

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de
l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Dr. Moulay Tahar de Saida

Faculté de Science

Département Biologie



MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN BIOLOGIE

Option : Microbiologie Appliquée

Présentées par :

- ✓ Mme. HAMI Saadia
- ✓ Melle. TERRAS Oumaima

Sur le Thème Intitulé

Les propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques isolées à
partir d'ensilage

Présentées devant le jury

Mme BEN ABDESLAM Yasmina
Mr BELLIL Yahiya
Mme CHAHROUR Wassila

Maître de conférences-B-
Maître de conférences-B-
Maître de conférences-B-

Président
Examinatrice
Encadreuse

Année universitaire :
2019/2020

Remerciement

Après achèvement de ce travail, Je tiens à remercier en premier lieu le bon DIEU, le Clément, le Miséricordieux, le tout Puissant, qui m'a permis de réaliser ce noble travail, ainsi que ses innombrables bienfaits.

Je tiens avant tout à remercier ma promotrice Mme. Chahrour Wassila qui a accepté de m'encadrer, qui m'a guidé par ses précieux conseils et suggestions pertinentes. En plus elle m'a profondément expliqué les phases de ce travail.

Veillez trouver ici, l'expression de mon profond respect et mes sincères remerciements.

En outre, je tiens aussi à exprimer mes sincères salutations.

Je tiens également à remercier :

Mme Ben Abdeslam Yasmina pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.

Mr Bellil Yahiya pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, trouvent ainsi l'expression de mes profondes gratitudes et respects.

Liste des abréviations

BL : bactérie lactique

Xos : xylopolisaccharide

RGE : red ginseng extracts

FOS : fructo-oligosaccharides

GOS : Les galacto-oligosaccharides

TOS : les transgalacto-oligosaccharides

FAO : Food and Agriculture Organization

OMS : Organisation mondiale de santé

pH:potentiel Hydrogène

UFC : Ultimate Fighting Championship

GRAS : Généralement reconnu sansrisque

ADN : Acide désoxyribonucléique

% : pourcentage

(p/v) : poids par volume

µm : micromètre

PSW : Pacific South West,

Liste des tableaux

Le tableau 01 : présente les principaux genres de bactéries lactiques et les caractéristiques physiologiques.....	11
Tableau 02 : Quelques applications des bactéries lactiques.....	18
Tableau 03 : Résultats de l'aspect microscopique des bactéries lactiques isolées d'ensilage.....	40

Listes des figures

Figure 1 : L'arbre phylogénétique des bactéries lactiques.....	12
Figure 2 : Souche de lactobacilles observée par microscopie électronique à balayage.....	12
Figure 3 : <i>Leuconostoc mesenteroides</i> au microscope électronique.....	14
Figure 4 : <i>Enterococcus</i> au microscope électronique.....	15
Figure 5 : <i>Enterococcus faecalis</i> au microscope électronique.....	15
Figure 6 : Résumé schématique des mécanismes d'action des probiotiques.....	25
Figure 7 : Représentation des boîtes d'isolement sur milieu MRS et Rogosa.....	37
Figure 8 : Représentation de l'aspect macroscopique des colonies de bactérie lactique sur milieu MRS.....	38
Figure 9 : Représentation de l'observation au microscope optique (x100) des bactéries lactiques après coloration de Gram.....	39

تلخيص

يعتبر علف السيلاج من البيئات الحيوية المفضلة لنمو أجناس معينة من بكتيريا حمض اللاكتيك التي تضمن استقرار وجودة السيلاج ومن ناحية أخرى لها خصائص بروبيوتيك.

تم عزل بكتيريا حمض اللاكتيك من علف بالبالون عمره شهرين على وسطي استزراع MRS و Rogosa ؛ الدراسات العيانية للمستعمرات والدراسات المجهرية للخلايا تحدد مسبقاً ثماني عزلات؛ من المحتمل أن تكون بكتيريا حمض اللاكتيك. تكون العصيات هي السائدة ويمكن اعتبارها بكتيريا لاكتوباسيلوس، والتي لها تأثير كبير على تخمر السيلاج وقد يكون لها خصائص بروبيوتيك.

الكلمات المفتاحية: اللاكتوباسيلوس، السيلاج، بكتيريا حمض اللاكتيك، البروبيوتيك.

Résumé

Le fourrage ensilé est un biotope très favorable pour la croissance de certains genres des bactéries lactiques qui assurent la stabilité et la qualité de l'ensilage et d'autre part possédant des propriétés probiotiques.

À partir d'un fourrage ensilé type ballon de deux mois, l'isolement des bactéries lactiques a été réalisé sur deux milieux de cultures MRS et Rogosa ; les études macroscopiques des colonies et les études microscopiques des cellules permet de pré-identifier huit isolats ; susceptibles d'être des bactéries lactiques .la forme bacille est dominante et on peut la considérer comme des *lactobacillus*, qui ont un impact majeur sur la fermentation de l'ensilage et peuvent avoir des propriétés probiotiques.

Mots clés : lactobacillus, ensilage, bactéries lactiques, probiotiques.

Abstract

Silage fodder is a very favorable biotope for the growth of certain kinds of lactic acid bacteria which ensure the stability and quality of silage and on the other hand possessing probiotic properties.

From a two-month-old balloon silage fodder, the isolation of lactic acid bacteria was carried out on two culture media MRS and Rogosa; the macroscopic study of the colonies and the microscopic studies of the cells allows the pre-identification of eight isolates; likely to be lactic acid bacteria. The bacillus form is dominant and can be considered as lactobacillus, which have a major impact on the fermentation of silage and may have probiotic properties.

Keywords : lactobacillus, silage, lactic acid bacteria, probiotic.

Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Listes des figures

PARTIE THÉORIQUE

Introduction

Chapitre I

1.L'ensilage.....	04
2 Différent type de silo.....	04
2.1Silos horizontaux.....	04
2.2Les silos presses.....	04
2.3Balles enrobées.....	04
3.Les processus biochimiques et microbiologiques au cours d'ensilage.....	05
3.1 Associer des enzymes aux bactéries lactiques.....	05
3.2Phase aérobie.....	05
Début d'acidification.....	05
3.2-A Entérobactéries « fermentation acétique ».....	05
3.2-B Levures.....	06
3.2-C Moisissures.....	06
3.3 Phase anaérobie.....	06
3.3-A Bactéries lactiques : fermentation lactique.....	06
3.3-B Phase Butyrique.....	07
3.4 Phase de l'alimentation.....	07

Chapitre II

1. Généralité.....	09
--------------------	----

2. Définition et caractéristique.....	09
3. Classification des bactéries lactiques.....	10
4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques.....	12
4.1 Genre <i>Lactobacillus</i>	12
4.2 Genre <i>Streptococcus</i>	13
4.3 Genre <i>Lactococcus</i>	14
4.4 Genre <i>leuconostoc (Ln.)</i>	14
4.5 Genre <i>enterococcus</i>	14
4.6 Genre <i>Pediococcus</i>	15
4.7 Genre <i>Carnobacterium</i>	16
5. Intérêt des bactéries lactiques.....	16
5.1 Utilisation industrielle des bactéries lactiques.....	16
5.2 Dans le secteur agronomique.....	17
5.3 Dans le domaine d'alimentaire.....	17
5.4 Dans le domaine de la santé.....	19

Chapitre III

1. Historique.....	21
2. Probiotiques.....	21
3. Les Caractéristiques des bactéries probiotiques.....	21
4. Les microorganismes probiotiques.....	22
4.1 Les ferments lactiques.....	22
4.2 Les bifidobactéries.....	22
4.3 Les levures.....	22
4.4 Les bactéries sporulées.....	22
4.5 Prébiotiques.....	22
5.1 Le rôle bénéfique des prébiotiques.....	23
5.2 Probiotiques et synbiotiques.....	24
5.3 Origine des probiotiques.....	24

6. Mécanisme d'action et effets bénéfiques des probiotiques	24
6.1 Effets sur les fonctions intestinales.....	25
6.2 Modulation du microbiote.....	25
6.3 Inhibition de pathogènes.....	26
6.4 Modulation du système immunitaire.....	27
7. Probiotique : impact sur la santé humaine.....	27
7.1 Caries et maladie parodontale.....	27
7.2 Effets secondaires gastro-intestinaux.....	27
7.3 Diarrhée.....	28
7.4 Intolérance de lactose.....	28
7.5 Anti-cancer.....	29
7.6 Production des vitamines.....	29
8 D'autre utilisation des probiotiques.....	30
8.1 Bioingénierie pour améliorer les propriétés fonctionnelles des souches Probiotiques.....	30
8.2 Volaille fermentée et déchets d'abattoir.....	31

PARTIE PRATIQUE

1. Échantillonnage.....	34
2. Test microbiologique.....	34
2.1 Isolement.....	34
2.2 Pré-enrichissement.....	34
3. Pré-identification de la flore lactique.....	34
3.1 Étude des caractères morphologiques.....	34
*Étude macroscopique.....	35

3.2 Test biochimique	35
Recherche de la catalase.....	35
*Étude microscopique.....	35
Résultats et interprétation	
1. Isolement des bactéries lactiques.....	38
*Étude macroscopique.....	38
*Étude microscopique.....	38
2 Test de catalase.....	40
Conclusion.....	43
Annexe	
Références bibliographiques	

Introduction

Les cultures fourragères se situent à la croisée des productions agricoles et d'élevages, elles relèvent de l'agronomie et servent aussi aux productions animales. Le fourrage est la matière première de production animale dont l'importance économique est considérable (Roberge, 1999).

L'ensilage est une méthode de conservation des fourrages par acidification passant par la fermentation lactique anaérobie d'un fourrage humide.

Les bactéries lactiques se réfèrent à un grand groupe de bactéries, plutôt qu'à une seule espèce ou souche, qui produisent de l'acide lactique en tant que sous-produit de la digestion de leur source de nourriture (habituellement des glucides). Ils font partie des groupes de microorganismes les plus importants utilisés dans la fermentation des aliments qui contribuent à la saveur et à la texture des produits fermentés (David *et al.*, 2013).

Récemment, le rôle du LAB dans la santé et la fonctionnalité de l'intestin humain et du bétail a été souligné principalement en raison de leur capacité à croître à un pH bas et à produire des agents antimicrobiens tels que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, les bactériophages et les bactériocines (Foulquié Moreno *et al.*, 2006).

De nombreuses bactéries lactiques sont prouvées avec des fonctions probiotiques qui sont bénéfiques pour l'hôte lorsqu'il est pris en quantité suffisante. La viabilité des bactéries probiotiques est importante pour la survie dans les aliments pendant la durée de conservation et le transit dans les conditions acides de l'estomac. Pour le dépistage des bactéries probiotiques, elles doivent également être résistantes à la dégradation par les enzymes hydrolytiques et les sels biliaires dans l'intestin grêle (Belma et Gulcin, 2009).

À partir de ce contexte, la rédaction de ce document a été créée sur un rappel bibliographique de l'ensilage, les bactéries lactiques, les probiotiques, et une partie expérimentale : isolement, purification et une pré-identification des souches lactiques.

Partie théorique

Chapitre I

1. l'ensilage

L'ensilage est un aliment essentiel pour le bétail basé sur la préservation des cultures fourragères et herbacées par acidification (Bebaymi, 2009). Conserver un fourrage suppose de stabiliser au mieux le matériel vivant (fourrage vert) de façon à pouvoir le stocker plusieurs semaines à plusieurs mois sans qu'il ne s'altère avec une valeur nutritionnelle élevée (Baumont et *al.*, 2011). Parmi les conditions de stockage, la température et la disponibilité des substances fermentescibles jouent un rôle important dans l'activité microbienne dans l'ensilage. (Haiwie, 2020).

L'ensilage est une méthode de conservation des fourrages par fermentation anaérobie (en l'absence d'oxygène). Il s'obtient en hachant et pressant un fourrage qui est ensuite gardé en silo (Wikiagri., 2018). Grâce à la fermentation acidifiante des bactéries lactiques : le fourrage ensilé va être riche en valeur alimentaire car cette méthode va minimiser les pertes de matière sèche et éviter le développement de micro-organismes indésirables et l'apparition de produits toxiques pour les animaux. (Merry et Davies, 1999) (Sandrine, 2004).

2. Différent type de silo

2.1 Silos horizontaux

Qu'il s'agisse de silos couloirs ou de silos meules la même règle s'applique quant au poids du tracteur utilisé pour compacter l'ensilage ; il faut de 0,7 à 1 tonne de poids de tracteur par tonne de matière sèche récoltée par heure (Germain, 2015).

2.2 Les silos presses

Confectionner un silo presse de densité élevée et uniforme n'est pas toujours facile avec les ensilages d'herbe. Il est fréquemment de voir des « dos de chameau » sur les parois des tubes d'ensilage d'herbe. Des vides importants se forment entre ceux-ci et dès que le sac sera ouvert, l'air va se faufiler, souvent très loin, provoquant un développement important de moisissures accompagné d'une élévation de la température de l'ensilage (Maack, 2009).

2.3 Balles enrobées

Comme pour les ensilages hachés, plus la densité des balles enrobées sera élevée moins l'air pourra s'y infiltrer. En plus de compromettre la conservation due à la lente

diffusion de l'air dans la balle il y aura plus de balles à enrober, donc plus de plastique, on est pénalisé deux fois (Germain,2015).

3.Les processus biochimiques et microbiologiques au cours d'ensilage

L'ensilage est le résultat d'une fermentation des plantes fourragères par les bactéries, constituant une partie du patrimoine naturel de la microflore associée avec du matériel végétal (Ma Kimattila et *al.*,2011).

Les bactéries jouent un rôle important dans le procédé de l'ensilage. Il y a beaucoup de bactéries qui ne peuvent vivre dans des conditions du silo, d'autres au contraire y trouvent un milieu idéal. La sève avec sa haute teneur en sucres, en protéines et en sels, fournit une nourriture excellente pour le développement des bactéries. Elles provoquent de nombreux changements dans le fourrage ensilé, dont le principal est le développement d'acides organiques (Hopkins et Ripley,1951).

D'abord l'ensilage subit des conditions aérobies(avec l'oxygène) lors de récolte et du remplissage suivie d'assez près des conditions anaérobies (sans oxygène) qui active la croissance de bactérie lactique et une réduction de pH et finalement, un retour au conditions aérobie pendant la reprise d'ensilage (MULLER,1992).

3.1 Associer des enzymes aux bactéries lactiques

Les enzymes ne sont pas des conservateurs en tant que telles. Elles sont utilisées en association avec les bactéries lactiques (homofermentaires ou hétérofermentaires). Leur rôle est de pré-digérer les fibres facilement digestibles ou les sucres de réserve (amidon) pour fournir davantage de sucres solubles aux bactéries (Weinberg, 2008).

3.2 Phase aérobie

Début d'acidification

3.2.A Entérobactéries « fermentation acétique »

Les entérobactéries sont les premières à prendre le relais car elles sont aérobies facultatives. Leur activité fermentaire, qui s'exerce au détriment des glucides solubles, génère avec une faible production de l'acide acétique (qui induit un début d'acidification), des alcools et du gaz carbonique. Au bout de 24-48 heures, les streptocoques et *leuconostocs* prennent le relais, mais la disparition totale de l'oxygène et la baisse du pH induite par l'accumulation

d'acide acétique réduisent leur activité. Les entérobactéries dégradent aussi la matière azotée en ammoniac.

3.2.B Levures

Toutes les levures se développent bien en présence d'oxygène, et leur rôle important dans la dégradation anaérobie de fourrage est bien établi. Dans l'ensilage un sous-groupe se développe qui peut rivaliser avec succès pour les glucides fermentescibles en anaérobie. Ce sont remplacées par un sous-groupe en mesure d'utiliser acides organiques (Henderson, 1993). Les genres de levures les plus importants associés à l'ensilage sont : *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* et *Saccharomyce* (Weinberg, 2008).

3.2.C Moisissures

La plupart des moisissures sont dépendants de l'oxygène pour leur croissance et leur propagation mais même d'infimes quantités d'oxygène sont suffisantes pour maintenir le métabolisme de certains membres du groupe (Pahlow, 2003) cité par (Henderson, 1993).

Certaines moisissures peuvent produire des mycotoxines dans les ensilages qui pour les animaux et les humains.

Les genres d'ensilage sont : *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* et *Mucor* (Wenbeg, 2008). Ces fermentations sont responsables d'une part de pertes d'éléments nutritifs, d'autre part d'un ralentissement de l'acidification du fourrage, en diminuant la quantité des sucres utilisables par les bactéries lactiques. Tant que le pH de stabilité n'est pas atteint, les flores indésirables comme les germes butyriques ou les *Listeria* peuvent se développer.

3.3 Phase anaérobie

3.3. A Bactéries lactiques : fermentation lactique

L'ensilage consiste à une fermentation anaérobie naturelle par des bactéries productrices d'acide lactique. Leur nombre peut varier cependant très largement (de 10^3 à 10^7 ufc par gramme de fourrage) selon les conditions d'environnement, le type de fourrage et la localisation géographique. (Weinberg 2008).

Si les conditions du milieu sont favorables, à savoir : anaérobiose, température comprise entre 10 et 40°C, quantité suffisante de sucres fermentescibles, pH inférieur à 6, leur

développement va être explosif et l'acidification rapide qui va en résulter (pH rapidement inférieur à 4) va bloquer le développement des autres espèces et stabiliser l'ensilage (Alan,2004).

3.3.B Bactéries butyriques : fermentation butyrique

Elles présentent dans l'ensilage sous forme de spores, les bactéries butyriques (*Clostridium butyricum*, *tyrobutyricum*) peuvent germer sous réserve d'une humidité suffisante (supérieure à 70 %) et d'une acidité faible (pH > 4,4). Leur développement se fait à partir des éléments nutritifs initiaux résiduels (sucres, acides aminés, protéines...) mais aussi au détriment des produits de fermentation (lactate essentiellement) ce qui induit une augmentation de pH (Bill,2018).

3.4Phase de l'alimentation

Lorsque les animaux sont nourris, l'ensilage est exposé à l'oxygène, les microorganismes aérobies recommencent à croître de l'ensilage serait détruit en raison d'une augmentation du pH et de la croissance de levure et de moisissures(Weinberg,2011).

Chapitre II

1. Généralité

Les bactéries lactiques, des micro-organismes, utilisées pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans (Drider et Prevost, 2009). Ce n'est qu'à la fin du 19ème siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini, plus précisément en 1919 par Orla-Jensen. Il a réuni plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (Tredez, 2008). Les bactéries lactiques appartiennent au groupe des bactéries bénéfiques, qui se trouvent partout dans la nature ainsi que dans le système digestif de l'homme. Depuis des millénaires, elles sont utilisées dans l'alimentation humaine. Elles occupent une place importante dans les fabrications agroalimentaires (Dortu et Thonart, 2009 ; Moraes *et al* 2010), elles sont utilisées pour le saumurage des légumes, les salaisons des viandes et des poissons, et dans la fabrication du vin, ainsi qu'en boulangerie, elles disposent généralement du statut GRAS (Vescovo *et al.*, 1996).

2. Définition et caractéristique

Le groupe de bactéries lactiques constitue un groupe hétérogène dont le caractère commun est la production d'acide lactique suite à la fermentation des glucides (Labioui *et al.*, 2005). Il existe d'autres bactéries produisant de l'acide lactique mais qui ne sont pas considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques. C'est le cas par exemple, de *Bacillus* et de *Sporolactobacillus* qui sont des bactéries Gram (+) sporulées (Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes en forme de coques ou de bâtonnets, Gram-positif, incapables de produire la catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase), généralement immobiles et asporulées (Dellagio *et al.*, 1994).

De nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, facteurs de croissance, peptides, base purique et pyrimidique, des vitamines B et des acides gras. Elles ont également une activité aromatique très importante d'où leur utilisation en agroalimentaire (Leveau *et al.*, 1991).

Les bactéries lactiques ont un métabolisme strictement fermentaire, elles sont classées en bactéries homofermentaires qui produisent uniquement l'acide lactique, et bactéries hétérofermentaires qui produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO₂ et/ou de l'éthanol (Pilet *et al.*, 2005).

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermentés, fromage). Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus*

lactis et/ou *Lactococcus garvieae*, les plus rencontrés dans le lait et le fromage sont communément utilisés comme ferments (« starter culture ») par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Elles sont à l'origine de la fermentation pour la préparation de nombreuses boissons à partir de plantes (boza, cidre), céréales (maïs, sorgho)(Ennahar et al., 1998).

3. Classification des bactéries lactiques

En 1919, ORLA-JENSEN a séparé les bactéries lactiques en deux groupes : homofermentaire, qui réunit les bactéries formant très peu de métabolites autres que l'acide lactique, celui-ci représentant 90 à 97 % du lactose métabolisé ; et hétérofermentaire, qui réunit les bactéries formant du lactate, en proportion moindre, ainsi que des concentrations non négligeables de produits secondaires et du CO₂. Ces deux familles sont ensuite subdivisées en sous-familles selon des critères morphologiques et physiologiques (Dellaglio *et al.*, 1994). Dès 1974, selon le Bergey's manual (Holt *et al.*, 1994), les bactéries lactiques se retrouvent dissociées en deux familles : celle des *Streptococcacea* et celle des *Lactobacillacea*. En 1985, Schleifer *et al.* ont proposé la division des streptocoques en 4 genres génétiquement distincts : *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* et *Lactococcus*, ces deux derniers regroupant les streptocoques lactiques(Dellaglio *et al.*, 1994).

Cependant, la caractérisation phénotypique/biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. Le pourcentage G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho *et al.*, 2007). Streptocoques lactiques (Dellaglio *et al.*, 1994).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classifier les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). (Collins *et al.*, 1993 ; Ho *et al.*, 2007).

Le tableau 1 : présente les principaux genres de bactéries lactiques et les caractéristiques physiologiques (Matamoros, 2008).

Genre	Forme de la cellule	Type de fermentation	configuration de l'acide lactique	Espèce type
<i>Aerococcus</i>	Coques	Homofermentaire		<i>Ac.viridans</i>
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaire	L(+)	<i>Cb.divergens</i>
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Ec.faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo ou hétéro-Fermentaire	D(-),L(+) ou D/L	<i>Lb.delbrueckii</i>
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Lc.lactic</i>
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaire	D(-)	<i>Ln.mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	D(-)	<i>Oe.oeni</i>
<i>Pediococcus</i>	Coques	Homofermentaire	D/L ou L(+)	<i>Pc.damnosus</i>
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Sc.salivarius</i>
<i>Tetragenococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Tc.halophilus</i>
<i>Vagococcus</i>	Coques ovoïdes	Homofermentaire	L(+)	<i>Vc.fluvialis</i>
<i>Weissella</i>	Petit bacilles	Hétérofermentaire	D/L	<i>We.viridescens</i>

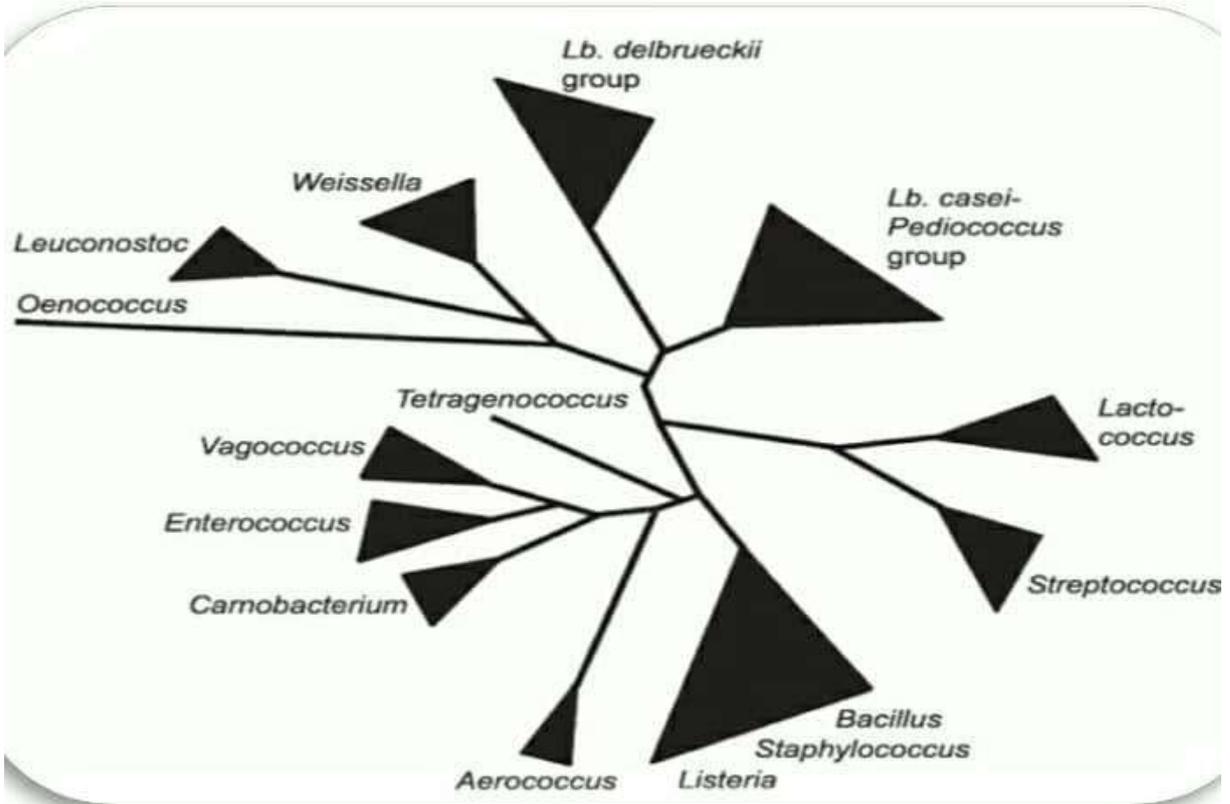


Figure 1 : L'arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Axelsson, 2004).

4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

4.1 Genre *Lactobacillus*

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulées et généralement non mobiles. Les souches mobiles le sont grâce à une ciliature péritriche. Ils peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins ou très courts ou coccobacilles. La formation de chaînes de cellules est courante (De Vos *et al.*, 2009). La figure 1 montre l'aspect microscopique d'une souche de lactobacilles observée par microscopie électronique à balayage.



Figure 2. Souche de lactobacilles observée par microscopie électronique à balayage.

(Tirée de www.inra.fr)

Les lactobacilles sont subdivisés selon leur type fermentaire en trois groupes selon la classification d'Orla-Jensen remaniée par Kandler et Weiss (Selon De vos *et al.*, 2009).

Le groupe I : comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire qui produisent uniquement de l'acide lactique à partir du glucose et qui sont incapables de fermenter les pentoses ou le gluconate. Elles possèdent une fructose 1,6-diphosphate aldolase et une phosphofruktokinase. Ce groupe est constitué majoritairement d'espèces présentes chez l'Homme et les animaux et qui participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme. Exemple : *L. acidophilus* et *L. gasseri*.

Le groupe II : comprend les espèces à métabolisme hétérofermentaire facultatif. Ces espèces utilisent la voie homofermentaire mais elles sont capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration de glucose limitée. Elles ont une fructose 1,6-diphosphate aldolase et une 6-phosphogluconate déshydrogénase. Exemple : *L. casei*, *L. sake*, *L. curvatus* et *L. plantarum*.

Le groupe III : comprend les espèces hétérofermentaires obligatoires qui forment des quantités équimolaires de CO₂, d'acide lactique, d'acide acétique et / ou d'éthanol. Les pentoses sont fermentés en acides lactique et acétique par la voie de la phosphocétolase car ces bactéries possèdent une phosphocétolase mais pas d'aldolase. Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'Homme et participent à l'équilibre de la flore intestinale. Exemple : *L. brevis* et *L. fermentum*.

4.2 Genre *Streptococcus*

Les cellules sont généralement, de formes sphériques ou ovoïdes disposées par paires ou en chaînes. La formation de chaîne est plus clairement observée dans des cultures liquides, et il est difficile de distinguer ce genre des *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus* sur une base morphologique (Wijtzes *et al.*, 1997).

La seule espèce utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* (Hols *et al.*, 2005), elle est isolée du lait pasteurisé, et des levains artisanaux (Bekhouche, 2006). Sa température optimale de croissance est d'environ 42°C. Cependant, elle est incapable de croître à des valeurs de pH supérieures à 9,6, à une concentration égale ou supérieure à 4%(p/v) de NaCl et en présence de 0,1% (p/v) de bleu de méthylène. Cette espèce produit de l'acide lactique uniquement à partir de quelques sucres (fructose, glucose, mannose, lactose et saccharose) (Klaenhammer *et al.*, 2005).

Suite à une vaste révision taxonomique de *Streptococcus* et la découverte de nouvelles espèces, il comporte plus de 100 espèces et sous-espèces dont le contenu en guanine et cytosine est compris entre 35 et 46% (Zhang *et al.*, 2013)

4.3 Genre *Lactococcus*

Les lactocoques sont des coques à gram positifs, de 0,5 à 1 μm de diamètre. Ils présentent un groupement typique en chaînettes, immobiles, dépourvus de spores et rarement capsulés. Aéro-anaérobie facultatifs, ils se développent aussi bien en absence d'oxygène qu'en présence d'oxygène. Ils sont mésophiles, avec un optimum de croissance de 37°C. Les lactocoques ne tolèrent pas les milieux acides et salés. Ils sont incapables de croître à pH 9,6 et en présence de 6,5% de NaCl. L'activité métabolique de lactococcus varie, mais toutes les espèces se caractérisent par l'absence de catalase et l'utilisation de la voie fermentaire pour la dégradation de certains glucides, sans production de gaz. Ils sont donc homofermentaires et produisent exclusivement de l'acide lactique(Simpson *et al.*, 2004).

4.4 Genre *leuconostoc (Ln.)*

Ils représentent les coques hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol, et se regroupent en paires ou en chaînettes mésophiles. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Ho *et al.*, 2007). Ce genre comprend les espèces suivantes : *Ln. mesenteroides* avec ses sous espèces(*mesenteroides*, *cremoris* et *dextranicum*), *Ln. lactis*, *Ln pseudomesenteroides* et *Ln. paramesenteroides*(Collins *et al.*,1993).

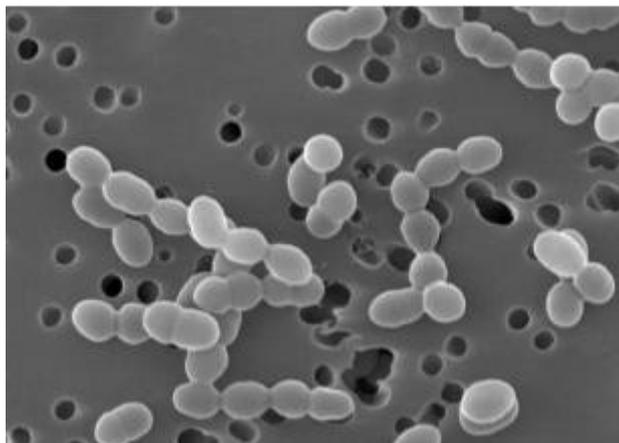


Figure 3 : *Leuconostoc mesenteroides* au microscope électronique. (Wallace *et al.*,2003).

4.5 Genre *enterococcus*

Ce genre regroupe des bactéries commensales de l'intestin. L'espèce fréquemment rencontrée dans l'alimentation est essentiellement *Enterococcus faecalis*. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobile, homofermentaire et généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol (Ho et *al.*, 2008).

Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux, dans les eaux usées, dans l'eau douce, dans l'eau de mer, dans le sol et sur les végétaux. La plupart des espèces de ce genre participent à la composition des microflores intestinales (Deveriese et *al.*, 2002).

On les retrouve aussi dans le lait et les produit laitiers, les produits carnés et de la pêche. Dans les produits laitiers ils atteignent au maximum des niveaux de 10^7 ufc/g (Foulquié-Moreno et *al.*, 2006).

Le genre *Enterococcus* comprend des bactéries ayant une température de croissance optimale de 35°C. Elles sont capables de résister à des conditions hostiles et à un chauffage de 60°C durant 30 minutes (Foulquié-Moreno et *al.*, 2006).

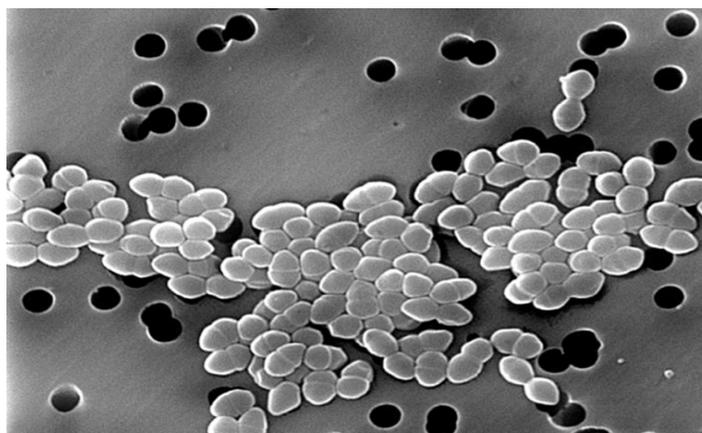


Figure 4 : *Enterococcus* au microscope électronique (Carr et al., 2002),



Figure 5 : *Enterococcus faecalis* au microscope électronique (Wallace et al., 2003).

4.6 Genre *Pediococcus*

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, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halo halophilus* et *Tetragenococcusmuriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

4.7 Genre *Carnobacterium*

Le genre *Carnobacterium* a été proposé en 1987 par Collins et ses collaborateurs pour classer les souches ressemblant à *Lactobacillus* (Carr et al., 2002). On retrouve cette bactérie essentiellement dans les produits carnés, les produits de la mer et dans les produits laitiers (Gonzalez-Rodriguez et al., 2002 ; Sakala et al., 2002 ; Dalgaard et al., 2003). Ce genre est constitué de bacilles minces, droits ou légèrement incurvés, se présentant de manière isolée ou groupée par deux (formant un V caractéristique) ou parfois en chaînettes, mobiles ou immobiles, et à métabolisme hétérofermentaire (Carr et al., 2002). Il est incapable de croître en présence de 8% (p/v) de NaCl et à 45°C, mais donne des colonies visibles à 10°C et parfois à 0°C. Sa température optimale de croissance varie de 23°C à 30°C et son pH optimum de 6,0 à 7,4. Son comportement vis-à-vis de l'oxygène est anaérobie ou aérotolérant (Edima, 2007).

5. Intérêt des bactéries lactiques

L'utilisation des bactéries lactiques pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes : activité acidifiante, propriétés enzymatiques (activité protéolytique, peptidasique et lypolytique), production de métabolites d'intérêt telle que la peroxyde d'hydrogène, les acides organiques et les bactériocines (Belyagoubi, 2014).

5.1 Utilisation industrielle des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques font partie de l'alimentation humaine depuis l'antiquité. Elles participent à la fermentation de nombreux aliments d'où changement de la saveur de l'aliment et de sa texture. D'autre part, les bactéries lactiques produisent des peptides et des molécules comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyl ou l'éthanol.

L'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres. La fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de nombreux produits différents,

chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité (Hugenholtz *et al.*, 2002).

Les bactéries lactiques sont aussi utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical et dans l'industrie comme des additifs alimentaire (Wisselink *et al.*, 2002).

5.2 Dans le secteur agronomique

Les bactéries lactiques sont utilisées comme agents biologiques de conservation du fourrage par fermentation acidifiante. L'utilisation des bactéries lactiques dans les ensilages, permet de limiter ou d'inhiber certaines voies métaboliques indésirables telles que l'acétogénèse et la protéolyse, conduisant à l'amélioration de la qualité nutritive du fourrage. Ont observé une augmentation de 5 à 11% des performances zootechniques telles que la digestibilité, le gain de poids ou la production laitière chez les bétails (Salawu *et al.*, 2001 ; Khuntia et Chaudhary, 2002).

L'étiologie des effets bénéfiques engendrés par les souches lactiques dans les ensilages reste encore très peu élucidée mais des équipes suggèrent un effet probiotique affectant favorablement l'écosystème et le pH ruminal (Weingerg *et al.*, 2004 ; Gollop *et al.*, 2005).

5.3 Dans le domaine d'alimentaire

Les bactéries lactiques sont aussi responsables de l'ouverture des fromages par production de CO₂, de la texture produite fermentés, par production des exopolysaccharides ainsi que de la production de peroxyde d'hydrogène ou de bactériocines qui inhibent la croissance de bactéries indésirables (Doleyres, 2003).

La biopréservation consiste à ajouter sur un aliment un ou des microorganismes et/ou leurs métabolites, sélectionnés pour leurs capacités à inhiber le développement des microorganismes indésirables, afin d'augmenter les durées de vie des denrées alimentaires et/ou de limiter la croissance des germes pathogènes. Ce concept s'inscrit dans l'utilisation des technologies de barrière, en complément à d'autres méthodes de conservation comme la réfrigération, la conservation sous vide ou sous atmosphère modifiée, etc. (Pilet *et al.*, 2009).

En outre, elles sont impliquées dans la fermentation et la bio-conservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateemet *et al.*, 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis *et al.*, 2005).

Chapitre II : Les bactéries lactiques

L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (tableau 02) (Dortu et Thonart, 2009).

L'application de ces souches bénéfiques doit répondre à certains critères :

- absence de pathogénicité ou activité toxique ;
- capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques ;
- facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001).

Tableau 02 : Quelques applications des bactéries lactiques (Zhu *et al.*, 2009).

Souches lactiques	Applications	Références
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Probiotique	Altermann <i>et al.</i> (2005)
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC367	Ferment de l'ensilage, levain, fermentation de la bière.	Dubchaket <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC334	Probiotique, fermentation du lait, la saveur des fromages	Dubchaket <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus casei</i> BL23	Probiotique, fermentation du lait, la saveur des fromages	Kandler et Welss (1986)
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ATCC BAA-365	Fermentation du yaourt	Tamime et Robinson (1999)
<i>Lactobacillus helveticus</i> DPC 4571	Industrie fromagère	Callanan <i>et al.</i> (2008)
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	Probiotique	Primoree <i>et al.</i> (2004)
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Conservation des aliments, tels que le lait, la viande et les végétaux, probiotique	Kleerebezemé <i>et al.</i> (2003)
<i>Lactobacillus reuteri</i> F275	Probiotique	Morita <i>et al.</i> (2008)
<i>Lactobacillus sakei</i> 23 <i>K sakei subsp.</i>	Conservation des aliments, fermentation de la viande	Chaillouet <i>et al.</i> (2005)
<i>Lactobacillus cremoris</i> MG 1363 <i>lactis subsp.</i>	La fermentation des aliments laitiers, une souche modèle	Wegmann <i>et al.</i> (2007)
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i> ATCC8293	Fermentation d'aliment : choucroute, des légumes, production de dextrane.	Debchaket <i>et al.</i> (2006)
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMC18311	Fermentation du fromage et du yaourt	Bolotin <i>et al.</i> (2006)

5.4 Dans le domaine de la santé

Certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotique c'est-à-dire micro-organismes vivants dans l'application pour l'homme ou pour l'animal lesquels exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisées sont *Lb. Acidophilus*, *Lb. Casei*, *Lb. Johsonii*, *Lb. Delbruecki*, sub sp *bulgaricus* (Salminen et al, 2004). Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires, l'intolérance au lactose et l'hypercholestérolémie. (Salminen et al, 2004).

Les bénéfices potentiels des probiotiques vont de la suppression de l'activité de certains pathogènes à l'amélioration de l'utilisation du lactose, de la réduction du cholestérol sanguin et du niveau de substances carcinogènes, l'inactivation de composés toxiques ainsi que la stimulation du système immunitaire ; donc ces micro-organismes sont bénéfiques pour la santé de l'hôte (Ninane *et al.*, 2009).

Ces spécificités correspondent essentiellement à des propriétés de résistance lors du passage dans l'estomac, dans le duodénum et dans l'intestin (Wildman, 2007 ; Remacle et Reusens, 2004).

Chapitre III

1. Historique

Le Dr. Metchnikoff a constaté que les Bulgares consommaient de grandes quantités de yaourt, et il a associé l'augmentation de la longévité observée à la consommation des microorganismes vivants provenant des produits laitiers fermentés. Même si Metchnikoff voyait les microbes comme étant plutôt nuisibles pour la santé humaine, il considérait bénéfique la substitution des bactéries du tractus gastro-intestinal par celle du yaourt dont le bacille bulgare. Il a alors expliqué l'effet bénéfique meilleurs de ce dernier par l'absence de production d'alcool (néfaste à la longévité), en comparaison aux bactéries présentes dans d'autres laits fermentés tels que le kéfir ou le koumys. De plus il a supposé que l'acide lactique produit, ainsi que d'autres facteurs non identifiés, agiraient de façon synergique pour inhiber la croissance de bactéries de la putréfaction dans le colon (Ezzariga, 2015).

2. Probiotiques

Plusieurs définitions ont été proposées :

1-Probiotiques terme proposé par Lilly et Stillwell (Science, 1965) : substances secrétées par un micro-organisme stimulant la croissance d'un autre.

2-Micro-organismes et substances issues de micro-organismes contribuant à l'équilibre de la microflore intestinale (Parker et *al.*, 1974).

3-Micro-organismes vivants exerçant un effet bénéfique vis-à-vis de l'hôte par maintien de l'équilibre de la microflore intestinale (Fuller et *al.*, 1989).

4- Micro-organismes vivants qui, ingérés en quantité suffisante exercent un effet positif sur la santé (FAO/WHO).

5-Micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte au-delà des effets nutritionnels traditionnels (OMS, 2001).

3. Les Caractéristiques des bactéries probiotiques

Une bactérie « probiotique » doit posséder plusieurs caractéristiques indiquées par (fores et *al.*, 2007., Behnsen et *al.*, 2013., Roefes, 2014).

1- Appartenir à la flore commensale.

2-Avoir un métabolisme actif.

3-Ne pas être pathogène ou carcinogène.

4-Viabilité : les probiotiques doivent rester viables dans les conditions de préparation et de stockage habituels, et résister aux conditions extrêmes retrouvées dans le tractus gastro-intestinal (pH acide, sucs gastriques, bile).

5-Adhérence : les microorganismes probiotiques doivent être capables d'adhérer à l'épithélium et au mucus intestinal, pour pouvoir s'y implanter et s'y développer.

6-Propriétés antimicrobiennes.

4. Les microorganismes probiotiques

Il existe 4 grands groupes de probiotiques :

4.1 Les ferments lactiques

Ils sont capables de produire de l'acide lactique par la fermentation de certains sucres comme le lactose. Ils sont regroupés en 2 catégories, en fonction de leur morphologie :

-les Lactobacilles : *Lactobacillus bulgaris*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei*

-les coques (Entérocoques et Streptocoques).

4.2 Les bifidobactéries

D'origine humaine ou animale, elles appartiennent à la flore intestinale normale et possèdent une bonne résistance aux sucs gastriques. La population de bifidobactéries diminue avec l'âge et leurs espèces varient selon l'âge.

Les autres bactéries sporulées, dont *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* (Biron et al., 2011 ; Anandharaj, 2014).

4.3 Les levures

Les différentes levures de type *Saccharomyces cerevisiae*. Elles sont principalement utilisées pour l'industrie agroalimentaire mais peuvent aussi être utilisées en tant que complément alimentaire.

4.4 Les bactéries sporulées

Les autres bactéries sporulées, dont *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*.

5. Prébiotiques

« Ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de manière sélective au niveau du côlon la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre restreint d'espèces bactériennes susceptibles d'améliorer la physiologie et donc la santé de l'hôte ». Ils sont considérés comme des facteurs de croissances des probiotiques (Rafael,2020).

Un composé prébiotique doit avoir les trois caractéristiques suivantes :

-Ne pas être **digéré**

-Ni **absorbé** avant d'atteindre le côlon,

-Être **un substrat sélectif** d'une ou plusieurs bactéries de la flore intestinale ayant un rôle bénéfique sur la santé, modifier la composition de la flore intestinale dans un sens favorable à la santé, soit en favorisant la croissance de bactéries bénéfiques, soit en atténuant celle des souches pathogènes.

La plupart sont des glucides d'origine végétale ou synthétique. Certains prébiotiques sont naturellement présents dans des aliments, et d'autres sont ajoutés dans des aliments à visée fonctionnelle ou dans des suppléments alimentaires (WSO/2008).

Les prébiotiques les plus connus et les mieux caractérisés sont :

_ Les fructanes, polymères de fructose, parmi lesquels on trouve :

-l'inuline, présente dans plusieurs végétaux (oignons, ail, asperges, et banane) et principalement extraite des tubercules de chicorée ;

-les fructo-oligosaccharides (FOS), ou oligofructoses, se trouvant naturellement présents dans de nombreux aliments tels que le blé, les oignons, les betteraves, les bananes, le miel, l'ail et les poireaux, et pouvant aussi être produits soit par hydrolyse de l'inuline, soit par biosynthèse à partir de saccharose et de fructose ;

_ Les galacto-oligosaccharides (GOS) et les transgalacto-oligosaccharides (TOS) ;

_ Le lactulose (Clerc et al.,2007).

5.1Le rôle bénéfique des prébiotiques

Sont responsables de multiples effets physiologiques indiqués par (Slavin,2013) telles que :

1-Hydrosolubilité

2-La viscosité

3- la fermentescibilité.

5.2 Probiotiques et synbiotiques

Un composé synbiotique est un produit qui contient à la fois un (des) probiotique(s) et un (des) prébiotique(s). L'effet synergique n'est pas requis, mais il est possible que le prébiotique soit ajouté afin de favoriser la survie et l'activité des souches probiotiques (Bunesova et al., 2016).

5.3 Origine des probiotiques

Les sources actuelles de probiotiques se répartissent en huit catégories :

- 1-Médicaments probiotiques,
- 2-Probiotiques médicaux aliments,
- 3-Aliments probiotiques,
- 4-Probiotiques non oraux,
- 5-Aliments pour animaux probiotiques,
- 6-Consortiums microbiens définis,
- 7-Complément alimentaire probiotique et préparations pour nourrissons probiotiques (Gibson et al., 2017).

De nombreux produits laitiers et non laitiers sur le marché sont annoncés pour leur présence de cultures vivantes (Wang et al., 2015). Les produits alimentaires commerciaux revendiquant une activité probiotique doivent être évalués avec le même contrôle que les médicaments probiotiques.

6 Mécanisme d'action et effets bénéfiques des probiotiques

La première étape pour qu'une souche probiotique exerce ses effets bénéfiques est associée à la capacité de l'adhérence et la colonisation dans les tissus de l'hôte (ÅshildTaksdal et al., 2015). Parmi les effets bénéfiques (figure 6) on cite :

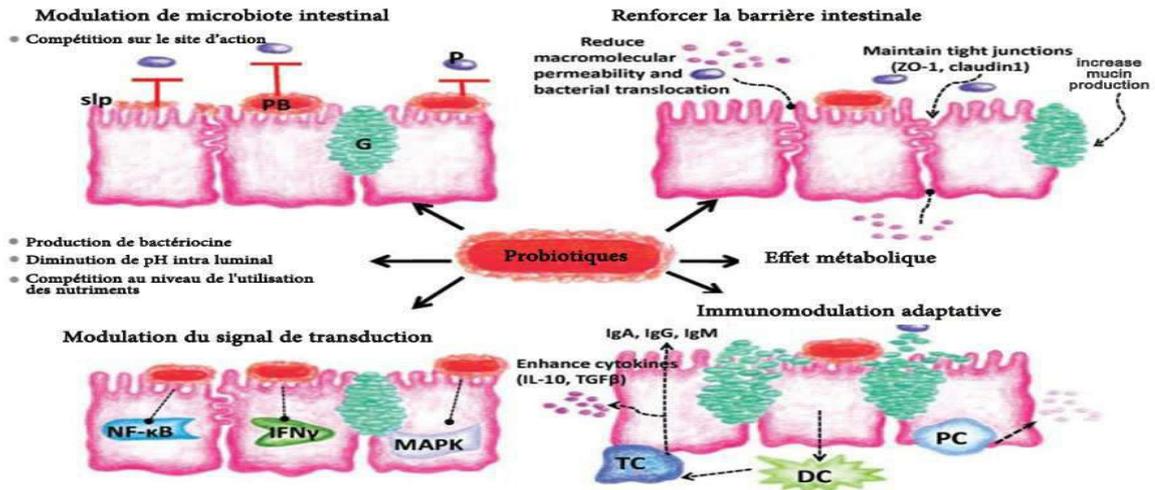


Figure 6 :Résumé schématique des mécanismes d'action des probiotiques. (Ezzariga,2015)

6.1 Effets sur les fonctions intestinales

Le lactose est hydrolysé par une β -galactosidase (appelée également lactase) présente sur les entérocytes de la bordure en brosse de l'intestin grêle. L'activité enzymatique, subit un sevrage qui finit par un déficit partiel (hypolactasie) chez l'adulte. Autrement cette activité été maximale à la naissance (FAO, 2004).

En outre les probiotiques, en produisant et/ou en augmentant l'activité de nombreuses enzymes digestives, permettent d'améliorer significativement la digestion et l'absorption intestinales, notamment chez des sujets ayant un déficit enzymatique.

Les bactéries lactiques montrent un effet majeur sur l'amélioration de l'intolérance au lactose chez l'homme (Aachary,2011).

6.2 Modulation du microbiote

Les bactéries probiotiques n'ont pas la capacité de coloniser de façon permanente le tractus gastro-intestinal. Par contre, la consommation sur une base régulière permet de modifier la microflore intestinale et d'atteindre un équilibre entre les bactéries pathogènes et les microorganismes bénéfiques (Parada et al.,2007).

L'administration des probiotiques provoque une diminution des germes pathogènes en créant un environnement peu favorable à leur développement. Différentes propriétés antagonistes des probiotiques sont impliquées pour inhiber les microorganismes pathogènes :

- 1-Production de substances antimicrobiennes, en particulier des bactériocines.
- 2-Acidification du contenu colique *via* la sécrétion d'acides organiques.
- 3-Compétition pour les sites d'adhérence.

4-Compétition pour les nutriments (Sherman et *al.*, 2009).

6.3 Inhibition de pathogènes

Les probiotiques sont capables d'exercer un effet antimicrobien direct en produisant des molécules inhibitrices bactéricides ou bactériostatiques. Il s'agit notamment des bactériocines.

Les bactéries lactiques sont capables d'inhiber la croissance de nombreuses autres bactéries par la production de composés chimiques de différentes natures.

Tout d'abord, toute fermentation lactique est à l'origine de la production d'**acides organiques** (acides lactique et acétique principalement), qui vont acidifier localement le milieu, ce qui ralentit généralement la croissance des autres microorganismes moins acido-résistants.

Certaines espèces de *Lactobacillus* notamment, produisent également du **peroxyde d'hydrogène**, un agent oxydant pouvant provoquer des lésions dans l'ADN des cellules adjacentes. Enfin, de nombreuses bactéries lactiques possèdent la capacité de synthétiser des **bactériocines**, Elles sont des molécules de nature protéique synthétisées par voie ribosomique possédant des propriétés antibiotiques, il en existe différents types.

Elles agissent principalement sur la membrane cellulaire des pathogènes, formant ainsi des pores qui rendent la membrane cytoplasmique perméable et qui mènent à la libération du contenu intracellulaire et donc la mort de la bactérie affectée (Kheadr et *al.*,2010 ; Morisset et *al.*,2005).

Donc elles ont une activité dirigée essentiellement contre les bactéries Gram positives membrane interne. Les bactériocines ont un spectre d'action relativement étroit, l'activité bactéricide ou bactériostatique est essentiellement dirigée contre des espèces, taxonomiquement proches de la souche productrice (Dortu et *al.*,2009).

Il importe donc que les bactéries lactiques utilisées comme probiotiques soient vivantes et en quantité suffisante dans la lumière intestinale pour en synthétiser des quantités suffisantes pour éliminer les bactéries pathogènes.

Il existe une grande variété de bactériocines synthétisées par les bactéries lactiques : par exemple *Lactobacillus sakei* produit la sakacine, tandis que *Lactococcus lactis* produit la nisine, une bactériocine actuellement utilisée comme conservateur alimentaire (Portou et *al.*,2015).

6.4 Modulation du système immunitaire

L'un des principaux avantages des probiotiques en termes immunologiques est la modulation de l'hôte réponses immunitaires via l'interaction avec la muqueuse gastro-intestinale (Azad et *al.*, 2018). Une fois administrées, les bactéries probiotiques orales interagissent avec l'épithélium intestinal des cellules ou des cellules immunitaires de la lamina propria, et induisent la production de différentes cytokines et chimiokines (Maldonado Galdeano et *al.*, 2019). Les probiotiques interagissent avec différentes cellules du système immunitaire (entérocytes, cellules dendritiques (CD), Th1, Th2 et T cellules régulatrices] dans l'intestin, modulant la réponse immunitaire vers une action pro- ou anti-inflammatoire (Oliveira et *al.* ; 2017).

La plupart des mécanismes immunitaires impliquent une régulation tissulaire spécifique de l'expression des gènes, en particulier dans l'intestin et le foie (Reid et *al.*, 2011).

7. Probiotique : impact sur la santé humaine

7.1 Caries et maladie parodontale

La cavité buccale de l'homme représente un bon biotope pour les virus, bactéries, levures et champignons.

L'équilibre de tous ces micro-organismes peut facilement être perturbé et une prévalence d'organismes pathogènes peut entraîner différents problèmes de santé bucco-dentaire tels que la carie dentaire, la parodontite et l'halitose.

Des espèces telles que *Streptococcus uberis* et *Streptococcus oralisals*.

Les probiotiques étaient efficaces contre l'halitose et empêchaient la production de composés soufrés volatils (CSV) par les anaérobies Gram négatif et Gram positif résidant dans les poches parodontales et sur la surface dorsale de la langue.

Une diminution du saignement des gencives et une diminution de la gingivite ont été observées avec l'application de *L. reuteri* (Kistler, 2015).

7.2 Effets secondaires gastro-intestinaux

Il y a eu des rapports sur les effets secondaires gastro-intestinaux, tels que vomissements, nausées, spasmes, diarrhée, ballonnements, soif et troubles du goût, survenant dans les cas des probiotiques (Goldenberg et *al.*, 2017).

7.3 Diarrhée

Certains probiotiques ont été révélés qu'ils peuvent traiter les maladies gastro-entérite comme la diarrhée qui représente un problème majeure de santé mondiale. Des études montrent que *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Saccharomyces boulardii* peuvent réduire le risque de AAD (Antibiotic-Associated Diarrhea).

Plusieurs mécanismes potentiels ont été proposés pour expliquer comment les lactobacilles réduisent la durée de la diarrhée à rotavirus ; Le traitement par *L.rhamnosus* a été ajouté comme une préparation spécifique des nourrissons (supplément probiotiques) montre une amélioration de sécrétion des anticorps IgA spécifiques contre le rotavirus pendant la convalescence (Allen, 2010). Certaines études rapportent l'utilisation de probiotiques pour le traitement de ces infections, dont les résultats indiquent une réduction de la durée de la diarrhée et de la fièvre (Rafael et *al.*,2020).

Le syndrome de l'intestin irritable aussi appelé côlon irritable, troubles fonctionnels intestinaux, se définit par troubles du transit (constipation, diarrhée, alternance des deux), de ballonnements et de flatulences qui se majorent lors des poussées douloureuses (Campistron,2014).

Les effets bénéfiques des probiotiques sur ces pathologies sont vraisemblablement liés à une amélioration de la fonction de barrière et à une modulation des réponses inflammatoires (Campistron,2014).

7.4 Intolérance de lactose

Le lactose est hydrolysé par une β -galactosidase (appelée également lactase) présente sur les entérocytes de la bordure en brosse de l'intestin grêle. L'activité enzymatique, subit un sevrage qui finit par un déficit partiel (hypolactasie) chez l'adulte. Autrement cette activité est maximale à la naissance (FAO, 2004).

En outre les probiotiques, en produisant et/ou en augmentant l'activité de nombreuses enzymes digestives, permettent d'améliorer significativement la digestion et l'absorption intestinales, notamment chez des sujets ayant un déficit enzymatique.

Les bactéries lactiques montrent un effet majeur sur l'amélioration de l'intolérance au lactose chez l'homme (Ezzariga,2015).

7.5 Anti-Cancer

Les souches de lactobacilles, des bifidobactéries et d'E. Coli ont des activités antimutagènes en raison de leur capacité à métaboliser et à inactiver composés de mutagène (Mtasher et *al.*, 2018).

Les probiotiques ont un effet anticancéreux en raison de plusieurs mécanismes tels que l'inhibition de la transformation des procarcinogènes en cancérogènes actifs, l'inactivation des composés mutagènes, la production de composés anti-mutagènes, la suppression de la croissance des bactéries procarcinogènes, réduction de l'absorption des mutagènes de l'intestin et renforcement de la fonction du système immunitaire (Soccol, et *al.*, 2010).

Plusieurs auteurs ont montré que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes, de mutagènes ou des acides biliaires secondaires dans les selles, qui pourraient chacun être impliqués dans la cancérogenèse colique. (Fesfendary, 2016).

Des chercheurs ont observé un moindre risque d'adénome colique de grande taille chez les sujets consommant du yaourt plus de trois fois par semaine.

Deux essais randomisés contrôlés ont montré que l'administration orale de *Lactobacillus casei* diminuait de manière significative le risque de récurrence de tumeur superficielle de la vessie chez l'homme.

Il est intéressant de noter que le traitement de référence des tumeurs de vessie à haut risque de récurrence et de progression est des injections intravésicales de bacille de Calmette Guérin (BCG) (aussi utilisé dans le vaccin contre la tuberculose) qui agissent en stimulant le système immunitaire, traitement conceptuellement proche de celui des probiotiques.

Une production excessive d'acides biliaires secondaires, exclusivement synthétisés par le microbiote, peut quant à elle se traduire par des cholélithiases biliaires et pourrait être liée à un risque accru de cancer du côlon. Des liens décomposition et risque cancéreux ont également été observés au niveau d'autres organes (poumon, foie, vessie, etc.) et pourraient être dus, entre autres, à une production accrue ou une dégradation réduite de carcinogènes par le microbiote. (FAO/OMS).

7.6 Production des vitamines

Les vitamines sont impliquées dans de nombreuses fonctions essentielles du corps comme le métabolisme cellulaire, la synthèse d'acides nucléiques et les activités

antioxydantes. La plupart des vitamines ne peuvent pas être synthétisées par les humains et les animaux, plusieurs espèces de bactéries peuvent servir à produire de l'acide folique, de la vitamine B12 ou de la cobalamine, de la vitamine K2, de la riboflavine, de la thiamine, de la biotine et d'autres vitamines essentielles (Lee et *al.*, 2009) (Turpinet *al.*, 2010).

8. D'autre utilisation des probiotiques

8.1 Bioingénierie pour améliorer les propriétés fonctionnelles des souches probiotiques

La Bioingénierie de les souches probiotiques peuvent améliorer leurs propriétés spécifiques, applicables à la colonisation de l'intestin, telles que l'adhérence des muqueuses, la résistance au stress acide, la production de composés bioactifs et la modulation du système immunitaire. En outre, la bioingénierie offre la possibilité de supprimer des gènes indésirables, contre-productifs ou problématiques qui peuvent être détectés dans certaines souches probiotiques, telles que les gènes résistants aux antibiotiques trouvés dans divers *Lactobacillus spp.*, qui peut être transféré latéralement parmi les bactéries d'un microbiome donné (Douillard et De vos, 2019).

Les chercheurs ont travaillé dans l'optimisation des souches probiotiques existantes, recherchant l'amélioration par des altérations ou l'acquisition de traits phénotypiques capables d'affecter positivement leurs propriétés probiotiques (Douillard et De vos, 2019 ; Mathipa et

Dans ce contexte, les études basées sur la génomique, la transcription et la métabolique fournissant des outils précieux dans ce domaine sont appelées « probiogénomique ». Divers outils génomiques sont actuellement disponibles et ont été employés pour les bactéries lactiques LAB, y compris les méthodes de transformation, l'intégration / homologue. (Borner et al., 2019) ont développé une souche recombinante de *Lb. paracasei* hébergeant *Listeria. Monocytogenes* protéine d'adhésion afin de contenir l'infection à *L. monocytogenes* par la mise en place d'une exclusion compétitive a souche recombinante a pu réduire l'attachement à la bordure de la brosse intestinale porcine d'une manière dose-dépendante. Ces études ont indiqué que la réduction de l'adhésion de l'agent pathogène par le probiotique recombinant empêche la liaison réelle de l'agent pathogène et, par conséquent diminue le développement des infections (Bellil et *al.*, 2019).

D'autre démontré que l'utilisation de probiotiques (*L. bulgaricus* et *L. rhamnosus*) ou des prébiotiques émergents (XOS et RGE) ont accéléré la récupération du

microbiote intestinal (endommagé par les antibiotiques) en permettant prolifération des bactéries bénéfiques et inhibition des bactéries nocives (Zhihua,2019)

Les ventes et la commercialisation des boissons laitières et non laitières ont augmenté de façon significative. Les études ont montré que l'ajout de prébiotiques aux boissons, avec ou sans probiotiques, peut présenter un avantage commercial plus rapide. De plus, le vaste des recherches doivent être menées sur l'efficacité de la micro encapsulation pour administrer des probiotiques à libération contrôlée et ciblé tube digestif (Semih,2019).

8.2Volaille fermentée et déchets d'abattoir

Utilisation inappropriée des déchets d'abattoirs de volailles (PSW), comme les têtes, les viscères et les pieds, peuvent entraîner de nombreux problèmes environnementaux, biologiques, économiques et industriels. Plusieurs méthodes dont mise en décharge, incinération, compostage et broyage en poudre sont utilisés pour éliminer les déchets.

La fermentation à l'acide lactique a été introduite comme un traitement plus souhaitable élimine les bactéries pathogènes. (Vargas et *al.*,2015)

Les isolats comme la souche de *L. plantarum*, *L. ramnosus* et *L. fermentum*, respectivement, qui ont démontré les meilleures caractéristiques pour une utilisation comme probiotique et ; les résultats dans cette étude ont indiqué que la fermentation est une méthode recommandée pour réutiliser les nutriments des déchets d'abattoirs de volailles et produire un probiotique supplément (Ashayeriza, 2017).

Partie pratique

*Matériels et
méthodes*

1.Échantillonnage

L'ensilage mixte a atteint son stade de maturité lequel a été remis par un éleveur.

2Testmicrobiologique

2.1Isolement

Deux méthodes ont été effectuées pour l'isolement

- Trois(03) grammes de l'ensilage ont été ajoutés dans 27ml de l'eau physiologique stérile, le contenu a été homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 60 sec afin d'acquérir une parfaite homogénéisation. Dans ce sens, des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10^{-6} . L'ensemencement en profondeur été réalisé sur les milieux MRS et Rogasa.
- **Pré-enrichissement** : À partir des tubes de pré-enrichissement, 1ml de culture a été ensemencé en profondeur ; puis le milieu MRS et milieu Rogosa été versés.

Les boîtes de pétri ont été incubées à 30° C pendant 18 à 24h.

2.2Purification

La purification des souches isolées est réalisée par repiquages successifs sur milieux sélectifs MRS solide (par la méthode des stries), et l'incubation à 30°C. La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme).

3Pré-identification de la flore lactique

La pré-identification bactérienneest effectuée conformément à l'étude morphologique et les tests biochimiques.

3.1Étudedes caractères morphologiques

*Étude macroscopique

Il consiste à décrire les colonies obtenues après culture sur milieu MRS solide de la souche bactérienne pendant 24 à 48 h. Selon la taille, la pigmentation, le contour, l'aspect (Sutra et *al.*, 1998) (Badis *et al.*, 2005). .

***Étude microscopique**

L'examen microscopique des colonies a été réalisé grâce à la coloration de Gram qui permet la distinction de la forme et le mode d'association des souches (Singleton., 1999).

3.2 Test biochimique

*** Recherche de la catalase**

La catalase a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement de l'oxygène. Son action directe est mise en évidence dans la masse bactérienne (Guiraud, 1998). Pour réaliser ce test, une culture bactérienne (ose de colonie) à tester, a été émulsionnée dans de l'eau oxygénée sur lame. La présence d'une catalase se manifeste par l'apparition d'une mousse renseignant sur la présence de bulles d'oxygène.

*Résultats et
Interprétation*

Partie pratique : Résultats et interprétation

Nous avons pris un échantillon à travers un ensilage mixte susceptible à un milieu vital pour les bactéries lactiques.

1. Isolement et purification des bactéries lactiques

Une stratégie a été adoptée basé sur deux méthodes (direct et indirect) pour augmenter les chances d'isolement.

L'isolement a été réalisé à partir des tubes MRS qui possèdent des troubles sur des boîtes de Pétri contenant le milieu MRS et milieu Rogosa. Selon (Carr et *al.*, 2002 ; Badis et *al.*, 2006) les colonies circulaires, lenticulaires, lisses, bombées régulières de couleur blanchâtre et leurs tours transparents, leurs tailles environ 0,1 à 3 mm de diamètres, susceptible d'être bactéries lactiques.

Après l'incubation de 24 à 72h ; des colonies blanchâtres petites et crémeuses parfois lenticulaires ont été observées, et prendre en considération comme des isolats appartiennent aux bactéries lactiques. La figure suivante illustre les boîtes d'isolement de Pétri MRS et Rogosa.

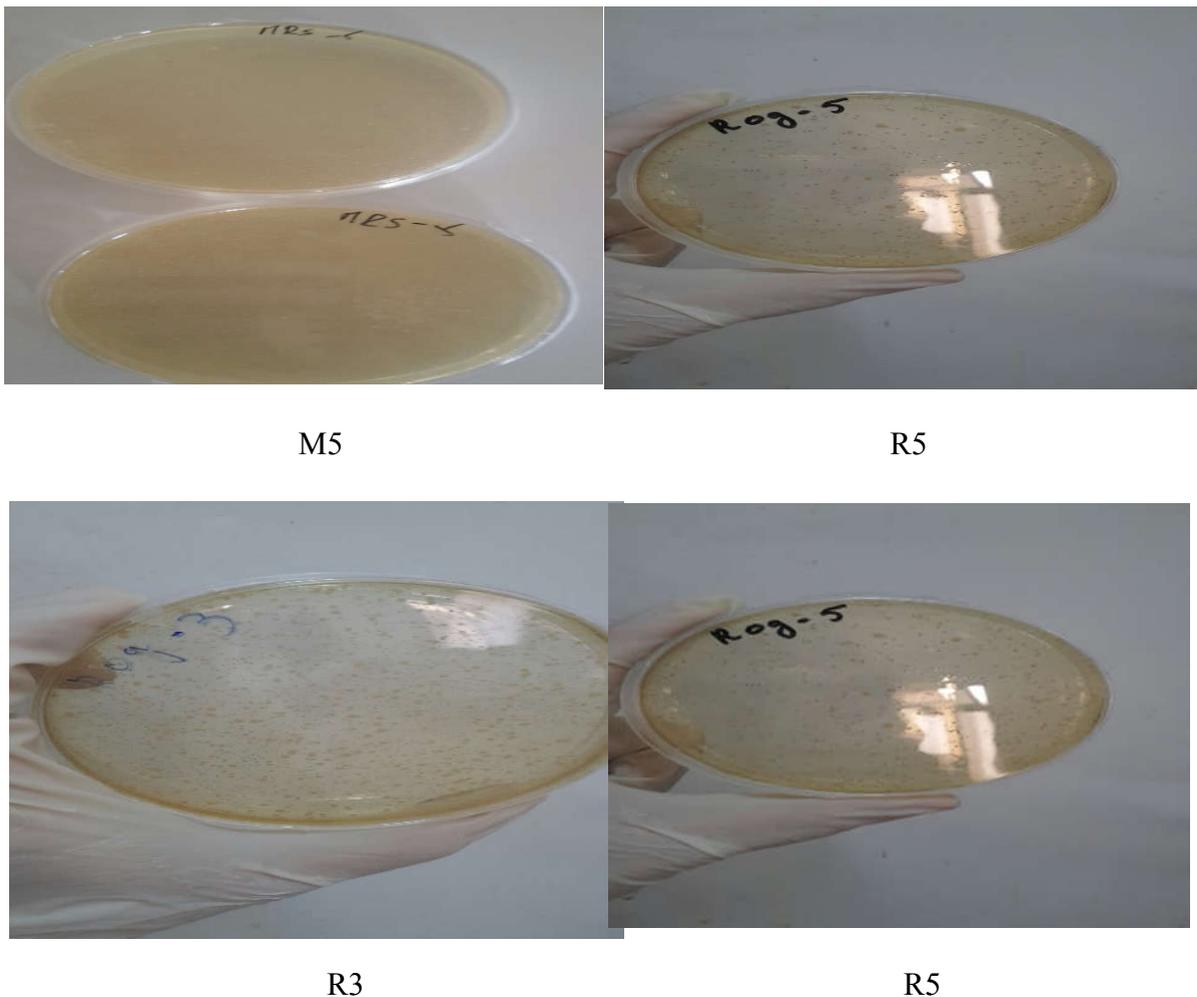


Figure 7 : Aspect macroscopique des colonies de bactéries lactiques sur le gélose MRS.

Partie pratique : Résultats et interprétation

Douze colonies ont été isolées et subissent des purifications sur milieux MRS (figure08).



M3 et M4

R2 et R3

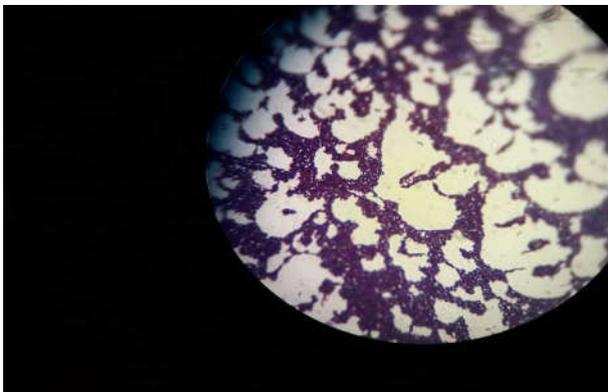
Figure 8 : Aspect microscopique des colonies de bactéries lactiques après la purification.

La pureté des isolats été basé sur l'observation :

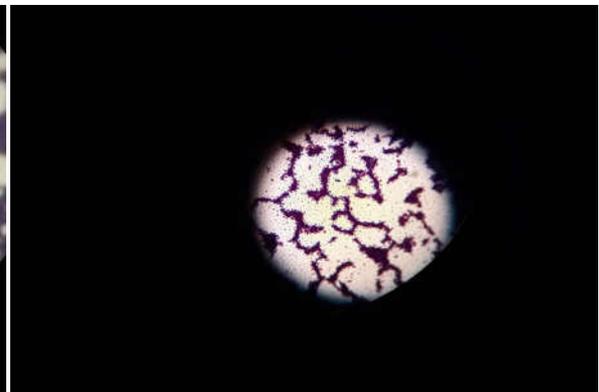
***Macroscopique** : En premier lieu les boîtes doivent contenir des colonies de même taille, forme, et couleur ; Puis les cultures sur le liquide, on doit observer une croissance des bactéries qui apparait sous forme de trouble fumeux surmonté d'une zone claire. Il est concentré au fond à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries (Carr et *al.*, 2002)

***Microscopique** : pour confirmer la pureté des isolats, une coloration de gram a été effectuée, cette observation de la forme (cocci, bacille), le mode d'arrangement (isolé, en diplo, en chaînette) et le Gram permet l'affirmation de la pureté au niveau cellulaire.

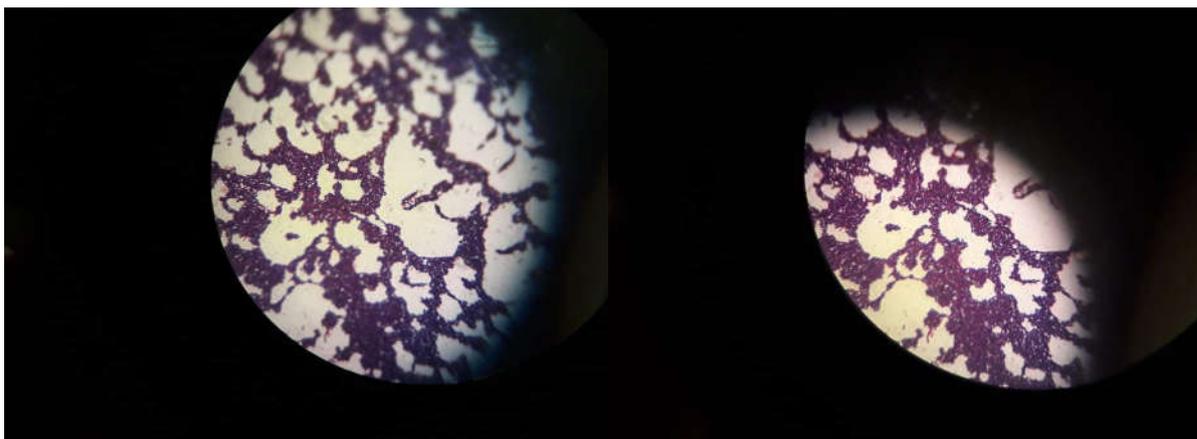
Parmi les douze isolats, huit (08) isolats ont été Gram + (figure 10) ; trois (03) de forme cocci et cinq (05) de forme bacille.



M5



M4



R5

R4

Figure 9 : Observation microscope optique des bactéries lactiques après coloration de Gram(x100).

2. Test de catalase

La recherche de la catalase se fait par la mise en contact des colonies avec quelques gouttes d'eau oxygénée. Le dégagement gazeux traduit l'activité positive de cette enzyme. Les résultats obtenus montrent les souches étudiées sont la catalase négative car on n'a pas obtenu des bulles d'air après le dépôt de l'eau oxygénée sur la colonie cible, qui est conforme aux résultats trouvés par (Carr *et al.*, 2002).

Les 08 souches isolées ont été la catalase négative, ce qui nous oriente à déduire que les souches isolées peuvent être des bactéries lactiques, les résultats sont résumés dans le tableau 03.

Tableau 03 : Résultats de l'aspect microscopique des bactéries lactiques isolées d'ensilage.

	Milieu	Gram	Catalase	Forme	Mode d'association
R5	Rogosa	+	-	Cocci	Isolée, diplocoque et en amas
R5	Rogosa	+	-	bacille	Isolée, diplobacille et en chaîne
M4	MRS	+	-	bacille	Isolée, diplobacille et en chaîne
R4	Rogosa	+	-	Cocci	Isolée
R5	Rogosa	+	-	bacille	Isolée, diplobacille, en amas, en long et courte chaîne
M5	MRS	+	-	bacille	Isolée et diplobacille
R3	Rogosa	+	-	Cocci	Isolée, diplocoque, en amas et en courte chaîne
M6	MRS	+	-	bacille	Isolée, diplobacille et en chaîne

Partie pratique : Résultats et interprétation

Huit isolats peuvent être des bactéries lactiques (Gram +et catalase -), on observe que la forme bacille est dominante par rapport aux cocci, peut être ces bacilles font partie des lactobacilles qui sont des acidophiles et jouent un rôle important dans l'acidification de l'ensilage (Xu et *al.*,2017).

Conclusion

Conclusion

L'ensilage est l'une des méthodes les plus utilisées pour conserver le fourrage. Les études d'ensilage se concentraient sur les analyses chimiques et la recherche sur la stabilité aérobie.

La population microbienne et leurs changements dynamiques ont seulement été analysés dans une moindre mesure.

Les bactéries lactiques qui jouent un rôle important dans la maturité de l'ensilage grâce au pouvoir acidifiant et au pouvoir inhibiteur des microorganismes épiphytes indésirables en se faisant concurrence pour les nutriments ou par la production des substances antimicrobiennes.

D'autre part, les bactéries lactiques se réfèrent à un grand groupe de bactéries ; plutôt qu'une seule espèce ou souche, qui produisent de l'acide lactique en tant que sous-produit de la digestion des glucides. Ils font partie de groupes de microorganismes les plus importants utilisés dans la fermentation des aliments, qui contribuent à la saveur et à la texture des produits fermentés.

Aujourd'hui, le rôle du BL dans la santé et la fonctionnalité de l'intestin humain et du bétail a été souligné principalement en raison de leur capacité probiotique.

En conclusion ; ce travail nous a permis de sélectionner huit isolats susceptibles d'être des bactéries lactiques, Le genre de lactobacillus été le genre plus dominant, puisque l'échantillon utilisé est un ensilage mature de culture mixte.

Des études approfondies doivent compléter ce travail tel que :

Identification biochimique et l'études de l'activité probiotiques de ces isolats.

Annexe

Annexe 01 : les milieux de culture

Gélose MRS (De Man, Rogosa et Sharpe, 1960) Culture et isolement des bactéries lactiques.

Peptone.....	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	05 g
Glucose.....	20 g
Citrate d'ammonium.....	0 2 g
Acétate de sodium	05 g
Sulfate du magnésium...	0,2 g
Sulfate de manganèse....	0,05g
Phosphate dipotassique...	0 2 g
Agar.....	0 5 g
Tween	01 ml
pH.....	6,2±0,2

Autoclavage 120°C/20min.

Gélose Rogosa milieu sélectif pour le dénombrement des lactobacilles dans les viandes, les produits alimentaires et les prélèvements biologiques.

Tryptone.....	10 g
Extrait autolytique de levure	05 g
Glucose	20g
Sodium acétat.e.....	15g
Ammonium citrate	02g
Phosphate monopotassique.....	06g
Magnésium sulfate.....	0,575g
Magnésium sulfate	0.12g
Fer (II) sulfate	0.12g
Tween 80.....	10g
Agar agar.....	15g

Eau physiologie

NaCl.....	0 9g
-----------	------

Eau distillée..... 1000 ml

Autoclave à 120°C/20mn

Annexe 02 : Coloration de Gram

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

1. Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne.
2. Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute.
3. Ajouter du lugol pendant 30 seconds.
4. Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau.
5. Faire une autre coloration en utilisant la fushine et laisser agir 20 à 30 secondes.
6. Laver à l'eau.
7. Après séchage, déposer une goutte de l'huile à émersion, Observer au microscope optique (G×100) (Gram+ : couleur violette ; Gram- : couleur rose).

Produits chimiques

Fushine phénique

Fushine cristallisée.....1g

Alcool éthylique10ml

Phénol..... 05g

Eau distillée..... 10ml

Violet de gentiane phénique

Violet de gentiane..... 01g

Phénol11g

Ethanol10ml

Eau distillée100ml

Réactifs

Alcool, Eau distillée, Lugol, Solution d'eau oxygénée (30%), L'huile à émersion, Solution NaOH.

Verreries

Béchers à différents volumes, burette, erlenmeyers, flacons en verre (250ml), lames et Lamelles en verre, tubes à essai, Pipettes Pasteur.

*Références
bibliographiques*

A

- ✓ Anandharaj M, Sivasankari B, Parveen Rani R. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: a review. *Biology*. ;2014.
- ✓ Anshul Sharma., Importance of Probiotics in Cancer Prevention and Treatment Department of Food Science and Biotechnology. Department of Biotechnology, Shoolini University of Biotechnology and Management Sciences, Solan, India
- ✓ Ashayerizadeh, O., Dastar a, F. Samadi b, M. Khomeiri c, A. Yamchi d, S. Zerehdarane, (2017). Study on the chemical and microbial composition and probiotic characteristics of dominant lactic acid bacteria in fermented poultry slaughterhouse waste. *Waste Management*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2017.04.017>.
- ✓ Åshild Taksdal Randbya, Kristine Gismervik, Arild Andersenc, Ida Skaar, (2015). Effect of invasive slug populations (*Arion vulgaris*) on grass silage. *Animal science technology* 199(015)10-19
- ✓ Ashild Taksdal Randbya., Kristine Gismervik b., Arild Andersenc., Ida Skaar., 2015. Effect of invasive slug populations (*Arion vulgaris*) on grass silage I. Fermentation quality, in-silo losses and aerobic stability. *Animal Feed Science and Technology* ,199 10-19.
- ✓ Audet, L. et M. Fortier, (1977). Comparaison et évaluation de videurs de silos verticaux. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Québec.
- ✓ Axelsson, L., (2004). chapter lactic acid bacteria microbiological and functional aspects edition Marcel, Dekker third edition.
- ✓ 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.

B

- ✓ Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et
- ✓ Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R., (2005). « Caractérisation phénotypique des
- ✓ Bahia Chahwana, Sophia Kwanb, Ashling Isikb, Saskia van Hemertc, Catherine Burke, (2019). Gut feelings : A randomised, triple-blind, placebo-controlled trial of probiotics for depressive symptoms. 315-319.
- ✓ Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013 Mar 1 ;3(3).

- ✓ Belkhouche F., (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2.
- ✓ Bellman, H.E., (1982). Choix et utilisation des silos hermétiques. Publication 1782F. Direction générale des communications, Agriculture Canada, Ottawa.
- ✓ Belyagoubi L., 2014. Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. 170p.
- ✓ Bill Mahanna. Le contrôle des paramètres de fermentation de qualité et des perte d'ensilage, 2018.
- ✓ Biron.j and Rouchy.A, "Les probiotiques." Centre d'étude et de développement de la nutrithérapie, Juin-2011.
- ✓ Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état : Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (INATAA) : Constantine, Algérie, p. 21-22.
- ✓ Kabyle». Scien&Tech, 23 : 30-37.

C

- ✓ Carr F.J., Chili D., Maida N., (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. Critical Rev. Microbiol, vol. 28, n°4, p. 281-370.
- ✓ Clarke, S.P., (1993). Prospects and problems with plastics in agriculture. NRAES Publication 67 : 144156. Ithaca, New-York.
- ✓ Clerc A., Pinna O. Prébiotiques, probiotiques, symbiotiques : que se cache-t-il derrière ces mots Haute école de santé Genève. Janv. 2007.
- ✓ Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. and Wallbanks S., (1993). Taxonomic studies of some Leuconostoc like organisms from fermented sausages, description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species. J. Appl.Bacteriol. (75) : 595-603.
- ✓ Color enhanced scanning electron micrograph (SEM) of Streptococcus thermophilus bacteria in yogurt. By producing lactic acid, these bacteria and lactobacilli coagulate milk and thus form yogurt. Lactic acid bacteria are probiotic (useful to humans). Microscope mag. 6250x.
- ✓ Coudeyras and C. Forestier, (2010) "Microbiote et probiotiques : impact en santé humaine," Can. J. Microbiol., vol. 56, n°8, pp. 611–650.

D

- ✓ Dalgaard P., (2003). Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0°C and 25°C. J Appl Microbiol, vol. 94, p. 30-89.

- ✓ Dellagio 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. 1 : 25-116.
- ✓ Dellagio F., De Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D., (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques.T.1. Aspects fondamentaux et technologiques.LoricaLavoisier(Ed) 25-68.614.
- ✓ Department of Animal and Aquatic Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai 17 University, Chiang Mai 2019.
- ✓ Doleyres, y., (2003). Production en continu de ferments probiotiques par la technique des cellules immobilisées. Faculté des études supérieures de l'université de Laval Quebec Pp :5-8
- ✓ Dortu, C. et Thonart, P., (2009). « Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires ». Biotechnol.Agron. Soc. Environ., 13 : 143-154.
- ✓ Dortu, C., (2009), and p. Thonart. « Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et. » Biotechnol. Agron. Soc. Environ 13 : 143-154.
- ✓ Drider et Prevost, (2009). Bactéries Lactiques Physiologie, Métabolisme, Génomique et applications industrielles.

E

- ✓ Edima Helene C. 2007. Carnobacterium maltaromaticum : caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère. INPL. Institut National Polytechnique de Lorraine : Université de Ngaoundéré, Cameroun.
- ✓ Ennahar, S., Assobhel, O and. Hasselmann, C., (1998). Inhibition of Listeriamonocytgenes in a smear surface soft cheese by lactobacillus plantarum WHE 92, apediocin AcH Producer.J. Food. Prot.61(2) :186-91.

F

- ✓ Foulquié-Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E. and De Vuyst L., (2006). The role and application of enterococci in food and health. International Journal of Food Microbiology, 106 : 1-24.

G

- ✓ Gollop N., Zakin V et Weinberg Z.G., (2005). Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and treated with these inoculants. Jouanal of Applied Microbiology 98, 662-666.

- ✓ Gonzalez, L., Sandoval, H., Sacristan, N., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo 614, M.E., (2007) Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*. 18,716-722.
- ✓ Gonzalez-Rodriguez M.N., Sanz J.J., Santos J.A., Otero A., Garcia Lopez M.L., (2002). Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *J. Food Microbiol*, vol. 17, p. 161-168.

H

- ✓ Ho T.N.T., Tuan N., Deschamps A. and 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.
- ✓ Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D., Leblondbourget N., Decaris B., Bolotin A., Delorme C., Ehrlich S.D., Guedon E., Monnet W., Renault P., Kleerebezem M., (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol*, vol. 29, p. 435-463.
- ✓ Holt G.J., Krieg N.R. Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T., (1994). Grampositive cocci. In *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed., pp. 527).
- ✓ Hugenholtz J., Sybesma W., Groot M. N., Wisseelink W., Ladero V., Burgess K., Vansinderen D., Piard J.C., Eggink G.J., Smid E., Savoy G., Sesma F., Jansen T., Hols P.,(2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 82, p. 217-235.
- ✓ Huhtanen, P., Rinne, M., Nousiainen, J., (2007). Evaluation of the factors affecting silage intake of dairy cows: a revision of the relative silage dry-matter intake index. *Animal* 1, 758–770

J

- ✓ J.C. Émile, Y. Barrière. Effets de la teneur en grain de l'ensilage de maïs sur les performances zootechniques de vaches laitières. *INRA Productions Animales*, Paris : INRA, 1992, 5 (2), pp.113-120
- ✓ J.J. Devoyod, Françoise Poullain, (1988). Les Leuconostocs. Propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Le Lait*, INRA Editions, 1988, 68 (3), pp.249-279.
- ✓ Joseph. A *Lactococcus lactis*. UW Department of Bacteriology. Magnification 20000X., University of Wisconsin-Madison.

K

- ✓ Kheadr, E., Zihler, A., Dabour, N., Lacroix, C., Le Blay, G. & Fliss, I. Study of the physicochemical and biological stability of pediocin PA-1 in the upper gastrointestinal tract conditions using a dynamic in vitro model. *Journal of Applied Microbiology* 2010. Vol. 109 (1) : 54-64.
- ✓ Khuntia A et Chaudhary L.C., (2002). Performance of male crossbred calves as influenced by substitution of grain by wheat bran and the addition of lactic acid bacteria to diet. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 15, 188-194.
- ✓ Kistler JO, Pesaro M & Wade W. Development and pyrosequencing analysis of an in-vitro oral biofilm model. *BMC Microbiol.* 2015 ;10 :15 :24 DOI : 10.1186/s12866-015-0364-1
- ✓ Klaenhammer T.R., Barrangou R., Buck B.L., Azcarate-peril M.A., Altermann E.,(2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol*, vol. 29 n°3, p. 393–409.
- ✓ Kozłowski, J., (2007). The distribution, biology, population dynamics and harmfulness of *Arion lusitanicus* Marbille, 1868 (Gastropoda: Pulmonata: Arionidae) in Poland. *J. Plant. Prot. Res.* 47, 219–230.

L

- ✓ Labioui, H., El Moualdi, L., El yachioui, M., Ouhssine, M., (2005). Sélections de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la société de pharmacie de Bordeaux.* 144 : 237-250.
- ✓ Lee YK, Salminen S. *Handbook of probiotics and prebiotics.* John Wiley & Sons ; 2009 Feb 17.
- ✓ Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B., (1991). *La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires.* 2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3 : 240P.

M

- ✓ Matamoros S., (2008). Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université de Nantes.
- ✓ Morisset D, Berjeaud J.M, Hichkson M, Héchard Y., (2005). Bactériocines de bactéries lactiques. In *Bactéries lactiques et probiotiques.* Lavoisier., Paris. P : 113-194

N

- ✓ Ninane V., MUKANDAYAMBAJE R. et BERBEN G., (2009). Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 13(3) : 459–466.

P

- ✓ P. Andrieu, C. Demarquilly, J. Rouel, (1990). Conservation et valeur alimentaire des ensilages directs de prairies naturelles Comparaisons de trois types des conservateurs.
- ✓ Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P. & Soccol, C. R., (2007). Bacteriocins form lactic acid bacteria: Purification, properties and uses as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal* 2007. Vol. 50 (3) : 521- 542.
- ✓ Pilet M. F., Mogras C. et Federighi M., (2005). Bactéries lactiques. In : Federighi M. *Bactériologie Alimentaire. Economica. Paris.* pp 219-242.
- ✓ Pilet M.F., Calvez S., Brollet A., Prevost H.,(2009). Applications alimentaires : Produits fermentés. In *bactéries lactiques- Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Economica*, p. 520-537.
- ✓ Pilet MF, Magras C, Federighi M. (2005). Bactéries lactiques. In : *Bactériologie Alimentaire. Ed. Economica. Paris.* pp. 249-240.

R

- ✓ Rafael Ballana, Carolina Battistinia, Douglas Xavier-Santosa, Susana Marta Isay Saad.,(2020). Interactions of probiotics and prebiotics with the gut microbiota. Department of Pharmaceutical and Biochemical Technology, University of São Paulo. ISSN 1877-1173
- ✓ Rambaud, J. Buts, G. Corthier, and B. Flourié, (2004). Flore microbienne intestinale ; physiologie et pathologie digestive.
- ✓ Rapport de L'Organisation Mondiale de Gastroentérologie – WGO. Probiotiques et Prébiotiques, (2011).
- ✓ Rapport de L'Organisation Mondiale de Gastroentérologie – WGO. Probiotiques et Prébiotiques, (2008).
- ✓ Rapport de L'Organisation Mondiale de Gastroentérologie – WGO. Probiotiques et Prébiotiques, (2004).

S

- ✓ Sakala R.M., Hayashidani H., Kato Y., Hirata T., Makino Y., Fukushima A., (2002). Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *J Food Microbiol*, vol. 74, n°1, p. 87–99.
- ✓ Salawu M.B., Warren E.H et Adesogan A.T., (2001). Fermentation characteristics, aerobic stability and ruminal degradation of ensiled pea/wheat bi-crop forages treated with two microbial inoculants, formica cid or quebracho tannins. *Journal of the science of food and Agriculture* 81, 1263-1268.
- ✓ Salminen S., Gorbach S., Yuan-kun Let Benno Y., (2004). Human studies on probiotics : What is scientifically proven today? In *Lactic Acid bacteria : Microbiological and functional Aspects*. Eds salimen, S., von Wright, A. and Ouwerhand A., New york Dekker M. pp 515-530.
- ✓ Sandrine Valentin, (2004). Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maîtrise des risques sanitaires.
- ✓ Sébastien Crémer, (2012). La conservation des stocks fourragers, Département économie.
- ✓ Selon Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitmanet WB., (2009). Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In : « *Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes* » Vol 3. Springer éd., New York. pp.19-511.
- ✓ Sherman, P. M., Ossa, J. C. & Jonhson-Henry, K., (2009). Unraveling Mechanisms of Action of Probiotics. *Nutrition in Clinical Practice* 2009, Vol. 24 (1) : 10-14.
- ✓ Simpson P.I., Ross R.P., Fitzgeald G.F., Stanton C., (2004). *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. Nov. and *aeriscardovia aeriphila* gen. nov, sp.nov, isolated from a porcine caecum [en ligne]. Accès Internet : ([Http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/psychraerophilum.html](http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/psychraerophilum.html))
- ✓ Soccol CR, de SouzaVandenberghe LP, Spier MR, Medeiros AB, Yamaguishi CT, De DeaLindner J, Pandey A, Thomaz-Soccol V., (2010). The potential of probiotics: areview. *Food Technology and Biotechnology*. 2010 Oct 1 ;48(4) :413-34.
- ✓ Spörndly, R., Haaga, C., (2010). Silage quality when the crop is infected with *Arion lusitanicus*. In : *Nordic Feed Science Conference*. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Animal Nutrition and Management, Uppsala, Sweden

T

- ✓ Taylor & Francis Group, USA, 541 p. Remacle C. et Reusens B., (2004). *Functional foods, ageing and degenerative disease*, CRC Press LLC, 771 p.
- ✓ Tredez M, et Louise H., (2008). Méta- analyse des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogenèse colorectale chez les rongeurs. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE. P 38-39.

V

- ✓ Vandamme P., Pot B., Gillis M., Devos P., Keresters K. and Swings J., (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60 :407.
- ✓ Vescovo, M, S Torraini, C Orsi, F Macchiarolo, and G Sclari., (1996). « Application of antimicrobial producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. » *Journal of Applied Bacteriology* 81 : 113-119.
- ✓ Vine NG, Leukes WD, Kaiser H., (2006) Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* ;30 :404e27.

W

- ✓ Wallace, T. D., Bradley, S., Buckley, N. D. & Green-Johnson, J. H., (2003). Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Journal of Food Protection.* Vol. 66 (3) : 466-472.
- ✓ Watson AK, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L., (2008) Probiotics in aquaculture : the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* ;274 :1e14.
- ✓ Weibing, (2008), préservation of forage crops by solid-state lactic acid fermentation-ensiling, *springer New work*,443-445.
- ✓ Weinberg Z.G., Muck R.E., Weimer P.J., Chen Y et Gamburg M., (2004). Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. *Applied Biochemistry and biotechnology* 118, 1-9.
- ✓ Wijtze T., Bruggeman M., Nout M., Zwietering M., (1997). A computerised system for the identification of lactic acid bacteria. *J Food Microbiol*, vol. 38, n°1, p. 65–70.
- ✓ Wildman R. E. C., (2007). *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, Second Edition, CRC Press
- ✓ Wilkinson, J., Toivonen, M., (2003). Appendix 29 Norway. In: *World Silage- A Survey of Forage Conservation Around the World*. Chalcombe Publications, Lincoln, UK, pp. 135–140.
- ✓ Wisselink H.W., Weusthuis R. A., Eggink G., Hugenholtz J., Grobben G.J. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria. A review. *International Dairy J*, vol.12, p. 151-161.

Y

- ✓ Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R., (2008). « Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk ». *Int. J. Dairy Sci.*, 3 : 194-199.

Z

- ✓ Zhang M., Yan L., Zhu G., Holifield M., Todd D., Zhang S., (2013). *Streptococcus troglodytidis* sp. nov., isolated from a foot abscess of a chimpanzee (*Pan troglodytes*). *J Syst Evol Microbiol*, vol. 63, n° 2, p. 449–53.
- ✓ Zhenshang Xu, Huiying He, Susu Zhang, Jian Kong, (2017). Effects of inoculants *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus parafarraginis* on the fermentation characteristics and microbial communities of corn stover silage. *Scientific Report*, vol 7, n°13614.