

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



MEMOIRE

Présenté à l'Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Alimentaires
Spécialité : Agro-alimentaire et contrôle de qualité

Thème

*Etude de la viabilité des bifidobactéries isolées à partir d'un
yaourt probiotique en présence de l'extrait d'écorce de grenade*

Présenté par

Benalia Dihia & Dib Thamila

Devant le jury :

Président : M^r Amrouche T.

Maitre de Conférence à l'UMMTO

Promotrice : M^{me} Remane Benmallem Y.

Maitre Assistante à l'UMMTO

Examineurs : M^r Bengana M.

Maitre de Conférence à l'UMMTO

M^{elle} Lami S.

Maitre Assistante à l'UMMTO

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Avant tout, nous remercions DIEU tout puissant de nous avoir aidé et donné la santé, le courage, la volonté et la patience de réaliser ce travail.

Au terme de ce travail, nous tenons à adresser l'expression de nos vifs remerciements à toutes les personnes qui nous ont aidé et collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nos sincères remerciements à M^{me} REMANE BENMALLEM Y. pour avoir proposé le sujet et accepter de nous encadrer et orienter tout au long de notre travail avec ses judicieux conseils et sa constante disponibilité, c'est grâce à sa compétence et indulgence que ce travail a pu être réalisé.

Nous remercions aussi M^r AMROUCHE T. d'avoir accepté la présidence du jury de notre travail. Nous lui exprimons notre profonde reconnaissance pour son aide précieuse.

Nous tenons à exprimer aussi nos remerciements à M^r BENGANA M. et M^{elle} LAMI S. pour avoir accepté de juger ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à M^r OUKIL B. pour nous avoir permis de réaliser une partie de notre travail à la laiterie Danone Djurdjura d'Algérie et à M^r AZZOUG B. pour nous avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de la laiteries Danone Djurdjura d'Algérie pour leurs aides.

DEDICACES

Nous avons l'honneur de dédier ce modeste travail

A nos parents

A nos familles

Et à nos amis

THAMILA ET DIHIA

Résumé

Les probiotiques sont des microorganismes vivants pour lesquels un bénéfice pour la santé a été démontré lors de leur administration en doses adéquates et les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires indigestible qui stimulent la croissance et l'activité des bactéries du côlon. Au cours de ce travail, trois souches bactériennes ont été isolées et identifiées à partir d'un yaourt fabriqué en Algérie qui sont *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobacterium animalis*. Une étude de la viabilité et des aptitudes technologiques de cette dernière ont été effectuée en culture pure et en culture mixte en présence de différentes concentrations de l'extrait d'écorce de grenade. Durant les premières heures de la fermentation des laits écrémés contenant cet extrait, les concentrations 0.1%, 0.3% et 0.9% ont enregistrées les taux de croissance les plus élevés ($1h^{-1}$, $1.28h^{-1}$ et $0.92h^{-1}$) des bifidobactéries en culture pure. A la fin de la fermentation de la culture pure ($37^{\circ}C/24h$) et de la culture mixte ($42^{\circ}C/6h$), la charge initiale des bifidobactéries (5×10^8 UFC/ml) a diminué jusqu'à une charge $>10^7$ UFC/ml pour toutes les concentrations avec l'augmentation de l'acidité surtout pour les concentrations moyennes de la culture pure ($>110^{\circ}D$). L'étude de leur viabilité en culture pure pendant la conservation à $4^{\circ}C/14j$ a donné des vitesses moyennes de déclin faibles ($\leq -0.27j^{-1}$) et celle de la culture mixte a été étudiée à $4^{\circ}C/7j$ a montré des vitesses moyennes de déclin plus faibles ($-0.06j^{-1}$ pour 0.9%). La charge finale des bifidobactéries a été $>10^6$ UFC/ml en culture pure avec une acidité $\geq 130^{\circ}D$ pour les meilleures concentrations enregistrées (0.09%, 0.1%, 0.3% et 0.9%) et $>10^7$ UFC/ml en culture mixte avec une acidité $\geq 74^{\circ}D$ (0.3% et 0.9%). Les charges obtenues sont supérieures à celles qu'un yaourt probiotique doit contenir, ce qui confirme l'effet stimulant de l'extrait d'écorce de grenade pour la croissance et la survie des bifidobactéries.

Mots clés : bifidobactéries, probiotiques, prébiotiques, écorce de grenade, croissance, viabilité.

Abstract

Probiotics are live microorganisms for which a health benefit has been demonstrated when they are administered in adequate doses and prebiotics are indigestible food ingredients that stimulate the growth and activity of the colon bacteria. During this work, three bacterial strains were isolated and identified from a yogurt made in Algeria that are *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium animalis*. A study of the viability and technological abilities of this latter bacteria were carried out in pure culture and mixed culture in the presence of different concentrations of pomegranate bark extract. During the first hours of the fermentation of the skimmed milk containing this extract, the concentrations 0.1%, 0.3% and 0.9% recorded the highest growth rates ($1h^{-1}$, $1.28h^{-1}$ and $0.92h^{-1}$) of the bifidobacteria in pure culture. At the end of the fermentation of pure culture ($37^{\circ}C/24h$) and mixed culture ($42^{\circ}C/6h$), the initial load of bifidobacteria (5×10^8 CFU/ml) decreased to a load $>10^7$ CFU/ml for all concentrations with increasing acidity especially for average concentrations of pure culture ($> 110^{\circ}D$). The study of their viability in pure culture during storage at $4^{\circ}C/14$ days gave low average rates of decline ($\leq -0.27d^{-1}$) and that of the mixed culture was studied at $4^{\circ}C/7d$ showed lower average rates of decline ($-0.06d^{-1}$ for 0.9%). The final load of bifidobacteria was $>10^6$ CFU/ml in pure culture with acidity $\geq 130^{\circ}D$ for the best recorded concentrations (0.09%, 0.1%, 0.3% and 0.9%) and $>10^7$ CFU/ml in mixed culture with acidity $\geq 74^{\circ}D$ (0.3% and 0.9%). The loads obtained are superior to those that a probiotic yoghurt must contain, therefore the pomegranate bark extract stimulates the growth of bifidobacteria.

Key words : bifidobacteria, probiotics, prebiotics, pomegranate bark extract, growth, viability.

Agzul

Ibrubyutiken d udusen yedren ur ten-nettwali ara s tit, ma ttwadeblen s tesmekta iwatan ttawin-d lfayda i tdawsa, ma d ibribyutiken d isufar ur nettwaqed ara deg ueebbuđ tteawanen titit (croissance) akk d urmud (activité) n tbaktiriyin n yizerman. Deg uxeddim-agi, krađ (03) n ccetlat n tbaktiriyin i d-nessufey akk i d-nukez deg uyawurt yettwaxedmen di Lzzayer : *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* akk d *Bifidobacterium animalis*. Tazrawt n tudert d tnezgiyin titiknulugiyin (aptitudes technologiques) n bifidubactiri wehdes di lyela ney texleđ akk d tbaktiriyin n uyawurt s tmerna n uyebbar n yiqcer n remmane ixelden akk d waman. Di tsactin timezwura n urakkem (fermentation) n uyefki ur nesai lidam i wumi nerna ayebbar n yiqcar n remmane ixelden d waman, isnegden (les concentrations) : 0.1%, 0.3%, akk 0.9% fkant-d itugen n titit (taux de croissance) imeqqranen n bifidubaktiri ittwazaren wehdes (1 saea⁻¹, 1.28 saea⁻¹ akk 0.29 saea⁻¹). Di tagara n urakkem n lyela tamfardit (37°C/24 swayae) akk d lyela ixelden (42°C/6 swayae) amđan n tazwara n bifidubactiri (5x10⁸UFC/ml) iřsub-d yer umđan $\geq 10^7$ UFC/ml i akk isnegden s tmerna n tmayust (acidité) ladya deg yisnegden ilemasen di lyela tamfardit (>110°D). Tazrawt n tudert n lyela tamfardit mi tnejmae ar 4°C/14 n wussan, tefka-d irurad ilemmasen n uřsubu d imecđah ($\leq -0.27\%$ ass⁻¹) ma d tin n lyela ixelden mi tnejmae ar 4°C/7 n wussan tefka-d irurad ilemmasen n uřsubu d imecđah ktar (-0.06 ass⁻¹ i 0.9%). Amđan aneggaru n bifidubaktiri wehdes di lyela, ieedda 10⁶UFC/ml s tmayust $\geq 130^\circ\text{D}$ i yisnegden n lali (0.09%, 0.1%, 0.3% akk d 0.9%) akk d umđan $> 10^7$ UFC/ml i lyela ixelden s tmayust $\geq 74^\circ\text{D}$ (0.3% akk d 0.9%). Imđanen n bifidubactiri i d-nufa yer tagara d imeqqranen yef wayen i ilaq ad yili deg uyawurt yesaan ibrubyutiken, d ayen i d-issemilen d akken ayebbar n yiqcer n remmane yetteawan titit d tudert n bifidubactiri.

Awalen n tsura : bifidubactiri, ibrubyutiken, ibribyutiken, iqcer n remmane, titit, tudert.

الملخص

البروبيوتيك هي كائنات حية تم إثبات فائدة صحية لها عند تناولها بجرعات كافية والمكونات الحيوية هي مكونات غذائية غير قابلة للهضم تحفز نمو ونشاط بكتيريا القولون. خلال هذا العمل تم عزل وتحديد ثلاث سلالات بكتيريا من الياغورت الزبي تم إنتاجه في الجزائر والتي هي *Lactobacillus bulgaricus* و *Streptococcus thermophilus* و *Bifidobacterium animalis*. وقد أجريت دراسات للفترة التكنولوجية لهذا الأخير في المزرعتين المفردة والمختلطة في وجود تراكيز مختلفة من مستخلص قشور الرمان . خلال الساعات الأولى من تخمر الحليب الخالي من الدسم المحتوي على هذا المستخلص، سجلت التركيزات 0.1 %، 0.3 % و 0.9 % أعلى معدلات النمو (1سا⁻¹، 1.28سا⁻¹، 0.92سا⁻¹) للبيفيدوبكتيريا في المزرعة المفردة . في نهاية التخمر للمزرعة المفردة (37°م / 24سا) والمزرعة المختلطة (42°م / 06سا)، انخفض الحمل الأولي (5X10⁸ UFC/ ml) للبيفيدوبكتيريا إلى 10⁷ لكل التراكيز مع ارتفاع الحموضة خاصة التراكيز المتوسطة للمزرعة المفردة (>110°D). أعطت دراسة نسبة الحيوية في المزرعة المفردة أثناء الحفظ في 4°م في مدة 14 يوم معدلات ضعيفة للسرعة المتوسطة لموت السلالة (0.27-يوم⁻¹) ودراسة المزرعة المختلطة عند 7 أيام أظهرت انخفاض المزرعة المتوسطة لموت السلالة (-0.06 يوم⁻¹ ل 0.9 %). كان الحمل الأخير من البيفيدوبكتيريا < UFC/ml 10⁶ في المزرعة المفردة مع حموضة تفوق 130° D لأفضل التراكيز المسجلة (0.09 ، 0.1 ، 0.3، و 0.9 %) وتكونت في المزرعة المختلطة مع حموضة >74° D. عدد البيفيدوبكتيريا الذي تم الحصول عليه يفوق ذلك الذي يجب أن يحتوي عليه الياغورت البروبيوتيكي وبالتالي فإن مستخلص قشور الرمان يحفز نمو البيفيدوبكتيريا .

الكلمات المفتاحية: البيفيدوبكتيريا، البروبيوتيك، المكونات الحيوية، قشور الرمان، النمو، الحيوية .

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale.....01

Partie bibliographique

Chapitre I : Probiotiques

1. Définition et historique.....	03
2. Principales souches microbiennes à effet probiotique	03
2.1. Bactéries lactiques	03
2.1.1. Le genre Lactobacillus	03
2.1.2. Le genre Streptococcus	04
2.2. Les bifidobactéries	04
3. Caractéristiques souhaitables des probiotiques	04
4. Critères de sélection des souches bactériennes potentiellement probiotiques	05
4.1. Propriétés fonctionnelles	05
4.1.1 Résistance à l'acidité gastrique	05
4.1.2. Résistance aux sels biliaires	05
4.1.3. Adhésion aux cellules épithéliales	05
4.1.4. La production des substances antimicrobiennes	06
4.1.5. La résistance aux antibiotiques	06
4.2. Propriétés technologiques	06
4.2.1. Propriétés acidifiantes	06
4.2.2. Viabilité et stabilité des microorganismes	06
5. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé.....	07
6. Emploi des bactéries probiotiques dans les produits laitiers	08
6.1. Viabilité des bactéries probiotiques.....	08
6.1.1. Effet du procédé technologique sur la viabilité.....	08
6.1.1.1. Méthodes d'amélioration de la viabilité des bactéries probiotiques	09

Chapitre II : Prébiotiques

1. Définition	10
2. Nature des prébiotiques	10
3. Mécanisme d'action des prébiotiques	11
3.1. Croissance accrue des bactéries bénéfiques	11
3.2. Inhibition de l'adhérence des pathogènes	12
3.3. Augmentation de l'absorption des minéraux	12
3.4. Rôle immunomodulateur des prébiotiques	12

3.5. Rôle dans la régulation des lipides	12
3.6. Influence de l'appétit	12
4. Critères de sélection des prébiotiques	12
5. Intérêts des prébiotiques sur la santé.....	13

Chapitre III : Lait et yaourt

1. Lait	14
1.1. Définition	14
1.2. Composition chimique du lait	14
1.2.1. Eau	15
1.2.2. Minéraux	15
1.2.3. Glucides.....	16
1.2.4. Matière grasse	16
1.2.5. Matière azotée	16
1.2.6. Vitamines	17
1.3. Valeur nutritionnelle du lait	17
1.4. Caractéristiques du lait	17
1.4.1. Caractéristiques organoleptiques.....	17
1.4.1.1. Couleur	17
1.4.1.2. Odeur	17
1.4.1.3. Saveur.....	17
1.4.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	18
1.4.3. Caractéristiques microbiologiques	18
1.4.3.1. Flore indigène ou originelle	18
1.4.3.2. Flore de contamination	18
2. Yaourt	19
2.1. Définition	19
2.2. La composition du yaourt	19
2.2.1. Glucides.....	19
2.2.2. Protéines	19
2.2.3. Matière grasse	19
2.2.4. Minéraux	19
2.2.5. Vitamines	19
2.3. Apports nutritionnels du yaourt	20
2.4. Effets bénéfiques du yaourt.....	20

Chapitre IV : Grenade

1. Historique	21
2. Composition chimique de la partie comestible de la grenade	21
3. L'écorce du fruit	22
3.1. Composition de l'écorce de grenade	23
3.2. Activité et intérêt de l'écorce	23
3.2.1. Activité anticancéreuse	23

3.2.2. Activité antimicrobienne	23
3.2.3. Activité antiulcéreuse	23

Partie expérimentale

1. Echantillons	24
2. Milieux de culture utilisés	24
2.1. Milieux de culture utilisés pour isoler les bifidobactéries	24
2.2. Milieux de culture pour les bactéries lactiques	24
2.3. Milieu lait	24
2.4. Préparation des extraits d'écorce de grenade	24
3. Isolement des souches du yaourt	25
3.1. Isolement des bifidobactéries	25
3.2. Isolement des bactéries lactiques	25
3.3. Purification des souches	25
4. Identification des souches	25
4.1. Observation microscopique	26
4.1.1. Observation à l'état frais	26
4.1.2. Coloration de Gram	26
4.2. Recherche de catalase	26
4.3. Recherche de l'oxydase	26
4.4. Production de l'indole	26
4.5. Production de gélatinase	27
4.6. Croissance en aérobiose	27
4.7. Production du gaz	27
4.8. Test de fermentation des sucres	27
4.9. L'antibiogramme	28
5. Etude des aptitudes technologiques des bifidobactéries en présence des extraits d'écorce de grenade	28
5.1. Préparation de l'inoculum	28
5.2. Etude de la croissance des bifidobactéries dans le lait écrémé à 0.05% de cystéine en présence de l'extrait d'écorce de grenade	28
5.3. Détermination de la viabilité des bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de 0.05% de cystéine en présence de l'extrait d'écorce de grenade pendant le stockage à 4°C	29
5.4. Détermination de l'acidité titrable	29
6. Etude des aptitudes technologiques des bifidobactéries en culture mixte avec <i>Lactobacillus bulgaricus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i> dans le lait écrémé en présence de l'extrait d'écorce de grenade	30
6.1. Etude de la croissance des bifidobactéries et des bactéries lactiques dans le lait écrémé en présence de l'extrait d'écorce de grenade	30
6.2. Détermination de la viabilité des bifidobactéries en culture mixte dans le lait écrémé en présence de l'extrait d'écorce de grenade	30
6.3. Détermination de l'acidité titrable	30

Résultats et Discussion

1. Diagramme de fabrication du yaourt « Activia » de DDA	31
2. Identification des bactéries lactiques	32
2.1.Aspect macroscopique	32
2.2.Aspect microscopique	32
2.3.Production de catalase	33
3. Identification de la souche de bifidobactérie.....	34
3.1.Critères morphologiques	34
3.1.1. Aspect macroscopique.....	34
3.1.2. Aspect microscopique	34
3.2.Tests physiologiques et enzymatiques	35
3.2.1. Fermentation des sucres	36
3.2.2. L'antibiogramme	37
4. Etude des aptitudes technologiques des bifidobactéries	38
Conclusion et perspectives	48
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

°D : Degré Dornic

μ: Taux de croissance

μg : Microgramme

μm : Micromètre

CO₂: Dioxyde de carbone

DDA : Danone Djurdjura d'Algérie

FAO : Organisation des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture

GRAS: Generally Recognized As Safe

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HCl: Acide chlorhydrique

Kcal : Kilocalories

KJ : Kilojoule

Lb: *Lactobacillus*

mg: Milligramme

ml: Millilitre

mm : Millimètre

MRS: Milieu de Man Rogosa et Sharpe

MRSc: Milieu de Man Rogosa et Sharpe cystéiné (0.05%)

Mup: Li-Mupirocin

N : Normalité

NaCl: Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

nm: Nanomètre

O₂ : Oxygène

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

p/v: Poids par volume

pH : Potentiel d'hydrogène

St : *Streptococcus*

Subsp : Sous espèce

TOS: Transgalactosylated Oligosaccharide

TSC : Tryptone-Sel-Cystéine

UFC : Unité Formant Colonies

UFC/g: Unité Formant Colonies par Gramme

UFC/ml: Unité Formant Colonies par Millilitre

UHT : Ultra Haute Température

UI: Unité Internationale

VMD : Vitesse Moyenne de Déclin

WGO: World Gastroenterology Organization

Liste des tableaux

Tableau I : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques	07
Tableau II : Catégories des prébiotiques	11
Tableau III : Composition du lait de vache	15
Tableau IV : Composition lipidique du lait	16
Tableau V : Apports nutritionnels du yaourt	20
Tableau VI : Composition du fruit du grenadier (la pulpe avec pépin).	22
Tableau VII : Résultats des tests enzymatiques et physiologiques de la souche des bifidobactéries	35
Tableau VIII : Résultats du test de fermentation des sucres pour la souche de bifidobactéries isolée	37
Tableau IX : Résultats de l'antibiogramme de la souche de bifidobactéries isolée.....	38
Tableau X : Croissance des bifidobactéries (h^{-1}) en culture pure et en présence de l'extrait d'écorce de grenade	39
Tableau XI : La vitesse de déclin (j^{-1}) de la culture pure de bifidobactéries stockée à 4°C en présence de l'extrait d'écorce de grenade.....	40
Tableau XII : Croissance des bifidobactéries (h^{-1}) en culture mixte en présence de l'extrait d'écorce de grenade pendant l'étuvage.....	42
Tableau XIII : La vitesse de déclin (j^{-1}) des bifidobactéries en culture mixte et en présence de l'extrait d'écorce de grenade, après stockage à 4°C.....	43

Liste des figures

Figure 01 : Diagramme de fabrication du yaourt « Activia » de DDA	31
Figure 02 : <i>Lactobacillus</i> après coloration de Gram observé sous microscope optique avec l'objectif à immersion (x100)	32
Figure 03 : <i>Streptococcus</i> après coloration de Gram observé sous microscope optique avec l'objectif à immersion (x100)	33
Figure 04 : Test de catalase pour <i>Lactobacillus</i> et <i>Streptococcus</i>	33
Figure 05 : Aspect macroscopique des bifidobactéries	34
Figure 06 : Aspect microscopique des bifidobactéries, observé sous microscope optique avec l'objectif à immersion (x100)	35
Figure 07 : Profil fermentaire de la souche <i>Bifidobacterium</i>	36
Figure 08 : Croissance de la souche de bifidobactéries en culture pure en présence de l'extrait d'écorce de grenade	39
Figure 09 : La viabilité des bifidobactéries en culture pure en présence de l'extrait d'écorce de grenade stockées à 4°C	40
Figure 10 : Nombre des bifidobactéries ($\times 10^7$ UFC/ml) en culture mixte en présence de l'extrait d'écorce de grenade pendant l'étuvage à 42°C.	41
Figure 11 : Viabilité des bifidobactéries ($\times 10^7$ UFC/ml) en culture mixte en présence de l'extrait d'écorce de grenade pendant 7 jours de stockage à 4°C.	42
Figure 12 : Acidité Dornic (°D) des laits fermentés avec des bifidobactéries en culture pure et en présence de l'extrait d'écorce de grenade.	44
Figure 13 : Acidité Dornic (°D) des laits fermentés avec des bifidobactéries en culture pure et en présence de l'extrait d'écorce de grenade, stockés jusqu'à 14j à 4°C.	45
Figure 14 : Acidité Dornic (°D) des laits fermentés avec des bifidobactéries en culture mixte et en présence de l'extrait d'écorce de grenade durant 6h à 42°C.	46
Figure 15 : Acidité Dornic (°D) des laits fermentés avec des bifidobactéries en culture mixte en en présence de l'extrait d'écorce de grenade, stockés pendant 7 jours à 4°C.	46

Introduction

Introduction générale

La notion de "probiotiques" a été développée grâce aux travaux de **Metchnikoff (1907)** qui avait constaté que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé.

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants pour lesquels un bénéfice pour la santé de l'hôte a été démontré lors de leur administration en doses adéquates (**WGO, 2017**).

Une consommation journalière de 10^9 à 10^{10} unités formant des colonies de cellules probiotiques viables procurerait des effets positifs sur la santé de l'hôte (**Hemaiswarya et al., 2013**), particulièrement par une modulation du microbiote intestinal (**Ohashi et Ushida., 2009**).

Dans la majorité des cas, les produits laitiers tels les yaourts, laits fermentés, fromages, laits en poudre et crèmes glacées ont été choisis comme véhicules privilégiés des cultures probiotiques (**Doleyres et al, 2002**).

Toutefois, les microorganismes probiotiques doivent demeurer viables dans les produits dans lesquels ils sont incorporés et durant leur passage dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal pour avoir un effet maximal sur le microbiote intestinal et aussi sur la réponse immunitaire des hôtes (**Adams, 2010**).

Certains composants de la microflore intestinale, particulièrement les bifidobactéries, sont capables de fermenter des substances essentiellement non digestibles (glucides complexes) dans le colon grâce à leur pouvoir saccharolytique important (**Kaplan et al., 2000**). Cette caractéristique permet d'augmenter la croissance ou l'activité des microorganismes spécifiques du tractus gastro-intestinal en agissant positivement sur la santé de l'hôte. Les effets bénéfiques générés par ces interactions ont permis le développement du nouveau concept « prébiotiques » (**Berg., 1998**).

Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires indigestibles qui ont un effet bénéfique sur l'organisme en stimulant sélectivement dans le côlon la croissance et/ou l'activité d'une bactérie ou d'un nombre limité de bactéries susceptibles d'améliorer la santé de leur hôte (**Dacosta., 2001**).

Les prébiotiques doivent être indigestibles pour servir de substrat aux bactéries spécifiques, principalement les bifidobactéries et les lactobacilles, qui sont actives et améliorent la santé de

l'hôte. Les fibres alimentaires tel que les polysaccharides non digestibles (inuline, pectines, gommés et oligosaccharides) sont fermentées par les bactéries intestinales en produisant des acides gras à courte chaîne notamment les acides acétique, propionique et butyrique... qui sont utilisés par les différents tissus de l'hôte non seulement comme substrats énergétiques, mais aussi comme facteurs de régulation cellulaire (**Blaut., 2002**).

Le fruit du grenadier a été utilisé, de façon empirique, dans les médecines traditionnelles, pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires (**Wald, 2009**). Beaucoup de chercheurs ont prouvés que les préparations contenant l'extrait de la peau de grenade peuvent être utilisées pour empêcher et/ou traiter l'athérosclérose, la diarrhée, l'ulcère gastrique, la maladie vénérienne et les maladies relatives à l'œstrogène (**Reddy *al*, 2007**).

L'objectif de notre étude est d'isoler les bifidobactéries à partir d'un yaourt probiotique fabriqué en Algérie et d'étudier leur viabilité et leurs aptitudes technologiques en culture pure et en culture mixte avec les bactéries lactiques du yaourt (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) en présence de l'extrait d'écorce de grenade.

Partie bibliographique

Chapitre I

Probiotiques

1. Définition et historique

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques (Ait Belgnaoui, 2006). 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). Le plus judicieux serait de le définir comme « supplément alimentaire contenant des microorganismes vivants qui affecte bénéfiquement l'animal hôte en régulant l'équilibre de la flore intestinale » (Fuller, 1989).

Cependant, la définition la plus largement acceptée du terme est celle de la consultation mixte d'experts (FAO/OMS, 2001) qui redéfinit les probiotiques comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates (dans le cadre de l'alimentation), confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte ». Ce groupe a reconnu que les probiotiques doivent être capables d'exercer des prestations de santé sur l'hôte grâce à la croissance et / ou l'activité dans le corps humain (Leahy et al., 2005).

2. Principales souches microbiennes à effet probiotique

Les bactéries probiotiques sont principalement des bactéries lactiques et des bifidobactéries (Ait Belgnaoui, 2006). Ces dernières sont connues pour ne pas présenter de risques toxiques ou infectieux et sont relativement faciles à inclure dans des produits laitiers (Izquierdo, 2009).

2.1. Bactéries lactiques

On appelle bactéries lactiques, les microorganismes assez hétérogènes sur les plans morphologie et physiologie qui se caractérisent par une production de quantités importantes d'acide lactique résultant du métabolisme des glucides (Desmazeaud, 1983).

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (De Roissart, 1986).

Elles sont Gram positif, généralement immobiles, asporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994).

Les bactéries lactiques ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique (Fooks et Gibson, 2002).

2.1.1. Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de

nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (**Khalid et Marth, 1990**).

2.1.2. Le genre *Streptococcus*

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (**Stiles et Holzappel, 1997**).

Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (**Pilet et al., 2005**).

2.2. Les bifidobactéries

Les bifidobactéries sont des bacilles de morphologies variables dont la plus caractéristique est une forme en Y. Ce sont des bactéries à Gram positif, non mobiles, catalases négatives et anaérobies strictes. Leurs conditions optimales de croissance se situent à des températures entre 37°C et 41°C et à des pH compris entre 6,5 et 7,0. Les bifidobactéries sont hétérofermentaires et dégradent les hexoses en produisant de l'acide lactique et acétique (**Scardovi, 1986**).

3. Caractéristiques souhaitables des probiotiques

D'après **Farnworth (2008)**, pour qu'un microorganisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes :

- Etre un habitant naturel de l'intestin (origine humaine) ;
- Etre capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier ;
- Adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des pathogènes ;
- Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H₂O₂, bactériocines, ...) ;
- Non invasif, non carcinogène et non pathogène (GRAS) ;
- Etre capable de co-agréger pour former une flore normale équilibrée ;
- Absence de toxicité ;
- Possibilité de production en grande échelle ;
- Possibilité de cryoprotection ;

- Résistance à la bile et au mucus intestinal (l'acide).

Les microorganismes probiotiques doivent également être technologiquement adaptés à interagir dans les produits alimentaires, tels qu'ils conservent à la fois la viabilité et l'efficacité dans les produits alimentaires (sur une échelle commerciale) pendant et après la consommation. Les probiotiques doivent être capables de survivre aux applications industrielles (par exemple la transformation des produits laitiers) et aussi être en mesure de croître ou survivre à des niveaux élevés dans le produit à la fin de la durée de conservation (**Farnworth, 2008**).

4. Critères de sélection des souches bactériennes potentiellement probiotiques

4.1. Propriétés fonctionnelles

Afin d'être conformes à la définition des probiotiques, les microorganismes doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte.

4.1.1. Résistance à l'acidité gastrique

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les bas pH. Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime. Par conséquent, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2.5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (**Ammor et Mayo, 2007**).

4.1.2. Résistance aux sels biliaires

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (**Ammor et Mayo, 2007**).

4.1.3. Adhésion aux cellules épithéliales :

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est un critère de sélection recommandé pour le choix des probiotiques, parce que c'est une condition pour la colonisation des entrailles. L'adhérence constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests *in vitro* puis *in vivo* en utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine (**Palomares et al., 2007 ; Reyes-Gavilan et al., 2011**).

4.1.4. La production de substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Titiak *et al.*, 1996 ; Labioui *et al.*, 2005).

4.1.5. La résistance aux antibiotiques

Les travaux de Temmerman *et al.* (2003), ont montré que 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la kanamycine, à la tétracycline, à l'érythromycine et au chloramphénicol.

Dans la plupart des cas la résistance n'est pas transmissible, cependant, il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autres espèces et genres. C'est une raison significative pour choisir des souches manquant du potentiel de transfert de résistance (Denohue, 2004).

4.2. Propriétés technologiques

Plusieurs aspects technologiques doivent être pris en compte dans la sélection des probiotiques pour conférer de bonnes propriétés sensorielles au produit fini, tels que :

4.2.1. Propriétés acidifiantes

La fonction acidifiante est la plus recherchée des bactéries lactiques qui a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable (Jones, 2004). Les conséquences d'ordre physicochimique et microbiologique sont récapitulées d'après Surta *et al.*, 1998 : coagulation du lait, la synérèse du caillé et la solubilisation du calcium micellaire, elle participe aux qualités organoleptiques des produits laitiers fermentés et inhibe la croissance de microorganismes nuisibles.

4.2.2. Viabilité et stabilité des microorganismes

Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les probiotiques doivent survivre en grand nombre au procédé de fabrication, et à la période d'entreposage au froid qui s'ensuit. Il est en effet généralement admis qu'un nombre minimal de 10^7 cellules viables par gramme de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique. Cependant, la stabilité physique et génétique des cellules ainsi que toutes les propriétés nécessaires pour exercer leurs bienfaits sur la santé doivent également être assurées (Izquierdo, 2009).

5. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques. Le tableau I illustre la diversité des effets bénéfiques sur la santé documentés et rapportés dans la littérature.

Tableau I : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (**Salminen et al., 2004 ; Patterson, 2008**)

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autres effets
Contrôle des troubles suivants : - Mauvaise digestion du lactose - Diarrhée due aux rotavirus et diarrhée associée aux antibiotiques - Syndrome du côlon irritable - Constipation - Infection par <i>Helicobacter pylori</i> - Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle - Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin Prévention de l'entérocolite nécroscante du nouveau-né	- Modulation immunitaire - Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation - Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants.	Réduction du risque de : - Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein) - Coronaropathie - Maladies des voies respiratoires supérieures et infections connexes Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle

6. Emploi des bactéries probiotiques dans les produits laitiers

Les produits laitiers probiotiques appartiennent à la catégorie des produits laitiers fonctionnels qui ont montré une croissance impressionnante au cours de la dernière décennie (**Menrad, 2003**). Ainsi, le nombre des produits disponibles et la connaissance du consommateur du concept probiotique a évolué, et, en conséquence, la recherche sur ces produits a également augmenté. Plus de 600 produits alimentaires probiotiques sont commercialisés par l'industrie laitière depuis 2006 comprenant : les crèmes glacées, les fromages, beurre, laits en poudre, desserts glacés et mayonnaise (**Sveje, 2007**)

Au cours de ces dernières années, la popularité de bio-yaourts, contenant des ferments *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus* et des espèces de *Bifidobacterium* a augmenté de manière significative (**Farnworth, 2008**).

Une revue récente dans le *British Journal of Nutrition* (**Guarner et al., 2005**) comprend la conclusion suivante : *"Le concept de « probiotique » a évolué pour devenir une notion simple et directe : Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte. Il a été démontré que la consommation d'un yaourt induit des bienfaits sanitaires mesurables liés à la présence de bactéries vivantes, par rapport aux produits contenant des bactéries détruites par la chaleur. Ainsi, les levains du yaourt remplissent clairement le concept actuel des probiotiques au moins pour ses effets bénéfiques sur la digestion du lactose in vivo. "*

6.1. Viabilité des bactéries probiotiques

Afin d'obtenir les effets santé souhaités, les bactéries probiotiques doivent être capables de croître dans le lait et de survivre à un taux suffisamment élevé (**Tamime et al., 2005**). Dans la littérature scientifique, des concentrations minimales de 10^6 et 10^7 UFC/g dans le produit fini sont considérées comme des quantités thérapeutiques de cultures probiotiques dans les aliments transformés (**Talwalkar et al., 2004**), atteignant 10^8 et 10^9 UFC/g, fournies par une consommation quotidienne de 100 g ou 100 ml de lait fermenté, d'où un bénéfice pour la santé de l'Homme (**Jayamanne et Adams, 2006**). Ces chiffres élevés ont été proposés pour compenser les pertes possibles des microorganismes probiotiques pendant la durée de conservation de l'aliment probiotique, lors du transit dans les conditions acides de l'estomac, et de résister aux sels biliaires dans l'intestin grêle (**Tamime et al., 2005**).

6.1.1. Effet du procédé technologique sur la viabilité

La viabilité de bactéries probiotiques dans les yaourts au cours du procédé technologique dépend des souches utilisées, l'interaction entre les espèces présentes, la production de peroxyde

d'hydrogène par le métabolisme bactérien, les composants de la matrice alimentaire et l'acidité finale du produit (**Farnworth, 2008**). La viabilité dépend également de la disponibilité des éléments nutritifs, les activateurs et inhibiteurs de croissance, la concentration des sucres, l'oxygène dissous et de l'oxygène perméable à travers l'emballage (en particulier pour les espèces *Bifidobacterium*), le niveau d'inoculation et le temps de fermentation (**Oliveira et Damin, 2003**).

6.1.1.1.Méthodes d'amélioration de la viabilité des bactéries probiotiques

○ Sélection des souches

Il est important que la viabilité de la souche et la stabilité des caractéristiques souhaitables soient maintenues pendant la production commerciale, ainsi que dans le produit fini (**Talwalkar et al, 2004**).

○ Taux d'inoculation

Les microorganismes probiotiques croissent mal dans le lait, un volume élevé de l'inoculum (5-10 ml/ 100 ml lait) est nécessaire, par rapport à un petit inoculum (1 ml/ 100 ml de lait) dans le cas des cultures starter du yaourt, ce qui peut entraîner une sur-acidification du produit et cela se traduit éventuellement par la faible survie des bactéries probiotiques. Le pH final à la fin de la fermentation est le facteur crucial pour la survie des microorganismes probiotiques. A ce stade un pH inférieur à 4,4 entraîne une diminution substantielle des bactéries probiotiques. Par conséquent, le niveau d'inoculum doit être soigneusement réglé et contrôlé (**Tamime, 2005**).

○ Utilisation des pièges à oxygène

La teneur en oxygène et le potentiel redox sont des facteurs importants pour la viabilité pendant le stockage à froid. L'acide ascorbique (vitamine C) agit comme un capteur d'oxygène et est autorisé comme additif alimentaire. En outre, le lait et les produits laitiers offrent seulement 10- 15% des besoins quotidiens en vitamine C. Ainsi, la fortification du yaourt avec de l'acide ascorbique pourrait augmenter sa valeur nutritive (**Dave et Shah, 1997**).

○ Ajout de cystéine

La cystéine est un acide aminé contenant du soufre, fournit l'azote aminé comme facteur de croissance tout en réduisant le potentiel d'oxydoréduction. La cystéine à 250 mg/l semble améliorer la survie de *Lb. acidophilus* et *Bifidobacterium spp*. Il convient de noter que la faible concentration en cystéine (50 mg/l) améliore la croissance de *S. thermophilus* (**Dave et Shah, 1997**).

Chapitre II

Prébiotiques

1. Définition

Les prébiotiques sont des ingrédients des aliments indigestibles, qui ont un effet bénéfique sur l'animal par le biais d'une stimulation de la croissance et/ou de l'activité d'un nombre restreint d'espèces bactériennes déjà résidente dans la flore digestive de l'animal, ce qui peut contribuer à l'amélioration de la santé de l'animal (**Gibson et al., 1995**).

Une définition plus courte prête moins à controverse : un prébiotique est une molécule fermentescible seulement par certaines bactéries du côlon et dotée par là d'un effet favorable sur la flore de l'intestin.

Donc un prébiotique doit résister à l'hydrolyse par la salive et à la digestion par les enzymes intestinales, être métabolisables par les bactéries estimées bénéfiques, au premier rang desquelles se placent les *Bifidobacterium* (**Dacosta, 2001**).

2. Nature des prébiotiques

Selon **Gibson et al. (1995)**, les substances échappant à la digestion et arrivant dans le côlon humain chaque jour sont :

- Principalement des glucides apportés par les aliments :
 - 8 à 40 g d'amidon résistant.
 - 8 à 18 g de polysaccharides autres que l'amidon.
 - 2 à 10 g de sucres non absorbés.
 - 2 à 8 g d'oligosaccharides.
- 2 à 3 g de glucides endogènes (par exemple les glycoprotéines des mucines).
- 3 à 9 g de protéines apportées par les aliments.
- 3 à 6 g de protéines endogènes (par exemple des enzymes pancréatiques).

Le plus important des polysaccharides naturels autre que l'amidon : l'inuline, qui se trouve dans les racines de certains végétaux (artichauts, asperges, oignons, ail, poireau, banane...).

Comme il existe des sucres simples non métabolisés par le système digestif sont notamment la raffinose, la lactulose, le stachyose, l'arabinose, la xylose, auxquels on peut ajouter le lactose pour les personnes démunies de l'enzyme correspondante.

Des additifs employés aujourd'hui dans certaines catégories d'aliments, notamment ceux dits « sans sucre », contiennent d'autres substances qui dérivent des glucides et sont métabolisables seulement par la flore du côlon :

- Les polyols :
 - Les monosaccharides hydrogénés (le sorbitol, le mannitol et le xylitol).
 - Les disaccharides hydrogénés (l'isomalt ou palatinit, le maltitol et le lactitol).
- Le polydextrose : polymère de condensation du dextrose.
- D'autres additifs ou ingrédients sont dans le même cas (fibres végétales, gommés, alginates, carraghénanes, carboxyméthylcellulose, pectines ...).

Aujourd'hui, il existe une nouvelle liste des catégories de prébiotiques connues, mais elle n'est pas exhaustive, car les recherches continuent de donner à beaucoup de nouveaux produits grâce aux progrès des techniques du génie enzymatique. A l'exception des malto-oligosaccharides, tous stimulent préférentiellement la croissance des *Bifidobacterium* (Dacosta, 2001).

Tableau II : Catégories de prébiotiques

Lactulose
Lactosucrose
Galacto-oligosaccharides
Transgalacto-oligosaccharides
Inuline et fructo-oligosaccharides
Malto-oligosaccharides
Isomalto-oligosaccharides
Parlatinose-oligosaccharides
Oligosaccharides des graines de soja
Gentio-oligosaccharides
Xylo-oligosaccharides
Chito-oligosaccharides
Agar-oligosaccharides

3. Mécanisme d'action des prébiotiques

3.1. Croissance accrue des bactéries bénéfiques

Les prébiotiques stimulent la croissance des probiotiques, principalement des bifidobactéries, mais aussi des lactobacilles. Ces derniers vont donc augmenter en nombre au niveau colique. La fermentation est un processus pouvant expliquer cette croissance importante. Ce phénomène de croissance sera différent en fonction de la nature d'oligosaccharides (linéaire ou ramifié), aussi les bactéries n'auront pas la même affinité avec tous les hydrates de carbone. En effet, alors que les bifidobactéries utiliseront des hydrates de carbone avec un faible degré

de polymérisation, d'autres comme les *Bacteroides* préféreront des oligosaccharides très polymérisés (Burgum, 2014).

3.2. Inhibition de l'adhérence des pathogènes

Les prébiotiques ont une influence très importante sur la capacité d'adhésion des bactéries pathogènes où ils vont limiter leurs sites de liaison et renforcer leurs barrières épithéliales par une augmentation de la production de la mucine constitutive du mucus (Delgado, 2011).

3.3. Augmentation de l'absorption des minéraux

Des études ont prouvé que l'absorption de calcium et de magnésium peut être améliorée en présence de prébiotiques, notamment des fructanes comme l'inuline qui favorisent l'absorption de calcium et des fructo-oligosaccharides qui ont un lien avec une absorption de magnésium augmentée.

3.4. Rôle immunomodulateur des prébiotiques

Des études menées chez l'homme ont montré que des prébiotiques tels que l'inuline et fructo-oligosaccharides pouvaient avoir une influence sur la réponse immunitaire mise en place après une vaccination (Vulevic et al, 2008).

3.5. Rôle dans la régulation des lipides

Les prébiotiques sont capables de réduire le taux des lipides, plus particulièrement le taux de cholestérol dans le sang. Ils peuvent également créer une barrière augmentant la viscosité au niveau intestinal. Le cholestérol et les acides biliaires seront donc moins bien absorbés où on retrouvera plus de cholestérol dans les fèces (Sadeq et al, 2013). Certains prébiotiques tel que l'inuline diminuent le pH au niveau colique, entraînant ainsi une diminution d'absorption des lipides.

3.6. Influence de l'appétit

La consommation de prébiotiques influence l'appétit où elle provoque la sensation de la faim, une perte de poids et une amélioration de la tolérance au glucose.

4. Critères de sélection des prébiotiques :

Il existe trois critères importants pour que des ingrédients soient définis comme prébiotiques :

- La résistance à l'acidité gastrique, l'hydrolyse et l'absorption gastro-intestinale.

- La sensibilité au processus de fermentation exercé par la flore intestinale.
- La stimulation sélective de la croissance et/ou de l'activité des bactéries intestinales responsables du bien-être et de la santé de l'hôte (**T.R.Licht et al, 2012**).

5. Intérêts des prébiotiques sur la santé :

Outre la stimulation des *Bifidobacterium*, on attribue généreusement aux prébiotiques un ensemble de propriétés dont la plupart seraient bénéfiques pour l'organisme :

- Retardement de la vidange gastrique.
- Ajustement de la durée du transit intestinal.
- Meilleure tolérance au glucose.
- Abaissement de l'absorption des lipides et du cholestérol.
- Augmentation de la teneur en eau du contenu intestinal.
- Amélioration de la fermentation microbienne dans le côlon par un accroissement de la production d'acides gras à courte chaîne, réduction du pH et production d'ammoniac.

En conséquence de tout cela, fonctionnement intestinal plus régulier, moindres risques de diarrhée ou de constipation et aussi prévention et évitement des maladies cardiovasculaires et le cancer de l'intestin (**Dacosta, 2001**).

Chapitre III

Lait et yaourt

1. Lait

1.1. Définition

Le lait a été défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à GENEVE comme étant "le produit intégral de la traite totale et interrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum" (**Luquet, 1987**).

Selon le code **FAO/OMS** « la dénomination lait est réservée exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale obtenue par une ou plusieurs traites sans addition ou soustraction » (**Boudiers et al, 1981**).

1.2. Composition chimique du lait :

Le lait est un système complexe constitué d'une solution vraie, d'une solution colloïdale, d'une suspension colloïdale et d'une émulsion (**Amiot et al., 2002**).

Le lait, à la fois aliment et boisson a un grand intérêt nutritionnel grâce à son hétérogénéité. Les constituants les plus importants sont : eau, protéines, lipides, glucides (lactose), minéraux, les autres constituants tels que les vitamines, les enzymes et les gaz dissous sont considérés comme des constituants mineurs (**Vierling, 2003**).

La composition chimique du lait de vache est représentée dans le tableau ci-dessous

Tableau III : Composition du lait de vache (g/l) (Alais *et al.*, 2008)

Composants	Composition (g/l)	Etat physique des composants
Eau	905	Eau libre plus eau liée (3.7%)
Glucides (lactose)	49	Solution
Lipides	35	Emulsion des globules gras
Matière grasse proprement dite	34	(3 à 5 µm)
Lécithine (phospholipides)	0.5	
Insaponifiable (stéroïls, carotènes, tocophérols)	0.5	
Protéines	34	
Caséine	27	Suspension micellaire phospho-caséinate de calcium (0.08 à 0.12 µm)
Protéines solubles (globulines, albumines)	2.5	Solution (colloïdale)
Substances azotées non protéiques	1.5	Solution (vraie)
Sels	9	Solution ou état colloïdal
De l'acide citrique (en acide)	2	
De l'acide phosphorique (P ₂ O ₃)	2.6	
De l'acide chlorhydrique (NaCl)	1.7	
Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz dissous)	traces	
Extrait sec total	127	
Extrait sec non gras	92	

1.2.1. Eau

Quantitativement, l'eau est le constituant le plus important du lait. Ce dernier est très riche en eau : ½ litre de lait (2 grands verres) apporte 450 ml d'eau. Il participe donc à la couverture des besoins hydriques de l'organisme (Fredot, 2005).

1.2.2. Minéraux

La fraction minérale bien que mineure dans la composition du lait, est considérée très importante tant d'un point de vue nutritionnel que technologique. Le lait et ses dérivés constituent dans la ration alimentaire le principal apport de calcium et de phosphore. Les sels minéraux du lait et des produits laitiers se répartissent schématiquement en deux groupes : les uns sont solubles dans la phase aqueuse du lait ou des produits laitiers, les autres sont à l'état solide, cristallisé ou amorphe (Gaucheron *et al.*, 2004).

1.2.3. Glucides

Les glucides sont essentiellement représentés dans le lait par le lactose, cependant le lait contient deux types de glucides :

- les glucides libres et dialysables (oligoholosides).
- les glucides combinés en glycoprotéines et non dialysables.

Le lactose constitue la matière carbonée principale pour le développement des bactéries lactiques (**Jeantet et al, 2007**). C'est un solide blanchâtre se trouvant en solution vraie dans le sérum du lait. Les propriétés physiques qui comptent le plus dans les transformations industrielles sont la solubilité, la cristallisation et le pouvoir sucrant (**Amiot et al, 2002**).

1.2.4. Matière grasse

Les matières grasses du lait se compose principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de β – carotène. Le tableau suivant indique les proportions des différents constituants de la fraction lipidique du lait (**Grappin R. et Pochet S., 1999**).

Tableau IV : Composition lipidique du lait (**Alais et al., 2008**)

Constituants	Proportions (%)
Glycérides	98
Phospholipides	01
Lipoïdes insaponifiables	01

1.2.5. Matière azotée

On distingue deux grands groupes de protéines dans le lait : les caséines et les protéines du lactosérum :

- Les caséines : Elles forment près de 80% de toutes les protéines présentes dans le lait, les caséines se regroupent sous forme sphérique appelée micelle constituées de 92 % de protéines et de 8% de minéraux (**Amiot et al, 2002**).
- Les protéines du lactosérum : Les protéines du sérum représentent environ 20% des protéines totales du lait. Elles se retrouvent sous forme de solution colloïdale. Les

deux principales protéines sont : la β -lactoglobuline et la α -lactalbumine. Les autres protéines du lactosérum sont les immoglobulines (**Eigel et al, 1984**).

1.2.6. Vitamines

Le lait et ses dérivés sont des sources notables en vitamines, où on distingue :

- Les vitamines liposolubles associées à la matière grasse (vitamine A, D, E et K).
- Les vitamines hydrosolubles de la phase aqueuse du lait (vitamines du groupe B, C, H, acide folique, acide pantothénique, niacine et niacinamide) (**Adrian, 1987**).

1.3. Valeur nutritionnelle du lait

Le lait et les produits laitiers constituent un des quatre grands groupes reconnus d'une alimentation saine. Ces recommandations reposent surtout sur le fait que le lait et les produits laitiers constituent une bonne et excellente source de certains nutriments pour la santé, autant en ce qui concerne la croissance normale des enfants que le maintien en santé et la prévention des maladies à tout âge de la vie. Par ailleurs, les concentrations ou l'intégrité de ces mêmes nutriments peuvent subir des modifications à la suite des différents traitements industriels appliqués au lait (**Amiot et al., 2002**).

1.4. Caractéristiques du lait

1.4.1. Caractéristiques organoleptiques

1.4.1.1. Couleur

Le lait est un fluide aqueux opaque d'une couleur blanche matte porcelaine due à la diffusion de la lumière à travers les micelles de colloïdes. Sa richesse en matières grasses lui confère une teinte un peu jaunâtre (selon sa teneur en β -carotène) (**Martin, 2000**).

1.4.1.2. Odeur

Elle est toujours faible et variable en fonction de l'alimentation de la femelle productrice. La présence de la matière grasse dans le lait lui confère une odeur caractéristique. Au cours de sa conservation, le lait est caractérisé par une odeur aigüe due à l'acidification par l'acide lactique (**Vierling, 1998**).

1.4.1.3. Saveur

Il est difficile de définir cette caractéristique du lait normal car elle provient de l'association d'éléments diversement appréciés selon l'observateur. En effet, on distingue la

saveur douce du lactose, la saveur salée du NaCl, la saveur particulière de lécithine qui s'équilibre et qui est atténuée par la masse des protéines (**Martin, 2000**).

1.4.2. Caractéristiques physico-chimiques :

Le lait est un système complexe constitué d'une solution vraie, d'une suspension colloïdale et d'une émulsion. Il a une densité de 1.032 à 20°C, l'homogénéisation multiplie la viscosité du lait de 1.2 à 1.4. Son acidité naturelle varie entre 0.13 et 0.17g pour 100g de lait et le pH se situant entre 6.6 et 6.8 avec un point de congélation variant entre -0.530°C à -0.575°C et un point d'ébullition légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau soit 100.5°C (**Fredot, 2012**).

1.4.3. Caractéristiques microbiologiques

Le lait et les produits laitiers peuvent contenir des micro-organismes pathogènes pour l'homme et être des agents de transmission des maladies contagieuses. Ces germes dont les origines sont variées (mamelle, environnement, homme...) peuvent être à l'origine de toxoinfections alimentaires en infectant l'organisme du consommateur (**Jeantet et al, 2008**).

1.4.3.1. Flore indigène ou originelle

Lorsque le lait provient d'un animal sain et qu'il est prélevé dans des conditions aseptiques il devrait contenir moins de 5000 UFC/ml. La flore indigène des produits laitiers se définit comme l'ensemble des micro-organismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis. Ces micro-organismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation, la race et d'autres facteurs. Les genres dominants de la flore indigène sont principalement des micro-organismes mésophiles, dont les principaux sont *Lactobacillus*, *Streptococcus*... (**Larpen, 1996**).

1.4.3.2. Flore de contamination

La flore de contamination est l'ensemble des micro-organismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits laitiers. L'ensemble des micro-organismes qui s'ajoute au lait extrait du pis de vache, sont considérés comme une flore de contamination, d'altération et pathogène. Les principaux micro-organismes de contamination sont *Clostridium sp*, *Staphylococcus aureus*... (**Guiraud, 2004**).

2. Yaourt

2.1. Définition

La dénomination yaourt ou yoghourt est réservée au lait fermenté obtenu par le développement des seules bactéries lactiques, *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, qui doivent êtreensemencées simultanément (**Mahaut et al., 2000**).

2.2. La composition du yaourt

Le yaourt diffère d'un type à un autre selon la composition en protéine, lipide, glucide, calcium, sodium, potassium, phosphore.

2.2.1. Glucides

La teneur du yaourt en lactose résiduel est de l'ordre de 4,5 g pour 100 g. La dégradation du lactose conduit à la formation de galactose, de glucose et d'acide lactique qui passe d'un niveau pratiquement nul à un niveau de 0,8 à 1 %, dont 50 à 100 % d'acide lactique selon les ferments (**Syndifrais, 1997**).

2.2.2. Protéines

Les bactéries Lactiques produisent des enzymes qui hydrolysent partiellement les protéines du lait. De ce fait, un yaourt contient plus de peptides et d'acides aminés libres (**Rasic et al., 1971**).

2.2.3. Matière grasse

Selon le *codex alimentarius*, la teneur en matière grasse doit être au minimum égal à 3% dans le cas des yaourts naturels, sucrés ou aromatisés, compris entre 0.5% et 3% dans le cas des yaourts partiellement écrémés ou maigres et au maximum égal à 0.5% dans le cas des yaourts écrémés.

2.2.4. Minéraux

C'est surtout la richesse en calcium du yaourt et des laits fermentés qui est à noter. La poudre de lait ajoutée au lait lors de la fabrication des yaourts et autres laits fermentés augmente en effet la teneur en calcium par rapport au lait d'origine (**Dupin, 1992**).

2.2.5. Vitamines

La composition des vitamines du yaourt dépend principalement de celle du lait utilisé. De plus, elle sera modulée au cours de la fermentation, dépendant aussi des souches employées. La composition en vitamines liposolubles A et D varie en fonction de leur teneur dans le lait utilisé (entier ou partiellement écrémé) (**Syndifrais, 1997**).

2.3. Apports nutritionnels du yaourt

Les apports nutritionnels du yaourt dépendent de sa composition chimique, du lait utilisé et de la procédure de production par exemple un traitement thermique du yaourt à 70°C pendant 10 minutes entraîne des diminutions importantes des teneurs en vitamines du groupe B et en enzymes (De Felip *et al.*, 1977 ; Syndifrais, 1997).

Les différents apports nutritionnels sont démontrés dans le tableau V

Tableau V : Apports nutritionnels du yaourt (100 gramme)
(Mahaut *et al.*, 2000)

	<i>Protéine</i>	<i>Lipide</i>	<i>Glucide</i>	<i>Calcium</i>	<i>Sodium</i>	<i>Potassium</i>	<i>Phosphore</i>	<i>Valeur</i> <i>énergétique</i>
	<i>g</i>	<i>g</i>	<i>g</i>	<i>mg</i>	<i>mg</i>	<i>mg</i>	<i>mg</i>	<i>KJ</i>
<i>Yaourt nature</i>	4.15	1.2	5.2	174	57	210	114	201
<i>Yaourt aromatisé</i>	3.2	3.2	12	140	50	190	106	372
<i>Yaourt brassé</i>	4.3	1.8	5.2	165	40	210	114	230

2.4. Effets bénéfiques du yaourt

Le yaourt a une valeur nutritive similaire au lait puisqu'il contient une quantité importante de protéines, de calcium, de potassium et de phosphore, et ce en ne fournissant que peu de calories. De plus, le yaourt est une source importante de vitamines A, B1 et B2, mais son contenu aurait tendance à diminuer au cours de l'entreposage du produit (Deeth et Tamime, 1981).

De plus, le transit intestinal du yaourt est deux fois plus long que celui du lait, ce qui améliore l'absorption des nutriments. Ce produit se différencie du lait par le fait qu'il est plus facile à digérer, tant au niveau de son contenu protéique qu'au niveau de son contenu en carbohydrates (Deeth et Tamime, 1981).

La propriété bénéfique la plus reconnue dans les yaourts est celle de permettre aux personnes intolérantes au lactose de digérer un produit laitier. Les lactases des bactéries du yaourt hydrolysent de 20% à 30% du lactose contenu dans le produit et continuent leur action au niveau de l'intestin. Cette propriété réduirait les inconforts associés à une mauvaise digestion du lactose (Deeth et Tamime, 1981 ; Piquet *et al.*, 2007).

Chapitre IV

Grenade

1. Historique

La grenade *Punica granatum L.*, est une espèce de climat tempéré, principalement cultivée dans la région méditerranéenne, l'Asie méridionale et dans plusieurs pays de l'Amérique du nord et l'Amérique du sud (Stover et Mercure, 2007).

La grenade est souvent mentionnée dans la mythologie grecque, ainsi que dans la Bible et le Coran, preuve que ce fruit est connu et consommé depuis des millénaires. Outre la dimension symbolique dont elle était revêtue, la grenade était appréciée à l'époque pour les propriétés vermifuges de son écorce, mais aussi pour sa pulpe désaltérante et son aptitude à se conserver et à résister aux chocs, grâce à son écorce rigide. Les voyageurs et les caravaniers l'emportaient donc avec eux comme provision de bouche : le grenadier s'est ainsi rapidement répandu vers l'Est (Asie) et vers l'Ouest (bassin méditerranéen), grâce aux pépins du fruit. Cet arbre fruitier est aujourd'hui cultivé un peu partout dans le monde, sous les climats chauds et secs (Calin Sanchez et al., 2005).

2. Composition chimique de la partie comestible de la grenade

La partie comestible de la grenade représente environ 50% du poids total d'une grenade dont 80% sont les arilles (partie charnue) et 20% les pépins (partie ligneuse).

La composition des graines de grenade est la suivante : eau (85%) ; sucres (10%), principalement fructose et glucose ; acides organique (1,5%) essentiellement acide ascorbique, citrique et malique ; composés bioactifs tels que les polyphénols et les flavonoïdes (essentiellement les anthocyanines) (Calin Sanchez et al., 2005).

En outre, les graines de grenade sont une source importante de lipides, car les pépins ont une teneur en acide gras qui oscille entre 12 et 20 % de leur poids total (poids sec) (Calin Sanchez et al., 2005).

La composition chimique de la grenade est présentée dans le tableau ci-dessous (Tableau VI) :

Tableau VI : Composition du fruit de grenadier (la pulpe avec pépin)
(Favier *et al*, 1993)

Constituants	Unité	Moyenne	Minimum	Maximum
Proportion comestible	%	56	35	65
Energie	Kcal/100g	60		
Eau	g/100g	80.2	72.6	84
Protéines	g/100g	1	0.3	1.6
Lipides totaux	g/100g	0.3	Traces	0.9
Glucides disponibles	g/100g	13.7		
Fructose	g/100g	6.3		
Glucose	g/100g	7		
Saccharose	g/100g	0.4		
Amidon	g/100g	0		
Fibres alimentaires	g/100g	3.5	3.1	6.4
Sodium	mg/100g	4	2	7
Potassium	mg/100g	247	200	380
Calcium	mg/100g	13	3	28
Magnésium	mg/100g	6	3	11
Fer	mg/100g	0.97	0.2	2.1
Cuivre	mg/100g	0.12	0.07	0.17
Zinc	mg/100g	0.4		
Phosphore	mg/100g	25	8	37
β-carotène	µg/100g	40	31	65
Vitamine C	mg/100g	20	4	29
Thiamine	mg/100g	0.05	0.01	0.09
Riboflavine	mg/100g	0.03	0.01	0.06
Niacine	mg/100g	0.3	0.1	0.4
Acide pantothénique	mg/100g	0.6	0.6	0.6
Vitamine B6	mg/100g	0.2	0.1	0.3
Acide malique	mg/100g	170	100	500
Acide citrique	mg/100g	800	500	1700

3. L'écorce du fruit

L'écorce du fruit du grenadier est également appelée *malicorium*. Il s'agit de la partie dure du fruit.

Elle est généralement utilisée séchée, sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur, un peu verruqueux, brillants, jaunâtres sur la face intérieure concave, portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient appliquées.

La saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente (Planchan et Collin, 1875).

3.1. Composition de l'écorce de grenade

La concentration en macronutriments des écorces de grenades varie en fonction de plusieurs facteurs (variétés, climat, nature du sol, etc.).

La peau de la grenade est composée à 80% d'eau, de polysaccharides complexes ($\approx 8\%$), dont des polysaccharides solubles ($\approx 5\%$), représentés par des pectines et de l'hémicellulose. Elle contient aussi des minéraux, dont le potassium, calcium, magnésium, phosphore et sodium (Viuda et al. 2010).

L'écorce du fruit contient deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide ellagique. Elle renferme également des acides hydroxycinnamiques, des dérivés de flavones, des molécules de coloration jaune et des anthocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades. De nombreux ellagitanins sont aussi présents, tels que la punicaline, la punicalagine, la granatine A et la granatine B (Lansky et al., 2007).

3.2. Activité et intérêt de l'écorce

3.2.1. Activité anticancéreuse

Les cellules cancéreuses ont la capacité de redevenir des cellules saines par un processus appelé « différenciation ». Les flavonoïdes peuvent induire des différenciations avec une toxicité plus faible que les rétinoïdes, ce qui les rend intéressants pour le traitement de la leucémie, mais aussi pour la lutte contre le cancer de la prostate et d'autres types de cancers tels que celui de l'intestin et du sein (Madlener et al., 2006).

3.2.2. Activité antimicrobienne

L'écorce du fruit de *Punica granatum* possède, *in vitro*, une activité antibactérienne. La combinaison unique des tanins et des alcaloïdes issus de cette écorce, ainsi que leur action synergique, explique probablement cette activité antibactérienne non retrouvée dans d'autres fruits également riches en tanins et alcaloïdes (Prashanth, 2001).

3.2.3. Activité antiulcéreuse

L'écorce de grenade séchée en poudre présente un efficace traitement contre l'acidité d'estomac et l'ulcère d'estomac (Championnière, 1850). L'extrait de peau de grenade possède une activité inhibitrice des ulcères de l'estomac induits par l'aspirine et l'éthanol grâce à ses propriétés antioxydantes.

Partie expérimentale

Notre travail consiste à étudier la viabilité des bifidobactéries en culture pure et en culture mixte, en présence de l'extrait d'écorce de grenade riche en composants bioactifs (polyphénols solubles, tanins et les anthocyanidines).

1. Echantillons

La source de notre étude était un yaourt fabriqué et commercialisé en Algérie à base de bifidobactéries et des bactéries classiques d'un yaourt *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

La marque étudiée est Activia de Danone Djurdjura d'Algérie dont le processus de fabrication a été suivi au sein de la laiterie lors d'un stage.

Un échantillonnage aléatoire a été effectué au niveau des marchés par prélèvement des échantillons transportés et conservés sous froid.

2. Milieux de culture utilisés

2.1. Milieux de culture utilisés pour isoler les bifidobactéries

TOS-Agar (Transgalactosylated oligosacharides Agar), additionnée d'une solution du Li-Mupirocin.

MRS cystéiné (Man Rogosa Sharpe + 0.05% de cystéine HCl).

2.2. Milieux de culture pour les bactéries lactiques

M17 pour *Streptococcus thermophilus*

MRS pour *Lactobacillus bulgaricus*

2.3. Milieu lait

Nous avons utilisé le lait écrémé UHT Candia Silhouette pour la conservation et le suivi de la viabilité des souches bactériennes.

2.4. Préparation des extraits d'écorce de grenade

Après séchage au soleil, broyage et tamisage des écorces de grenade, nous avons réalisé des solutions aqueuses à différentes concentrations (p/v) avec la poudre obtenue : 0.01% - 0.03% - 0.09% - 0.1% - 0.3% - 0.9% - 1% - 3% et 6%.

3. Isolement des souches du yaourt

3.1. Isolement des bifidobactéries

A partir des échantillons nous avons pris 1ml du yaourt et nous avons réalisé des dilutions décimales dans la solution tryptone sel cystéine (TSC).

Environ 1ml des dilutions 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} a étéensemencé en masse dans le milieu TOS-MUP, deux boites pour chaque dilution. Deux témoins sont ajoutés, un contenant le milieu de culture uniquement, l'autre le milieu et la solution TSC.

L'incubation est faite dans une jarre à 37°C pendant 72h en présence d'un système d'anaerocult qui absorbe l' O_2 .

3.2. Isolement des bactéries lactiques

Environ 1ml des dilutions 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} a étéensemencé en masse dans le milieu MRS pour l'isolement des lactobacilles. L'incubation est faite dans une jarre avec un système d'anaerocult à 45°C pendant 72h.

L'isolement des streptocoques est fait par l'ensemencement en masse des dilutions dans le milieu M17. L'incubation est faite à 44°C pendant 48h.

3.3. Purification des souches

D'une part, les colonies obtenues ont étéensemencées dans des bouillons : MRSc pour les bifidobactéries, MRS pour les lactobacilles et M17 pour les streptocoques. Après incubation, elles ont étéensemencées à nouveau sur des géloses (MRSc, MRS et M17 respectivement).

D'autre part, elles ont été repiquées en surface (en stries) sur les milieux gélosés (MRSc, MRS et M17).

4. Identification des souches

A partir des boites obtenues après repiquage, nous avons réalisé les tests d'identification.

La coloration de Gram et la recherche de la catalase ont été réalisées pour les trois souches, les autres tests ont été réalisés uniquement pour l'identification des bifidobactéries.

4.1.Observation microscopique

4.1.1. Observation à l'état frais

Elle permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie et de leur mode de groupement (**Dellaras, 2014**).

Pour cette observation, préparer et sécher à la flamme un frottis sur lame. Couvrir cette dernière avec du bleu de méthylène. Après 1min la rincer à l'eau distillée. Sécher, couvrir par une lamelle et observer au microscope optique.

4.1.2. Coloration de Gram

Cette façon de colorer les cellules bactériennes permet de décrire la morphologie des bactéries et leur classification en 2 groupes : Gram positif et Gram négatif (ISO 7218, 2007).

Pour réaliser la coloration, préparer un frottis d'une colonie bactérienne pure, et le fixer à la flamme. Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1min et rincer à l'eau distillée. Puis, verser du lugol et laisser agir 1min avant de le rincer à l'eau distillée. Ensuite, décolorer à l'éthanol (96%), ne pas dépasser 30s et rincer à l'eau distillée. Recolorer avec de la safranine pendant 10 à 30s, rincer à l'eau distillée et sécher la lame au-dessus de la flamme du bec bensen. La safranine peut être remplacée par de la fuschine de Zichl diluée 1/10 pendant 1min. Enfin observer au microscope à l'objectif à immersion (grossissement X100) (**Delarras, 2014**).

4.2.Recherche de catalase

Un petit inoculum bactérien est introduit dans un tube contenant 2 à 3ml de H₂O₂. Un dégagement de bulles s'observe avec les germes catalase positive (**Hart et Shears, 1997**).

4.3.Recherche de l'oxydase

A partir d'un milieu solide, prélever une quantité suffisante de culture et la déposer sur un disque imprégné du réactif placé sur une lame à l'aide d'un instrument n'oxydant pas le réactif (**Joffin et Leyral, 2006**).

4.4.Production d'indole

Une colonie de bifidobactéries est inoculée dans un tube d'eau peptonée exempte d'indole additionnée d'huile de vaseline et incubée en anaérobiose à 37°C/48h. La recherche d'indole a été effectuée à l'aide du réactif Kovacs (**Beerens, 1990 ; Crociani et al, 1996**).

4.5. Production de gélatinase

Des tubes de gélatine nutritive sont ensemencés par piqûres centrales puis recouvertes de l'huile de vaseline. L'incubation est effectuée à 37°C/48h. La lecture se fait par la diffusion d'un pigment noir ou non (Beerens, 1990 ; Crociani *et al.*, 1996).

4.6. Croissance en aérobiose

Une culture sur milieu gélosé a été préparée pour les souches de bifidobactéries et a été incubée à 37°C en aérobiose pendant 72h (Zerrouki, 2012).

4.7. Production de gaz

Pour déterminer la production de CO₂ de la fermentation du glucose par les souches de bifidobactéries, une colonie d'une culture pure a été ensemencée dans le milieu bouillon MRSc contenant une cloche du Durham et incubé à 37°C pendant 24h en anaérobiose. La présence de gaz dans la cloche indique qu'il y a production de CO₂ (Garvie, 1984).

4.8. Test de fermentation des sucres

Un tube de 10ml de milieu MRSc a été ensemencé avec une colonie de bifidobactéries et incubé en anaérobiose à 37°C/48h. Procéder à une centrifugation 3000 tours/min pendant 15min.

Le culot une fois récupéré est rincé 2 fois à l'eau physiologique cystéinée 0.05% puis une suspension épaisse est réalisée avec 20 gouttes d'eau physiologique cystéinée 0.05%.

Le milieu MRSc sans sucre additionné d'indicateur de pH pourpre de Bromocrésol à raison de 0.0004% et auquel on ajoute les sucres testés à une concentration finale de 2% puis le milieu est ensemencé avec 1% de la suspension bactérienne.

Les cultures sont incubées en anaérobiose en présence de l'huile de vaseline stérile à 37°C/48h.

La fermentation d'un sucre donné par la souche bactérienne testée se traduit par la fermentation d'acide qui se manifeste par le virage de la coloration en jaune (Abdelmalek, 2008).

4.9.L'antibiogramme

La sensibilité et la résistance des bifidobactéries ont été réalisées par la technique de diffusion sur milieu MRSc solide selon la 6^{ème} édition 2011 de la standardisation de l'antibiogramme.

A partir d'une culture pure, des colonies de bifidobactéries ont été prélevées par un écouvillon. L'écouvillon a été bien homogénéisé avec de l'eau physiologique à 0.05% de cystéine. La suspension a été utilisée à une densité optique située entre 0.08 et 0.1 (lue à 625nm).

L'écouvillon a été frotté sur la totalité de la surface gélosée en le passant sur la périphérie de la gélose. A l'aide d'une pince stérile, les disques d'antibiotiques ont été déposés sur la gélose.

Les disques d'antibiotiques utilisés sont les suivants : Ampicilline (10µg), Gentamicine (10µg), Pénicilline G (10UI), Cefoxitine (30µg), Amoxicilline (25µg), Kanamycine (30µg), Oxacilline (1µg), Vancomycine (30µg), Cefotaxime (30µg).

5. Etude des aptitudes technologiques des bifidobactéries en présence de l'extrait d'écorce de grenade

5.1.Préparation de l'inoculum

Des tubes de lait écrémé et stérile contenant 0.05% de cystéine et 0.5% d'extrait de levure ont été inoculés avec une solution d'eau physiologique avec 0.05% de cystéine chargée de colonies de bifidobactéries jusqu'à une densité optique supérieure à 0.2 (lue à 625nm). Une couche de l'huile de vaseline a été ajoutée. Incubation en anaérobiose (tubes fermés avec du papier parafilm dans une jarre avec une bougie) 37°C pendant 72h.

5.2.Etude de la croissance des bifidobactéries dans le lait écrémé à 0.05% de cystéine en présence de l'extrait d'écorce de grenade

Des tubes contenant 10ml du lait écrémé à 0.05% de cystéine ont étéensemencés par 1% de l'inoculum. 1% de l'extrait d'écorce de grenade a été ajouté à différentes concentrations (p/v) (0.01% - 0.03% - 0.09% - 0.1% - 0.3% - 0.9% - 1% - 3% - 6%).

Pour l'incubation en anaérobiose, l'huile de vaseline a été ajoutée. Les tubes ont été fermés avec du papier parafilm dans une jarre avec une bougie, incubés à 37°C pendant 3h, 6h et 24h.

Après incubation, les dilutions décimales ont été préparées etensemencées sur milieu gélosé MRSc et incubées à 37°C pendant 48h en anaérobiose (boites fermées avec du papier parafilm dans une jarre + bougie).

Seules les boites qui contiennent entre 15 et 300 colonies sont retenues pour le dénombrement. Le taux de croissance (μ) a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\mu = (\log X_t - \log X_0) / (t_t - t_0)$$

Où : X_t est le nombre de colonies (UFC/ml) à temps t_t

X_0 est le nombre de colonies (UFC/ml) à temps t_0

5.3.Détermination de la viabilité des bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de 0.05% de cystéine en présence de l'extrait d'écorce de grenade pendant le stockage à 4°C

La viabilité des bifidobactéries a été étudiée sur les tubes inoculés, incubés à 37°C pendant 24h et conservés à 4°C pour des périodes de 7j et 14j. Le dénombrement a été fait sur des boites de MRScensemencées par des dilutions décimales.

La vitesse moyenne de déclin de bifidobactéries pendant le stockage a été calculée comme suit :

$$VD_7 = (\log_{10} X_7 - \log_{10} X_0) / 7$$

$$VD_{14} = (\log_{10} X_{14} - \log_{10} X_7) / 7$$

$$VMD = (VD_7 + VD_{14}) / 2$$

Où : X_0 , X_7 et X_{14} sont le nombre de colonies (UFC/ml) à temps t_0 , t_7 et t_{14}

VD_7 et VD_{14} sont les vitesses de déclin entre (0-7jours) et (7-14jours)

VMD c'est le vitesse moyenne du déclin en jours^{-1} (j^{-1})

5.4.Détermination de l'acidité titrable

L'acidité produite a été titrée à 0h, 3h, 6h, 24h d'incubation à 37°C et après 7 et 14 jours de stockage.

Quelques gouttes de phénolphtaléine à 1% dans l'alcool ont été additionnées au lait fermenté. Le titrage a été effectué à l'aide d'une burette avec de la soude (N/9). Le résultat est considéré positif quand le virage de la couleur blanche du lait au rose persiste.

L'acidité est exprimée en degré Dornic (°D) qui correspond au nombre de 1/10 de ml de soude Dornic N/9 nécessaire pour assurer la neutralisation totale de l'acide : Acidité en °D = le volume de NaOH x 10 (1°D = 0.1g d'acide lactique dans 1l du lait).

6. Etude des aptitudes technologiques des bifidobactéries en culture mixte avec *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* dans le lait écrémé en présence de l'extrait d'écorce de grenade

6.1. Etude de la croissance des bifidobactéries et des bactéries lactiques dans le lait écrémé en présence de l'extrait d'écorce de grenade

Le lait écrémé a été inoculé par 1% d'inoculum de bifidobactéries et par 0.0013% des bactéries lactiques lyophilisées ; correspondant à (5×10^8 UFC/ml) de bifidobactéries, (25×10 UFC/ml) de *Lactobacillus bulgaricus* et (75×10^7 UFC/ml) de *Streptococcus thermophilus*. L'extrait d'écorce de grenade a été ajouté à des concentrations de 0.3% et 0.9%. Le lait a été incubé à 42°C pour des durées de 3h et 6h.

Les souches de bifidobactéries, *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* ont été dénombrées respectivement sur leurs milieux suivants : MRSc, MRS et M17. L'incubation pendant 48h a été faite à 37°C en anaérobiose (papier parafilm + jarre + bougie) pour les bifidobactéries, à 42°C en anaérobiose (papier parafilm + jarre + bougie) pour les lactobacilles et en aérobie pour les streptocoques.

6.2. Détermination de la viabilité des bifidobactéries en culture mixte dans le lait écrémé et en présence de l'extrait d'écorce de grenade

Les tubes du lait écrémé à différentes concentrations (0.3% et 0.9%) de l'extrait d'écorce de grenade et inoculés par les bifidobactéries, *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* après 6h d'incubation à 42°C ont été stockés à 4°C pour des périodes de 7 jours.

Le dénombrement a été fait après 48h d'incubation à 37°C en anaérobiose sur MRSc pour les bifidobactéries, à 42°C en anaérobiose sur MRS pour *Lactobacillus bulgaricus* et en aérobie sur M17 pour *Streptococcus thermophilus*.

6.3. Détermination de l'acidité titrable

L'acidité a été titrée à 0h, 3h, 6h d'incubation à 42°C et après 7 jours de stockage à 4°C.

Des gouttes de phénolphtaléine à 1% dans l'alcool ont été additionnées au lait. Le titrage a été effectué par la soude Dornic (N/9).

Résultats
Et
Discussion

1. Diagramme de fabrication du yaourt « Activia » de DDA :

Afin de fabriquer le yaourt « Activia », l'unité DDA suit un diagramme contenant l'ensemble des étapes de fabrication ; de la réception des matières premières jusqu'au conditionnement (figure 01).

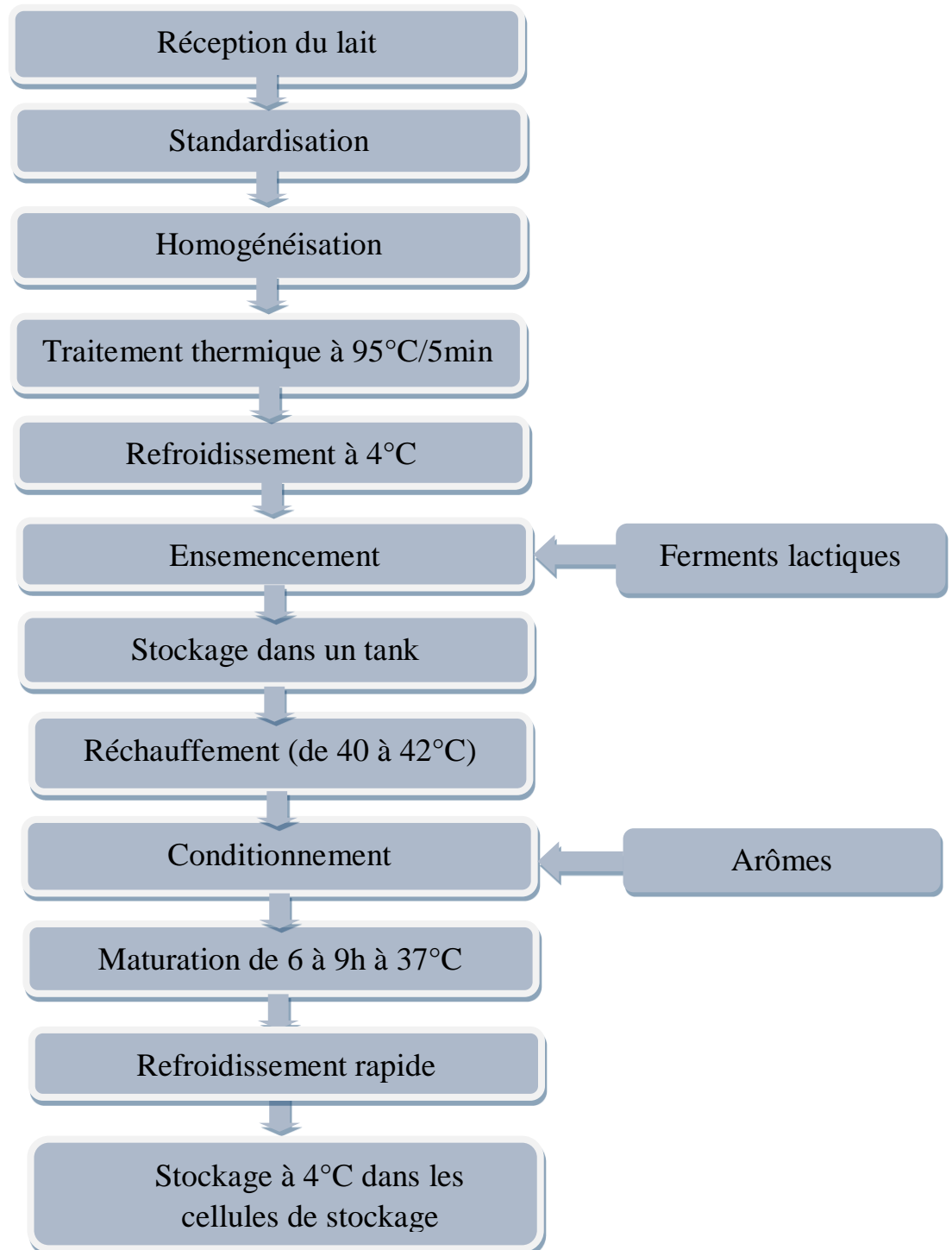


Figure 01 : Diagramme de fabrication du yaourt « Activia » de DDA

2. Identification des bactéries lactiques

2.1. Aspect macroscopique

L'observation macroscopique a permis de décrire les colonies obtenues sur milieu MRS solide à pH 5.4 après incubation à 45°C pendant 72h et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques. Les colonies observées sont petites, bien isolées, de couleur blanchâtre, forme ronde et avec un diamètre de 1 à 2mm. Ces critères macroscopiques de *Lactobacillus* ont été obtenus par **Badis et al** en **2005**.

Les colonies isolées sur milieu M17 solide à pH 7 après incubation à 45°C pendant 48h sont petites, à un diamètre inférieur à 1mm, blanches, rondes ou lenticulaires. Ces résultats sont les critères macroscopiques de *Streptococcus* obtenus aussi par **Badis et al, 2005**.

2.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique après coloration de Gram des frottis réalisés à partir des colonies apparues sur le MRS ainsi que celles apparues sur le M17 révèle que les souches sont des bactéries à Gram positif.

Lactobacillus sont des bactéries à Gram positif sous forme de bâtonnets courts (figure 02). Les mêmes résultats ont été obtenus par **Mami** en **2013**.

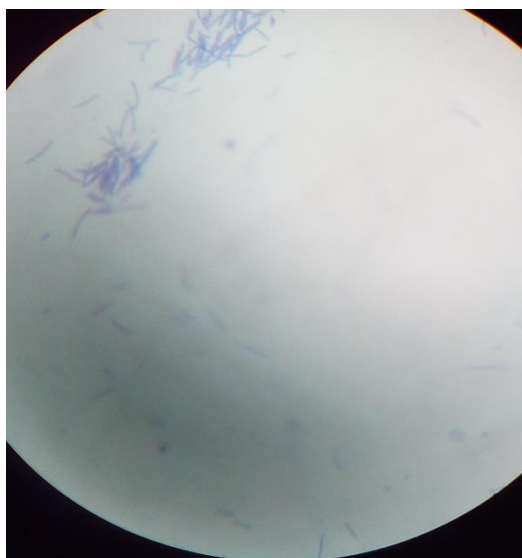


Figure 02 : *Lactobacillus* après coloration de Gram, observé sous microscope optique avec l'objectif à immersion (x100).

Streptococcus, bactéries à Gram positif, sont des cocci et des diplocoques (figure 03). **Badis et al, 2005** ont arrivé aux mêmes résultats.

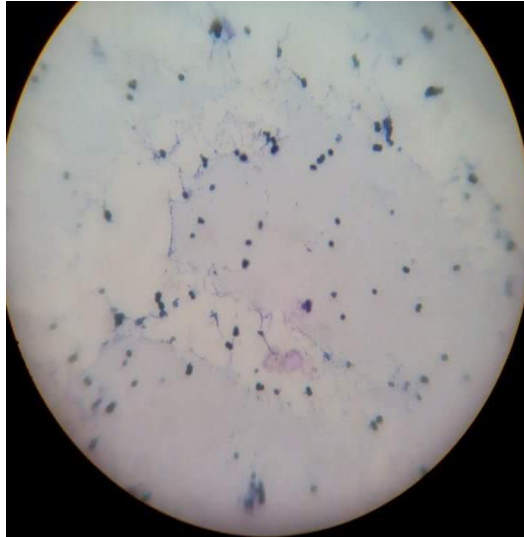


Figure 03 : *Streptococcus* après coloration de Gram, observé sous microscope optique avec l'objectif à immersion (x100).

2.3. Production de catalase

Les résultats ont montré que les deux souches sont à catalase négative (pas d'apparition des bulles d'air (figure 04)).



Figure 04 : test de catalase pour *Lactobacillus* (a) et *Streptococcus* (b)

Les résultats obtenus confirment l'appartenance des souches aux bactéries lactiques et d'après ceux de **Badis et al, 2005** il s'agit de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus*.

3. Identification de la souche de bifidobactérie

3.1. Critères morphologiques

3.1.1. Aspect macroscopique

Les colonies développées sur le milieu TOS agar et sur MRSc pH 6.8 sont des colonies de diamètre variable, blanchâtres et crèmes, à surface lisse et à contour régulier (figure 05). C'est l'aspect des bifidobactéries décrit par **Baratte-Euloge, 1992**.

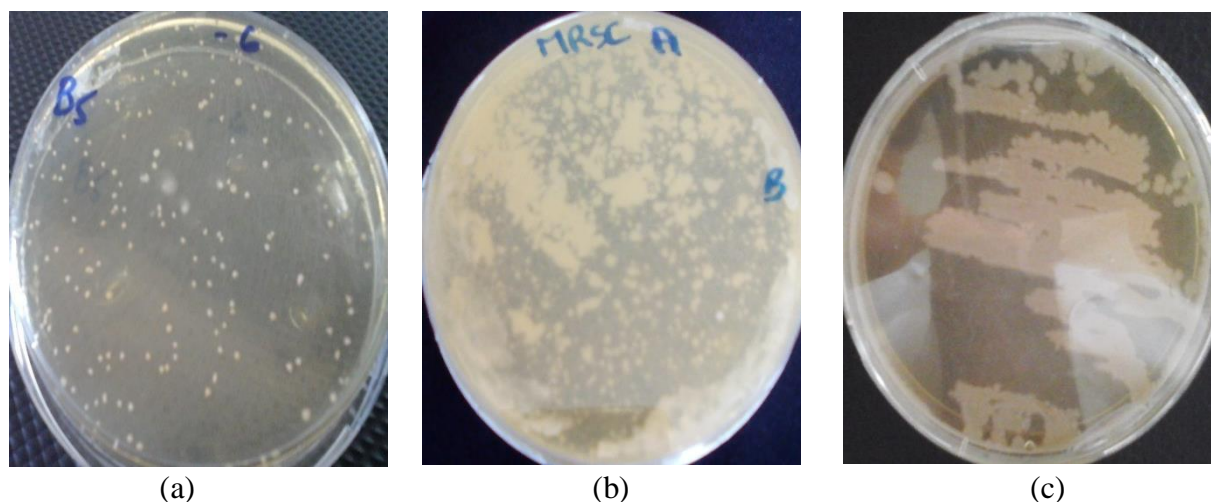


Figure 05 : Aspect macroscopique des bifidobactéries

a : L'aspect des colonies de bifidobactéries sur milieu TOS agar

b : L'aspect des colonies de bifidobactéries sur milieu MRSc

c : L'aspect des colonies de bifidobactéries repiquées en stries sur milieu MRSc

3.1.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique à l'état frais et après coloration de Gram montre la présence des bacilles en forme Y et V ou incurvés avec des extrémités bifurquées, sont isolés ou en amas et à Gram positif (figure 06).

D'après **Mahmoudi et al, 2013** les cellules formant les colonies sont Gram positif, caractérisées par des formes variables mais souvent des bifides qui sont typiques aux bifidobactéries.

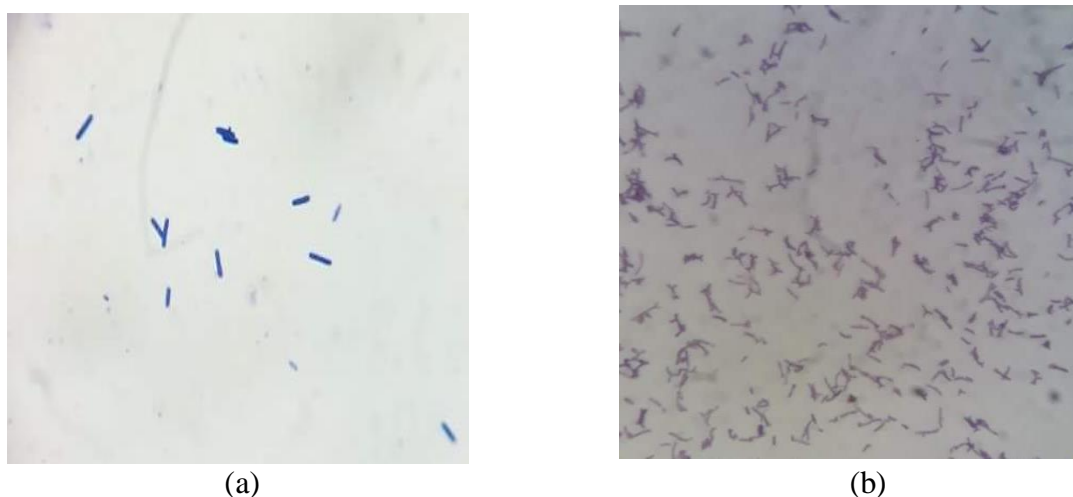


Figure 06 : Aspect microscopique des bifidobactéries, observé sous microscope optique avec l’objectif à immersion (x100)

a : Observation à l’état frais

b : Observation après coloration de Gram

3.2. Tests physiologiques et enzymatiques

La souche ne se développe pas en aérobiose et ne produit pas de gaz dans les cloches de durham des tubes contenant le bouillon MRSc incubés à 37°C pendant 72h.

Les résultats des tests enzymatiques et physiologiques sont résumés dans le tableau VII

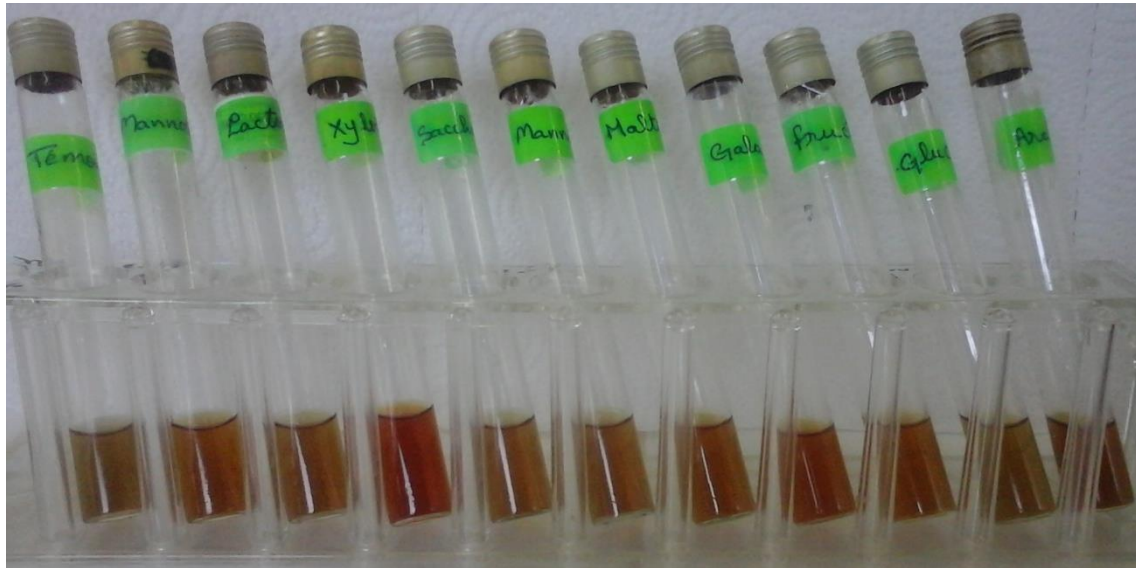
Tableau VII : Résultats des tests enzymatiques et physiologiques

	Catalase	Oxydase	Indole	Gélatinase	Croissance en aérobiose	Production de CO ₂ à partir du glucose
Réaction	négative	négative	négative	négative	négative	négative

La souche isolée est anaérobie strict, ne produit pas de gaz lors de la fermentation des sucres. Dépourvue de toute activité catalase, oxydase et gélatinase. Elle ne forme pas d’indole. Ces caractéristiques correspondent à ceux du genre *Bifidobacterium* rapportés par plusieurs auteurs (Baratte-Euloge, 1992 ; Crociani et al, 1996 ; Ventura et al, 2004 ; Leahy et al, 2005 ; Mahmoudi et al, 2013 ; Mattarelli et al, 2018).

3.2.1. Fermentation des sucres

L'identification de l'espèce de bifidobactérie repose sur l'étude du profil fermentaire de différents sucres (10 sucres) qui sont représentés dans la figure 07.



(a)



(b)

Figure 07 : Profil fermentaire de la souche *Bifidobacterium*

De gauche à droite : Témoin, Mannose, Lactose, Xylose, Saccharose, Mannitol, Maltose, Galactose, Fructose, Glucose et Arabinose.

a : avant l'incubation

b : après incubation à 37°C pendant 48h

La souche étudiée fermente tous les sucres utilisés à part l'arabinose et xylose. Les mêmes résultats ont été obtenus en 2007 par Reichart *et al.* (Tableau VIII)

Tableau VIII : Résultats du test de fermentation des sucres par la souche isolée

Sucres	Souche isolée	<i>Bifidus essensis</i> (Reichart et al.,2007)
Mannose	+	+
Lactose	+	+
Xylose	-	-
Saccharose	+	+
Mannitol	+	Faible
Maltose	+	+
Galactose	+	+
Fructose	+	+
Glucose	+	+
Arabinose	-	-

Le profil fermentaire de la souche isolée de « Activia » DDA est similaire à celui de la souche isolée de « Activia » de Danone de la Hongrie par **Reichart et al, 2007**.

Bifidus essensis, *Bifidus digestivum*, *Bifidus regularis* et *Bifidus actiregularis* ce sont des nominations données à la souche isolée du yaourt « Activia » de Danone qui diffèrent d'un pays à un autre pour refléter les différences dans la stratégie marketing mais dont le nom scientifique est *Bifidobacterium animalis* DN-173010 (**Anonyme, 2005**).

Les fabricants affirment que le *Bifidus regularis* ou le *Bifidus actiregularis* sont des noms de marque de *Bifidobacterium animalis* (**Yildez, 2010**).

Cependant, on peut dire que l'espèce de *Bifidobacterium* utilisée pour la production de ce lait fermenté est *Bifidobacterium animalis*.

Cette espèce regroupe deux sous espèces (*subsp. animalis* et *subsp. lactis*) (**Yildez, 2010**).

Une identification finale au niveau de la sous espèce est pratiquement impossible sans l'application des techniques faisant appel à la biologie moléculaire (**Masco et al, 2004**).

3.2.2. L'antibiogramme

L'étude de la sensibilité aux antimicrobiens pour ce type de bactéries strictement anaérobies et à croissance lente est difficile nécessitant parfois la répétition d'expérience (**Moubareck et al, 2005**).

Après plusieurs essais, la souche isolée a montré une résistance aux mêmes antibiotiques : ampicilline, pénicilline G et oxacilline.

Les résultats obtenus du test d'antibiogramme sont représentés dans le tableau IX

Tableau IX : Résultats de l'antibiogramme de la souche de bifidobactéries isolée

Antibiotique	Dose	Résultat
Ampicilline	10µg	Résistance
Gentamicine	10µg	Sensibilité
Penicilline G	10UI	Résistance
Cefoxitine	30µg	Sensibilité
Amoxicilline	25µg	Sensibilité
Kanamycine	30µg	Sensibilité
Oxacilline	1µg	Résistance
Vancomycine	30µg	Sensibilité
Cefotaxime	30µg	Sensibilité

Toutes les souches des bifidobactéries sont sensibles à l'amoxicilline (**Yazid et al, 2000**), à la cefotaxime et cefoxitine (**Moubareck et al, 2005**) et à la vancomycine (**Masco et al, 2006**). La sensibilité des bifidobactéries à la gentamicine est variable et dépend des espèces (**D'Aimmo et al, 2007**). La sensibilité à ces antibiotiques a été aussi observée chez la souche isolée lors de notre étude.

Selon nos résultats, la souche isolée est résistante à l'oxacilline alors que ceux de **Yazid et al, 2000** montrent que les zones d'inhibitions de l'oxacilline sont différentes selon les espèces.

Une résistance à l'ampicilline et à la pénicilline G a été observée ainsi qu'une sensibilité à la kanamycine, ces résultats sont différents de ceux obtenus par **Moubareck et al, 2004** ; **D'Aimmo et al, 2007**.

4. Etude des aptitudes technologiques des bifidobactéries

Le dénombrement des colonies acquises de la culture pure des bifidobactéries (figure 08) a permis de calculer le taux de croissance de la souche en présence de l'extrait de l'écorce de grenade (tableau X).

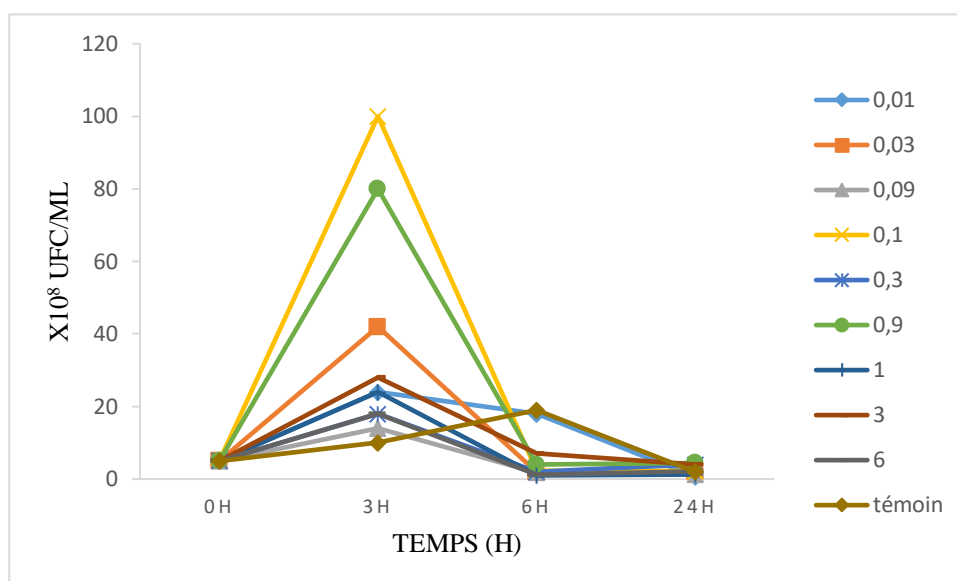


Figure 08 : Nombre de bifidobactéries ($\times 10^8$ UFC/ml) en culture pure en présence de l'extrait d'écorce de grenade

Les nombres de colonies les plus importants ($>10^9$ UFC/ml) ont été observés après 3h d'incubation pour toutes les concentrations de l'extrait d'écorce de grenade. Les taux les plus élevés ont été observés en présence de l'extrait aux concentrations (p/v) : 0.01% - 0.03% - 0.1% - 0.3% - 0.9% et 3% à des valeurs de 0.7 h^{-1} , 1 h^{-1} , 1.28 h^{-1} , 0.92 h^{-1} et 0.6 h^{-1} respectivement. A 6h d'incubation, une diminution a été observée pour toutes les concentrations. Le dénombrement à 24h a montré une stabilité du nombre de colonies pour les différentes concentrations.

Le plus faible taux de croissance observé après 3h d'incubation a été celui du témoin (0.23 h^{-1}) mais c'était le seul qui a eu une augmentation après 6h d'incubation (0.64 h^{-1}). Après 24 h, la charge du témoin a diminué.

Tableau X : Croissance des bifidobactéries (h^{-1}) en culture pure en présence de l'extrait d'écorce de grenade

C (%)	0.01	0.03	0.09	0.1	0.3	0.9	1	3	6	Témoin
Temps										
3h	0.52	0.7	0.34	1	1.28	0.92	0.52	0.6	0.43	0.23
6h	-0.09	-1.03	-0.68	-1.2	-0.73	-0.90	-1.06	-0.46	-0.90	0.64
24h	-1.11	0.02	-0.01	-0.01	0.04	0.04	0.01	-0.19	0.03	-0.12

Une propriété très importante d'une souche destinée à être utilisée comme probiotique est qu'elle doit demeurer viable pendant l'entreposage frigorifique avant la consommation du produit.

Un stockage du lait fermenté par une culture pure de bifidobactéries en présence de l'extrait d'écorce de grenade à 4°C pendant 7 jours a montré une faible diminution de la charge des bifidobactéries dans toutes les concentrations de l'extrait et le témoin aussi (témoin sans extrait). Après 14 jours de conservation, une stabilité a été observée (figure 09).

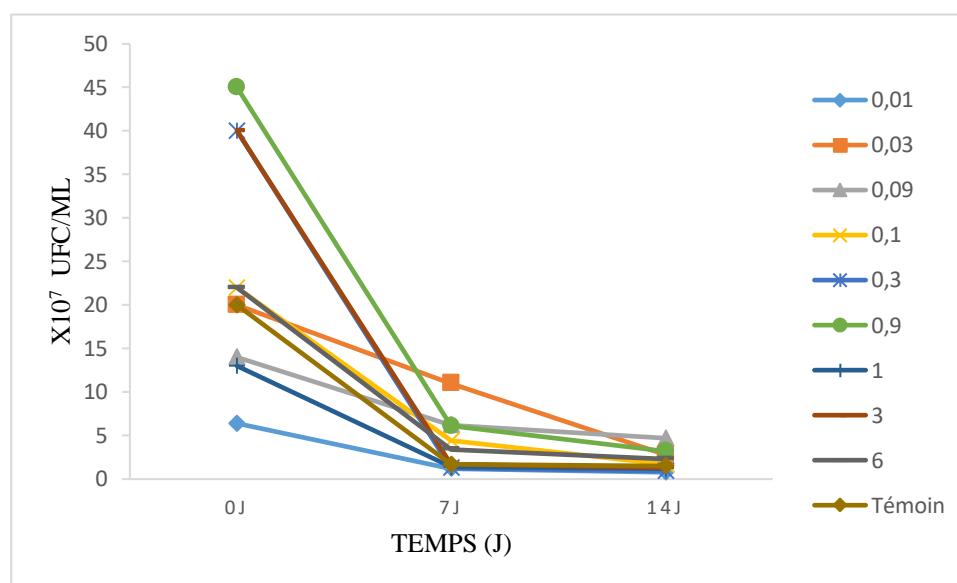


Figure 09 : La viabilité des bifidobactéries en culture pure en présence de l'extrait d'écorce de grenade, stockées à 4°C.

La vitesse moyenne de déclin est plus élevée en présence de l'extrait d'écorce de grenade aux plus fortes concentrations (tableau XI).

Tableau XI : La vitesse de déclin (j^{-1}) de la culture pure des bifidobactéries stockée à 4°C en présence de l'extrait d'écorce de grenade

<i>C (%)</i>	<i>0.01</i>	<i>0.03</i>	<i>0.09</i>	<i>0.1</i>	<i>0.3</i>	<i>0.9</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>Témoin</i>
<i>Temps</i>										
<i>7j</i>	-0.24	-0.08	-0.1	-0.23	-0.49	-0.28	-0.32	-0.45	-0.26	-0.35
<i>14j</i>	-0.06	-0.2	-0.04	-0.04	-0.05	-0.09	-0.02	-0.04	-0.05	-0.02
<i>VMD</i>	-0.15	-0.14	-0.07	-0.14	-0.27	-0.19	-0.17	-0.25	-0.16	-0.19

En parallèle, la croissance et la viabilité des bifidobactéries cultivées en association avec les lactobacilles et les streptocoques ont été étudiées en présence de l'extrait d'écorce de grenade aux concentrations 0.3% et 0.9% (p/v).

Le dénombrement des bifidobactéries cultivées en association avec les lactobacilles et les streptocoques en présence de l'extrait d'écorce de grenade effectué après 3h d'incubation a montré une diminution de la charge initiale jusqu'à 5.2×10^7 UFC/ml pour la concentration 0.3%, 3.1×10^7 UFC/ml pour la concentration 0.9% et 1.5×10^7 UFC/ml pour le témoin. Au bout de 6h d'incubation, une augmentation de la charge bactérienne a été observée pour les deux concentrations et pour le témoin (figure 10).

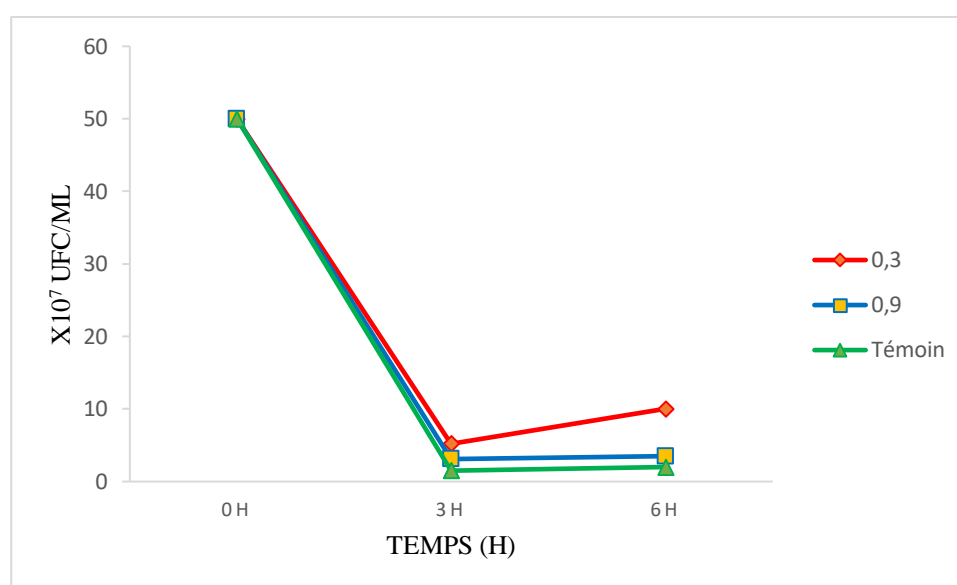


Figure 10 : Nombre des bifidobactéries ($\times 10^7$ UFC/ml) en culture mixte en présence de l'extrait d'écorce de grenade pendant l'étuvage à 42°C.

Après 3h d'incubation, absence de croissance des bifidobactéries pour les deux concentrations ainsi que pour le témoin. Par contre, à 6h d'incubation, une croissance a été obtenue (tableau XII).

Tableau XII : Croissance des bifidobactéries (h^{-1}) en culture mixte en présence de l'extrait d'écorce de grenade pendant l'étuvage.

C (%)	0.3	0.9	Témoins
Temps			
3h	-0.75	-0.93	-1.17
6h	1	0.04	0.09

La viabilité des bifidobactéries cultivées en association avec les bactéries lactiques du yaourt en présence de l'extrait d'écorce de grenade a été évaluée pendant une durée de stockage de 7 jours à 4°C (figure 11).

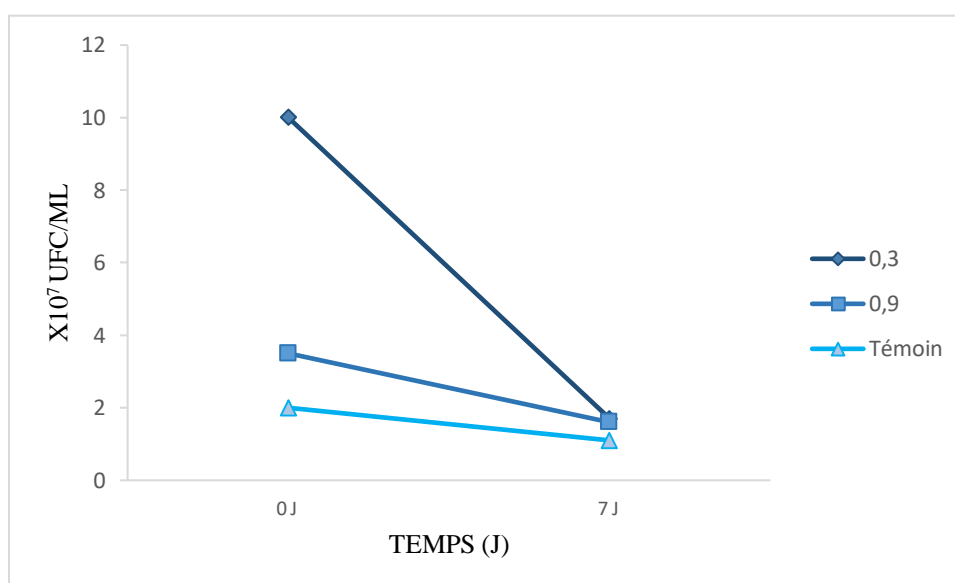


Figure 11 : viabilité des bifidobactéries ($\times 10^7$ UFC/ml) en culture mixte et en présence de l'extrait d'écorce de grenade pendant 7 jours de stockage à 4°C.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que la viabilité de la souche probiotique décroît graduellement durant la période de stockage réfrigéré. Le tableau XIII montre les vitesses moyennes du déclin de la viabilité des bifidobactéries en culture mixte calculées après stockage des laits fermentés à 4°C.

Tableau XIII : Vitesse moyenne de déclin (j^{-1}) des bifidobactéries en culture mixte et en présence de l'extrait d'écorce de grenade, après stockage à 4°C.

C (%)	0.3	0.9	Témoin
Temps (j)			
7	-0.9	-0.06	-0.08

La concentration 0.3% a enregistré le plus grand nombre de cellules viables qui est de 1.7×10^7 UFC/ml en comparaison à la concentration 0.9% et le témoin après 7 jours de stockage.

La fermentation durant 24h des laits écrémés avec une culture de bifidobactéries pure contenant de l'extrait d'écorce de grenade à différentes concentrations a montré une faible diminution de la charge initiale de 5×10^8 UFC/ml à une charge supérieure à 6×10^7 UFC/ml.

Les meilleures concentrations enregistrées sont 0.3% et 0.9% où la charge initiale a légèrement diminuée de 5×10^8 UFC/ml jusqu'à 4×10^8 UFC/ml et 4.5×10^8 UFC/ml respectivement. Ces dernières concentrations sont celles utilisées pour l'étude de la viabilité des bifidobactéries en culture mixte.

La croissance des bifidobactéries dans le lait est souvent lente ou limitée par rapport à d'autres bactéries lactiques utilisées dans les produits laitiers fermentés (**Dave and Shah, 1996**). Ce qui explique les charges élevées ($>10^7$ UFC/ml) de *Lactobacillus bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus* obtenues après fermentation et conservation à 4°C des laits fermentés avec une culture mixte.

Les vitesses de déclin des bifidobactéries cultivées en association avec les bactéries lactiques du yaourt obtenues après 7 jours de stockage au froid (4°C) sont très faible en comparaison à celles obtenues dans le cas de la culture pure dans les mêmes conditions de stockage. C'est-à-dire la meilleure viabilité des bifidobactéries dans le lait écrémé en présence de l'extrait d'écorce de grenade a été observée en présence des autres souches du yaourt (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*).

Ait Abdeslam (2008), a obtenu une vitesse moyenne de déclin de $0.40 j^{-1}$ pour la population de *Bifidobacterium animalis* en culture associée avec *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* dans le lait fermenté écrémé et conservé au froid pendant 7 jours. Cette vitesse est supérieure aux vitesses de déclin obtenues dans notre étude.

Un produit probiotique efficace doit contenir au minimum 10^6 UFC/ml de bifidobactéries le jour d’expiration (**Joyamane et Adams, 2006**). Les charges de bifidobactéries en culture pure dans le lait écrémé en présence de l’extrait d’écorce de grenade obtenues lors de notre étude sont $\geq 7.8 \times 10^6$ UFC/ml et celles des bifidobactéries en culture mixte sont $>10^7$ UFC/ml.

La viabilité des bactéries probiotiques est affectée par des substances inhibitrices telles que l’acide lactique produit pendant la production et l’entreposage au froid (**Roy, 2005**).

L’acidité titrable des produits contenant des bactéries probiotiques affecte considérablement leur survie (**Mortazavian et al., 2010**).

Au bout de 3h d’incubation, la culture pure des bifidobactéries ensemencées en présence de l’extrait d’écorce de grenade a permis l’obtention d’un même taux d’acidité pour toutes les concentrations ainsi que pour le témoin. Après les 6h d’incubation, l’acidité Dornic a légèrement augmentée pour les concentrations les plus fortes : 26°D pour 0.3%, 28°D pour 0.9%, 30°D pour 1% et 3% et enfin 26°D pour 6%.

A 24h d’incubation, l’acidité la plus élevée ($>100^\circ\text{D}$) a été observée pour les concentrations moyennes : 0.09%, 0.1%, 0.3% et 0.9%. L’acidité du témoin a été de 130°D.

Les résultats pour les différentes concentrations sont résumés dans la figure 12.

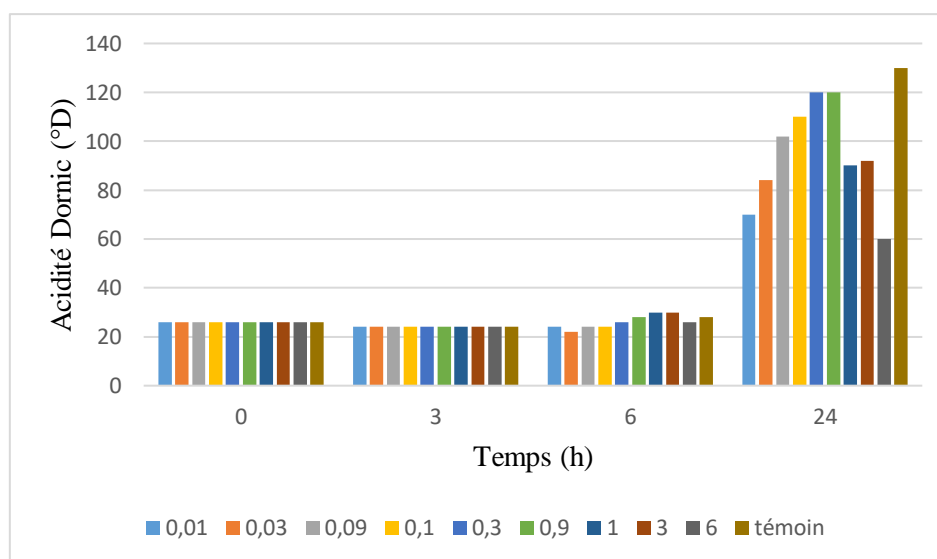


Figure 12 : Acidité Dornic (°D) des laits fermentés avec des bifidobactéries en culture pure en présence de l’extrait d’écorce de grenade.

Pendant 7 j de stockage frigorifié, l'acidité Dornic a augmenté (>120°D). Les concentrations 0.03%, 0.3%, 0.9%, 1% et 3% ont montré les taux les plus élevés d'acide lactique.

Au bout de 14j de stockage, les valeurs les plus élevées (>140°D) ont été enregistrées pour les mêmes concentrations (figure 13).

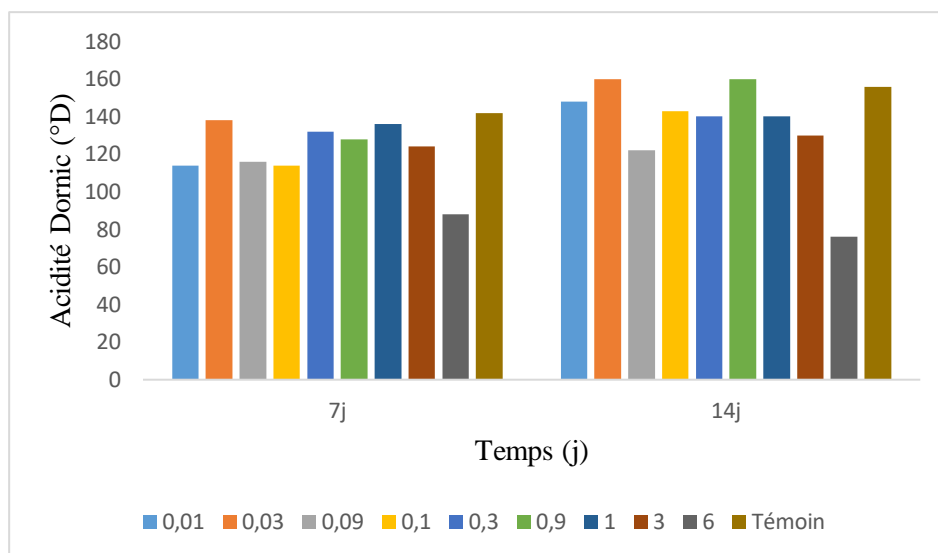


Figure 13 : Acidité Dornic (°D) des laits fermentés avec des bifidobactéries en culture pure en présence de l'extrait d'écorce de grenade, stockés jusqu'à 14jours à 4°C.

L'analyse de la cinétique d'acidification des laits fermentés par les bifidobactéries cultivées en association avec les lactobacilles et les streptocoques en présence de l'extrait d'écorce de grenade a révélé une augmentation d'acide lactique après 3h d'incubation où la valeur la plus élevée a été enregistrée pour la concentration 0.3% qui était de 44°D. Au bout des 6h d'incubation, la quantité d'acide lactique produite par les bactéries lactiques a été élevée pour le témoin ainsi que pour les deux concentrations (figure 14).

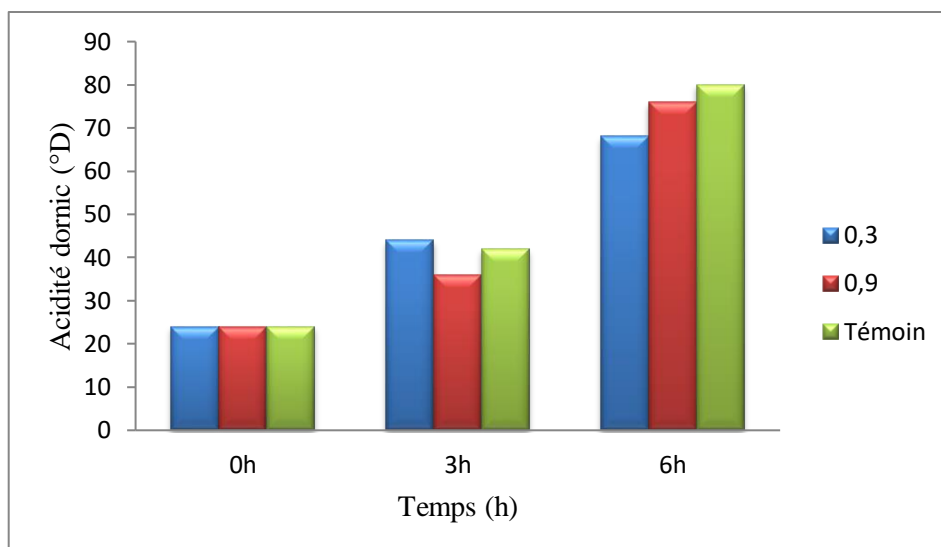


Figure 14 : Acidité Dornic (°D) des laits fermentés aux bifidobactéries en culture mixte et en présence de l'extrait d'écorce de grenade étuvés durant 6h à 42°C.

Durant les 7jours de stockage à 4°C, la plus grande valeur d'acidité a été observée pour la concentration 0.9% qui été de 92°D, suivie par le témoin à une valeur de 90°D et enfin la concentration 0.3% à une valeur de 74°D (figure 15).

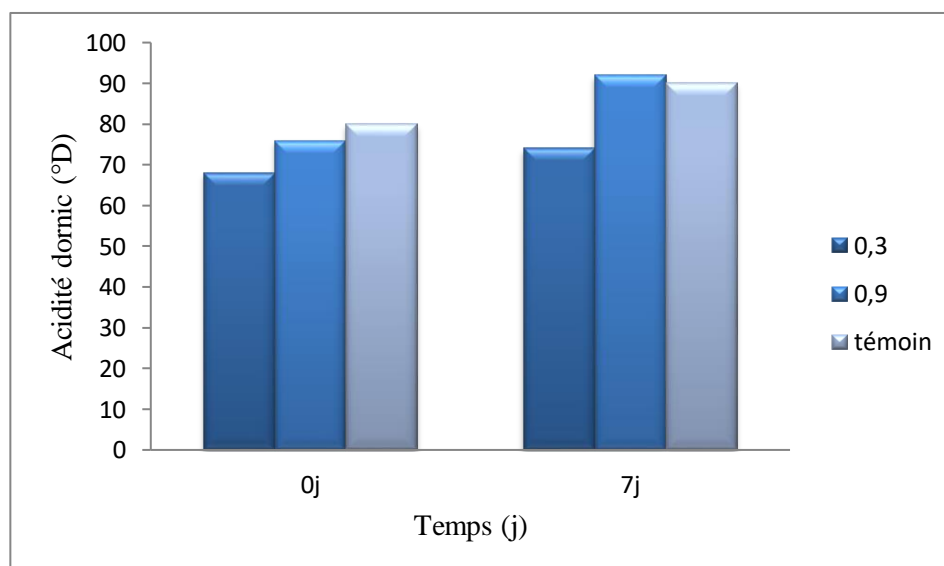


Figure 15 : Acidité Dornic (°D) des laits fermentés aux bifidobactéries en culture mixte et en présence de l'extrait d'écorce de grenade stockés pendant 7 jours à 4°C.

Mehdi (2015) a obtenu une acidité qui varie entre 50 et 60°D après 10h d'incubation des bifidobactéries en culture mixte avec *Lactobacillus*. Ce qui est faible en comparaison à l'acidité Dornic que nous avons obtenu après 6h de fermentation des laits contenant l'extrait d'écorce de grenade.

Cette augmentation d'acidité Dornic est expliquée par une production importante d'acide lactique, donc développement et croissance des souches lactiques.

Selon **Shah (2000)**, les cultures starters se développent plus rapidement, l'acidification se produit rapidement et les durées de fermentations sont beaucoup plus courtes en leur présence, ce qui réduit la disponibilité des nutriments.

Conclusion
Et
Perspectives

Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons isolé des souches bactériennes à partir du yaourt Activia à la laiterie Danone Djurdjura d'Algérie, appartenant aux trois genres utilisés généralement dans la production des yaourts et laits fermentés probiotiques qui sont *Bifidobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*.

L'utilisation des milieux sélectifs et des conditions de cultures (anaérobiose) qui répondent aux exigences de ces bactéries (spécifiquement les bifidobactéries) nous ont permis de les bien isoler et purifier. Nous avons clairement constaté et observé la forme typique de *Bifidobacterium*.

Les tests physiologiques et biochimiques nous ont révélés que les souches isolées sont *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobacterium sp.*

Le profil fermentaire nous a permis de confirmer que la souche probiotique isolée est *Bifidobacterium animalis*.

L'étude de la sensibilité de *Bifidobacterium animalis* aux antibiotiques a montré que cette dernière est sensible à la gentamicine, cefoxitine, amoxicilline, kanamycine, vancomycine et cefotaxime. Une résistance à l'ampicilline, pénicilline G et l'oxacilline a été observée.

La viabilité des bifidobactéries est un critère important pour les sélectionner autant que probiotiques. L'étude de la croissance des bifidobactéries en présence de l'extraits d'écorce de grenade en culture pure à 37°C et en association avec les souches lactiques du yaourt à 42°C, ainsi que leur survie en culture pure et en culture mixte en présence de cet extrait conservées à 4°C a montré la résistance de la souche à l'acidité et à la température de réfrigération.

La culture pure des bifidobactéries en présence de l'extrait d'écorce de grenade stockée pendant 14j à 4°C a mené à une charge finale $>10^6$ UFC/ml en démarrant d'une charge $>10^8$ UFC/ml.

Les meilleures concentrations de l'extrait d'écorce de grenade qui ont permis l'obtention des charges bactériennes les plus élevées sont 0.09%, 0.1%, 0.3% et 0.9%.

La culture mixte des bifidobactéries en présence de l'extrait d'écorce de grenade stockée pendant 7j à 4°C a donné une charge finale $>10^7$ UFC/ml.

L'utilisation de l'extrait d'écorce de grenade dans la cultivation des bifidobactéries seules et en association avec les lactobacilles et les streptocoques a permis l'obtention d'une charge supérieure à celle que doit contenir un yaourt probiotique, ce qui confirme l'effet stimulant de l'extrait d'écorce de grenade pour la croissance et la survie des bifidobactéries.

Perspectives

Le but de notre travail était l'identification des bifidobactéries isolées d'un yaourt probiotique produit en Algérie et l'étude de leur viabilité et leurs aptitudes technologiques en présence de l'extrait d'écorce de grenade. En perspectives, il serait intéressant de réaliser les points suivant :

1. Identification génétique des bifidobactéries isolées d'un yaourt fabriqué en Algérie.
2. Etude du potentiel probiotique des bifidobactéries isolées in vivo.
3. Formulation d'un yaourt probiotique contenant l'extrait d'écorce de grenade comme prébiotique.

Références bibliographiques

A

Abdelmalek A., 2008. Etude de performance des bifidobactéries isolées d'un yaourt fabriqué en Algérie. Magister, Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran. 137p.

Abrams S.A, Griffin I.J, Hawthorne K.M, et Liang L., Gann S.K., Darlington G et Ellis K.J., 2007. Effet of prebiotic supplementation and calcium intake on body mass index. *J Pediatr.* 151: 293-298.

Adams C.A., 2010. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr. Res. Rev.* 23 :37-46.

Adrian J., 1975. Valeur alimentaire du lait. *Edition : la maison rustique*, Paris. 224p.

Ait Abdeslam A., 2008. Etude de croissance des bifidobacterium sp.dans le lait de brebis. Mémoire Magister : Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran. 132p.

Ait Belgnaoui A., 2006. Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. Doctorat, qualité et sécurité des aliments. INRA Toulouse, 5pp : 3-152.

Albrecht M., Jiang W., Kumi-Diaka J., Lansky E. P., Gommersall L. M., Patel A., Mansel R.E., Neeman I., Geldof A.A. et Campbell M.J., 2004. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J. Med. Food* ; 7(3):274-283.

Amiot J., Fourniers., Lebeuf Y., Paquin P et Simsoud R., 2002. Propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyses du lait dans Science et technologie du lait, Edition : école polytechnique de Montreal.

Ammor M.S. et Mayo B., 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as Functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* 76, 138-146.

B

Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R., 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabia et kabyle". *Sciences & technologie.* vol.23 : 31-35.

Baratte-Euloge P., 1992. Action comparée sur la flore intestinale de trois laits fermentés au *Bifidobacterium* : Evaluation des propriétés probiotiques et du comportement de la souche BB 536 de *Bifidobacterium longum* chez l'homme. Doctorat, Biologie appliquée à la nutrition et aux bioindustries. Université de Nancy I. 267P.

Beerens H., 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium sp.* *Letters in applied microbiology.* 11 : 155-157.

Berg R. D., 1998. Probiotics, prebiotics or ‘conbiotics’. *Trends in Microbiology*. 6, 89-92.

Blaut M., 2002. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*. 41, 11- 16. In: Amrouche Tahar., 2005. Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de doctorat en sciences et technologie des aliments. Québec : Université Laval, 155p.

Boudier J.F et Luquet F.M., 1981. Dictionnaire laitier.

C

Calin S. A. et Carboneli B. A., 2005. La grenade cultivée en Espagne Punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Natural antioxydant granatum+ et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, 77p.

Carole L Vignola., 2002. Science et technologie du lait : transformation du lait. *Edition : Presses internationales. Polytechnique, Canada*. 603p.

Championnière J. L., 1850. Journal de médecine et de chirurgie pratique : à l'usage des mediciens praticiens. *Imprimerie de Crapelet (EDS)*. Paris, 21p.

Charles Alais et Guy Rinden., 1997. Abrégé de biochimie alimentaire. Edition *ERREURPERIMES Masson*, Paris.

Codex Alimentarius, 2007. Lait et produits laitiers. Première édition. Rome

Crociani F., Biavati B., Alessandrini A., Chiarini C. et Scardovi V., 1992. Bifidobacterium inopinatum sp.nov. And Bifidobacterium denticolens sp.nov., Two New Species Isolated from Human Dental Caries. *International Journal of Syntematic Bacteriology*. 46 (2), p.564-571.

D

D'Aimmo M.R., Modesto M., Biavati B., 2006. Antibiotic résistance of lactic acid bacteria and bifidobacterium spp.isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*. 115, p35-42.

Dacosta Y., 2001. Probiotiques et prébiotiques en alimentation humaine. Edition Yves Dacosta. 45 Rues Guersant, 75017 Paris, 228p.

Dave R.I. and Shah N.P., 1997. Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7 pp : 435-443.

Dave R.I. et Shah N.P., 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii sp.bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacteria. *J. Dairy. Sci* 79 : 1529-1536.

De Felip G., Croci L. et Gizzarelli S., 1977. Ricerche su alcune idrolasi e vitamine dei gruppo B nello yogurt in relazione al trattamento termico. *Ig Mod* 70. 288-297.

De Roissart H., 1986. Bactéries lactiques. In : Luquet FM. Laits et produits laitiers. *Tec et Doc, Lavoisier*. Paris, pp. 343-402.

Deeth H.C. et Tamime A.Y., 1981. Yogurt : Nutritive and therapeutic aspects. *Journal of food protection*. 44 (1) : 78-86.

Delarras C., 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et levures-moisissures. *Tec et Doc, Lavoisier*. Paris, pp : 66-67.

Delgado C. G. T., Tamashiro W.M., Marostica Junior M.R., Moreno Y.M.F et Pastore G.M., 2011. The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents. *Food research international*. 44: p3167-3173.

Dellaglio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M. C. and Janssens D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries Lactiques, vol. I, pp. 25–116. Edited by H. de Roissart and F. M. Luquet, Lorica, Uriage, France.

Denohue D. C., 2004. Safety of novel probiotic bacteria. In : Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright AV. et Ouwehand A.). 3^e Ed., *Marcel Dekker, Inc*. New York. pp. 531-546.

Desmazeaud M. J., 1983. Comment les bactéries lactiques se comportent elle dans le lait ? *Technique laitière*. 976, 11-14.

Dupin H., 1992. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. *Tech & Doc*. Lavoisier, Paris, France.

E

Eigel W.N., Harwalkar V.R., Jemess R., Buther J.E., Ernstrom C.A., Farrell H.M., Farrell J.R et Whitney R.M.L., 1984. Nomenclature of the proteins of cows'milk : fifth revision. *J.Dairy Sci*. 67.

Emilie Burgum., 2014. Probiotiques et prébiotiques, intérêt chez l'enfant : de l'aliment au médicament. Thèse de doctorat en pharmacie. France : Université de Nantes, 235p.

F

FAO/WHO, 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.

Farnworth E.R., 2008. Kefir : from folklore to regulatory approval. *Journal of Nutraceuticals Functional and Medical Foods*, 1 pp : 57-68.

Favier J.A., Ireland-Ripert J., Laussuq C. et Feinberg M., 1993. Répertoire général des aliments : table de composition des fruits exotiques, fruit de cueillette d'Afrique. Tome 3. ORSTOM édition. 213, rue Lafayette- 15480, Paris cedex 10. INRA édition, 147, de l'université- 75338, Paris cedex 07.

Fooks L. J. et Gibson G. R., 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88 pp : 39-49.

Fredot Emilie., 2005. Connaissance des aliments : bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. *Edition : Tec&Doc, Lavoisier*. 397p.

Fredot Emilie., 2012. Connaissance des aliments : bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. 3^{ème} édition : *Tec&Doc, Lavoisier*. 613p.

Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66 pp : 365-78.

G

Garvie E.I., 1984. Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *In : methods in microbiology. Academic press, London*. 16, pp : 147-178.

Gaucheron Frédéric., Legraet Y et Drange G., 2004. Minéraux et produits laitiers. *Edition Tec&Doc, Paris*. 922p.

Gibson G.R., Beatty E.R., Wang X. et Cummings J.H., 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenter.*, 108:975-982.

Grappin R et Pochet S., 1999. Le lait, P 3 – 22. *In : Larbaoui Mehdi. Analyse microbiologique et physico-chimique d'un lait pasteurisé de la région de Tlemcen. Sciences des aliments. Algérie : Université de Tlemcen, 2017, 52p.*

Guarner F., Perdigon G., Corthier G., Salminen S. and Koletzko B., 2005. "Should yoghurt cultures be considered probiotic ?". *Br. J. Nutr. Jun.*, 93(6) pp:783-6.

Guiraud J.P et Rosec J.P., 2004. Pratique des normes microbiologie alimentaire. *Edition : AFNOR. Paris*. p : 50.

H

Haddie J.M., 1986. Other streptococci. *In : Bergey's manual of systematic bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.)*. 1 : 1070.

Hart T. et Shears P., 1997. Atlas de poche de microbiologie. *Médecine-Science, flammarion. Paris*, pp :93.

Hemaiswarya S., Raja R., Ravikumar R. et Carvalho I.S., 2013. Mechanism of action of probiotics. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56:113-119.

I

ISO 7218, 2007. In : Delarras C., 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et levures-moisissures. *Tec et Doc, Lavoisier*. Paris, pp : 66-67.

Izquierdo E., 2009. Les protéines bactériennes entant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Doctorat, Université de Strasbourg : 8-141.

J

Jayamanne V. S. and Adams M. R., 2006. Determination of survival identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bioyoghurts. *Letters in Applied Microbiology*, 42(3) pp:189-194.

Jeantet R., Croyennec T., Mahaut M., Schuck P et Brulé G., 2008. Les produits laitiers. 2^{ème} édition : *Tec&Doc, Lavoisier*. Paris. pp : 1-9.

Jeantet Romain., Goguennec Thomas., Mahaut Michel., Schuck Pierre et Brulé Gérard., 2007. Les produits laitiers. *Edition Tec&Doc, Lavoisier*. 184p.

Joffin J. et Leyral G., 2006. Microbiologie technique. 4^{ème} édition, centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.

Jones R.J., 2004. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. *Int J Food Microbiol.* 90(3), pp. 273-282.

K

Kaplan H., & Hutkins R., 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2682-2684.

Khalid N.M. et Marth E.H., 1990. Lactobacilli, their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese. *Dairy Sci.* 73 : 2669-2684.

L

Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., 2005. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 144,237-250.

Lansky E. P. et Newman R. A., 2007. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology.* N°109 : 177-206.

Larpent J.P., 1996. Lait et produits laitiers non fermentés. In : Microbiologie alimentaire. Tome I. *Edition : Tec&Doc, Lavoisier*, Paris. pp : 272-310.

Leahy S. C., Higgins D. G., Fitzgerald G. F. and Van Sinderen D., 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98 pp : 1303-1315.

Licht T.R et Ebersbach T., 2012. Prebiotics for prevention of gut infections. *Trends in food science and technology*. 23 : 70-82.

Lilly D. M. and Stillwell R. H., 1965. Probiotics : Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*, pp : 147-747.

Luquet FM., 1987. Lait et produits laitiers vache, brebis, chèvre. Volume I. *Edition Tec&Doc, Lavoisier*. 397p.

M

Madlener S., Illmer C., Harvath Z., Saiko P., Losert A., Herbacek I., Grusch M., Elföred H.L., Krupitza G., Bernhaus A., Fritzer-Szerers T., 2006. Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancers Letters*. 245 ; 156-162.

Mahaut M., Jeantet R., Brulé G. et Schuck P., 2000. Les produits industriels laitiers. Edition : *Tec et Doc*, Lavoisier. Paris. 178p.

Mahmoudi F., Hadadji M., Guessas B. et Kihal M., 2013. Evaluation of in vitro antagonism and protection against enteropathogenic experimental challenge of different strains of *Bifidobacterium*. *African Journal of Microbiology Research*. 7 (29) pp. 3816-3823.

Malik A., Afaq F., Sarfaraz S., Adhami V. M., Syed D. N. et Mukhtar H., 2005. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 11 ;102(41) :14813-8.

Mami A., 2013. Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Doctorat, Microbiologie Appliquée. Université d'Oran : 161p.

Martin J.C., 2000. Technologie des laits de consommation. Edition : Uni lait, CANDIA Direction Développement Technologique. P: 135. In : Sadelli Nassima et Oulmi Aicha. Etude des paramètres physico-chimiques et analyses microbiologiques du lait pasteurisé conditionné fabriqué par l'unité ORLAC d'Amizour. Algérie: Université Abderrahmane MIRA de Bejaia, 2013. 47p.

Masco L., Ventura M., Zink R., Huys G. et Swings J., 2004. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. And *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, p137–1143.

Mattarelli P., Biavati B., Holzapfel W. H. et Wood B. J. B., 2018. The Bifidobacteria and Related Organisms : Biology, Taxonomy, Applications. *Academic Press*. p 9-48.

Mehdi Kheira., 2015. Sélection des bifidobactéries à caractères probiotiques pour la fermentation du lait en culture mixte et évolution de leurs viabilités. Thèse de doctorat en contrôle microbiologique et hygiène alimentaire. Algérie : Université d'Oran. 144p.

Menrad K., 2003. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56 pp : 181-188.

Metchnikoff E., 1907. The prolongation of life. In *Optimistic Studies* (Heinemann W., Ed.), G. P. Putnam and Sons, London, UK. pp: 1-100.

Mission Scientifique de Syndifrais, 1997. Yaourts, laits fermentés. Le Lait, *INRA Editions*. 77 (3), pp.321-358.

Mortazavian A.M., Khosrokhvar R., Rastegar H. et Mortazaei G.R., 2010. Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of freshly made probiotic Doogh (Iranian fermented milk drink). *Ital. J. Food Sci.* 22:98–102.

Moubarek C., Gavini F., Vaugien L., Butel M.J. and Doucet-populaire F., 2005. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, p38-44.

O

Ohashi Y et Ushida K., 2009. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Anim. Sci. J.* 80:361-371.

Oliviera M. N. and Damin M. R., 2003. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidifi caça, fermezae viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. *Ciência e Tecnologia d'Alimentos*, 23 pp: 172–176.

P

Palomares I.C., Pérez-Morales R. et Acedo-Félix E., 2007. Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 49(3-4) : 46-54.

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

Patterson C.A., 2008. Probiotiques : bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base. *AAFC*. 1-4.

Pilet M.F., Magras C., Federigh M., 2005. Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., *Economica*. Paris. 219-240.

Piquet M.A., Gloro R., Justum A.M. et Reimund J.M., 2007. Les probiotiques, des outils thérapeutiques pour moduler les effets biologiques de la flore intestinale : une introduction. *Springer Obes. 2* :227-233.

Planchon G. et Collin E., 1875. Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétale. Librairie F. Savy. Tome I. Pages 235-236 et 307-308.

Prashanth D., Asha M. K. et Amit A., 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*. N°72. P171-173.

R

Rasic J., Curcic R., Stojavljevic T., Obradovic B., 1971. A study on the amino acids of yoghurt. *Milchwissenschaft*. 26 ; 496-499.

Reichart O., Katalin S. et Akos B. J., 2007. Rapid Method for Selective Enumeration of *Bifidus* *essensis* in ACTIVIA yogurts. *Acta alimentaria*. 36 (2), pp. 173-183.

Reyes-Gavilan C.G., Suarez A., Fernandez-Garcia M., Margolles A., Gueimonde M. et Ruas Madiedo P., 2011. Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Res. Microbiol.* 162 : 514-519.

Roy D., 2005. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le Lait*. INRA, Toulouse. 85 (1-2), pp.39-56.

S

Sadeq H. A. S., Amin I., Mohd Y.M., Shuhaimi M., Mohd Y.R et Abdulrahman F.H., 2013. Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of functional foods*, 1542-1553.

Salminen S., Gorbach S., Lee Y.K. et Benno Y., 2004. Human studies on probiotics : what is scientifically proven today. *In* : Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 515-530.

Scardovi V. 1986. *Bifidobacterium*. *In* : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME and Holt JG (Eds), vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp.1418-1434.

Shah N.P., 2000. Probiotic bacteria : selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Sciences*. 83 (4) : 894-907.

Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), document édité avec la collaboration de l'OMS. 6^{ème} édition ; 2011.

Stover E. et Mercure E.W., 2007. The pomegranate : A new look at the fruit of paradise. *Hort Science*. 42 (5) : 1088-1092.

Surta L., Federighi M. et Jouve J-L., 1998. *Listeria monocytogenes* : Manuel de bactériologie alimentaire. *Polytechnica*, Paris : 133-159.

Sveje M., 2007. Probiotics and prebiotics improving consumer health through food consumption. *Nutracos*, sept/oct : 28-31.

T

Talwalkar A., Miller C. W., Kailasapathy K. and Nguyen, M. H., 2004. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 39 (6) pp: 605-611.

Tamime A. Y., Saarela M., Koslund sondergaard A., Mistery V. V., 2005. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy product. *In* : Probiotic Dairy Products.(Tamime A. Y.). *Blackwell publishing* : 56-62.

Temmerman R., Pot B., Huys G. et Swings J., 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.*, 81: 1-10

Titiek F. D., Endang S. R., Djoko W. et Slamet S., 1996. Antimicrobial substance produced by *Lactobacillus* sp. TGR-2 isolated from *Growol*. *Indonesian Food Nutrition and Progress*, 3(2) : 29-34.

V

Ventura M., Van Shinderen D., Fitzgerald G. F. et Zink R., 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 86, 205-223.

Vierling E., 2003. Alimentation et boisson : technique et aspect réglementaires. 1^{ère} édition, Doin.

Viuda-Martos M., Fernández-López J et Pérez-Alvarez J. A., 2010. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6) : 635-654.

Vulevic J., Drakoularakou A., Yagoob P., Tzortzis G et Gibson G.R., 2008. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*. 88: 1438-1446.

W

World Gastroenterology Organisation, 2017. Probiotiques et prébiotiques.

Y

Yazid A.M., Ali A.M., Shuhaimi M., Kalaivaani V., Rokiah M.Y. et Reezal A., 2000. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 57-62.

Yildez F., 2010. Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products. *CRC press, Taylor and Francis Group*. New York.p435.

Z

Zerrouki M.H., 2012. Effets des Antibiotiques commercialisés en Algérie sur la croissance des bifidobactéries. Magister : Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran. 86p.

Références webographiques

Anonyme, 2005 : <https://whatisbifidusregularis.org/>

Annexes

Annexe I : Appareillage

- Autoclaves
- Bain marie
- Etuves
- Balances
- Centrifugeuse
- pH-mètre
- Agitateurs
- Four pasteur
- Plaques chauffantes
- Distillateur
- Microscopes optiques
- Compteur de colonies

Annexe II : Composition des milieux et solutions utilisés

La fuschine :

- 1g de fuschine
- 5g de phénol
- 10ml d'alcool
- Compléter jusqu'à 100ml avec de l'eau distillée

Violet de gentiane :

- 1g de violet de gentiane
- 10ml d'éthanol
- 2g phénol
- Compléter jusqu'à 100ml avec de l'eau distillée

Eau physiologique :

- 9g de NaCl
- 1000ml d'eau distillée

Eau physiologique cystéinée :

- 8.5g de NaCl

- 0.5g de cystéine Hcl
- 0.5g de peptone
- 1000ml d'eau distillée

Soude à 0.1N :

- 4g de Nacl
- 1000ml d'eau distillée

Soude à 1N :

- 40g de Nacl
- 1000ml d'eau distillée

Phénolphtaléine :

- 0.5g de phénolphtaléine
- 50ml d'éthanol 96%

Lugol :

- 1g d'Iode
- 2g d'Iodure de potassium
- Compléter jusqu'à 300ml avec de l'eau distillée

Lait écrémé :

- 0.5g de cystéine Hcl
- 1000ml de lait écrémé UHT (Condia)

Milieu MRS :

- Peptone 10g
- Extrait de levure 5g
- Extrait de viande 10g
- Acétate de sodium 5g
- Citrate de sodium 2g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25g
- $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05g
- KH_2PO_4 2g
- Glucose 20g

- Tween80 1ml
- Eau distillée 1000ml
- Agar Agar 17g
- pH = 5,2 ±0.02
- Autoclavage à 120°C/20min

Milieu MRSc :

- Peptone 10g
- 0.5g de cystéine Hcl
- Extrait de levure 5g
- Extrait de viande 10g
- Acétate de sodium 5g
- Citrate de sodium 2g
- MgSO₄ 7H₂O 0.25g
- MnSO₄ 4H₂O 0.05g
- KH₂PO₄ 2g
- Glucose 20g
- Tween80 1ml
- Eau distillée 1000ml
- Agar Agar 17g
- pH = 6.8 ±0.02
- Autoclavage à 120°C/20min

Bouillon MRSc :

- Peptone 10g
- 0.5g de cystéine Hcl
- Extrait de levure 5g
- Extrait de viande 10g
- Acétate de sodium 5g
- Citrate de sodium 2g
- MgSO₄ 7H₂O 0.25g
- MnSO₄ 4H₂O 0.05g
- KH₂PO₄ 2g
- Glucose 20g

- Tween80 1ml
- Eau distillée 1000ml
- pH = 6.8 ±0.02
- Autoclavage à 120°C/20min

Bouillon MRS BCP :

- 0.25mg de pourpe de Bromocrésol
- Peptone 10g
- Extrait de levure 5g
- Extrait de viande 10g
- Acétate de sodium 5g
- Citrate de sodium 2g
- MgSO₄ 7H₂O 0.25g
- MnSO₄ 4H₂O 0.05g
- KH₂PO₄ 2g
- Tween80 1ml
- Eau distillée 1000ml
- pH = 6.8 ±0.02
- Autoclavage à 120°C/20min

Réactif de kovacs :

- p-diméthylamino-benzaldéhyde 5,00 g
- Alcool iso-amylque 75 ml
- Acide chlorhydrique pur 25 ml

Annexe III : Préparation de l'extrait de l'écorce de grenade

- Préparation de la poudre de l'écorce de grenade :
 - Lavage des grenades
 - Séchage à température ambiante
 - Séparation de la partie interne et de l'écorce de grenade
 - Séchage au soleil des écorces obtenues pendant 4 jours
 - Broyage à l'aide d'un broyeur électronique
 - Tamisage de la poudre obtenue

- Préparation des solutions de l'écorce de grenade à différentes concentrations :
 - Peser les différentes quantités de la poudre de l'écorce de grenade (0.001g, 0.003g, 0.009g, 0.01g, 0.03g, 0.09g, 0.1g, 0.3g et 0.6g)
 - Remplir 9 tubes à essai avec 10 ml d'eau distillée bouillante
 - Mettre dans chaque tube une des quantités pesées
 - Agiter pendant 2h
 - Filtrer les suspensions obtenues
 - Récupérer les filtrats et les mettre dans des tubes
 - Pasteuriser les solutions à 90°C pendant 10min
 - Laisser refroidir
 - Conserver à 4°C

Annexe IV : Tableaux concernant l'expérimentation

Tableau 1 : Nombre des bifidobactéries (UFC/ml) en culture pure en présence de l'extrait d'écorce de grenade durant la fermentation

C(%)	0.01	0.03	0.09	0.1	0.3	0.9	1	3	6	Témoins
temps (h)										
0	5x10 ⁸	5x10 ⁸	5x10 ⁸	5x10 ⁸	5x10 ⁸	5x10 ⁸	5x10 ⁸	5x10 ⁸	5x10 ⁸	5x10 ⁸
3	2.4x10 ⁹	4.2x10 ⁹	1.4x10 ⁹	10 ¹⁰	1.8x10 ⁹	8x10 ⁹	2.4x10 ⁹	2.8x10 ⁹	1.8x10 ⁹	10 ⁹
6	1.8x10 ⁹	1.9x10 ⁸	1.8x10 ⁸	2.3x10 ⁸	2x10 ⁸	4x10 ⁸	10 ⁸	7x10 ⁸	1.2x10 ⁸	1.9x10 ⁹
24	6.4x10 ⁷	2x10 ⁸	1.4x10 ⁸	2.2x10 ⁸	4x10 ⁸	4.5x10 ⁸	1.3x10 ⁸	4x10 ⁸	2.2x10 ⁸	2x10 ⁸

Tableau 2 : Nombre des bifidobactéries (UFC/ml) en culture pure en présence de l'extrait d'écorce de grenade durant le stockage réfrigéré

C(%)	0.01	0.03	0.09	0.1	0.3	0.9	1	3	6	Témoins
temps (j)										
0	6.4x10 ⁷	2x10 ⁸	1.4x10 ⁸	2.2x10 ⁸	4x10 ⁸	4.5x10 ⁸	1.3x10 ⁸	4x10 ⁸	2.2x10 ⁸	2x10 ⁸
7	1.2x10 ⁷	1.1x10 ⁸	6.2x10 ⁷	4.4x10 ⁷	1.3x10 ⁷	6.1x10 ⁷	1.4x10 ⁷	1.7x10 ⁷	3.4x10 ⁷	1.7x10 ⁷
14	7.8x10 ⁶	2.8x10 ⁷	4.7x10 ⁷	1.7x10 ⁷	9.1x10 ⁶	3.2x10 ⁷	1.2x10 ⁷	1.3x10 ⁷	2.3x10 ⁷	1.5x10 ⁷

Tableau 3 : Acidité dornic (°D) des laits fermentés aux bifidobactéries cultivés en culture pure en présence de l'extrait d'écorce de grenade durant la fermentation

C(%) Temps (h)	0.01	0.03	0.09	0.1	0.3	0.9	1	3	6	Témoins
0	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
3	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
6	24	22	24	24	26	28	30	30	26	28
24	70	84	102	110	120	120	90	92	60	130

Tableau 4 : Acidité dornic (°D) des laits fermentés aux bifidobactéries cultivés en culture pure en présence de l'extrait d'écorce de grenade durant le stockage réfrigéré

C (%) Temps (j)	0.01	0.03	0.09	0.1	0.3	0.9	1	3	6	Témoins
0	70	84	102	110	120	120	90	92	60	130
7	114	138	116	114	132	128	136	124	88	142
14	148	160	122	143	140	160	140	130	76	156

Tableau 5 : Nombre des bifidobactéries ($\times 10^7$ UFC/ml) en culture mixte en présence de l'extrait d'écorce de grenade durant la fermentation

C (%)	0.3	0.9	Témoins
Temps (h)			
0	50	50	50
3	5.2	3.1	1.5
6	10	3.5	2

Tableau 6 : Nombre des bifidobactéries ($\times 10^7$ UFC/ml) en culture mixte en présence de l'extrait d'écorce de grenade durant le stockage réfrigéré

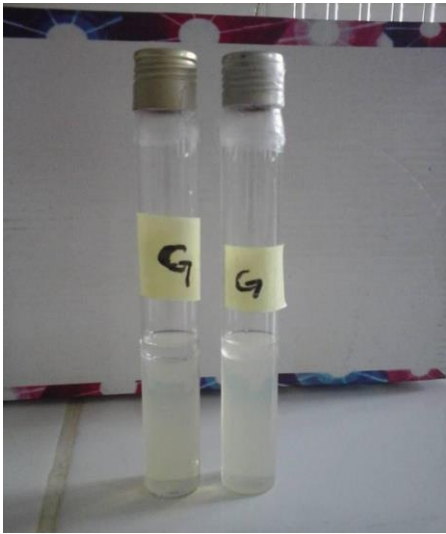
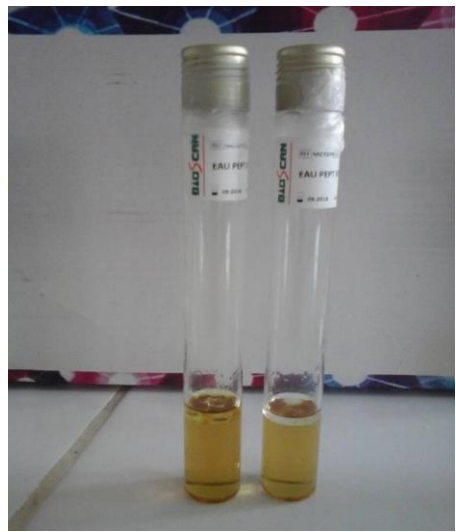
C (%)	0.3	0.9	Témoins
Temps (j)			
0	10	3.5	2
7	1.7	1.6	1.1

Tableau 7 : Acidité dornic ($^{\circ}$ D) des laits fermentés aux bifidobactéries cultivés en culture mixte en présence de l'extrait d'écorce de grenade durant la fermentation

C (%)	0.3	0.9	Témoins
Temps (h)			
0	24	24	24
3	44	36	42
6	68	76	80

Tableau 8 : Acidité dornic ($^{\circ}$ D) des laits fermentés aux bifidobactéries cultivés en culture mixte en présence de l'extrait d'écorce de grenade durant le stockage réfrigéré

C (%)	0.3	0.9	Témoins
Temps (j)			
0	68	76	80
7	74	92	90

Annexe V : Tests physiologiques et enzymatiques des bifidobactéries**Figure 1 :** Test de la recherche de gélatinase**Figure 2 :** Test de recherche d'indole**Figure 3 :** Test de recherche de production de gaz**Figure 4 :** test de recherche de catalase