



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Microbiologie

قسم الميكرو بيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie fongique, Option : Fermentation et production  
de substances fongiques

Intitulé :

---

# Recherche de microorganismes de différents écosystèmes développant une activité probiotique

---

Présenté et soutenu par : REHAMNIA Baraa

Le : 28/06/2016

DJELID Hadjer

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme. MIHOUBI I .

Pr. UFM Constantine

Rapporteur : Mr. KACEM CHAOUCHE N.

Pr. UFM Constantine

Examinatrice : Mlle. KARA ALI M .

Dr. UFM Constantine

*Année universitaire  
2015 - 2016*

# **DEDICACE**

*Je veux poser ces mots*

*Pour Dieu porteur de force et de lumière,*

*Détenteur du savoir et du mystère*

*Pour Dieu à qui un merci éternel traverse mes nuits de savoir*

*Arrivant au jour de frontière, acte et omniscience*

*Je veux poser ces mots*

*Aux Piliers de ma vie, mes chers parents,*

*À toi, ma douce mère, ma porte d'espoir ;*

*À toi mon père, porteur de raison et ombre de mes décisions ;*

*À la Force de mon esprit Monder et Adb El-Raouf ;*

*À la Lumière et au bonheur de mes jours, Aboura ;*

*À tous les membres de ma famille*

*Joie de vie, sourire des fleurs et parfum des temps durs à vous mes amis en particulier mon amie DIABAT AMIRA et sa famille pour leur soutien dans ce mémoire;*

*Un merci à mon binôme HADJER pour les moments qu'on a partagé ensemble ;*

*À vous tous,*

*Je pose ces mots*

*Pour vous dédier ce modeste travail.*

**BARAA**

## *DEDICACE*

*À ma très chère mère à qui je n'arrive pas à récompenser les sacrifices qu'elle a fait pour moi, pour sa tendresse et son soutien.*

*À mon cher père pour ses encouragements et ses conseils.*

*Vous êtes la source éternelle de mon bonheur. Que DIEU vous garde en bonne santé toujours.*

*A mes sœurs SOUAD, NOUSSA, et SARA, pour leur aide, leur encouragements et leur soutien pendant tous mes études supérieures.*

*A mes frères RAOUF, MOHAMMED, et RIAD.*

*A mes nièces SIMOU et MIRAL*

*À mon binôme et mon amie BARAA merci pour tous les moments qu'on a passé ensemble.*

*A mes amies MANEL, ZAINEB, AMINA,*

*À tous ceux que j'aime.*

**HADJER**

## Remerciements

*Au terme de ce travail, nous tenons à remercier en premier lieu 'ALLAH' le bon Dieu, le Miséricordieux de nous avoir donné la force, la volonté, et la patience d'achever cette modeste étude.*

*Nos remerciements les plus respectueux vont à notre encadreur monsieur **Pr. KACEM CHAOUCHE.N**, professeur à l'université des frères Mentouri de Constantine, pour avoir accepté de nous encadrer et de nous avoir accueilli au sein de son Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), et de nous suivre tout au long de la réalisation de ce mémoire. Pour son caractère de noblesse incomparable, sa générosité et la grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles. Nous voudrions vous exprimer ici notre profonde reconnaissance pour la confiance et le soutien que vous n'avez pas cessé de nous porter au cours de ces dernières années ainsi que pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail,*

*Un grand merci s'adresse à madame **KARA ALI.M** qui nous a fait l'honneur d'avoir guidé et dirigé ce travail. De début jusqu'à la mise en forme de ce document,*

*Nos remerciements sont également adressés aux membres de jury :*

*Madame **MIHOUBI.I** d'avoir acceptée de présider le jury et madame **KARA ALI** d'avoir acceptées d'examiner notre travail,*

*Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de mycologie, de biotechnologie et de l'activité microbienne (LaMyBAM) de nous avoir aidé très sincères remerciements,*

*Nous remercions nos très chers parents, frères et sœurs qui ont toujours été là pour nous,*

*Nos remerciements les plus sincères à tous nos camarades pour leur encouragements et pour l'ambiance agréable tout au long de ce travail.*

---

## Table des matières

<b>1-Introduction</b> .....	1
<b>2-Revue bibliographique</b> .....	3
2.1- Généralités sur les probiotiques .....	3
2.2-Principales espèces de microorganismes à potentiel probiotique .....	3
2.2.1-Levures .....	3
2.2.2.1- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
2.2.2.2- <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	4
2.2.2- Bactéries lactiques .....	5
2.2.2.1- Le genre <i>Lactobacillus</i> .....	5
2.2.2.2- Le genre <i>Lactococcus</i> .....	6
2.2.2.3- Le genre <i>Streptococcus</i> .....	6
2.2.2.4- Le genre <i>Enterococcus</i> .....	6
2.2.2.5- Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i> .....	6
2.2.2.6- Les genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i> .....	7
2.2.2.7- Le genre <i>Bifidobacterium</i> .....	7
2.3-Microbiote intestinale.....	7
2.4-Propriétés et critères de sélection de souches probiotiques.....	7
2.4.1- Critères de sécurité .....	8
2.4.2- Critères technologiques .....	8
2.4.3-Critères fonctionnels.....	8
2.4.3.1- Effet antimycotoxinogène.....	8
2.4.3.2- Aflatoxines.....	9
2.4.3.3- Champignons mycotoxinogènes.....	10
2.5-Mécanisme d'action des probiotiques .....	11
2.6-Effets bénéfique des probiotiques sur la santé humaine .....	13
2.6.1-Troubles gastro-intestinaux .....	13
2.6.1.1-Constipation.....	13
2.6.1.2- Intolérance au lactose .....	14
2.6.1.3- Diarrhée .....	14
2.6.1.4- Infection intestinale par <i>Helicobacter pylori</i> .....	15
2.6.1.5-Maladie de Crohn .....	15

---

2.6.1.6- Syndrome de l'intestin irritable (IBS) .....	16
2.6.1.7-Cancer du colon .....	16
2.6.2-Modulation de l'immunité .....	16
2.6.3-Antibiothérapie .....	16
2.7-Effets secondaires associés à la consommation des probiotiques .....	17
2.8-Sources de microorganismes à potentiel probiotique.....	17
2.8.1- Laits et Produits laitiers .....	18
2.8.1.1-Lait de vache.....	18
2.8.1.2-Lait de chamelle.....	18
2.8.1.2-Produits laitiers .....	18
2.8.2- Le sol .....	18
<b>3- Matériel et méthodes .....</b>	<b>20</b>
3.1- Echantillonnage .....	20
3.1.1- Origine des échantillons du lait .....	20
3.1.2-Origine des échantillons du sol.....	21
3.1.3- <i>Aspergillus flavus</i> .....	21
3.2- Exploration des échantillons et isolement des microorganismes .....	21
3.2.1- Isolement des bactéries lactiques et levures .....	21
3.2.1.1- Préparation des dilutions .....	21
3.2.1.2- Ensemencement .....	22
3.2.2- Purification des isolats.....	22
3.3- Evaluation de l'effet probiotique des isolats bactériens .....	22
3.3.1- Production de substances antimicrobiennes .....	22
3.3.1.1- Sélection des isolats à effet antifongique.....	22
3.3.1.2- Étude de l'activité anti mycotoxinogène .....	23
3.3.1.2.1- Activité mycotoxinogène d' <i>Aspergillus flavus</i> .....	23
3.3.1.2.2- Fermentation en milieu liquide.....	24
• Préparation des surnageants bactériens.....	24
• Préparation de la suspension sporale .....	24
• Fermentation liquide .....	24
• Extraction de l'Aflatoxine B1 .....	24
• Séparation chromatographique .....	25
3.3.1.3- Résistance aux sels biliaires.....	26

---

3.3.1.4- Résistance à l'acidité gastrique.....	26
3.4- Identification des isolats bactériens à potentiel probiotique .....	27
3.4.1- Observation macroscopique.....	27
3.4.2- Observation microscopique .....	27
3.4.2.1. Observation à l'état frais .....	27
3.4.2.2- Coloration de Gram .....	27
3.4.3-Tests biochimique.....	28
3.4.3.1- Test de catalase .....	28
3.4.3.2- Test d'oxydase.....	28
3.4.3.3- Test de nitrate – réductase .....	28
3.4.3.4. Production d'indole.....	29
3.4.3.5- Détermination de la voie d'attaque de glucides.....	29
3.4.3.6- Température de croissance .....	29
<b>4- Résultats .....</b>	<b>30</b>
4.1- Exploration des échantillons et isolement de microorganismes .....	30
4.1.1- Isolement des bactéries et des levures .....	30
4.1.2- Etude morphologique d' <i>Aspergillus flavus</i> .....	31
4.1.2.1- Aspect macroscopique .....	31
4.1.2.2- Aspect microscopique.....	31
4.2- Evaluation de l'effet probiotique des isolats obtenus .....	32
4.2.1- Production des substances antimicrobiennes.....	32
4.2.1.1- Activité mycotoxinogène.....	32
4.2.1.2- Sélection des isolats bactériens et levuriens à effet antifongique.....	32
4.2.1.3- Étude de l'activité antimycotoxinogène .....	34
4.2.2- Résistance à l'acidité gastrique.....	35
4.2.3- Tolérance aux sels biliaires .....	36
4.3- Identification des isolats bactériens à effet probiotique .....	37
4.3.1- Aspect macroscopique .....	37
4.3.2- Aspect microscopique .....	37
4.3.3- Observation par coloration de GRAM.....	37
4.3.3- Tests biochimiques .....	38
4.3.3.1- Test de catalase .....	38
4.3.3.2- Test d'oxydase .....	39

---

4.3.3.3- Test indole .....	39
4.3.3.4- Test de réduction de nitrate .....	40
4.3.3.5- Détermination de la voie d'attaque de glucides.....	40
4.3.3.6- Température de croissance .....	42
<b>5- Discussion</b> .....	<b>43</b>
<b>6- Conclusion et perspectives</b> .....	<b>46</b>
<b>7- Références bibliographiques</b> .....	<b>47</b>
<b>Annexe</b>	
<b>Résumé</b>	

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> <i>S. cerevisiae</i> sous microscopie électronique .....	4
<b>Figure 2</b> Structure chimique de l'aflatoxine B1 .....	9
<b>Figure 3</b> Caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i> .....	11
<b>Figure 4</b> Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le traitement des infections entériques. ....	12
<b>Figure 5</b> Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques .....	12
<b>Figure 6</b> Présentation des effets bénéfiques sur la santé humaine de la consommation des probiotiques .....	14
<b>Figure 7</b> Lait de chamelle et lait de vache .....	20
<b>Figure 8</b> Schéma représentatif du test antifongique .....	23
<b>Figure 9</b> Test d'activité mycotoxinogène .....	23
<b>Figure 10</b> Aspect de milieu de fermentation .....	25
<b>Figure 11</b> Chromatographie sur couche mince.....	26
<b>Figure 12</b> Activité mycotoxinogène d' <i>Aspergillus flavus</i> vis-à-vis les bactéries tests : 1. <i>Staphylococcus aureus</i> , 2. <i>E.coli</i> .....	32
<b>Figure 13</b> Résultats du test antifongique .....	33
<b>Figure 14</b> Test antifongique à résultat négatif.....	33
<b>Figure 15</b> Fermentations en milieu liquide après la période de fermentation .....	34
<b>Figure 16</b> Chromatographie sur couche mince, S: Standard d'aflatoxine, T :témoin, CH1, CH2, CH7, A1, B1, L10 : les isolats bactériens.....	35
<b>Figure 17</b> Résultat de la résistance à l'acidité gastrique.....	36
<b>Figure 18</b> Résultat de tolérance aux sels biliaires sur milieu BVBL.....	36
<b>Figure 19</b> Aspect macroscopique des isolats à effet probiotique .....	37
<b>Figure 20</b> Résultat du test oxydase .....	39
<b>Figure 21</b> Résultats du test indole .....	39
<b>Figure 22</b> Résultat du test de réduction de nitrate .....	40
<b>Figure 23</b> Déterminations de la voie d'attaque des glucides ; 1 : avec couche d'huile 2 : sans couche d'huile .....	41
<b>Figure 24</b> Développement des bactéries (CH1, CH2, CH7) à 45°C .....	42

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> Principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique.....	5
<b>Tableau 2</b> Propriétés physiques des aflatoxines.....	9
<b>Tableau 3</b> Moisissures et leurs mycotoxines.....	10
<b>Tableau 4</b> Indications basées sur l'évidence pour les probiotiques en gastroentérologie.....	15
<b>Tableau 5</b> Différents volumes de chloroforme additionné en trois phases .....	25
<b>Tableau 6</b> Isolats bactériens et levuriens obtenus des échantillons de sols et laits .....	30
<b>Tableau 7</b> Observation macroscopique de la moisissure .....	31
<b>Tableau 8</b> Observation microscopique de la moisissure .....	31
<b>Tableau 9</b> Calculs des rapports frontaux de différents spots en comparaison avec le Rf du standard .....	35
<b>Tableau 10</b> Aspect macroscopique des isolats sélectionnés .....	37
<b>Tableau 11</b> Aspect microscopique des colonies .....	38
<b>Tableau 12</b> Résultats du test catalase .....	38
<b>Tableau 13</b> Tests morphologiques et biochimiques des trois souches bactériennes .....	41

## Liste des abréviations

**AFB1** Aflatoxine B1

**AFs** Aflatoxine

**Bf** *Bifidobacterium*

**BLBVB** Bouillon Lactosé Bilié Au Vert Brillant

**BN** Bouillon Nutritif

**DLC** Date Limite De Consommation

**E.Coli** *Escherichia coli*

**FAO** Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

**GN** Gélose Nutritif

**LaMyBAM** Laboratoire De Mycologie, Biotechnologie et de L'activité Microbienne

**MEVAG** Milieu d'Etude de la Voix d'Attaque des Glucides

**MRS** Man Rogosa Sharp

**OMS** Organisation Mondiale De La Santé

**OTA** Ochratoxine A

**PDA** Potato Dextrose Agar

**rpm** Rotation Par Minute

**UV** Ultraviolet

**WGO** World Gastroenterology Organisation

**WHO**

**YPGA** Yeast Peptone Glucose Agar

## Introduction

La population Algérienne est connue par un régime alimentaire déséquilibré, stress et antibiothérapies (UNICEF/OMS, 2006). Ces dernières sont les facteurs principaux de déséquilibre de la flore intestinale « autochtone » qui est le responsable de plusieurs maladies et infections humaines (Hoppe et *al.*, 2004 ; Tong *et al.*, 2007). Afin de résoudre ce problème et préserver cet équilibre, les chercheurs, après l'observation de Metchnikoff Eli (1907), ont commencé de mettre en œuvre la culture des microorganismes indispensables (Lily et Stillwell, 1965 ; Fuller, 1989). Les probiotiques (micro-organismes vivants) sont considérés comme des agents protecteurs vis-à-vis des risques d'apparitions de pathologies digestives. Parmi les effets les mieux éclaircis figurent l'effet antidiarrhéique dans le cadre d'une antibiothérapie (Surawicz *al.*, 1989 ; Gill, 2003). L'intérêt de probiotiques aussi, réside d'une part dans leur effet antimicrobien à large spectre et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes. Ces microorganismes antimicrobiens ont la capacité de cibler sélectivement les microorganismes pathogènes ou altérants, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables. Ces microorganismes présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques, ainsi qu'à la bile gastrique (Dortu et Thonart, 2009).

La contamination des aliments provoquée par les champignons mycotoxinogènes, capable d'inciter une réponse toxique (lorsqu'il pénètre par voie naturelle ; ingestion, inhalation ou absorption par la peau), constituée, un problème majeur, qui peut aussi remédier par l'utilisation de ces probiotiques (Magjeed, 2005 ; Gisela et *al.*, 2012). La recherche de méthodes de prévention contre les maladies affectant la flore intestinale et l'élimination de substances mycotoxinogènes constitue un objectif à atteindre.

De cette logique que découle le but de ce travail, et qui cible la recherche de microorganismes, développant une activité probiotique à partir de différents écosystèmes à savoir ; le sol, le lait de vache et le lait de chamelle (peu explorés d'après la littérature).

Pour ce faire, plusieurs approches sont développées :

- Isolement et purification des bactéries lactiques et levures ;

- Evaluation de l'effet probiotique des isolats bactériens sélectionnés en particulier, l'étude de la production des substances antimicrobiennes, l'activité antimycotoxinogène, la résistance aux sels biliaires et à l'acidité gastrique ;
- Identification préliminaire de ces microorganismes.

## **2- Revue bibliographique**

### **2.1- Généralités sur les probiotiques**

Le terme probiotique est un mot grec qui signifie “en faveur de la vie”, et qui est utilisé pour définir certains microorganismes vivants (Levures et bactéries) ayant un effet bénéfique sur la santé de l’Homme et de l’animal (Lily et Stillwell, 1965 ; Guarner et Schaafsma, 1998).

Les probiotiques peuvent être présents dans différents types de produits, en l’occurrence ; aliments, substances médicales et suppléments alimentaires (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001).

Le pédiatre français, Henry Tissier a remarqué que les enfants souffrants de diarrhée, ont dans leurs selles un certain nombre de bactéries avec une forme Y. Ces bactéries “bifides” étaient au contraire abondantes chez les enfants sains. A son avis, ces bactéries pourraient être administrées aux patients souffrant de diarrhée pour aider à rétablir une flore intestinale saine (Tissier, 1906). En effet, au cours des vingt dernières années, les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu’ils sont ingérés en quantité adéquate, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels (FAO et OMS, 2001).

La recherche dans le domaine des probiotique a fait des progrès considérables en ce qui concerne la sélection et la caractérisation des cultures probiotiques spécifiques et la justification des allégations santé liées à leur consommation (OMS, 2001).

### **2.2- Principales espèces de microorganismes à potentiel probiotique**

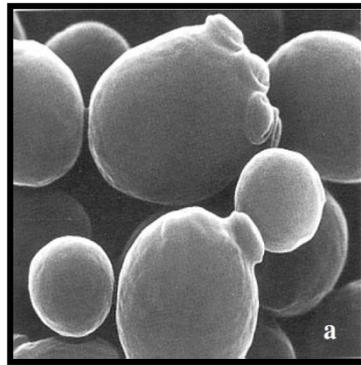
#### **2.2.1- Levures**

Les levures sont les premiers micro-organismes utilisées par l’homme depuis des millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et du pain par fermentation (Bouix et Leveau, 1991; Pol, 1996). Les levures sont des cellules eucaryotes, présentant une structure plus complexe que celle des bactéries notamment par la présence d’un noyau, de mitochondrie, d’un appareil de Golgi et de plus d’un chromosome (*Saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes) (Labrecque, 2003).

Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent ainsi largement ces micro-organismes, pour la production de molécules à intérêt médical (ex : production de protéines hétérologues, comme le vaccin de l’hépatite B) (Mercier ,1997 ; Blin, 2002).

### 2.2.1.1- *Saccharomyces cerevisiae*

La classification des levures (qui a été remaniée en 1984 par Kreger Van R) montre que le genre *Saccharomyces* appartenant à la classe des ascomycètes et à l'ordre des endomycétales est le plus impliqué dans les productions industrielles (Leveau et *al.*, 1993) (figure 1).



**Figure 1** *S. cerevisiae* sous microscopie électronique (Tortora et *al.*, 2003)

Depuis l'antiquité, la levure *S. cerevisiae* a été utilisée dans la panification et la fabrication des boissons alcoolisées, après, la levure s'est installée et progressée en qualité d'additif alimentaire de probiotique en élevage intensif de ruminant où les éleveurs ont commencé à l'apprécier lors de tentative de valorisation des résidus de fermentation (Carter et Phillips, 1944), actuellement, *S. cerevisiae* est utilisée comme des probiotiques contre les maladies fongiques chez les humains (Munoz et *al.*, 2016).

### 2.2.1.2- *Saccharomyces boulardii*

C'est une levure semblable à *S. cerevisiae*, isolée, pour la première fois, en 1923 par le scientifique français Henri Boulard, elle appartient à la classe des *Saccharomycetes* et l'ordre des *Saccharomycetales* (Alis et Jespersen, 2003).

*S. boulardii* est une souche de levure ayant fait l'objet de très nombreuses études cliniques démontrant son grand intérêt en cas de diarrhées (réduction de la fréquence) ou de prise d'antibiotiques (prévention de la diarrhée associée à l'antibiothérapie). Elle favorise le réensemencement et la croissance des germes utiles, les saprophytes, en inhibant celle des germes nuisibles. Il a été démontré scientifiquement que l'utilisation périodique de la levure *S. boulardii*, réduit de manière sensible l'apparition des colites et des colopathies fonctionnelles, ou syndrome du côlon irritable (ballonnements, douleurs abdominales chroniques, troubles du transit chroniques, etc.), qui représentent près d'un tiers des consultations en gastro-entérologie. Il y a maintenant presque une dizaine d'années que des études randomisées et des méta-analyses ont montré l'effet des probiotiques sur la réduction du risque de survenue d'une diarrhée infectieuse et sur la diminution de sa sévérité évaluée en

termes de durée de l'épisode (Rodrigues, 2000 ; Kamm, 2004 ; Szajewska, 2005 ; Olivier, 2009 ; Pothoulakis, 2009).

### 2.2.2- Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini, du point de vue, taxonomique (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et *al.*, 2005). Ce sont des bactéries anaérobies facultatives, généralement immobiles, elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et pour les glucides fermentescibles (Dellaglio et *al.*, 1994 ; Hogg, 2005).

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature, elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001). Les genres les plus utilisés comme des probiotiques sont des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* (Khan et Ansari, 2007), et aussi des souches de genres : *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Pot, 2008 ; Rokka et Rantamaki, 2010 ; Gbassi et *al.*, 2011) (tableau 1).

**Tableau 1** Principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique (Shah, 2007 et 2010).

<b>Espèces de <i>Lactobacillus</i></b>		
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. gasseri</i>	<i>Lb. paracasei</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. johnsonni</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. plantarum</i>
<b>Espèces de <i>Bifidobacterium</i></b>		
<i>Bf. lactis</i>	<i>Bf. animalis</i>	<i>Bf. infantis</i>
<i>Bf. longum</i>	<i>Bf. bifidum</i>	<i>Bf. Breve</i>
<i>Bf. adolescentis</i>		
<b>Autres bactéries lactiques</b>		
<i>Lc. lactis</i>	<i>St. diacetylactis</i>	<i>En. faecalis</i>
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>St. intermedius</i>	<i>En. faecium</i>
<i>P. acidilactici</i>	<i>St. thermophiles</i>	

#### 2.2.2.1- Le genre *Lactobacillus*

*Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développant à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences

nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et *al.*, 1994).

#### **2.2.2.2- Le genre *Lactococcus***

Le genre *Lactococcus* représente les streptocoques dits lactique, car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène (Pilet et *al.*, 2005). Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+). Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, mais capables de se développer à 10°C (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et *al.*, 2005).

#### **2.2.2.3- Le genre *Streptococcus***

La seule espèce de streptococcus utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* (Stiles et Holzapfel, 1997). Cette souche, se caractérise par son habitat (lait et produits laitiers), son caractère non pathogène et sa résistance à la température (52°C) (Haddie, 1986 ; Pilet et *al.*, 2005).

#### **2.2.2.4- Le genre *Enterococcus***

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type  $\lambda$  et  $\beta$  et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *Enterococcus faecalis*. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement, différenciés par la fermentation de l'arabinose et de sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (Tamime, 2002 ; Ho et *al.*, 2007).

#### **2.2.2.5- Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella***

Ils ressemblent aux coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire, avec production de l'acide lactique, de CO<sub>2</sub> et d'éthanol (Pilet et *al.*, 1998 ; Ho et *al.*, 2007).

Le genre *Leuconostoc* est anaérobie facultatif et exigeant du point de vue nutritionnel. Le développement des leuconostoc entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et *al.*, 2008).

### 2.2.2.6- Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées (18% de NaCl), comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* (Pilet et al., 2005).

### 2.2.2.7- Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007).

## 2.3- Le microbiote intestinal

L'écosystème intestinal d'un adulte sain est généralement composé de 1000 espèces moléculaires dont, 60-70% restent incultivées (Qin et al., 2010). Le microbiote possède deux fonctions essentielles : d'une part, il permet une meilleure efficacité digestive et porte des activités de synthèse, en particulier celles de vitamines (Qin et al., 2010). D'autre part, il constitue une barrière physique, microbiologique et immunologique sélective vis à vis d'agents potentiellement néfastes pour l'organisme (Szajewska, 2005).

Le côlon est le compartiment dépourvu de l'oxygène qui contient une immense quantité de microorganismes. Il est dominé par des bactéries anaérobies strictes et comprenant à la fois les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (*Bactéroides spp*, *Clostridium spp*, *Bifidobacterium* : *B. longum*, *B. bifidum* et *B. infantis*) (Farnworth, 2008).

## 2.4- Propriétés et critères de sélection de souches probiotiques

Les probiotiques doivent être capables d'exercer leur effet bénéfique sur l'hôte par leur croissance et par leur activité dans le corps humain (Collins et al., 1998; Morelli, 2000). En outre, les micro-organismes à potentiel probiotique doivent posséder certains critères comme les critères de sécurité, les critères fonctionnels et les critères technologiques.

### **2.4.1- Critères de sécurité**

L'identification taxonomique de la souche par des techniques moléculaires fiables et l'origine de la souche sont considérées parmi les critères de sécurité les plus importants (Saarela *et al.*, 2002; Gueimonde et Salminen, 2006). La souche à caractère probiotique ne doit développer ni infection systémique, ni activité métabolique nuisible, ni stimulation immunitaire excessive, ni transfert de gènes (FAO/OMS, 2002). A ce titre les bactéries les plus connues par leur historique non pathogène sont les lactobacilles, les bifidobactéries, les entérobactéries et les lactococcus (Borriello *et al.*, 2003; Marteau *et al.*, 2006).

### **2.4.2- Critères technologiques**

Du point de vue technologique, les souches probiotiques doivent posséder plusieurs qualités telles que la facilité à être cultivée à de hautes densités cellulaires, la viabilité durant le traitement technologique, la conservation de leurs propriétés biologiques et leur stabilité au cours des procédés de production et de stockage (Saarela *et al.*, 2002).

### **2.4.3- Critères fonctionnels**

La définition actuelle des probiotiques insiste sur le paramètre de viabilité, ce dernier explique que la souche probiotique doit conserver sa viabilité jusqu'à l'arrivée à son site d'action. Ceci est assuré par la résistance à l'acidité gastrique ainsi qu'aux sels biliaires (Simon et Gorbach, 1987; Heatley et Sobala, 1993 ; FAO/OMS, 2002). L'adhésion à la muqueuse intestinale est aussi un critère très important pour que les probiotiques persistent plus long temps dans le côlon (Goktepe *et al.*, 2006). En revanche, leurs aptitudes à produire des effets bénéfiques sur la santé a resté toujours un sujet délicat à évaluer dû à l'ignorance du vrai mécanisme d'action des probiotiques (Organisation mondiale de Gastroentérologie, 2008). En outre, l'aptitude de produire des agents antimicrobiens a été considérée parmi les critères fonctionnels les plus recommandés pour sélectionner une souche probiotique (Idoui, 2008).

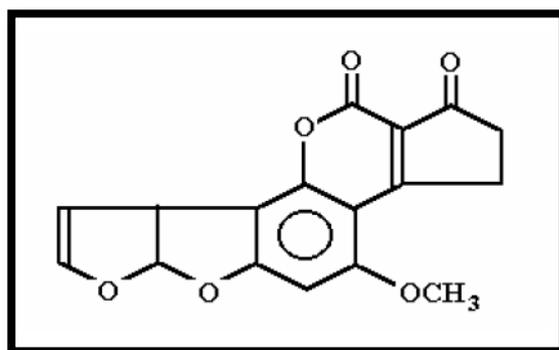
#### **2.4.3.1- Effet antimycotoxinogène**

Les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire des moisissures pouvant se développer sur la plante au champ ou en cours de stockage et pourvue de potentialités toxiques pour l'homme et pour les animaux (Agence Française de Sécurité Alimentaires des Aliments, 2006). Il existe plus de 300 métabolites secondaires fongiques, mais seule une trentaine possède des caractéristiques toxiques préoccupantes (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Certains microorganismes dits à potentiel antimycotoxinogène, sont capables d'inhiber la

production de mycotoxine par les champignons (Magjeed, 2005). Il est très important de signaler que ce critère a été bien développé dans le présent travail.

#### 2.4.4.1- Aflatoxines

Les aflatoxines (AF) sont des agents considérés cancérigènes pour l'homme depuis 1991 (Rapport des carcinogène, treizième édition, 1998). Les aflatoxines regroupent une famille de composés relativement proches, dont, l'aflatoxine B1 (figure 2) est la plus abondante et la plus toxique (Adams *et al.* 2002).



**Figure 2** Structure chimique de l'aflatoxine B1

Les aflatoxines ne présentent pas un profil toxicologique sauf lorsqu'elles sont métabolisées, c'est-à-dire, transformée en plusieurs métabolites intermédiaires (Pfohl-Leskowicz, 1999). Le tableau 2 illustre les différentes propriétés physiques de ces mycotoxines (Cole *et al.*, 2003).

**Tableau 2** Propriétés physiques des aflatoxines (Cole *et al.*, 2003).

Aflatoxine	Formule moléculaire	Masse moléculaire	Point de fusion
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240
M <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	299
M <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	293
B <sub>2A</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	240
G <sub>2A</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	346	190

#### 2.4.4.2- Champignons mycotoxinogènes

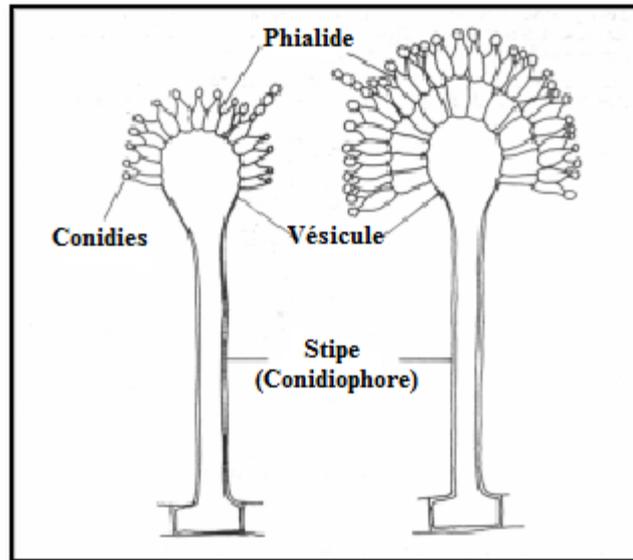
Les mycotoxines sont produites essentiellement par cinq genres de champignons: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Miller et Trenholm, 1994) (tableau 3). Les champignons majeurs connus comme précurseurs de l'OTA et de l'AFB1 qui sont impliqués dans la chaîne alimentaire humaine et animale, appartiennent principalement aux genres : *Aspergillus* et *Penicillium* (Delage *et al.*, 2003 ; Lopez De Cerain *et al.*, 2002 ; Filali *et al.*, 2001 ; Otteneder et Majerus, 2000).

**Tableau 3** Moisissures et leurs mycotoxines (Agence Française de Sécurité Alimentaires des Aliments)

<b>Mycotoxine</b>	<b>Principales moisissures productrices</b>
Aflatoxines B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
Ochratoxine A	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i>
Patuline	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Byssoschlamys nivea</i>
Fumonisines B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub>	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>
Trichothécènes (DON)	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i>
Zéaralène	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i> .
Alcaloïdes d'ergot (dit ergot du seigle)	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. Africana</i>
Citrinine	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. niveus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i>
Toxines d' <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i> ,
Acide cyclopiazonique	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Penicillium</i> dont <i>P. camemberti</i> ,
Stérigmatocystine	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. flavus</i>
Sporidesmines	<i>Pithomyces chartarum</i>
Stachybotryotoxines	<i>Stachybotrys chartarum</i>
Toxines d'endophytes (ergovaline, lolitrène B)	<i>Neotyphodium coenophialum</i> , <i>N. lolii</i>
Phomopsines	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>
Toxines trémorgènes	<i>Penicillium roquefortii</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. puberulum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i>

- **Le genre *Aspergillus***

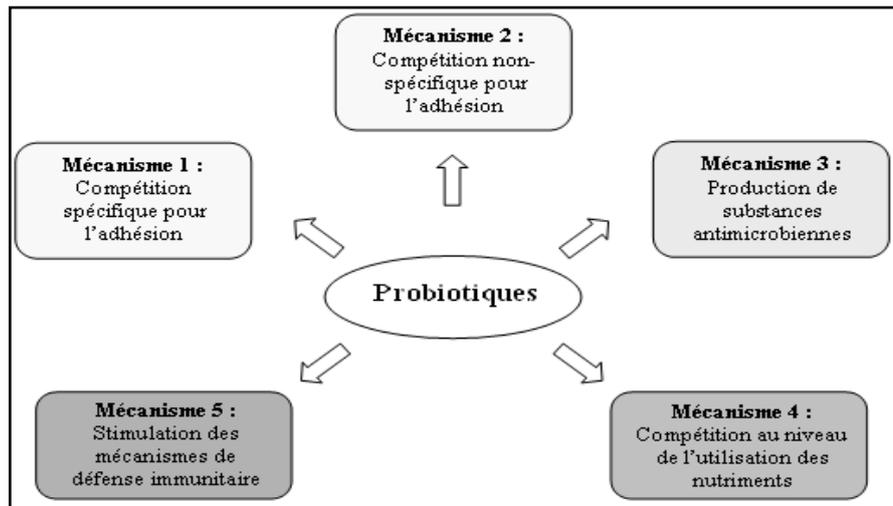
Les espèces d'*Aspergillus* sont considérées comme des agents de détérioration (Pitt *et al.*, 1977 ; Cahagnier *et al.*, 1998). elles fait partie de l'embranchement des *Ascomycota*, classe des *Eurotiomycètes*, ordre des *Eurotiales* , famille des *Trichomaceae* (Catalogue of life, 2016). Les aspergillus sont caractérisés par la formation de conidiophores. Les vésicules sont souvent sphériques et rugueuses, parfois, étirées ou gonflées, portent les métules et les phialides ou uniquement les phialides (Pitt *et al.*, 1977 ; Cahagnier *et al.*, 1998) (figure 3).



**Figure 3** Caractères morphologiques des *Aspergillus* (Samson *et al.*, 1981)

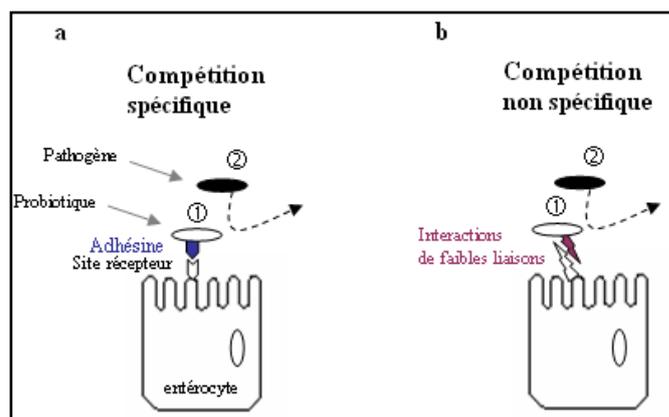
## 2.5- Mécanisme d'action des probiotiques

Les probiotiques agissent principalement en stimulant les interactions entre l'intestin (cellules épithéliales intestinales), le système immunitaire (cellules immunocompétentes) et le contenu digestif (nutriments et flore endogène) (Backhed *et al.*, 2005). En revanche, les mécanismes d'action des probiotiques sur l'hôte sont complexes, multiples (figure 4) et dépendent de la souche microbienne considérée (Rambaud, 1993). En outre, les vrais mécanismes d'action des probiotiques restent méconnus (Organisation mondiale de Gastroentérologie, 2008).



**Figure 4** Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le traitement des infections entériques, Adapté de Calder et Kew (2002); Kaur *et al.*, (2003).

Les deux premiers mécanismes d'action des probiotiques sont la compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion, ceci concerne leurs capacités d'adhésion à la muqueuse intestinale, en tenant compte que la plupart des infections intestinales sont dû à l'adhésion des pathogènes aux entérocyte. Cependant, certaines souches de *Bifidobactérium* et de *Lactobacillus* auraient la capacité de bloquer l'accès vers ces cellules (Gill, 2003; Servin et Coconnier, 2003; Servin, 2004; Picard *et al.*, 2005) par une compétition à l'adhésion (figure 5). Ce mécanisme d'action serait similaire à celui exercé par le microbiote intestinal face aux infections microbiennes (Liévin-Le Moal et Servin, 2006).



**Figure 5** Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques.

L'activité antibactérienne et antivirale, par la sécrétion directe de bactériocines sont des principales propriétés des probiotiques (Cotter *et al.*, 2005). Une influence importante des bactéries de l'intestin sur la fonction immunitaire est suggérée par un grand nombre de structures lymphoïdes organisées dans la muqueuse de l'intestin grêle (plaques de Peyer).

Certains composés exocellulaires ou endocellulaires des micro-organismes (pathogènes ou non) sont impliqués dans les effets immunomodulateurs (Medzhitov *et al.*, 1997). Les effets des probiotiques sur l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes Gram négatif, et sur la stabilisation de la barrière épithéliale sont également associés à une diminution de la translocation bactérienne. Ainsi chez l'animal, le traitement par certains probiotiques tels que *Bacillus longum* (Suzuki *et al.*, 1997) ou *S. boulardii* (Berg *et al.*, 1993) diminue la translocation bactérienne.

## **2-6 Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaines**

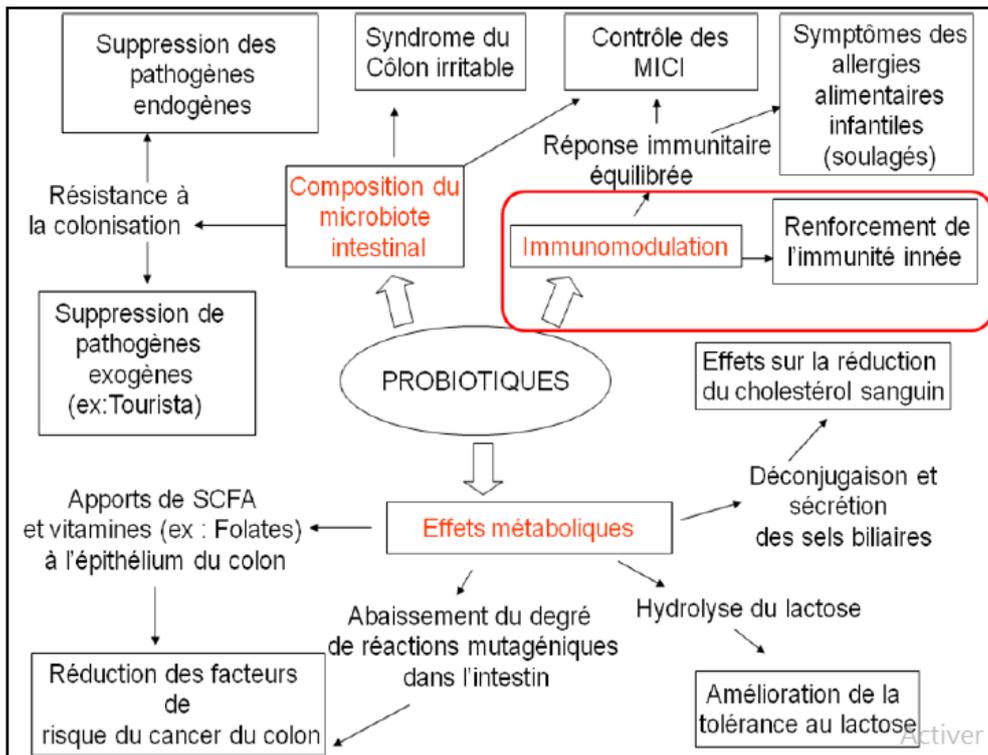
Les micro-organismes probiotiques peuvent être très différents les uns des autres. Les différences intrinsèques entre probiotiques concernent le génome, la composition de la paroi, les enzymes, les propriétés technologiques, la résistance à diverses agressions rencontrées dans le tube digestif (acide, bile..), la capacité d'adhérence aux cellules épithéliales en culture ou à du mucus et la capacité de produire des substances antimicrobiennes (Olivier, 2007). Ceux-ci impliquent que les effets bénéfiques de ces microorganismes diffèrent de l'un à l'autre (figure 6) (Saarela *et al.*, 2000) . En conséquence, les affirmations sur le bénéfice apporté par les probiotiques sont variées et non applicables sur toute les espèces dites probiotiques. Il est important de mentionner que les effets de la promotion de la santé dépendent de la souche présente dans la formulation du produit, et qu'il n'y a pas une souche probiotique en mesure de fournir tout les avantages (Olivier, 2007 ; Shah, 2007) (figure 7).

### **2.6.1-Troubles gastro-intestinaux**

Des études ont établi les effets des probiotiques sur un grand nombre de troubles gastro-intestinaux, y compris les diarrhées, les maladies inflammatoires de l'intestin, le syndrome de l'intestin irritable et les infections vaginales (Organisation mondiale de Gastroentérologie, 2008).

#### **2.6.1.1- Constipation**

Les lactobacilles ayant un effet sur la constipation (selles difficiles, dureté excessive des selles, transit intestinal lent) et permettent de réduire l'utilisation de laxatifs. Ces derniers ont l'inconvénient d'éliminer différentes substances essentielles à l'organisme comme les acides aminés, les minéraux, etc., (Guarner *et al.*, 2008).



**Figure 6** Présentation des effets bénéfiques des probiotiques (Saarela *et al.*, 2000).

### 2.6.1.2- Intolérance au lactose

Un grand nombre d'études contrôlées portant sur des individus consommant des yaourts avec des cultures vivantes a confirmé l'efficacité de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bilgaricus* dans l'amélioration de la digestion du lactose et la réduction des symptômes liés à son intolérance (Organisation mondiale de Gastroentérologie, 2008).

### 2.6.1.3- Diarrhée

L'administration orale d'une souche probiotique spécifique s'est révélée efficace chez un sujet en bonne santé ou comme option thérapeutique dans, au moins, un essai clinique correctement conduit et élaboré (tableau 4).

**Tableau 4** Indications basées sur l'évidence pour les probiotiques en gastroentérologie (Organisation mondiale de Gastroentérologie, 2008)

Pathologie	Produit	Dosage recommandé
Traitement de la diarrhée infectieuse aiguë chez l'enfant	<i>L. rhamnosus</i> GG	10 <sup>10</sup> -10 <sup>11</sup> cfu, 2 fois par jour
	<i>L. reuteri</i> ATTC 55730	10 <sup>10</sup> -10 <sup>11</sup> cfu, 2 fois par jour
	<i>L. acidophilus</i> + <i>B. infantis</i> (souches d'Infloran)	10 <sup>9</sup> cfu chaque, 3 fois par jour
	<i>S. cerevisiae</i> ( <i>boulevardii</i> ) lyo	200 mg, 3 fois par jour
Traitement de la diarrhée infectieuse aiguë chez l'adulte	<i>Enterococcus faecium</i> LAB SF68	10 <sup>8</sup> cfu, 3 fois par jour
Prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques chez l'enfant	<i>S. cerevisiae</i> ( <i>boulevardii</i> ) lyo	250 mg, 2 fois par jour
	<i>L. rhamnosus</i> GG	10 <sup>10</sup> cfu, 1 ou 2 fois par jour
	<i>B. lactis</i> Bb12 + <i>S. thermophilus</i>	10 <sup>7</sup> + 10 <sup>6</sup> cfu/g de formule
Prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques chez l'adulte	<i>Enterococcus faecium</i> LAB SF68	10 <sup>8</sup> cfu, 2 fois par jour
	<i>S. cerevisiae</i> ( <i>boulevardii</i> ) lyo	1 g or 3 × 10 <sup>10</sup> cfu par jour
	<i>L. rhamnosus</i> GG	10 <sup>10</sup> -10 <sup>11</sup> cfu, 2 fois par jour
	<i>L. casei</i> DN-114 001 dans le lait fermenté avec <i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	10 <sup>10</sup> cfu, 2 fois par jour
	<i>B. clausii</i> (souches d'Enterogermina)	2 × 10 <sup>9</sup> spores, 3 fois par jour
	<i>L. acidophilus</i> CL1285 + <i>L. casei</i> Lbc80r	5 × 10 <sup>10</sup> cfu, 1 dose par jour

#### 2.6.1.4- Infection intestinale par *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* est un agent pathogène à GRAM négatif, responsable de la gastrite de type B, d'ulcère et du carcinome gastrique (Hart, Shears, 1997).

Actuellement, l'évidence de l'efficacité des probiotiques sur cette souche sans l'utilisation d'antibiotique est insuffisante, de ce fait, une méta-analyse de 14 essais randomisés de la part de World Gastroenterology Organisation faite en 2008 suggère que la supplémentation de traitements antibiotiques anti-*H.pylori* avec certains probiotiques peut être efficace pour augmenter les taux d'éradication et se révéler utile chez les patients chez qui on ne peut procéder à une bonne éradication (Mozzi, 2010)

#### 2.6.1.5- Maladie de Crohn

Les études menées par l'Organisation mondiale de Gastroentérologie dans le cadre de la maladie de Crohn ont été décevantes et ils ont conclu qu'il n'existe aucune évidence pour

suggérer un bénéfice causé par les probiotiques pour le maintien de la rémission ans une maladie de Crohn (Lerebours, 2001).

#### **2.6.1.6- Syndrome de l'intestin irritable (IBS)**

Le syndrome du côlon irritable est un désordre gastro-intestinal multifactoriel, caractérisé par des douleurs abdominales, de la flatulence, une variation de la consistance des selles (constipation, diarrhée) ou de la dyspepsie. Ces symptômes sont souvent liés à une microflore anormale avec un plus grand nombre d'organismes anaérobies facultatifs du genre *Klebsiella* et des entérocoques associés à une diminution des lactobacilles et des bifidobactéries. (Halpern, 1996).

Les effets bénéfiques des probiotiques sur ce syndrome ne sont pas encore confirmé, à cause de l'absence de résultats significatifs, par contre, l'utilisation préventive est plus au moins confirmée. Plus de recherches pourraient être nécessaires pour identifier les cas exacts où les probiotiques peuvent être utiles et choisir les associations de probiotiques les plus efficaces (Carbonnel, 1999).

#### **2.6.1.7- Cancer du colon**

D'un part les chercheurs pensent que les probiotiques ont un effet probable de réduction de risques de cancer de côlon chez le modèle animal par la réduction de l'activité de certaines enzymes bactériennes qui pourraient augmenter les niveaux de procarcinogènes, mais ceci n'a pas été même pas prouvé chez l'humain (Rowland, 2004 ; Organisation mondiale de Gastroentérologie, 2008).

#### **2.6.2- Modulation de l'immunité**

L'intestin est l'organe le plus important sur le plan de la fonction immunitaire : approximativement 60 % des cellules immunitaires du corps sont présentes dans la muqueuse intestinale (Organisation mondiale de Gastroentérologie, 2008). En revanche, très peu d'études sont disponibles concernant les effets des probiotiques sur le système immunitaire, la plupart des travaux sont expérimentaux, in vitro ou in vivo chez l'animal, et suggèrent que certains probiotiques ont la capacité d'augmenter ou de moduler la réponse inflammatoire et immunitaire (Matsuzaki *et al.*, 2007).

#### **2.6.3- Antibiothérapie**

Plusieurs souches de lactobacilles et de bifidobactéries tout comme *Bacillus clausii*, semblent réduire les effets secondaires des thérapies antibiotiques et améliorer la compliance du patient (Matsuzaki *et al.*, 2007).

## 2.6- Effets secondaires associés à la consommation des probiotiques

La majorité des bactéries lactiques sont utilisées depuis très longtemps dans divers procédés alimentaires et possèdent une longue histoire de consommation humaine (Ishibashi et Yamazaki, 2001). Les bactéries lactiques et les probiotiques ne sont donc pas considérés comme étant des organismes pathogènes ou opportunistes et le statut « GRAS » (Generally Recognized As Safe) leur est conféré, ce qui signifie que les risques associés à leur consommation sont très faibles (Feord, 2002). La possibilité de translocation bactérienne, processus par lequel les microorganismes traversent le tractus gastro-intestinal vers d'autres parties du corps, comme les nodules lymphatiques, le sang, le foie, les reins ou la rate, semble entraîner des effets néfastes pour la santé. S'il y a perte d'intégrité au niveau de l'épithélium cutané ou intestinal découlant d'une blessure, d'un cancer ou d'une anomalie provoquée par un agent toxique, n'importe quelle bactérie présente dans l'intestin peut atteindre le sang ou certains organes et entraîner des effets néfastes (Ishibashi et Yamazaki, 2001). La crainte est qu'une consommation excessive des probiotiques accentue ce phénomène et en aggrave les conséquences. Cependant, malgré les milliards de doses de probiotiques consommés annuellement à travers le monde, les complications observées sont extrêmement rares et ne semblent se produire que dans des cas particuliers, surtout chez les patients âgés, les individus immunodéprimés ou les gens ayant de graves problèmes intestinaux (Cassone *et al.*, 2003) rapportent une épidémie de *Saccharomyces boulardii* dans l'unité des soins intensifs d'un centre hospitalier secondaire de Rome, Italie. Cette épidémie a affecté trois patients qui n'avaient pas reçu de *S. boulardii* et l'infection aurait été transmise par le site d'insertion d'un cathéter. Toutefois, une conclusion semble faire de plus en plus l'unanimité dans le domaine de probiotiques : les probiotiques ne devraient pas être administrés directement pour des maladies sévères ou chez des individus fortement immunodéprimés comme dans le cas de lésions intestinales, en raison du risque accru de translocation bactérienne. Le suivi par des médecins spécialistes devrait être réalisé dans ces cas afin de pouvoir réagir rapidement aux complications (Tamboli *et al.*, 2003).

## 2.7- Sources de microorganismes à potentiel probiotique

Les microorganismes développant des activités probiotiques sont présents dans de nombreux milieux naturels, sol, plantes en décomposition et animaux. Chez ces derniers, on les trouve dans les cavités buccales et vaginales, et surtout dans le lait. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques comme *Bifidobacterium*, et *Lactobacillus* (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001).

## 2.8.1- Lait et Produits laitiers

### 2.8.1.1- Lait de vache

La consommation du lait de vache peut conférer une protection contre les allergies (Wickens *et al.*, 2002 ; Perkin et Strachan, 2006 ; Waser *et al.*, 2007). Les composants responsables de l'effet protecteur et les mécanismes biologiques impliqués ne sont pas encore clairement identifiés bien que quelques suggestions aient été formulées. Ainsi, les lactobacilles du lait interagissant directement ou indirectement, avec le système immunitaire ce qui leur confère un caractère probiotique. De même, Debarry *et al.* 2007 ont montré que des bactéries abondantes dans l'intestin comme *Lactococcus lactis*, avaient un effet protecteur chez la souris contre le développement d'une maladie allergique telle que l'asthme.

### 2.8.1.2- Lait de chamelle

Le lait de chamelle peut êtreensemencé par de nombreuses espèces microbiennes. Pour certaines, il constitue un bon milieu de culture, ce qui leur permet de s'y développer. En raison de la grande diversité des bactéries présentes dans ce dernier, il a été utilisé comme agent antifongique probiotique (Magjeed, 2005 ; Alaoui, 2016).

### 2.8.1.3- Produits laitiers

Les produits laitiers sont définis comme « Les produits dérivés exclusivement du lait, étant entendu que des substances nécessaires pour leur fabrication peuvent être ajoutées, pourvu que ces substances ne soient pas utilisées en vue de remplacer, en tout ou partie, l'un quelconque des constituants du lait » (Règlement européen CEE, n°1898/87). Le terme frais est par rapport à la date limite de consommation (DLC), cette dernière qui est inférieure ou égale à 30 jours. Les bactéries les plus fréquemment utilisées comme probiotiques sont des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* (Khan & Ansari, 2007). Dans la majorité des cas, les produits laitiers tel le yaourt, lait fermenté, fromages, lait en poudre, crème glacées ont été choisis comme véhicules privilégiés des cultures probiotiques. Les lactobacilles ont été incorporés dans des laits fermentés (Christiansen *et al.*, 1996; Gomes & Malcata, 1998 ; Heller, 2001 ; Oliveira *et al.*, 2001 ; Doleys *et al.*, 2002 ; Nayra *et al.*, 2002).

## 2.8.2- Le sol

Le sol est un milieu oligotrophe, la plus part des microorganismes telluriques (algues, protozoaires, champignons, levures, bactéries) sont impliqués dans de nombreux processus biogéochimiques (Richaume *et al.*, 2006). Il existe une grande diversité des communautés microbiennes dans le sol tant du point de vue de la diversité taxonomique que du point de vue

des fonctions. En effet, il est estimé, par exemple, qu'un gramme de sol contient environ  $10^{10}$  à  $10^{11}$  bactéries (Horner-Devine *et al.* 2003). Un grand nombre des probiotiques est isolé de ce milieu, surtout les *Lactobacillus* (Lidan *et al.*, 2013).

### 3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur la recherche de microorganismes, de différents écosystèmes, développant une activité probiotique. La partie expérimentale est réalisée au sein du Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri, Constantine.

#### 3.1- Echantillonnage

Les échantillons utilisés sont de différentes natures et de différents écosystèmes.

##### 3.1.1- Echantillons du lait

Le premier échantillon est un échantillon du lait de vache qui provient des fermes d'élevage situées dans la région de **Tedjnet** (Wilaya de **MILA**) et le deuxième échantillon concerne le lait de chamelle (race blanche), qui a été collecté de la Wilaya de **OUERGLA**. Les prélèvements ont été réalisés dans des conditions aseptiques et les échantillons ont été recueillis dans des flacons stériles afin de les transporter, dans les normes de sécurité, jusqu'au laboratoire (figure 7).



**Figure 7** Lait de chamelle et lait de vache

### 3.1.2- Echantillons du sol

L'échantillon du sol saharien a été prélevé à partir d'une palmeraie de la région d'**EL-OUED** et l'échantillon du sol des champs de blé a été collecté de la wilaya d'**EI-TAREF**. Après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol, une quantité de ce dernier a été prélevée à partir d'une profondeur de 20 cm à l'aide d'une spatule stérile et introduite dans des flacons stériles afin de les transporter dans les normes de sécurité jusqu'au laboratoire.

### 3.1.3- *Aspergillus flavus*

La souche fongique, en l'occurrence *Aspergillus flavus*, utilisée dans ce travail a été fournie par le Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Chaab Erssas, Université des Frères Mentouri, Constantine, se caractérisant par sa production de l'aflatoxines B1 en quantité considérable et qui a servi de souche mycotoxinogène. Pour toute utilisation, la souche est réactivée par repiquages successifs par pique centrale sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA) (Annexe 3) en boîtes de Pétri. Les boîtes ont été incubées à 30 C°, pendant 7 jours. Le milieu PDA est un milieu favorable pour un développement rapide des champignons et pour la production des spores (Botton *et al.*, 1990).

## 3.2- Exploration des échantillons et isolement de microorganismes

Les échantillons précédents ont servi à chercher des microorganismes à activité probiotique. Pour ce faire, deux groupes de microorganismes ont été ciblés à savoir ; des bactéries lactiques et des levures.

### 3.2.1- Isolement des bactéries lactiques et des levures

#### 3.2.1.1- Préparation des dilutions

La réalisation des dilutions consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère du lait en mettant 1 mL du lait dans 9 mL d'eau physiologique stérile, suivie d'une agitation pendant 3 min. Ensuite, la préparation est laissée se reposer. À partir de cette préparation des dilutions décimales ont été préparées par l'ajout successif de 1 mL de la solution précédente à 9 mL d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de  $10^{-6}$  (Jerome *et al.*, 2004). La même méthode a été appliquée pour les échantillons du sol, en mettant 1g de ce dernier dans 9 mL d'eau physiologique pour constituer la solution mère.

### **3.2.1.2- Ensemencement**

Un volume de 0.1 mL de chacune des dilutions, préparées précédemment, a été déposé sur milieu gélosé de Man Rogosa Sharpe (MRS) pour les bactéries lactique (Annexe 1) et sur milieu Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) pour les levures (Annexe 2) (Guiraud, 1998). Ensuite, les dépôts ont été étalés uniformément avec un étaloir stérile par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose. Enfin, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h, durée nécessaire pour l'apparition des colonies de souches bactériennes et à 30°C pendant 48h pour les souches levuriennes (Tortora *et al.*, 2003).

### **3.2.2 - Purification des isolats**

Après le développement des colonies, les isolats ont été purifiés par la méthode rétro-repiquage en stries sur la surface d'une gélose neuve en boîtes de Pétri suivi d'incubation dans les mêmes conditions précédemment citées. Les colonies parfaitement isolées, ont été réensemencées et conservées.

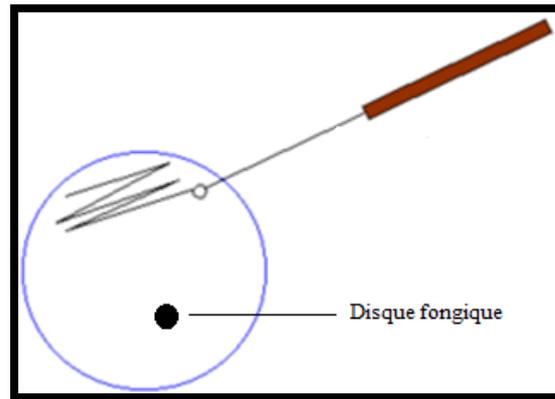
## **3.3 - Evaluation de l'effet probiotique des isolats bactériens**

Afin d'évaluer l'activité probiotique des isolats, des paramètres ont été testés à savoir ; la production des substances antimicrobiennes, l'activité antimycotoxinogène, la résistance aux sels biliaires et à l'acidité gastrique :

### **3.3.1 - Production des substances antimicrobiennes**

#### **3.3.1.1 - Sélection des isolats à effet antifongique**

La sélection des isolats à effet antifongique a été effectuée par la méthode de confrontation. Chaque isolat testé a été ensemencé sur la moitié d'une boîte contenant le milieu PDA, conjointement, l'autre moitié de la boîte a été ensemencé par un disque de la colonie fongique, objet de test (Magnusson et Schnurer, 2001). L'incubation a été réalisée à 30 °C pendant 72h (Gisela *et al.*, 2012) (Figure 8).



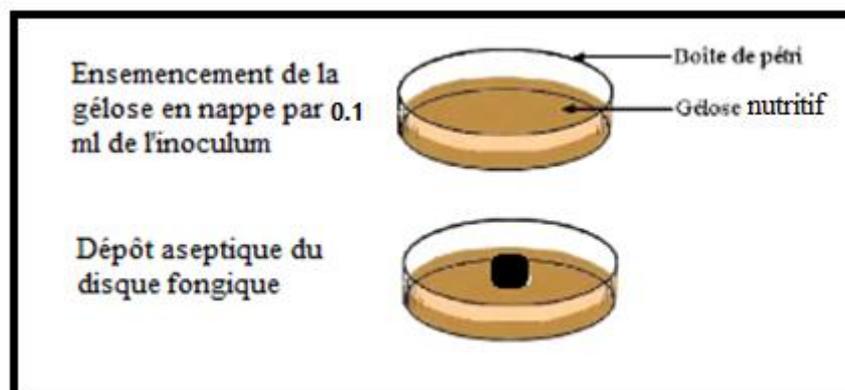
**Figure 8** Schéma représentatif du test antifongique

Après incubation une lecture de résultats a été faite pour choisir les isolats les plus performants.

### 3.3.1.2 - Étude de l'activité antimycotoxinogène

#### 3.3.1.2.1 *Activité mycotoxinogène d'Aspergillus flavus*

Afin de confirmer la production des mycotoxines par *Aspergillus flavus*, des disques coupés à l'aide d'un perforateur, contenant des colonies de ce dernier, ont été déposés sur une gélose nutritif (GN) (Annexe 4) préalablementensemencée par des bactéries test en l'occurrence; *E.coli* et *Staphylococcus aureus*. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 48 heures. L'activité est détectée par la présence d'une zone claire autour des disques (Figure 9).



**Figure 9** Test de l'activité mycotoxinogène

L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 48 heures. Le développement de l'activité est détecté par la présence d'une zone claire autour des disques.

### 3.3.1.2.2- *Fermentation en milieu liquide*

Afin de mettre en évidence l'activité antimycotoxinogène, une fermentation a été réalisée seulement avec les surnageants des isolats bactériens qui ont présentés une activité antifongique dans le test précédent (Michel, 2001).

#### ➤ *Préparation des surnageants bactériens*

Des tubes contenant 10 mL de bouillon nutritif (Annexe 5), ont été inoculés par des colonies (cultures jeunes) de chaque bactérie sélectionnée, puis ont été incubés à 30°C pendant 24h. Après cette période, les tubes sont centrifugés à 3500 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu a servi comme source de substances actives des bactéries (Michel, 2001).

#### ➤ *Préparation de la suspension sporale*

Les spores de la souche fongique (ensemencée sur milieu PDA dans des boîtes de pétri pendant 7 jours), sont récupérées par addition d'une quantité d'eau physiologique stérile, la solution obtenue est récupérée à l'aide d'une pipette stérile (Michel, 2001).

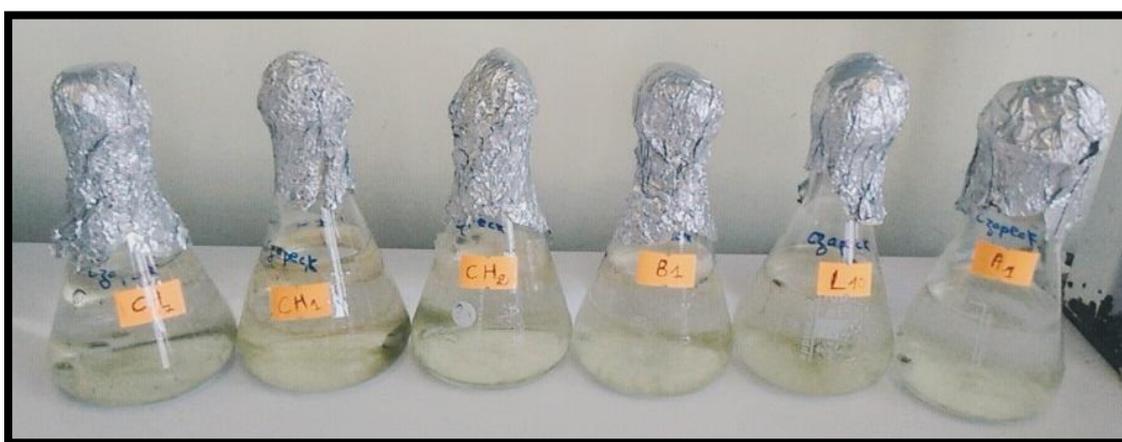
#### ➤ *Fermentation liquide*

Afin de mettre en évidence l'effet anti mycotoxinogène des substances secrétées par les isolats bactériens sélectionnés (CH1, CH2, CH7, A1, B1, L10) ; une fermentation a été réalisée dans des erlenmeyers de 500 mL contenant 150 mL de milieu Czapek (Annexe 6) pour fermentation liquide, ensuite les erlenmeyers ont été stérilisés à 121° C pendant 15 min (Botton *et al.*, 1990). 5 mL du surnageant microbien récupéré précédemment, ont été transférés dans les erlenmeyers, conjointement avec 5 mL de la suspension sporale. Le témoin est préparé de la même manière sans l'ajout du surnageant bactérien. Les erlenmeyers ont été incubés à 30°C pendant 10 jours. L'aspect de milieu de fermentation est présenté par la figure 10.

#### ➤ *Extraction d'Aflatoxine B1*

Après 10 jours d'incubation, le contenu des milieux de fermentation est filtré à travers du papier wattman n°1. La biomasse obtenue a été séchée à 105 °C pendant 6h, puis, pesée afin de déterminer son poids sec. Alors que le filtrat est additionné de différents volumes de chloroforme en trois phases : la 1<sup>ère</sup> phase (100mL), la 2<sup>ème</sup> phase (50mL) et la 3<sup>ème</sup> phase (30mL) et ce, pour un volume de 50 mL du filtrat. Dans la première phase le mélange a été mis dans des ampoules à décanter et agité pendant 10 min. après séparation de phases, la

phase aqueuse a été reprise de nouveau dans 30mL de chloroforme et l'opération de mélange et de décantation a été répétée, la phase aqueuse a été reprise dans 30 mL de chloroforme pour extraire la totalité de la mycotoxine (Gacem, 2011) ( tableau 5). Les phases chloroformiques ont été ensuite concentrées par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor, dont la température ne dépasse pas les 50°C.



**Figure 10** Aspect du milieu de fermentation

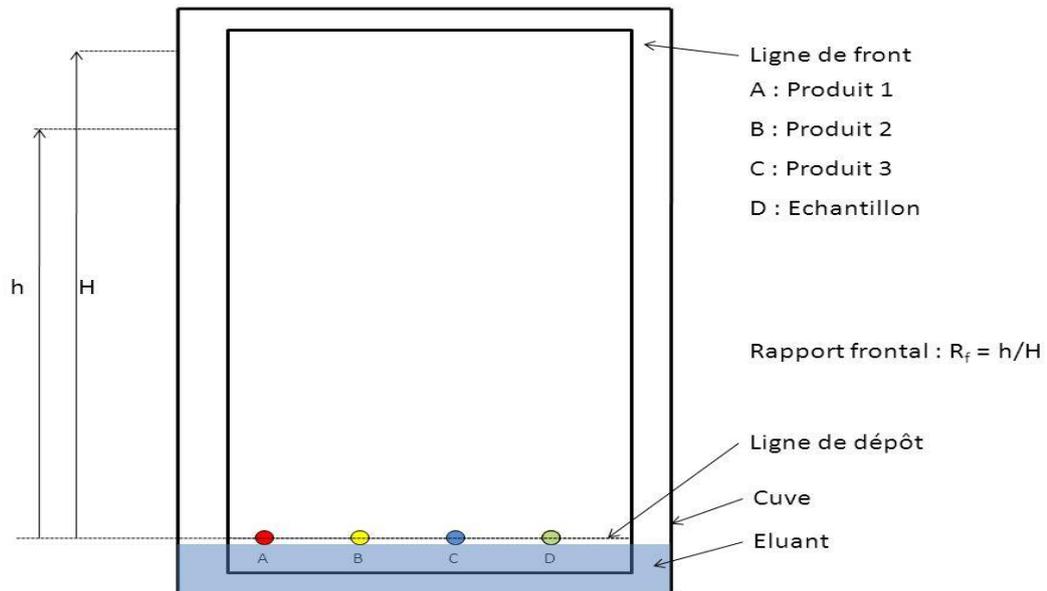
**Tableau 5** Différents volumes de chloroforme additionné en trois phases

Isolats bactériens	Volume du filtrat (mL)	Volume de chloroforme		
		Phase 1 (mL)	Phase2 (mL)	Phase 3 (mL)
Témoin	162	224	126	75.5
CH 1	132	264	132	79.2
CH 2	127	254	127	76.2
CH 7	132	264	132	79.2
A 1	126	252	126	75.6
B 1	154	308	154	92.4
L 10	136	272	136	81.6

#### ➤ Séparation chromatographique

La séparation a été faite sur une plaque de gel de silice (gel de silice 60 F254). Pour ce faire, des spots de 20  $\mu$ L de chaque extrait chloroformique et 5 $\mu$ L de solution standard d'aflatoxine B1 ont été déposés sur la même ligne de la même plaque (ligne de dépôt) (figure 11). La plaque a été, ensuite, placée verticalement dans une cuve chromatographique contenant le solvant d'éluion constitué de toluène, d'acétate d'éthyle et d'acide formique à v/v/v de 20 ;

16 ; 4 mL respectivement. La plaque est déposée de telle façon que la ligne de dépôt soit en parallèle avec le front de migration du solvant (Multon, 1982). Après la migration, la plaque a été retirée de la cuve et séchée à l'air libre. La révélation a été faite par exposition de la plaque aux rayons UV de longueur d'onde de 365nm.



**Figure 11** Chromatographie sur couche mince ( Multon, 1982)

### 3.3.1.3 - Résistance aux sels biliaires

La résistance des isolats bactériens aux sels biliaires a été déterminée dans des tubes à essai contenant le bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) (Annexe 7), les tubes ont été inoculés avec une culture jeune des isolats bactériens puis incubés à 30°C pendant 24h. Le test est considéré positif s'il ya un trouble signifiant une concentration cellulaire importante.

### 3.3.1.4 - Résistance à l'acidité gastrique

Chaque isolat bactérien a été ensemencé séparément dans des boîtes de pétri contenant le milieu gélosé (GN) et dans des tubes contenant 10 mL de bouillon nitritif (BN), le pH est ajusté à 3.5. Le témoin est préparé de la même manière en ajustant le pH à 7.2. L'incubation est faite à 30°C pendant 48h (Gibson *et al.*, 2005).

## **3.4 - Identification des isolats bactériens à potentiel probiotique**

### **3.4.1- Observation macroscopique**

L'étude de l'aspect macroscopique consiste en une observation à l'œil nu de la taille (petite, moyenne, grande), la forme de la colonie (ronde, irrégulière...), transparence, élévation de la colonie, type de colonie et le relief (Guiraud, 1998).

### **3.4.2- Observation microscopique**

#### ***3.4.2.1 - Observation à l'état frais***

La technique de la goutte pendante utilisée consiste à déposer une goutte de la culture bactérienne jeune sur une lamelle et à recouvrir la lamelle par une lame creuse, puis la lame est inversée de manière à obtenir une goutte pendante dans le creux. Ensuite, la lame est examinée au microscope optique à l'objectif (40X) puis à immersion (100X), cette technique permet d'observer les bactéries vivantes et leur morphologie (Singleton, 2005).

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

Cet examen a été effectué selon la méthode classique suivante : les frottis utilisés sont étalés à l'aide d'une anse sur des lames en verre propre. Les lames sont ensuite séchées à l'air à proximité d'un bec Bunsen, puis fixées par la chaleur en les passant deux ou trois fois sur la flamme. Les frottis préparés sont colorés pendant 1 minute au cristal violet, qui est un colorant basique, ils sont ensuite, inondés rapidement par une solution de lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de Potassium) qui agit comme un mordant, c'est-à-dire, il augmente les interactions entre le colorant et la cellule pour que cette dernière soit contrastée. Sans rincer en inclinant les lames, les frottis sont ensuite décolorés par lavage avec un mélange d'éthanol (1 à 3 secondes). Juste après, la décoloration est arrêtée rapidement par lavage à l'eau du robinet. Dans la dernière étape, les frottis sont soumis à une contre-coloration de 30 secondes à la fuchsine basique diluée. Après un bref rinçage, les frottis sont séchés par le papier buvard et examinés par microscope jusqu'à l'objectif à immersion (grossissement X100) (Singleton, 2005). La couleur violette due au cristal violet est l'aspect caractéristique des bactéries à coloration Gram positive, les bactéries Gram négative se colorent en rose par la fushine (Tortora *etal.*, 2003).

### 3.4.3- Tests biochimiques

#### 3.4.3.1- Test de catalase

La catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et en oxygène synthétisée par la plupart des bactéries aérobies, elle élimine le peroxyde d'hydrogène produit au cours du métabolisme aérobie. Le test de la catalase sert à détecter la présence de cette enzyme dans une souche bactérienne donnée. Il consiste essentiellement à exposer les cellules bactériennes au peroxyde d'hydrogène, la présence de catalase se manifeste par la formation de bulles (oxygène). Dans la version traditionnelle du test, un prélèvement bactérien a été transféré au moyen d'une boucle dans une goutte de peroxyde d'hydrogène et déposé sur une lame. Avec cette technique, si le test est positif, les bulles en éclatant donnent naissance à un aérosol. Pour éviter la contamination de l'environnement par des aérosols, une autre méthode a été utilisée en prélevant 1 mL d'une solution d'eau oxygénée 3 % (Prescott *et al.*, 2007) et la déposée dans un tube contenant une solution d'eau physiologique stérile et une colonie de la souche à identifier. Une réaction positive se traduit par l'apparition de bulles (Guiraud, 1998).

#### 3.4.3.2- Test d'oxydase

Le test oxydase permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme capable d'oxyder le substrat utilisé et ne signifie pas la présence d'une oxydase particulière (Guiraud, 1998). Le substrat utilisé est l'oxalate de diméthyl-paraphénylène-diamine sous forme d'un disque du papier filtre. Ce dernier est placé sur une lame puisensemencé, par une goutte de culture bactérienne jeune. La présence de l'oxydase se manifeste par une coloration violette après 30 secondes, lorsque la bactérie est oxydase positive (Singleton, 2005).

#### 3.4.3.3- Test de nitrate – réductase

Ce test détecte si un organisme est capable de réduire le nitrate. La recherche de nitrate réductase (NR) est réalisée sur un bouillon nitraté (Annexe 8), par les réactifs de Griesse (Annexe 9 et 10) qui permet de détecter le nitrite. Le test consiste à cultiver l'organisme dans un bouillon nitraté à 28°C pendant 48h à 72h. Après incubation le milieu est examiné pour savoir s'il y a réduction des nitrates en nitrites.

Pour détecter la présence du nitrite, 0,5 ml de réactif 1 et 0,5 mL du réactif 2 de Griesse ont été ajoutés. Ces réactifs se combinent à tout nitrite présent pour former un virage de couleur vers le rouge azoïque soluble. L'absence de coloration rouge peut signifier, soit que le nitrate

n'a pas été réduit, soit que le nitrite s'est formé mais a été ensuite réduit, soit, en azote, soit en ammoniac (Singleton, 2005).

#### **3.4.3.4- Production d'indole**

Le test de l'indole permet de savoir si un organisme peut produire de l'indole à partir du tryptophane. Les souches bactériennes ont été mises dans de l'eau peptonée (Annexe 11) pendant 48 heures à 30°C. Après l'incubation, 3 gouttes du réactif de Kovacs ont été ajoutées puis, la réaction est lue immédiatement après agitation. La présence d'un anneau rouge en surface indique la formation d'indole. La réaction est considérée négative si l'anneau est brunâtre (couleur du réactif) (Singleton, 2005).

#### **3.4.3.5- Détermination de la voie d'attaque des glucides**

Afin de déterminer la voie d'attaque des glucides par les bactéries, soit par voie oxydative ou fermentative, deux tubes à essai contenant le milieu MEVAG (Annexe 8) ont été utilisés, puis additionnés par une solution aqueuse stérile de glucose à 30%, ensuite, une agitation douce a été effectuée pour homogénéiser le milieu. Les tubes ont étéensemencés par la bactérie sélectionnée par piqûre centrale ; l'un des tubes est recouvert par une couche d'huile de vaseline stérile (tube fermé), l'autre est considéré ouvert (sans couche de vaseline) (Guiraud, 1998).

#### **3.4.4- Température de croissance**

Des cultures bactérienne de 48 heures ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu MRS. Ensuite les boîtes sont incubées à une température élevée de 45°C, pendant 48h.

## 4- Résultats

Ce travail porte sur la mise en évidence de différents microorganismes développant une activité probiotique, isolés à partir de différents écosystèmes (sols et laits).

### 4.1- Exploration des échantillons et isolement de microorganismes

#### 4.1.1- Isolement des bactéries et des levures

50 isolats bactériens et levuriens ont été obtenus à partir de sols et de laits. Après la purification, seulement 36 isolats ont fait l'objet de complément d'étude (tableau 6).

**Tableau 6** Isolats bactériens et levuriens obtenus à partir des échantillons de sols et laits

Profondeurs (cm)	Microorganismes isolés					
	Sol agricole (Champs de blé)			Sol saharien		
	Nombre total	Isolats bactériens	Isolats levuriens	Nombre total	Isolats bactériens	Isolats levuriens
20	06	B1, B2	B3, B4, B5, B6.	10	A1, A2, A3, A4, A5.	A6, A7, A8, A9, A10.
	Lait de vache			Lait de chamelle		
	Nombre	Isolats bactériens		Nombre	Isolats bactériens	
	10	L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10		10	CH1, CH2, CH3, CH4, CH5, CH6, CH7, CH8, CH9, CH10.	

Parmi les 36 isolats, 27 isolats sont des bactéries et 9 sont des levures. En effet, 2 isolats bactériens ont été obtenus à partir de sol agricole (B1, B2), 5 ont été isolés de sol saharien (A1, A2, A3, A4, A5), 10 à partir de lait de vache (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10), et 10 autres sont obtenus du lait de chamelle (CH1, CH2, CH3, CH4, CH5, CH6, CH7, CH8, CH9, CH10). Par ailleurs, 4 isolats levuriens ont été obtenus à partir du sol agricole (B3, B4, B5, B6.), et 5 autres ont été isolés du sol saharien (A6, A7, A8, A9, A10).

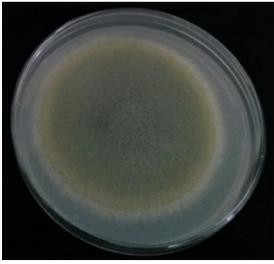
#### 4.1.2- Etude morphologique d'*Aspergillus flavus*

Une étude morphologique se basant sur l'aspect macroscopique et microscopique a été développée afin de confirmer l'aspect de la moisissure.

##### 4.1.2.1- Aspect macroscopique

Les caractères macroscopiques de la moisissure ont été étudiés sur le milieu PDA le plus communément utilisé à cet effet (Botton, 1990). Le tableau 7 montre l'aspect macroscopique de la colonie, de la surface, de la couleur et de la vitesse de croissance de la moisissure.

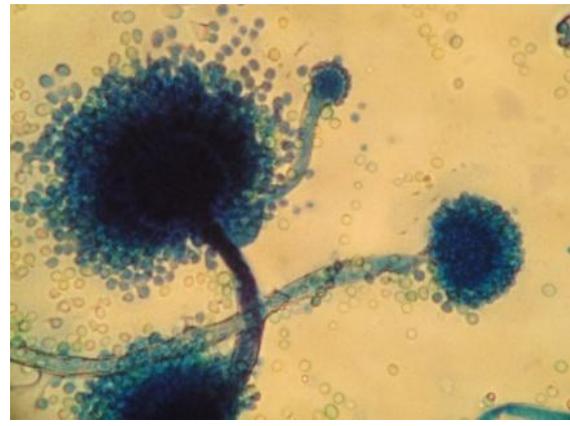
**Tableau 7** Observation macroscopique de la moisissure

Relief	Couleur	Vitesse de croissance	Texture	Face	Revers
Plane	Verte	Rapide (72h)	Poudreuse		

##### 4.1.2.2- Aspect microscopique

L'étude microscopique a porté sur l'observation des structures caractéristiques de la souche fongique. Le tableau 8 montre l'aspect de ces caractères.

**Tableau 8** Aspect microscopique de la souche fongique

Caractères microscopiques	Aspect microscopique observé
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mycélium cloisonné.</li> <li>• Conidies : Pluricellulaires et rondes.</li> <li>• Présence d'une tête aspergillaire.</li> </ul>	

Les caractères macroscopiques et microscopiques de la moisissure confirment que la souche étudiée est un *Aspergillus flavus*.

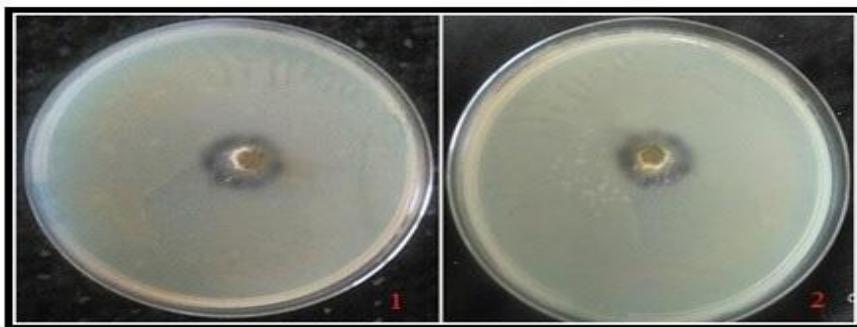
## 4.2- Evaluation de l'effet probiotique des isolats obtenus

Afin d'évaluer l'effet probiotique des isolats obtenus, trois tests ont été développés à savoir ; production des substances antimicrobiennes, résistance à l'acidité gastrique et le test des sels biliaires.

### 4.2.1- Production des substances antimicrobiennes

#### 4.2.1.1- La mise en évidence de l'activité mycotoxinogène

Ce test a été réalisé in vitro pour révéler l'activité mycotoxinogène d'*Aspergillus flavus* vis-à-vis de *E. coli* et *Staphylococcus aureus* (figure 12).



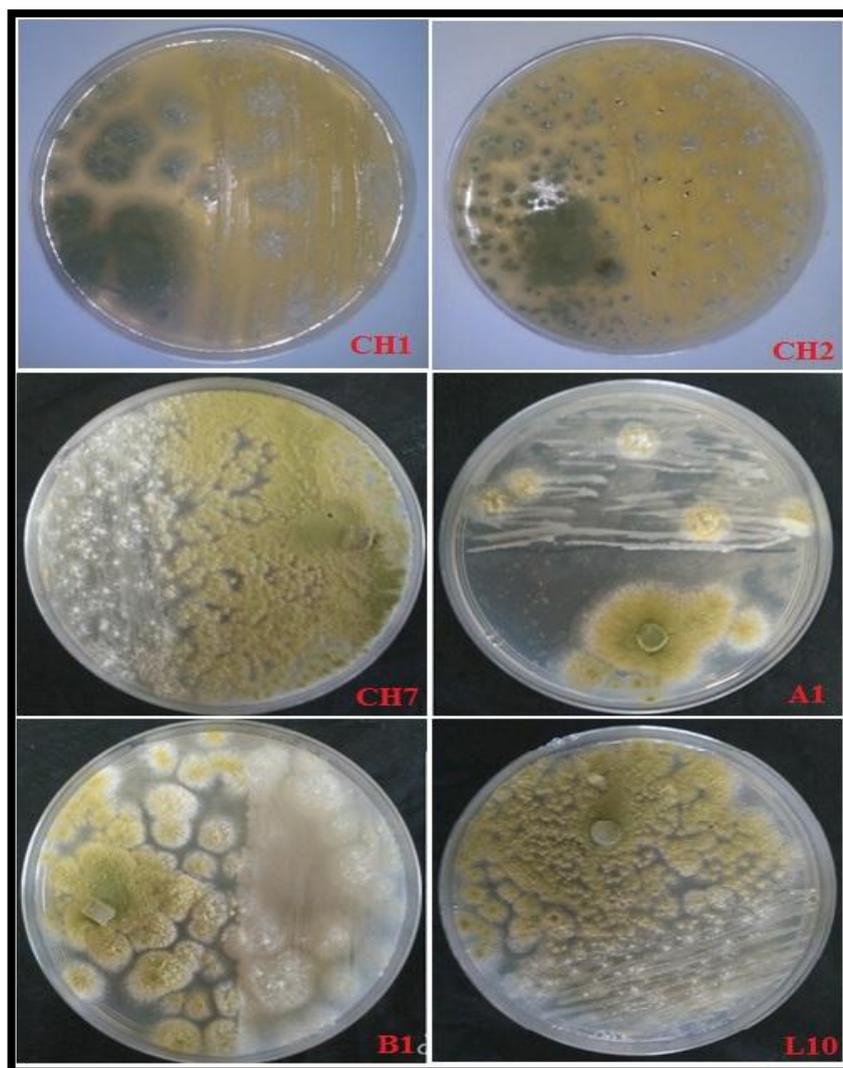
**Figure 12** Activité mycotoxinogène d'*Aspergillus flavus* vis-à-vis les bactéries tests :

1. *Staphylococcus aureus*, 2. *E. coli*

Les résultats obtenus montrent, une zone de lyse autour de disque fongique dans les deux boites contenant les bactéries test avec un diamètre de 11 mm pour *Staphylococcus aureus*, et de 10 mm pour *E. coli*. Cette observation confirme que la souche d'*Aspergillus flavus* possède une activité mycotoxinogène.

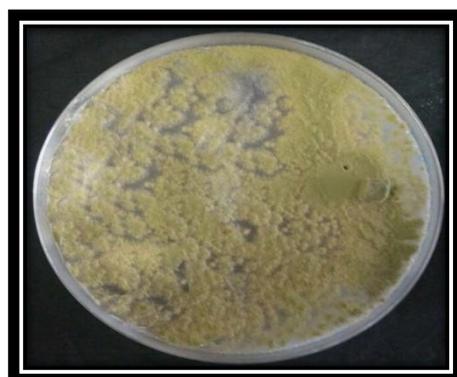
#### 4.2.1.2- Sélection des isolats bactériens et levuriens à effet antifongique

Le test de confrontation effectué pour la sélection des isolats bactériens et levuriens à effet antifongique a révélé que seulement 6 isolats bactériens (A1, B1, CH1, CH2, CH7, L10) sont capables d'inhiber la croissance de la moisissure *Aspergillus flavus* (figure 13).



**Figure 13** Résultats du test antifongique

En revanche, ce test a été considéré négatif pour les autres isolats qui n'ont pas inhibés la croissance de la souche fongique. La figure 14 montre l'effet négatif de l'un des isolats sur la croissance fongique.



**Figure 14** Test antifongique à résultat négatif

Par leurs fortes capacités à inhiber le développement de la souche fongique produisant des mycotoxines, les 6 isolats bactériens (A1, B1, CH1, CH2, CH7, L10), ont été sélectionnés pour la suite du travail.

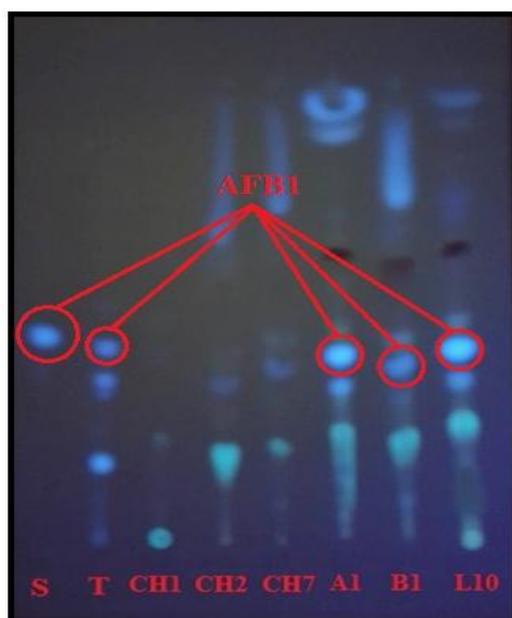
#### 4.2.1.3- Étude de l'activité antimycotoxinogène des isolats sélectionnés

L'activité antimycotoxinogène effectuée par une fermentation liquide avec les surnageants des isolats bactériens sélectionnés montre des aspects différents de milieux de fermentation et ce, après la période d'incubation (figure 15).



**Figure 15** fermentations en milieu liquide après la période de fermentation

Afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de l'aflatoxine B1 susceptible d'être synthétisée par la moisissure, une séparation des substances obtenues lors de l'extraction par le chloroforme sur gel de CCM a été effectuée. L'examen visuel sous UV après l'élution de la plaque a permis de constater la présence de plusieurs taches, dont certaines prenaient une coloration bleue fluorescence semblable à celle de l'aflatoxine B1 standard (s). En effet, trois isolats en l'occurrence ; CH1, CH2 et CH7 ont développé un effet antimycotoxinogène sur l'*Aspergillus flavus* en empêchant la synthèse de l'aflatoxines B1 dans le milieu liquide (figure 16). En revanche, les isolats (A1, B1, L10) n'ont manifesté aucun effet antimycotoxinogène sur la moisissure. La figure 16 montre clairement la production de l'aflatoxines B1 par ces isolats, du même pour la souche témoin (T).



**Figure 16** Chromatographie sur couche mince, **S**: Standard d'aflatoxine, **T** :témoin, **CH1, CH2, CH7, A1, B1, L10** : les isolats bactériens

En outre, les valeurs des rapports frontaux ( $R_f$ ) (0.41, 0.40, 0.41, respectivement) calculés selon l'équation (1) et qui sont semblables à celui du standard (0.42).

$$R_f = \frac{\text{Hauteur de la tache}}{\text{Hauteur du front du solvant}} \dots\dots\dots (1)$$

Approuvent que le surnageant des isolats bactériens A1, B1, L10 contenait réellement de l'aflatoxine B1 (tableau 9).

**Tableau 9** Calculs des rapports frontaux de différents spots en comparaison avec le  $R_f$  du standard

Standard	Témoin	CH1	CH2	CH7	A1	B1	L10
0.42	0.41	/	/	/	0.41	0.40	0.41

Sur la base des résultats obtenus, les isolats bactériens (CH1, CH2, CH7) confirment leurs activités anti mycotoxinogène. De ce fait, Ces isolats ont été sélectionnés pour effectuer les autres tests afin de confirmer leurs activités probiotiques.

#### 4.2.2- Résistance à l'acidité gastrique

Le test du pH sur milieu à pH 3.5, a montré un développement des trois souches révélé par un trouble blanchâtre dans les tubes après 48h d'incubation. La croissance des souches à pH bas est un signe positif de l'éventuelle résistance des isolats aux conditions gastriques (figure17).



**Figure 17** Test du pH sur bouillon nutritif à pH 3.5

#### 4.2.3- Test des sels biliaries

Le test des sels biliaries sur milieu BVBL, a montré une croissance de bactéries sélectionnées sur ce milieu par rapport au témoin (sans croissance) (figure 18).



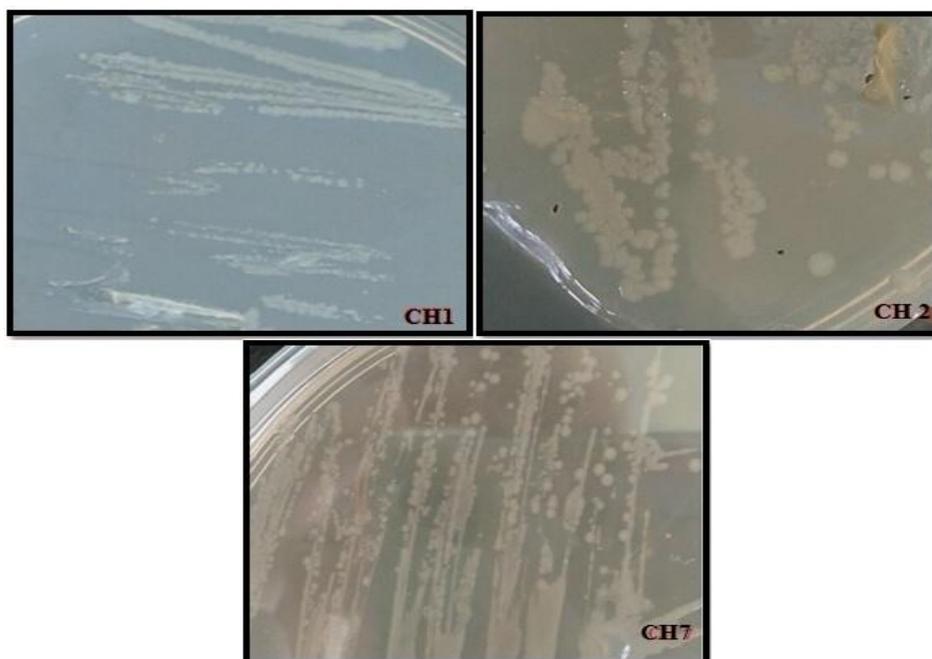
**Figure 18** Test des sels biliaries sur milieu BVBL

Sur la base des différents tests étudiés, les isolats bactériens (CH1, CH2, CH7) développent une activité probiotique. De ce fait, une identification préliminaire s'avère nécessaire pour révéler leur taxonomie.

### 4.3- Identification des isolats bactériens à effet probiotique

#### 4.3.1- Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique des isolats sélectionnés est présenté dans la figure 19



**Figure 19** Aspect macroscopique des isolats à effet probiotique

L'examen macroscopique des isolats a révélé une différence de taille, de forme et de couleur des colonies, ces observations sont récapitulées dans le tableau 10.

**Tableau 10** Aspect macroscopique des isolats sélectionnés

Les isolats	Taille	Forme	Relief	Couleur	Contour
CH 1	Petite	Ronde	Plat	Blanche	Régulier
CH 2	Grande	Ronde	Bombé	Blanche	Régulier
CH 7	Petite	Ronde	Plat	Blanche	Régulier

#### 4.3.2- Aspect microscopique par coloration de Gram

Après avoir effectué une coloration de Gram sur les trois souches bactériennes, les isolats CH1 et CH2 se sont pigmentés en couleur violette ce qui signifie que ces derniers sont de Gram - (Camille, 2007), en revanche, l'isolat CH7 s'est enluminé en rose (Gram +) (tableau 11).

**Tableau 11** Aspect microscopique des colonies

Les isolats	Aspect des colonies	GRAM
CH 1	Cocci	-
CH 2	Cocci	-
CH 7	Cocci	+

### 4.3.3- Tests biochimiques

#### 4.3.3.1- Test de catalase

Ce test a montré que les souches bactériennes ; CH 1, CH 2, CH 7 ne présentent aucune formation des bulles après le dépôt de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), signifiant qu'elles sont catalase négatif, prétendant qu'elles ne possèdent pas l'enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (tableau 12).

**Tableau 12** Résultats du test Catalase

Code de l'isolat	Test dans les tubes	Test sur lames	Résultats
CH 1			Catalase négatif
CH 2			Catalase négatif
CH 3			Catalase négatif

#### 4.3.3.2- Test oxydase

Ce test a montré que les souches bactériennes ; CH 1, CH 2, CH 7 ne présentent aucun changement de la couleur des disques, signifiant qu'elles sont oxydase négatif (figure 20).

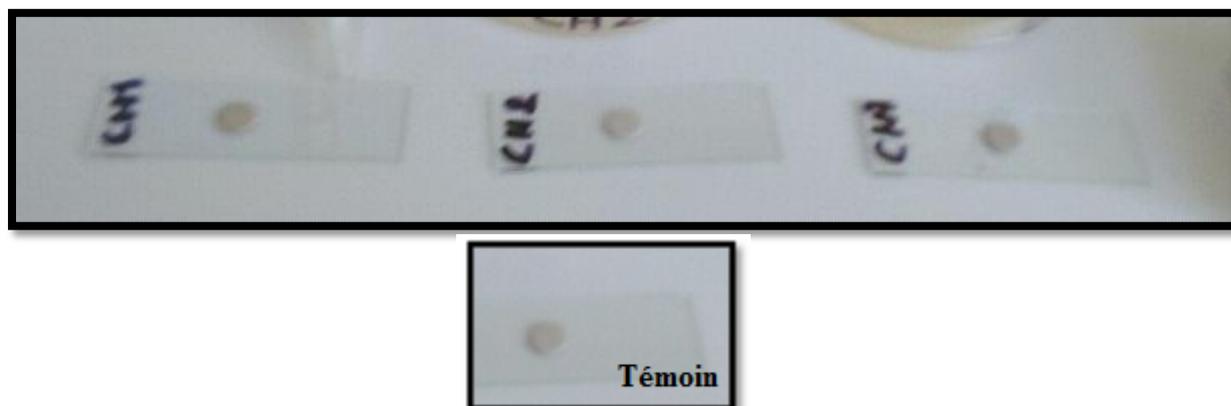


Figure 20 Test d'Oxydase

#### 4.3.3.3- Test Indole

Le test de production d'indole a révélé un résultat positif (apparition d'un anneau noir) pour les trois bactéries et ce, après l'ajout du réactif de Kovac, montrant que ces bactéries produisent de l'indole à partir du tryptophane (figure 21).



Figure 21 Test Indole

#### 4.3.3.4- Test de réduction de nitrate

Le test de nitrate réductase révèle que les trois souches (CH1, CH2, CH7) possèdent une nitrate réductase car après le dépôt des réactifs 1 et 2 de Griess, une couleur rouge orange apparaît, ce qui signifie la présence d'ions nitrites combinés aux réactifs (figure 22).



**Figure 22** Test de réduction de nitrate

#### 4.3.3.5- Détermination de la voie d'attaque des glucides

Le test de la détermination de la voie d'attaque des glucides a révélé que les trois bactéries (CH1, CH2, CH7) possèdent un métabolisme fermentaire traduit par une acidification rapide et un changement du couleur vers le jaune avec production de gaz sous la couche de l'huile (figure 23).

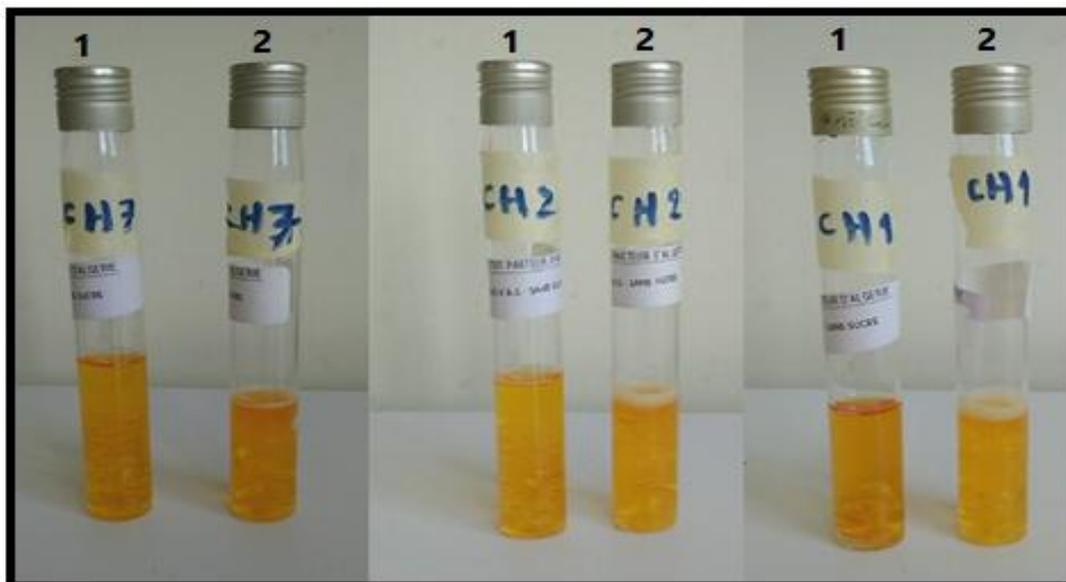


Figure 23 déterminations de la voie d'attaque des sucres

Le tableau 13 récapitule l'aspect morphologique et les différents tests biochimiques des trois souches bactériennes.

Tableau 13 Tests morphologiques et biochimiques des trois souches bactériennes

Caractères	Résultats obtenus		
	CH 1	CH 2	CH 7
Forme de la cellule	Cocci	Cocci	Cocci
GRAM	-	-	+
Catalase	-	-	-
Oxydase	-	-	-
Indole	+	+	+
Nitrate réductase	+	+	+
Voie d'attaque des sucres	Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif

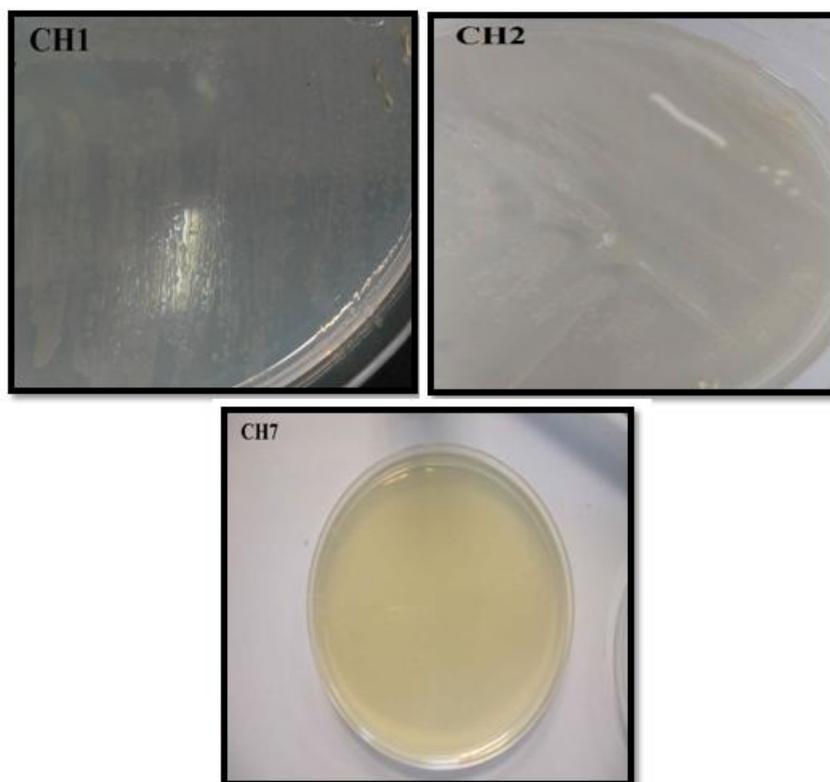
(+) : test positif, (-) : test négatif

L'identification du genre de chacune des souches bactériennes (CH1, CH2, CH7), est basée d'abord sur les clés déterminatives du genre selon Guiraud (1998). L'analyse des résultats macroscopiques, microscopiques ainsi que les tests biochimiques montrent que les trois souches bactériennes correspondent probablement aux Genres: *Enterococcus sp.* et *Lactococcus*.

#### 4.3.4- Température de croissance

Afin de confirmer le genre des bactéries, un test de croissance dans une température élevée (45°C) à été effectué. Ce test est considéré positif pour les *Enterococcus sp.*, ayant la capacité de se développer dans cette température et négatif pour les autres (absence de croissance).

Ce résultat laisse présumer que les isolats bactériens sélectionnés (CH1, CH2) appartenant au genre *Enterococcus sp.* et l'isolat (CH7) au *Lactococcus sp.* car ce dernier ne possède pas la capacité de croitre à cette température (figure 24).



**Figure 24** Développement des bactéries (CH1, CH2, CH7) à 45°C

## 5- Discussion

Durant les dernières années, des efforts considérables ont été fournis pour étudier l'activité antifongique, anti mycotoxinogène des bactéries lactiques et d'associer cette activité à leur activité probiotique (Crowely *et al.*, 2012 ; Magjeed, 2005). Dans cette optique s'inscrit la logique de ce travail qui s'articule sur les objectifs suivants :

- Isolement des bactéries et de levures à partir de différents écosystèmes (laits et sols);
- Sélection des isolats à caractères probiotiques et développant, en particulier, une activité anti mycotoxinogène ;
- Identification préliminaire des souches à potentiel probiotique.

L'exploration des échantillons du sol et du lait de vache et de chamelle a permis l'obtention de 36 isolats bactériens et levuriens, prouvant la richesse des milieux investis par des microorganismes spécifiques étant donné que l'isolement est effectué sur milieux MRS et YPGA (De Man *et al.*, 1960 ; Guiraud, 1998 ; Seppo, 2003 ; Prescott *et al.*, 2007). L'isolement des bactéries à partir du lait de chamelle constitue une piste intéressante pour la recherche des microorganismes à activités biologiques diverses (Alaoui, 2016).

La souche fongique *Aspergillus flavus* utilisée dans le présent travail a été choisie grâce à sa capacité de produire une quantité considérable de l'aflatoxines B1, un test *in vitro* a été réalisé pour confirmer son activité mycotoxinogène en étudiant sa toxicité sur des souches test : *E. coli* et *Staphylococcus aureus*, les résultats obtenus montrent que cette souche a développé une zone de lyse vis-à-vis de ces bactéries. La toxicité de l'*Aspergillus flavus* contre plusieurs bactéries est établie et signalée par nombreux travaux (Wicklowsky et Shotwell, 1983 ; Rodrigues *et al.*, 2007 ; Gisela *et al.*, 2012).

Afin d'évaluer l'activité probiotique des isolats obtenus, plusieurs tests d'activité probiotique ont été effectués et l'accent est mis sur l'activité anti mycotoxinogène. Pour ce faire, l'effet antifongique des isolats est d'abord étudié par la réalisation de la méthode de confrontation directe des isolats avec la souche mycotoxinogène en l'occurrence, *Aspergillus flavus*. Les résultats obtenus montrent que seulement 6 isolats bactériens (CH1, CH2, CH7, A1, B1, L10) ont inhibé la croissance de la moisissure et par conséquent sont jugés performants. En revanche, le test est considéré négatif pour le reste des isolats bactériens et la totalité des isolats levuriens. Plusieurs études ont montré que des souches d'origine lactique, plus précisément le lait de chamelle, possèdent une activité contre *Aspergillus* (Magjeed, 2005 ; Gisela *et al.*, 2012 ).

Un deuxième test d'activité anti mycotoxinogène a été réalisé sur les 6 isolats sélectionnés (CH1, CH2, CH7, A1, B1, L10) par l'injection du surnageant de leur culture dans le milieu de développement de la moisissure. La chromatographie sur couche mince des extraits de culture de la moisissure a montré une absence d'aflatoxine dans les milieux contenant les surnageants de trois souches isolats bactériens (CH1, CH2, CH7), provenant du lait de chamelle, ce qui explique leur capacité de produire des substances anti mycotoxinogène inhibant sa sécrétion. De ce fait, il est ressorti que ces trois bactéries développent un pouvoir anti-aflatoxinogène. Ces résultats sont conformes à ceux, obtenus par Magjeed, 2005 qui a isolé des bactéries lactiques à partir du lait de chamelle développant les mêmes caractéristiques.

Les résultats de l'acidité gastrique et de la résistance aux sels biliaires montrent qu'en plus de leur capacité à produire des substances antifongiques anti aflatoxinogène, les isolats bactériens (CH1, CH2, CH7) sont aussi capables d'éprouver une résistance au pH acide d'estomac et aux sels biliaires existant dans l'intestin. Ceci est un critère incontournable de sélection des souches probiotiques d'après FAO et OMS (2006).

Plusieurs études similaires ont montré la résistance aux conditions gastriques (pH et sels biliaires) des bactéries lactiques appartenant aux différentes espèces : *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus paracasei* et *Lactococcus sp*. (Vernazza et al., 2006 ; Saadi, 2006 ; Both et al., 2010 ; Kimoto-Nira et al., 2009 et Rahli, 2015).

Les mécanismes de résistance des bactéries lactiques aux sels biliaires font, encore l'objet de nombreux travaux (Bousbiaa, 2008 ; Bahri, 2014). Il a été montré que les bactéries lactiques sont capables de métaboliser les acides biliaires ce qui les protègent contre la bile en désassociant les acides biliaires par les enzymes *biles salts hydrolase* (BSH). L'hydrolyse libère les glycines et/ou les taurines du noyau stéroïde ce qui a pour effet de diminuer la solubilité de la bile à pH bas et de réduire ses activités détergentes (Roy, 2006 ; Begley et al., 2006 ; Hamon et al., 2011). Un autre mécanisme responsable de la résistance des lactobacilles aux sels biliaires est l'extrusion de la bile. Ce mécanisme est réalisé grâce aux systèmes *multidrug resistance* (MDR). Les MDR sont responsables de la résistance à de nombreux composés toxiques comme les antibiotiques, les solvants organiques, les détergents et les sels biliaires (Sami et al., 1997 ; Pfeiler et Klaenhammer, 2009).

L'un des rôles des acides biliaires est l'inhibition de la prolifération de bactéries dans la partie supérieure de l'appareil digestif chez l'Homme, par désassemblage des membranes

biologiques. La concentration moyenne de la bile intestinale est considérée comme étant de 0,3% P/ V, en outre, le temps de passage est suggéré être de 4 heures (Parasad *et al.*, 1998).

Par ailleurs, et selon Van de Guchte *et al.* (2002), la plupart des bactéries lactiques sont naturellement bien adaptées à un pH acide, ceci est dû à des mécanismes inductibles connus sous le nom de tolérance au stress acide en raison de leur catabolisme, l'acidification de leur environnement à travers la fermentation des sucres et la production d'acétate et de lactate (Vernazza *et al.*, 2006) (Foster et Hall, 1991).

D'après les résultats obtenus dans la présente étude les souches choisies sont susceptibles d'être des probiotiques (Saarela *et al.*, 2000, Ouwehand *et al.*, 2002 ; Gueimonde et Salmien, 2006 ).

Dans le but d'identifier les isolats sélectionnés à effet probiotiques une caractérisation morphologique basée sur l'observation macroscopique et microscopique et des tests biochimiques ont été effectués.

Les résultats obtenus montrent que les deux isolats bactériens (CH1, CH2) sont des colonies rondes et blanches, avec une forme cellulaire cocci à Gram négatif. En outre les tests biochimiques, ont montré que ces isolats sont catalase et oxydase négatif, indole positif, capables de croître à 30, 37, et 45°C et de fermenter le glucose, possédant un métabolisme aéro-fermentaire et une nitrate réductase. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Zadi-Karam *et al.*, 2005 ; Allaoui *et al.*, 2016, qui ont montré que ces caractères laissent supposer que les bactéries en question peuvent appartenir au genre *Enterococcus sp.*

Alors que l'observation macroscopiques, microscopiques et les tests biochimique du troisième isolat (CH7) a montré une similarité avec les résultats obtenus pour les deux souches précédentes, sauf qu'il est à GRAM positif, et peut croître à une température de 37°C mais pas à 45°C. D'après la littérature, les *Enterococcus* sont les seules à pouvoir croître dans des températures allant jusqu'à 45°C (Guiraud, 1998 ; Tamime, 2002 ; Ho *et al.*, 2007). Ceci suggère que cette bactérie appartient au genre *Lactococcus sp.* Ces résultats sont en conformité avec ceux trouvés par Zadi Karam *et al.*, 2005 ; Zebboudj *et al.*, 2014.

## Conclusion et perspectives

Dans cette étude, une recherche des microorganismes (bactéries et levures) à partir du lait et du sol de différentes natures et provenances a été effectuée, dans le but de sélectionner des souches à potentiel probiotique.

50 isolats bactériens et levuriens, ont été isolés à partir du lait et de sol après purification seulement 36 L V R O D W V R Q W I D L W O ¶ R E M H W G V R I F R P S O P I P H Q W G probiotique des isolats, une recherche de O ¶ D F W L Y L W p D Q W L I S E Q U E M T I X H D P R G isolats bactériens CH1, CH2, CH7, B1, L10 ont une activité antifongique remarquable vis-à-vis la moisissure mycotoxinogène *Aspergillus flavus* un W H V W G H O ¶ D F W L Y mycotoxinogène a été développé pour les isolats sélectionnés. Il a été constaté que seulement 3 bactéries (CH1, CH2, CH7) isolées à partir du lait de chamelle, ont une capacité à inhiber la sécrétion de O ¶ D I O D W p A S P E R G I L L U S flavus & H W W H I D F X O W p Q ¶ D S D V p V évoquée précédemment ce qui constitue une avancée considérable. Les trois bactéries ont développé par ailleurs, une résistance au pH bas et une croissance en présence de sels biliaires, ce qui confirme le potentiel probiotique de ces bactéries

/ ¶ L G H Q W L I L F D W L R Q p Y H Q W X H O O H E D V p H V X U O ¶ p W X G H P que les 3 isolats bactériens obtenus appartiennent au genre *Lactococcus* sp. A cet effet, et au terme de cette recherche, nous pouvons nous fixer les points suivants comme perspectives :

- 1- / ¶ L G H Q W L I L F D W L R Q F R P S O q W H G H V L V R O D W V E D F W
- 2- Détermination et purification des substances à effet anti mycotox[(m)-21(y)20nua9[(t

## Références bibliographiques

- **ADAMS, M.R. & MOSS, M.O. (2002).** *Toxingenic Fungi in Food microbiology*,
- **Alaoui Ismaili, M., Guilal, J., Hamama, A., Saidi, B., Zahar, M. (2016),** **Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc.** *The International Journal of Multi- disciplinary Sciences*
- **Alis van der Aa Kühle et Lene Jespersen. (2003).** *The Taxonomic Position of Saccharomyces boulardii as Evaluated by Sequence Analysis of the D1/D2 Domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region and the Mitochondrial Cytochrome- c Oxidase II Gene.* *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 26, n° 4, 2003, p. 564-571
- **André EL KHOURY, (2007).** Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine.
- **Axelsson, L. (2004).** Classification and physiology. *In* : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 1-66.
- **Begely M, Hill C, Gahan CGM (2006).** Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applly Environemental Microbiology*. 72(3):1729-1738.
- **Borriello S. P., Hammes W. P, Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M., and Valtonen V., (2003).** Safety of Probiotics That Contain Lactobacilli or Bifidobacteria,
- **Both E, Gyorgy E, Kibédi-szabo ZC, Tamas, Abraham B, Milklossy I et Lanyi S. (2010)** Acid and bile tolerance, adhesion to epithelial cells of probiotic microorganisms. *UPB. Sci Bull.*, 72 (2): 37-44.
- **Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Raymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson*, Paris, 512p.
- **C. POTHOUAKIS. (2009).** Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*
- **Cahagnier, B., Dragaci, S., Frayssinet, C., Frémy, J.M., Hennebert, G.L. (1998).** Lesage - meessen, L., Multon, J.L., Richard-Molard, D., Roquebert, M.F. Moisissuers des aliments peu hydratés. *Lavoisier Tec&Doc.* France.
- **Calder PC, Kew S. (2002).** The immune system: a target for functional foods? *Br J Nutr*; 88 *Suppl 2*: S165-77.

- **CARBONNEL F, COSNES J. (1999).** Thérapeutiques nutritionnelles dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin: bilan et perspectives. *Gastroenterol Clinical Biology*; 23 (5 Pt 2): B195-9.
- **Cassone, M., P.Serra, F. Mondello, A. Girolamo, S. Scafetti, E. Pistella et M.Venditti. (2003).** Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype boulardii fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *Journal of clinical microbiology*, vol. 41. p. 5340-5343.
- **Christiansen, P.S., Edelsten, D., Kristiansen, J.R. and Nielsen, E.W. (1996).** Some properties of ice cream containing *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*, 51: 502-504.
- **Coconnier MH. and Servin AL, (2003).** Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*.
- **Cole, P. M., Teti, L. O., & Zahn-Waxler, C. (2003).** Mutual emotion regulation and the stability of conduct problems between preschool and early school age. *Development and Psychopathology*, 15, 1–18
- **Collins, R. L., Morsheimer, E. T., Shiffman, S., Paty, J. A., Gnys, M., & Papandonatos, G. D. (1998).** Ecological momentary assessment in a behavioral drinking moderation training program. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*.
- **Cotter P.D., Hill C., Ross R.P (2008).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Natural Review*.
- **Crowley, S. ; Mahony, J ; Sinderen, D.V. (2012).** Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models. *Folia. Microbiol., DOI*
- **De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of App. Bacteriology.*, 23, p : 130-135.
- **Debarry, J., Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blumer, N., von Mutius, E., Bufe, A., Gatermann, S., Renz, H., Holst, O., Heine, H. (2007).** Acinetobacter Iwoffli and Lactococcus lactis strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J. Allerg. Clin. Immunol.* 119, 1514-1521.
- **Dellaglio F., de Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). Lorica, Uriage.* p : 25-116
- **Farnworth E.R. (2008).** Kefir: from folklore to regulatory approval. *J. Nutraceuticals Funct. Med. Foods*.

- **Feord, J. (2002).** Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 82. p. 353-360.
- **Gacem, M. (2001).** Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Université Kasdi Merbah-Ouargla. P : 33-35.
- **Gacem, M.A., Ould El Hadj, K.A., Gacemi, B. (2012).** Étude de la qualité physicochimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l'office algérien interprofessionnel des céréales (OAIC) de la localité de Saida (Algérie). *Alg.J.Env.* p : 67-76.
- **Gerbaldo, G.A., Barberisa, C., Pascuala, L., Dalceroa, A., Barberisa, L. (2012).** Antifungal activity of two lactobacillus strains with potential probiotic properties. *FEMS Microbiology Letter.* 322, 27-33.
- **Gibson, G.R., Rouzaud, G., Brostaff, J. and Rayment, R. (2005).** *Final technical report for FSA project Ref G01022.* An evaluation of probiotic effects in the human gut: microbial aspects, p. 8-12.
- **Gill HS. (2003).** Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*
- **Gisela, A., Gerbaldo., Carla Barberis., Liliana Pascual., Ana Dalcero., et Lucila Barberis. (2012).** Antifungal activity of two Lactobacillus strains with potential probiotic properties. *FEMS Microbiol.*
- **Goktepe S, Yilmaz B, Alaca R, Yazicioglu K, et al. (2006).** Does standing protect bone density in chronic spinal cord injured patients? *Journal of Rheumatology and Medical Rehabilitation* 17(2):104-108.
- **Gomes, A.M.P. et Xavier Malcata, F. (1998).** Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *J. Dairy Sci.*, 81: 1992-1507.
- **Guarner F. (2006).** Enteric flora in health and disease. *Digestion.*
- **Guessas, B et Kihal M. (2004).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from
- *AFNOR.* 237- 251.
- **Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. p : 310-321.
- **Guiraud, J.P. (2003).** Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Dunod.* Paris. 90-292.

- **Guiraud, J.P. et Rosec J.P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR*. 237- 251.
- **H. SZAJEWSKA\* & J. MRUKOWICZ. (2005).** Meta-analysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea.
- **Haddie, J.M. (1986).** Other streptococci. *In: Bergey's manual of systematic bacteriology* (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). p: 1070.
- **Halpern G.M., Prindiville T., Blankenburg M., Hsia T., Gershwin M.E. (1996).**Treatment Of Irritable Bowel Syndrome With Lacteol Fort : A Randomised, Double-Blind, Cross-Over Trial. *Am. J. Gastroenterol.*
- **Hamon E, Horvatovich P, Izquierdo E, Bringel F, Marchioni E, Aoude-Werner D, Ennahar S (2011).** Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC. Microbiol.* 11(63): 191-201.
- **Hassan A.N. et Frank J.F., (2001).** Starter Cultures and their use. *In: Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) *2e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.
- **Heller, K.J. (2001).** Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 374S-379S.
- **Ho, T.N.T., Tuan, N., Deschamps, A. et Caubet, R. (2007).** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134-142.
- **Hooper L.V., Macpherson A.J. (2010).** Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.*
- **Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith; V.H., et Bohannon, B.J.M. (2003).** Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters.* 6: 613-622.
- **Idoui T. et Karam N.E., 2008.** Lactic acid bacteria from Jijel's butter: isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites.* **59**(4) : 361-367.
- **Idoui T., 2008.** Les bactéries lactiques indigènes : Isolement, identification et propriétés technologiques. Effet probiotiques chez le poulet de chair ISA15, le lapin de souche locale et le rat Wistar. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie. 179
- **Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E., 2009.** Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk:Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites.* **60**(2) : 177-183.

- **Ishibashi, N. et Yamazaki, S. (2001).** Probiotics and safety. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73 (supplement 2). p. 465S-470S.
- **Jerome, J. P., James, T. S., Stephen, L. (2004).** Microbiologie. *Ed. Dunod*. Paris.P 479.
- **KAMM K., HOPPE S., BREVES G., SCHRODER B.. (2004).** Effects of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on the neurochemistry of myenteric neurones in pig jejunum *SCHEMANN Neurogastroenterol Motil* 16, 53–60
- **Karam, N. (1995).** Constitution d'un soucier de bactéries lactiques à intérêt biotechnologique : étude biochimique et moléculaire. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie. 212
- **Kaur A, Mahajan S, Singh JR (2003).** Cytogenetic investigations in Mentally Retarded Individuals. *Int J Hum Genet*, 3: 13-16.
- **Khalid, N.M. et Marth, E.H. (1990).** Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* **73** : 158-167.
- **Khan, S.H. and Ansari, F.A. (2007).** Probiotics-The friendly bacteria with market potential in global market. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 20(1): 76-82.
- **Kimoto-Nira H., Kabayashi M., Sasaki K. et Suzuki C. (2009).** Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition : Analysis by using different growth media. *Int. J. Food Microbial.* 131:183-188.
- **Kreger -Van Rij, N.J. (1984).** The yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical. .
- **Labrecque, M.H. (2003).** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Mémoire, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université LAVAL. p : 19- 24.
- **LEREBOURS E, GUEDON G, DECHELOTTE P. (2001).** Nutrition et pathologie digestive. In: Basdevant A, Laville M, Lerebours E, eds. *Traité de nutrition clinique de l'adulte. Flammarion Médecine-Sciences*,: 557-66
- **Leveau, J.Y. et Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 85-87.
- **Lidan Ye, Xingding Zhou, Mohammad Sufian Bin Hudari, Zhi Li, Jin Chuan Wu. (2013).** Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106.
- **Liévin-Le Moal V, and Servin AL. (2006).** The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: Mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev.*

- **Lilly, D.M. and Stillwell, R.H.(1965).** Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*.
- **Magjeed N. A. (2005).** Corrective effect of milk camel on some cancer biomarkers in blood of rats intoxicated with aflatoxin B1. *Journal of the Saudi Chemical society*, 9(2), 253-263
- **Magnusson, J et Schnunrer, J. (2001).** Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl Environ Microbiol*, p. 1-5.
- **Matsuzaki, H., Nakano, C., Tuchiya, Y., Kato, K., Maejima, Y., Miyairi, Y., Wakasa, S. and Aze, T. (2007).** Multi-nuclide AMS performances at MALT. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B 259, 36–40.
- **Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. (1997).**A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*.
- **Mercier, C. (1997).** Transgènes et modification quantitative et/ou qualitative de la composition de lait à de fins nutritionnels. In : Frened G. (Ed), intérêts nutritionnels et diététique du lait de chèvre. *Nord-France*. p : 169-177.
- **Metchnikoff E. Prolongation of life. (1908).**G. Putman Sons, New York.
- **Michel, A. (2001).** Métabolites secondaires d'*ophiostoma novo-ulmi* et de *coratocystis fimbriata* sp. *Platani*, pathogènes de l'orme et du platane. Thèse de doctorat en sciences. Institut de chimie. Université de Neuchatel, p :16.
- **Morelli A., Danesi S. (2000).** Group velocity of Rayleigh waves in the Antarctic region, *Physics of the Earth and Planetary Interiors*, 122, 55-66.
- **Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M., (2010).** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. *Blackwell. Publishing*. 13.
- **Nayra, S., Sharaf, O.M., Ibrahim, G.A. and Tawfik, N.F. (2002).** Incorporation and viability of some` probiotic bacteria in functional dairy food: I. Soft cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 30: 217-229.
- **Ogier, J.C., Casalta E., Farrokh C., et Saihi A. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126** : 286-290.
- **Oliveira, M.N., Sodini, I., Remeuf, F. and Corrieu, G. (2001).** Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 11: 935-942.

- **Olivier Goulet, (2009)** .Effets de *Saccharomyces boulardii* dans le traitement et la prévention des diarrhées de l'enfant.
- **Parasad J, Gill H, Smart J, Gopal PK (1998)**. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy. J.* 8: 993-1002.
- **Perkin, M.R., Strachan, D.P. (2006)**. Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J. Allerg. Clin. Immunol.* 117, 1374-1381.
- **Pfeiler EA, KlaenhammerTR (2009)**. Role of transporter proteins in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*75: 6013-6016.
- **Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. (2005)**. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther.*
- **Pilet, M.F., Magras C., Federigh M. (2005)**. Bactéries lactiques. *In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris.* 219-240.
- **PITT, J.I. & HOKING, A.D. (1977)** Fungi and Food Spoilage. *Blackie Academic & Profesional..*
- **Pol, D. (1996)**. Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire. ellipses édition marketing S.A, Paris. 15, p : 20-38, 42-57, 141-151.
- **Pot B., (2008)**. The taxonomy of lactic acid bacteria. *In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.*1-106.
- **Prescott, Harly. et Kelin. (2007)**. Microbiologie. 2éme Ed. Boeck-wesmael. Bruxelles.
- **Rahli, F. (2015)**. Valorisation du lait de chamelle par l'exploitation des potentialités technologiques des bactéries lactiques isolées localement, Université d'Oran 1 .
- **Rambaud J.C., Bouhnik Y., Marteau P., Pochart P. (1993)**. Manipulation of the human gut microflora.
- **Rapport de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments, Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale, (2006)**.
- **Rapport de l'Organisation mondiale de Gastroentérologie, 2008**
- **Rapport de la FAO et l'OMS en 2001.**
- **Rodrigues . A.C.P., Cara D.C., Fretez S.H.G.G, Cunha F.Q, Vieira E.C., Nicoli J.R. and Vieira L.Q.(2000)** *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice.

- **Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R.M., Lima, N and Venâncio, A. (2007).** Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Ed, A. Méndez-Vilas.
- **Rowland I. (2004).** Probiotics and colorectal cancer risk. *Br J Nutr*; 91(6):805-807.
- **Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T (2000).** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol*.
- **Salminen S., Collado MC<sup>1</sup>, Gueimonde M, Sanz Y, (2006)** Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. Functional Foods Forum, University of Turku, Itäinen Pitkätatu 4A 5th Floor, FIN 20520, Turku, Finland
- **Sawssen Bousbiaa & Nicolas Schneider (2007).** Développement des formes orales de probiotiques, Master d'ingénierie pour la santé et le médicament, option développement et production pharmaceutique.
- **Seppo, N. (2003).** Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Centre For Metrology And Accreditation. Helsinki Finland.
- **Servin AL. (2004)** .Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*.
- **Singleton. (2005).** The critical period hypothesis: A coat of many colours. *International Review of Applied Linguistics*, 43, 269-286.
- **Stiles, M.E., et Holzapfel W.H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36** : 1-29.
- **Tamboli, C.P., C. Caucheteux, A. Cortot, J.F. Colombel., et P. Desreumaux. (2003).** Probiotics in inflammatory bowel disease: a critical review, *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, vol. 17. p. 805-820.
- **Tamime, A.Y. (2002).** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). *3e Ed., John Wiley and Sons, Inc.,* New York. 261-366.
- **Tissier H. (1906).** Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *Crit Rev Soc Biol*.
- **Tong JL, Ran ZH, Shen J, Zhang CX, Xiao SD (2007).** Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 25: 155–168.

- **Tortora, G., Funke, B. R., Case, C.L., Martin, L., (2003).** Introduction à la microbiologie. (Ed). ERPI. Paris, p 4-869.
- **Van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD et Maguin E. (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82:187-216.
- **Vernazza CL, Gibson GR. Et Rastall RA. (2006).** Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. *J Appl.Microbiol*, 100(4): 846-853.
- **Waser, M., Michels, K.B., Bieli, C., Floistrup, H., Pershagen, G., von Mutius, E., Ege, M., Riedler, J., SchramBijkerk, D., Brunekreef, B., van Hage, M., Lauener, R., Braun-Fahrlaender, C. (2007).** Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin. Exp. Allerg.* 37, 661-670.
- **Wicklow, D.T., Shotwell, O. L. (1983).** Intrafungal distribution of aflatoxin among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Can. J. Microbiol.*, **29**, 1– 5.
- **Wickens, K., Lane, J.M., Fitzharris, P., Siebers, R., Riley, G., Douwes, J., Smith, T., Crane, J. (2002).** Farm residence, exposures, and the risk of allergic diseases in New Zealand children. *Allergy* 57, 1171-1179.
- **Zadi, H. (1998).** Bactéries lactiques isolées de lait de *Camelus dromedarius* : étude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Constantine, Algérie. 205.
- **Zadi-Karam .H et Karam. N-E. (2006)** Lactic acid bacteria from Camel milk. Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Université d'Oran-Sénia, Oran, Algérie.

## Annexe 1

### Milieu de MRS (Gélose de Man Rogosa Sharpe)

Peptone.....	10g
Extrait de viande .....	10g
Extrait de levure.....	5g
Tween .....	80mL
Phosphate dipotassique.....	2g
Acétate de sodium .....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium .....	2 g
Sulfate de manganèse.....	0,005g
Agar-agar.....	5 g
Eau distillée .....	1000 mL

pH = 6.5

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 2

### Milieu YPGA (Yeast Peptone Glucose Agar)

Extrait de levure .....	10g
Peptone .....	10g
Glucose .....	20g
Agar .....	17g
Eau distillée .....	1000 mL

pH = 5

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 3

### Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Pomme de terre .....	200 g
Dextrose .....	10 g
Agar .....	15 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH= 7,3

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 4

### Milieu GN (Gélose nutritif)

Extrait de viande .....	1g
Extrait de levure .....	2,5g
Peptone .....	5 g
Chlorure de sodium .....	5 g
Agar .....	15 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH =7,0

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 5

### Bouillon nutritif

Peptone .....	15g
Yeast extract.....	5g
NaCl .....	5g
Eau distillée .....	1000ml

pH = 7,4

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 6

### Milieu Czapek

Nitrate de sodium .....	2g
Chlorure de potassium .....	0,5g
Sulfate de magnésium.....	0,5 g
Sulfate ferreux .....	0,01
Phosphate de potassium.....	1 g
Saccharose.....	30g
Eau distillée .....	1000ml

pH = 6,8 ± 0,2

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 7

### Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant (BLBVB)

Peptone .....	10g
Lactose .....	10g
Bile .....	20ml
Vert brillant .....	13mg

pH = 7,4

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 8

### Bouillon nitraté

Bouillon nutritif additionné de nitrate de sodium  $\text{NaNO}_3$ ..... 1 g / 100 mL

## Annexe 9

### Réactif 1 de Griesse

Acide sulfamique .....	0.8 g
Acide acétique 5N.....	100ml

## Annexe 10

### Réactif 2 de Griesse

Alpha-Naphthylamine.....	0.5 g
Acide acétique 5N .....	100ml

## Annexe 11

### Eau peptonée

Peptone exempte d'indole.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Eau distillée .....	1000ml

pH = 7,2

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 12

### Milieu MEVAG

Macération de viande (1 kg / l) .....	25ml
Chlorure de sodium .....	5.2g
Agar .....	3,12g
Rouge de phénol.....	0,035ml
Eau distillée .....	1000 mL

Autoclavage 120C°, 15min

## Résumé

Beaucoup de microorganismes dans la nature peuvent exercer un effet bénéfique sur la santé humaine. A cet effet, Les microorganismes probiotiques agissent principalement en stimulant la flore intestinale et le système immunitaire, essentiellement, par leurs interactions avec le contenu digestif, ainsi que leur activité anti microbienne.

L'exploration des échantillons du sol et du lait de différentes régions locales, a abouti à l'obtention de 50 isolats bactériens et levuriens. Après purification, seulement 36 isolats ont fait l'objet du complément d'étude. Le test de sélection des isolats à effet antifongique a permis de retenir seulement 6 isolats bactériens (CH1, CH2, CH7, A1, B1, L10), qui possèdent un effet inhibiteur très remarquable vis-à-vis de la souche mycotoxinogène *Aspergillus flavus*.

L'étude de l'effet antimycotoxinogène des molécules bioactives contenues dans le surnageant des cultures des 6 bactéries sélectionnées, a montré que seulement 3 bactéries (CH1, CH2, CH7), isolées à partir du lait de chamelle, ont une capacité d'inhiber la sécrétion de l'aflatoxine B1 par la souche fongique *Aspergillus flavus*.

En complément, deux autres tests ont été développés pour confirmer l'activité probiotique des souches sélectionnées ; la tolérance au pH gastrique, et la tolérance aux sels biliaires de l'intestin. Les deux tests se sont révélés positifs, ce qui témoigne du potentiel probiotique des isolats.

L'identification préliminaire des isolats bactériens, basée sur l'étude macroscopique, microscopique ainsi que les tests biochimiques ont montré que les bactéries CH1 et CH2 appartiennent au genre *Enterococcus sp.* alors que la bactérie CH7 appartient au genre *Lactococcus sp.*

**Mots clés :** Probiotiques, Bactéries lactiques, lait de chamelle, activité anti mycotoxinogène.

## Abstract

Many microorganisms in nature can have a beneficial effect on human health. The probiotics are one of these microorganisms and act mainly by stimulating the intestinal flora and the immune system, primarily through their interactions with the gastrointestinal tract and their antimicrobial activity.

The exploration of soil and milk samples from local areas lead to finding 50 isolates of different species of yeast and bacteria. After purification, only 36 isolates were the subject of further study. The screening test for antifungal effect isolates allowed to retain only 6 bacterial isolates (CH1, CH2, CH7, A1, B1, L10) which have a remarkable inhibitory effect against *Aspergillus flavus* fungal strain.

The study of the antimycotoxinogen effect of bioactive molecules in the culture supernatant of the 6 selected bacteria, showed that only 3 bacteria (CH1, CH2, CH7) isolated from camel milk have an ability to inhibit the secretion of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* fungal strain.

Two other tests are developed to confirm the probiotic activity of chosen species, the tolerance to gastric pH, and tolerance to bile salts of intestine. Those tests were revealed positive which confirm the probiotic potentiality of those bacteria.

Preliminary identification of bacterial isolates, based on macroscopic and microscopic examination and biochemical tests, have shown that the CH1 and CH2 bacteria belong to the genus *Enterococcus sp.* while CH7 belongs to the genus *Lactococcus sp.*

Key words : Probiotic, Lactic acid bacteria, Camel milk, anti mycotoxinogen activity.

## ملخص

الكثير من الميكروبات الموجودة في الطبيعة يمكنها أن تحدث أثراً مفيداً على صحة الانسان. ومنه البروبيوتيكات تؤثر بصفة أساسية بتحفيز الميكروفلورا المعوية والجهاز المناعي، بالتحديد عن طريق العلاقات الموجودة بين المحتوى المعوي من غذاء والنشاط ضد مكروبي.

البحث في عينات التربة والحليب لمختلف المناطق نتج عنه الحصول على 50 عزلة بكتيرية وخميرية. بعد عملية التنقية تم اختيار 36 عزلة فقط لإتمام مشروع البحث. بعدها تم اختيار العزلات ذات مفعول مضاد للفطريات CH1, CH2, CH7, خاصة النوع السمي *Aspergillus flavus*.

دراسة المفعول مضاد السمية للجزيئات البيولوجية الموجودة في محلول البكتيريا بين أنه فقط ثلاث أنواع بكتيرية ( CH1, CH2, CH7) معزولة من حليب الإبل، هن من يملكن القدرة على منع انتاج الأفلاتوكسين ب1 من قبل نوع *Aspergillus flavus*.

للإتمام البحث ، تم القيام باختبارين آخرين للإثبات أن هاته الأنواع تمثل بروبيوتيكات : اختبار القدرة على تحمل الوسط الحمضي للمعدة والقدرة على تحمل الأملاح البيلية الموجودة في الأمعاء الدقيقة. كانت نتيجة كل من الاختبارين إيجابية، مما يثبت القدرة البروبيوتكية للبكتيريا المختارة.

أخيراً، تم اجراء اختبارات للتعريف بالبكتيريا المختارة، من خلال الدراسة الماكروسكوبية والميكروسكوبية، أيضاً الاختبارات البيوكيميائية التي بين من خلالها أن كلا من CH1 و CH2 تنتمي إلى نوع *Enterococcus sp.* أما CH7 تنتمي إلى نوع *Lactococcus sp.*

الكلمات المفتاحية : البروبيوتيك ، بكتيريا الحليب ، حليب الإبل ، المفعول المضاد للسمية الفطرية.

# Recherche de microorganismes de différents écosystèmes développant une activité probiotique

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des Mycètes

Beaucoup de microorganismes dans la nature peuvent exercer un effet bénéfique sur la santé humaine. A cet effet, Les microorganismes probiotiques agissent principalement en stimulant la flore intestinale et le système immunitaire, essentiellement, par leurs interactions avec le contenu digestif, ainsi que leur activité anti microbienne.

L'exploration des échantillons du sol et du lait de différentes régions locales, a abouti à l'obtention de 50 isolats bactériens et levuriens. Après purification, seulement 36 isolats ont fait l'objet du complément d'étude. Le test de sélection des isolats à effet antifongique a permis de retenir seulement 6 isolats bactériens (CH1, CH2, CH7, A1, B1, L10), qui possèdent un effet inhibiteur très remarquable vis-à-vis de la souche mycotoxinogène *Aspergillus flavus*.

L'étude de l'effet antimycotoxinogène des molécules bioactives contenues dans le surnageant des cultures des 6 bactéries sélectionnées, a montré que seulement 3 bactéries (CH1, CH2, CH7), isolées à partir du lait de chamelle, ont une capacité d'inhiber la sécrétion de l'aflatoxine B1 par la souche fongique *Aspergillus flavus*.

En complément, deux autres tests ont été développés pour confirmer l'activité probiotique des souches sélectionnées ; la tolérance au pH gastrique, et la tolérance aux sels biliaires de l'intestin. Les deux tests se sont révélés positifs, ce qui témoigne du potentiel probiotique des isolats.

L'identification préliminaire des isolats bactériens, basée sur l'étude macroscopique, microscopique ainsi que les tests biochimiques ont montré que les bactéries CH1 et CH2 appartiennent au genre *Enterococcus sp.* alors que la bactérie CH7 appartient au genre *Lactococcus sp.*

**Mots clés :** Probiotiques, Bactéries lactiques, lait de chamelle, activité anti mycotoxinogène,

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM),

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Mme. MIHOUBI. I  
**Rapporteur :** Mr. KACEM CHAUCHE. N  
**Examinatrice :** Mlle. KARA ALI. M

**Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine**  
**Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine**  
**Dr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine**

**Date de soutenance :** 26/06/2016



## Conclusion et perspectives

Dans cette étude, une recherche des microorganismes (bactéries et levures) à partir du lait et du sol de différentes natures et provenances, a été effectuée, dans le but de sélectionner des souches à potentiel probiotique.

50 isolats bactériens et levuriens, ont été isolés à partir du lait et de sol, après purification seulement 36 isolats ont fait l'objet du complément de cette étude. Pour vérifier le pouvoir probiotique des isolats, une recherche de l'activité antifongique a montré que seulement les isolats bactériens CH1, CH2, CH7, A1, B1, L10 ont une activité antifongique remarquable vis-à-vis la moisissure mycotoxinogène *Aspergillus flavus*, un test de l'activité anti mycotoxinogène a été développé pour les isolats sélectionnés. Il a été conclu que seulement 3 bactéries (CH1, CH2, CH7), isolées à partir du lait de chamelle, ont une capacité à inhiber la sécrétion de l'aflatoxine B1 par *Aspergillus flavus*. Cette faculté n'a pas été, à notre avis, évoquée précédemment ce qui constitue une avancée considérable. Les trois bactéries ont développé, par ailleurs, une résistance au pH bas et une croissance en présence de sels biliaires, ce qui confirme le potentiel probiotique de ces bactéries.

L'identification éventuelle basée sur l'étude morphologique et l'étude biochimique a montré que les 3 isolats bactériens obtenus appartiennent au genre *Enterococcus sp.* et *Lactococcus sp.* A cet effet, et au terme de cette recherche, nous pouvons nous fixer les points suivants comme perspectives :

- 1- L'identification complète des isolats bactériens sélectionnés ;
- 2- Détermination et purification des substances à effet anti mycotoxinogène synthétisée par *Enterococcus sp.* et *Lactococcus sp.*

## Références bibliographiques

- **ADAMS, M.R. & MOSS, M.O. (2002).** *Toxingenic Fungi in Food microbiology*,
- **Alaoui Ismaili, M., Guilal, J., Hamama, A., Saidi, B., Zahar, M. (2016),** **Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc.** *The International Journal of Multi- disciplinary Sciences*
- **Alis van der Aa Kühle et Lene Jespersen. (2003).** *The Taxonomic Position of Saccharomyces boulardii as Evaluated by Sequence Analysis of the D1/D2 Domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region and the Mitochondrial Cytochrome- c Oxidase II Gene.* *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 26, n° 4, 2003, p. 564-571
- **André EL KHOURY, (2007).** Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine.
- **Axelsson, L. (2004).** Classification and physiology. *In* : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 1-66.
- **Begely M, Hill C, Gahan CGM (2006).** Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applly Environemental Microbiology*. 72(3):1729-1738.
- **Borriello S. P., Hammes W. P, Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M., and Valtonen V., (2003).** Safety of Probiotics That Contain Lactobacilli or Bifidobacteria,
- **Both E, Gyorgy E, Kibédi-szabo ZC, Tamas, Abraham B, Milklossy I et Lanyi S. (2010)** Acid and bile tolerance, adhesion to epithelial cells of probiotic microorganisms. *UPB. Sci Bull.*, 72 (2): 37-44.
- **Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson*, Paris, 512p.
- **C. POTHOUAKIS. (2009).** Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*
- **Cahagnier, B., Dragaci, S., Frayssinet, C., Frémy, J.M., Hennebert, G.L. (1998).** Lesage - meessen, L., Multon, J.L., Richard-Molard, D., Roquebert, M.F. Moisissuers des aliments peu hydratés. *Lavoisier Tec&Doc.* France.
- **Calder PC, Kew S. (2002).** The immune system: a target for functional foods? *Br J Nutr*; 88 Suppl 2: S165-77.

- **CARBONNEL F, COSNES J. (1999).** Thérapeutiques nutritionnelles dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin: bilan et perspectives. *Gastroenterol Clinical Biology*; 23 (5 Pt 2): B195-9.
- **Cassone, M., P.Serra, F. Mondello, A. Girolamo, S. Scafetti, E. Pistella et M.Venditti. (2003).** Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype boulardii fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *Journal of clinical microbiology*, vol. 41. p. 5340-5343.
- **Christiansen, P.S., Edelsten, D., Kristiansen, J.R. and Nielsen, E.W. (1996).** Some properties of ice cream containing *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*, 51: 502-504.
- **Coconnier MH. and Servin AL, (2003).** Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*.
- **Cole, P. M., Teti, L. O., & Zahn-Waxler, C. (2003).** Mutual emotion regulation and the stability of conduct problems between preschool and early school age. *Development and Psychopathology*, 15, 1–18
- **Collins, R. L., Morsheimer, E. T., Shiffman, S., Paty, J. A., Gnys, M., & Papandonatos, G. D. (1998).** Ecological momentary assessment in a behavioral drinking moderation training program. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*.
- **Cotter P.D., Hill C., Ross R.P (2008).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Natural Review*.
- **Crowley, S. ; Mahony, J ; Sinderen, D.V. (2012).** Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models. *Folia. Microbiol., DOI*
- **De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of App. Bacteriology.*, 23, p : 130-135.
- **Debarry, J., Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blumer, N., von Mutius, E., Bufe, A., Gatermann, S., Renz, H., Holst, O., Heine, H. (2007).** Acinetobacter Iwoffli and Lactococcus lactis strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J. Allerg. Clin. Immunol.* 119, 1514-1521.
- **Dellaglio F., de Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). Lorica, Uriage.* p : 25-116
- **Farnworth E.R. (2008).** Kefir: from folklore to regulatory approval. *J. Nutraceuticals Funct. Med. Foods*.

- **Feord, J. (2002).** Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 82. p. 353-360.
- **Gacem, M. (2001).** Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Université Kasdi Merbah-Ouargla. P : 33-35.
- **Gacem, M.A., Ould El Hadj, K.A., Gacemi, B. (2012).** Étude de la qualité physicochimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l'office algérien interprofessionnel des céréales (OAIC) de la localité de Saida (Algérie). *Alg.J.Env.* p : 67-76.
- **Gerbaldo, G.A., Barberisa, C., Pascuala, L., Dalceroa, A., Barberisa, L. (2012).** Antifungal activity of two lactobacillus strains with potential probiotic properties. *FEMS Microbiology Letter.* 322, 27-33.
- **Gibson, G.R., Rouzaud, G., Brostaff, J. and Rayment, R. (2005).** *Final technical report for FSA project Ref G01022.* An evaluation of probiotic effects in the human gut: microbial aspects, p. 8-12.
- **Gill HS. (2003).** Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*
- **Gisela, A., Gerbaldo., Carla Barberis., Liliana Pascual., Ana Dalcero., et Lucila Barberis. (2012).** Antifungal activity of two Lactobacillus strains with potential probiotic properties. *FEMS Microbiol.*
- **Goktepe S, Yilmaz B, Alaca R, Yazicioglu K, et al. (2006).** Does standing protect bone density in chronic spinal cord injured patients? *Journal of Rheumatology and Medical Rehabilitation* 17(2):104-108.
- **Gomes, A.M.P. et Xavier Malcata, F. (1998).** Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *J. Dairy Sci.*, 81: 1992-1507.
- **Guarner F. (2006).** Enteric flora in health and disease. *Digestion.*
- **Guessas, B et Kihal M. (2004).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from
- *AFNOR.* 237- 251.
- **Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. p : 310-321.
- **Guiraud, J.P. (2003).** Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Dunod.* Paris. 90-292.

- **Guiraud, J.P. et Rosec J.P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR*. 237- 251.
- **H. SZAJEWSKA\* & J. MRUKOWICZ. (2005).** Meta-analysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea.
- **Haddie, J.M. (1986).** Other streptococci. *In: Bergey's manual of systematic bacteriology* (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). p: 1070.
- **Halpern G.M., Prindiville T., Blankenburg M., Hsia T., Gershwin M.E. (1996).**Treatment Of Irritable Bowel Syndrome With Lacteol Fort : A Randomised, Double-Blind, Cross-Over Trial. *Am. J. Gastroenterol.*
- **Hamon E, Horvatovich P, Izquierdo E, Bringel F, Marchioni E, Aoude-Werner D, Ennahar S (2011).** Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC. Microbiol.* 11(63): 191-201.
- **Hassan A.N. et Frank J.F., (2001).** Starter Cultures and their use. *In: Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) *2e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.
- **Heller, K.J. (2001).** Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 374S-379S.
- **Ho, T.N.T., Tuan, N., Deschamps, A. et Caubet, R. (2007).** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134-142.
- **Hooper L.V., Macpherson A.J. (2010).** Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.*
- **Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith; V.H., et Bohannon, B.J.M. (2003).** Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters.* 6: 613-622.
- **Idoui T. et Karam N.E., 2008.** Lactic acid bacteria from Jijel's butter: isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites.* **59**(4) : 361-367.
- **Idoui T., 2008.** Les bactéries lactiques indigènes : Isolement, identification et propriétés technologiques. Effet probiotiques chez le poulet de chair ISA15, le lapin de souche locale et le rat Wistar. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie. 179
- **Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E., 2009.** Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk:Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites.* **60**(2) : 177-183.

- **Ishibashi, N. et Yamazaki, S. (2001).** Probiotics and safety. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73 (supplement 2). p. 465S-470S.
- **Jerome, J. P., James, T. S., Stephen, L. (2004).** Microbiologie. *Ed. Dunod*. Paris.P 479.
- **KAMM K., HOPPE S., BREVES G., SCHRODER B.. (2004).** Effects of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on the neurochemistry of myenteric neurones in pig jejunum *SCHEMANN Neurogastroenterol Motil* 16, 53–60
- **Karam, N. (1995).** Constitution d'un soucier de bactéries lactiques à intérêt biotechnologique : étude biochimique et moléculaire. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie. 212
- **Kaur A, Mahajan S, Singh JR (2003).** Cytogenetic investigations in Mentally Retarded Individuals. *Int J Hum Genet*, 3: 13-16.
- **Khalid, N.M. et Marth, E.H. (1990).** Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* **73** : 158-167.
- **Khan, S.H. and Ansari, F.A. (2007).** Probiotics-The friendly bacteria with market potential in global market. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 20(1): 76-82.
- **Kimoto-Nira H., Kabayashi M., Sasaki K. et Suzuki C. (2009).** Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition : Analysis by using different growth media. *Int. J. Food Microbial.* 131:183-188.
- **Kreger -Van Rij, N.J. (1984).** The yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical. .
- **Labrecque, M.H. (2003).** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Mémoire, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université LAVAL. p : 19- 24.
- **LEREBOURS E, GUEDON G, DECHELOTTE P. (2001).** Nutrition et pathologie digestive. In: Basdevant A, Laville M, Lerebours E, eds. *Traité de nutrition clinique de l'adulte. Flammarion Médecine-Sciences*,: 557-66
- **Leveau, J.Y. et Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 85-87.
- **Lidan Ye, Xingding Zhou, Mohammad Sufian Bin Hudari, Zhi Li, Jin Chuan Wu. (2013).** Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106.
- **Liévin-Le Moal V, and Servin AL. (2006).** The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: Mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev.*

- **Lilly, D.M. and Stillwell, R.H.(1965).** Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*.
- **Magjeed N. A. (2005).** Corrective effect of milk camel on some cancer biomarkers in blood of rats intoxicated with aflatoxin B1. *Journal of the Saudi Chemical society*, 9(2), 253-263
- **Magnusson, J et Schnunrer, J. (2001).** Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl Environ Microbiol*, p. 1-5.
- **Matsuzaki, H., Nakano, C., Tuchiya, Y., Kato, K., Maejima, Y., Miyairi, Y., Wakasa, S. and Aze, T. (2007).** Multi-nuclide AMS performances at MALT. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B 259, 36–40.
- **Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. (1997).**A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*.
- **Mercier, C. (1997).** Transgènes et modification quantitative et/ou qualitative de la composition de lait à de fins nutritionnels. In : Frened G. (Ed), intérêts nutritionnels et diététique du lait de chèvre. *Nord-France*. p : 169-177.
- **Metchnikoff E. Prolongation of life. (1908).**G. Putman Sons, New York.
- **Michel, A. (2001).** Métabolites secondaires d'*ophiostoma novo-ulmi* et de *coratocystis fimbriata* sp. *Platani*, pathogènes de l'orme et du platane. Thèse de doctorat en sciences. Institut de chimie. Université de Neuchatel, p :16.
- **Morelli A., Danesi S. (2000).** Group velocity of Rayleigh waves in the Antarctic region, *Physics of the Earth and Planetary Interiors*, 122, 55-66.
- **Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M., (2010).** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. *Blackwell. Publishing*. 13.
- **Nayra, S., Sharaf, O.M., Ibrahim, G.A. and Tawfik, N.F. (2002).** Incorporation and viability of some` probiotic bacteria in functional dairy food: I. Soft cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 30: 217-229.
- **Ogier, J.C., Casalta E., Farrokh C., et Saihi A. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126** : 286-290.
- **Oliveira, M.N., Sodini, I., Remeuf, F. and Corrieu, G. (2001).** Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 11: 935-942.

- **Olivier Goulet, (2009)** .Effets de *Saccharomyces boulardii* dans le traitement et la prévention des diarrhées de l'enfant.
- **Parasad J, Gill H, Smart J, Gopal PK (1998)**. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy. J.* 8: 993-1002.
- **Perkin, M.R., Strachan, D.P. (2006)**. Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J. Allerg. Clin. Immunol.* 117, 1374-1381.
- **Pfeiler EA, KlaenhammerTR (2009)**. Role of transporter proteins in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*75: 6013-6016.
- **Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. (2005)**. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther.*
- **Pilet, M.F., Magras C., Federigh M. (2005)**. Bactéries lactiques. *In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica.* Paris. 219-240.
- **PITT, J.I. & HOKING, A.D. (1977)** Fungi and Food Spoilage. *Blackie Academic & Profesional..*
- **Pol, D. (1996)**. Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire. ellipses édition marketing S.A, Paris. 15, p : 20-38, 42-57, 141-151.
- **Pot B., (2008)**. The taxonomy of lactic acid bacteria. *In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier.* Paris.1-106.
- **Prescott, Harly. et Kelin. (2007)**. Microbiologie. 2éme Ed. Boeck-wesmael. Bruxelles.
- **Rahli, F. (2015)**. Valorisation du lait de chamelle par l'exploitation des potentialités technologiques des bactéries lactiques isolées localement, Université d'Oran 1 .
- **Rambaud J.C., Bouhnik Y., Marteau P., Pochart P. (1993)**. Manipulation of the human gut microflora.
- **Rapport de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments, Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale, (2006)**.
- **Rapport de l'Organisation mondiale de Gastroentérologie, 2008**
- **Rapport de la FAO et l'OMS en 2001.**
- **Rodrigues . A.C.P., Cara D.C., Fretez S.H.G.G, Cunha F.Q, Vieira E.C., Nicoli J.R. and Vieira L.Q.(2000)** *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice.

- **Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R.M., Lima, N and Venâncio, A. (2007).** Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Ed, A. Méndez-Vilas.
- **Rowland I. (2004).** Probiotics and colorectal cancer risk. *Br J Nutr*; 91(6):805-807.
- **Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T (2000).** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol*.
- **Salminen S., Collado MC<sup>1</sup>, Gueimonde M, Sanz Y, (2006)** Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. Functional Foods Forum, University of Turku, Itäinen Pitkätatu 4A 5th Floor, FIN 20520, Turku, Finland
- **Sawssen Bousbiaa & Nicolas Schneider (2007).** Développement des formes orales de probiotiques, Master d'ingénierie pour la santé et le médicament, option développement et production pharmaceutique.
- **Seppo, N. (2003).** Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Centre For Metrology And Accreditation. Helsinki Finland.
- **Servin AL. (2004)** .Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*.
- **Singleton. (2005).** The critical period hypothesis: A coat of many colours. *International Review of Applied Linguistics*, 43, 269-286.
- **Stiles, M.E., et Holzapfel W.H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36** : 1-29.
- **Tamboli, C.P., C. Caucheteux, A. Cortot, J.F. Colombel., et P. Desreumaux. (2003).** Probiotics in inflammatory bowel disease: a critical review, *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, vol. 17. p. 805-820.
- **Tamime, A.Y. (2002).** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). *3e Ed., John Wiley and Sons, Inc.,* New York. 261-366.
- **Tissier H. (1906).** Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *Crit Rev Soc Biol*.
- **Tong JL, Ran ZH, Shen J, Zhang CX, Xiao SD (2007).** Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 25: 155–168.

- **Tortora, G., Funke, B. R., Case, C.L., Martin, L., (2003).** Introduction à la microbiologie. (Ed). ERPI. Paris, p 4-869.
- **Van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD et Maguin E. (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82:187-216.
- **Vernazza CL, Gibson GR. Et Rastall RA. (2006).** Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. *J Appl.Microbiol*, 100(4): 846-853.
- **Waser, M., Michels, K.B., Bieli, C., Floistrup, H., Pershagen, G., von Mutius, E., Ege, M., Riedler, J., SchramBijkerk, D., Brunekreef, B., van Hage, M., Lauener, R., Braun-Fahrlaender, C. (2007).** Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin. Exp. Allerg.* 37, 661-670.
- **Wicklow, D.T., Shotwell, O. L. (1983).** Intrafungal distribution of aflatoxin among conidia and selerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Can. J. Microbiol.*, **29**, 1– 5.
- **Wickens, K., Lane, J.M., Fitzharris, P., Siebers, R., Riley, G., Douwes, J., Smith, T., Crane, J. (2002).** Farm residence, exposures, and the risk of allergic diseases in New Zealand children. *Allergy* 57, 1171-1179.
- **Zadi, H. (1998).** Bactéries lactiques isolées de lait de *Camelus dromedarius* : étude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Constantine, Algérie. 205.
- **Zadi-Karam .H et Karam. N-E. (2006)** Lactic acid bacteria from Camel milk. Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Université d'Oran-Sénia, Oran, Algérie.

## Annexe 1

### Milieu de MRS (Gélose de Man Rogosa Sharpe)

Peptone.....	10g
Extrait de viande .....	10g
Extrait de levure.....	5g
Tween .....	80mL
Phosphate dipotassique.....	2g
Acétate de sodium .....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium .....	2 g
Sulfate de manganèse.....	0,005g
Agar-agar.....	5 g
Eau distillée .....	1000 mL

pH = 6.5

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 2

### Milieu YPGA (Yeast Peptone Glucose Agar)

Extrait de levure .....	10g
Peptone .....	10g
Glucose .....	20g
Agar .....	17g
Eau distillée .....	1000 mL

pH = 5

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 3

### Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Pomme de terre .....	200 g
Dextrose .....	10 g
Agar .....	15 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH= 7,3

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 4

### Milieu GN (Gélose nutritif)

Extrait de viande .....	1g
Extrait de levure .....	2,5g
Peptone .....	5 g
Chlorure de sodium .....	5 g
Agar .....	15 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH =7,0

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 5

### Bouillon nutritif

Peptone .....	15g
Yeast extract.....	5g
NaCl .....	5g
Eau distillée .....	1000ml

pH = 7,4

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 6

### Milieu Czapek

Nitrate de sodium .....	2g
Chlorure de potassium .....	0,5g
Sulfate de magnésium.....	0,5 g
Sulfate ferreux .....	0,01
Phosphate de potassium.....	1 g
Saccharose.....	30g
Eau distillée .....	1000ml

pH = 6,8 ± 0,2

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 7

### Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant (BLBVB)

Peptone .....	10g
Lactose .....	10g
Bile .....	20ml
Vert brillant .....	13mg

pH = 7,4

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 8

### Bouillon nitraté

Bouillon nutritif additionné de nitrate de sodium  $\text{NaNO}_3$ ..... 1 g / 100 mL

## Annexe 9

### Réactif 1 de Griesse

Acide sulfamique .....	0.8 g
Acide acétique 5N.....	100ml

## Annexe 10

### Réactif 2 de Griesse

Alpha-Naphthylamine.....	0.5 g
Acide acétique 5N .....	100ml

## Annexe 11

### Eau peptonée

Peptone exempte d'indole.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Eau distillée .....	1000ml

pH = 7,2

Autoclavage 120C°, 15min

## Annexe 12

### Milieu MEVAG

Macération de viande (1 kg / l) .....	25ml
Chlorure de sodium .....	5.2g
Agar .....	3,12g
Rouge de phénol.....	0,035ml
Eau distillée .....	1000 mL

Autoclavage 120C°, 15min

## Résumé

Beaucoup de microorganismes dans la nature peuvent exercer un effet bénéfique sur la santé humaine. A cet effet, Les microorganismes probiotiques agissent principalement en stimulant la flore intestinale et le système immunitaire, essentiellement, par leurs interactions avec le contenu digestif, ainsi que leur activité anti microbienne.

L'exploration des échantillons du sol et du lait de différentes régions locales, a abouti à l'obtention de 50 isolats bactériens et levuriens. Après purification, seulement 36 isolats ont fait l'objet du complément d'étude. Le test de sélection des isolats à effet antifongique a permis de retenir seulement 6 isolats bactériens (CH1, CH2, CH7, A1, B1, L10), qui possèdent un effet inhibiteur très remarquable vis-à-vis de la souche mycotoxinogène *Aspergillus flavus*.

L'étude de l'effet antimycotoxinogène des molécules bioactives contenues dans le surnageant des cultures des 6 bactéries sélectionnées, a montré que seulement 3 bactéries (CH1, CH2, CH7), isolées à partir du lait de chamelle, ont une capacité d'inhiber la sécrétion de l'aflatoxine B1 par la souche fongique *Aspergillus flavus*.

En complément, deux autres tests ont été développés pour confirmer l'activité probiotique des souches sélectionnées ; la tolérance au pH gastrique, et la tolérance aux sels biliaires de l'intestin. Les deux tests se sont révélés positifs, ce qui témoigne du potentiel probiotique des isolats.

L'identification préliminaire des isolats bactériens, basée sur l'étude macroscopique, microscopique ainsi que les tests biochimiques ont montré que les bactéries CH1 et CH2 appartiennent au genre *Enterococcus sp.* alors que la bactérie CH7 appartient au genre *Lactococcus sp.*

**Mots clés :** Probiotiques, Bactéries lactiques, lait de chamelle, activité anti mycotoxinogène.

## Abstract

Many microorganisms in nature can have a beneficial effect on human health. The probiotics are one of these microorganisms and act mainly by stimulating the intestinal flora and the immune system, primarily through their interactions with the gastrointestinal tract and their antimicrobial activity.

The exploration of soil and milk samples from local areas lead to finding 50 isolates of different species of yeast and bacteria. After purification, only 36 isolates were the subject of further study. The screening test for antifungal effect isolates allowed to retain only 6 bacterial isolates (CH1, CH2, CH7, A1, B1, L10) which have a remarkable inhibitory effect against *Aspergillus flavus* fungal strain.

The study of the antimycotoxinogen effect of bioactive molecules in the culture supernatant of the 6 selected bacteria, showed that only 3 bacteria (CH1, CH2, CH7) isolated from camel milk have an ability to inhibit the secretion of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* fungal strain.

Two other tests are developed to confirm the probiotic activity of chosen species, the tolerance to gastric pH, and tolerance to bile salts of intestine. Those tests were revealed positive which confirm the probiotic potentiality of those bacteria.

Preliminary identification of bacterial isolates, based on macroscopic and microscopic examination and biochemical tests, have shown that the CH1 and CH2 bacteria belong to the genus *Enterococcus sp.* while CH7 belongs to the genus *Lactococcus sp.*

Key words : Probiotic, Lactic acid bacteria, Camel milk, anti mycotoxinogen activity.

## ملخص

الكثير من الميكروبات الموجودة في الطبيعة يمكنها أن تحدث أثراً مفيداً على صحة الانسان. ومنه البروبيوتيكات تؤثر بصفة أساسية بتحفيز الميكروفلورا المعوية والجهاز المناعي، بالتحديد عن طريق العلاقات الموجودة بين المحتوى المعوي من غذاء والنشاط ضد مكروبي.

البحث في عينات التربة والحليب لمختلف المناطق نتج عنه الحصول على 50 عزلة بكتيرية وخميرية. بعد عملية التنقية تم اختيار 36 عزلة فقط لإتمام مشروع البحث. بعدها تم اختيار العزلات ذات مفعول مضاد للفطريات CH1, CH2, CH7, خاصة النوع السمي *Aspergillus flavus*.

دراسة المفعول مضاد السمية للجزيئات البيولوجية الموجودة في محلول البكتيريا بين أنه فقط ثلاث أنواع بكتيرية ( CH1, CH2, CH7) معزولة من حليب الإبل، هن من يملكن القدرة على منع انتاج الأفلاتوكسين ب1 من قبل نوع *Aspergillus flavus*.

للإتمام البحث ، تم القيام باختبارين آخرين للإثبات أن هاته الأنواع تمثل بروبيوتيكات : اختبار القدرة على تحمل الوسط الحمضي للمعدة والقدرة على تحمل الأملاح البيلية الموجودة في الأمعاء الدقيقة. كانت نتيجة كل من الاختبارين إيجابية، مما يثبت القدرة البروبيوتكية للبكتيريا المختارة.

أخيراً، تم اجراء اختبارات للتعريف بالبكتيريا المختارة، من خلال الدراسة الماكروسكوبية والميكروسكوبية، أيضاً الاختبارات البيوكيميائية التي بين من خلالها أن كلا من CH1 و CH2 تنتمي إلى نوع *Enterococcus sp.* أما CH7 تنتمي إلى نوع *Lactococcus sp.*

الكلمات المفتاحية : البروبيوتيك ، بكتيريا الحليب ، حليب الإبل ، المفعول المضاد للسمية الفطرية.

# Recherche de microorganismes de différents écosystèmes développant une activité probiotique

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des Mycètes

Beaucoup de microorganismes dans la nature peuvent exercer un effet bénéfique sur la santé humaine. A cet effet, Les microorganismes probiotiques agissent principalement en stimulant la flore intestinale et le système immunitaire, essentiellement, par leurs interactions avec le contenu digestif, ainsi que leur activité anti microbienne.

L'exploration des échantillons du sol et du lait de différentes régions locales, a abouti à l'obtention de 50 isolats bactériens et levuriens. Après purification, seulement 36 isolats ont fait l'objet du complément d'étude. Le test de sélection des isolats à effet antifongique a permis de retenir seulement 6 isolats bactériens (CH1, CH2, CH7, A1, B1, L10), qui possèdent un effet inhibiteur très remarquable vis-à-vis de la souche mycotoxinogène *Aspergillus flavus*.

L'étude de l'effet antimycotoxinogène des molécules bioactives contenues dans le surnageant des cultures des 6 bactéries sélectionnées, a montré que seulement 3 bactéries (CH1, CH2, CH7), isolées à partir du lait de chamelle, ont une capacité d'inhiber la sécrétion de l'aflatoxine B1 par la souche fongique *Aspergillus flavus*.

En complément, deux autres tests ont été développés pour confirmer l'activité probiotique des souches sélectionnées ; la tolérance au pH gastrique, et la tolérance aux sels biliaires de l'intestin. Les deux tests se sont révélés positifs, ce qui témoigne du potentiel probiotique des isolats.

L'identification préliminaire des isolats bactériens, basée sur l'étude macroscopique, microscopique ainsi que les tests biochimiques ont montré que les bactéries CH1 et CH2 appartiennent au genre *Enterococcus sp.* alors que la bactérie CH7 appartient au genre *Lactococcus sp.*

**Mots clés :** Probiotiques, Bactéries lactiques, lait de chamelle, activité anti mycotoxinogène,

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM),

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Mme. MIHOUBI. I  
**Rapporteur :** Mr. KACEM CHAUCHE. N  
**Examinatrice :** Mlle. KARA ALI. M

**Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine**  
**Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine**  
**Dr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine**

**Date de soutenance :** 26/06/2016

