginea noctiflora*.

En présence de glucose le milieu est plus acidifié par *lactobacillus brevis* que le lactulose.

Conclusion

Conclusion

La souche à tester est *Lactobacillus brevis*, qui été isolé à partir yaourt local "Dialna" après incubation dans le milieu MRS à 37°C pendant 48h. L'action à stimuler la croissance d'une bactérie, des extraits des polysaccharides hydrosolubles, est testée sur la souche *Lactobacillus brevis* représentant la flore probiotique. L'oligosaccharide d'*Astragalus armatus* stimulent de manière significative *Lactobacillus brevis*. L'action prébiotique des oligosaccharides issus de l'hydrolyse des extraits des polysaccharides hydrosolubles d'*Astragalus armatus* sur cette souche est appréciable.

*Références
bibliographiques*

1. ABEE T., GROOT M. N., TEMPELAARS M., ZWIETERING M., MOEZELAAR R. and VOORT M., 2010.- Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. Food microbiology. Vol. 28: 199-201.
2. AIT 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 de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse : 15-16.
3. ALLEN S., WASHINGTON C. WINN Jr., JANDA W., KONEMAN E., PROCOP G., SCHRECKENBERGER B., and WOODS G., 2006.- Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 6^{ème} édition: 644.
4. ANONYME 1, 2007.- API 50 CHL Medium, Ref 50 410. bioMérieux SA, Français : 1-3, 32.
5. ANONYME 2, 2009.- Gélose MRS. Biokar Diagnostics, France : 1-4.
6. ATKINS P. et JONES L., 1998.- Chimie. molécules, matière, métamorphoses. Ed. De boeck université, Bruxelles : 559-561.
7. BADIS A., LAOUABDIA-SELLAMI N., GUETARNI D., KIHAL M. et OUZROUT R., 2005.- Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabia et kabyle". Sciences & technologie. vol.23 : 31-35.
8. BATTANDIER A., 1882.- Le droguier d'un mozabite. Imprimés de bibliothèque nationale de la république française, Paris: 3-12 .
9. BONNEFOY C., GUILLET F., LEYRAL G. et Verne-Bourdaï E., 2002.- Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Ed. Doin, France : 48-50.
10. BOUAL Z., KEMASSI A., OULD El HADJ KHELIL A., MICHAUD P. and DIDIOULD El HADJ M., 2012.- Partial characterization and hydrolysis procedure of water soluble polysaccharides extracted from one saharian medicinal plant: *Malvaegyptiaca L.* International journal of bioscience, biochemistry and bioinformatics. Vol.2, No.2 : 100-103.
11. BRAEGGER C., 2004.- Prébiotique. Paediatrica, Vol. 15, N° 6 : 22.
12. BUSEE H-J., DENNER E.B.M. and LUBITZ W., 1996.- Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. Journal of biotechnology. Vol. 47: 3-7.
13. COULIBALY I., 2010.- Contribution à l'étude de la résistance au séchage des bactéries lactiques. Thèse de doctorat de l'université de Liège : 45-47.

14. CRITTENDEN R.G. and PLAYNE M.J., 1996.- Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Food science & technology*. Vol. 7: 354-360.
15. DE SOUZA Oliveira R.P., RODRIGUES FLORENCE A. C., PEREGO P., DE OLIVEIRA M. N., and CONVERTI A., 2010.- Use of lactulose as prebiotic and its influence on the growth, acidification profile and viable counts of different probiotics in fermented skim milk. *International journal of food microbiology*, Vol. 145: 22-27.
16. DELCENSERIE V., CHINA B., GAVINI F., BEERENS H., DAUBE G., 2002.- Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments : le genre *Bifidobacterium*. *Ann. Méd. Vét.* Vol. 146 : 284.
17. DUMAS G. et BEN-AIM R., 2003.- L'indispensable en réactions ioniques en solution aqueuse. Ed. Breal, France : 51-54
18. EL SODA M., AHMED N., OMRAN N., OSMAN G. and MORSI A., 2003.- Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. *Emir. J. Agric. Sci.* Vol. 15: 51, 53, 54.
19. FAO/WHO, 2002.- Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada: 5-8.
20. FEDERIGHI M., 2005.- Bactériologie alimentaire. Ed. Economica, 2^{ème} édition, paris : 220, 236.
21. GBASSI G., 2010.- Aspects physicochimiques de l'encapsulation et de la désencapsulation des probiotiques. Thèse de doctorat de l'université de Strasbourg : 14, 18, 29-35, 70.
22. GENESTIE B., 2006.- Optimisation de la production d'arabinoxyloligosaccharides d'intérêt biologique à partir de sons de céréales : Approches méthodologiques. Thèse de doctorat de l'université de Limoges : 30-50, 167-171, 215, 216, 217.
23. GUARNER F., KHAN A.G., GARISCH J., ELIAKIM R., GANGL A., THOMSON A., KRABSHUIS J. et Le MAIR T., 2008.- Recommandation Pratique: Probiotiques et Prébiotiques. *WGO Practice Guidelines* : 3-17.
24. HADEF S., 2012.- Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de magister de l'université d'Ouargla: 3-8, 32.
25. HART ÇA. et SHEARS P., 1999.- Atlas de microbiologie médicale. Ed. Niort, France : 75-76, 100, 101, 170.
26. HOLM F., 2001.- La santé de l'intestin. Rapport de synthèse de Fair-Flow Europe concernant l'impact des pro- et prébiotiques sur la santé : 4-16.
27. HOQUE M.Z., AKTER F., HOSSAIN K.M., RAHMAN M.S.M., BILLAH M.M. and ISLAM K.M.D., 2010.- Isolation, identification and analysis of probiotic properties of

- Lactobacillus spp.* from selective regional yoghurts. World journal of dairy & food sciences, Vol. 5: 39, 40, 41.
28. LABANOWSKI J., 2004.- Matière organique naturelle et anthropique : vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation. Thèse de doctorat de l'université de Limoges : 102-106.
 29. LARPENT J. P., Microbiologie alimentaire technique de laboratoire. Lavoisier tec & doc, paris : 225, 383.
 30. LEE K-Y., SO J-S., and HEO T-R., 2001.- Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level. Journal of microbiological methods Vol. 45: 2-3.
 31. MAMI A., 2013.- Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat de l'université d'Oran : 25, 77.
 32. MAUGHAN H. and VAN DER AUWERA G., 2011.- Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. Infection, genetics and evolution Vol.11: 789-790.
 33. MEYER A., DEIANA J., and BERNARD A., 2004.- Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. Ed. Doin, 2^{ème} édition, France : 61, 62, 136.
 34. NOWROOZI J., MIRZAI M., and NOROUZI M., 2004.- Study of *Lactobacillus* as probiotic bacteria. Iranian j publ health, Vol. 33, No. 2: 1.
 35. OLLIVIER B., 1987.- Fermentation méthanique par des cultures mixtes définies de bactéries thermophiles. Thèse de doctorat de l'université de Provence : 26.
 36. OUHSSINE K., OUHSSINE M., et EL YACHIOUI M., 2006.- Caractérisation chimique et microbiologique des déchets de *gelidium sesquipedale* avant et après fermentation. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, Vol. 145 : 34, 35, 39.
 37. OZENDA P., 1977.- Flore du Sahara. Ed. Centre nationale de la recherche scientifique (CNRS), 2^{ème} édition, Paris: 617.
 38. PRESCOTT L.M., HARLEY J. P., and KLEIN D., 2003.- Microbiologie. Ed. De boeck, 2^{ème} édition, Bruxelles : 106-110, 113-116, 119, 529.
 39. QUEZEL P., et SANTA S., 1962.- Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, Ed. Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris :
 40. QUEZEL P., et SANTA S., 1963.- Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris :
 41. RAMBAUD J. C., BUTS J. P., CORTIER G., et FLOURIE B., 2004.- Flore microbienne intestinale physiologie et pathologie digestives. John libbey eurotext, paris : 43, 51.

42. RANADHEERA C. S., EVANS C. A., and BAINES S. K., 2012.- *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food research international* Vol. 49: 619-622.
43. RICHER M., BRANGER A., et ROUSTEL S., 2007- Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Ed. Educagri éditions, Paris : 95.
44. ROUSSEAU V., 2004.- Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. Thèse de doctorat de l'institut national des sciences appliquées de Toulouse : 31-34, 40-46, 53-63.
45. SAHNOUNI F., 2013.- Isolement, identification biochimique et technologique des bactéries lactique isolées de poissons marins (*Sardina pilchardus* et *Boops boops*) pêchés dans la côte occidentale algérienne et mise en évidence de leur pouvoir bioconservateur. Cas de la crevette rose (*Aristeus antennatus*). Thèse de doctorat de l'université d'Oran : 87, 88.
46. SAKILI D. et ISSOUAL D., 1996.- Les bactéries lactiques dans l'élaboration du smen marocain. Académie d'agriculture de France : 4-5.
47. SIBOUKEUR A., 2011.- Etude de l'activité antibactérienne des bactériocines (type nisine) produites par *Lactococcus lactis sub sp lactis*, isolée à partir du lait camelin. Mémoire de magister d'Université d'Ouargla: 25, 30, 31.
48. SOUID W., 2011.- effet des bactériocines (type nisine) produites par une souche lactique isolée à partir du fromage camelin, sur une souche psychrotrophe. Mémoire de magister d'Université d'Ouargla: 39,42, 44.
49. TABAK S. et BENSOLTANE A., 2012.- L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature & technologie*, N° 06 : 71-73.
50. Tannock G. W., 1999.- Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues Molec. Biol.*, Vol. 1: 55.
51. VOISIN A., 1987- Utilisation des plantes médicinales dans le souf au 19^{ème} siècle. *Le sahara*, 1^{er} trimestre, vol. 100: 25-28.
52. WATTERLOT L., 2010.- Analyse des effets de souches probiotiques anti-inflammatoires. Thèse de doctorat de l'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement de paris : 65-66.

Annexes

Annexe 1

➤ Composition de milieu de culture MRS

Le milieu MRS (de Man Rogosa Sharpe), Merck (Germany). Il est constitué de 10g.L-1 de peptone, 8g.L-1 d'extrait de viande, 4g.L-1 d'extrait de levure, 20g.L-1 de glucose, 2g.L-1 de phosphate dipotassique, 5g.L-1 d'acétate de sodium, 2g.L-1 de citrate d'ammonium, 0,2g.L-1 de sulfate de magnésium (heptahydrate), 0,04g.L-1 de sulfate de manganèse (monohydrate) et de 1 mL.L-1 de tween 80, le pH final est de 7, Merck (Germany). Avant utilisation le milieu est autoclavé 15min à 121°C.

Annexe II

➤ Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- Ajouter du Lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir à 20 à 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (Gx100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

Annexe III

API 50 CHL V5.1 [Impression](#) [Export](#) [Nouveau test](#) [Modification](#)

REFERENCE: HADJ SAID & BECHOUN | DATE: 26/05/13

COMMENTAIRE: La galerie utiliser avec cette souche est: l'API 20 C AUX des levures, dont sa composition est reportée dans la liste des tests suivants:

BONNE IDENTIFICATION

| Galerie | API 50 CHL V5.1 |
|---------|---|
| Profil | -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- |
| Note(s) | |

| Taxons significatif(s) | % ID | T | Test(s) à l'encontre | | | | | | | |
|------------------------|------|------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lactobacillus brevis 3 | 99.8 | 0.32 | RIB | 98% | GAL | 89% | FRU | 92% | MEL | 76% |
| | | | GNT | 87% | 2KG | 1% | | | | |

| Taxon suivant | % ID | T | Test(s) à l'encontre | | | | | | | |
|---------------------------|------|------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lactobacillus fermentum 1 | 0.1 | 0.03 | RIB | 95% | GAL | 92% | FRU | 80% | NAG | 6% |
| | | | LAC | 87% | MEL | 90% | SAC | 86% | RAF | 76% |

API 50 CHL V5.1

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
20 21 22 23 24 25 26 27 28 29
30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
40 41 42 43 44 45 46 47 48 49

REFERENCE: HADJ SAID & BECHOUN | DATE: 26/05/13

COMMENTAIRE: La galerie utiliser avec cette souche est: l'API 20 C AUX des levures, dont sa composition est reportée dans la liste des tests suivants: D-Glucose, Glycérol, calcium 2-céto-Gluconate, L-Arabinose, D-Xylose, Adonitol, Xylitol, D-Galactose, Inositol, D-Sorbitol, Méthyl- α -D-lucopyranoside, N-Acétyle-Glucosamine, D-Cellobiose, D-Lactose (origine bovine), D-Maltose, D-Saccharose, D-Trehalose, D-Mélézitose, et D-Raffinose (les autres tests dans l'identification avec ce programme sont considérés négatifs mais ils ne sont réellement pas testés); Avec le milieu MRS reconstitué sans glucose additionné d'une quantité adéquate du bleu de bromothymol comme indicateur coloré, pour la préparation de l'inoculum.

BONNE IDENTIFICATION

| Galerie | API 50 CHL V5.1 |
|---------|---|
| Profil | -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- |
| Note(s) | |

| Taxons significatif(s) | % ID | T | Test(s) à l'encontre | | | | | | | |
|------------------------|------|------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lactobacillus brevis 3 | 99.8 | 0.32 | RIB | 98% | GAL | 89% | FRU | 92% | MEL | 76% |
| | | | GNT | 87% | 2KG | 1% | | | | |

| Taxon suivant | % ID | T | Test(s) à l'encontre | | | | | | | |
|---------------------------|------|------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lactobacillus fermentum 1 | 0.1 | 0.03 | RIB | 95% | GAL | 92% | FRU | 80% | NAG | 6% |
| | | | LAC | 87% | MEL | 90% | SAC | 86% | RAF | 76% |

Annexe IV

➤ Préparation des solutions

I. Préparation de solution de HCL de 1N

Densité $d = 1,18$

Pureté% = 37

Masse Molaire = 36,46

$$C = 10 \times d \times \% / MM$$

$$C = 10 \times 1,18 \times 37 / 36,46 = 11,9$$

$$C \times V = C' \times V'$$

C = Concentration

V = Volume

$$11,9 \times V = 1 \times 500 ; \quad V = 500 \times 1 / 11,9 = 42,01 \text{ ml}$$

Donc ; en utilise 42 ml de HCL pur dans 500ml d'eau distillée.

II. Préparation de tube de control positif « lactulose »

La concentration du sirop « Ezilax » est de 0.67 g/ml, pour obtenir une concentration de 10 mg/ml :

$$670 \text{ mg} \longrightarrow 1000 \mu\text{l}$$

$$10 \text{ mg} \longrightarrow X \quad , \quad X = 10 \times 1000 / 670$$
$$\sim 15 \mu\text{l}$$

Donc, on dilue 15 μl du sirop dans 5 ml de milieu MRS.

RESUME- L'étude des hydrolysats partiels des différents extraits de polysaccharides hydrosolubles des plantes spontanées, à caractère médicinal récolté dans la région de Ghardaïa dont *Plantago notata*, *Astragalus armatus* et *Urginea noctiflora* additionnés en milieu de culture chez la bactérie probiotique *Lactobacillus brevis*, isolée d'un yaourt locale montre une activité biologique sur cette souche. Les hydrolyse partiel des extraits de polysaccharides hydrosolubles d'*Astragalus armatus* de concentration 10 mg /ml, stimulent de manière significative, pour 1.007 DO après 24 heures, et diminue le pH de milieu à 5,78. La croissance de *Lactobacillus brevis* et l'action prébiotique des oligosaccharides issus de ces hydrolysats sur cette souche est notable.

Mots clés: Plantes spontanées, Polysaccharides, extrait, *Lactobacillus*, effet prébiotique

SUMMARY- The study of partial hydrolysates of water-soluble polysaccharides extracted from medicinal plants, harvested in the region of Ghardaia such *Plantago notata*, *Astragalus armatus* and *Urginea noctiflora* added in culture medium, in the probiotic bacterium *Lactobacillus brevis*, shows the biological activity on this strain. The partial hydrolysis of water-soluble polysaccharide extracts of *Astragalus armatus* with concentration of 10 mg/ml, stimulate significantly to 1.007 OD after 24 hours, and decreases the pH of the medium to 5.78. The growth of *Lactobacillus brevis* and action prebiotic of oligosaccharides stemming from these hydrolysates on this strain is significant.

Keywords: Plants spontaneous Polysaccharides, extract, *Lactobacillus*, prebiotic effect

ملخص- بينت دراسة السكريات المميهة المعقدة القابلة للذوبان في الماء ، بعد استخلاصها من النباتات التلقائية في منطقة غرداية ذات استعمال طبي والتي هي *Plantago notata* ، *Astragalus armatus* و *Urginea noctiflora* المضافة في وسط زراعي لبكتيريا بروبيوتيك *Lactobacillus brevis*، وجود نشاط بيولوجي معتبر على هذه السلالة. أظهر ناتج التحلل الجزئي للسكريات المعقدة القابلة للذوبان في الماء المستخلصة من *Astragalus armatus* بتركيز 10 مغ/ مل نمو معتبر للبكتيريا، إذ صارت الكثافة الضوئية 1.007 بعد 24 ساعة و التي أدت إلى زيادة حموضة الوسط المقدر بـ 5.78، إذن هذه السكريات المعقدة لـ *Astragalus armatus* ذات تأثير إيجابي ملحوظ على هذه البكتيريا.

الكلمات المفتاحية: النباتات التلقائية، السكريات المتعددة، المستخلصة، البكتيريا اللبنية، التأثير الإيجابي.