

*République Algérienne Démocratique & Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Hassiba Ben-Bouali-Chlef-  
Faculté des Sciences*

# **MEMOIRE**

**Présenté à l'Université Hassiba Ben-Bouali- Chlef- En vue de  
L'obtention du Diplôme de Magister en Biologie  
Option: Sciences Alimentaires**

*Etude de l'effet probiotique de quelques bactéries  
lactiques vis-à-vis de l'intolérance au lactose*

*Présenté par : BOUKEFOUSSA ZOHRA*

Devant le jury d'examen :

<i>Mme. Allem R.</i>	<i>Président</i>	<i>M.C.A. U.H.B. Chlef</i>
<i>Mr Dilmi-bouras A.</i>	<i>Promoteur</i>	<i>Pr. U.H.B. Chlef</i>
<i>Melle Koiche M.</i>	<i>Copromotrice</i>	<i>M.C.B. U.H.B. Chlef</i>
<i>Mr .Bensaid A.</i>	<i>Examineur</i>	<i>M.C.A. U.H.B. Chlef</i>
<i>Mr.Mezaini A.</i>	<i>Examineur</i>	<i>M.C.B. U.H.B. Chlef</i>

*Année universitaire : 2011/2012*

## REMERCIEMENTS

*Je tiens à adresser ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à toutes les personnes pour leur aide, en particulier :*

*\* Mr. Pr. A. DILMI-BOURAS, mon promoteur, Professeur à l'U.H.B Chlef, pour son soutien, son aide et ses conseils qu'il m'a apportés dans la réalisation de ce travail.*

*\* Melle M. KOÏCHE, ma co-promotrice, maître de conférences à l'U.H.B Chlef, que je remercie pour ses encouragements, sa disponibilité exceptionnelle, son inquiétude et l'aide qu'elle m'a apporté durant toute la période de réalisation de ce travail et surtout pour ses qualités humaines.*

*\* Mme. Dr. R. ALLEM, maître de conférences à l'U.H.B Chlef, que je remercie pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*\* Mr. Dr. A. MEZAINI, maître de conférences à l'U.H.B Chlef, que je tiens à remercier d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*\* Mr. Dr. A. BENSAID, maître de conférences à l'U.H.B Chlef, que je tiens aussi à remercier d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à :*

*\* L'ensemble des membres du département de biologie surtout, Mme. M. THABTI et Mr MAHMOUD pour tout leur aide.*

*\* Mr. Dr. Mahmoudi H. vice doyen de la post graduation pour sa disponibilité et son aide a*

*Je remercie de façon particulière mes parents pour leurs aides et leurs encouragements durant toute la période de réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à :*

*Toute ma famille*

*Tous mes amis*

# TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

INTRODUCTION..... 1

## Chapitre I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### *1/ LES PROBIOTIQUES*

1.1/ Historique de l'utilisation des probiotiques.....	3
1.2/Définition.....	3
1.3/ Les micro-organismes probiotiques .....	4
1.4/ Critères de sélection des probiotiques.....	5
1.5/ Effets positifs des probiotiques sur la santé.....	7
1.6/ Persistance des probiotiques dans le tube digestif.....	8

### *2/ LES BACTÉRIES LACTIQUES*

#### *2.1/ GÉNÉRALITÉ*

2.1.1/ Définition et caractéristiques des bactéries lactiques.....	9
2.1.2/ Classification des bactéries lactiques.....	10

#### *2.2 / LES LACTOCOQUES*

2.2.1/ Caractéristiques générales.....	11
2.2.2/ Besoins nutritionnels.....	13
2.2.3/ Rôles des lactocoques.....	14
2.2.4/ <i>Lactococcus lactis</i> comme souche probiotique.....	14

### *3/ LE LACTOSE ET INTOLÉRANCE AU LACTOSE*

#### *3.1 / LE LACTOSE*

3.1.1/ Structure du lactose.....	16
3.1.2/ Propriétés physicochimiques du lactose.....	17
3.1.3/ Transformation biologique du lactose.....	18
3.1.4/ Avantages et inconvénients de l'utilisation de lactose.....	19

3.1.4.1/ Rôle fonctionnel du lactose .....	19
3.1.4.2/ Inconvénients de l'utilisation de lactose.....	21
<b>3.2/ CARACTÉRISATION DE LA <math>\beta</math>-GALACTOSIDASE</b>	
3.2.1/ Généralités.....	21
3.2.2/ Classification de la lactase.....	22
3.2.3/ Action de la lactase.....	23
3.2.4/ Activité lactasique.....	25
<b>3.3/ INTOLÉRANCE AU LACTOSE</b>	
3.3.1/ Historique.....	26
3.3.2/ Définition.....	26
3.3.3/ Origine de la malabsorption.....	27
3.3.4/ Classification de l'intolérance au lactose.....	28
3.3.5/ conséquence physiologique de l'intolérance au lactose.....	30
3.3.6/ Aspect clinique et nutritionnel de l'intolérance au lactose.....	31
<b>4/ POBIOTIQUES ET INTOLÉRANCE AU LACTOSE.....</b>	<b>33</b>

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Chapitre I : MATERIEL ET METHODES**

#### **Partie I : Étude de la dégradation du lactose par les Lactocoques mésophiles**

##### **1/ MATERIEL**

1.1/ Matériel biologique.....	35
1.2/ Milieux de culture.....	38
1.3/ Réactifs chimiques.....	38
1.4/ Appareillage.....	38

##### **2/ METHODES**

2.1/ Repiquage et revivification des souches.....	38
2.2/ Préparation d'inoculum.....	41
2.3/ Préparation des laits fermentés.....	41

2.4/ Dosage du lactose.....	42
2.5/ Acidité des laits fermentés.....	43
2.6/ Viabilité des bactéries.....	44

**Partie II : Étude de la survie des Lactocoques mésophiles dans les conditions extrême du tube digestif.**

**1/ MATERIEL**

1.1/ Matériel biologique.....	45
1.2/ Milieux de culture.....	45
1.3/ Réactifs chimiques.....	45

**2/METHODES.....45**

**Chapitre II : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

**Partie I : Étude de la dégradation du lactose par les Lactocoques mésophiles**

<i>1/ Dégradation du lactose.....</i>	<i>47</i>
<i>2/ Évolution de l'acidité Dornic.....</i>	<i>53</i>
<i>3/ Évolution de la viabilité des bactéries.....</i>	<i>57</i>

**Partie II : Étude de la survie des Lactocoques mésophiles dans les conditions extrême du tube digestif**

<i>1/ Survie des cultures mixtes des souches de Lactococcus lactis à pH 2,5 en absence de sels biliaires.....</i>	<i>63</i>
<i>2/ Survie des cultures mixtes des souches de Lactococcus lactis à pH 2,5 en présence de sels biliaires.....</i>	<i>65</i>
<i>3/ Survie des cultures mixtes des souches de Lactococcus lactis à pH 4,3 en absence de sels biliaires.....</i>	<i>68</i>
<i>4/ Survie des cultures mixtes des souches de Lactococcus lactis à pH 4,3 en présence de sels biliaires.....</i>	<i>70</i>

<i>5/ Survie des cultures mixtes des souches de Lactococcus lactis à pH 6,5 en absence de sels biliaires.....</i>	<i>73</i>
<i>6/ Survie des cultures mixtes des souches de Lactococcus lactis à pH 6,5 en présence des sels biliaires.....</i>	<i>74</i>

**CONCLUSION**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**ANNEXES**

**RESUME**

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Micro-organismes considérés comme probiotiques (Hozalpfel <i>et al.</i> ,1998).....	5
<b>Tableau II :</b> Proposition de critères de sélection des probiotiques à application intestinale (Saarela <i>et al.</i> ,2000).....	6
<b>Tableau III :</b> Effets positifs des probiotiques sur la santé (Gueimonde et Salminen ,2003).....	7
<b>Tableau IV :</b> Les différents genres des bactéries lactiques (Novel, 1993).....	10
<b>Tableau V:</b> Caractéristiques physiologiques et biochimiques des Lactocoques (Guiraud, 1998).....	12
<b>Tableau VI :</b> Besoins nutritionnels des lactocoques (Konnings, 1994).....	13
<b>Tableau VII:</b> Répartition de l'hypolactasie de type adulte dans les populations humaines adultes appartenant a différents groupes ethniques (Sahi, 1997).....	29
<b>Tableau VIII:</b> Les différents symptômes présentés lors d'une intolérance au lactose (Virginie Alexandre <i>et al.</i> ,2011).....	31
<b>Tableau IX:</b> Origine des souches et les tests biochimiques d'identification.....	37
<b>Tableau X :</b> Evolution du lactose résiduel en (g/l) en fonction du temps d'incubation à 30°C dans les laits fermentés par les souches en combinaison selon le rapport (1 :1).....	49
<b>Tableau XI:</b> Évolution du lactose résiduel en (g/l) en fonction du temps d'incubation à 30°C dans les laits fermentés par les souches en association selon le rapport (1 :1 :1).....	51
<b>Tableau XII:</b> Évolution de l'acidité Dornics D° des laits fermentés avec les cultures mixtes de bactéries lactiques mésophiles en fonction du temps d'incubation à 30°C selon les rapports (1 :1).....	54
<b>Tableau XIII:</b> Évolution de l'acidité Dornic D° des laits fermentés avec les cultures mixtes de bactéries lactiques en fonction du temps d'incubation à 30°C selon les rapports (1 :1 :1).....	56
<b>Tableau XIV:</b> Évolution de la viabilité des bactéries lactiques en cultures mixtes en fonction du temps d'incubation et à 30°C et selon les rapports (1 :1).....	59
<b>Tableau XV :</b> Évolution de la viabilité des bactéries lactiques en cultures mixtes en fonction du temps d'incubation et à 30°C et selon les rapports (1 :1 :1).....	61



## **Tableaux en annexes :**

### ***Annexe(I)***

**Tableau I:** Composition moyenne de 100g de poudre de lait.

**Tableau II:** Composition du M 17 bouillon (g/l d'eau distillée).

**Tableau III:** Composition de réactif de patein.

### ***Annexe (II)***

**Tableau I :** Évolution de la dégradation du lactose par les bactéries lactiques en culture pure en fonction du temps d'incubation à 30°C en g/ l.

**Tableau II:** Évolution de l'acidité dornics D° des laits fermentés avec les cultures pures de bactéries lactiques en fonction du temps d'incubation à 30°C.

**Tableau III :** Évolution de la viabilité des bactéries lactiques en cultures pures en fonction du temps d'incubation et à 30°C.

### ***Annexe (III)***

**Tableau I:** Variation du nombre de cellules à pH 2,5 en absence de sels biliaries

**Tableau II :** Variation du nombre de cellules à pH 2,5 en présence de 0,3% de sels biliaries.

**Tableau III :** Variation du nombre de cellules à pH 4,3 en absence des sels biliaries.

**Tableau IV:** Variation du nombre de cellules à pH 4,3 en présence de 0,3% des sels biliaries.

**Tableau V:** Variation du nombre de cellules à pH 6,5 en absence des sels biliaries

**Tableau VI :** Variation du nombre de cellules à pH 6,5 en présence de 0,3% de sels biliaries.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Synthèse du lactose (Pougheon et Goursand, 2001).....	16
<b>Figure 2 :</b> Formation du lactose et structure cyclique (Amiot et <i>al.</i> , 2002 ).....	17
<b>Figure 3 :</b> Localisation de la lactase intestinale (Raul, 2001).....	22
<b>Figure 4 :</b> Mécanisme d'action de l'enzyme B-galactosidase ( Prenosil et <i>al.</i> ,1987).....	24
<b>Figure 5 :</b> Action de la lactase (Antoine et Frippiat ,1986).....	24
<b>Figure 6 :</b> Evolution avec l'âge de l'activité de la lactase intestinale chez les mammifères (Raul, 2001).....	25
<b>Figure 7 :</b> Mécanisme du développement de l'intolérance au lactose chez des sujets déficients en lactase intestinal (Raul, 2001).....	30
<b>Figure 8 :</b> Aspect macroscopique des souches de <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> .....	35
<b>Figure 9 :</b> Aspect macroscopique de souches de <i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i> .....	36
<b>Figure 10 :</b> Aspect macroscopique des souches de <i>Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetyllactis</i> .....	36
<b>Figure 11 :</b> Évolution du lactose résiduel en (g/l) en fonction du temps d'incubation à 30°C dans les laits fermentés par les souches pures de <i>Lactococcus lactis</i> .....	47
<b>Figure 12 :</b> Évolution de l'acidité Dornic en fonction du temps d'incubation à 30°C dans les laits fermentés par des souches pures de <i>Lactococcus lactis</i> .....	53
<b>Figure 13 :</b> Évolution de la viabilité des souches pures en fonction du temps d'incubation à 30°C.....	57
<b>Figure 14 :</b> Évolution de la survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 :1) à pH 2,5 en absence de sels biliaries.....	63
<b>Figure 15 :</b> Évolution de la survie des associations de trois souches selon le rapport (1 :1 :1) à pH 2,5 en absences de sels biliaries.....	64
<b>Figure 16 :</b> Évolution de la survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 :1) à pH 2,5 en présence de 0,3% de sels biliaries.....	66
<b>Figure 17 :</b> Évolution de la survie des associations de trois souches selon le rapport (1 :1 :1) à pH 2,5 en présence de 0,3% de sels biliaries.....	67
<b>Figure 18 :</b> Évolution de la survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 :1) à pH 4,3 en absence de sels biliaries.....	68

<b>Figure 19 :</b> Évolution de la survie des associations de trois souches selon le rapport (1 :1 :1) à pH 4,3 en absence de sels biliaries.....	69
<b>Figure 20 :</b> Évolution de la survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 :1) à pH 4,3 en présence de 0,3% de sels biliaries.....	70
<b>Figure 21 :</b> Évolution de la survie des associations de trois souches selon le rapport (1 :1 :1) à pH 4,3 en présence de 0,3% de sels biliaries.....	72
<b>Figure 22 :</b> Évolution de la survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 :1) à pH 6,5 en absence de sels biliaries.....	73
<b>Figure 23 :</b> Évolution de la survie des associations de trois souches selon le rapport (1 :1 :1) à pH 6,5 en absence de sels biliaries.....	74
<b>Figure 24 :</b> Évolution de la survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 :1) à pH 6,5 en présence de 0,3% de sels biliaries.....	75
<b>Figure 25 :</b> Évolution de la survie des associations de trois souches selon le rapport (1 :1 :1) à pH 6,5 en présence de 0,3% de sels biliaries.....	75

## LISTE DES ABREVIATIONS

- Cell : Cellules
- C : Degré Celsius
- D : Degré Dornic
- J : jours
- G : Groupe
- g : Gramme
- h : heure
- L : Litre
- *Lc.l.*: *Lactococcus lactis subsp lactis*
- *Lc.cr* : *Lactococcus lactis subsp cremoris*
- *Lc.d* : *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*
- mL : Millilitre
- Nbre : Nombre
- S.B. : Sels biliaires
- UFC : Unités formants colonies

# ***INTRODUCTION***

## INTRODUCTION

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, peuvent exercer de nombreux bénéfices pour la santé de l'hôte. L'intérêt et le champ des recherches dans ce domaine ont considérablement progressé ces dernières années. Les effets bénéfiques des probiotiques ont notamment été démontrés dans le traitement de l'intolérance au lactose (Coombes *et al.*, 2007).

Les bactéries lactiques représentent un groupe diversifié de bactéries dont le produit majeur de fermentation est l'acide lactique. Ces dernières années, l'activité probiotique de certaines bactéries lactiques a été soulignée notamment sur modèle *Lactococcus lactis* (Bermudez-Humaran, 2002).

Toutefois, plusieurs travaux ont montré la possibilité de persistance de *Lactococcus lactis* chez l'homme ou chez l'animal. De nombreuses souches de Lactocoques étant traditionnellement utilisées comme « starter » dans la fabrication des fromages et d'autres produits laitiers fermentés, l'établissement de propriétés probiotiques chez *Lactococcus lactis* pourrait conduire au développement de nouveaux aliments fonctionnels « bio-thérapeutique » (Doan-Thanh-LamLE, 2011).

L'intolérance au lactose affecte 3/4 de la population mondiale. Environ 20% des personnes digérant mal le lactose sont intolérantes au lactose et souffrent de douleurs abdominales après consommation de lactose (Suarez *et al.*, 1995).

L'hypothèse que certains microorganismes sont capables de diminuer le lactose dans l'intestin et d'améliorer les propriétés nutritionnelles, diététiques et thérapeutiques est maintenant sujette de plusieurs recherches (Dilmi Bouras *et al.*, 2007), notamment Les bactéries lactiques qui provoquent sa transformation chimique en le dégradant en acide lactique grâce à l'enzyme même (Clinquart, 2005).

C'est pour cette raison, que de nombreux chercheurs se sont intéressés à étudier l'incidence que peuvent avoir ces bactéries sur la santé humaine (Dilmi Bouras, 2006).

Il semble bien que leurs rôles soient propices, sous réserve du choix correcte des souches et des modalités pratiques d'application (Givry, 2006). Parmi les effets revendiqués, la modulation de l'activité lactasique du fait que la digestion du lactose du yaourt est assurée par les enzymes des bactéries, voir la  $\beta$ - galactosidase qui le converti en glucose et galactose au cours du transit dans le tube digestif (Drouault et *al.*, 2002).

L'étude de la survie des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal est importante pour une meilleure connaissance du devenir des bactéries lactiques ingérées avec l'aliment et une meilleure compréhension de l'action des probiotiques chez l'homme et l'animal. Il est probable que pour exercer un effet probiotique significatif, les bactéries doivent arriver vivantes et en nombre suffisant dans l'intestin (Drouault et Corthier, 2001). Ainsi ces ferments doivent pouvoir passer sans dommage irréversible la barrière acide de l'estomac, puis l'effet inhibiteur éventuel des sels biliaires (Dilmi Bouras et Sadoun, 2002a).

La présente étude est consacrée à:

- Sélectionner des souches de bactéries lactiques mésophiles locales dont les espèces sont *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris* et *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* ayant une grande capacité de dégradation de lactose ;
- Etudier la survie de ces souches en cultures pures et mixtes dans les conditions extrêmes du tube digestif (acidité gastrique et sels biliaires) *in vitro*, pour pouvoir à la fin sélectionner un lait fermenté dont les bactéries restent viables dans le tube digestif et peuvent être utilisé comme alicament destiné aux intolérants au lactose.

# ***ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE***



## **Chapitre I : Étude bibliographique**

### ***1/ LES PROBIOTIQUES***

#### **1.1/ Historique de l'utilisation des probiotiques**

Ce sont Tissier (1906) et Metchnikoff (1907) qui ont été les premiers à avancer dans leurs travaux des propositions scientifiques au sujet de l'utilisation probiotique des bactéries, même si le mot "probiotique" n'a été forgé qu'en 1960, pour désigner des substances produites par des microorganismes qui favorisaient la croissance d'autres microorganismes (Lilly et Stillwell, 1965).

Une définition très semblable a été proposée par Havenaar et Huis in 't Veld, (1992) "une culture viable composée d'une ou d'un mélange de bactéries qui, lorsqu'elle est appliquée à l'animal ou à l'homme, exerce un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant les propriétés de la flore indigène".

Une définition plus récente, qui n'est probablement pas la dernière est: "microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte" (Guarner et Schaafsma, 1998., Tannock, 1999 et Michetti et *al.*, 1999).

#### **1.2/ Définitions**

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques.

Une des premières définitions des probiotiques comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposée par Lilly et Stillwell en 1965. Ensuite, Parker élargit cette définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore » (Parker, 1974).

Cette définition inclut potentiellement des produits métaboliques microbiens y compris les antibiotiques. Plus tard, Fuller (1989) propose une définition très proche

du sens actuel : « supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ».

La FAO et l'OMS ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulent la définition suivante : « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère » (FAO/OMS, 2002).

### **1.3/ Les micro-organismes probiotiques**

Les bactéries qui constituent la microflore intestinale résidente, n'ont pas normalement d'effets négatifs sur les probiotiques et certaines d'entre elles sont nécessaires pour maintenir le bien-être de leur hôte. Comme exemple du rôle bénéfique de la microflore intestinale, il faut citer ce que l'on a appelé la "résistance à la colonisation" ou l'"effet de barrière" (van der Waaij et *al.*, 1971 et Vollaard et Clasener, 1994).

Sont considérés comme probiotiques différentes souches bactériennes ainsi que les levures. Les bactéries probiotiques sont principalement des bactéries lactiques et des bifidobactéries (Tableau I) :

**Tableau I** : Micro-organismes considérés comme probiotiques .

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Autres micro-organismes
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus spp,</i>
<i>L. amylovirus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli strain Nissle</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
<i>L. cellobius</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>		<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Source : Hozalpfel *et al.* (1998)

#### **1.4/ Critères de sélection des souches probiotiques**

Selon Salminen *et al.*(1996), Tannock (1999 a,b) et Stanton *et al.*(2001), pour qu'un organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique il doit présenter les caractéristiques suivantes:

- être un habitant naturel de l'intestin ;
- être capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier ;
- adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduit l'adhérence des pathogènes ;
- avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bactériocines...) ;
- non invasif, non carcinogène et non pathogène ;
- être capable de co-agréger pour former une flore normale équilibrée ;

- survivre aux différents procédés technologiques de production ;
- garder sa viabilité dans l'aliment et durant le transit intestinal.

Dans toutes les définitions prononcées, la notion de viabilité apparaît comme un critère de sélection important. Cependant, cette notion demeure très controversée puisque des études récentes, ont clairement démontré que même les souches non viables de probiotiques sont capables d'exercer certains effets positifs sur la santé entre autres la stimulation de certaines fonctions immunitaires, l'inhibition de l'adhésion et l'invasion de certains pathogènes (Coconier et *al.*, 1993.,Ouwehand et *al.*, 1999). Le tableau II montre les critères de sélection des probiotiques .

**Tableau II :** Proposition de critères de sélection des probiotiques à application intestinale

<b>Critères de sécurité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Souche pour l'usage humain d'origine humaine ( isolée du tractus intestinal d'un homme sain ou alimentaire( utilisée dans les produits fermentés)</li> <li>▪ Souche déposée dans une collection de cultures reconnue internationalement</li> <li>▪ Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques</li> <li>▪ Historique de non pathogénicité</li> <li>▪ Pas de déconjugaison excessive des sels biliaires au risque des lyses cellulaires</li> <li>▪ Pas de transmission possible de gènes résistant au antibiotiques</li> <li>▪ Pas de dégradation excessive de mucus</li> </ul>
<b>Critères fonctionnels</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tolérance à l'acidité et au enzymes gastriques</li> <li>▪ Tolérance à la bile et aux enzymes digestives</li> <li>▪ Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastrointestinal</li> <li>▪ Immunostimulation</li> <li>▪ Production de substances antimicrobiennes et antagonisme vis-à-vis des pathogènes</li> <li>▪ Effets positifs sur la santé</li> </ul>
<b>Critères technologiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini</li> <li>▪ Conservation des propriétés probiotiques après production</li> </ul>

Source : Saarela *et al.* (2000)

**1.5/ Effets positifs des probiotiques sur la santé**

Selon Sanders et Huis in't Veld (1999) ; Playne et Salminen (2002); Gueimonde et Salminen (2003 ), différents effets positifs sont ainsi attribués aux probiotiques. Ces effets sont décrits dans le tableau III et expliqués ci-dessous.

**Tableau III :** Effets positifs des probiotiques sur la santé

<b>EVIDENCES SCIENTIFIQUES FORTES</b>	
<b>EFFETS DES PROBIOTIQUES</b>	<b>MECANISMES DES PROBIOTIQUES</b>
Aide à la digestion du lactose	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Action de la <math>\beta</math>-galactosidase bactérienne</li> </ul>
Réduction des risques des diarrhées	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activité antipathogène</li> <li>▪ Stimulation du système immunitaire</li> </ul>
Diminution des allergies alimentaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Amélioration de la fonction barrière de la muqueuse</li> <li>▪ Stimulation du système immunitaire</li> <li>▪ Dégradation des protéines allergènes</li> </ul>
<b>EVIDENCES SCIENTIFIQUES ET PROMETTEUSES</b>	
<b>EFFETS DES PROBIOTIQUES</b>	<b>MECANISMES DES PROBIOTIQUES</b>
Activité hypocholestérolémiante	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Assimilation du cholestérol</li> <li>▪ Déconjugaison des sels biliaires</li> </ul>
Prévention du cancer du côlon	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dégradation des carcinogènes</li> <li>▪ Production de composés antimutagéniques</li> <li>▪ Modulation des enzymes fécales carcinogéniques</li> <li>▪ Stimulation du système immunitaire</li> </ul>
Résistance contre les maladies inflammatoires et irritables des intestins	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activité antipathogène</li> <li>▪ Stimulation du système immunitaire</li> </ul>
Diminution des infections à <i>Helicobacter pylori</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activité antipathogène</li> </ul>
Effet anti hypertenseur	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Action des peptidases sur les protéines du lait donnant des peptides bioactifs</li> </ul>

Source: Gueimonde et Salminen (2003)

### **1.6/ Persistance et survie des probiotiques dans le tube digestif**

La survie dans l'environnement gastro-intestinal est une condition essentielle pour nommer les bactéries lactiques des probiotiques (Lievin-Le Moal et *al.*, 2007, Ghadimi et *al.*, 2008 et Lopez et *al.*, 2008).

Il est bien admis que les probiotiques transitent dans le tube digestif sans le coloniser. Néanmoins une colonisation provisoire est toutefois possible. Certaines bactéries lactiques peuvent persister jusqu'à plusieurs semaines. Même si les bactéries lactiques ne font que transiter dans le tube digestif, elles sont capables d'exercer leurs effets et d'avoir ainsi un impact sur l'hôte ( Dilmi-Bouras et Sadoun, 2002) et (Corrieu, Georges et *al.*, 2005).

L'étude de la survie des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal est importante pour une meilleure connaissance du devenir des bactéries lactiques ingérées avec l'aliment et une meilleure compréhension de l'action des probiotiques chez l'homme et l'animal.

Il est probable que pour exercer un effet probiotique significatif, les bactéries doivent arriver vivantes et en nombre suffisant dans l'intestin (Drouault et Corthier, 2001). Dans le tube digestif, les conditions d'environnement sont très différentes du produit contenant des probiotiques.

Dans l'estomac, l'acidité peut être très élevée mais une part importante des bactéries lactiques est évacuée avec les premières vidanges gastriques et elles atteignent rapidement l'iléon en une à deux heures après le repas (Lopez et *al.*, 2008).

Dans l'intestin grêle, les sels biliaries, les enzymes pancréatiques et des défensines produites par les cellules de l'intestin grêle peuvent réduire la viabilité des bactéries probiotiques. Dans le côlon, les bactéries se trouvent confrontées à une flore intestinale qui leur est 1 000 à 10 000 fois supérieure en nombre et qui peut avoir des répercussions sur leur viabilité et leur physiologie. Cependant il a été montré que non seulement les probiotiques étaient capables de survivre, mais également qu'ils étaient capables de moduler leur métabolisme pour s'adapter à l'environnement digestif de l'homme (Oozeer et *al.*, 2002).

Le moyen le plus fiable d'étudier le devenir des bactéries ingérées dans le tractus digestif est d'effectuer des mesures *in vivo*. Pour cela, deux techniques peuvent être utilisées : le recueil des selles et l'intubation intestinale. Ces deux techniques ont déjà permis d'étudier la survie d'un petit nombre de bactéries lactiques, essentiellement des lactobacilles, dans le tractus digestif (Marteau, Pochart et *al.*, 1992 ; Dilmi-Bouras et Sadoun, 2002 et Koïche et Dilmi-Bouras, 2010).

Plusieurs études sur souris gnotoxéniques (inoculées par un ou plusieurs micro-organismes définis) montrent que les bactéries résidentes ont un effet sur l'hôte dès lors que leur taux dépasse  $10^7$  bactéries/g de fèces. Cette condition est vraisemblablement valable pour les probiotiques (Gill , 1998), et le taux de survie dans le tube digestif (10 à 30% selon les souches) est ainsi un critère important pour avoir un effet (Moreau, 2001), la même constatation a été faite en utilisant le modèle lapin (Dilmi-Bouras et Sadoun, 2002).

## **2/ LES BACTÉRIES LACTIQUES**

### **2.1/ GÉNÉRALITES**

#### **2.1.1/ Définition et caractéristiques des bactéries lactiques**

Le terme "bactéries lactiques" désigne des bactéries produisant de l'acide lactique par fermentation des hydrates de carbone. Elles sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes, ne se développent qu'en présence de substances hydrocarbonées telles que les sucres, les alcools et les acides organiques (Desmazeaud, 1983).

Les bactéries lactiques sont: Gram +, en général immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes, catalases (-) (certaines bactéries possèdent des pseudo-catalases), nitrate (-), se présentent sous forme sphérique, allongée ou en bâtonnet. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les

peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Deroissart et Luquet, 1994).

Selon Dellaglio (1988) toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui en utilisant les glucides peuvent produire:

- L'acide lactique (bactéries homofermentaires).
- L'acide lactique et acétique, l'éthanol, le mannitol et CO<sub>2</sub> (bactéries hétérofermentaire).

### **2.1.2/ Classification des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques impliquées dans la production des laits fermentés sont distribuées en plusieurs groupes phénotypiques et génotypiques. Ces groupes sont caractérisés par des différents besoins nutritionnels, métaboliques et propriétés technologiques (Loones, 1994).

Parmi les nombreuses classifications proposées, la plus généralement adoptée avec quelques modifications est celle d'Orla-Jensen (1919), faisant appel pour différencier ces bactéries à plusieurs critères comme l'indique le tableau IV suivant :

**Tableau IV** : les différents genres des bactéries lactiques.

<b>Genres</b>	<b>Cellules</b>		<b>Fermentation</b>	<b>ADN GC (%)</b>
	<b>Formes</b>	<b>Arrangement</b>		
<i>Streptococcus</i>	Coque	Chaînes	Homolactiques	36-46
<i>Leuconostoc</i>	Coque	Tétrades	Hétérolactiques	36-43
<i>Pediococcus</i>	Coque	Tétrades	Homolactiques	34-42
<i>Lactobacillus</i>	Bacille	Chaînes	Homolactiques Hétérolactiques	32-53
<i>Bifidobacterium</i>	Variée	Variée	Acétiques et lactiques	55-67

Source : Novel ( 1993)



## **2.2 / LES LACTOCOQUES**

### **2.2.1/ Caractéristiques générales**

Les Lactocoques se retrouvent principalement dans les laits et crèmes fermentés ainsi que dans les fromages où ils sont en quantité dominante et dans lesquels ils jouent un rôle irremplaçable en contribuant à la structure et au goût et en assurant la conservation et la salubrité des produits. Les lactocoques se présentent sous forme de coques et forment des chaînes de longueur variable ( Kunji *et al.*, 2005).

Ce sont des bactéries homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), anaérobies facultatives à micro-aérophiles. Leur température de croissance optimale est proche de 30°C. Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6.5% de NaCl, ou lorsque le pH est supérieur à 9.6 (Dellaglio *et al.*, 1994).

Le genre *Lactococcus* comporte plusieurs espèces et sous espèces dont les trois types suivants sont utilisés en fabrication fromagère : *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris* et *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. Diacetylactis* (Konning,1994).

Le type *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis* possède un plasmide en codant la dégradation du citrate en diacétyl, molécule aromatique responsable de l'arôme du beurre. Les autres caractères biochimiques sont une croissance à 40°C, en présence de NaCl 4%, et à pH 9.2. Les coques lactiques ont des exigences nutritives parfois complexes, Certains ont des activités protéasiques et peptidasiques (Desmazeaud, 1996).

Les distinctions entre les espèces et les sous-espèces de *Lactococcus* sont données par le tableau V.

**Tableau V** : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des Lactocoques.

Bactéries		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactisbiovar. diacetylactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>raffinolactis</i>
<b>Croissance à</b>	10°C	+	+	+	+
	40°C	+	+	-	+
	45°C	-	-	-	-
	pH 9,6	-	+	+	-
<b>Croissance dans NaCl</b>	2%	+	+	+	+
	4%	+	+	-	+
	6,5%	-	-	-	-
<b>Profils fermentaires</b>	Lactose	+	+	+	+
	Maltose	+	-	+	v
	Mannitol	-	-	-	+
	Melibiose	-	-	-	-
	Gala	+	+	+	+
	Sac	v	v	-	-
	Ara	-	-	-	v
Ribose	+	-	-	+	
	Mobilité	-	-	-	-
	VP	-	+	+	v
	Résistance 30min/63°C	v	v	v	v
	Bile	+	+	-	-
	P° de gaz	-	+/-	-	-
	Esc	+	v	v	v
	Arg	-	+	+	+
	LS	v	+	+	v
	LT	arc	arc	arc	/
	Cit	-	+	+	-
Gélatinase	-	-	-	-	

Source : Guiraud (1998)

**Symboles :**

+ : réaction positive ; - : réaction négative ; v : variable ; a : acidification ; r : réduction ; c : coagulation. VP : acétoïne ; LT : lait tournesolé ; LS : lait de Sherman ; Esc : esculine ; Cit : citrate ; Arg : arginine ; P° : production. Gala : galactose ; Sac : saccharose ; Ara : arabinose.

**2.2.2/ Besoins nutritionnels**

Les Lactocoques ont une faible aptitude biosynthétique, ce qui explique leurs exigences du point de vue nutritionnel (tableau VI).

Ils utilisent pour leur croissance des éléments complexes carbonés, azotés et phosphatés, ainsi que des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligo-éléments (Konnings, 1994).

**Tableau VI** : Besoins nutritionnels des Lactocoques.

<b>Substance de croissance</b>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. Lactisbiovar.</i> <i>diacetylactis</i>
<b><u>Acides aminés</u></b>			
Lysine	-	-	-
Leucine	+	+	+
Histidine	+	+	+
Valine	+	+	+
Cystéine	S	+	S
Aspartate	Nd	Nd	Nd
Glutamate	+	+	+
Isoleucine	+	+	+
Tyrosine	Nd	Nd	Nd
méthionine	+	+	+
<b><u>Vitamine</u></b>			
Vit.B12	+	+	+
Biotine	+	+	+
Niacine	+	+	+
Pantothécrate	+	+	+
Riboflavine	+	+	+
Thiamine	+	+	+
Pyridaxol	+	+	+
Acide folique	+	+	+
<b><u>Acides organiques</u></b>			
Acide acétique	+	+	+
Acide oléique	+	+	+
Acide orotique	Nd	Nd	Nd
Acide formique	Nd	Nd	Nd
<b><u>Acides nucléiques</u></b>			
Hypoxanthines	S	-	-
Adénine	S	S	-
Guanine	S	-	-
Thymine	S	-	-
Thymidine	S	-	-
Uracil	S	-	-

Source : Konnings (1994).

**Symboles :**

+ : Essentiel à la croissance, - : Non requise pour la croissance, **S** : Stimulant, **Nd** : non déterminé.

### **2.2.3/ Rôles des lactocoques**

Les Lactocoques ont une grande importance dans l'industrie agro-alimentaire et en particulier dans l'industrie de transformation laitière. Ils sont classés en souches acidifiantes : *Lactococcus lactis subsp lactis* et *cremoris* et en souches aromatisantes : *Lactococcus Lactis subsp.lactis biovar diacetylactis* (Novel, 1993).

*Lactococcus lactis* est la principale bactérie composant les starters utilisés dans l'industrie et l'artisanat laitiers, pour l'élaboration d'une large gamme de produits (crèmes aigres, fromages à pâte molle, fromages durs et demi-durs...). Ces ferments lactiques jouent un rôle-clé dans la qualité de ces produits, notamment en ce qui concerne la durée de conservation, la préservation et la qualité sensorielle (Smit *et al.*, 2005).

La quantité et la diversité des informations recueillies (données de séquences génomiques, macro-cinétiques et physiologiques, aspects technologiques), ainsi que le développement d'outils de génétique moléculaire, font aujourd'hui de *Lactococcus lactis* un microorganisme modèle pour les bactéries à Gram positif et, en particulier, pour les bactéries lactiques (Kok *et al.*, 2005 ; Mierau et Kleerebezem, 2005).

De plus, *Lactococcus lactis*, décrit comme un organisme GRAS (« Generally Recognized As Safe »), est couramment exploité pour des applications d'usine cellulaire, pour la production de protéines hétérologues ou comme système de délivrance de molécules thérapeutiques dans le tractus gastro-intestinal (Norton *et al.*, 1995., Steidler *et al.*, 2000., Kunji *et al.*, 2005).

### **2.2.4/ Lactococcus lactis comme souche probiotique**

Plusieurs travaux ont montré la possibilité de persistance de *Lactococcus lactis* chez l'homme ou chez l'animal (Grahn *et al.*, 1994 ; Schlundt *et al.*, 1994 ; Klijn *et al.*, 1995).

De nombreuses souches de Lactocoques étant traditionnellement utilisées comme « starter » dans la fabrication des fromages et d'autres produits laitiers

fermentés, l'établissement de propriétés probiotiques chez *Lactococcus lactis* pourrait conduire au développement de nouveaux aliments fonctionnels à visée « bio-thérapeutique » (Yadav et al., 2009).

Ainsi, certaines souches de lactocoques d'origine laitière présentent des propriétés probiotiques potentielles comme *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* NCC2211 et NIAI527 (Kimoto et al., 1999., Comelli, et al., 2002).

Par ailleurs, il a été montré que la souche *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219 est résistante aux conditions hostiles rencontrées dans le tractus gastro-intestinal et se lie aux cellules Caco-2 (Todorov et al., 2007).

Kimoto et al.(1999) et Kimoto et al.(2004), ont également révélé que *Lactococcus lactis* G50 présente une activité immuno-modulatrice qui améliore la réponse immunitaire et diminue significativement le taux sérique total d'anticorps IgE chez la souris, lors d'une administration par voie orale.

Les tests de criblage pour la sélection de bactéries lactiques probiotiques chez la carpe adulte ont permis d'isoler deux souches *Lactococcus lactis* h2 et h47, dotées d'une forte résistance à l'acide cholique et d'une activité antibactérienne élevée contre les pathogènes des poissons (Hagi et Hoshino, 2009).

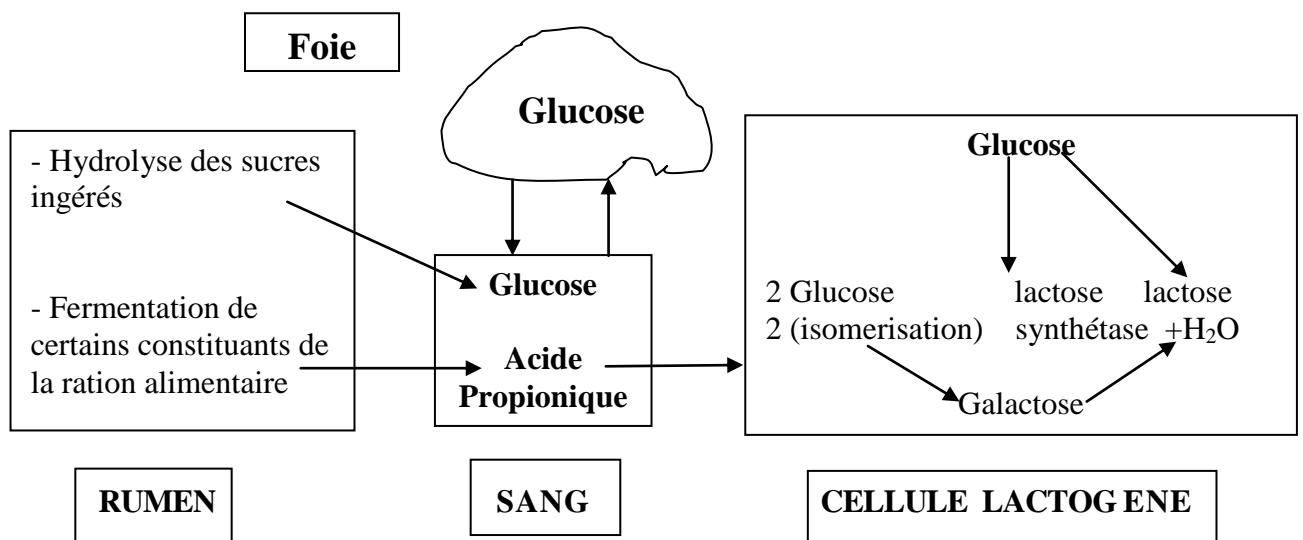
Dans l'optique d'un meilleur contrôle des mammites bovines, il a été montré que l'administration de *Lactococcus lactis* DPC3147 dans la glande mammaire permet de stimuler la réponse immunitaire locale de l'hôte (Beecher et al., 2009).

### 3/ LE LACTOSE ET INTOLÉRANCE AU LACTOSE

#### 3.1/ LE LACTOSE

##### 3.1.1/ Structure du lactose

Le lactose est le glucide prédominant du lait, il s'agit d'un disaccharide  $C_{12}H_{22}O_{11}$  réducteur spécifique du lait puisque sa synthèse se déroule dans la glande mammaire, sa synthèse ( figure 1) s'effectue dans les acini à partir du glucose sanguin produit essentiellement dans le foie (Pougheon et Goursand, 2001).

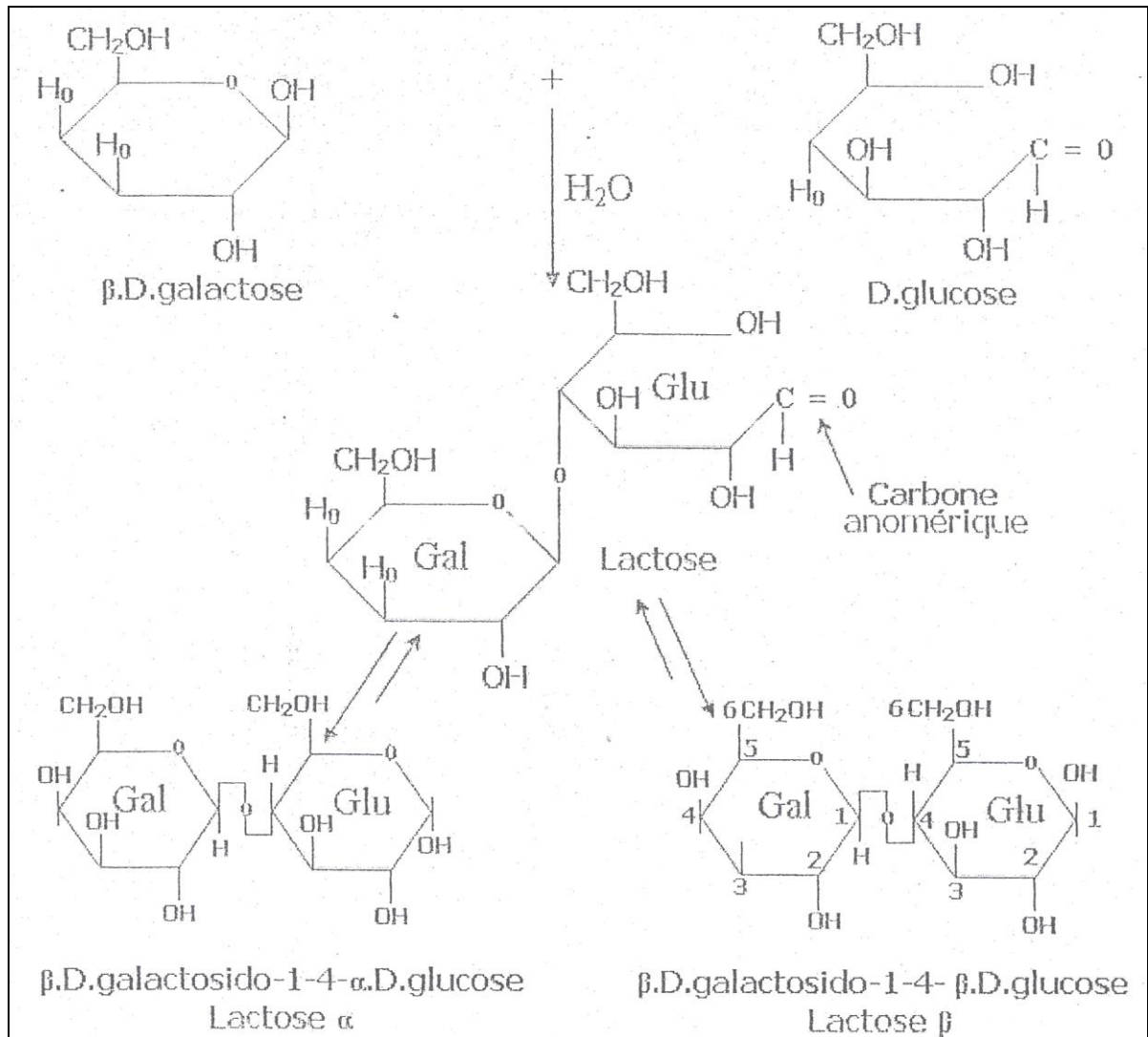


**Figure 1** : Synthèse du lactose ( Pougheon *et* Goursand, 2001)

Le lactose est un disaccharide formé par l'union de deux monosaccharide; le D.glucose et le D.galactose par un lien glucosidique  $C_1 (\beta) - C_4$  ( Amiot *et al.*, 2002).

Il est dit alpha ( $\alpha$ ) ou bêta ( $\beta$ ) selon la position du groupement -OH porté par le carbone 1 du résidu glucose, il se crée un équilibre entre ces 2 formes et on considère que dans une solution de lactose à 15 °C, le mélange se compose de 38 % de lactose  $\alpha$  et de 62 % de lactose  $\beta$  ( Pougheon *et* Goursand, 2001).

La figure 2 montre la formation du lactose et sa structure (les deux formes cycliques).



**Figure 2** : Formation du lactose et structure cyclique ( Amiot et *al.*, 2002 )

### 3.1.2/ Propriétés physicochimiques du lactose

- **Solubilité**

Le lactose est soluble dans l'eau grâce à la présence des groupements hydroxyles (- OH) qui peuvent s'associer à l'eau par des liaisons hydrogène (Amiot et al., 2002 ).

La solubilité du lactose justifie quelques remarques d'après Lankveld (1995) :

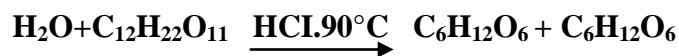
- La forme  $\beta$ , plus soluble, prédominé jusqu'à 93 °C, mais au delà de cette température elle prend sa solubilité.
- ✓ A 15 °C; la solubilité initiale est assez faible (10 fois plus faible qu'un sucre ordinaire) mais elle s'élève après une agitation prolongée (de 7,3 à 17 g/100 g d'eau).
- ✓ La solubilité augmente avec la température (à 25 °C, elle est de 22 g/100 g d'eau).

▪ **Gout sucré**

Le lactose à un goût sucré faible, son pouvoir sucrant est 6 fois plus faible que le sucre ordinaire, par exemple, si on considère le pouvoir sucrant du saccharose égal à 100, celui du fructose est de 170, celui du glucose de 75 et celui du lactose de 17 (Amiot et al., 2002 ).

▪ **Hydrolyse du lactose**

Soit par acide à haute température :



Soit par la voie enzymatique par action d'une lactase ou  $\beta$ -galactosidase (Pougheon et Goursand, 2001).

▪ **Propriétés réductrices**

Le lactose est un sucre réducteur du fait de la présence d'un groupe aldéhyde libre, contrairement au saccharose, ce pouvoir augmente suite à l'hydrolyse puisque le glucose possède un pouvoir réducteur supérieur et que s'y ajoute celui du galactose (Pougheon et Goursand, 2001).

### **3.1.3/ Transformation biologique du lactose**

▪ **Métabolisme d'hydrolyse enzymatique**

Le métabolisme du lactose débute dans le jéjunum par l'action de la ( $\beta$ .galactosidase intestinale qui libère le glucose et le galactose au sein de l'organisme, qui sont ensuite employé dans le cycle biologique du métabolisme après

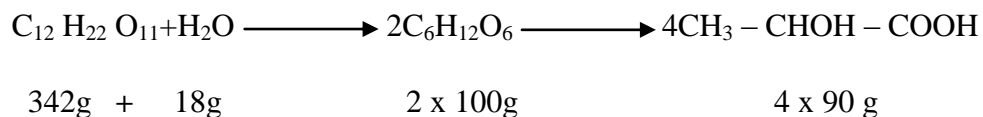


phosphorylation, ce type d'hydrolyse (par un enzyme) est employé en industrie, on utilise des lactases de levure (*Kluyveromyces fragilis ou lactis*) ou des lactases fongiques (*Aspergillus niger ou oryzae*) (Pien, 1975 ; Olano et Calvo, 1989 ; Lorient, 2001)

▪ **Fermentation lactique**

La fermentation est la transformation physicochimique du lactose la plus importante dans le domaine laitier (Pougheon et Goursand, 2001., Amiot et *al.*, 2002).

Quelques bactéries adaptés au métabolisme du lactose (car possédant une  $\beta$ -galactosidase) réalisent cette fermentation qui donne comme métabolites final essentiellement de l'acide lactique ( Luquet, 1990 et Luquet, 1993)



**3.1.4/ Avantages et inconvénients de l'utilisation de lactose**

**3.1.4.1/ Rôles fonctionnels du lactose**

▪ **Intérêt général du lactose**

- Il contribue à stabiliser le pH intestinal d'où une meilleure utilisation digestive du Ca et P, l'abaissement du pH évite l'installation de la flore putrifiante (Luquet, 1990).

- Le lactose a l'avantage d'exercer une pression osmotique deux fois moindre pour un apport énergétique du glucose et du galactose après l'action de la  $\beta$ -galactosidase intestinale limitant ainsi l'osmolarité intraluminale du grêle (Vidailhet, 2001).

-Par ailleurs alors que dans les autres glucides alimentaires la plupart des liaisons sont de type  $\alpha$  (1-4), elles sont ici type  $\beta$  (1-4) limitant le risque de prolifération de certaines bactéries pathogènes (Alston - Mills, 1995).

- Les liaisons  $\beta$  (1-4) favorisent le développement d'une flore lactique fermentant le lactose et s'avèrent avoir un effet favorable sur la microflore intestinale appelée effet probiotique (Vidailhet, 2001)

- Cet effet favorable de la fermentation du lait, favorisent sa conservation par formation d'acide lactique, acétique, d'acide gras volatils (Alston - Mills, 1995 ).

- Le galactose est un constituant essentiel des cérébrosides qui compose le tissu nerveux (Luquet, 1990).

#### ▪ **Utilisation en transformation alimentaire**

Selon Britten et *al.*(2002), on exploite plusieurs propriétés du lactose en transformation alimentaire :

➤ Il permet de réduire l'intensité de la saveur sucrée des produits, on l'utilise dans les produits à forte concentration de sucre pour contrôler la texture (confiture, garniture).

➤ Il intensifie et prolonge la perception des arômes et stabilise les colorants.

Selon Luquet (1990), Le lactose est utilisé dans la fabrication de chips et pommes de terre frites pour favoriser les réactions de brunissement et de caramélisation.

#### ▪ **Application nutritionnelle et pharmaceutique**

Selon Gauthier et Pouliot (2002).

➤ Le rapport glucides / Protéines du lait de bovins est d'environ 1,6 alors qu'il atteint 7,0 dans le lait humain.

➤ La lactose est l'ingrédient idéal à ajouter au lait de bovin pour standardiser la composition des lactées pour les nourrissons, la digestion du lactose est lente et fournit de l'énergie au nouveau né pour de longues périodes.

➤ De plus une production du lactose atteint la flore intestinale et stimule la croissance des Bifidobactéries.

➤ On emploie les dérivés du lactose principalement en raison de leur effet sur le système digestif humain, le lactulose (dérivé du lactose) agit comme laxatif dans le traitement de la constipation chronique.

### **3.1.4.2/ Inconvénients de l'utilisation de lactose**

- Selon Luquet (1990), sa faible stabilité et la dureté des cristaux, on évite ce phénomène soit en broyant les cristaux pour obtenir une taille de particule inférieure au seuil de perception de papilles gustatives (70 Micron). Soit en provoquant une cristallisation très fine pour que les cristaux eux-mêmes soient imperceptibles.

- Son pouvoir sucrant faible était considéré comme un défaut, il y a quelques années, puisque tous les sucres étaient référencés au saccharose (Britten et al., 2002).

- Les interactions entre les bactéries et certains constituants du régime alimentaire provoquent la formation des acides responsables de la déminéralisation de l'émail buccodentaire (Folliguet et Debry, 2001).

- Les laits au lactose pour nourrisson seraient plus cariogènes que les préparations au soja sans lactose car celles-ci contiennent du sirop au glucose (Moynihan et al., 1996, Moynihan 1998 et Folliguet et Derby, 2001).

- l'intolérance au lactose (Raul, 2001).

## **3.2/ CARACTERISATION DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASE**

### **3.2.1/ Généralités**

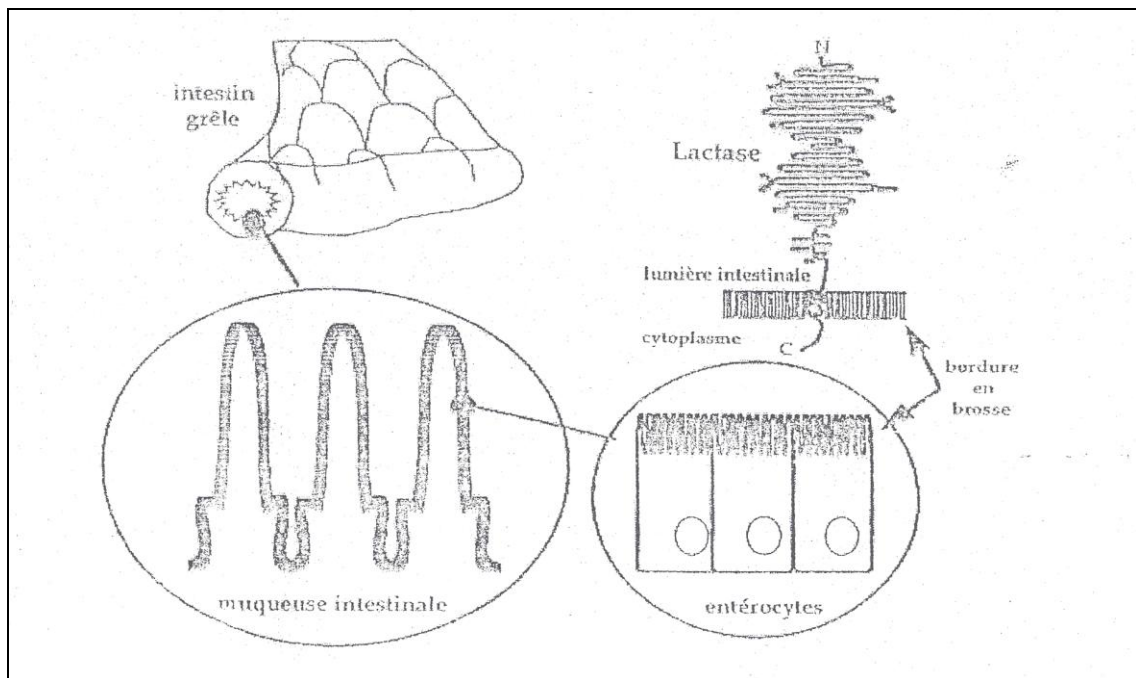
D'après Raisonier (2001), la  $\beta$ -galactosidase est une enzyme d'*Escherichia coli* ; lorsque cette bactérie pousse sur un milieu riche en lactose, elle exprime la  $\beta$ -galactosidase qui est un gène de l'opéron lactose. Elle hydrolyse spécifiquement les liaisons osides dans lesquelles l'anomère  $\beta$  du galactose engage son carbone réducteur. 1 g de lactase peut hydrolyser 1000g de lactose par heure (Stewart, 1973).

\*La  $\beta$ -galactosidase est une enzyme endocellulaire (Durand et Monson, 1982).

\*La  $\beta$ -galactosidase (Ec.3.2.1.23) hydrolyse le lactose ainsi que d'autres dérivés ( $\beta$ -Galactosides) comme O-nitrophenyl  $\beta$ -D galactoside (ONPG) et le P-Nitrophényl  $\beta$ -D galactoside (PNG) (Senez, 1968 et Jacob et al., 1997).

La quasi-totalité de la molécule se trouve dans la lumière intestinale au contact des nutriments, la lactase intestinale présente deux sites actifs qui hydrolyse le lactose (Walker et al., 1992).

La figure (3) montre la localisation de la lactase intestinale.



**Figure 3** : Localisation de la lactase intestinale ( Raul, 2001)

### **3.2.2/ Classification de la lactase**

Selon Durand et Monson (1982), les enzymes sont groupés en 6 classes, chaque enzyme est désigné par 4 nombres :

Le numéro systématique de cet enzyme est Ec3-2-1-23 : EC pour Enzyme commission, le premier nombre (3) pour la classe des hydrolases, le deuxième (2) pour la sous classe des glucosidases, le troisième (1) pour la sous-sous- classe des hydrolases catalysant l'hydrolyse d'une liaison. O-glycosidique, et le quatrième (23) pour le numéro d'ordre dans la sous-sous classe (Quintard et Guilloton, 1996).

Les travaux de Semenza et *al.*(1965) puis Cook et *al.*(1973) ont permis d'isoler trois  $\beta$ -galactosidase :

1. La lactase lysosomiale ou enzyme II ,peu spécifique et dont le rôle physiologique est très limité ;
2. L'enzyme III ou hétéro-béta-galactosidase, n'hydrolyse pas le lactose.
3. La lactase de la bordure de brosse ou enzyme I dont la synthèse a lieu au niveau des cellules de l'épithélium villositaires.

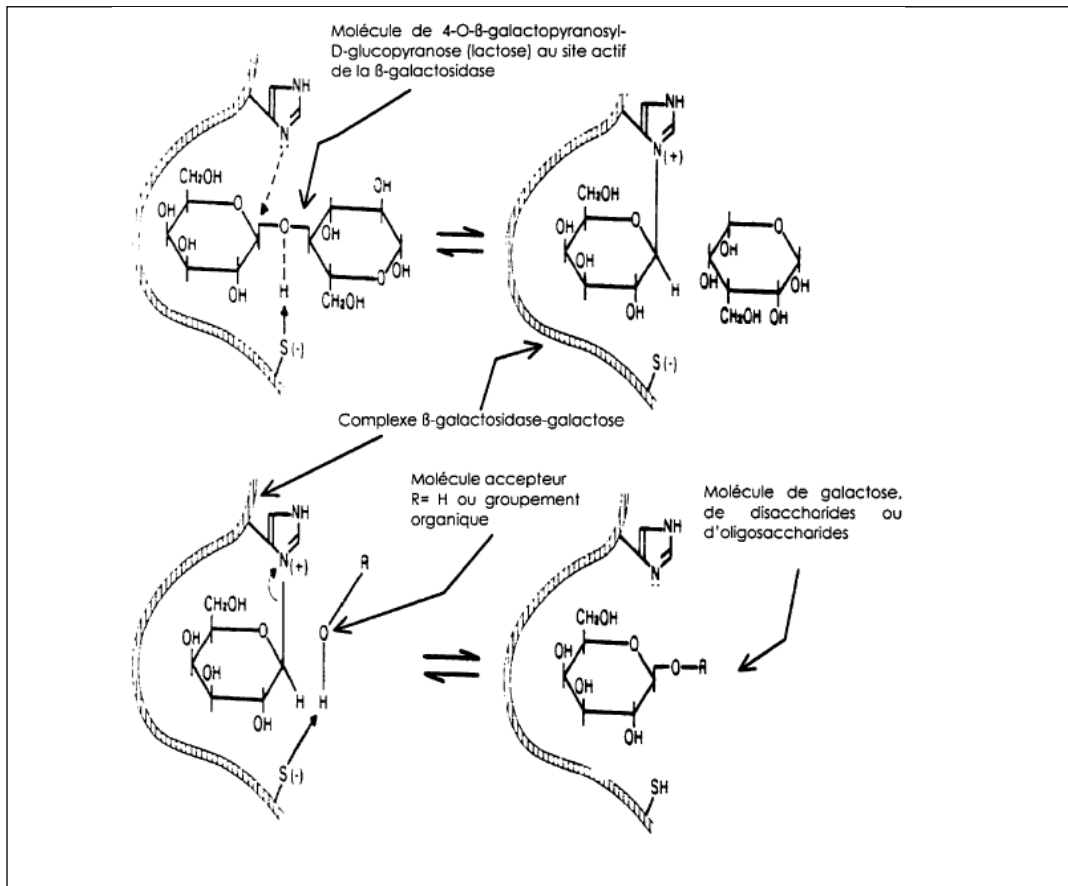
### **3.2.3/ Action de la lactase**

Prenosil et *al.*(1987) avait proposé un modèle pour la réaction de transgalactosidation de certaines  $\beta$ -galactosidases qui se divisent en trois étapes. La figure 4 schématise la réaction transhydrolytique.

Lors de la première étape, l'enzyme démontre une spécificité accrue envers la partie glycone du substrat puisqu'on retrouve des groupements histidine et cystéine au site actif de la B-galactosidase. Le groupement SH se comporte comme un acide pour faire la protonation de l'atome d'oxygène glycosidique et un groupement imidazole agit comme un nucléophile attaquant le centre électrophile au carbone C(1) du glycone et facilitant ainsi le clivage de la liaison osidique.

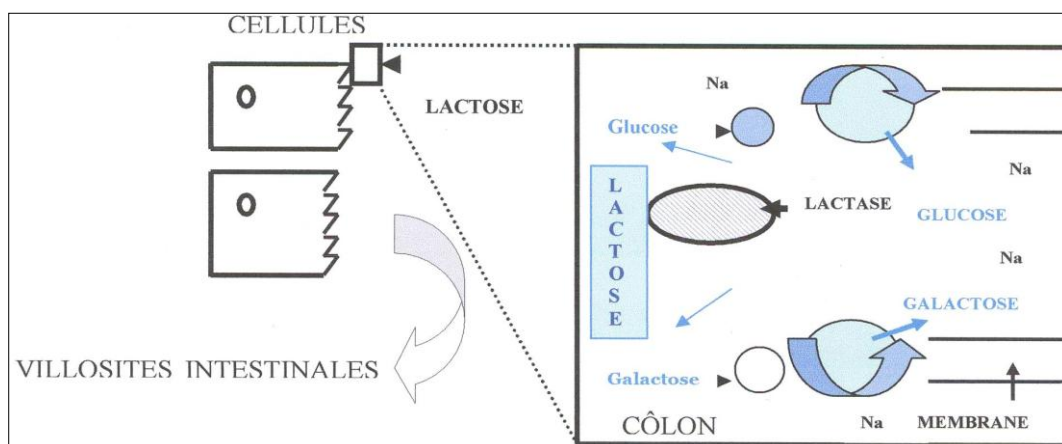
Lors de la deuxième étape, un intermédiaire covalent impliquant un lien carbone-azoté est formé, lequel peut réagir avec n'importe quel substrat accepteur qui possède un groupement hydroxyle.

Enfin, à la dernière étape, l'anion sulfure de la cystéine agit comme une base pour soustraire un proton de l'accepteur et libérer ainsi la nouvelle molécule synthétisée.



**Figure 4 :** Mécanisme d'action de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase ( Prenosil et *al.*,1987).

Lorsque le lactose est absorbé dans l'intestin grêle, il sera dégradé dans le côlon sous l'action de la lactase, cette enzyme le décompose en glucose et en galactose pour générer de l'ATP (Antoine et Fripiat ,1986) comme le montre la figure 5 .



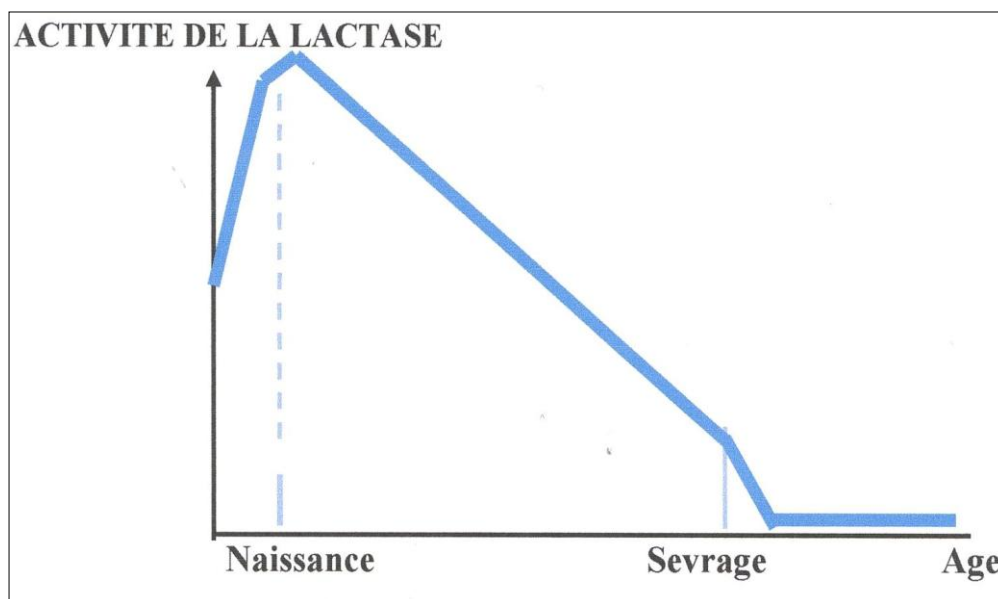
**Figure 5 :** Action de la lactase (Antoine et Fripiat ,1986).

### **3.2.4/ Activité lactasique**

L'activité intestinale lactasique de la majorité des individus diminue avec le temps Cette évolution est sous contrôle génétique. Certains sujets (les moins nombreux) conservent cette capacité enzymatique toute leur vie. Pour les autres populations, cette activité disaccharidique diminue inexorablement, mais sans disparaître complètement (Adrian et Lepen ,1987).

L'activité lactasique est maximale à la naissance elle chute au sevrage chez tous les mammifères chez lesquels une activité résiduelle de 10% de l'activité à la naissance persiste à l'âge adulte.

Il en est ainsi dans la plus grande partie de l'espèce humaine, sauf chez les Caucasiens et les descendants de tribus pastorales chez lesquels l'activité lactasique persiste à l'âge adulte ( figure 6) (Carper, 1995).



**Figure 6 :** Evolution de l'activité de la lactase intestinale chez les mammifères avec l'âge (Raul, 2001)

### **3.3/ INTOLÉRANCE AU LACTOSE**

#### **3.3.1/ Historique**

Selon Luquet (1986), différentes hypothèses ont été émises en ce qui concerne l'intolérance au lactose :

- **Première Hypothèse** : Ethnique.

Les races noires, jaunes, sémites n'ont pas de lactase persistante, une mutation anormale serait apparue au Nord-Ouest de l'Himalaya et aurait par vagues successives envahis l'Europe et le nord de l'Amérique.

- **Deuxième hypothèse** : Pression sociologique et biologique.

- **Le premier exemple** : concerne les populations de Viking qui vivaient dans une zone à faible ensoleillement, lorsqu'ils ne buvaient pas le lait, ils étaient soumis au rachitisme de l'adulte, c'est à dire l'ostéomalacie qui a eu pour conséquence de pratiquer une sélection génétique, dans les cimetières Viking on a trouver de nombreuses femmes au bassins ostéomalaciques morts en couches avec un enfant bloqués dans le petit bassin, il y aurait donc une sélection de population lactase persistante.

- **Le deuxième exemple** : concerne les tribus nomades bédouines, les arabes ainsi que les sémites, sont une population lactase disparus après le sevrage; mais certains auteurs ont étudiés des tribus nomade bédouines autour de Riyad et se sont aperçut que dans ces tribus bédouines, pratiquement 100% des sujets étudiés absorbaient le lactose donc sont lactase persistantes, cette anomalie est expliquée par la pression génétique due au fait que les tribus bédouines, pendant de nombreuses semaines, voir même des mois, n'ont que le lait de chamelle pour survivre par conséquent, ceux qui surviennent sont lactase persistante.

#### **3.3.2/ Définition**

C'est l'incapacité de digérer le sucre du lait (le lactose) (Emond, 2004). L'intolérance au lactose se définit aussi comme l'apparition de symptômes digestifs désagréables (Ballonnement, gaz en excès, borborygmes voir diarrhées) survenant après ingestion de lactose chez les sujets incapables de digérés en totalité ce sacre en fonction de la tolérance individuelle (Absolonne ,1989., Ekleinman et Pennez, 2003).



Près-de-75 % de la population mondiale tolère mal le lait d'origine animale et ses dérivés (Emond, 2004).

En Suisse, environ une personne sur six souffre de l'intolérance au lactose (Ekleinman et Pennez, 2003). Les personnes qui en souffrent accusent une déficience en lactase, une enzyme du système digestif qui permet de digérer le sucre du lait et de le convertir en glucose et en galactose afin qu'il soit absorbé par l'intestin.

L'intolérance au lactose touche entre 70 et 90 % des grecs, des arabes, des africains, des Afro-américains, des Japonais, des Thaïlandais, des Philippins, des juifs, des Amérindiens et des Inuits, seulement 15 % des occidentaux souffrent d'intolérance au lactose (Emond, 2004).

### **3.3.3/ Origine de la malabsorption**

La digestion du lactose dépend de l'activité de la lactase (lactase - phlorizin hydrolase). En effet le disaccharide n'est pas absorbé et nécessite d'être clivé en glucose et galactose. In Utero, l'activité lactasique de l'intestin de l'embryon augmente au cours de la gestation, elle est maximale dans le dernier trimestre de la grossesse et à la naissance, ainsi cette activité lactasique permet au nourrisson d'hydrolyser le lactose que lui apporte le lait de sa mère ou le lait infantile quand elle n'allait pas (Emond, 2004).

Selon Raul (2001), au moment de sevrage, l'activité de la lactase va diminuer progressivement pour beaucoup de population, elle va se stabiliser à un niveau de l'ordre de 10 à 20% de celui de naissance, cette situation est appelée hypolactasie, l'âge au quel cette hypolactasie est établie et variable selon les groupes ethniques, par exemple, elle est déjà installée à 2 ans en Afrique et en Asie, alors qu'elle n'intervient qu'à l'âge de 6- 8 ans au Japon, à 10 - 15 ans en Finlande.

Néanmoins, certaines populations ou certains groupes ethniques vont conservés des niveaux élevés de lactase tout au long de leur vie (Europe du nord, certaines tribus nomades d'Afrique et du moyen orient) (Emond, 2004).

### **3.3.4/ Classification de l'intolérance au lactose**

D'après Ekleinman et Pennez (2003) Il y a 3 types d'intolérance au lactose.

- ✓ L'intolérance de source congénitale, une condition assez rare causée par un absence de lactase à la naissance.
- ✓ L'intolérance temporaire ou permanente causée par un virus, une bactérie ou une maladie ayant détériorés les capacités digestives.
- ✓ L'intolérance causée par une diminution normale de l'activité de la lactase, ce qui se produit généralement dès la fin de la petite enfance.

#### ▪ *Déficit congénital en lactase*

Selon Raul (2001) et Robavo-Torres et *al.* (2007), ce déficit extrêmement rare est héréditaire et transmis sur un mode récessif il est liée à un dysfonctionnement du gène de la lactase conduisant à l'absence complète de lactase au niveau des bordures en brosse entérocytaire (individu lactasique).

Ce déficit apparaissant dès la naissance, le nouveau né présente une diarrhée de fermentation dès l'ingestion de lait pouvant conduire à une sévère déshydratation, Mais il ne présente pas de dangers lorsqu'il est diagnostiqué rapidement, les symptômes disparaissent complètement lorsque l'enfant reçoit un lait délactosé, ces individus doivent consommer une alimentation dépourvue de lactose durant le reste de leur vie.

#### ▪ *Déficit secondaire en lactase*

La molécule de lactase occupe une position particulièrement vulnérable ce qui lui confère une très grande fragilité, de nombreux facteurs perturbent l'intégrité de la muqueuse intestinale : une intolérance au gluten ou une allergie aux protéines du lait, une diarrhée d'origine virale ou bactérienne, une infection parasitaire, une malnutrition, en protéine énergétique, une pathologie inflammatoire, une hypoxie, une hyperthyroïdie, la chimiothérapie, certain antibiotique comme la néomycine (Villako et Maarons, 1994).

Le déficit secondaire en lactase qui est un phénomène entièrement réversible est la cause la plus fréquente de l'intolérance au lactose chez les nourrissons (Raul, 2001 et Heyman, 2006).

▪ **Déficit primaire en lactase ou hypolactasie de type adulte**

La perte permanente d'activité de la lactase est courante chez l'humain adulte. On estime que 70 à 95 % des adultes subissent un certain niveau d'intolérance au lactose, qui se déclare habituellement vers la fin de l'enfance. Cette condition semble avoir des affinités raciales, certaines ethnies étant plus susceptibles que d'autres, avec une apparition plus hâtive et un degré d'intolérance plus élevé que d'autres ( Joneja 2004., Mustapha et *al.*, 1997., Vesa et *al.*, 2000 et Wermuth , 2008).

L'hypolactasie de type adulte doit ainsi être considéré comme un phénomène normal, en fait, c'est la persistance d'une forte activité lactasique à l'âge adulte qui doit être considéré comme l'exception dans un grand nombre de population ou il été observé que l'ingestion de lait occasionnait des troubles digestifs à l'age adulte ( Flatz 1987., Raul, 2001 et Alm , 2002).

Le tableau VII montre la répartition de l'hypolactasie de type adulte dans les populations humaines adultes appartenant à différents groupes ethniques.

**Tableau VII** : Répartition de l'hypolactasie de type adulte dans les populations humaines adultes appartenant a différents groupes ethniques :

Groupe ethnique	Intolérance au lactose %
Africains	95-100
Indiens	90-100
Asiatiques	90-95
Américain (population native)	70-90
Américain (d'origine Africaine)	70-80
Population du bassin méditerranéen	60-75
Juifs	60-70
Américain (d'origine Européenne)	10-15
Européens du nord	5-10

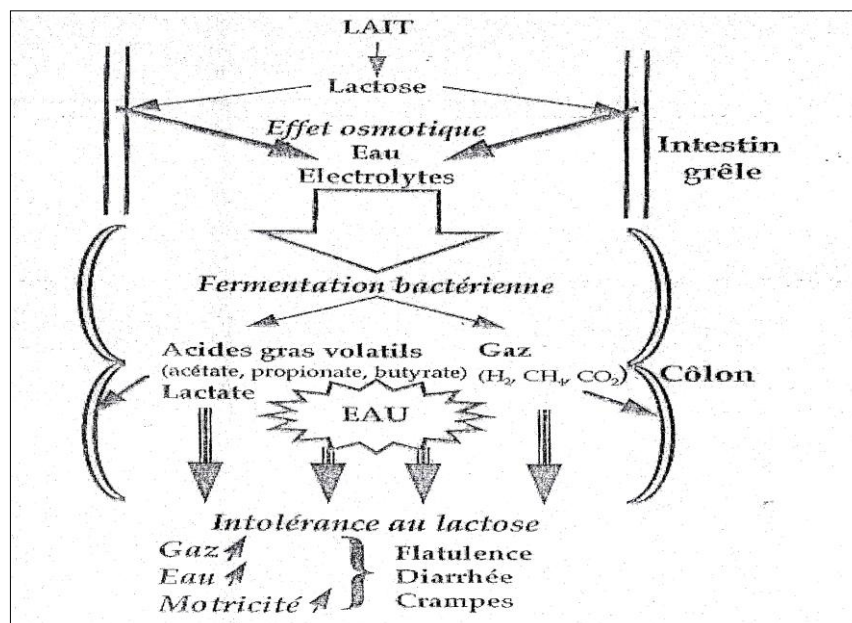
Source: Sahi (1997)

### 3.3.5/ conséquence physiologique de l'intolérance au lactose

Lors d'un déficit en lactase intestinal, le lactose ne peut plus être hydrolysé, son pouvoir osmotique provoque un transfert d'eau de la muqueuse vers la lumière intestinale (Raul, 2001).

- ✓ L'accumulation d'eau conduit à une dilatation dans l'intestin ainsi qu'à une accélération du transit intestinal ( Zhao *et al.*, 2010).
- ✓ L'augmentation du volume liquide au niveau colique aboutit à une diarrhée importante (Raul, 2001).
- ✓ Le lactose non hydrolysé est métabolisé par la flore bactérienne du colon, ce qui conduit à la production de pyruvate, de lactate, d'acide gras volatils (acétate, propionate) et de gaz (hydrogène, gaz carbonique et méthane) (Raul, 2001).
- ✓ Les gaz libérés produisent un borborygme, ballonnement de flatulence accompagné de douleurs abdominales, des crampes et des nausées. Ces symptômes se manifestent (généralement) dans les deux heures qui suivent l'ingestion du lactose (Raul, 2001, Emond, 2004).

La figure 7 montre le mécanisme du développement de l'intolérance au lactose chez des sujets déficients en lactase intestinale.



**Figure 7:** Mécanisme du développement de l'intolérance au lactose chez des sujets déficients en lactase intestinal (Raul, 2001)

Le tableau VIII montre les différents symptômes de l'intolérance au lactose

**Tableau VIII** : Les différents symptômes présentés lors d'une intolérance au lactose

<b>Symptômes gastro-intestinaux</b>	<b>% parmi les patients présentant les symptômes (n= 133)</b>
Douleurs abdominales	100
Distension intestinale	100
Borborygme	100
Flatulence	100
Nausée	78
Vomissement	78
Diarrhées osmotiques	70
Constipation	30

Source :Virginie Alexandre et *al.*(2011)

### **3.3.6/ Aspect clinique et nutritionnel de l'intolérance au lactose**

#### **▪ *Traitement et prévention***

Chez un sujet intolérant au lactose, plusieurs moyens peuvent être utilisé pour faire, disparaître les symptômes d'après Reasoner et *al.* (1981) et Raul (2001) dont :

- ✓ L'utilisation de laits dé lactoser.
- ✓ ajout de la lactase exogène sous forme de comprimé ou des bactéries vivantes qui en conviennent comme celles présentés dans le yaourt.
- ✓ Privilégier la consommation de yaourt, de laitage ou de fromage avec les repas.
- ✓ Ne pas consommer du lait à jeun.
- ✓ En effet, les graisses et/ou l'association d'autres aliments au lait ralentissent la vidange gastrique et peuvent ainsi améliorer l'absorption du lactose (Raul, 2001 ; Ekleinman et Pennez, 2003).

✓ De plus, le lactose agit dans 21 % des médicaments sur ordonnance et dans 6% des médicaments en vente libre à titre d'ingrédient inactif, il est important de vérifier auprès du pharmacien avant de prendre un nouveau médicament (Emond, 2004).

▪ ***Aliment à privilégié***

Certains produits laitiers comme le lait au chocolat, le yaourt et les fromages affinés (Camembert, cheddar, suisse, bleu, mozzarella, parmesan, monterey jack) contiennent une quantité moins importante de lactose (Emond, 2004).

Selon Ekleinman et Pennez (2003), les bactéries nécessaires au vieillissement des fromages et à la fermentation du yaourt se substituent à la lactase dans le processus d'assimilation du sucre du lait, elles comblent la déficience en lactase ce qui se traduit par une digestion normale du lactose.

Le yaourt nature est reconnu pour être mieux toléré que le yaourt aromatisé (Emond, 2004).

▪ ***Aliment à éviter***

Le lait entier, le lait écrémé, le babeurre, le fromage cottage, la ricotta, le beurre, la crème glacée, le yaourt glacé et le lait évaporé sont des aliments à proscrire lorsqu'on souffre d'intolérance au lactose (Ekleinman et Pennez, 2003).

Certains aliments préparés pourtant non laitiers présentent une quantité de lactose suffisante pour provoquer un inconfort tels: le pain, les légumes congelés, les soupes, les vinaigrettes, les céréales, les préparations pour gâteaux et les bonbons (Emond, 2004).

#### **4/ POBIOTIQUES ET INTOLÉRANCE AU LACTOSE**

Le yaourt et autres laits fermentés par des bactéries probiotiques augmentent la digestion du lactose et éliminent les symptômes de l'intolérance au lactose cet effet bénéfique est due à l'activité microbienne de la  $\beta$ -galactosidase ( DeVrese *et al.*, 2001).

Il est bien établi que le yaourt a des effets positifs sur la maldigestion du lactose dans le cas de déficiences primaires et secondaires en lactase ( Savaiano *et al.*, 1984., Boudraa *et al.*, 1990., Marteau *et al.*, 1992 et Arrigoni *et al.*, 1994 ).

La déficience en lactase est due à une faible activité en lactase intestinale sur les entérocytes des villosités situées dans la bordure en brosse du jéjunum ( Sahi , 1994) .

Le lactose non digéré dans l'intestin grêle est fermenté dans le côlon par les bactéries coliques conduisant à la production d'acides organiques à chaîne courte et de gaz tels que l'hydrogène, le méthane et le gaz carbonique. Ces produits présents en quantités excessives dans le côlon peuvent provoquer flatulences, spasmes intestinaux, douleurs abdominales, ballonnements et diarrhées osmotiques (de Villiers, 1995).

Plusieurs études ont montré, par le test respiratoire à l'hydrogène, que la production d'hydrogène est beaucoup moins importante avec le yaourt qu'avec le lait ( Sahi , 1994 et Shermak *et al.*, 1995).

Marteau *et al.*( 1990) ont également montré que plus de 90% du lactose du yaourt est digéré chez des sujets déficients en lactase. L'effet bénéfique du yaourt par rapport au lait est indépendant de la quantité de lactose dans le produit et n'est donc pas dû à une plus faible teneur en lactose du yaourt due à la dégradation du lactose par les bactéries lactiques thermophiles ( *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* ( Koïche et Dilmi-Bouras, 2010) .

Trois hypothèses ont été proposées sur cet effet bénéfique :

\* la digestion du lactose dans la lumière intestinale par la lactase des bactéries lactiques du yaourt. Plusieurs auteurs postulent que la bile contenue dans l'intestin grêle augmenterait la perméabilité des cellules bactériennes, permettant au lactose

d'entrer et d'être dégradé (Noh et Gilliland , 1995). La lyse des bactéries lactiques dans le tractus digestif avec relargage de leur lactase intracellulaire est également possible (Marteau et *al.*, 1997) ;

\* un ralentissement de la vidange gastrique et du transit gastro-intestinal dus à la texture plus épaisse et visqueuse du yaourt par rapport au lait (Marteau et *al.*, 1990). Ceci laisserait plus de temps à la lactase intestinale résiduelle et aux bactéries lactiques du yaourt pour agir ;

\*la stimulation de l'activité lactasique de la muqueuse intestinale par les bactéries lactiques du yaourt . Besnier et *al.*(1983) ont observé chez la souris une augmentation de l'activité lactasique dans la bordure en brosse chez des souris normales et des souris axéniques (sans germe) après 14, 28 et 42 jours de consommation de yaourt.



# ***PARTIE EXPERIMENTALE***

## ***MATERIEL ET METHODES***

## **Chapitre I : MATERIEL ET METHODES**

L'ensemble de ce travail a été réalisé au laboratoire de bioressources naturelles locales (faculté des sciences, département de biologie) de l'Université Hassiba Benbouali Chlef.

### **Partie I : Étude de la dégradation du lactose par les Lactocoques mésophiles**

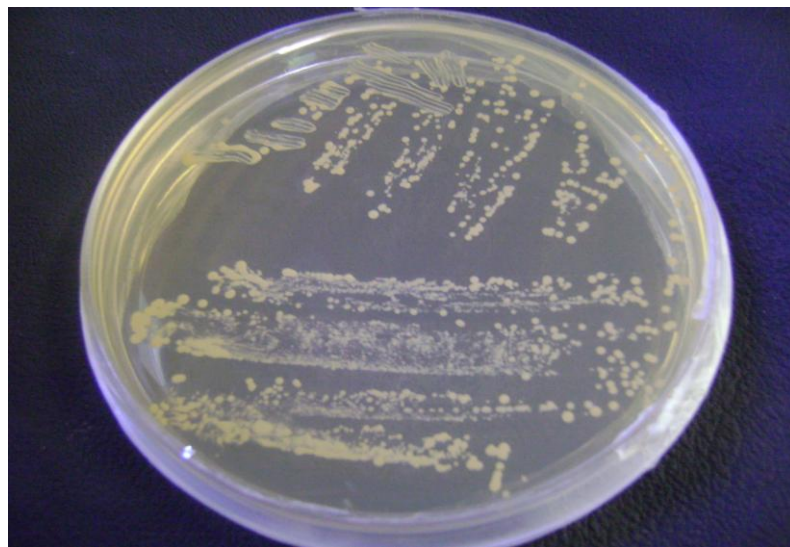
#### ***1/ MATERIEL***

##### **1.1/ Matériel biologique**

Les souches de *Lactococcus lactis* utilisées ont été isolées à partir des laits de vaches, chèvres et brebis ; purifiées et identifiées (tableau IX) par Allal, (2010). Les cellules bactériennes sont conservées dans un bouillon M17 à une température de -20°C en présence de 3% de glycérol.

Les souches utilisées sont les suivantes :( figure 8,9 et 10)

- 3 souches de *Lactococcus lactis subsp lactis* (*Lc.l1*, *Lc.l2*, *Lc.l3*) ;
- 2 souches de *Lactococcus lactis subsp cremoris* (*Lc.cr1*, *Lc.cr2*) ;
- 4 souches de *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* (*Lc.d1* , *Lc.d2*, *Lc.d3*, *Lc.d4* ) ;



**Figure 8** : Aspect macroscopique des souches de *Lactococcus lactis subsp lactis*



**Figure 9** : Aspect macroscopique de souches de *Lactococcus lactis subsp cremoris*



**Figure 10** : Aspect macroscopique des souches de *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*

**Tableau IX** : Origine des souches et les tests biochimiques d'identification

Test / Souche	V <sub>4</sub>	V <sub>5</sub>	V <sub>7</sub>	V <sub>10</sub>	V <sub>11</sub>	V <sub>13</sub>	V <sub>15</sub>	C <sub>6</sub>	V <sub>16</sub>
Production de CO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à:									
10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance en:									
2% de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.5% de NaCl	+	+	+	+	+	+	-	-	+
6.5% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Résistance au tellurite	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Dégradation de citrate	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Croissance à:									
pH4.5	-	-	-	-	+	+	+	+	+
pH6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thermorésistance à 65 °C/30min	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSI	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation de:									
Glucose	+	+	+	+	+	+			+
Galactose	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-					
Salicine	+	+	+	+	+	+	-	-	+
β-galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sels biliaires	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type respiratoire	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa
urée	-	-	-	-	+	+	-	-	+
indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TDA	+	+	+	+	-	-	+	+	-
mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Résultats	<i>Lc.dia<sub>1</sub></i>	<i>Lc.dia<sub>2</sub></i>	<i>Lc.dia<sub>3</sub></i>	<i>Lc.dia<sub>4</sub></i>	<i>Lc.l<sub>1</sub></i>	<i>Lc.l<sub>2</sub></i>	<i>Lc.cr<sub>1</sub></i>	<i>Lc.cr<sub>2</sub></i>	<i>Lc.l<sub>3</sub></i>

**Symboles:**

V: vache; C: chèvre; + : réaction positive; - : réaction négative; Aa : Aéro- anaérobie facultative; *Lc. cr.*: *Lactococcus cremoris*; *Lc. dia.*: *Lactococcus diacetylactis*; *Lc. l.*: *Lactococcus lactis*; + : réaction positive; - : réaction négative; Aa : Aéro- anaérobie facultative

### **1.2/ Milieux de culture**

\*Le milieu M17 (bouillon et gélose) (ou milieu de Terzaghi, référence : DIFCO 218561), est sélectif pour le dénombrement des lactocoques ( Petranxienne et Lapied , 1981).

\*Lait en poudre ( Craon, France)

### **1.3/ Réactifs chimiques**

- Hydroxyde de sodium 1N (NaOH) ;
- Solution physiologique de chlorure de sodium NaCl (9g/l) ;
- Ethanol absolue 96° ;
- Lugol
- Fuschine ;
- Violet de gentiane ;
- Bleu de méthylène ;
- Réactif de patein (composition en annexe I) ;
- Phénolphtaléine.

### **1.4/ Appareillage**

- Polarimètre manuel numérique (ATAGO) POLAX-2L ;
- Etuves réglées à 30°C et à 37°C (BENDER) ;
- Bain marie ;
- Balance analytique de précision (KERN) ;
- Microscope optique (MOTIC) ;
- Burette ;
- Agitateur magnétique à plaque chauffante ;
- pH-mètre HANNA 211 à électrode combinée ;
- Autoclave.

## **2/ METHODES**

### **2.1/ Repiquage et revivification des souches**

Les bactéries lactiques sont utilisées sous forme congelées en cultures pures. Elles sont activées et maintenues par un repiquage avec 0,1ml d'inocula dans 10 ml du bouillon de croissance M17 et incubées à 30°C pendant 72heures.

La méthode utilisée pour examiner la pureté des souches est celle préconisée par plusieurs auteurs notamment Dellaglio (1994) et Bourgeois et *al.*(1996) ,elle consiste à :

- Ensemencer, après repiquage, 0,1ml en surface sur gélose M17 avec la méthode des stries et incubé 24 h à 30°C ;
- Après incubation, la pureté des souches est confirmée par des examens macroscopiques et microscopiques (coloration au bleu de méthylène et coloration de Gram).

#### **\* Coloration**

La coloration différentielle la plus connue est celle de Gram, qui permet de diviser les bactéries en deux grands groupes Gram + et Gram -.

La méthodologie est la suivante :

- Quelques gouttes de solution aqueuse de violet de gentiane sont répandues sur le frottis puis l'excès de violet est jeté après une minute d'action.
- Le frottis est ensuite recouvert de lugol de Gram ; cette liqueur prend une teinte mordorée ; on la jette au bout de quelques secondes et on répète l'opération 1 ou 2 fois jusqu'à ce que la pellicule mordorée n'apparaisse plus.
- La lame est ensuite décolorée à l'alcool absolu goutte à goutte en l'inclinant au-dessus du l'évier, jusqu'à ce que l'alcool ajouté n'ait plus d'action décolorante.
- Après lavage à l'eau de robinet, le frottis est recoloré à la fuschine de Ziehl au 1/10<sup>e</sup> pendant une minute, puis lavé à l'eau, séché au buvard et examiné à l'immersion. Les Gram + apparaissent en violet et les Gram – en rose (Larpent, 1997).

**\* Caractères biochimiques**

• *Oxydases*

Les oxydases interviennent à la fin des étapes de déshydrogénation des chaînes de cytochromes. Il existe plusieurs types. Elles sont mises en évidence par leur propriété de catalyser la réaction d'oxydation d'un substrat organique par l'oxygène de l'air.

Le test peut être réalisé par la technique de Kovacs. Un disque « OX » est placé sur une lame et imbibé d'une goutte d'eau puis une parcelle de la culture est déposée à la surface. Une coloration rose violette se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive (Bourgeois, 1996).

• *Catalase*

Selon Delarras (2007), La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée qui résulte de l'oxydation, par l'oxygène de l'air, des protons issus des voies d'oxydation directes. Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes.

Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase :



Des tests biochimiques sont effectués pour la réidentification des souches de *Lactococcus lactis*, ces derniers sont mentionnés dans le tableau suivant.



## **2.2/ Préparation d'inoculum**

Dans un tube à essai contenant 9ml de bouillon de croissance M17 ,1ml de la culture pure est ajouté. Le bouillon est préalablement chauffé à 30°C (charge initiale de 10<sup>7</sup> bactéries/ml). Une bonne agitation est nécessaire pour rendre le milieu parfaitement homogène le mélange. L'incubation se fait à 30°C pendant 3heures.

## **2.3/ préparation des laits fermentés**

### *2.3.1/ préparation du lait*

120 grammes de poudre de lait entier (Celia) est dissoute dans une quantité suffisante pour 1 litre d'eau distillée stérile. Après homogénéisation, un traitement thermique est réalisé (90°C pendant 5 minutes) équivalent à une pasteurisation qui va permettre la destruction de tous les germes indésirables et l'inactivation de nombreuses enzymes (Loones, 1994).

### *2.3.2/ préparation des laits fermentés*

Dans des bêche de 250ml qui contiennent du lait stérilisé et refroidie à 30°C on ensemence 3% d'inoculum, et on suit pendant ( 3h, 6h, 24h, 48h et 72h ) les paramètres suivants :

- La dégradation du lactose par les lactocoques ;
- L'acidité dornics (°D) ;
- La viabilité des souches.

Afin d'élargir la zone de criblage nous avons utilisé :

- Des souches pures (*Lc.l1*, *Lc.l2*, *Lc.l3*, *Lc.cr1*, *Lc.cr2*, *Lc.d1*, *Lc.d2*, *Lc.d3*, *Lc.d4*) ;
- Des combinaisons binaires selon le rapport (1 :1) :

<i>Lc.d1+Lc.l1</i>	<i>Lc.d2+Lc.l1</i>	<i>Lc.d3+Lc.l1</i>	<i>Lc.d4+Lc.l1</i>	<i>Lc.l1+ Lc.cr1</i>
<i>Lc.d1+Lc.l2</i>	<i>Lc.d2+Lc.l2</i>	<i>Lc.d3+Lc.l2</i>	<i>Lc.d4+Lc.l2</i>	<i>Lc.l1+ Lc.cr2</i>
<i>Lc.d1+Lc.l3</i>	<i>Lc.d2+Lc.l3</i>	<i>Lc.d3+Lc.l3</i>	<i>Lc.d4+Lc.l3</i>	<i>Lc.l2+ Lc.cr1</i>
<i>Lc.d1+Lc.cr1</i>	<i>Lc.d2+Lc.cr1</i>	<i>Lc.d3+Lc.cr1</i>	<i>Lc.d4+Lc.cr1</i>	<i>Lc.l2+ Lc.cr2</i>
<i>Lc.d1+Lc.cr2</i>	<i>Lc.d2+Lc.cr2</i>	<i>Lc.d3+Lc.cr2</i>	<i>Lc.d4+Lc.cr2</i>	<i>Lc.l3+ Lc.cr1</i>
				<i>Lc.3+ Lc.cr2</i>

- des associations de trois souches selon le rapport (1 :1 :1) :

$D_1L_1C_1$	$D_2L_1C_1$	$D_3L_1C_1$	$D_4L_1C_1$
$D_1L_1C_2$	$D_2L_1C_2$	$D_3L_1C_2$	$D_4L_1C_2$
$D_1L_2C_1$	$D_2L_2C_1$	$D_3L_2C_1$	$D_4L_2C_1$
$D_1L_2C_2$	$D_2L_2C_2$	$D_3L_2C_2$	$D_4L_2C_2$
$D_1L_3C_1$	$D_2L_3C_1$	$D_3L_3C_1$	$D_4L_3C_1$
$D_1L_3C_2$	$D_2L_3C_2$	$D_3L_3C_2$	$D_4L_3C_2$

## 2.4/ Dosage du lactose

Le lactose est mesuré après hydrolyse par la méthode polarimétrique décrite par Le Coq (1965).

### 2.4.1/ Principe

Après défécation du lait par le réactif de Patein , la quantité de lactose est évaluée en déterminant le pouvoir rotatoire du lactosérum. Pour tenir compte du volume du précipité on opère suivant le procédé dit de « double dilution ». Deux prélèvements identiques de lait sont amenés après défécation à des volumes différents ayant entre eux le rapport  $\frac{1}{2}$ .

### 2.4.2/ Mode opératoire

On introduit successivement dans une fiole jaugée de 50 ml :

- 25 ml de lait ;
- 2,5 ml de réactif de Patein.

On agite et on complète au trait de jaugé avec de l'eau distillée. On mélange et on filtre après une dizaine de minutes (10mn). Le filtrat (a) doit être limpide.

On opère de même manière en utilisant une fiole jaugée de 100 ml (b).

Les filtrats (a) et (b) sont examinés en tube de 20 cm, la lecture est effectuée plusieurs fois.

Soit  $X_1$  le pouvoir rotatoire du liquide déféqué complété à 50 ml (a), et  $X_2$  celui du liquide déféqué complété à 100 ml (b).

Si on désigne par X le pouvoir rotatoire qu'aurait le lactosérum dilué issu de la défécation (a) ou qu'aurait le lactosérum issu de (b), en supposant le volume de précipité nul. X correspond au pouvoir rotatoire du lactose hydraté dont :

$$X = \frac{X_1 X_2}{2X_1 - X_2}$$

Le pouvoir rotatoire spécifique du lactose étant 52,42.

La quantité « P » de lactose hydraté en gramme par litre (g/l) de lait est :

$$P = \left( \frac{100X}{52,42} \right) \cdot 10$$

Le dosage du lactose est effectué à t = 0 (lactose initial du lait), et après ensemencement la lecture s'est effectuée aux intervalles de temps suivants :

0h, 3h, 6h, 24h, 48h, 72h.

## **2.5/ Acidité des laits fermentés**

### **2.5.1/ Principe**

L'acidité du lait est exprimée en degré Dornic (1 degré Dornic correspond à 100 mg d'acide lactique dans 1 litre de lait).

La solution NaOH est appelée « soude dornic », elle est préparée de façon à ce que 1 cm<sup>3</sup> de cette solution neutralise 10 mg d'acide lactique, sa concentration molaire est égale à 1/9 mole/l. On utilise pour prélever le lait une pipette classique de 10 ml.

### **2.5.2/ Mode opératoire**

Le titrage de l'acidité est effectué sur 10 ml du lait fermenté par une solution de NaOH (0,1 N) en présence de quelques gouttes de phénolphtaléine à 1% utilisée comme indicateur coloré (Bradly et al., 1992).

L'acidité titrable est exprimée en degrés Dornic (°D) dans ces conditions 1°D correspond à 0,1 ml de soude.

## **2.6/ Viabilité des bactéries**

### *2.6.1/ Préparation des dilutions*

A partir de la suspension mère, les dilutions sont préparées selon la méthode suivante :

Après avoir bien agiter le lait pour assurer une répartition homogène des microorganismes, on répartit d'une manière stérile 9 ml de diluant (solution physiologique stérile de 9% de NaCl) dans une série de tubes.

Après agitation, on prélève à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de la solution mère qu'on introduit dans le tube n° 1 et ainsi s'obtient une dilution  $10^{-1}$ . Après agitation, on prélève 1 ml de la dilution  $10^{-1}$  et on le transfère dans le tube n° 2, on obtient ainsi la dilution  $10^{-2}$  et ainsi de suite jusqu'à obtention des différentes dilutions ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ).

### *2.6.2/ Dénombrement de la flore lactique*

Le procédé de dénombrement des bactéries s'est opéré sur le milieu M17 agar, par ensemencement en surface ensuite une incubation à 30°C pendant 24 heures à 48 heures. Les *Lactocoques* ont des colonies circulaires, blanches à contour régulier et transparent, de diamètre varie entre 1.5 à 2 mm, légèrement bombé et brillantes, visqueuse, et opaque.

Nous avons décompté les colonies développées dans chaque boîte de pétrie et transformé logarithmiquement ces résultats pour établir la représentation graphique (Larpen, 1997).

## **Partie II : Étude de la survie des Lactocoques mésophiles dans les conditions extrême du tube digestif**

### ***1/ MATERIEL***

#### **1.1/ Matériel biologique**

Les souches qui présentent un taux dégradation du lactose élevé durant l'incubation à 37°C seront l'objet d'une étude de leur survie dans les conditions du tractus digestif.

#### **1.2/ Milieux de culture**

- Milieu M17 gélose (référence : DIFCO 218561) ;
- Milieu M17 bouillon (référence : DIFCO 218561).

#### **1.3/ Réactifs chimiques**

- Solution physiologique de NaCl (9g/l) ;
- Acide chlorhydrique concentré (HCl) ;
- Sels biliaires en poudre : (référence 4054- Merck)

### ***2/ METHODES***

Le but de cette étude est de faire la sélection des souches lactiques qui ont une forte assimilation du lactose et qui peuvent résister aux barrières physiologiques du tube digestif.

L'étude de la survie est réalisée selon la méthode suivante :

Les bouillons M17 de croissance sont fraîchement préparés et divisés directement en deux fractions :

▪ La fraction 1 : sans sels biliaries, répartie en flacons et autoclavée à 120°C pendant 15 min, puis additionnée l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à l'ajustement du pH désiré :

- pH 2,5 : représente le pH de l'estomac à jeûne ;
- pH 4,3 : représente le pH de l'estomac au moment ou juste après le repas ;
- pH 6,5 : représente le pH au niveau des intestins.

▪ La fraction 2 : est additionnée de 0,3% des sels biliaries, après son autoclavage à 120°C pendant 15 min. le pH est ajusté comme la fraction précédente.

Les bouillons de croissance sont ensuite répartis dans des tubes stériles à raison de 10 ml par tube.

À ces différentes fractions sont additionnées : 3% d'inoculum des associations bactériennes sélectionnées.

Ces fractions sont ensuite incubées à 37°C ; la croissance des ferments est contrôlée par dénombrement en surface sur boîte de pétri pendant les intervalles de temps suivants : 0h, 3h, 24h , 48h et 72h ( Dilmi-Bouras, 2002).

## ***RESULTATS & DISCUSSIONS***

## Chapitre II : RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Partie I : Etude de la dégradation du lactose par les Lactocoques mésophiles

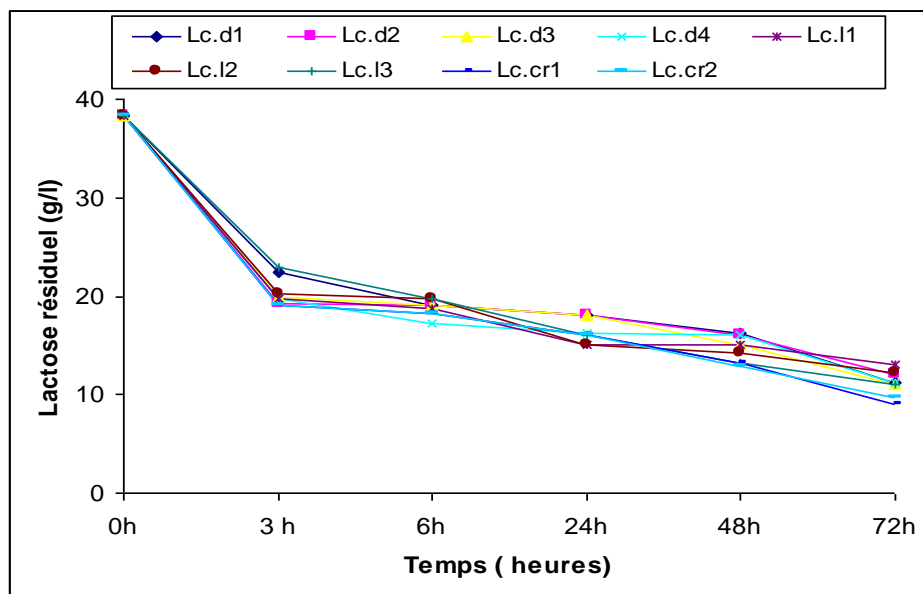
#### *1/ Dégradation du lactose*

##### 1.1/ Dégradation du lactose par les souches pures

Le lait avant ensemencement des bactéries lactiques contient 38,25 g/l de lactose.

Le lactose est dégradé à un taux moyen de 47% après 6 h d'incubation à 37°C et un taux de 70% après 72 h d'incubation par les souches pures de *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* (Lc.d1, Lc.d2, Lc.d3, Lc.d4).

Un pourcentage maximal de dégradation de 50,2% est obtenu après 6h d'incubation et 76% après 72h respectivement pour les souches (Lc.cr1 et Lc.cr2) comme le montre la figure (11).



**Figure 11** : Évolution du lactose résiduel en (g/l) en fonction du temps dans les laits fermentés par les souches pures de *Lactococcus lactis*.



Un effet positif de plusieurs souches probiotiques sur la digestion du lactose a été démontré par des études physiopathologiques *in vitro et in vivo* ( Kolars *et al.*, 1984., Savaiano *et al.*,1984., Marteau *et al.*, 1990., Adolfsson *et al.*, 2004 ).

Selon Sahi (1994)., de Vrese *et al.*(2001)., Drouault *et al.*( 2002) et Adolfsson *et al.*(2004) , es mécanismes d'action des bactéries lactiques probiotiques dans les laits fermentés sont :

La diminution de la concentration du lactose dans le lait fermenté ;

\* une forte activité lactasique des bactéries lactiques, l'enzyme bactérienne ( $\beta$ -galactosidase est trouvé active dans le duodénum ;

\* Augmentation et induction d'activité de la  $\beta$ -galactosidase intestinale ,

Les *Lactococcus lactis* sont capables de métaboliser le lactose, principal sucre du lait, dont il y'a une variation dans le pourcentage de dégradation (Crow et Thomas, 1984). Cette variation dans les résultats de dégradation du lactose est due essentiellement aux souches utilisées, car il existe une variation considérable non seulement entre les différentes souches mais également entre les espèces de même genre comme l'a confirmé Accolas *et al.* (1977).

Ainsi Noh *et al.*(1995) avaient comparés l'activité de la Béta-galactosidase de six souches de *Streptococcus thermophilus* dans les mêmes conditions de culture que nos souches et ensemencées dans un bouillon M17 les résultats montrent une variation dans leurs pouvoir de dégradation du lactose.

### **1.2/ Dégradation du lactose par les combinaisons de deux souches selon le rapport (1:1)**

Les résultats mentionnés dans le tableau X montrent un taux moyen de dégradation de lactose qui atteint 72% après 6 h d'incubation et 82% après 72 h d'incubation chez plusieurs combinaisons notamment *Lc.d1+Lc.cr1*, *Lc.d1+Lc.cr2*, *Lc.d2+Lc.cr1*, *Lc.d2+Lc.cr2*, *Lc.d3+Lc.cr1*, *Lc.d3+Lc.cr2*, *Lc.d4+Lc.l2*, *Lc.d4+Lc.cr1* et *Lc.d4+Lc.cr2*.

## Résultats & discussion

Alors qu'un taux plus élevé de dégradations a été obtenu par les combinaisons (*Lc.l2+ Lc.cr1*, *Lc.l2+ Lc.cr2*, *Lc.l3+ Lc.cr1* et *Lc.3+ Lc.cr2*) arrivant à 80% après 6 h d'incubation et 87% après 72 h d'incubation.

Les meilleurs résultats de dégradation de lactose sont obtenu par la culture mixte *Lc.l3+ Lc.cr2*, avec un lactose résiduelle de 07,90 g/ l c'est-à-dire un taux de dégradation de 80% après 6h d'incubation et 03,735 g/ l de lactose résiduelle avec un taux de dégradation de 90,24% après 72 h d'incubation.

**Tableau X** : Évolution du lactose résiduel en (g/l) en fonction du temps d'incubation à 30°C dans les laits fermentés par les souches en combinaison selon le rapport (1 :1) .

temps Bactéries	3 h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d1+Lc.l1</i>	13,75	12,66	11,82	11,05	10,25
<i>Lc.d1+Lc.l2</i>	12,28	11,32	11,05	10,05	9,57
<i>Lc.d1+Lc.l3</i>	13,15	12,07	10,07	10	09,25
<i>Lc.d1+Lc.cr1</i>	12,08	10,15	09,55	07,06	06,15
<i>Lc.d1+Lc.cr2</i>	11,98	10,09	09,33	08,17	07,02
<i>Lc.d2+Lc.l1</i>	13,98	12,15	10,55	09,15	09,02
<i>Lc.d2+Lc.l2</i>	12,72	11,50	10,25	10,01	09,95
<i>Lc.d2+Lc.l3</i>	13,95	12	11,05	11	10,025
<i>Lc.d2+Lc.cr1</i>	11,85	10,41	9,75	9,05	8,25
<i>Lc.d2+Lc.cr2</i>	12,01	10,05	09,52	08,15	07,15
<i>Lc.d3+Lc.l1</i>	12,75	12,70	11,4	10,33	10,05
<i>Lc.d3+Lc.l2</i>	12,15	11,09	10,43	09,08	09
<i>Lc.d3+Lc.l3</i>	11,06	11	10,15	10	09,52
<i>Lc.d3+Lc.cr1</i>	11,45	10,15	09,75	08,33	06,52
<i>Lc.d3+Lc.cr2</i>	11,6	10,02	09,13	08,05	07,15
<i>Lc.d4+Lc.l1</i>	12,33	11,42	10,36	10,15	09,95
<i>Lc.d4+Lc.l2</i>	11,75	10,75	09,97	09,05	08,63
<i>Lc.d4+Lc.l2</i>	12,70	11,07	10,25	09,25	08,95
<i>Lc.d4+Lc.cr1</i>	11,24	10,06	09,33	08,55	07,05
<i>Lc.d4+Lc.cr2</i>	11,02	10,05	08,15	07,07	06,07
<i>Lc.l1+ Lc.cr1</i>	11,38	11,029	10,10	09,36	09,05
<i>Lc.l1+ Lc.cr2</i>	11,44	10,04	09,89	09,19	08,89
<i>Lc.l2+ Lc.cr1</i>	10,66	09,33	09,05	08,15	07,16
<i>Lc.l2+ Lc.cr2</i>	09,71	08,71	07,33	05,28	04,75
<i>Lc.l3+ Lc.cr1</i>	09,03	08,12	07,015	06,27	05,13
<i>Lc.l3+ Lc.cr2</i>	08,15	07,90	06,13	05,52	03,735

Garman et al. ( 1996) ont prouvé dans une étude sur l'hydrolyse du lactose du lait par six souches de bactéries lactiques *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* , *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus* et *Bifidobacterium bifidum* et ont pu isolés leur Béta-galactosidase et calculé leur activité lactasique , une meilleur hydrolyse a été obtenue par celles isolés à partir des souches du genre *Lactococcus lactis*.

Une meilleure dégradation est obtenue par les interactions entre les espèces de *Lactococcus lactis subsp lactis* et *Lactococcus lactis subsp cremoris* que celle des *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* et *Lactococcus lactis subsp cremoris*, cela est due selon Courtin et al.( 2004) au interactions entre microorganismes dans un écosystème simple qui est le lait fermenté et les capacités différentes de dégradation de lactose entre chaque espèce.

### **1.3/ Dégradation du lactose par les associations de trois souches selon le rapport (1:1:1)**

Les résultats mentionnées dans le tableau XI montrent que le lactose est dégradé jusqu'à 78% après 6 h d'incubation et 90,8% après 72 h d'incubation respectivement pour les associations (  $D_1L_3C_1$ ,  $D_2L_1C_1$ ,  $D_2L_2C_1$ ,  $D_2L_3C_1$ ,  $D_3L_1C_1$ ,  $D_3L_1C_2$ ,  $D_3L_3C_2$ ,  $D_4L_1C_1$ ,  $D_4L_1C_2$ ,  $D_4L_2C_1$  et  $D_4L_2C_2$  ).

Ainsi, un pourcentage de dégradation maximale est atteint par les associations en cultures mixtes ( $D_4L_3C_1$  et  $D_4L_3C_2$ ) à raison d'une moyenne de 86% après 6 h d'incubation et 100% après 72 h d'incubation.

Des valeurs maximales sont obtenues pour l'association  $D_4L_3C_2$  avec un lactose résiduel de 2,25 g/ l c'est-à-dire un taux de 94,11% après 24 h d'incubation et 00 g/ l de lactose résiduel (100%) après 24 h d'incubation.

**Tableau XI** : Évolution du lactose résiduel en (g/l) en fonction du temps d'incubation à 30°C dans les laits fermentés par les souches en association selon le rapport (1 :1 :1).

temps \ Bactéries	3 h	6h	24h	48h	72h
$D_1L_1C_1$	11,56	9,35	8,66	5,25	3,35
$D_1L_1C_2$	11,35	10,08	9,55	07,85	3,95
$D_1L_2C_1$	10,25	9,75	8,25	7,13	4,09
$D_1L_2C_2$	10,15	9,11	8,35	7,10	3,85
$D_1L_3C_1$	9,75	8,15	7,25	5,5	2,65
$D_1L_3C_2$	9,50	8,05	7,15	5,33	3,05
$D_2L_1C_1$	10,15	9,75	7,5	5,85	4,15
$D_2L_1C_2$	9,39	8,57	7,45	5,59	3,95
$D_2L_2C_1$	9,77	8,35	7,70	6,25	4,85
$D_2L_2C_2$	10,75	9,33	8,70	7,15	5,45
$D_2L_3C_1$	9,095	8,11	7,05	5,43	2,58
$D_2L_3C_2$	9,01	8,06	6,75	4,35	2,15
$D_3L_1C_1$	9,77	8,57	7,88	6,73	5,15
$D_3L_1C_2$	9,75	8,25	6,96	5,25	3,75
$D_3L_2C_1$	10,33	9,25	8,77	7,09	5,25
$D_3L_2C_2$	9,25	8,75	7,67	6,57	5,15
$D_3L_3C_1$	8,75	7,25	5,33	2,55	00
$D_3L_3C_2$	8,15	7,33	5,25	2,25	00
$D_4L_1C_1$	9,75	8,95	7,33	6,15	4,75
$D_4L_1C_2$	9,95	8,25	7,15	6,05	5,05
$D_4L_2C_1$	8,13	7,25	5,01	2,75	00
$D_4L_2C_2$	8,25	7,10	5,25	3,75	1,15
$D_4L_3C_1$	7,15	6,35	4,02	2,15	00
$D_4L_3C_2$	7,03	5,43	2,25	00,85	00

Le lactose-6-phosphate intracellulaire issu du transport du lactose par le système PTS lac (Le système PTS (phosphotransférase PEP-dépendant) est impliqué dans le transport de divers hydrates de carbone chez les bactéries (Postma *et al.*, 1993).

Le lactose est clivé en galactose-6-phosphate et glucose par la phospho- $\beta$ -galactosidase. Le glucose, après phosphorylation par le PTS man ou la GLK, emprunte la glycolyse tandis que le galactose-6-phosphate suit la voie du Tagatose qui elle-même rejoint la glycolyse au niveau des trioses-phosphate (de Vos *et al.*, 1990., van Rooijen *et al.*,1991).

Les souches de *Lactococcus lactis* qui fermentent lentement le lactose produisent généralement de nombreux produits finaux : acétate, formiate, éthanol et lactate (Farrow, 1980).

Il a été montré que la souche *Lactococcus. lactis* NCDO2054, qui métabolise très lentement ce sucre le transporte via un système perméase (Crow et Thomas, 1984).

Le lactose est ensuite clivé en glucose et en galactose par la  $\beta$ -galactosidase, le glucose emprunte la glycolyse, tandis que le galactose est dirigé vers la voie de Leloir qui rejoint la glycolyse au niveau du G6P (Bissette et Anderson, 1974., Thomas *et al.*, 1980).

Il est bien établi que certaines souches probiotiques de bactéries lactiques augmentent la digestion du lactose dans l'intestin grêle chez l'adulte grâce à leur lactase dans la lumière intestinale car le lait fermenté est vidangé plus lentement que le lait liquide (De Vrese *et al.*, 2001).

Deux mécanismes proposés pourraient expliquer l'amélioration de la digestibilité du lactose observée *in vitro* avec la consommation du lait fermenté grâce à la lactase bactérienne :

1. la digestion du lactose est facilitée par la lactase bactérienne sécrétée ;
2. le temps de transit gastro-intestinal du lait fermenté est plus élevé que celui du lait (Marteau *et al.*, 2001 et Labayen *et al.*, 2001).

Des travaux expérimentaux réalisés par Draouault *et al.*( 1984) sur des souris montrent que l'effet de l'amélioration de la digestion du lactose est liée à la présence de la  $\beta$ -galactosidase fournie par les bactéries lactiques présentes dans les laits fermentés.

Gallagher *et al.* (1974) ont montré une diminution du taux du lactose dans un lait fermenté et un fromage frais construit par les espèces du genre *Lactococcus lactis*.

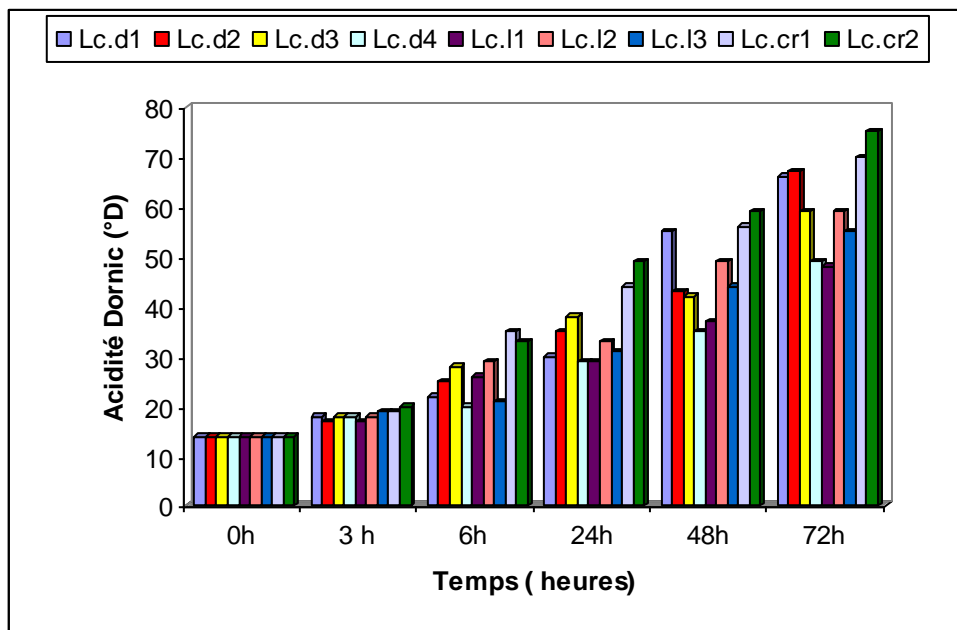
Les Lactocoques mésophiles dont les espèces sont (*Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* , *Lactococcus lactis subsp cremoris*, *Lactococcus lactis subsp lactis*) hydrolysent le lactose durant son absorption intestinale grâce à une phospho  $\beta$ -galactosidase intracellulaire qui les caractérise ( Lin M-y ,1995).

## 2/ Évolution de l'acidité Dornic

Afin de sélectionner des souches lactiques intéressantes du point de vue technologiques, dans notre cas c'est le taux de dégradation du lactose, l'étude de la variation de l'acidité Dornic s'est avérée importante.

### 2.1/ Évolution de l'acidité Dornic des souches mésophiles pures

Les valeurs de l'acidité Dornic des cultures bactériennes pures augmentent progressivement de 14°D à 0 h d'incubation pour atteindre 35°D et 33°D respectivement après 6 h d'incubation et 72 h d'incubation à 30°C. Une acidité plus élevée comprise entre 70 °D et 75° D est enregistrée respectivement pour les souches : *Lc.cr1* et *Lc.cr2* comme le montre la figure (12).



**Figure 12** : Évolution de l'acidité Dornic en fonction du temps d'incubation dans les laits fermentés par des souches pures de *Lactococcus lactis*.

Nous constatons que les souches de l'espèce *Lactococcus lactis subsp cremoris*, sont plus acidifiantes que celles de l'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis* et *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*. Ceci est en parfaite

## Résultats & discussion

concordance avec les résultats trouvés par Cogan (1980) ; Novel (1993) et Champagne *et al.*(2000).

### 2.2/ Évolution de l'acidité Dornic des combinaisons de deux souches selon le rapport ( 1 :1)

En cultures mixtes, presque toutes les combinaisons présentent une acidité plus élevée qu'en cultures pures comme le montre le tableau XII. Pour les associations : *Lc.d3+Lc.cr1* et *Lc.l3+ Lc.cr2*, l'acidité augmente pour atteindre respectivement après 72 h d'incubation: 78°D et 82 °D.

**Tableau XII** : Évolution de l'acidité Dornic °D des laits fermentés avec les cultures mixtes de bactéries lactiques mésophiles en fonction du temps d'incubation à 30°C selon les rapports (1 :1)

Bactéries \ temps	3 h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d1+Lc.l1</i>	22	35	39	44	52
<i>Lc.d1+Lc.l2</i>	24	29	33	42	55
<i>Lc.d1+Lc.l3</i>	30	33	39	48	50
<i>Lc.d1+Lc.cr1</i>	32	38	44	51	75
<i>Lc.d1+Lc.cr2</i>	30	32	42	55	68
<i>Lc.d2+Lc.l1</i>	22	24	34	43	49
<i>Lc.d2+Lc.l2</i>	20	33	40	45	51
<i>Lc.d2+Lc.l3</i>	19	22	32	39	47
<i>Lc.d2+Lc.cr1</i>	28	33	42	49	51
<i>Lc.d2+Lc.cr2</i>	32	41	49	59	69
<i>Lc.d3+Lc.l1</i>	20	29	43	50	57
<i>Lc.d3+Lc.l2</i>	21	28	33	45	54
<i>Lc.d3+Lc.l3</i>	22	29	35	49	57
<i>Lc.d3+Lc.cr1</i>	35	44	59	64	78
<i>Lc.d3+Lc.cr2</i>	33	48	54	60	69
<i>Lc.d4+Lc.l1</i>	22	25	35	42	55
<i>Lc.d4+Lc.l2</i>	25	29	39	44	58
<i>Lc.d4+Lc.l3</i>	20	25	35	45	57
<i>Lc.d4+Lc.cr1</i>	21	28	39	49	62
<i>Lc.d4+Lc.cr2</i>	22	25	34	42	51
<i>Lc.l1+ Lc.cr1</i>	29	33	47	53	68
<i>Lc.l1+ Lc.cr2</i>	22	29	39	42	57
<i>Lc.l2+ Lc.cr1</i>	27	31	45	51	69
<i>Lc.l2+ Lc.cr2</i>	29	39	49	64	75
<i>Lc.l3+ Lc.cr1</i>	23	33	48	54	68
<i>Lc.l3+ Lc.cr2</i>	29	39	49	67	82

Lucas et Reyrolle (1989), ont testé la résistance des lactocoques aux acidités élevées et leurs résultats ont montré que les souches de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* sont résistantes à une acidité de 85°D.

L'aptitude acidifiante est une caractéristique propre à chaque souche bactérienne car elle est liée aux aptitudes particulières qu'elle possède à dégrader les composés du milieu pour les rendre assimilables et à transporter les éléments nutritifs dans le cytoplasme ( Payens ,1979., Deroissart et Luquet, 1994 et Brussow, 2001).

### **2.3/ Évolution de l'acidité Dornic des associations de trois souches selon le rapport (1 :1 :1)**

Les associations de trois souches bactériennes présentent une acidité plus élevée que pour les cultures en association de deux souches. Des valeurs maximales sont atteintes après 72h d'incubation de l'ordre de 110°D et 120°D respectivement pour les cultures :  $D_3L_3C_1$  et  $D_3L_3C_2$  selon le tableau XIII.

- Des expériences réalisées par Lucas et Reyrolle (1989) montrent que les souches en association de *Lactococcus lactis* peuvent résister à une acidité dépassant les 75°D.
- Nous pouvons déduire que les souches de *Lactococcus lactis* en associations possèdent un pouvoir acidifiant élevé car l'acidité Dornic dépasse 95°D au bout de 72 h d'incubation surtout pour les associations :  $D_4L_3C_2$ ,  $D_3L_3C_2$ ,  $D_3L_3C_1$ ,  $D_4L_2C_1$  et  $D_4L_3C_1$ .



**Tableau XIII** : Évolution de l'acidité Dornic des laits fermentés avec les cultures mixtes de bactéries lactiques en fonction du temps d'incubation à 30°C selon les rapports (1 :1 :1)

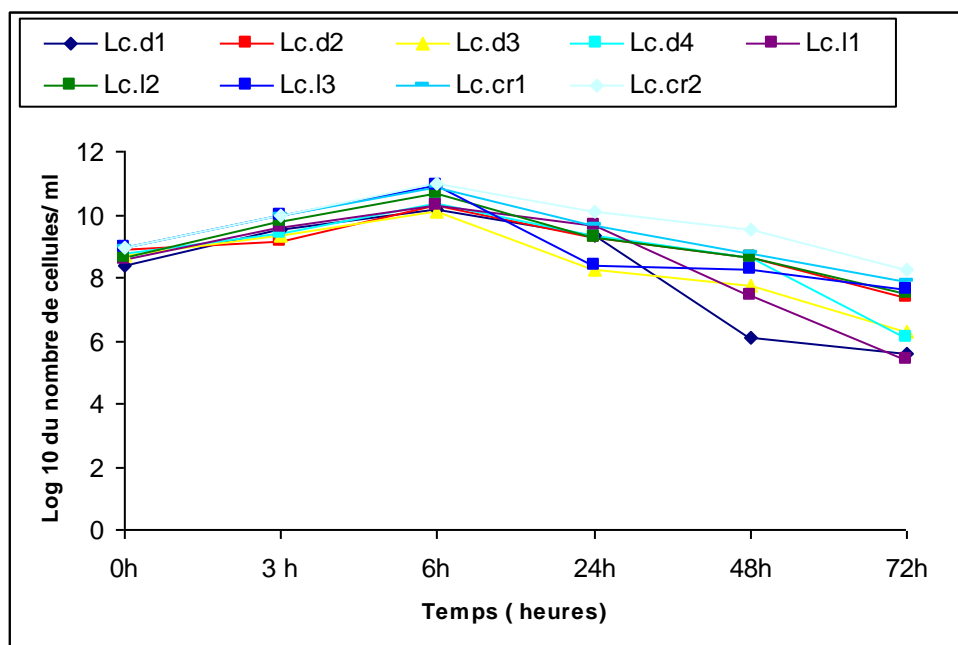
temps	3 h	6h	24h	48h	72h
Bactéries					
<i>D<sub>1</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	23	35	42	58	62
<i>D<sub>1</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	24	33	40	62	69
<i>D<sub>1</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	22	38	44	60	72
<i>D<sub>1</sub>L<sub>2</sub>C<sub>2</sub></i>	23	35	48	70	85
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	26	38	59	85	98
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	25	39	59	67	87
<i>D<sub>2</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	21	35	55	66	79
<i>D<sub>2</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	22	45	57	59	75
<i>D<sub>2</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	21	38	49	59	78
<i>D<sub>2</sub>L<sub>2</sub>C<sub>2</sub></i>	23	33	44	58	70
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	24	44	59	75	102
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	24	48	69	79	95
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	22	33	49	65	78
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	23	35	57	69	89
<i>D<sub>3</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	23	38	49	60	72
<i>D<sub>3</sub>L<sub>2</sub>C<sub>2</sub></i>	21	42	52	69	79
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	24	48	68	79	110
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	26	58	75	87	120
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	22	39	48	59	75
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	23	47	53	69	87
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	26	44	59	75	98
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>2</sub></i>	22	40	58	70	95
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	27	43	59	79	98
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	26	57	62	85	102

### 3/ Évolution de la viabilité des bactéries

#### 3.1/ Évolution de la viabilité des souches pures

La viabilité des bactéries lactiques est un critère d'évaluation de la qualité nutritionnelle dans les laits fermentés (Koïche, 2011).

Une croissance notable est enregistrée pour les cultures pures des *Lactococcus lactis*, au bout de 6 heures d'incubation à 30°C, elle atteint  $7,2 \cdot 10^{10}$ ,  $7,9 \cdot 10^{10}$  et  $8,1 \cdot 10^{10}$  cellules/ml respectivement pour *Lc.cr1*, *Lc.cr2* et *Lc.l3* (figure 13).



**Figure 13 :** Évolution de la viabilité des souches pures en fonction du temps

L'abaissement du nombre de bactéries vivantes peut être dû au taux d'acide lactique produit, car les souches de *Lactococcus lactis* sont très sensibles au bas pH. La température et la durée d'incubation peuvent également exercer un effet inhibiteur sur la croissance des souches ce qui est confirmé par les résultats d'Accolas (1979).

### **3.2 / Évolution de la viabilité des combinaisons de deux souches selon le rapport (1:1)**

La viabilité des souches en combinaison semble très importante par rapport aux cultures pures.

Le tableau XIV montre que le nombre de cellules vivantes atteint  $4,3.10^9$  cellules/ ml et  $8,5.10^9$  cellules/ ml après 3 heures d'incubation et passe à  $5,7.10^{10}$  cellules/ ml et  $4,7.10^{10}$  cellules ml après 6 heures d'incubation respectivement pour les cultures mixtes : *Lc.l3+ Lc.cr1* et *Lc.l3+ Lc.cr2*.

Pendant la deuxième phase allant de 48h d'incubation jusqu'à 72h d'incubation, on remarque une baisse de croissance qui atteint  $2,7.10^9$  cellules/ ml pour *Lc.l3+ Lc.cr2* cellules/ ml.

L'étude du phénomène de procoopération était mise en évidence par les travaux de Bouillance et Desmazeaud (1981) qui divisent la croissance des bactéries lactiques en 3 phases:

- phase de latence ;
- phase de croissance ;
- phase stationnaire remarquable stable.

La durée d'incubation conduit à un épuisement du milieu des éléments nutritifs et donc affecte d'une façon significative la viabilité des micro-organismes mais aussi neutralise l'activité de la lactase bactérienne (Savaiano *et al.*, 1984).

Cependant, cette différence de digestibilité n'a pas de traduction clinique évidente car les études n'ont pas montré de différence significative de tolérance (symptômes cliniques) au lactose (Marteau *et al.*, 1997).

## Résultats & discussion

**Tableau XIV:** Évolution de la viabilité des bactéries lactiques en cultures mixtes en fonction du temps d'incubation et à 30°C et selon les rapports (1 :1)

temps Bactéries	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d1+Lc.l1</i>	$3,4.10^8$	$9,8.10^8$	$1,2.10^9$	$1,9.10^8$	$4,3.10^7$	$3,1.10^6$
<i>Lc.d1+Lc.l2</i>	$1,5.10^8$	$1,1.10^9$	$1,9.10^9$	$3,5.10^8$	$1,2.10^8$	$8,5.10^7$
<i>Lc.d1+Lc.l3</i>	$7,2.10^8$	$1,5.10^9$	$2,1.10^9$	$4,5.10^7$	$1,3.10^7$	$6,5.10^6$
<i>Lc.d1+Lc.cr1</i>	$6,1.10^8$	$3,7.10^9$	$9.10^9$	$7,2.10^8$	$1,6.10^8$	$3,4.10^7$
<i>Lc.d1+Lc.cr2</i>	$1,9.10^8$	$2,1.10^9$	$7,2.10^9$	$4,1.10^8$	$3,9.10^7$	$1,5.10^7$
<i>Lc.d2+Lc.l1</i>	$3,7.10^8$	$1,3.10^9$	$1,6.10^9$	$4,7.10^8$	$3,3.10^7$	$1,9.10^7$
<i>Lc.d2+Lc.l2</i>	$9,3.10^8$	$1,5.10^9$	$2,3.10^9$	$7,4.10^8$	$4,1.10^7$	$9,7.10^6$
<i>Lc.d2+Lc.l3</i>	$1,5.10^8$	$2,7.10^9$	$4,1.10^9$	$5,1.10^8$	$4,2.10^7$	$1,5.10^6$
<i>Lc.d2+Lc.cr1</i>	$4,2.10^8$	$3,6.10^9$	$1,2.10^{10}$	$3,25.10^9$	$4,1.10^8$	$7,3.10^7$
<i>Lc.d2+Lc.cr2</i>	$4,9.10^8$	$9,5.10^{10}$	$1,3.10^9$	$2,8.10^8$	$7,15.10^7$	$4,5.10^6$
<i>Lc.d3+Lc.l1</i>	$1,3.10^8$	$1,9.10^9$	$3,7.10^9$	$4,7.10^8$	$7,2.10^7$	$1,7.10^6$
<i>Lc.d3+Lc.l2</i>	$2,5.10^8$	$3,5.10^9$	$9,7.10^9$	$3,7.10^8$	$5,5.10^7$	$3,5.10^6$
<i>Lc.d3+Lc.l3</i>	$2,1.10^8$	$4,7.10^9$	$9,8.10^9$	$2,8.10^8$	$6,7.10^7$	$2,6.10^6$
<i>Lc.d3+Lc.cr1</i>	$3,1.10^8$	$2,9.10^9$	$8,5.10^9$	$6,5.10^8$	$1,7.10^8$	$5,3.10^7$
<i>Lc.d3+Lc.cr2</i>	$7,0.10^8$	$9,6.10^8$	$3,7.10^9$	$5,3.10^8$	$7,53.10^7$	$5,7.10^6$
<i>Lc.d4+Lc.l1</i>	$3.10^8$	$2,7.10^9$	$6,7.10^9$	$7,5.10^8$	$3,2.10^7$	$5,3.10^6$
<i>Lc.d4+Lc.l2</i>	$4,5.10^8$	$3,9.10^9$	$2,5.10^{10}$	$4,5.10^9$	$3,7.10^8$	$9,5.10^7$
<i>Lc.d4+Lc.l3</i>	$1,3.10^8$	$1,7.10^9$	$1,5.10^{10}$	$7,5.10^9$	$3,1.10^8$	$1,6.10^7$
<i>Lc.d4+Lc.cr1</i>	$1,25.10^8$	$3,9.10^9$	$4,5.10^{10}$	$2,5.10^9$	$8,7.10^8$	$9,7.10^7$
<i>Lc.d4+Lc.cr2</i>	$2,8.10^8$	$4,1.10^9$	$5,2.10^{10}$	$3,5.10^9$	$1,3.10^9$	$5,2.10^8$
<i>Lc.l1+ Lc.cr1</i>	$4,8.10^8$	$5,1.10^9$	$1,3.10^{10}$	$7,25.10^9$	$3,3.10^8$	$1,9.10^7$
<i>Lc.l1+ Lc.cr2</i>	$5,9.10^8$	$3,9.10^9$	$9,8.10^9$	$1,2.10^9$	$7,2.10^8$	$3,2.10^7$
<i>Lc.l2+ Lc.cr1</i>	$7.10^8$	$4,5.10^9$	$3,2.10^{10}$	$3,7.10^9$	$8,2.10^8$	$7.10^7$
<i>Lc.l2+ Lc.cr2</i>	$8,5.10^8$	$7,5.10^9$	$3,5.10^{10}$	$1,3.10^{10}$	$9,5.10^9$	$1,7.10^9$
<i>Lc.l3+ Lc.cr1</i>	$3,9.10^8$	$4,3.10^9$	$5,7.10^{10}$	$4,8.10^9$	$2,7.10^9$	$7,5.10^8$
<i>Lc.l3+ Lc.cr2</i>	$4,01.10^8$	$8,5.10^9$	$4,7.10^{10}$	$9,5.10^9$	$1,8.10^9$	$9,5.10^8$

### **3.3 / Évolution de la viabilité des associations de trois souches selon le rapport (1:1:1)**

Une croissance maximale est atteinte au bout de 6 heures d'incubation arrivant à  $4,9 \cdot 10^{10}$  cellules ml pour les cultures en association de trois souches notamment pour : D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub> comme le montre le tableau XV.

L'évolution des équilibres de populations varie selon les conditions de culture (pH, température, nutriment).

Il est donc raisonnable d'attribuer cette diminution plus au moins rapide de la croissance à la diminution de l'hydrate de carbone dans ce cas le lactose dégradé dans les premières heures ainsi qu'à la sensibilité au pH due à la production d'acide lactique (Kandler et weiss, 1986).

La croissance des ferments de *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris* et *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* en cultures mixtes, des différents laits fermentés s'est montrée très importante, et nettement améliorée sous l'effet de la symbiose.

Ce résultat est conforme aux travaux antérieurs qui confirment que la coculture a un effet positif pour l'amélioration de la croissance. Les cinétiques de croissance des cultures mixtes des bactéries lactiques mésophiles présentent des caractères spécifiques essentiellement liés à la production d'un métabolite inhibiteur qui est l'acide lactique. Un certain nombre de ces caractères peut être expliqué par les connaissances acquises sur la physiologie et le métabolisme des bactéries (Deroissart et Luquet, 1994).

**Tableau XV** : Évolution de la viabilité des bactéries lactiques en cultures mixtes en fonction du temps d'incubation et à 30°C et selon les rapports (1 :1 :1)

temps \ Bactéries	0 h	3h	6h	24h	48h	72h
$D_1L_1C_1$	$2,8.10^8$	$3,1.10^9$	$2,5.10^9$	$3,5.10^9$	$3,5.10^8$	$1,5.10^7$
$D_1L_1C_2$	$4,56.10^8$	$3,7.10^9$	$4,3.10^{10}$	$2,1.10^9$	$3,1.10^8$	$2,2.10^7$
$D_1L_2C_1$	$3,5.10^8$	$4,5.10^9$	$1,2.10^{10}$	$3,6.10^9$	$1,5.10^8$	$1,1.10^7$
$D_1L_2C_2$	$1,9.10^8$	$2,5.10^9$	$8,9.10^9$	$1,5.10^8$	$3,9.10^7$	$1,5.10^7$
$D_1L_3C_1$	$1,7.10^8$	$3,7.10^9$	$6,3.10^{10}$	$1,1.10^{10}$	$4,5.10^9$	$1,6.10^8$
$D_1L_3C_2$	$2,9.10^8$	$1,9.10^9$	$3,7.10^{10}$	$2,3.10^9$	$4,5.10^8$	$9,1.10^7$
$D_2L_1C_1$	$3,1.10^8$	$3,2.10^9$	$3,1.10^{10}$	$1,3.10^9$	$2,8.10^8$	$2,3.10^7$
$D_2L_1C_2$	$2,4.10^8$	$4,1.10^9$	$1,3.10^{10}$	$2,8.10^9$	$3,5.10^8$	$1,7.10^7$
$D_2L_2C_1$	$3,2.10^8$	$1,9.10^9$	$9,5.10^9$	$3,2.10^8$	$1,7.10^7$	$7,8.10^6$
$D_2L_2C_2$	$7,2.10^8$	$2,7.10^9$	$9,8.10^9$	$3,3.10^8$	$2,5.10^7$	$1,5.10^7$
$D_2L_3C_1$	$1,9.10^8$	$4,8.10^9$	$3,5.10^{10}$	$1,3.10^9$	$3,5.10^8$	$2,9.10^7$
$D_2L_3C_2$	$2,5.10^8$	$5,6.10^9$	$4,9.10^{10}$	$9,7.10^9$	$1,3.10^9$	$2,8.10^8$
$D_3L_1C_1$	$2,8.10^8$	$6,2.10^9$	$3,1.10^{10}$	$7,2.10^9$	$4,5.10^8$	$5,3.10^7$
$D_3L_1C_2$	$3,3.10^8$	$3,5.10^9$	$1,3.10^{10}$	$6,5.10^9$	$3,7.10^8$	$6,1.10^7$
$D_3L_2C_1$	$4,2.10^8$	$1,2.10^9$	$3,5.10^{10}$	$7,8.10^9$	$4,5.10^8$	$1,2.10^7$
$D_3L_2C_2$	$1,9.10^8$	$3,5.10^9$	$1,9.10^{10}$	$3,2.10^9$	$2,3.10^8$	$7,5.10^7$
$D_3L_3C_1$	$3,5.10^8$	$6,5.10^9$	$5,1.10^{10}$	$9,2.10^9$	$1,1.10^9$	$3,5.10^8$
$D_3L_3C_2$	$5,3.10^8$	$7,5.10^9$	$6,2.10^{10}$	$5,3.10^9$	$3,3.10^8$	$1,9.10^7$
$D_4L_1C_1$	$1,5.10^8$	$4,1.10^9$	$2,1.10^{10}$	$1,5.10^9$	$3,5.10^8$	$6,5.10^7$
$D_4L_1C_2$	$2,3.10^8$	$3,3.10^9$	$2,5.10^{10}$	$5,4.10^9$	$1,5.10^8$	$2,3.10^7$
$D_4L_2C_1$	$2,5.10^8$	$8,5.10^9$	$4,2.10^{10}$	$1,5.10^{10}$	$07,5.10^9$	$5,5.10^8$
$D_4L_2C_2$	$3,7.10^8$	$6,5.10^9$	$4,5.10^{10}$	$1,3.10^{10}$	$7,2.10^9$	$5,5.10^8$
$D_4L_3C_1$	$1,9.10^8$	$1,8.10^9$	$3,9.10^{10}$	$3,5.10^9$	$1,2.10^9$	$7,5.10^8$
$D_4L_3C_2$	$3,5.10^8$	$2,5.10^9$	$4,9.10^{10}$	$9,8.10^9$	$1,3.10^9$	$9,7.10^8$

## **Partie II : Etude de la survie des Lactocoques mésophiles dans les conditions extrême du tube digestif**

La résistance aux hostilités digestives (acidité gastrique et sels biliaries) constitue un caractère important de sélection des souches probiotiques car elle conditionne le transit et/ ou la colonisation du tube digestif par ces microorganismes (Pereira et Gibson, 2002).

La survie de ces souches aux conditions drastiques du tube digestif représente par conséquent, un objectif de cette utilisation de microorganisme comme probiotiques ( Rallu, 1999).

En général, les bactéries lactiques en culture isolées ou en associations montrent une variation importante à pousser dans un milieu synthétique en présence d'acide et de sels biliaries (Dilmi-Bouras, 1991).

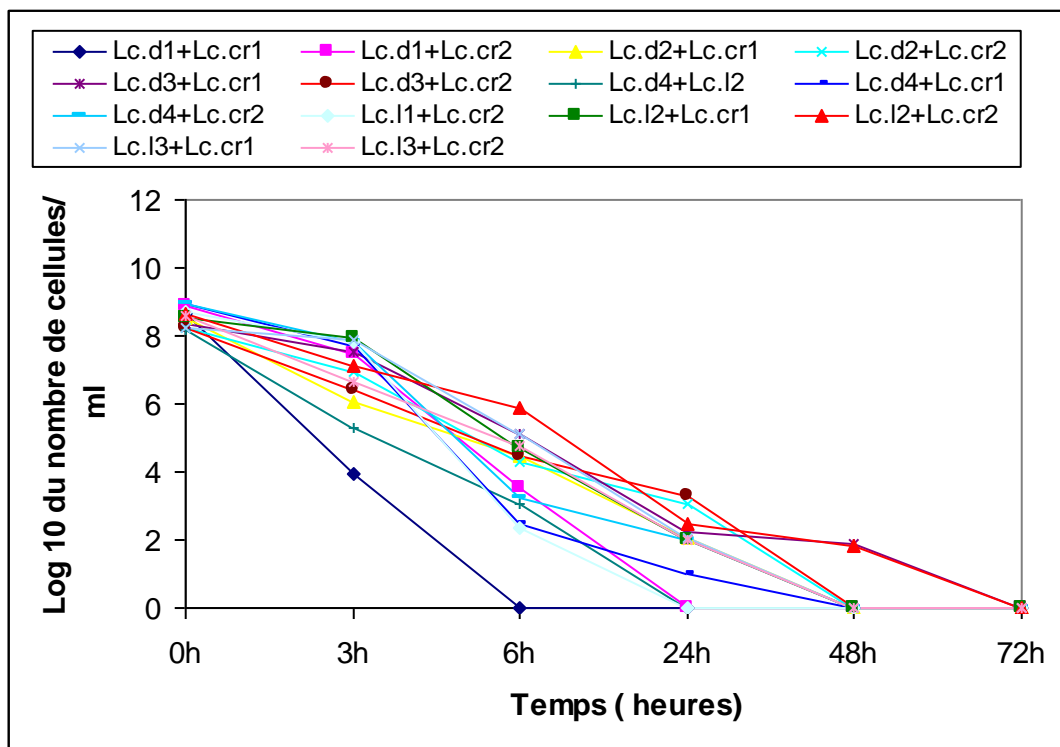
Pour la partie survie, c'est uniquement les bactéries ayant une bonne dégradation du lactose qui sont maintenues pour cette étude, à cet effet nous avons choisi les combinaisons ci-dessous :

<i>Lc.d1+Lc.cr1</i>	<i>Lc.d3+Lc.cr2</i>	<i>Lc.l2+Lc.cr1</i>	<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>
<i>Lc.d1+Lc.cr2</i>	<i>Lc.d4+Lc.l2</i>	<i>Lc.l2+Lc.cr2</i>	<i>D<sub>2</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>
<i>Lc.d2+Lc.cr1</i>	<i>Lc.d4+Lc.cr1</i>	<i>Lc.l3+Lc.cr1</i>	<i>D<sub>2</sub>L<sub>2</sub>C<sub>2</sub></i>	<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>2</sub></i>
<i>Lc.d2+Lc.cr2</i>	<i>Lc.d4+Lc.cr2</i>	<i>Lc.l3+Lc.cr2</i>	<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>
<i>Lc.d3+Lc.cr1</i>	<i>Lc.l1+Lc.cr2</i>	<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>

*1/ Survie des cultures mixtes des souches de Lactococcus lactis à pH 2,5 en absence des sels biliaries*

**1.1/ Survie des combinaisons de deux souches selon le rapport ( 1 :1) à pH 2,5 en absence de sels biliaries**

En milieu très acide (pH 2,5), les souches de *Lactococcus lactis* en cultures mixtes présentent une sensibilité variable car certaines ont disparu au bout de 6 heures d'incubation telle que la culture : *Lc.d1+Lc.cr1*, alors que les deux combinaisons *Lc.l3+Lc.cr1* et *Lc.l3+Lc.cr2* ont montré une résistance significative après 24 heures d'incubation et persistent avec des charges moyenne de  $1,02.10^2$  cellules/ ml comme le montre la figure 14.



**Figure 14 :** Évolution de la survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 :1) à pH 2,5 en absence de sels biliaries.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Clark et Martin (1993) qui trouvent que seulement 0,01% d'inoculum de dix souches de bactéries lactiques



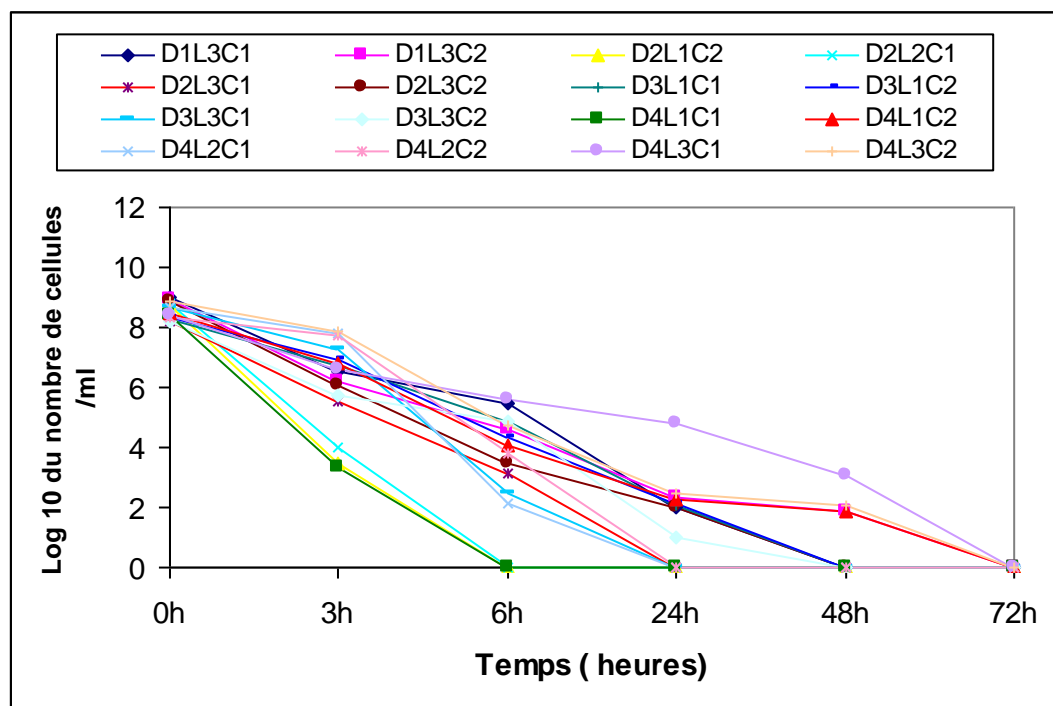
exposées à l'effet de l'acidité à pH 1, plus ou moins importante à pH 2 ont persisté après 6 heures d'incubation.

Chez *Lacococcus lactis* la baisse du pH extracellulaire est responsable d'une diminution de l'activité de certaines enzymes sensibles aux bas pH, et en particulier les enzymes glycolytiques dont la  $\beta$ -galactosidase, ce qui a pour conséquence une baisse de la production d'ATP (Presser *et al.*, 1997).

**1.2/ Survie des associations de trois souches selon le rapport (1:1:1) à pH 2,5 en absence de sels biliaires**

À pH 2,5 et selon la figure 15, presque la totalité des cultures en association présente une masse moyenne de  $10^7$  cellules/ ml après 3 heures d'incubation.

Toute fois après 6 heures d'incubation nous avons remarqué une diminution remarquable dans la biomasse des bactéries, une meilleure croissance est enregistrée par les associations  $D_4L_3C_1$  où le nombre de cellule est de  $3,80 \cdot 10^5$  par ml diminuant à  $1,2 \cdot 10^3$  cellules/ ml après 48 heures d'incubation, la croissance est nulle pour les autres associations.



**Figure 15 :** Évolution de la survie des associations de trois souches selon le rapport (1 : 1 : 1) à pH 2,5 en absence de sels biliaires.

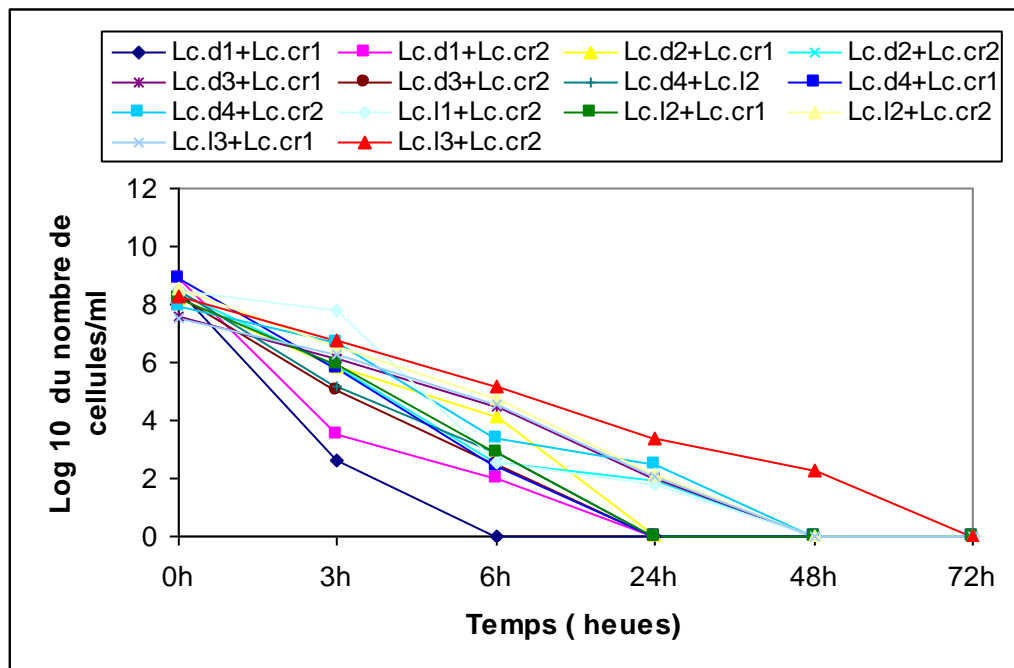
La sécrétion acide constitue le premier mécanisme de défense contre la majorité des microorganismes ; des travaux *in vitro*, ont permis d'étudier la résistance de certaines bactéries lactiques à l'acidité (Arrigoni et *al.*, 1994).

Rallu (1999) a montré que l'espèce de *Lactococcus lactis* ne survit pas à une acidification brutale du milieu, par contre, cette survie peut être améliorée par une phase d'adaptation ou par l'introduction des Lactocoques dans un aliment (lait fermenté) qui va jouer un rôle de transporteur d'une part, et d'un tampon de pH d'autre part. Le lait fermenté augmente le pH de l'estomac à des niveaux supérieurs à 4, ce qui aide certaines souches à traverser cette barrière pour atteindre le duodénum.

## ***2/ Survie des cultures mixtes des souches de *Lactococcus lactis* à pH 2,5 en présence de sels biliaires***

### **2.1/ Survie des combinaisons de deux souches selon le rapport ( 1 :1) à pH 2,5 en présence de sels biliaires**

En milieu très acide additionné de 0,3% des sels biliaires on remarque une disparition de la croissance cellulaire au bout de 24 heures d'incubation sauf pour certaines combinaisons, où une charge maximale est obtenue par les cultures *Lc.l3+Lc.cr1* et *Lc.l3+Lc.cr2* , avec des concentrations cellulaires respectives de  $3,5 \cdot 10^4$  cellules/ml et  $1,51 \cdot 10^5$  cellules/ ml , ensuite on remarque une disparition totale de la biomasse de *Lc.d1+Lc.cr1* après 6h d'incubation (figure 16).



**Figure 16 :** Évolution de la survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 :1) à pH 2,5 en présence de 0,3% de sels biliaires.

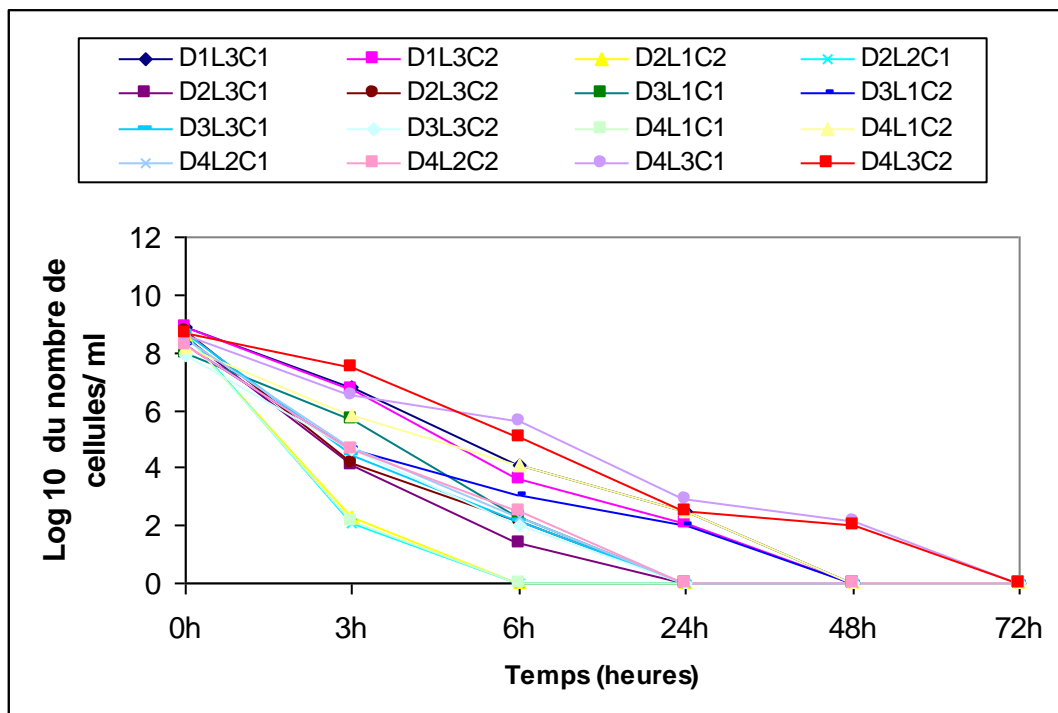
Jin et al. (1998) avaient isolé des souches de Lactobacilles à partir de l'intestin des volailles et ont montré leur tolérance vis-à-vis de 0,3% de bile et un taux de survie modérée à pH 2.

De même Dilmi-Bouras et Sadoun (2002) montrent que les pH trop bas (1,2 et 2,1) influencent négativement sur la croissance des ferments du yaourts.

Il faut souligner que les modèles utilisés *in vitro* pour étudier la survie des souches probiotiques vis-à-vis de l'acidité révèlent beaucoup de contradiction. Par exemple, en utilisant un modèle dynamique de l'estomac et de l'intestin Marteau et al. (1997) ont démontré que l'exposition prolongée à l'acidité gastrique exerce un effet inhibiteur drastique sur la majorité des souches probiotiques.

**2.2/ Survie des associations de trois souches selon le rapport ( 1 :1 :1) à pH 2,5 en présence de sels biliaires**

Les associations  $D_4L_3C_1$  et  $D_4L_3C_2$  montrent une persistance jusqu'à 48 heures d'incubation, après 6 heures d'incubation les charges bactériennes étaient respectivement de  $4,5 \cdot 10^5$  et  $1,08 \cdot 10^5$  cellules/ ml. Alors qu'on remarque une croissance nulle après 6 heures d'incubation pour les associations  $D_1L_3C_2$  et  $D_2L_1C_2$  (figure 17).



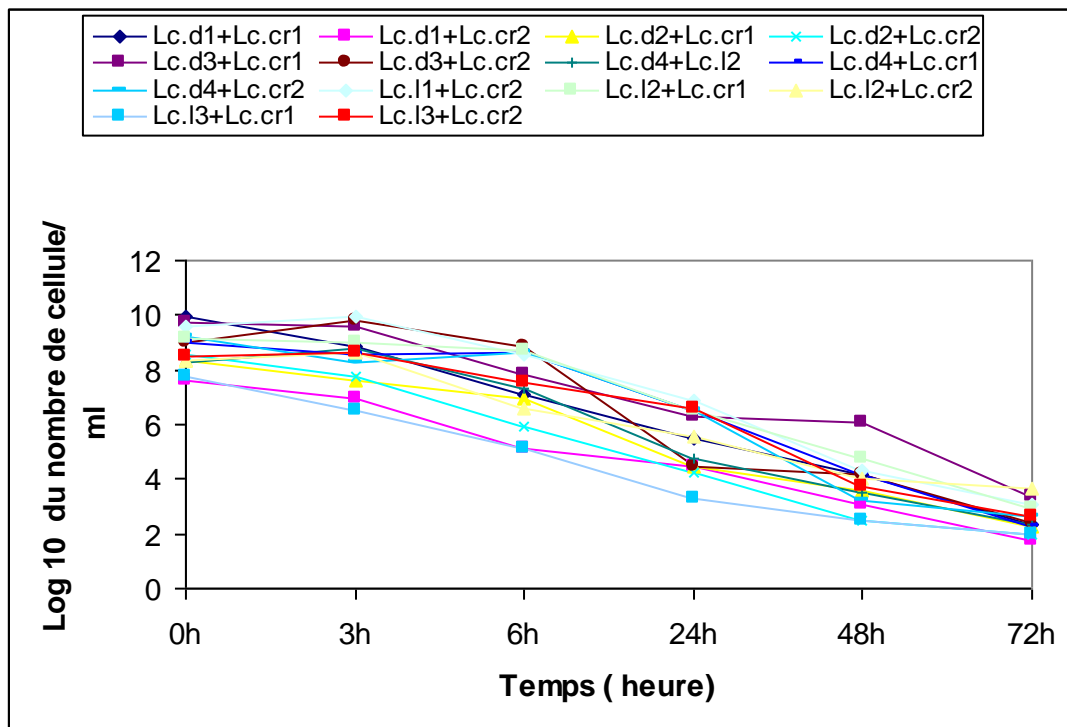
**Figure 17 :** Évolution de la survie des associations de trois souches selon le rapport (1 :1 :1) à pH 2,5 en présence de 0,3% de sels biliaires.

Les Lactocoques mésophiles peuvent développer une réponse adaptative au stress acide, cette réponse est en stricte relation avec des protéines spécifiques responsable au maintien du pH intracellulaire à des valeurs approximatives du pH extracellulaire (Harke et al., 1996).

3/ *Survie des cultures mixtes des souches de Lactococcus lactis à pH 4,3 en absence de sels biliaries*

**3.1/ Survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 :1) à pH 4,3 en absence de sels biliaries**

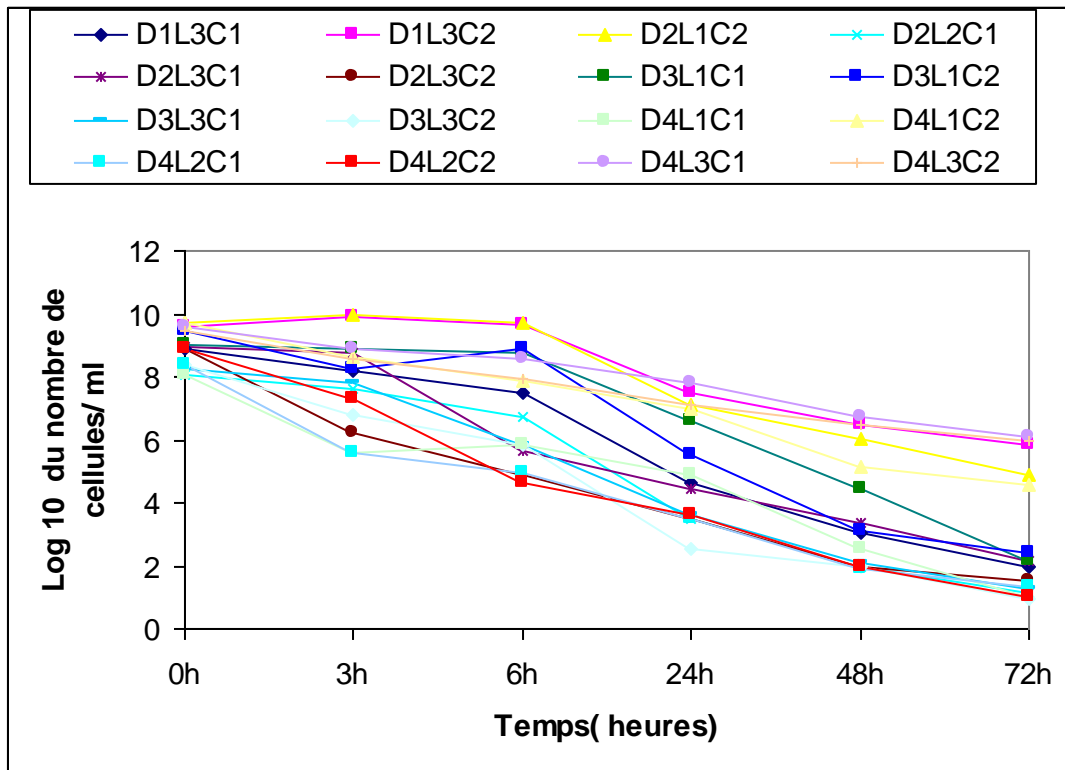
Le pH 4.3, contrairement au pH de l'estomac, semble plus tolérable par les souches lactiques, en effet après 6 heures d'incubation une charge moyenne de  $10^8$  cellules/ ml est atteinte pour les combinaisons *Lc.d3+Lc.cr2*, *Lc.d4+Lc.cr1*, *Lc.d4+Lc.cr2* et *Lc.l1+Lc.cr2*. Par la suite nous avons assisté à une diminution progressive au-delà de 72 heures d'incubation (figure 18).



**Figure 18 :** Évolution de la survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 :1) à pH 4.3 en absence de sels biliaries.

**3.2/ Survie des associations de trois souches selon le rapport ( 1 :1 :1) à pH 4,3 en absence de sels biliaires**

En cultures mixtes de trois souches de *Lactococcus lactis* nous avons constaté une amélioration notable de croissance pour les cultures en association arrivant respectivement à  $4,70.10^9$  cellules/ ml et  $5,31.10^9$  cellules/ ml pour les cultures  $D_1L_3C_2$  et  $D_2L_1C_2$  après 6 heures d'incubation comme la montre la figure 19.



**Figure 19 :** Évolution de la survie des associations de trois souches selon le rapport (1 :1 :1) à pH 4,3 en absence de sels biliaires.

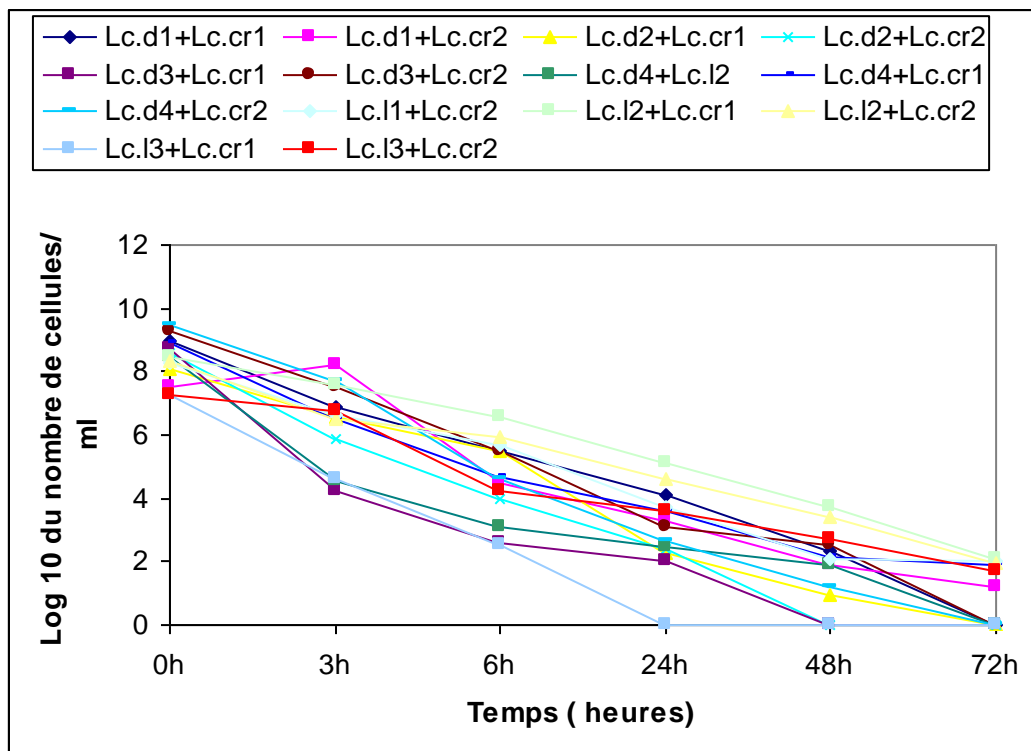
Dans ce contexte, Kim et Dunn (1999) ont montré que des souches de *Lactococcus lactis* peuvent avoir un taux de survie important après incubation de 30 min à pH 4,5.

En plus, la décarboxylation des acides et la présence des antiports électrogéniques chez les bactéries lactiques les aident à contrecarrer la baisse de pH intracellulaire ; ce système fonctionne chez *Lactococcus lactis* dans le cas de glutamate , le pH optimum de la glutamate décarboxylase est 4,7 (Sanders et al., 1999).

4/ *Survie des cultures mixtes des souches de Lactococcus lactis à pH 4,3 en présence de sels biliaries*

4.1/ Survie des combinaison de deux souches selon le rapport ( 1 :1) à pH 4,3 en présence de sels biliaries

Après addition de 0,3% de sels biliaries nous avons signalé un taux très faible de croissance notamment pour les combinaisons bactérienne: *Lc.d3+Lc.cr2*, *Lc.d4+Lc.l2*, *Lc.d4+Lc.cr1*, *Lc.l2+Lc.cr1* et *Lc.l2+Lc.cr2* qui survivent avec une charge moyenne de  $10^3$  cellules/ ml après 48 heures d'incubation, tandis qu'elle était nulle pour le reste des combinaisons (figure 20).



**Figure 20** : Évolution de la survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 :1) à pH 4,3 en présence de 0,3% de sels biliaries.

Selon Charteris et *al.*(1998), les mécanismes de résistance des bactéries lactiques aux sels biliaires restent jusqu'à présent inconnus.

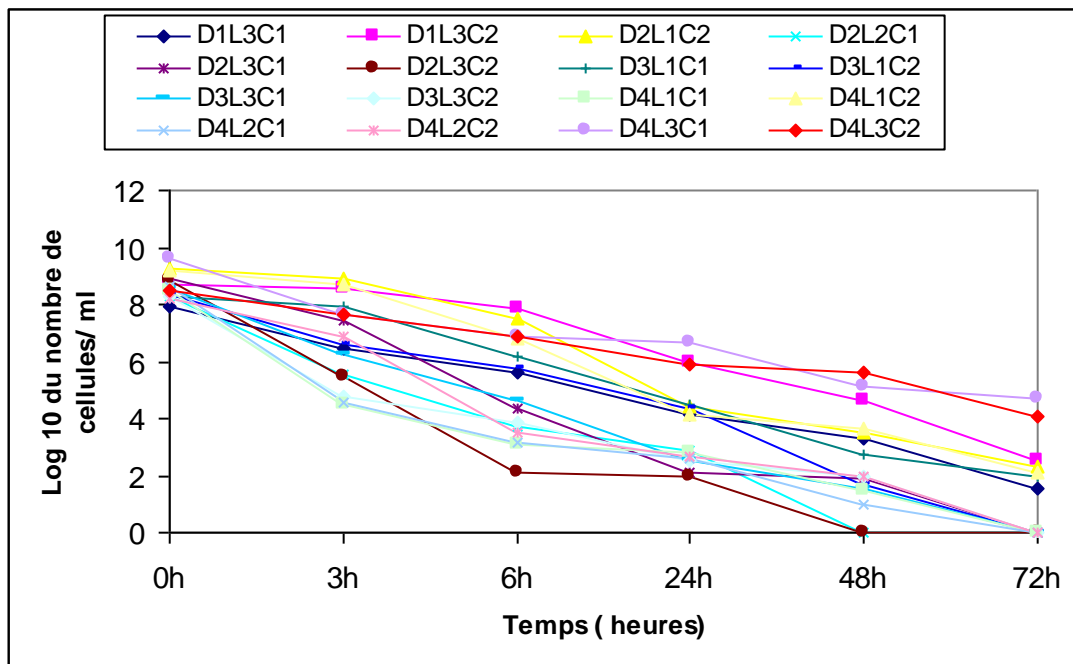
Cependant, Even et *al.* (2002) ont montré que le matériel génétique des espèces de *Lactococcus lactis* joue un rôle très important dans leur résistance aux changements des conditions environnementales tels que les sels biliaires où plusieurs mécanismes interviennent dont les plus importants sont :

- l'activité de l'ATP ase qui contribue à l'homéostasie du pH grâce à un échange de cations convertissant un potentiel transmembranaire en gradient de pH.
- Le deuxième mécanisme de lutte contre l'acidification du milieu est la production de composés basiques en particulier l'ammoniac qui est produit par les différentes espèces du genre *Lactococcus lactis* suivant la voie d'arginine déiminase ( ADI) qui implique des enzymes actives à pH 2 et 3 et assure la conversion de l'arginine en ornithine, ammoniac, CO<sub>2</sub> et permet la production de l'ATP, l'ammoniac ainsi produit va réagir avec des protons permettant l'alcalinisation du cytoplasme et l'ATP générée pourra être utilisée par l'ATP ase F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> pour l'expulsion des protons ( Sanders et *al.*, 1999).

#### **4.2/ Survie des associations de trois souches selon le rapport ( 1 :1 :1) à pH 4,3 et en présence de sels biliaires**

Pour les associations de trois souches de *Lactococcus lactis* l'addition de 0,3% de sels biliaires semble à peu d'effet, car une biomasse maximale respectivement de  $8,25 \cdot 10^6$ ,  $7,87 \cdot 10^6$  cellules/ml est obtenue après de 6 heures d'incubation à 37°C pour les associations *D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub>* et *D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub>* (figure 21).





**Figure 21 :** Évolution de la survie des associations de trois souches selon le rapport (1 :1 :1) à pH 4,3 en présence de 0,3% de sels biliaries

Toutefois, plusieurs travaux ont montré la possibilité de persistance de *Lactococcus lactis in vitro* ce qui confirme nos résultats ainsi que chez l'homme ou chez l'animal en présence des sels biliaries (Grahn *et al.*, 1994., Schlundt *et al.*, 1994., Klijn *et al.*, 1995).

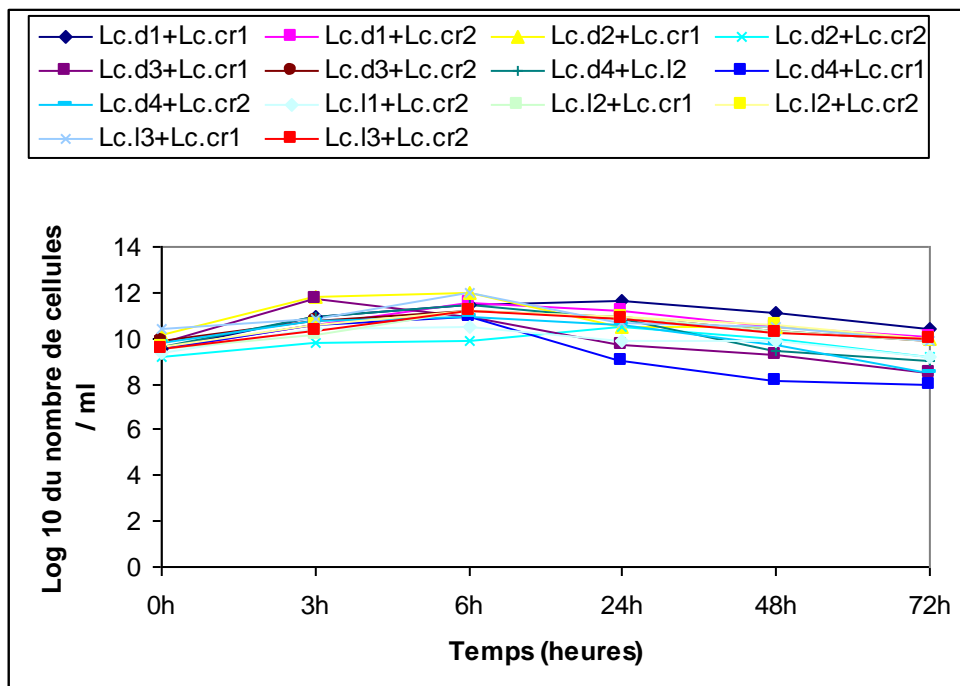
L'addition de 0,3% de sels biliaries à pH 4,3 a modifié le comportement des souches en cultures mixtes, en fonction de leur résistance, nous avons remarqué deux groupes :

- Le premier groupe comporte  $D_4L_3C_1$ ,  $D_4L_3C_2$ ,  $Lc.l_2+Lc.cr_1$ ,  $Lc.d_1+Lc.cr_1$  et  $Lc.l_2+Lc.cr_2$  qui ont révélé une résistance avec des charges bactériennes qui se situent entre  $8,25 \cdot 10^6$  et  $3,25 \cdot 10^5$  cellules/ ml après 6 heures d'incubation ;
- Le deuxième groupe comporte le reste des associations qui ont montré une faible résistance dès les 24 heures d'incubation comme  $Lc.l_3+Lc.cr_1$ .

5/ *Survie des cultures mixtes des souches de Lactococcus lactis à pH 6,5 en absence des sels biliaries*

5.1/ Survie des combinaisons de deux souches selon le rapport ( 1 :1 ) à pH 6,5 en absence de sels biliaries

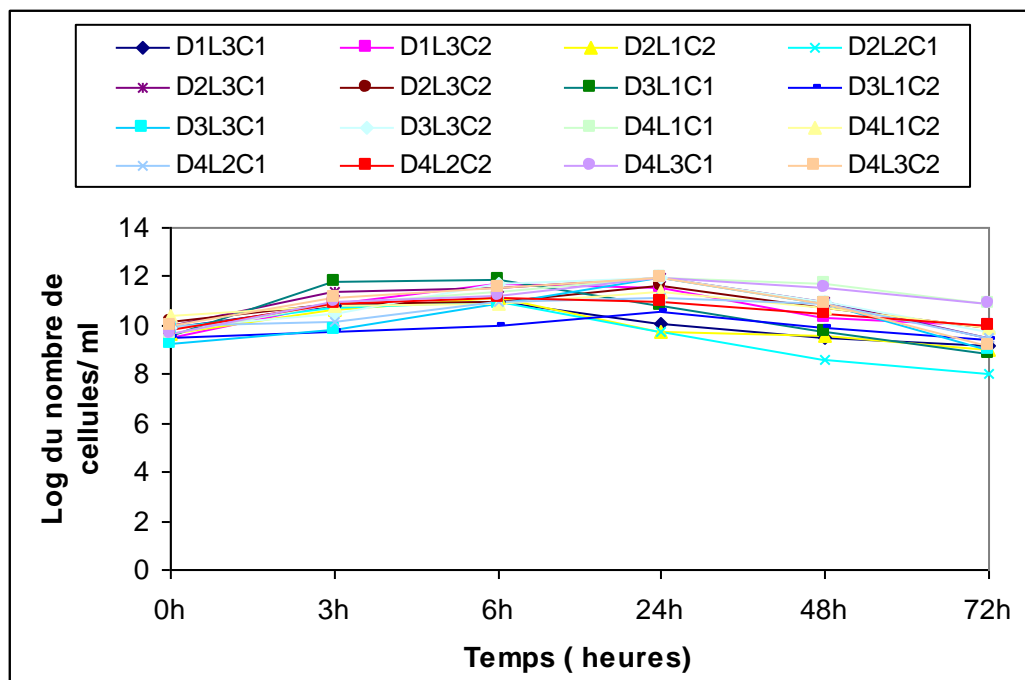
À ce pH, les différentes cultures ont montré une croissance très importante et des charges bactériennes avec une moyenne de  $10^{11}$  cellules/ ml, qui augmentent avec le temps d'incubation. Une valeur maximale atteinte était de  $9,85 \cdot 10^{11}$  cellules/ ml pour la combinaison *Lc.d2+Lc.cr1* après 6 heures d'incubation (figure 22).



**Figure 22 :** Évolution de la survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 :1) à pH 6,5 en absence de sels biliaries.

**5.2 / Survie des associations de trois souches selon le rapport ( 1 :1 :1) à pH 6,5 en absence de sels biliaries**

Une croissance maximale de  $3,51.10^{11}$  cellules/ ml et  $5,85.10^{11}$  cellules/ml est atteinte respectivement pour les associations :  $D_4L_3C_2$  et  $D_3L_3C_2$  après 6 heures d'incubation (figure 23).

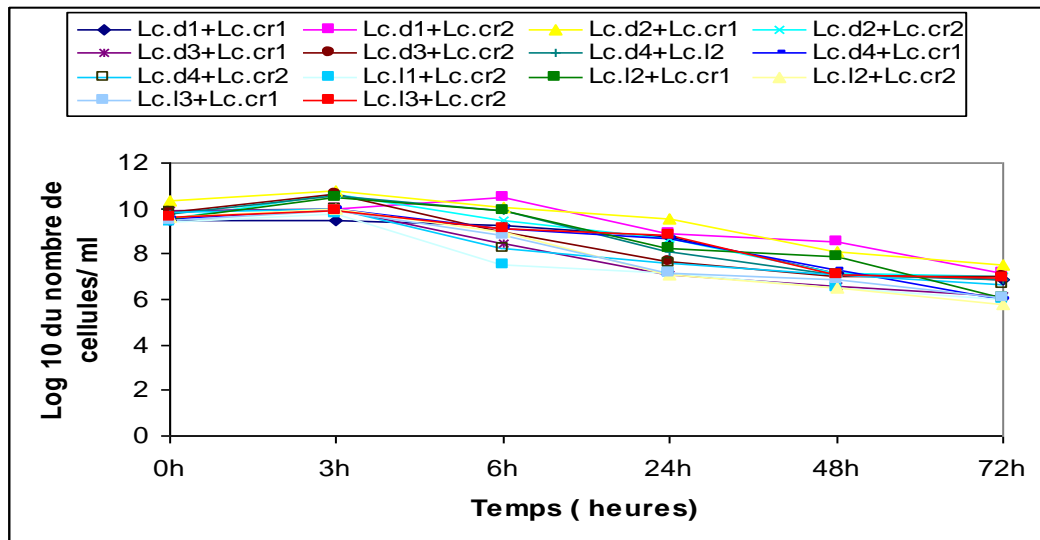


**Figure 23 :** Évolution de la survie des associations de trois souches selon le rapport (1 :1 :1) à pH 6,5 en absence de sels biliaries.

**6/ *Survie des cultures mixtes des souches de Lactococcus lactis à pH 6,5 en présence de sels biliaries***

**6.1/ Survie des combinaisons de deux souches selon le rapport ( 1 :1 ) à pH 6,5 en présence de sels biliaries**

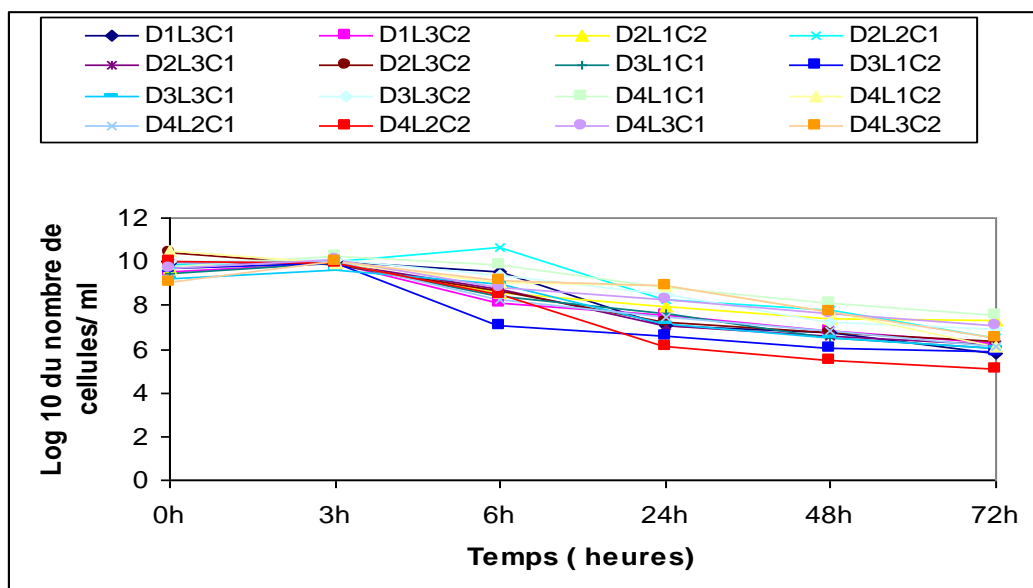
L'addition de 0,3% de sels biliaries n'a pas influencé le comportement des cultures du fait que la biomasse enregistrée après 24 h d'incubation, par exemple était de  $5,85.10^8$  cellules/ ml et  $3,4.10^9$  cellules/ ml respectivement pour les cultures  $Lc.d1+Lc.cr1$  et  $Lc.d2+Lc.cr1$  comme le montre la figure 24 .



**Figure 24 :** Évolution de la survie des combinaisons de deux souches selon le rapport (1 : 1) à pH 6,5 en présence de 0,3% de sels biliaries.

**6.2/ Survie des associations de trois souches selon le rapport ( 1 : 1 : 1) à pH 6,5 en présence de sels biliaries**

Les charges bactériennes restent importantes même après l’addition des sels biliaries avec une valeur moyenne de  $10^9$  cellules/ ml, par exemple une valeur maximale de  $7,2 \cdot 10^9$  cellules /ml est enregistrée pour l’association D4L1C1 après 6 h d’incubation (figure 25).



**Figure 25 :** Évolution de la survie des associations de trois souches selon le rapport (1 : 1 : 1) à pH 6,5 en présence de 0,3% de sels biliaries.

- La concentration des lactocoques à pH 6,5 est très importante car c'est le pH optimale de l'ATP ase, cette dernière fonctionne chez les espèce de *Lactococcus lactis* à des pH proches de la neutralité (entre 6,5 et 7,5) (Garriges et al., 1998) et c'est le cas de nos association bactériennes.
- La régression du nombre de bactéries de *Lactococcus lactis* au cours du temps est due à l'épuisement des éléments nutritifs dans le bouillon de croissance M17 aux périodes importantes d'incubation (72h, 96h ) (Beecher et al., 2009).
- Les sels biliaries ont un effet bactéricide vis-à-vis des bactéries Gram positif en jouant le rôle d'un détergent sur les membranes cellulaires ; mais les bactéries lactiques généralement ( Dilmi-Bouras, 1991) et les lactocoques mésophiles spécialement ( Corthier et Drouaunt, 2001) ont des comportements variables vis-à-vis des sels biliaries surtout à différents pH.

\*Le groupes des cultures mixtes ayant montré une résistance significative après 3 h d'incubation dans les différentes conditions expérimentales (pH 2,5, 3,4 et 6,5 sans sels biliaries et en présence de sels biliaries est le suivant :  $D_4L_3C_1$ ,  $D_4L_3C_2$ ,  $D_3L_1C_1$ ,  $Lc.l3+Lc.cr2$ , les bactéries qui survivent dans les condition *in vitro* d'acidité et sels biliaries continuent à sécréter une  $\beta$ -galactosidase durant le transit intestinale (Drouault et al.,2002).

\*Les résultats trouvés nous permettent de dire que les différentes cultures de *Lactococcus lactis* possèdent des variations plus ou moins importantes dans la résistance vis à vis des pH bas en présence et en absence des sels biliaries. Cette conclusion corrobore les résultats trouvés par Dilmi-Bouras (1991, 2002) et Dilmi-Bouras et Koïche (2010) qui montrent que les bactéries lactiques en cultures isolées ou en association montrent des variations importantes à pousser dans le milieu synthétique en présence ou en absence d'acide et des sels biliaries.

Selon Cerf-Bensussan (2002) et Mater *et al.* (2006), les résultats des expériences *in vitro* et *in vivo* sur des souris montrent que *Lactococcus lactis* survit dans l'intestin grêle et qu'il y exprime une  $\beta$ -galactosidase active ce qui donne une signification de nos résultats de la survie *in vitro* à pH 6,5 en présence et en absence de sels biliaires .

Il est à souligner que c'est dans l'intestin grêle que l'activité lactasique est primordiale car si le lactose n'est pas digéré dans cette partie de l'intestin il parvient au côlon où sa fermentation est à l'origine des troubles associés à sa maldigestion. Ces résultats confortent par ailleurs l'idée qu'un produit laitier contenant un probiotique doté de  $\beta$ -galactosidase pourrait être toléré par les personnes dont l'activité lactasique est déficiente ( Smits *et al.*, 2005).

Des nombreux travaux ont montré que la lactase de certaines bactéries lactiques, participait *in situ* dans l'intestin à l'hydrolyse du lactose (étape de digestion partiellement prise en défaut chez de nombreux adultes qui peuvent alors souffrir de symptômes dits « d'intolérance au lactose ». La digestibilité du lactose des laits fermentés peut aller jusqu'à 90% de la charge (Marteau *et al.*, 1990 ).

La lactase du lait fermenté serait protégée de l'acidité gastrique et libérée dans le duodénum sous l'action des acides biliaires aboutissant à une digestibilité significative du lactose (Savaiano *et al.*, 1984., Marteau *et al.*, 1990., Varela-Moreiras *et al.*, 1992., Rizkalla *et al.*, 2000).

Les résultats de la survie montrent que *Lactococcus lactis* est largement utilisée comme bactérie modèle pour délivrer des molécules d'intérêt thérapeutique dans le tube digestif (Mercenier *et al.*, 2000., Bermudez-Humaran *et al.*, 2002., Drouault *et al.*, 2002).

Vesa *et al.* (2000 a) ont suivi *in vitro* et *in vivo* le devenir de la souche de *Lactococcus lactis* au niveau iléal après une seule prise de lait fermenté. La bactérie apparaissait entre 1 et 3 heures après ingestion avec une concentration maximale. La quantité totale de cellules récupérées correspondait à 1 % des bactéries ingérées.

La concentration de *Lactococcus lactis* en transit diminuait beaucoup plus rapidement que celle du marqueur. La survie fécale de *Lactococcus lactis* a été étudiée pour une autre souche. Après consommation pendant 4 jours par 4 volontaires de  $10^{11}$  UFC dans du lait frais, 1 % des bactéries ingérées étaient récupérées dans les fèces (Klijn *et al.*, 1995).

# ***CONCLUSION***



## CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude sont résumés dans les points suivants :

- Des cultures mixtes des trois souches (*Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris* et *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*) notamment (*Lc.d1+Lc.cr1*,  $D_2L_1C_2$ ,  $D_2L_2C_1$ ,  $D_2L_2C_1$ ,  $D_3L_3C_1$ ,  $D_3L_3C_2$ ) qui présentent des taux moyen de dégradation du lactose supérieur à 86% après 6 heures d'incubation et 100% après 72 heures d'incubation à 37°C, mais ces dernières n'ont montré aucune résistance au pH acide et à la concentration 0,3% de sels biliaires car on a marqué une disparition totale de la charge bactérienne après 6 heures d'incubation à pH 2,5 en absence et en présence des sels biliaires.
- Par contre aux premières cultures, pour les deux associations  $D_4L_3C_1$  et  $D_4L_3C_2$  on note une dégradation de lactose à des pourcentage moyenne de 83% après 6 heures d'incubation et 100% après 72 heures d'incubation, une acidité Dornic supérieure à 100°D et une meilleur viabilité qui atteint  $10^7$  après 24 heures d'incubation à 37°C. Aussi, les deux associations peuvent résister au pH bas et à la concentration 0,3% de sels biliaires.

Donc d'après les résultats de la dégradation du lactose et de la survie *in vitro* on peut choisir deux associations  $D_4L_3C_1$  et  $D_4L_3C_2$  comme des cultures bactériennes modèles pour délivrer des molécules à effet probiotiques et d'intérêt thérapeutique sur le tube digestif dans des laits fermentés ou des fromages spécifiques.

En perspective, les expériences *in vivo* sur animal ou homme peuvent montrer l'effet clairement.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABSOLONNE J. (1989). Le yaourt : adaptation aux objectifs nutritionnels In "Lait fermentés : Actualité de la recherche ". *John Libbey eurotext. itd*, 153-159.

ACCOLAS J.P., BLOQUEOL R., DIDIENNE R. et REAGINIER J. (1977). Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt, *Le lait*, 1(23) : 561-562.

ACCOLAS J.P. (1979). Les levains thermophiles : propriétés et comportement en technologie laitière. *Congrès International : Microbiologie alimentaire*.

ADOLFSSON O., MEYDANI S.N., AND RUSSELL R.M. (2004). Yogurt and gut function. *Am. J. Clin Nutr* , 80: 245-256.

ADRIAN J. et LEPEN C.M. (1987). Lait : matière première de l'industrie laitière. Ed. *Tec. Et Doc., Lavoisier, Paris*, 256P.

ALLAL L. (2010). Essai d'isolement et d'identification des bactéries lactiques à partir de lait de vaches, brebis et de chèvre. *Mémoire de Master*. UHB, Chlef, 38 P

ALM, L. (2002). Lactose intolerance. In H. Roginsky, J. W. Fuquay, et P. F. Fox (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences*. London, UK: *Academic Press*: 1533–1537.

ALSTON MILLS B.P. (1995). Comparative analysis of milks for human consumption. In : *Hand book of milk composition*. Acad. Press, New York: 828-834.

AMIOT J., FOURNIER S., LEBEUF Y., PAQUIN P., SIMPSON R. (2002). Composition, propriétés physicochimique et techniques d'analyse du lait. In : *Science et technologie du lait, transformation du lait*. Ed .*Presse internationale polytechnique fondation de technologie laitière du Quebec*, INC Montréal, Canada, 324P.

ANTOINE, J.M ., FRIPPIAT, A.F .(1986). Le yoghourt : *Nutrition et santé*, Ed. Druco, Halle- Belgique, 21-23.

ARRIGONI E., MARTEAU P., BRIET F., POCHART P., RAMBAUD J.C., MESSING B. (1994). Tolerance and absorption of lactose from milk and yoghurt during short bowel syndrome in man, *Am. J. Clin. Nutr.* 60 : 926-929.

BEECHER C, DALY M, BERRY DP, *et al.* (2009). Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 and IL-8 gene expression. *J. Dairy Res.* 76: 340-348.

BERMUDEZ-HUMARAN L.G., LANGELLA P., MIYOSHI A., GRUSS A., GUERRA R.T., MONTES DE OCA-LUNA R., *et* LE LOIR, Y. (2002). Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 :917-922.

BESNIER M.O., BOURLIOUX P., FOURNIAT J., DUCLUZEAU R., AUMAITRE A. (1983). Influence de l'ingestion de yogurt sur l'activité lactasique intestinale chez des souris axéniques ou holoxéniques, *Ann. Microbiol. Paris* A 134 : 219-230.

BISSETTE D.L., ANDERSON R.L. (1974). Lactose and D-galactose metabolism in group N streptococci : presence of enzymes for both the D-galactose 1-phosphate and D-tagatose 6- phosphate pathways. *J. Bacteriol.* 117: 318.320.

BOUDRAA G., TOUHAMI M., POCHART P., MARY J.Y., DESJEUX J.F. (1990). Effect of feeding yogurt versus milk in children with persistent diarrhea, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 11 : 509-512.

BOUILLANNE C. *et* DESMAZEAUD M.J. (1981). Classement de souches de *Lb. bulgaricus* selon quelques caractères utilisés en fabrication du yogurt. *Sciences des aliments*, 1 : 7-17.

BOURGEOIS C.M., MESCLE J.F. *et* ZUCCA J. (1996). Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. *Techniques et documentation Lavoisier*. Paris.

BRADLY R. L., ANOLD E. et BARBANO D. M. (1992). Chemical and physical methods In: Standard methods for the examinations of dairy products. *Ed. Marshal*: 433-531.

BRITTEN M. (2002). Ingrédients laitiers. In : Sciences et technologie du lait, transformation du lait. *Presse polytech.* Fondation de thecnologie laitière du Quebec INC. Montréal, Canada, 145P.

BRÛSSOW H. (2001). Bactéries lactiques mésophiles. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55 : 283-303.

CERF-BENSUSSAN N. (2002). Un nouvel éclairage sur le rôle direct des bactéries lactiques vivantes dans la digestion du lactose. *Yaourts Laites Fermentés*, Lettre n°8, Editorial p.1.

CHAMPAGNE C.P., MOINEAU S., LANGE M., GELINAS P. et AUDET P. (2000). Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. Ed. Fondation des Gouverneurs, 210p.

CHARTERIS W.P., KELLYP.M. MORELLI L. et COLLINS J.K. (1998). Develloppement and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbio*, 84 : 759-768.

CARPER S. (1995). Milk is not for every body. Fact of file, Newyork, 56.

CLARK P.A. et MARTIN J.H. (1993). Survival of bifidobacteria under in vivo conditions stimulating the human stomach. Abstract D 139. *J. Dairy Sci*, 76: (supp.1), 136.

CLINQUART A. (2005). Les techniques de conservation des Aliments, revue: *sciences et technologie*, 44, Faculté de médecine vétérinaire.

COCONIER M. H., BERNET M F., KERNEIS S., CHAUVIERE G., FOURNIAT J., et SERVIN A. L. (1993). Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human

intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiology Letters*, 110: 299-306.

COGAN T.M. (1980). Les levains lactiques mésophiles. *Le lait*, 60 (597): 397-425.

COMELLI EM, GUGGENHEIM B, STINGELE F et NEESER J-R .(2002). Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur. J. Oral Sci.* 110: 218-224.

COOK .(1973). Activities of brush border lactase and  $\beta$ -galactosidase in the jejunum of the Zambian African. *Gastroenterolo.* 64 : 405-410.

Coombes, J. L. and K. J. Maloy .(2007). "Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells." *Semin Immunol.* 19(2): 116-26.

CORTHER G. et DROUAULT SOPHIE. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. INRA, EDP Science. *Vétérinaire research*, 32: 101-117.

COURTIN P. et Françoise RUL. (2004). Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait*, 84 :125–134

CROW V.L., THOMAS T.D. (1984). Properties of a *Streptococcus lactis* strain that ferments lactose slowly. *J. Bacteriol.* 157: 28-34.

DELARRAS C. (2007). Microbiologie pratique de laboratoire d'analyse et de contrôle sanitaire. Ed. Lavoisier, Paris.

DELLAGLIO F., (1988). Starters for fermented milks, section 3: thermophilic starters in "*fermented milks, sciences and technology*". *Bulletin Fil.* 227: 27-33.

DELLAGLIO F., (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Ed. Lavoisier, Paris, 1-37.

DEROISSART H.B. et LUQUET M. (1994). " Bactéries lactiques" .Vol I. Ed. Loriga. 605 p.

DESHPANDE G., RAO S. et PATOLE S. (2011). Progress in the field of probiotics: year 2011. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 27: 13-18.

DESMAZEAUD M. (1983). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques, *Le Lait*, 63: 267-316.

DESMAZEAUD M. (1996). Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine: utilisation et innocuité. *Cahier agricultures*, 5: 331-343.

DE VOS W.M., BOERRIGTER I., VAN ROOIJEN R.J., REICHE B., HENGSTENBERG W.(1990). Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem*, 265: 22554-22560.

DE VRESE MICHAEL, ANNA STEGELMANN, BERND RICHTER, SUSANNE FENSELAU, CHRISTIANE LAUE, AND JÜRGEN SCHREZENMEIR. ( 2001). Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl):421-429.

DE VILLIERS V. (1995). The effect of lactose maldigestion on the stools of young Tswana children, *J. Trop. Pediatr.* 41 : 54-56.

DILMI BOURAS A. (1991). Assimilation du cholestérol par les bactéries lactiques. Thèse de magister. Agro., INA. Alger, 144P.

DILMI-BOURAS A., (2002). Survie de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* et leur action sur le métabolisme du cholestérol. *Thèse de doctorat d'etat*, INA, ELHarrach, Alger.

DILMI-BOURAS A. et SADOUD D. (2002a). Effet du yaourt à *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* sur le cholestérol sanguin chez le lapin. *Médecine et nutrition*, 38 (1): 24-32.

DILMI BOURAS A. (2006). Assimilation (*in vitro*) of cholesterol by yogurt bacteria, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 13 :49-53.

DILMI BOURAS A., KOÏCHE M., TABTI M. (2007). The affect of *Lactobacillus paracasei* on the rabbit's cholestrolemia, *African journal of biotechnology*, Vol.6 (24): 2840-2845.

DOAN-THANH-LAM LE. (2011). Identification et caractérisation des déterminants physico-chimiques et biologiques mis en jeu dans l'adhésion de *Lactococcus lactis* à la mucine modèle PGM. *Thèse de doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)*.

DROUAULT S. AND G. CORTIER. (2001). Health effects of lactic acid bacteria ingested in fermented milk. *Vet. Res.* 32(2): 101-17.

DROUAULT S., ANBA J., CORTIER G. (2002). *Streptococcus thermophilus* is able to produce a  $\beta$ -galactosidase active during its transit in the digestive of germ free mice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(2): 936-941.

DURAND G. et MONSSON P. (1982). *Enzymes : production et utilisation industrielle*. Ed. Gowthier-Villars, France, 268P.

EKLEINMAN R. et PENNEZ F. (2003). L'alimentation et l'intolérance au lactose, causes, conseils. <http://www.swissmilk.ch/F/alimentation/soin/allergie/intolerance/pc.dijon.Fr/pedugo/99reu.B.html> .

EMOND L. (2004). Conseils nutritionnels, intolérance au lactose. <http://www.servicevie.com/02santé/intoleranceaulactose/I/63%/alimentsprivilegiéetaeviter/C.1actoseetsanté-20/santé.html>

EVEN S., LINDLEY U. D. , LOUBIERE. P., et COCAIGN-BOUSQUET. ( 2002). Dynamic reponse of catabolit pathway of autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation of metabolic and energetic constraints. *Mol. Microbial.* 45: 1143-1152.



FAO/ WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Report of a joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London Ontario, Canada.

FARROW J.A. (1980). Lactose hydrolysing enzymes in *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* and also in some other species of streptococci. *J. Appl. Bacteriol*, 49: 493-503.

FOLLIGUET M. et DEDRY G. (2001). Lait et santé bucco-dentaire. In/ *Nutrition et santé*. Ed. Tec et Doc., Lavoisier, Paris, 188P.

FULLER R. (1989). *Probiotics in man and animals*. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365–378.

GALLAGHER C.R., MOLLESON A.L., CALDWELL J.H. (1974). Lactose intolerance and fermented dairy product. *J. Am. Diet. Assoc*, 65: 418-419.

GARMAN J., COOLBEAR T., SMART J. (1996). The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by  $\beta$ -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 46:22-27.

GARRIGUES C., MERCADE MYRIAM , LOUBIERE P., LINDLY D. et COCAIGN-BOUSQUET M. (1998). Comportement métabolique de *Lactococcus lactis* en réponse à l'environnement. *Lait*, 78 : 145-155.

GAUTHIER S., POULIOT Y. (2002). Lactose et concentres de minéraux, ingrédients laitiers In : *Science et Tec. De lait*, transformation du lait. Ed press interpoly. Foundation de tec. laitières du Quebec.INC. Montréal.

GHADIMI D., FOLSTER-HOLST R., DE VRESE M., WINKLER P., HELLER K.J. et SCHREZENMEIR J.(2008). Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. *Immunobiology*. 213 : 677–692.

GILL H. (1998). "Stimulation of the immune system by lactic cultures." *International Dairy Journal*, 8: 535-544.

GIVRY L. (2006). Optimisation de la fermentation lactique sur sirop de son de blé et purification d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*, *Thèses de doctorat*, Université de Champagne Ardenne Reims, 184P.

GRAHN E, HOLM SE, LILJA H & SELLGREN K. (1994). Interference of a *Lactococcus lactis* strain on the human gut flora and its capacity to pass the stomach and intestine. *Scand. J. Nutr.* 38: 2-4.

GUARNER F, SCHAAFSMA GJ. (1998). *Probiotics. Int. J. Food Microbiol.* 39: 237-238.

GUEIMONDE M. AND SALMINEN S. (2003). Probiotics : efficacy in gut health promotion. *Nutrafoods.* 2(2):13-21.

GUIRAUD J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris.

HAGI T. et HOSHINO T. (2009). Screening and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from cultured common carp intestine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1479-1483.

HARKE A., BOUCHE C., GIARD C, BENACHOUR A., BOUTIBOONES P.et AUFFRAY Y. (1996). The lactic acid stress reponse of *Lactococcus lactis cremoris subsp lactis*. *Curent microbiologie* , 33: 194-199.

HAVENAAR R., HUIS IN'T VELD J.H.J. (1992).: *Probiotics: A general view*. In: *Wood BJB: The Lactic Acid Bacteria, Vol. 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, Chapman & Hall, New York, NY: 209–224.

HEYMAN MB. (2006). Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Pediatrics.* 118:1279-1286 .

HOLZAPFEL W.H., HABERER P., SNEL J., SCHILLINGER U. AND HUIS IN'T VELD J.H.( 1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food. Microbiol.* 41:85-101.

JACOB R., ZIMMER K.P., NAIM H., NAIM H.Y. (1997). The apical sorting of lactose- phlorizin hydrolase implicates sorting sequences found in the mature domain. *Eur.J.Cell.Biol.* 72: 54-60.

JIN L.Z., HO Y.W., ABDULLAH N., JALLALUDIN S.(1998). Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters in applied Microbiology*, 27: 183-185.

JONEJA, J.M.VICKERSTAFF. (2004). Digestion, Diet and Disease: Irritable Bowel Syndrome and Gastrointestinal Function Rutgers University Press, *Piscataway, New Jersey* , pp 122-125.

KANDLER O. et WEISS N. (1986). Genre *Lactobacillus* Beijerinck 601-212. in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol.2, 1209-1234.

KIM W. S. et DUNN N. W. (1999). Differentiation of *Lactococcus lactis subsp lactis* and *subsp cremoris* strains by their adaptive response to stress. *FEMS. Microbiologie Letter*, 171: 57-65.

KIMOTO H, KURISAKI J, TSUJI NM, OHMOMO S et OKAMOTO T. (1999). Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 313-316.

KIMOTO H, MIZUMACHI K, OKAMOTO T et Kurisaki J. (2004). New *Lactococcus* strain with immunomodulatory activity: Enhancement of Th1-type immune response. *Microbiology And Immunology*, 48: 75-82.

KLIJN N., WEERKAMP A. et DE VOS W. (1995). Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2771-2774.

KOÏCHE M. et DILMI BOURAS, A. (2010). Selection of local extremophile lactic acid bacteria with high capacity to degrade lactose: Potential use to reduce intolerance to lactose *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 9(11) : 1635-1640.

KOÏCHE M. ( 2011). Effet des bactéries lactiques locales du yaourt sur l'intolérance au lactose. *Thèse de doctorat*. École nationale supérieure d'agronomie – *El Harrach- Alger*.

KOK J., BUIST G., ZOMER A.L., VAN HIJUM SAFT et KUIPERS O.P. (2005). Comparative and functional genomics of lactococci. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 411-433.

KOLARS J.C., LEVITT M.D., AOUJI, M., et SAVAIANO D.A. (1984). Yogurt-an autodigesting source of lactose. *N. Engl. J. Med.* 310: 1-3.

KONNINGS. (1994). Mécanisme de transport des nutriments dans les bactéries lactique in "*Bactéries lactiques*". Ed. Loriga Lavoisier. PP 198-218.

KUNJI E.R.S., CHAN K.W., SLOTBOOM D.J., FLOYD S., O'CONNOR R. et MONNE M. (2005). Eukaryotic membrane protein overproduction in *Lactococcus lactis*. *Curr. Opin. Biotech.* 16: 546-551.

LABAYEN I., FORGA L., GONZALEZ A., LENOIR-WIJNKOOP I., NUTR R. et MARTINEZ J. (2001). Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. *Aliment Pharmacol. Ther.* 15:543-549

LANKVELD J.(1995). Protein standardization milk products composition and properties. In : *International Dairy Federation.* 9502. Milk protein definition and standardization. Brussels, p: 70-81.

LARPENT J.P. (1997). Microbiologie alimentaire. Ed : Lavoisier, Paris, 1073(4) : 133-218.

LE COQ R. (1965). Manuel d'analyse alimentaire et d'expertise usuelle. Ed. Doin – Bern et Cie, Paris, 1-487.

LIEVIN-LE MOAL V., SARRAZIN-DAVILA L.E. et SERVIN A.L. (2007). An experimental study and a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial to

evaluate the antisecretory activity of *Lactobacillus acidophilus* strain LB against nonrotavirus diarrhea. *Pediatrics*, 120, :795–803.

LILLY D.M., STILLWELL R.H. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147 : 747-748.

Lin M-Y. (1995). In vivo lactose digestion by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Chin. Nutr. Soc.*, 20:147–56.

LOONES A. (1994). Les laits par les bactéries lactiques. Bactéries lactiques. Ed Larica, 2: 137-145.

LOPEZ M., LI N., KATARIA J., RUSSELL M. et NEU J. (2008). Live and ultraviolet-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease flagellin-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*. 138 : 2264–2268.

LORIENT D. (2001). Influence des traitements technologiques sur les propriétés nutritionnelles du lait. In : Lait Nutrition et santé. *Tec et Doc*, Lavoisier, paris.

LUCAS S. et REYROLLE J. (1989). Etude d'un lot de ferments lactiques msophiles. Equilibre de la flore au cours de la première étape de la fabrication du levain. *Le lait*, 69 (2) : 123-136.

LUQUET F.M. (1986). Bactéries lactiques. In : Lait et produits laitiers (vache- chèvre- brebis). Vol. 2. Ed. *Tec et Doc*. Lavoisier et Apria, Paris, 77-115.

LUQUET F.M. (1990). Les produits laitiers transformation et technologie: Vache, brebis, chèvre. Vol.2, 2<sup>ème</sup> Ed . *Tec et doc*. Lavoisier, Paris, 382-384.

LUQUET, F.M., (1993). Lait et produits laitiers (vache- chèvre- brebis). Qualité, énergie et table de composition. Tome 3, Ed. *Tec et doc*. Lavoisier, Paris, 198P.

MARTEAU P., FLOURIE B., POCHART P., CHASTANG C., DESJEUX J. F., et RAMBAUD J. C. (1990). Effect of the microbial lactase (EC: 3.2.1.23) activity in yoghurt on

the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br. J. Nutr*, 64: 71-79.

MARTEAU P., P. POCHART, *et al.* (1992). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium sp.* in the small intestine following ingestion in fermented milk. A rational basis for the use of probiotics in man. *Gastroenterol. Clin. Biol*, 16 (1): 25-8.

MARTEAU P., MINEKUS M., HAVEBAAR R. et HUIS IN'T VELD J.H. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamyc model of stomach and small intestine ; validation and effect of bile. *J. Dairy Sci*, 80: 1031-1037.

MARTEAU P., DE VRESE M., CELLIER C. et SCHREZENMEIR J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am.J.Clin. Nutr*, 73 (suppl): 430S-436S.

MARTEAU P., SEKSIK P., LEPAGE P., et DORE, J. (2004). Cellular and physiological effects of probiotics and prebiotics. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 4: 889-896.

MATER D.D.G., DROUAULT-HOLOWACZ S., OOZEER R., LANGELLA P., ANBA J., et CORTHER G. (2006). Beta-galactosidase production by *Streptococcus thermophilus* is higher in the small intestine than in the caecum of human-microbiota-associated mice after lactose supplementation. *Br. J. Nutr* , 96:177.

MERCENIER A., MULLER-ALOUF H., et GRANGETTE C. (2000). Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr Issues. Mol. Biol*, 2:17-25.

METCHNIKOFF E. (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life: Optimistic studies. W. Heinemann, London*: 161-183.

MICHETTI P., DORTA G., WIESEL P.H., BRASSART D., VERDU E., HERRANZ M., FELLE C., PORTA N., ROUVET M., BLUM A.L. et CORTHESEY-THEULAZ I. (1999). Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (*johnsonii*) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion*, 60: 203-209.

MIERAU I. et KLEEREBEZEM M. (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 68: 705-717.

MOREAU M.C. (2001). "Les probiotiques : des microorganismes bénéfiques pour notre système immunitaire ?" Cholé-Doc Numéro 63. (Janvier/Février).

MOYNIHAN P.J., GOULD M., HUNTLEY N., THORMAS S. (1996). Effect of glucose polymers in water, milk and milk substitutes on plaque pH *in vitro*. *Inter. J. Pead. Dent.*, 6: 10-24.

MUSTAPHA A., HERTZLER S.R. et SAVAIANO D.A. (1997). Lactose: Nutritional significance. In Fox PF (ed): "Advanced Dairy Chemistry. Volume 3: Lactose, Water, Salts and Vitamins," 2nd ed. London: Chapman and Hall, pp: 127–154.

NOH D.O. et GILLILAND S.E. (1995). Influence of bile on  $\beta$ -galactosidase activity of component species of yogurt starter cultures, *J. Dairy Sci*, 77: 3532-3537.

NORTON P., LE PAGE R. et WELLS J. (1995). Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiologica* 40: 225-230.

NOVEL G. (1993). Les bactéries lactiques in «Microbiologie industrielle" Les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. Leveau, G.V., Bouix, M. *Techniques et documentation Lavoisier*. Paris. PP. 171-215.

OLANO A. et CALVO M. (1989). Kinetic of lactulose galactose and epilactose formation during heat treatment of milk. *Food. Chem.*, 34 : 239- 249.

OOZEER, R., N. GOUPIL-FEULLERAT, et al. (2002). "Lactobacillus casei is able to survive and initiate protein synthesis during its transit in the digestive tract of human flora-associated mice." *Appl. Environ. Microbiol*, 68(7): 3570-4.

ORLA-JENSEN S. (1919). The lactic acid bacteria. Copenhagen I, *Komission*.

OUWEHAND A. C., KIRJAVAINEN P.V., GRONLUND M.M., ISOLAURI S. J. et SALMINEN S. (1999). Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9: 623-630.

PARKER R. (1974). Probiotics, the other half of antibiotic story. *Anim. Nutr. Health*, 29:4-8.

PAYENS T.A.J. (1979). Casein micelles: the colloid-chemical approach. *International Dairy Journal*, 46 : 288-302.

PEREIRA D.I. et GIB SON G.R. (2002). Effect of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid level in humans. *Crit.Rev.Biochem. Mol. Biol*, 37(4): 259-81.

PETRANSXIENNE D. et LAPIED L. (1981). La qualité bactériologique du lait et des produits laitiers. Analyses et tests. Techniques et documentation Lavoisier. Paris. PP. 71-82.

PIEN J. (1975). Physicochimie du lait. *Tech. lait* , 841 : 13-14.

PLAYNE M. et SALMINEN S. (2002). Health benefits of probiotics : human studies and clinical trials. *Nutrafoods*, 1(1):5-11.

POSTMA P.W., LENGELER J.W., JACOBSON G.R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.*,57: 543-594.

POUGHEON S., GOURSAND J. ( 2001). Le lait: caractéristiques physicochimiques In : lait, nutrition et santé. *Tec et Doc*. Lavoisier , Paris.

PRENOSIL J.E., SFUKER E. et BOURNE J.R. (1987). Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose : Part I : State of art. *Biotechnology and Bioengineering*. 30: 1019-1025.

PRESSER K.A., RATKOWSKY D.A., ROSS T. (1997) Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol*, 63: 2355-2360.



QUINTARD M. et GOUILLOTON B. (1996). Biochimie. Ed. Masson, Paris, 55-64.

RAISONNIER A. (2001). Cours de biologie génique. Université Pierre et Marie Curie. Faculté de médecine, Pitié sal Pêtrière, 71-73.

RALLU F. (1999). Etude de la résistance au stress acide de *Lactobacillus lactis*. Thèse de doctorat. Université Paris VI. France.

RAUL F. (2001). Lait : Nutrition et santé – Lactose et intolérance au lactose. Ed : Tec et Doc. Lavoisier, Paris, 341-351.

REASONNER J., MACULAN T.P., RAND A.G., THAYER W.R. (1981). Clinical studies with low lactose milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34: 54-60.

RIZKALLA S. W., LUO J., KABIR M., CHEVALIER A., PACHER N., et SLAMA G. (2000). Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 1474-1479.

ROBAVO-TORRES C.C., NICHOLS B.L. (2007). Molecular differentiation of congenital lactase deficiency from adult-type hypolactasia. *Nutr. Rev.*, 65(2): 95-98

SAARELA M., MOGENSEN G., FONDEN R., MATTO J. AND MATTILA-SANDHOLM T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* ,84(3): 197-215.

SAHI T. (1994). Hypolactasia and lactase persistence, *Scand. J. Gastroenterol*, 29:1-6.

SALMINEN S., ISOLAURI E. et SALMINEN E.(1996). Clinical uses of probiotics for stabilising gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* ,70: 347-358.

SANDERS M. et HUIS IN'T VELD J. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market : microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie vanLeeuwenhoek*, 76:293-315.

SAVAIANO D.A., ABOUELANOUAR A., SMITH D.E. et LEVITT M.D.( 1984). Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet *acidophilus* milk, and cultures milk in lactase-deficient individuals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 40 : 1219-1223.

SCHLUNDT J., SAADBYE P., LOHMANN B., JACOBSEN B.L. et NIELSEN E.M. (1994). Conjugal transfer of plasmid DNA between *Lactococcus lactis* strains and distribution of transconjugants in the digestive tract of gnotobiotic rats. *Micro.Ecol. Health Dis*, 7: 59-69.

SEMENZA et al. (1965). Multiplicity of human intestinal disaccharide. I. Chromatographic separation of maltase and tow lactase. *Biochimic. Biophysic.Acta*, 96: 487-503.

SENEZ J. (1968). Microbiologie générale. *Ed* : Doin, Paris.

SHERMAK M.A., SAAVDRA J.M., JACKSON T.L., HUANG S.S., BAYLESS T.M. et PERMAN J.A. (1995). Effect of yogurt on symptoms and kinetics of hydrogen production in lactose-malabsorbing children, *Am. J. Clin. Nutr.*, 62:1003-1006.

SMITS H.H., ENGERING A., VAN DER KLEIJ D., et al. (2005). Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells *in vitro* by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J. Allergy Clin. Immun.* 115: 1260-1267.

STEIDLER L., HANS W., SCHOTTE L., et al. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, 289: 1352-1355

STEWART G.F. et AMERINE M.A. (1979). Introduction to food science and technology. *Ed.* Academie press, Paris, 256P.

SUAREZ F. et SAVALIANO D.A. (1995). Lactose intolerance. *Food thecnol*, 51 : 74-76.

TANNOCK G.W. (1999): Analysis of the intestinal microflora: A renaissance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 265-278.

TANNOCK G.W. (1999a). The normal microflora: an introduction. In *Medical importance of normal microflora*. Tannock, G. W., Ed., pp. 1-23.

THOMAS T.D., TURNER K.W. et CROW V.L. (1980). Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* : pathways, products, and regulation. *J. Bacteriol*, 144:672.682.

TISSIER H. (1906). Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *CR.Soc Biol.* 60 : 359-361.

TODOROV S.D., BOTES M., DANOVA S.T.et DICKS L.M.T. (2007). Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. *J. Appl. Microbiol*, 103: 629-639.

VAN DER WAAIJ D., BERGHUIS-DE VRIES J.M. et LEKKERKERK–VAN DER WEES J.E.C. (1971). Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J. Hyg. (Lond)*, 69: 405-11.

VAN ROOIJEN R.J., VAN SCHALKWIJK S. et DE VOS W.M. (1991). Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the tagatose 6-phosphate pathway gene cluster of the lactose operon of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem*, 266 : 7176-7181.

VARELA-MOREIRAS, G., ANTOINE, J. M., RUIZ-ROSO, B., et VARELA, G. (1992). Effects of yogurt and fermented-then-pasteurized milk on lactose absorption in an institutionalized elderly group. *J. Am. Coll. Nutr*, 11, 168-171.

VESA T., POCHART P. et MARTEAU P. (2000). Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment pharmacol. Ther.*, 14 : 823-828.

VESA T.H., MARTEAU P. et KORPELA R. (2000 a). Lactose intolerance. *Journal of the American College of Nutrition* .19(90002) : 165S-175S.

VILLAKO K. et MAAROOS H. (1994). Clinical picture of hypolactasia and lactose intolerance scand. *J. Gastroenterol.*, 202: 36-54.

VIDAILHET M. (2001). Glucides in « Lait nutrition et santé ». *Ed. Tec et Doc.*, Lavoisier, Paris, 274P.

VIRGINIE ALEXANDRE , ANNE-MARIE DAVILA , MICHEL BOUCHOUCHA et GUILLAUME CADIOT . (2011). L'intolérance au lactose en 2011. *Hépto-Gastro.*, 18(6): 589-593.

VOLLAARD E.J., CLASENER H.A. (1994). Colonization resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 38: 409-14.

WAKER H., KELLER P. et FALCHETTO R. (1992). Localisation of the two catalytic sites in intestinal lactase, phlorizin hydrolase. *J.Biol.Chemin.*, 267 : 18744-18752.

WERMUTH J., BRAEGGERB C., ARNDTA D. et MEIERA R. (2008). Intolérance au lactose. *Forum. Med. Suisse*, 8(40): 746–750.

YADAV K., BHARDWAJ A., KAUR G., IYER R., DE et MALIK R.K. (2009). Potential of *Lactococcus lactis* as a probiotic and functional lactic acid bacteria in dairy industry. *Inter. J. Probiotics Prebiotics*, 4: 219-228.

ZHAO J., FOX M., CONGY. (2010). Lactose intolerance in patients with chronic functional diarrhoea: the role of small intestinal bacterial overgrowth. *Aliment. Pharmacolo. Ther.*, 31: 892-900.

# ***ANNEXES***

**Annexe (I) : Composition des milieux et des réactifs****Tableau I** : Composition moyenne de 100g de poudre de lait

composant	unité	teneur
Lactose		36
Lipide	g	26.0
lécithine		0.2
protéines	g	26.0
minéraux	g	8
Vitamines		
Vit A	UI	1800
Vit D	UI	320
Vit B <sub>2</sub>	mg	1.1
Vit B <sub>12</sub>	mg	1.1

**Tableau II**: Composition du M 17 bouillon (g/l d'eau distillée).

Constituants	g / l
Tryptone	02,50
Peptone pepsique de viande	02,50
Peptone papainique de soja	05,00
B –Glycérophosphate de sodium	19,00
Lactose	05,00
Extrait de viande	02,50
Extrait de levure	05,00
Magnésium sulfate	00,25
Acide ascorbique	00,50

**NB:** M17- Agar : 15 g d'Agar est ajoutée aux formules précédentes.

**Tableau III** : Composition de réactif de patein.

<b>Constituants</b>	
Acide azotique (ou encore acide nitrique) .....	160 ml
Oxyde rouge de mercure .....	220 g
Lessive de soude (D=1,33) .....	10 ml
Eau distillée .....	qsp 1000 ml

**Source** : LE COQ, (1965)

**Annexe (II) : Evolution de la dégradation du lactose, acidité Dornics et viabilité des souches en fonction du temps**

**Tableau I** : Évolution de la dégradation du lactose par les bactéries lactiques en culture pures en fonction du temps d'incubation à 30°C en g/l.

Temps \ Bactéries	3 h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d1</i>	22,5	19,08	18,15	16,25	11,22
<i>Lc.d2</i>	19,25	19,00	18,025	16,01	12,13
<i>Lc.d3</i>	19,98	19,15	18,15	15,01	11,09
<i>Lc.d4</i>	19,81	17,25	16,22	16	11,28
<i>Lc.l1</i>	19,77	18,78	15,08	15	13,10
<i>Lc.l2</i>	20,25	19,75	15,09	14,26	12,25
<i>Lc.l3</i>	22,95	19,78	16,13	13,18	11,025
<i>Lc.cr1</i>	19,13	18,25	16,095	13,159	09,08
<i>Lc.cr2</i>	19,07	18,25	16,11	12,95	9,73

**Tableau II** : Évolution de l'acidité dornics D° des laits fermentés avec les cultures pures de bactéries lactiques en fonction du temps d'incubation à 30°C.

Temps \ Bactéries	3 h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d1</i>	18	22	30	55	66
<i>Lc.d2</i>	17	25	35	43	67
<i>Lc.d3</i>	18	28	38	42	59
<i>Lc.d4</i>	18	20	29	35	49
<i>Lc.l1</i>	17	26	29	37	48
<i>Lc.l2</i>	18	29	33	49	59
<i>Lc.l3</i>	19	21	31	44	55
<i>Lc.cr1</i>	19	35	44	56	70
<i>Lc.cr2</i>	20	33	49	59	75



**Tableau III** : Evolution de la viabilité des bactéries lactiques en cultures pures en fonction du temps d'incubation et à 30°C.

temps \ Bactéries	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d1</i>	$2,5.10^8$	$3,6.10^9$	$1,5.10^{10}$	$2,1.10^9$	$3,8.10^7$	$1,3.10^6$
<i>Lc.d2</i>	$8,3.10^8$	$1,5.10^9$	$1,9.10^{10}$	$1,9.10^9$	$4,2.10^8$	$2,5.10^7$
<i>Lc.d3</i>	$4,9.10^8$	$2,3.10^9$	$1,3.10^{10}$	$1,7.10^8$	$5,3.10^7$	$1,9.10^6$
<i>Lc.d4</i>	$5,6.10^8$	$2,5.10^9$	$2,4.10^{10}$	$2,3.10^9$	$4,2.10^8$	$1,3.10^6$
<i>Lc.l1</i>	$3,9.10^8$	$3,8.10^9$	$1,9.10^{10}$	$4,5.10^9$	$2,9.10^7$	$2,5.10^5$
<i>Lc.l2</i>	$4,5.10^8$	$5,9.10^9$	$5.10^8$	$1,8.10^9$	$4,6.10^8$	$3,1.10^7$
<i>Lc.l3</i>	$9,2.10^8$	$9.10^9$	$8,1.10^{10}$	$2,3.10^9$	$1,9.10^8$	$3,9.10^7$
<i>Lc.cr1</i>	$9,5.10^8$	$9,5.10^9$	$7,2.10^{10}$	$4,5.10^9$	$5,9.10^8$	$7,2.10^7$
<i>Lc.cr2</i>	$8,8.10^8$	$9,1.10^9$	$7,9.10^{10}$	$1,2.10^{10}$	$3,6.10^9$	$1,9.10^8$

**Annexe (III) : Survie des Lactocoques mésophiles****Tableau I** : Variation du nombre des cellules à pH 2,5 en absence de sels biliaries.

temps \ Bactéries	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d1+Lc.cr1</i>	$4,60.10^8$	$0,90.10^4$	00	00	00	00
<i>Lc.d1+Lc.cr2</i>	$8,25.10^8$	$3,10^7$	$3,25.10^3$	00	00	00
<i>Lc.d2+Lc.cr1</i>	$3,25.10^8$	$1,2.10^6$	$3,2.10^4$	$1,2.10^2$	00	00
<i>Lc.d2+Lc.cr2</i>	$1,67.10^8$	$8,8.10^6$	$2,01.10^4$	$1,09.10^3$	00	00
<i>Lc.d3+Lc.cr1</i>	$2,15.10^8$	$3,5.10^7$	$1,30.10^5$	$1,16.10^2$	77	00
<i>Lc.d3+Lc.cr2</i>	$1,7.10^8$	$2,8.10^6$	$3,15.10^4$	$1,88.10^3$	00	00
<i>Lc.d4+Lc.l2</i>	$1,5.10^8$	$8,4.10^5$	$1,23.10^3$	00	00	00
<i>Lc.d4+Lc.cr1</i>	$9,5.10^8$	$5,00.10^7$	$3,1.10^2$	10	00	00
<i>Lc.d4+Lc.cr2</i>	$8,5.10^8$	$6,66.10^7$	$1,70.10^3$	$1,02.10^2$	00	00
<i>Lc.l1+Lc.cr2</i>	$4,8.10^8$	$7,07.10^7$	$2,31.10^2$	00	00	00
<i>Lc.l2+Lc.cr1</i>	$3,25.10^8$	$8,5.10^7$	$5,16.10^4$	$1,02.10^2$	00	00
<i>Lc.l2+Lc.cr2</i>	$4,59.10^8$	$1,25.10^7$	$8,1.10^5$	$3,2.10^2$	67	00
<i>Lc.l3+Lc.cr1</i>	$1,76.10^8$	$8,08.10^7$	$1,3.10^5$	$1,09.10^2$	00	00
<i>Lc.l3+Lc.cr2</i>	$3,75.10^8$	$4,5.10^6$	$6,23.10^4$	$1,02.10^2$	00	00
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$9,8.10^8$	$3,5.10^8$	$3,21.10^5$	$10^2$	00	00
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$9,1.10^8$	$1,5.10^6$	$4,25.10^4$	$2,23.10^2$	79	00
<i>D<sub>2</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$5,76.10^8$	$3,02.10^3$	00	00	00	00
<i>D<sub>2</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	$6,1.10^8$	$1,06.10^4$	00	00	00	00
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$1,51.10^8$	$3,25.10^5$	$1,29.10^3$	00	00	00
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$7,22.10^8$	$1,25.10^6$	$2,85.10^3$	$10^2$	00	00
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	$1,78.10^8$	$5,40.10^6$	$7,80.10^4$	$1,2.10^2$	00	00
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$2,06.10^8$	$8,14.10^6$	$2,13.10^4$	$1,35.10^2$	00	00
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$5,10.10^8$	$1,9.10^7$	$3,2.10^2$	00	00	00
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$1,70.10^8$	$5,4.10^5$	$7,08.10^4$	$0,1.10^2$	00	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	$5,60.10^8$	$2,11.10^3$	00	00	00	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$2,81.10^8$	$6,7.10^6$	$1,2.10^4$	$1,78.10^2$	75	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	$4,9.10^8$	$6,7.10^7$	$0,13.10^3$	00	00	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>2</sub></i>	$2,3.10^8$	$5,7.10^7$	$6,05.10^3$	$1,02.10^2$	00	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$2,7.10^8$	$4,2.10^6$	$3,80.10^5$	$6,7.10^4$	$1,2.10^3$	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$7,51.10^8$	$7,87.10^7$	$5,50.10^4$	$3,15.10^2$	$1,25.10^2$	00

**Tableau II :** Variation du nombre des cellules à pH 2,5 en présence de 0,3% de sels biliaires.

temps	0h	3h	6h	24h	48h	72h
Bactéries						
<i>Lc.d1+Lc.cr1</i>	$3,29.10^8$	$4,01.10^2$	00	00	00	00
<i>Lc.d1+Lc.cr2</i>	$7,5.10^8$	$3,5.10^3$	$10^2$	00	00	00
<i>Lc.d2+Lc.cr1</i>	$1,75.10^8$	$7,5.10^5$	$1,34.10^2$	00	00	00
<i>Lc.d2+Lc.cr2</i>	$2,45.10^8$	$7,6.10^5$	$3,81.10^2$	85	00	00
<i>Lc.d3+Lc.cr1</i>	$4,15.10^7$	$1,3.10^6$	$3,22.10^4$	$10^2$	00	00
<i>Lc.d3+Lc.cr2</i>	$1,9.10^8$	$1,16.10^5$	$3,20.10^2$	00	00	00
<i>Lc.d4+Lc.l2</i>	$3,20.10^8$	$4,1.10^5$	$0,80.10^3$	00	00	00
<i>Lc.d4+Lc.cr1</i>	$8,7.10^8$	$6,16.10^5$	$2,14.10^2$	00	00	00
<i>Lc.d4+Lc.cr2</i>	$9,1.10^7$	$5,05.10^6$	$2,60.10^3$	$3,02.10^2$	00	00
<i>Lc.l1+Lc.cr2</i>	$3,13.10^8$	$6,17.10^7$	$3,39.10^2$	64	00	00
<i>Lc.l2+Lc.cr1</i>	$1,67.10^8$	$9,1.10^5$	$8,22.10^2$	00	00	00
<i>Lc.l2+Lc.cr2</i>	$3,80.10^8$	$3,5.10^6$	$6,1.10^4$	$1,3.10^2$	00	00
<i>Lc.l3+Lc.cr1</i>	$3,2.10^7$	$1,89.10^6$	$3,5.10^4$	$2,1.10^2$	00	00
<i>Lc.l3+Lc.cr2</i>	$2,08.10^8$	$6,1.10^6$	$1,51.10^5$	$2,33.10^3$	$1,8.10^2$	00
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$7,1.10^8$	$1,5.10^6$	$1,31.10^4$	$3,1.10^2$	00	00
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$7,7.10^8$	$5,2.10^6$	$4,01.10^3$	$1,25.10^2$	00	00
<i>D<sub>2</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$4,15.10^8$	$2,1.10^2$	00	00	00	00
<i>D<sub>2</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	$5,1.10^8$	$0,12.10^3$	00	00	00	00
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$3,25.10^8$	$1,25.10^4$	$0,23.10^2$	00	00	00
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$5,13.10^8$	$3,25.10^4$	$1,39.10^2$	00	00	00
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	$0,9.10^8$	$4,8.10^5$	$1,9.10^9$	00	00	00
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$1,9.10^8$	$4,45.10^4$	$1,16.10^3$	$10^2$	00	00
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$5,01.10^8$	$0,27.10^5$	$1,32.10^2$	00	00	00
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$0,8.10^8$	$4,5.10^4$	$1,09.10^2$	00	00	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	$4,09.10^8$	$1,51.10^2$	00	00	00	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$1,51.10^8$	$7,1.10^5$	$1,2.10^4$	$3,2.10^2$	00	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	$2,79.10^8$	$5,13.10^4$	$2,13.10^2$	00	00	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>2</sub></i>	$1,66.10^8$	$4,32.10^4$	$3,2.10^2$	00	00	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$3,90.10^8$	$3,29.10^6$	$4,5.10^5$	$7,8.10^2$	$1,35.10^2$	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$4,56.10^8$	$3,15.10^7$	$1,08.10^5$	$3,35.10^2$	$10^2$	00

**Tableau III** : Variation du nombre des cellules à pH 4,3 en absence de sels biliaries.

temps \ Bactéries	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d1+Lc.cr1</i>	$8,90.10^8$	$7,1.10^8$	$1,33.10^7$	$3,3.10^5$	$1,58.10^4$	$2,35.10^2$
<i>Lc.d1+Lc.cr2</i>	$4,35.10^7$	$9,1.10^6$	$1,4.10^5$	$3,20.10^4$	$1,21.10^3$	$0,6.10^2$
<i>Lc.d2+Lc.cr1</i>	$2,16.10^8$	$4,3.10^7$	$8,4.10^6$	$2,80.10^4$	$3,29.10^3$	$1,80.10^2$
<i>Lc.d2+Lc.cr2</i>	$3,61.10^8$	$5,8.10^7$	$9,1.10^5$	$1,79.10^4$	$3,25.10^2$	$10^2$
<i>Lc.d3+Lc.cr1</i>	$5,5.10^9$	$3,8.10^9$	$7,20.10^7$	$1,90.10^6$	$3,1.10^5$	$2,3.10^3$
<i>Lc.d3+Lc.cr2</i>	$10^9$	$7,19.10^9$	$7,67.10^8$	$7,41.10^6$	$3,20.10^4$	$2,81.10^2$
<i>Lc.d4+Lc.l2</i>	$1,95.10^8$	$6,51.10^8$	$2,23.10^7$	$5,31.10^4$	$3,15.10^3$	$2,35.10^2$
<i>Lc.d4+Lc.cr1</i>	$9,5.10^8$	$3,49.10^8$	$4,40.10^8$	$3,35.10^6$	$1,5.10^4$	$2.10^2$
<i>Lc.d4+Lc.cr2</i>	$1,55.10^9$	$8,5.10^8$	$4,5.10^8$	$3,15.10^6$	$1,75.10^3$	$4,5.10^2$
<i>Lc.l1+Lc.cr2</i>	$3,9.10^9$	$8,5.10^9$	$3,40.10^8$	$7,31.10^6$	$1,98.10^4$	$1,16.10^3$
<i>Lc.l2+Lc.cr1</i>	$1,3.10^9$	$9,7.10^8$	$4,8.10^8$	$3,16.10^6$	$5,33.10^4$	$0,85.10^3$
<i>Lc.l2+Lc.cr2</i>	$2,22.10^8$	$4,33.10^8$	$3,8.10^6$	$3,50.10^5$	$1,2.10^4$	$4,51.10^3$
<i>Lc.l3+Lc.cr1</i>	$5,37.10^7$	$3,51.10^6$	$1,3.10^5$	$1,85.10^3$	$3,2.10^2$	$10^2$
<i>Lc.l3+Lc.cr2</i>	$3.10^8$	$4,5.10^8$	$3,25.10^7$	$4,08.10^6$	$5,2.10^3$	$4,59.10^2$
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$8,5.10^8$	$1,6.10^8$	$3,33.10^7$	$4,22.10^7$	$1,2.10^3$	$0,89.10^2$
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$4,02.10^9$	$8,5.10^9$	$4,70.10^9$	$8,02.10^7$	$3,2.10^6$	$5,13.10^5$
<i>D<sub>2</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$5,16.10^9$	$9,1.10^9$	$5,31.10^9$	$1,31.10^7$	$1,09.10^6$	$0,85.10^5$
<i>D<sub>2</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	$1,22.10^8$	$4,50.10^7$	$5,48.10^6$	$3,15.10^3$	$10^2$	15
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$9,6.10^8$	$6,15.10^8$	$4,3.10^5$	$2,7.10^4$	$2,13.10^3$	$1,57.10^2$
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$8,5.10^8$	$1,59.10^6$	$7,8.10^4$	$3,2.10^2$	$10^2$	32
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	$10^9$	$7,9.10^8$	$6,1.10^8$	$4,1.10^6$	$2,66.10^4$	$1,51.10^2$
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$3.10^9$	$1,9.10^8$	$7,3.10^8$	$3,2.10^5$	$1,35.10^3$	$2,59.10^2$
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$1,80.10^8$	$6,9.10^7$	$7,50.10^5$	$3,90.10^3$	$1,29.10^2$	19
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$2,25.10^8$	$6,2.10^6$	$7,5.10^5$	$3,29.10^2$	$0,98.10^2$	09
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	$1,19.10^9$	$4,01.10^5$	$7,4.10^5$	$8,5.10^5$	$3,29.10^2$	$0,1.10^2$
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$5,1.10^9$	$4,1.10^8$	$7,1.10^7$	$9,30.10^6$	$1,45.10^5$	$3,2.10^4$
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	$2,4.10^8$	$3,90.10^5$	$9,1.10^4$	$3,22.10^3$	$0,81.10^2$	22
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>2</sub></i>	$7,3.10^8$	$1,9.10^7$	$4,2.10^4$	$4,51.10^3$	$0,29.10^2$	10
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$3,81.10^9$	$8,4.10^8$	$3,54.10^8$	$6,72.10^7$	$5,41.10^6$	$1,33.10^6$
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$2,74.10^9$	$3,8.10^9$	$9,10.10^7$	$1,32.10^7$	$3,10.10^6$	$10^6$

**Tableau IV:** Variation du nombre des cellules à pH 4,3 en présence de 0,3% de sels biliaires.

temps \ Bactéries	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d1+Lc.cr1</i>	$10^9$	$7,3.10^6$	$3,25.10^5$	$1,33.10^4$	$2,34.10^2$	00
<i>Lc.d1+Lc.cr2</i>	$3,1.10^7$	$3,25.10^5$	$0,31.10^5$	$1,9.10^3$	$0,85.10^2$	17
<i>Lc.d2+Lc.cr1</i>	$1,3.10^8$	$3,9.10^6$	$3,25.10^5$	$1,85.10^2$	09	00
<i>Lc.d2+Lc.cr2</i>	$3,9.10^8$	$8,1.10^5$	$9.10^3$	$2,5.10^2$	00	00
<i>Lc.d3+Lc.cr1</i>	$5,1.10^8$	$1,8.10^4$	$3,9.10^2$	$10^2$	00	00
<i>Lc.d3+Lc.cr2</i>	$1,9.10^9$	$3,21.10^7$	$7,31.10^5$	$1,31.10^3$	$3,44.10^2$	00
<i>Lc.d4+Lc.l2</i>	$3,1.10^8$	$5,71.10^4$	$1,32.10^3$	$3,1.10^2$	$0,85.10^2$	00
<i>Lc.d4+Lc.cr1</i>	$8,1.10^8$	$3,1.10^6$	$4,8.10^4$	$4,23.10^3$	$1,5.10^2$	75
<i>Lc.d4+Lc.cr2</i>	$3,1.10^9$	$5,3.10^7$	$3,9.10^4$	$4,5.10^2$	$0,15.10^2$	00
<i>Lc.l1+Lc.cr2</i>	$1,8.10^8$	$4,5.10^6$	$4,85.10^5$	$5,3.10^3$	$1,25.10^2$	$10^2$
<i>Lc.l2+Lc.cr1</i>	$3,1.10^8$	$7,1.10^7$	$3,9.10^6$	$1,31.10^5$	$5,35.10^3$	$1,3.10^2$
<i>Lc.l2+Lc.cr2</i>	$2,1.10^8$	$3,4.10^6$	$8,59.10^5$	$4,3.10^4$	$2,7.10^3$	$0,9.10^2$
<i>Lc.l3+Lc.cr1</i>	$1,8.10^7$	$4,1.10^4$	$3,2.10^2$	00	00	00
<i>Lc.l3+Lc.cr2</i>	$1,9.10^7$	$6,1.10^6$	$1,8.10^4$	$4,33.10^3$	$5,2.10^2$	$0,51.10^2$
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$8,1.10^7$	$3,1.10^6$	$4,37.10^5$	$1,40.10^4$	$2,1.10^3$	35
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$5.10^8$	$3,7.10^8$	$1,78.10^7$	$3,9.10^5$	$4,2.10^4$	$3,3.10^2$
<i>D<sub>2</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$1,85.10^9$	$8,2.10^8$	$3,51.10^7$	$2,51.10^4$	$3,25.10^3$	$1,95.10^2$
<i>D<sub>2</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	$2.10^8$	$3,25.10^5$	$4,98.10^3$	$7,8.10^2$	00	00
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$8,1.10^8$	$5,61.10^7$	$2,1.10^4$	$1,3.10^2$	$0,85.10^2$	00
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$7,1.10^8$	$3,1.10^5$	$1,31.10^2$	$10^2$	00	00
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	$1,9.10^8$	$8,1.10^7$	$1,5.10^6$	$3,1.10^4$	$5,3.10^2$	$10^2$
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$2,1.10^8$	$3,9.10^6$	$5,50.10^5$	$2,43.10^4$	$0,50.10^2$	00
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$3,8.10^8$	$1,9.10^6$	$4,1.10^4$	$3,25.10^2$	35	00
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$2.10^8$	$1,6.10^4$	$7,1.10^3$	$3,22.10^2$	$10^2$	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	$3,22.10^8$	$3,3.10^4$	$1,33.10^3$	$6,35.10^2$	$0,31.10^2$	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$1,6.10^9$	$5,1.10^8$	$6,3.10^6$	$1,43.10^4$	$4,25.10^3$	$1,29.10^2$
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	$4.10^8$	$3,51.10^4$	$1,5.10^3$	$4,15.10^2$	$0,09.10^2$	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>2</sub></i>	$1,7.10^8$	$7,2.10^6$	$3,3.10^3$	$4,85.10^2$	$0,89.10^2$	00
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$4,15.10^9$	$4,3.10^7$	$8,25.10^6$	$4,77.10^6$	$1,33.10^5$	$4,9.10^4$
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$3,1.10^8$	$4,59.10^7$	$7,87.10^6$	$0,85.10^6$	$3,85.10^5$	$1,25.10$

**Tableau V** : Variation du nombre des cellules à pH 6,5 en absence de sels biliaires.

temps \ Bactéries	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d1+Lc.cr1</i>	$3,80.10^9$	$8,06.10^{10}$	$3,2.10^{11}$	$4,51.10^{11}$	$1,32.10^{11}$	$2,80.10^{10}$
<i>Lc.d1+Lc.cr2</i>	$3,31.10^9$	$4,02.10^{10}$	$3,51.10^{11}$	$1,5.10^{11}$	$3,35.10^{10}$	$1,05.10^{10}$
<i>Lc.d2+Lc.cr1</i>	$1,31.10^{10}$	$5,95.10^{11}$	$9,85.10^{11}$	$3,4.10^{10}$	$6,8.10^{10}$	$9,8.10^9$
<i>Lc.d2+Lc.cr2</i>	$3,25.10^9$	$6,42.10^9$	$8,35.10^9$	$2,9.10^{10}$	$9,06.10^9$	$1,45.10^9$
<i>Lc.d3+Lc.cr1</i>	$6,70.10^9$	$5,2.10^{10}$	$8,05.10^{10}$	$5,06.10^9$	$1,8.10^9$	$3.10^8$
<i>Lc.d3+Lc.cr2</i>	$7,30.10^9$	$5,70.10^{10}$	$1,56.10^{11}$	$8,90.10^{10}$	$2,14.10^{10}$	$8,70.10^9$
<i>Lc.d4+Lc.l2</i>	$4,66.10^9$	$8,30.10^{10}$	$2,7.10^{11}$	$7,5.10^{10}$	$3,1.10^9$	$1,08.10^9$
<i>Lc.d4+Lc.cr1</i>	$3,25.10^9$	$3,85.10^{10}$	$9,08.10^{10}$	$1,02.10^9$	$1,15.10^8$	$9,7.10^7$
<i>Lc.d4+Lc.cr2</i>	$6,25.10^9$	$5,35.10^{10}$	$9.10^{10}$	$4,15.10^{10}$	$5,30.10^9$	$3,25.10^8$
<i>Lc.l1+Lc.cr2</i>	$2,25.10^9$	$2,85.10^{10}$	$3,35.10^{10}$	$8,59.10^9$	$6,3.10^9$	$1,51.10^9$
<i>Lc.l2+Lc.cr1</i>	$3,35.10^9$	$1,40.10^{10}$	$1,50.10^{11}$	$9,09.10^{10}$	$2,1.10^{10}$	$7,11.10^9$
<i>Lc.l2+Lc.cr2</i>	$4,01.10^9$	$3,9.10^{10}$	$1,5.10^{11}$	$8,31.10^{10}$	$3,6.10^{10}$	$9,9.10^9$
<i>Lc.l3+Lc.cr1</i>	$2,70.10^{10}$	$6,70.10^{10}$	$9,21.10^{11}$	$4,5.10^{10}$	$3,20.10^{10}$	$7,9.10^9$
<i>Lc.l3+Lc.cr2</i>	$3,53.10^9$	$2,31.10^{10}$	$1,59.10^{11}$	$7,35.10^{10}$	$1,9.10^{10}$	$9,2.10^9$
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$7,55.10^9$	$6,85.10^{10}$	$9,58.10^{10}$	$1,31.10^{10}$	$3,3.10^9$	$1,35.10^9$
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$3,38.10^9$	$7,16.10^{10}$	$5,1.10^{11}$	$3,81.10^{11}$	$2,28.10^{10}$	$9,08.10^9$
<i>D<sub>2</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$4,70.10^9$	$4,61.10^{10}$	$1,35.10^{11}$	$5,16.10^9$	$3,9.10^9$	$9,8.10^8$
<i>D<sub>2</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	$7,53.10^9$	$5,71.10^{10}$	$9,80.10^{10}$	$5,16.10^9$	$3,9.10^8$	$1,08.10^8$
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$9,89.10^9$	$2,30.10^{11}$	$3,78.10^{11}$	$8,91.10^{11}$	$8,89.10^{10}$	$3,05.10^9$
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$1,56.10^{10}$	$7,80.10^{10}$	$9,80.10^{10}$	$4,38.10^{11}$	$5,40.10^{10}$	$8,61.10^9$
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	$3,85.10^9$	$5,70.10^{11}$	$7,13.10^{11}$	$6,52.10^{10}$	$6,08.10^9$	$7,07.10^8$
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$3,46.10^9$	$5,34.10^9$	$9,51.10^9$	$3,5.10^{10}$	$8,3.10^9$	$2,5.10^9$
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$1,66.10^9$	$6,43.10^9$	$7,51.10^{10}$	$9,8.10^{11}$	$8,5.10^{10}$	$1,08.10^9$
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$8,90.10^9$	$3,30.10^{10}$	$5,85.10^{11}$	$8,97.10^{11}$	$9,09.10^{10}$	$5,15.10^9$
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	$4,60.10^9$	$8,1.10^{10}$	$2,5.10^{11}$	$8,51.10^{11}$	$5,15.10^{11}$	$7,80.10^{10}$
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	$2,7.10^{10}$	$6,80.10^{10}$	$8,50.10^{10}$	$2,40.10^{11}$	$5,54.10^{10}$	$7,8.10^9$
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	$9,90.10^9$	$1,35.10^{10}$	$9,55.10^{10}$	$1,39.10^{11}$	$7,2.10^{10}$	$3,2.10^9$
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>2</sub></i>	$7,35.10^9$	$8,31.10^{10}$	$1,35.10^{11}$	$8,85.10^{10}$	$3,14.10^{10}$	$9,8.10^9$
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	$4,80.10^9$	$9,80.10^{10}$	$1,55.10^{11}$	$9,31.10^{11}$	$3,81.10^{11}$	$7,2.10^{10}$
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	$9,5.10^9$	$1,50.10^{11}$	$3,51.10^{11}$	$8,5.10^{11}$	$7,31.10^{10}$	$1,5.10^9$

**Tableau VI:** Variation du nombre des cellules à pH 6,5 en présence de 0,3% de sels biliaires.

temps \ Bactéries	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d1+Lc.cr1</i>	2,80.10 <sup>9</sup>	3,14.10 <sup>9</sup>	1,9.10 <sup>9</sup>	5,85.10 <sup>8</sup>	1,35.10 <sup>7</sup>	0,70.10 <sup>7</sup>
<i>Lc.d1+Lc.cr2</i>	3,35.10 <sup>9</sup>	3,39.10 <sup>9</sup>	3,2.10 <sup>9</sup>	8,5.10 <sup>8</sup>	3,35.10 <sup>8</sup>	1,35.10 <sup>7</sup>
<i>Lc.d2+Lc.cr1</i>	2,31.10 <sup>10</sup>	5,60.10 <sup>10</sup>	1,2.10 <sup>10</sup>	3,4.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>8</sup>	3,31.10 <sup>7</sup>
<i>Lc.d2+Lc.cr2</i>	3,51.10 <sup>9</sup>	4,52.10 <sup>10</sup>	3.10 <sup>9</sup>	5,2.10 <sup>8</sup>	1,37.10 <sup>7</sup>	9,8.10 <sup>6</sup>
<i>Lc.d3+Lc.cr1</i>	7,60.10 <sup>9</sup>	9,85.10 <sup>9</sup>	3,1.10 <sup>8</sup>	1,33.10 <sup>7</sup>	3,85.10 <sup>6</sup>	1,35.10 <sup>6</sup>
<i>Lc.d3+Lc.cr2</i>	7,33.10 <sup>9</sup>	4,1.10 <sup>10</sup>	9,58.10 <sup>8</sup>	4,43.10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	9,66.10 <sup>6</sup>
<i>Lc.d4+Lc.l2</i>	5,60.10 <sup>9</sup>	3,8.10 <sup>10</sup>	7,75.10 <sup>9</sup>	1,35.10 <sup>8</sup>	1,25.10 <sup>7</sup>	7,6.10 <sup>6</sup>
<i>Lc.d4+Lc.cr1</i>	3,33.10 <sup>9</sup>	9,3.10 <sup>9</sup>	1,31.10 <sup>9</sup>	4,5.10 <sup>8</sup>	2,01.10 <sup>7</sup>	1,06.10 <sup>6</sup>
<i>Lc.d4+Lc.cr2</i>	7,02.10 <sup>9</sup>	9,58.10 <sup>9</sup>	1,45.10 <sup>8</sup>	3,77.10 <sup>7</sup>	1,30.10 <sup>7</sup>	4,7.10 <sup>6</sup>
<i>Lc.l1+Lc.cr2</i>	2,52.10 <sup>9</sup>	5,4.10 <sup>9</sup>	3,56.10 <sup>7</sup>	1,38.10 <sup>7</sup>	3,5.10 <sup>6</sup>	1,05.10 <sup>6</sup>
<i>Lc.l2+Lc.cr1</i>	3,53.10 <sup>9</sup>	3,1.10 <sup>10</sup>	8,5.10 <sup>9</sup>	1,85.10 <sup>8</sup>	7,31.10 <sup>7</sup>	1,2.10 <sup>6</sup>
<i>Lc.l2+Lc.cr2</i>	3,99.10 <sup>9</sup>	8,97.10 <sup>9</sup>	9,8.10 <sup>8</sup>	1,33.10 <sup>7</sup>	3,15.10 <sup>6</sup>	5,9.10 <sup>5</sup>
<i>Lc.l3+Lc.cr1</i>	3,1.10 <sup>9</sup>	8,09.10 <sup>9</sup>	7,1.10 <sup>8</sup>	1,38.10 <sup>7</sup>	7,2.10 <sup>6</sup>	1,15.10 <sup>6</sup>
<i>Lc.l3+Lc.cr2</i>	4,05.10 <sup>9</sup>	8,12.10 <sup>9</sup>	1,3.10 <sup>9</sup>	7,08.10 <sup>8</sup>	1,31.10 <sup>7</sup>	9,3.10 <sup>6</sup>
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	8,35.10 <sup>9</sup>	1,02.10 <sup>10</sup>	3,8.10 <sup>9</sup>	1,31.10 <sup>7</sup>	5,33.10 <sup>6</sup>	6,35.10 <sup>5</sup>
<i>D<sub>1</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	3,40.10 <sup>9</sup>	9,31.10 <sup>9</sup>	1,25.10 <sup>8</sup>	3,71.10 <sup>7</sup>	6,86.10 <sup>6</sup>	1,9.10 <sup>6</sup>
<i>D<sub>2</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	4,6.10 <sup>9</sup>	8,40.10 <sup>9</sup>	3,8.10 <sup>8</sup>	9,71.10 <sup>7</sup>	2,5.10 <sup>7</sup>	4,31.10 <sup>6</sup>
<i>D<sub>2</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	6,90.10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	4,2.10 <sup>9</sup>	1,7.10 <sup>8</sup>	5,9.10 <sup>7</sup>	3,4.10 <sup>6</sup>
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	8,9.10 <sup>9</sup>	9,12.10 <sup>9</sup>	5,37.10 <sup>8</sup>	1,25.10 <sup>7</sup>	3,8.10 <sup>6</sup>	1,66.10 <sup>6</sup>
<i>D<sub>2</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	2,60.10 <sup>10</sup>	7,78.10 <sup>9</sup>	4,5.10 <sup>8</sup>	1,8.10 <sup>7</sup>	5,60.10 <sup>6</sup>	2,31.10 <sup>6</sup>
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	3,1.10 <sup>9</sup>	9,08.10 <sup>9</sup>	2,5.10 <sup>8</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>	3,10.10 <sup>6</sup>	1,03.10 <sup>6</sup>
<i>D<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	4,6.10 <sup>9</sup>	8,85.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>7</sup>	3,8.10 <sup>6</sup>	1,08.10 <sup>6</sup>	7,50.10 <sup>5</sup>
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	1,68.10 <sup>9</sup>	4,40.10 <sup>9</sup>	9,80.10 <sup>8</sup>	1,50.10 <sup>7</sup>	3,10.10 <sup>6</sup>	1,09.10 <sup>6</sup>
<i>D<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	9,99.10 <sup>9</sup>	1,31.10 <sup>10</sup>	2,5.10 <sup>9</sup>	3,4.10 <sup>8</sup>	1,68.10 <sup>7</sup>	8,31.10 <sup>6</sup>
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub></i>	6,4.10 <sup>9</sup>	1,80.10 <sup>10</sup>	7,2.10 <sup>9</sup>	7,2.10 <sup>8</sup>	1,2.10 <sup>8</sup>	4,5.10 <sup>7</sup>
<i>D<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub></i>	3,35.10 <sup>10</sup>	9,33.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	8,5.10 <sup>8</sup>	5,37.10 <sup>7</sup>	1,3.10 <sup>6</sup>
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>1</sub></i>	8,51.10 <sup>9</sup>	9,98.10 <sup>9</sup>	1,8.10 <sup>8</sup>	3,1.10 <sup>7</sup>	7,2.10 <sup>6</sup>	1,33.10 <sup>6</sup>
<i>D<sub>4</sub>L<sub>2</sub>C<sub>2</sub></i>	1,08.10 <sup>10</sup>	8,5.10 <sup>9</sup>	3,1.10 <sup>8</sup>	1,3.10 <sup>6</sup>	3,1.10 <sup>5</sup>	1,33.10 <sup>5</sup>
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>1</sub></i>	5,35.10 <sup>9</sup>	1,3.10 <sup>10</sup>	6,9.10 <sup>8</sup>	1,7.10 <sup>8</sup>	4,3.10 <sup>7</sup>	1,2.10 <sup>7</sup>
<i>D<sub>4</sub>L<sub>3</sub>C<sub>2</sub></i>	1,09.10 <sup>9</sup>	9,80.10 <sup>9</sup>	1,3.10 <sup>9</sup>	8,9.10 <sup>8</sup>	5,35.10 <sup>7</sup>	3,3.10

## **Résumé**

Un effet stimulant de plusieurs souches probiotiques sur la digestion du lactose a été démontré par des études physiopathologiques. Des nombreux travaux ont montré que la lactase de certaines bactéries lactiques, participait *in situ* dans l'intestin à l'hydrolyse du lactose chez de nombreux malades qui peuvent alors souffrir de symptômes dits « d'intolérance au lactose ».

L'étude porte sur le criblage et la sélection des souches probiotiques de bactéries lactiques mésophiles locales *Lactococcus lactis subsp lactis* *Lactococcus lactis subsp cremoris* et *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*, ces dernières utilisés sous forme souches pures, en combinaison et en association à haut pouvoir de dégradation de lactose d'une part, et d'autres part sur le test de la résistance, de la croissance et de l'activité de ces bactéries. Les souches et les cultures mixtes ayant dégradé des quantités importantes de lactose et qui ont gardé une bonne viabilité sont mises dans des conditions extrêmes du tube digestif. Les résultats ont montré des variations considérables entre genres, espèces et souches de la même espèce dans la dégradation du lactose en cultures pures et en cultures mixtes ; ainsi que la croissance à différents pH en absence et en présence de 0,3% de sels biliaries.

**Mots clés** : Probiotiques, *Lactococcus lactis*, intolérance au lactose, lactose, survie.

## **Abstract**

A stimulant effect of several probiotic strains on the digestion of lactose has been demonstrated by pathophysiological studies. A number of studies have demonstrated that the lactase from certain lactic bacteria was involved *in situ* in the gut in the hydrolysis of lactose a number of patients who may then suffer from symptoms known as « lactose intolerance ».

The aim of this study concerned the selection of local probiotics strains of *Lactococcus lactis subsp lactis* *Lactococcus lactis subsp cremoris* et *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*, e, with have a high capacity to degrade lactose on the one hand, and other share to test resistance, growth and activity of these bacteria. Strains and mixed cultures having degraded significant quantities of lactose and which kept a good viability, are subjected to extreme conditions of the digestive tract. The results showed considerable variations between genera, species and strains of the same species in the degradation of lactose in pure and mixed cultures like growing with pH different in absence and in the presence of bile salts.

**Key words**: Probiotics, *Lactococcus lactis*, intolerance to lactose, lactose, survival.