

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département d'agronomie



Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Sciences Alimentaires
Spécialité : Agro-Alimentaire et Contrôle de Qualité

Thème

**L'effet de l'ajout de l'extrait d'écorce de
grenade (prébiotique) sur la viabilité des
bifidobactéries (probiotiques) dans le yaourt**

Réalisé par :

AIT SAID Célia
HAMEG Mélissa

Encadré par :

Mr Amrouche T.

Co-encadré par :

Mme Ould Mammar O.

Promotion 2019

REMERCIEMENTS

Nous ne pouvons débiter ce manuscrit sans présenter ici nos plus vifs remerciements à toutes les personnes qui nous ont accompagnées durant ces mois de travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude en premier lieu à monsieur AMROUCHE J. et madame OULD MAMMAR O. nos deux promoteurs pour la confiance qu'ils nous ont témoignée en nous confiant l'opportunité de travailler sur une thématique aussi intéressante, pour leur encadrement et leurs orientations tout au long de notre travail avec leurs judicieux conseils.

Nous remercions aussi D'avoir accepté la présidence du jury.

Nous tenons aussi à exprimer nos remerciements à pour avoir accepté de juger ce travail.

Dédicaces

*Nous avons l'honneur de dédier ce modeste travail
A nos chers parents pour leur soutien et leurs sacrifices, en
témoignage de notre grande estime et notre amour pour
eux.*

*Aux membres de nos familles et nos ami (e) s pour leurs
motivations et encouragements incessants qu'ils nous ont
fournis en élaborant ce travail.*

Melissa et Célia

Liste des abréviations

Abréviations	Significations
°C	Degré Celsius
µm	Micromètre
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire
CCR	Cancer colorectal
CO2	Dioxyde de Carbone
Da	Dalton
EFSA	European Food Safety Authority
EtOH	Ethanol
FAO	Food and Agriculture Organization
FOS	Fructooligosaccharide
g	Gramme
g/Kg	Gramme par kilogramme
g/L	Gramme par litre
g/ml	Gramme par millilitre
GRAS	Generally Recognized As Safe
h	Heure
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IgA	Immunoglobulines A
IL	Interleukine
kcal/ml	Kilocalorie par millilitre
Kg/m3	Kilogramme par mètre cube
KJ	Kilojoule
MC	Maladie chronique
mg/g	Milligramme par gramme
mg/L	Milligramme par litre
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Milli mole
MRS	Man Rogosa Sharpe
MRSc	Milieu de Man Rogosa et Sharpe cystéiné
MRSc_{+AN}	Milieu de Man Rogosa et Sharpe cystéiné + acide nalidixique
nm	Nanomètre
O2	Oxygène
p/v	Poids par Volume
Pdt	Pendant
pH	Potentiel d'hydrogène
RCH	La rectocolite hémorragique
s	Seconde
SAT	Statut Antioxydant Total
SCFA	Short-chain fatty acid
T°	Température
Th1	T Helper Cell Type 1
Th2	T Helper Cell Type 2

TNF	Tumor Necrosis Factor
trs	Tours
TSEc	Tryptone Sel Eau cystéiné
UFC	Unité Formant Colonie
UFC/ml	Unité Formant Colonie par millilitre
UHT	Ultra-high temperature
WGO	World Gastroenterology Organization
WHO	World Health Organization

Liste des tableaux

Tableau N°	Titres	Pages
1	Nomenclature pour les microorganismes probiotiques	
2	Principaux probiotiques commercialisés	
3	Effets positifs sur la santé obtenus avec des probiotiques	
4	Critères de sélection d'organismes probiotiques	
5	Prébiotiques et candidats prébiotiques	
6	Composition moyenne et apports énergétiques des laits de vache, chèvre, brebis, chamelle et humain	
7	Caractéristiques de la β -lactoglobuline et de l' α -lactalbumine du lait	
8	Caractéristiques physicochimiques des caséines	
9	Répartition des éléments minéraux entre les phases aqueuse et micellaire du lait	
10	Composition nutritionnelle de différents types de yaourts pour 100g de produit	
11	Composition du jus de grenade en acides organiques, en sucres et en minéraux	
12	Mécanismes d'action des probiotiques	
13	Résultats des tests physiologiques et enzymatiques des souches isolées	
14	Nombre de Bifidobactéries (UFC/ml) en culture pure en absence et en présence du gel de l'extrait d'écorce de grenade	

Liste des figures

Figure N°	Titres	Pages
1	Micelle de caséine au microscope électronique à balayage	
2	planche anatomique de la grenade, définition des différentes parties du fruit	
3	Schéma général du procédé d'extraction du gel à partir de l'écorce de grenade	
4	Les dilutions du gel à différentes concentrations	
5	Ensemencement des dilutions sur milieu MRS _{C+AN}	
6	Résultats du degré de Brix	
7	Aspect macroscopique des bifidobacteries	
8	Aspect microscopique des bifidobacteries observés sous microscope optique avec l'objectif à immersion (×100)	
9	Test de production de gaz	
10	Test de recherche de catalase	
11	Test de production d'indole	
12	Nombre de bifidobactéries (UFC/ml) dans la dilution 10 ⁻⁴ en culture pure en présence des différentes concentrations du gel d'extrait d'écorce de grenade	
13	Nombre de bifidobactéries (UFC/ml) dans le yaourt en présence et en absence de la concentration 0,2 g/ml	

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

Agzul

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction Générale.....

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Généralités

I. PROBIOTIQUES

I.1. Histoire et définition.....

I.2. Genres, espèces et souches de probiotiques

I.3. Principales souches commercialisées.....

I.4. Effets positifs sur la santé.....

I.5. Critères de sélections.....

I.6. Sécurité.....

II. PREBIOTIQUES.....

II.1. Définition

II.2. Principaux prébiotiques

II.3. Effets positifs sur la santé

II.4. Critères de sélections

II.5. Sécurité

II.6. Activité fonctionnelle.....

III. Lait.....

III.1. Définition

III.2. Caractéristiques physiques

III.3. Composition biochimique.....

III.3.1. L'eau

III.3.2. Les protéines du lait

III.3.2.1. Les protéines sériques

III.3.2.2. La micelle de caséine

III.3.3. Les lipides du lait.....

III.3.4. Les sels minéraux.....

III.3.5. Les vitamines

III.3.6. Le lactose

IV. Yaourt

IV.1. Origine du yaourt.....

IV.2. Définition du yaourt

IV.3. Composition et atouts nutritionnels.....

IV.4. Effets sur la santé

V. Grenade	
V.1. Description de la grenade	
V.1.1. Origine	
V.1.2. Culture.....	
V.1.3. Botanique	
V.2. Composition des différentes fractions du fruit	
V.2.1. Jus	
V.2.2. Les graines et leur huile	
V.2.3. L'écorce du fruit	
V.3. Intérêts thérapeutiques	

CHAPITRE II: Mécanismes d'actions

II.1. PROBIOTIQUES	
II.1.1. Renforcement de la fonction barrière de l'intestin.....	
II.1.2. Modulation du système immunitaire.....	
II.1.3. Amélioration de la digestion du lactose	
II.1.4. Prévention des maladies atopiques	
II.1.5. Prévention du cancer colorectal	
II.2. PREBIOTIQUES.....	
II.2.1. Modulation de la flore intestinale	
II.2.2. Amélioration de la motilité intestinale et soulagement de la constipation	
II.2.3. Augmentation de l'absorption minérale et prévention de l'ostéoporose	
II.2.4. Modulation du métabolisme lipidique et glucidique.....	
II.2.5. Diminution des diarrhées	
II.2.6. Immunomodulation et effet anti-inflammatoire.....	
II.2.7. Prévention du cancer colorectal	

CHAPITRE III : Applications industrielles

III. 1. PROBIOTIQUES.....	
III.1.1. Le chocolat aux probiotiques.....	
III.1.2. Probiotiques en industrie fromagère	
III.1.3. Probiotiques comme compléments alimentaires.....	
III.1.4. Probiotiques dans le yaourt.....	
III.1.5. Probiotiques comme médicaments	
III.2. PREBIOTIQUES.....	
III.2.1. Addition des prébiotiques dans le lait infantile	
III.2.2. Ajout de Brana Vita dans plusieurs aliments.....	
III.2.3. Introduction des prébiotiques dans les céréales	
III.2.4. Prébiotiques sous formes de gélules végétales	
III.2.5. Prébiotiques naturels en poudre.....	
III.2.6. Prébiotiques dans les médicaments	
III.2.7. Prébiotiques dans les produits cosmétiques	

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIELS ET METHODES

I. Microorganismes	
II. Milieux et conditions de cultures.....	
II.1. Milieux de culture utilisés.....	
II.2. Conditions de culture	

III. Extraction et préparation de l'extrait	
III.1. Extraction hydro-alcoolique du gel	
III.2. Préparation des dilutions du gel.....	
III.3. Analyses physico-chimiques du gel	
III.3.1. Degré de Brix.....	
III.3.2. Extrait sec	
IV. Isolement des bifidobactéries	
V. Purification des bifidobactéries	
VI. Confirmation des souches.....	
VI.1. Coloration de Gram.....	
VI.2. Recherche de la catalase.....	
VI.3. Production de gaz.....	
VI.4. Production d'indole.....	
VII. Conservation des souches	
VIII. Etude de l'effet de l'ajout du gel d'extrait d'écorce de grenade sur les bifidobactéries en culture pure et dans le yaourt	
VIII.1. Préparation de l'inoculum.....	
VIII.2. Etude de l'effet de l'ajout du gel d'extrait d'écorce de grenade sur les bifidobactéries en culture pure	
VIII.3. Etude de l'effet de l'ajout du gel d'extrait d'écorce de grenade sur les bifidobactéries dans une matrice alimentaire (yaourt)	
RESULTATS ET DISCUSSIONS	
I. Analyses physico-chimiques du gel	
I.1. Degré de Brix	
I.2. Extrait sec.....	
II. Isolement des bifidobactéries	
II.1. Observation macroscopique.....	
II.2. Observation microscopique	
II.3. Tests physico-chimiques et enzymatiques	
II.3.1. Production de gaz.....	
II.3.2. Recherche de la catalase.....	
II.3.3. Production d'indole.....	
III. Etude de l'effet de l'ajout du gel d'extrait d'écorce de grenade sur les bifidobactéries en culture pure et dans le yaourt	
III.1. Etude de l'effet de l'ajout du gel d'extrait d'écorce de grenade sur les bifidobactéries en culture pure.....	
III.2. Etude de l'effet de l'ajout du gel d'extrait d'écorce de grenade sur les bifidobactéries dans une matrice alimentaire (yaourt).....	
Conclusion et Perspectives.....	
Références bibliographiques.	
Annexes.	

Tout au long de notre vie des quantités faramineuses d'aliment transitent dans notre corps via le système digestif, qui est le siège de nombreuses biotransformations capitales pour notre santé et notre bien-être, ces biotransformations reposent en grande partie sur notre écosystème digestif appelé « *microbiote* ».

Cette flore est indispensable à la survie de n'importe quel individu, chez qui on estime que l'ensemble des microorganismes intestinaux est 10 fois supérieur à ses propres cellules, et cette masse microbienne abrite entre 500 et 1000 espèces différentes. L'essentiel pour ces différentes populations de bactéries, levures et parasites est d'être maintenu en équilibre chacune à sa place et en bon nombre, ce qui permet d'assurer un bon équilibre physiologique de l'individu et une bonne protection contre des microorganismes pathogènes ou opportunistes.

Depuis 20 ou 30 ans, les efforts pour améliorer la santé humaine et animale se focalisent sur les voies de modulation de la flore intestinale par l'adjonction de microbes vivants appelés maintenant probiotiques.

Une bactérie est considérée probiotique si elle exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte qui la consomme (*Salminen et coll., 1998*). Plusieurs genres et espèces bactériennes sont considérés comme probiotiques, mais les bactéries lactiques comme les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium* représentent les groupes bactériens les plus associés au terme probiotique (*Fooks et Gibson, 2002*) car elles composent plus de 93% de la flore intestinale et jouent un rôle primordial dans notre métabolisme : elles sont les sentinelles qui gardent les pathogènes en nombre réduit et sécuritaire, qui leur permet de vivre en symbiose dans notre corps sans nuire.

Les bifidobacteries sont des bâtonnets à Gram positif aux formes variées, non motiles, non sporulants et en général anaérobies strictes. Elles participent à la fermentation du lait dans le cadre de la fabrication de fromages et de préparations similaires aux yaourts. De plus, elles produisent de grandes quantités d'acide lactique, ce qui entraîne une baisse du pH qui leur est favorable et qui inhiberait la croissance d'autres germes.

Si l'introduction des bifidobacteries en industrie laitière s'est faite il y a plus d'une vingtaine d'années dans les pays technologiquement avancés, elle n'est par contre, pas encore envisageable dans certains autres pays comme l'Algérie. Cette situation est liée aux contraintes posées par le genre bifidobacterium qui est très sensible à l'acidité développée dans le lait et à l'aérobiose relative qui y règne. Ce genre est rarement utilisé seul en raison de ses faibles aptitudes fermentaires sur milieu lait et il est souvent associé aux bactéries lactiques classiques telles que *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Dans ce cas de cultures associées, la survie des bifidobactéries reste faible. Néanmoins, cette survie peut-être sensiblement améliorée par l'addition de substances indigestes

communément appelées prébiotiques. Ce sont des substances alimentaires indigestibles qui stimulent sélectivement la flore bénéfiques intestinales. Parmi les prébiotiques les plus utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, il y a l'inuline et l'oligo-fructose.

La combinaison appropriée de prébiotiques et de probiotiques donne naissance à un produit symbiotique qui exerce un effet pré- et probiotique en même temps et qui affecte positivement l'hôte en améliorant la survie et l'implantation d'espèces microbiennes vivantes apportées sous forme de suppléments alimentaires dans le tractus gastro-intestinal, et, par conséquent, la santé et le bien-être de l'hôte (*Isolauri et al., 2002*).

Le grenadier (*Punica granatum L.*) est un arbuste qui est depuis longtemps convoité en médecine ayurvédique, toutes ses parties, fruits, racines, écorce, pépins sont utilisés pour traiter des maladies, infections, blessures et inflammations (*Ahmed et al., 2005*). Effectivement, l'écorce de la grenade est utilisée par de nombreux peuples contre les diarrhées, les ulcères, les parodontoses, les stomatites et les pharyngites (*Jung et Curtay, 2010*). Ces propriétés sont dues à la capacité antioxydant de la grenade (*Gil et al., 2000*), celle-ci est due à son abondance en composés phénoliques, tanins, flavonoïdes..., qui sont connus par leur effet bénéfique sur divers systèmes biologiques (*Negi et al., 2003 ; Li et al., 2006*).

Ce présent travail se focalisera sur l'effet de l'ajout d'extrait d'écorce de grenade comme étant prébiotiques sur la viabilité des bifidobacteries (*probiotiques*) dans une matrice alimentaire (*yaourt*).

I. Probiotiques

I.1 Histoire et définitions

L'observation des bénéfices apportés par la fermentation d'aliments et de boissons (*kéfir, fromages, bières, olives, choucroute, charcuteries, etc...*) d'un point de vue organoleptique, de conservation ou d'effets bénéfiques sur la santé, a conduit à l'utilisation empirique de ferments dans l'alimentation. Les traces de ces usages remontent à plusieurs millénaires. Des peintures rupestres datées de 2500 av JC témoignent de l'utilisation par les Sumériens d'inoculum pour faire cailler le lait.

Dans l'Ancien Testament (*Genèse 18:8*), il est rapporté qu'« *Abraham doit sa longévité à la consommation de lait fermenté* ». Pline l'Ancien recommande en 76 après JC la consommation de produits laitiers fermentés dans le traitement de la gastro-entérite. Mais ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle que Pasteur démontra de façon rigoureuse l'origine microbienne de ces processus fermentaires (1850-1860) (*Bottazzi, 1983 ; Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007*). C'est à Ilya Ilich Metchnikoff, professeur de microbiologie à l'Institut Pasteur de 1893 à 1914, collaborateur de Pasteur et prix Nobel de médecine en 1908, que l'on doit le concept de bactéries bénéfiques. En effet, ses observations du régime alimentaire de paysans Bulgares le conduisirent à lier leur longévité avec leur consommation de yaourts fermentés par le « *bacille bulgare* ».

Il en déduisit que l'ingestion de bactéries lactiques conférait des bénéfices pour la santé en combattant les bactéries intestinales productrices de toxines et responsables du vieillissement. Il recommanda ainsi la consommation de laits fermentés par *Lactobacillus bulgaricus* (*Metchnikoff, 1907*). Deux contemporains de Metchnikoff ont également isolé des bactéries aux propriétés bénéfiques. En 1900, Henri Tissier isola une bifidobactérie dominante dans la flore fécale de nouveaux-nés nourris au sein qu'il nomma *Lactobacillus bifidus communis* et corréla sa présence à la prévention de diarrhées. Il en recommanda donc l'ingestion dans le traitement de cette pathologie (*Tissier, 1900*). Alfred Nissle isola quant à lui une souche non pathogène d'*E. coli* à partir d'échantillons fécaux d'un soldat de la Première Guerre mondiale épargné par une épidémie de shigellose (Nissle, 1916). Cette souche est encore aujourd'hui utilisée comme probiotique sous l'appellation *E. coli* Nissle 1917.

Le terme probiotique fut défini par Lilly et Stillwell (*Lilly & Stillwell, 1965*) pour décrire les substances produites par un microorganisme qui favorisent la croissance d'autres microorganismes. Depuis lors, les probiotiques ont été définis de différentes façons suivant l'évolution des connaissances de leurs mécanismes d'action et de leurs effets sur la santé. La dernière définition a été adoptée par une consultation mixte d'experts FAO/OMS (*FAO/WHO,*

2002) et décrit les probiotiques comme des « *microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés dans les quantités adéquates confèrent des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte* ». L'histoire souligne donc que la définition actuelle pourrait encore évoluer, car les champs de recherche pour mieux connaître et comprendre l'action des probiotiques sont encore nombreux : rôle en termes de régulation et d'interaction avec la flore intestinale, facteurs de diversité chez l'homme, facteurs d'établissement et de maintien, contribution de chaque élément et de la communauté au bénéfice santé...

I.2 Genres, espèces et souches de probiotiques

Une souche probiotique est identifiée par son genre, son espèce, sa sous-espèce (*s'il y a lieu*) et par des caractères alphanumériques qui permet d'identifier sa souche spécifique. Dans la communauté scientifique, il existe une nomenclature reconnue et acceptée pour les microorganismes, par exemple, *Lactobacillus casei* DN-114 001 ou *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Il n'existe pas de réglementation par la communauté scientifique en ce qui concerne le marketing et les noms commerciaux. En accord avec les guidelines de la WHO/FAO, les fabricants de probiotiques sont tenus d'enregistrer leurs souches dans un registre international. Une désignation supplémentaire des souches est conférée par les dépositaires eux-mêmes. Le tableau 1 montre quelques exemples de souches commercialisées et les noms commerciaux qui y sont associés.

Tableau N°01 : Nomenclature pour les microorganismes probiotiques

Genre	Espèces	Sous-espèces	Désignation de la souche	Désignation de la souche R-I	Surnom de la souche	Nom du produit
Lactobacillus	Rhamnosus	Sans	GG	ATTC 53103	LGG	Culturelle
Bifidobacterium	Animalis	Lactis	DN-173 010	CNCM I-2494	Bifidus regularis	Yogourt Activia
Bifidobacterium	Longum	Longum	35624	NCIMB 41003	Bifantis	Align

Source : WGO.GG, 2017.

I.3 Principales souches commercialisées

La plupart des probiotiques commercialisés appartiennent au groupe des bactéries lactiques, dont une très large majorité est représentée par les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. Quelques autres souches microbiennes sont également utilisées, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli* ou la levure *Saccharomyces boulardii* (Mercenier et al., 2003; de Vrese & Schrezenmeir, 2008; WGO, 2008). Ces souches sont présentées dans le tableau 2.

Tableau N°02 : Principaux probiotiques commercialisés

Souches	Producteurs
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Danone
<i>B. animalis ssp. lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen, Inc.
<i>B. bifidum</i> (MF 20/5)	Seven Seas
<i>B. breve</i> strain Yakult	Yakult
<i>B. infantis</i> 35624	Procter & Gamble
<i>B. lactis</i> FK120	Fukuchan milk
<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)	Danisco
<i>B. lactis</i> LKM512	Fukuchan milk
<i>B. longum</i> B6	Sanofi-Bio-Industries, Inc
<i>B. longum</i> BB536	Morinaga Milk Industry Co., Ltd
<i>B. longum</i> SBT-2928	Snow Brand Milk Products Co., Ltd.
<i>B. longum</i> (SP 07/3)	Seven Seas
<i>B. species</i> 420	Danlac
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Cerbios Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CK120	Matsutani Chemical Product
<i>L. acidophilus</i> NCFB 1748	Arla Foods
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Danisco
<i>L. acidophilus</i> 145	Danlac
<i>L. acidophilus</i> 74-2	Danlac
<i>L. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska Cultures, Inc
<i>L. acidophilus</i> LA-1	Chr. Hansen, Inc.
<i>L. acidophilus</i> LA-5	Chr. Hansen, Inc
<i>L. acidophilus</i> LB	Labratoire Lacteol
<i>L. acidophilus</i> NCFM®	Rhodia, Inc.
<i>L. acidophilus</i> R0418	Institut Rosell
<i>L. acidophilus</i> SBT-2062	Snow Brand Milk Products Co., Ltd
<i>L. bulgaricus</i> 1261	Danlac
<i>L. casei</i> 01	Chr. Hansen, Inc.
<i>L. casei</i> 744	Nutricia
<i>L. casei</i> CRL431	Chr. Hansen, Inc.
<i>L. casei</i> (Defensis) DN114 001	Danone
<i>L. casei</i> F19	Arla Foods
<i>L. casei</i> Shirota (YIT 0918)	Yakult
<i>L. casei var. rhamnosus</i> (Lactophilus)	Laboratoires Lyocentre
<i>L. crispatus</i> CTV05	Gynelogix
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> 2038	Meiji
<i>L. fermentum</i> RC-14	Urex Biotech
<i>L. gasseri</i> (16/8)	Seven Seas
<i>L. helveticus</i> CK60	Matsutani Chemical Product
<i>L. johnsonii</i> La-1 (Lj1)	Nestec Ltd.
<i>L. paracasei</i> CRL 431	Chr. Hansen, Inc.
<i>L. paracasei</i> F19	Arla Foods
<i>L. plantarum</i> 299V	NextFoods Probi
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	MicroBioLogics
<i>L. plantarum</i> L2-1	Danlac
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	BioGaia Biologics
<i>L. reuteri</i> MM53	BioGaia Biologics

<i>L. reuteri</i> SD2112 (MM2)	BioGaia Biologics
<i>L. rhamnosus</i> 1091	Danlac
<i>L. rhamnosus</i> 271	Probi AB
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	MicroBioLogics
<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	Valio
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	Urex Biotech
<i>L. rhamnosus</i> LB21	Norrmejerier
<i>L. rhamnosus</i> LC-705	Danlac
<i>L. rhamnosus</i> R0011	Institut Rosell
<i>L. rhamnosus</i> VTT E-97800	Research strain VTT
<i>L. sakei</i> KCTC 10755BP	Problonic, Inc.
<i>L. salivarius</i> UCC118	University College Cork
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Norrmejerier
<i>Saccharomyces boulardii</i> Iyo	Wren Laboratories, Biocodex, autres
<i>Streptococcus thermophilus</i> 1131	Kenko-dontokoi
<i>S. thermophilus</i> F2	Danlac
<i>Bacillus clausii</i> strains O/C, NR, SIN, et T.	Sanofi-Aventis

Source : (Mercenier et al., 2003; de Vrese & Schrezenmeir, 2008; WGO, 2008).

I.4 Effets positifs sur la santé

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle de l'intestin. Quelques préparations de probiotiques ont été utilisées pour prévenir la diarrhée induite par antibiotiques, ou comme part d'un traitement contre une dysbiose liée aux antibiotiques. Des études ont établi les effets des probiotiques sur un grand nombre de troubles gastro-intestinaux et extra-intestinaux, y compris les maladies inflammatoires de l'intestin, le syndrome de l'intestin irritable, les infections vaginales et des améliorations immunitaires. On a aussi cherché à connaître les effets des probiotiques sur l'eczéma atopique, l'arthrite rhumatoïde et la cirrhose du foie. Bien qu'il y ait quelques évidences cliniques du rôle des probiotiques sur la diminution du taux de cholestérol, cela reste encore controversé.

En général, la plus grande évidence pour les probiotiques concerne leur rôle sur l'intestin et sur l'amélioration de la fonction immunitaire. Il n'existe pas de probiotique universel, mais certaines souches données qui s'avèrent efficaces au niveau d'un site spécifique et pour une indication précise. Ce sont surtout les lactobacilles et les bifidobactéries qui sont responsables des bénéfices sur la santé. Différents travaux ont conduit à mettre en évidence des bénéfices variés pour la santé de l'hôte, exercés par des microorganismes probiotiques commercialisés. Les mécanismes mis en jeu agissent essentiellement sur :

- L'écologie microbienne en favorisant une flore bénéfique tout en inhibant la présence de certains pathogènes ;
- La physiologie intestinale par l'apport d'activités microbiennes ou par stimulation de certaines fonctions de l'hôte ;

- L'immunité de l'hôte par le jeu d'interactions étroites avec le système immunitaire mucosal.

Ces effets probiotiques ont été prouvés à des degrés divers. Alors que certains bénéfiques sur la santé comme l'amélioration des symptômes de l'intolérance au lactose sont reconnus comme avérés par la communauté scientifique et médicale, d'autres semblent être des tendances et nécessitent des études plus approfondies pour être démontrés de façon rationnelle, comme les effets immunomodulateurs. Enfin, certaines propriétés probiotiques ne peuvent être caractérisées par les connaissances actuelles et des travaux supplémentaires sont nécessaires pour objectiver leur potentiel bénéfique.

- **Interaction avec des bactéries pathogènes** : cross-talk, effet de barrière, acidification du contenu luminal (*production d'acides gras à chaîne courte*), compétition pour les nutriments et les sites de fixation, production de bactériocines et défensines, production de monoxyde d'azote ;
- **Effets trophiques sur le tube digestif** : motricité colique, production d'acides gras à chaîne courte, production de mucus ;
- **Effets anti-prolifératifs sur la muqueuse colique** : acidification du milieu, effets trophiques des acides gras à chaîne courte, inhibition d'enzymes transformant les acides biliaires autres composés luminaux en carcinogènes ;
- **Effet barrière** ;
- **Effet sur le système immunitaire** : La flore intestinale module la réponse des immunoglobulines A sécrétées vis-à-vis des pathogènes. En effet, cette flore est capable d'augmenter localement le nombre de lymphocytes B sécrétant ces IgA sécrétées. Elle développe également les mécanismes de la tolérance immunitaire vis-à-vis des protéines alimentaires et des bactéries intestinales. Au niveau périphérique, elle stimule la phagocytose protectrice contre l'infection et la synthèse des cytokines nécessaires à la réponse immunitaire ;
- **Effet de production d'éléments essentiels** : La flore intestinale participe à la synthèse de vitamines (*B2, B5, B9, B12, K*). Elle assure également la production d'enzymes digestives et protectrices ;
- **Effet de détoxification** : La flore intestinale est impliquée dans la transformation métabolique de substances potentiellement cancérigènes. Elle module également les effets des toxines émises par les micro-organismes pathogènes ;
- **Autres effets** : La flore intestinale permet la récupération d'énergie à partir d'éléments non digérés lors de leur dégradation par fermentation. Elle améliore aussi l'accessibilité aux

micronutriments. Enfin, elle pourrait jouer un rôle dans l'efficacité de certains médicaments par leur métabolisation, tels que les digitaliques et les anticoagulants coumariniques (*antivitamines K*).

Tableau N° 03 : Récapitulatif des effets positifs sur la sante obtenus avec des probiotiques

Effets positifs des probiotiques
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Prévention et/ou réduction de la durée et de l'intensité des symptômes de diarrhées à Rotavirus ou associées à la prise d'antibiotiques ; ▪ Atténuation des symptômes de l'intolérance au lactose ; ▪ Modulation positive de la flore intestinale autochtone ; ▪ Immunomodulation ; ▪ Prévention ou traitement des allergies et des maladies inflammatoires d'origine infectieuses ; ▪ Traitement des infections des voies urinaires ; ▪ Prévention des infections de l'appareil respiratoire ; ▪ Prévention du cancer colorectal ; ▪ Amélioration de la motilité intestinale dans le contexte de la constipation ou du syndrome de l'intestin irritable ; ▪ Prévention ou traitement des ischémies myocardiques ; ▪ Amélioration des maladies auto-immunes ; ▪ Diminution de la cholestérolémie ; ▪ Amélioration de l'absorption des minéraux ; ▪ Amélioration de la flore buccale et prévention des caries.

Source : (Mercenier *et al.*, 2003; de Vrese & Schrezenmeir, 2008).

I.5 Critères de sélection

Un probiotique potentiel doit posséder différentes propriétés afin de pouvoir exercer les effets attendus. Ainsi, plusieurs critères « *historiques* » ont été définis pour sélectionner des probiotiques efficaces et sont présentés dans le tableau 4. Ces propriétés sont spécifiques et doivent donc être validées pour chaque microorganisme testé (*AFSSA, 2003*).

Tableau N° 04 : Critères de sélection d'organismes probiotiques

Critères fonctionnels	Critères technologiques
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Etre un habitant naturel de l'intestin ; ▪ Etre capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier ; ▪ Adhérer aux cellules intestinales et exclue ou réduit l'adhérence des pathogènes ; ▪ Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (<i>Acides, H2O2, bactériocines...</i>) ; ▪ Non invasif, non carcinogène et non pathogène ▪ Etre capable de co-agrégéer pour former une flore normale équilibrée. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Survivre aux différents procédés technologiques de production ; ▪ Garder sa viabilité dans l'aliment et durant le transit intestinal ; ▪ Résister au bactériophage ; ▪ Facilité de culture ; ▪ Absence de propriétés organoleptique indésirables.

Source : (Ouwehand *et al.*, 1999; Saarela *et al.*, 2000).

Afin de démontrer qu'une souche possède ces caractéristiques, plusieurs tests *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires allant des simples essais de résistance aux pH acides jusqu'aux études cliniques chez l'humain. Cependant, il est essentiel que chaque souche à fort potentiel probiotique soit étudiée et documentée de façon indépendante car les caractéristiques nécessaires à l'appellation probiotique ne sont pas associées à l'espèce bactérienne mais bien à la souche elle-même (*Dunne et coll., 2001*).

Ceci signifie que deux souches d'une même espèce bactérienne peuvent avoir des capacités très différentes l'une de l'autre et qu'il est impossible d'extrapoler les résultats obtenus chez une souche à une autre. Une fois toutes les étapes de sélections franchies avec succès, une souche peut être considérée probiotique et utilisée dans des produits de nutrition humaine ou animale.

Afin de garantir les effets recherchés, il est habituellement recommandé de consommer les probiotiques à des doses de 10^9 à 10^{10} UFC/jour. Cependant, certaines souches sont plus efficaces à des doses moindres alors que d'autres en nécessitent de plus fortes. Les quantités administrées doivent donc être évaluées pour chaque microorganisme et ses conditions de mise en oeuvre. Par exemple, *Bifidobacterium infantis* s'est révélé efficace pour réduire les symptômes du syndrome de l'intestin irritable à 10^8 UFC/jour, alors que des résultats similaires avec VSL#3 nécessitent 3.10^{11} – $4.5.10^{11}$ UFC trois fois par jour (*WGO, 2008*).

I.6 Sécurité

L'innocuité des probiotiques semble confirmée par l'absence d'effets indésirables induits par ces microorganismes alors qu'ils sont fortement représentés dans la flore intestinale et des produits alimentaires consommés régulièrement (*produits fermentés*). L'ensemble des bifidobactéries et lactobacilles, à l'exception d'une souche de *L. rhamnosus*, ont reçu le statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (*de Vrese & Schrezenmeir, 2008*).

Cependant, des infections liées à la consommation de probiotiques peuvent survenir chez des sujets fortement affaiblis. Les cas de bactériémies ou d'endocardites sont rares et restent associés à des pathologies sous-jacentes sévères ou des interventions médicales lourdes: cancer (40 %), chirurgie (38 %), diabète sucré (27 %), et les souches isolées dans les biopsies ne correspondent parfois pas aux probiotiques consommés, mais proviennent plutôt de la flore commensale (*Husni et al., 1997*). Une myocardite a été causée par la libération dans la bouche de probiotiques contenus dans une capsule, immédiatement après une extraction dentaire (*Mackay et al., 1999*). Quelques cas de fongémies à *Saccharomyces boulardii* ont également été rapportés chez des sujets fortement immuno-déprimés ou cathétérisés (*de Vrese & Schrezenmeir, 2008*), ainsi que chez un grand brûlé (*Viggiano et al., 1995*).

Cependant, ces cas restent marginaux en regard de la consommation de probiotiques. En Finlande, le nombre de bactériémies à *Lactobacillus* était resté stable entre 1990 et 2000 malgré une augmentation considérable de la consommation de *L. rhamnosus* GG par la population sur la même période (*Salminen et al., 2002*).

II. Prébiotiques

II.1 Définition

Les prébiotiques sont des substances alimentaires (*consistant surtout en polysaccharides, à l'exclusion de l'amidon, et en oligosaccharides*) non digestibles qui stimulent sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un ou d'un groupe de bactéries bénéfiques dans le côlon, améliorant ainsi la santé de l'hôte (*Patel & Goyal, 2011*). Les prébiotiques sont devenus importants pour l'industrie des aliments fonctionnels dans le cadre des " aliments du côlon " qui peuvent améliorer la santé grâce au microbiote du côlon (*Roberfroid et al, 2010*).

De plus, pour être classé comme prébiotique, un substrat ne doit pas avoir de conséquences négatives pour l'hôte, comme une distension abdominale due à une production excessive de gaz ou la croissance de micro-organismes pathogènes (*Gibson et al. 2017*).

II.2 Principaux prébiotiques

Afin de favoriser la croissance des bactéries bénéfiques en tant que source de carbone, les prébiotiques sont de nature glucidique et le plus souvent constitué d'oligosacchararides, polymères à chaînes courtes de résidus glucidiques ou de fibres plus longues pouvant comporter plus de 1 000 résidus. Il existe une grande diversité biochimique de prébiotiques, due aux différents types de monomères utilisés (*glucose, fructose, galactose, etc...*), aux chaînes osidiques et aux méthodes des productions (*synthèse enzymatique, hydrolyse, etc...*). Les différentes familles existant actuellement sont présentées dans le tableau 5 (*Cummings & Macfarlane, 2002; AFSSA, 2005*).

Tableau 5 : Prébiotiques et candidats prébiotiques

Substance	Procédé d'obtention
Inuline	Extraction
Fructooligosaccharides	Hydrolyse et biosynthèse
Levanes	Biosynthèse
Graminanes	Biosynthèse
Lactulose	Synthèse chimique
Lactosucrose	Biosynthèse
Galactooligosaccharides(GaOS)	Biosynthèse
Xylooligosaccharides (XOS)	Hydrolyse
Oligosides de soja	Extraction
Glucooligosaccharides (GOS)	Biosynthèse
Amidons résistants	Extraction et biosynthèse
Isomaltooligosides (IMO)	Hydrolyse et bioconversion
Oligolaminaranes (beta-glucanes)	Hydrolyse
D-tagatose	Extraction
Cyclodextrine	Hydrolyse
Chitooligosaccharides	Hydrolyse

Source : (AFSSA, 2005; de Vrese & Schrezenmeir, 2008).

II.3 Critères de sélection

Les prébiotiques doivent correspondre à certaines propriétés afin de pouvoir être qualifiés en tant que tels. La définition réactualisée a conduit à retenir trois critères de sélection devant être prouvés in vitro et in vivo avant une validation par des essais cliniques :

- **Résistance à la digestion** : Les candidats prébiotiques doivent résister à l'hydrolyse acide dans l'estomac, aux enzymes digestives et à l'absorption intestinale afin d'être délivrés intacts dans le côlon ;
- **Fermentation par la flore intestinale** : Les produits testés doivent pouvoir être métabolisés par des bactéries commensales de l'intestin ;
- **Stimulation sélective de la croissance et de l'activité métabolique de bactéries intestinales** : Les prébiotiques potentiels doivent pouvoir être utilisés comme source de carbone et favoriser la croissance de bactéries bénéfiques résidentes du tube digestif (*bifidobactéries, lactobacilles, etc...*) et induire chez celles-ci des activités physiologiques bénéfiques pour l'hôte (*production de métabolites, enzymes, etc...*).

La dose de prébiotiques ingérée quotidiennement n'induit des effets que de façon faiblement dose-dépendante. Ces effets sont plutôt liés au sujet et sont en particulier positivement corrélés à la quantité de bifidobactéries présentes dans la flore fécale avant le début du traitement (*Roberfroid, 2007*) ;

- **Effet bénéfique sur la santé de l'hôte** ;
- **La stabilité dans les différentes transformations de diverses denrées alimentaires.**

II.4 Les effets positifs sur la santé

Les prébiotiques alimentaires sont utilisés comme immunomodulateurs et alternatives aux antibiotiques.

Leur fermentation dans le côlon génère un grand nombre d'effets physiologiques qui incluent :

- Une augmentation du nombre des bifidobactéries dans le côlon ;
- Un accroissement de l'absorption de calcium ;
- Un raccourcissement du temps de transit gastro-intestinal ;
- Une diminution du taux de lipides sanguins ;
- Prévention du cancer colorectal.

Les prébiotiques sont ajoutés au yogourt et à d'autres produits laitiers fermentés ; ils peuvent être métabolisés par les probiotiques dans le tractus intestinal. Cette combinaison de probiotiques et prébiotique (*symbiotique*) peut conduire à une amélioration du microbiote intestinal. Cet enrichissement qui en résulte peut avoir un effet antagoniste contre les bactéries intestinales nuisibles et améliorer la santé de l'hôte de plusieurs façons (*Wang & Gibson, 1993*).

II.5 Sécurité

Certains désagréments peuvent survenir en lien avec l'ingestion de prébiotiques suite à leur fermentation dans le côlon, tels que des flatulences, des douleurs abdominales et des diarrhées osmotiques. Ces désordres restent cependant limités et liés à une consommation excessive plutôt qu'à la nature du prébiotique. L'ingestion de 10 g à 20 g d'oligofructose est considérée comme étant dépourvue d'effets secondaires. Lorsque cette dose est portée de 31 g à 41 g, certains des symptômes décrits ci-dessus peuvent survenir (*Absolonne et al., 1995*).

II.6 Activité fonctionnelle

Plusieurs approches quantitatives ont été conçues pour déterminer l'activité fonctionnelle des prébiotiques dans des conditions de fermentation in vitro (*Palframan et al., 2003 ; Jiménez-Vera et al., 2008 ; Figueroa-González et al., 2010*).

En général, ces méthodes fournissent des taux qui reflètent la capacité relative d'un prébiotique donné à produire des effets spécifiques, et elles sont basées sur la mesure des populations microbiennes, des taux de croissance, des taux d'assimilation du substrat et/ou de la production d'acides gras à chaîne courte.

III. Lait

III.1 Définition

Le lait est un liquide blanc, deux fois plus visqueux que l'eau, de saveur légèrement sucrée et d'odeur peu accentuée, sécrété par les glandes mammaires des femelles de mammifères (*Debry, 2001*).

Le lait destiné à l'alimentation Humaine a été défini en 1909, au cours du congrès international de la répression des fraudes Genève comme étant : « *Un produit intégral de la traite totale et interrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum* » (*Debry, 2001*).

Le terme « *lait* » sans autre qualificatif désigne le lait de vache (*Alais et Linden, 1984*), et tout lait provenant d'une femelle laitière, autre que la vache doit être désigné par la dénomination de l'espèce animale dont il provient (*Luquet, 1985*).

III.2 Caractéristiques physiques

Le lait est une émulsion de matière grasse (*globules gras*) dans une phase aqueuse contenant des éléments solubles (*lactose, protéines du lactosérum, vitamines hydrosolubles et sels minéraux*) et d'autres sous forme colloïdale (*micelles de caséine*). Il est de couleur blanchâtre avec une odeur très faible et un gout sucré peu prononcé. Le pH du lait de vache à 25 °C est compris entre 6,5 et 6,7 ; 6,6 étant la valeur la plus fréquemment rencontrée (*McCarthy & Singh, 2009*).

La densité du lait entier de vache à 20 °C est de 1029 Kg/m³. Cette valeur augmente avec l'extrait sec dégraissé du lait et diminue lorsque la teneur en matière grasse du lait augmente (Fox & McSweeney, 1998 ; Jeantet et al., 2004). Il bout entre 100,15°C et 100,17 °C et se congèle à -0,55 °C (Walstra et al., 2006).

III.3 Composition biochimique

La composition du lait varie selon les espèces animales (Tableau 6) mais aussi selon différents facteurs tels que la race, les stade et nombre de lactation, l'alimentation de l'animal et les facteurs environnementaux tels que le climat et les régions (Walstra & Jenness, 1984 ; Fox & McSweeney, 1998 ; Yang et al., 2013). Les laits sécrétés par les différentes espèces de mammifères présentent des caractéristiques communes et contiennent les mêmes catégories de composants : eau, protéines, matières grasses (*lipides*) et minérales, vitamines, lactose.

Tableau N°06 : Composition moyenne et apports énergétiques des laits de vache, chèvre, brebis, chamelle et humain

	Eau (%)	Apport énergétique (kcal/100ml)	Protéines (%)	Lipides (%)	Lactose (%)	Calcium (mg/100g)
Vache	87,5	69	3,2	3,6	4,1	122
Chèvre	87,0	70	3,4	3,8	4,7	134
Brebis	81,5	105	6,2	7,9	4,9	193
Chamelle	87,6	-	3,6	3,6	4,7	-
Femme	87,5	68	1,2	4,0	6,9	33

Source : (Fox & McSweeney, 1998 ; Vignola, 2002).

III.3.1 L'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).

III.3.2 Les protéines du lait

Les protéines du lait peuvent être subdivisées en 2 groupes : les protéines sériques (*ou protéines solubles*) et les micelles de caséines qui sont des structures sphériques constituées par des associations de monomères de caséines et de minéraux.

III.3.2.1 Les protéines sériques

Les protéines sériques représentent approximativement 15 % de l'azote total du lait. Elles ont la particularité de rester solubles à pH 4,6 à 20 °C contrairement aux caséines.

Les protéines majeures du lactosérum sont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine (Tableau N°07). Elles représentent respectivement 50 et 20 % des protéines solubles du lait (Walstra *et al.*, 2006).

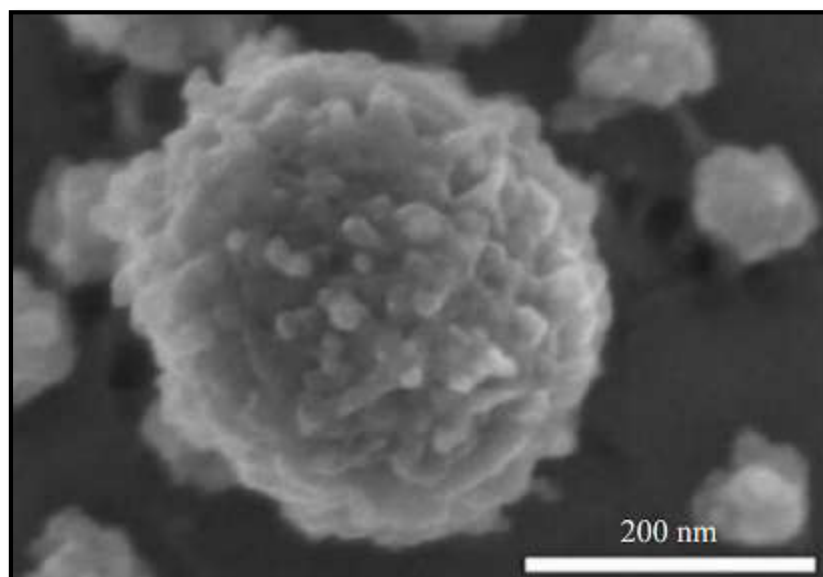
Tableau 7 : Caractéristiques de la β -lactoglobuline et de l' α -lactalbumine du lait

	β -lactoglobuline	α -lactalbumine
Concentration (g/L) dans le lait	2-4	1-1,5
Poids moléculaire (Da)	18300	14200
Nombre de variants génétiques	7	2
Nombre d'acides aminés	162	123
Nombre de ponts disulfure	2	4

Source : (Cayot & Lorient, 1998).

III.3.2.2 La micelle de caséine

La micelle de caséine est une structure, sphérique dont le diamètre moyen est de l'ordre de 150 à 200 nm (Figure N°01) (Cayot & Lorient, 1998 ; Dalgleish *et al.*, 2004, Dalgleish & Corredig, 2012).



Source : (Dalgleish *et al.*, 2004)

Figure 1 : Micelle de caséine au microscope électronique à balayage

La micelle de caséine est composée de 92 à 94% de caséines et 6 à 8% de minéraux. Les caséines, sont au nombre de 4 (*Tableau N°08*): les caséines α_1 , α_2 , β et κ et sont retrouvées respectivement dans les proportions de 4/1/3,7/1,4 au sein de la micelle (*Cayot & Lorient, 1998 ; Dalgleish & Corredig, 2012*).

Tableau N° 08 : Caractéristiques physicochimiques des caséines

	α_1	α_2	β	κ
Concentration (g/L) dans le lait	10	2,6	9,3	3,3
Poids moléculaire (Da)	23600	25200	24000	19000
Résidus d'acides aminés (nombres/moles)	199	207	209	169
Nombre de variants	5	4	6	2
Hydrophobicité (KJ/résidus)	4,9	4,64	5,6	5,1
Charge à pH 6,6	-20,9	-14,8	-12,3	-3,0
Sensibilité à la chymosine	+	-	+	+++
Sensibilité au calcium	++	+++	+	-

Source : (Brulé et al., 1997).

III.3.3 Les lipides

Le lait de vache contient 3 à 5 % de matière grasse. La matière grasse du lait est un mélange complexe de triacylglycérols (98 %), diacylglycérol (2 %), cholestérol (< 5 %), phospholipides (1 %) et acides gras libres (0,1 %). Elle se présente sous forme de globules gras, qui sont des structures sphériques dont le cœur est riche en triacylglycérols.

La membrane du globule gras est un assemblage complexe de phospholipides, protéines, glycoprotéines, lipides neutres, enzymes et autres composés mineurs (*Danthine et al., 2000 ; Lopez et al., 2010*). Elle joue un rôle d'émulsifiant naturel grâce à l'orientation interne de ses composants hydrophobes et externe de ses constituants hydrophiles. La membrane du globule gras assure ainsi l'émulsion de la matière grasse dans la phase aqueuse du lait. La distribution de taille des globules gras du lait, évaluée par diverses techniques (*microscopie, granulométrie laser*) va de 0,1 à 15 μm de diamètre avec une moyenne autour de 3 et 5 μm (*Fleming et al., 2017; Singh & Gallier, 2017; Zamora et al., 2007*).

Les globules gras du lait sont caractérisés par une instabilité avec une tendance à l'agglomération. L'homogénéisation est le procédé habituellement appliqué au lait pour augmenter la dispersibilité de sa matière grasse et en limiter la remontée. Elle assure une fragmentation des globules gras natifs en petites gouttelettes lipidiques plus stables et

dispersibles dans la phase aqueuse du lait. La taille des globules gras influence les propriétés technologiques et sensorielles de nombreux produits laitiers (Lopez et al., 2015).

III.3.4 Les sels minéraux

Si les sels minéraux sont des éléments mineurs dans la composition du lait (9 g/L), ils n'en demeurent pas moins des éléments clé de la stabilité de la micelle de caséine. L'élément majeur de ce groupe est le calcium avec une concentration moyenne de 1200 mg/L. Les minéraux du lait sont répartis entre sa phase aqueuse et sa phase micellaire : le calcium, le phosphate inorganique et le magnésium sont en grande partie liés à la micelle de caséine alors que le potassium, le chlorure et le sodium sont plus abondants dans la phase aqueuse (Tableau N°09) (Brulé et al., 1974 ; 1997 ; Gaucheron, 2005).

Tableau N°09 : Répartition des éléments minéraux entre les phases aqueuse et micellaire du lait

Eléments	Concentration totale	Concentration dans la micelle de caséine	Concentration dans la phase aqueuse
Calcium	29,4	20,2	9,2
Phosphate inorganique	20,9	9,7	11,2
Magnésium	5,1	1,8	3,3
Citrate	9,2	-	8,2
Sodium	24,2	-	24,2
Potassium	34,7	-	34,7
Chlorure	30,2	-	30,2

Les concentrations sont exprimées en milli Molaire (mM).

Source :(Gaucheron, 2005).

Les minéraux solubles sont présents sous formes ioniques ou sous forme de complexe non ionisés (*sels*). Il n'existe pas de minéraux spécialement associés au lactose ou aux globules gras du lait.

Des modifications de pH, de température ou de concentration en minéraux peuvent affecter l'équilibre minéral du lait et entraîner des changements de la structure de la micelle et de l'état physique du lait.

III.3.5 Les 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).

III.3-6 Le lactose

Le lactose est le principal sucre présent dans le lait avec une teneur d'environ 50 g/Kg. Le lait contient également des quantités infimes d'autres glucides tels que le glucose et le galactose. La teneur en lactose du lait de vache varie en fonction de l'alimentation de l'animal et du stade de lactation. Elle diminue progressivement au cours de la lactation (Fox & McSweeney, 1998).

Le lactose est un dissaccharide constitué d'une molécule de galactose et d'une molécule de glucose. Il est présent sous forme soluble dans la phase aqueuse du lait et est habituellement éliminé dans le lactosérum lors de l'égouttage des fromages. Il est utilisable par beaucoup de micro-organismes et est à l'origine de la fermentation des produits tels que le yaourt et le fromage. Budslawski & Pogorzelski (1964) ont d'ailleurs montré qu'au bout de 3 jours de stockage, les fromages ne contenaient plus de molécules fermentescibles. Le glucose et le lactose sont consommés au bout de 48 h et le galactose au bout de 72 h.

IV. Yaourt

IV.1 Origine du yaourt

Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 6000 ans avant JC en Asie centrale. Les premiers laits fermentés résultent probablement d'une fermentation au contact des bactéries résidant à l'intérieur des sacs de peau de chèvre utilisés pour le transport du lait. L'acidification du lait par fermentation est une des plus anciennes méthodes de conservation du lait en lui conférant des qualités organoleptiques.

Différentes méthodes de fermentation dans diverses parties du monde ont donné lieu à toute une gamme de produits de lait fermenté, dont le koumiss, le kéfir, le lait acidophile et le yaourt. Les compositions, les saveurs et les textures de ces produits varient considérablement selon le type de lait et la nature des micro-organismes utilisés pour la fermentation.

Les travaux de Pasteur sur la fermentation en 1857 ont permis d'établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries. Metchnikoff isole en 1904 le « *bacille bulgare* » (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il développe l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé. Il plaidera en faveur de l'introduction de produits laitiers fermentés dans le régime alimentaire. Les premières entreprises fabriquant du yaourt à partir des souches de l'Institut Pasteur voient le jour en 1929 avec Daniel Carasso.

IV.2 Définition

Le yaourt est un produit laitier de grande consommation qui possède une grande valeur nutritionnelle et très apprécié par son goût caractéristique et sa texture. Le yaourt est plus digestible que le lait avant fermentation et contient 2 fois plus d'acides aminés libres. Cette caractéristique résulte du traitement thermique, de l'acidification et de l'activité protéolytique des bactéries (*Mahaut et al. 2008*).

La consistance et la viscosité du yaourt sont, pour une grande partie, sous la dépendance de la teneur en matière sèche du lait. (*Jeantet et al. 2008*) ont rapporté que les protéines ont un rôle déterminant dans la texture, par contre la matière grasse a un effet sur les caractéristiques organoleptiques. Les protéines et la matière grasse, contribuent également à masquer l'acidité du produit (*Amiot et al. 2002*). Pour avoir un goût et une acidité convenables, le yaourt doit êtreensemencé par deux types de bactéries spécifiques à savoir : *Streptococcus thermophilus* et *Bacillus bulgaricus* (*Tamime et Robinson 1985*). Outre le goût acidulé qu'elles donnent au gel, les bactéries lactiques du yaourt lui confèrent une saveur caractéristique due à la production de composés aromatiques (*Zourari et Desmazeaud, 1991*).

L'action acidifiante des bactéries lactiques doit être limitée dans le temps (*Corrieu et Luquet 2005*). L'acidification dépend de la température et de la durée d'incubation (*Jeantet et al. 2008*). Une fois l'acidité voulue est atteinte, un refroidissement rapide à la température de 4°C est recommandé pour bloquer la fermentation (*Luquet 1990*). Le stockage à basse température (4°C) permet, non seulement, d'arrêter l'acidification mais aussi d'augmenter la consistance du produit sous l'effet du froid (*Corrieu et Luquet, 2005*). Une cinétique de refroidissement trop lente et/ou une température de stockage trop élevée peut engendrer des défauts de goût et une synérèse excessive (*Slavador et al. 2005*).

Les contraintes mécaniques auxquelles sont soumis les produits au cours de l'entreposage et du transport peuvent contribuer à une destruction du gel et ainsi à une modification de la texture ferme du yaourt étuvé (*Jeantet et al. 2008*). Une teneur en matière sèche faible, un traitement thermique trop modéré, un niveau d'ensemencement trop bas ou une mauvaise conduite de l'incubation peuvent engendrer un défaut de texture caractérisé par un caillot mou (*Ciron et al. 2011 ; Kessler 1998 ; Heertje et al. 1985 ; Tamime et al. 1984*).

En fonction de la technologie de fabrication, les yaourts sont divisés en deux groupes :

- Yaourts étuvés ; dont la fermentation a lieu en pots. Ce sont généralement des yaourts naturels ou aromatisés ;
- Yaourts brassés ; dont la fermentation a lieu en cuve. Ce sont généralement des yaourts brassés naturels, aromatisés ou aux fruits.

IV.3 Composition et atouts nutritionnels

Les valeurs nutritionnelles du lait sont tout à fait transposables au yaourt. En effet, le yaourt concentre les qualités nutritionnelles du lait auxquelles s'ajoutent les propriétés apportées par les ferments lactiques. Plusieurs facteurs interviennent dans la composition finale du yaourt :

- Les souches utilisées pour la fermentation du lait ;
- La nature du lait utilisé (*entier, demi-écrémé ou écrémé*) ;
- L'ajout éventuel d'ingrédients qui interviennent sur la composition des produits (*sucres, arômes, fruits...*) ;
- Les procédés de fabrication (*température, durée de fermentation...*).

Grâce à sa haute teneur en eau de plus de 80%, le yaourt est un aliment hydratant (*Tableau N°10*). Il contient du lactose qui est la source de carbone majoritaire. Pendant la fermentation, ce disaccharide est hydrolysé par la β -galactosidase bactérienne en glucose et galactose (*Hutkins et al., 1985a; Zourari et al., 1992*).

C'est aussi une source de protéines avec 5 g de protéines par pot, valeur supérieure à la teneur en protéines du lait, suite à l'ajout de poudre de lait écrémé lors de la fabrication du yaourt. Ainsi les caséines et les protéines du lactosérum présentent une source riche en acides aminés (*Shahani & Chandan, 1979*) car les protéines du yaourt sont plus digestibles que celle du lait suite à leur hydrolyse par les bactéries lactiques (*Oberg et al., 1991; Thomas & Pritchard, 1987; Zourari et al., 1992*).

La teneur en matière grasse du yaourt dépend de la nature du lait utilisé. Le yaourt est le produit laitier qui contient le moins de matière grasse en comparaison avec d'autres produits comme les fromages. Cette matière grasse est aux 2/3 une matière grasse saturée mais ne représente au plus que 2.4% de la composition du yaourt. Le yaourt reste donc un aliment à apport modéré en énergie.

Le yaourt est particulièrement riche en minéraux et oligo-éléments. Un pot de yaourt couvre 13% des besoins journaliers en phosphore et 16% des besoins de calcium d'un adulte. Lors de la fermentation du yaourt, l'acide lactique produit permet la solubilisation du calcium (*Tamime & Robinson, 1999*).

Le yaourt est aussi une source de vitamines (*Shahani & Chandan, 1979*). Ces vitamines sont hydrosolubles et ne sont donc pas stockées dans l'organisme (*à l'exception de la vitamine B12*).

Ainsi le yaourt apparaît un aliment de choix dans le cadre d'une alimentation équilibrée. En effet, il est riche en protéines et assure un apport de vitamines et d'oligoéléments, particulièrement le calcium, tout en ayant un apport énergétique modéré.

Tableau N°10 : Composition nutritionnelle de différents types de yaourts pour 100 g de produit

	Energie (Kcal)	Eau (g)	Protéines (g)	Glucides (g)	Lipides (g)
Yaourt nature au lait entier	70.6	86.5	3.8	5	3.6
Yaourt nature au lait partiellement écrémé	47.7	88.2	4	4.8	1.02
Yaourt nature 0% au lait écrémé	42	88.6	4.4	5.1	0.07
Yaourt aromatisé sucré au lait demi-écrémé	84.8	81.1	3.1	14.2	1.4
Yaourt aux fruits sucré au lait demi-écrémé	91.8	77.6	3.2	15.2	1.69

Source : (Anses, 2008)

IV .4. Effets sur la santé

Plusieurs études ont rapporté les effets bénéfiques des laits fermentés sur la santé. Ces effets dépendent à la fois des souches utilisées et des métabolites produits. L'effet le plus étudié qui a valu la dénomination « *probiotique* » par l'EFSA au yaourt est l'amélioration de la digestion du lactose. Une relation de cause à effet a été établie entre la consommation de bactéries vivantes du yaourt et l'amélioration de la digestion du lactose chez les personnes ayant une intolérance au lactose (EFSA, 2010).

L'incapacité à digérer le lactose, a été attribuée à des quantités insuffisantes de la lactase intestinale. L'amélioration de sa digestion se fait grâce à l'activité de la β -galactosidase (*enzyme hydrolysant le lactose*) de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* (Savaiano et al., 1984); la quantité du lactose digérée dépend à la fois de l'activité des enzymes bactériennes du yaourt mais aussi du nombre de bactéries présentes. Afin de porter l'allégation, l'EFSA souligne l'importance du caractère vivant des ferments qui doivent contenir au moins 108 UFC de micro-organismes vivants par portion.

Le yaourt exerce des effets bénéfiques sur la santé grâce à sa composition nutritionnelle. Sa richesse en protéines lui confère un effet satiétogène (Chapelot & Payen, 2010; Tsuchiya et al., 2006), ce qui permet, dans le cadre d'une alimentation équilibrée, de lutter contre l'obésité.

D'autre part, des essais cliniques ont permis de montrer qu'un yaourt enrichi en vitamine D permet d'améliorer la glycémie des patients souffrant du diabète du type 2 (Nikooyeh *et al.*, 2011). D'autres études portent sur la stimulation du système immunitaire, la prévention du cancer, de certaines maladies inflammatoires :

La consommation régulière de yaourt stimule le système immunitaire chez l'homme (deux groupes : jeunes adultes âgés de 20 à 40 ans et séniors âgés de 55 à 70 ans) et diminue les symptômes d'allergie (Van de Water *et al.*, 1999). Le yaourt a un effet pro inflammatoire en stimulant la production de cytokines et plus particulièrement d'IL1 β et de TNF- α chez des hommes de moyenne d'âge de 24.4 (Meyer *et al.*, 2007).

Une autre étude clinique (sur une période s'étalant jusqu'à 12 ans) montre que la consommation de yaourt réduit les risques de cancer colorectal en particulier des hommes (Pala *et al.*, 2011).

V. La grenade

V.1 Description de la grenade

V.1.1 Origine

La grenade (*Punica granatum L.*) est le membre principal de la famille des Punicaceae, qui partage sa famille botanique uniquement avec *Punica protopunica* (grenadier de Socotra). Ce dernier est recensé exclusivement sur l'île de Socotra, située dans l'océan Indien, au large des côtes de Somalie (Courchet 1897). Plus de 1000 cultivars de *P. granatum* existent. Ce fruit est originaire d'Iran et d'Afghanistan, où le grenadier croît de façon spontanée depuis plus de 4000 ans. Aujourd'hui sa culture s'étend à tout le bassin Méditerranéen, à la Chine, l'Inde, et au sud-ouest américain (Californie et Mexique) (Levin 1994).

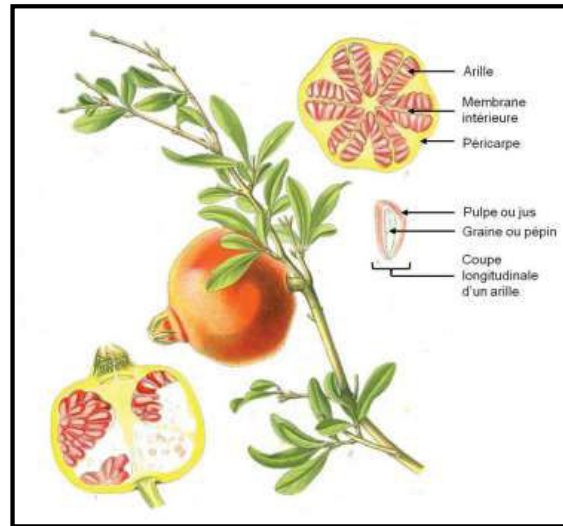
V.1.2 Culture

Dans le monde, les plus importants producteurs de grenades sont les pays d'Orient dont l'Iran (production annuelle de 665 000 tonnes [2003]), la Turquie, la Transcaucasie et l'Inde, mais aussi dans la zone méditerranéenne la Tunisie, le Maroc, l'Espagne, l'Italie et la Grèce. Aux Etats-Unis et plus particulièrement en Californie, la culture de la grenade est également très développée (Lansky and Newman 2007).

V.1.3 Botanique

La grenade, fruit du grenadier, est délimitée par un péricarpe épais (ou peau), à l'intérieur duquel sont contenus de nombreux arilles. Chacun est constitué d'une graine (ou pépin) entourée de jus translucide contenu par une très fine membrane. Les arilles sont rencontrés dans des loges séparées par de minces membranes qui s'étendent à l'intérieur du fruit, prenant naissance au niveau du péricarpe et constituant ainsi une base pour l'attachement des

arilles (*Figure N° 02*) (*Dallas and Bonewald 2010*). Le fruit donne donc naissance à trois parties bien distinctes : les pépins (*environ 3% du poids du fruit*) qui contiennent eux-mêmes 20% d'huile, le jus (*environ 30% du poids du fruit*) et la peau qui comprend également les membranes intérieures, dont la composition phytochimique est détaillée dans les paragraphes suivants (*Lansky and Newman 2007*).



Source : Spilmont, M., 2013.

Figure 2 : Planche anatomique de la grenade, définition des différentes parties du fruit

V.2 Composition des différentes fractions du fruit

De manière générale, la composition de la partie comestible de la grenade est bien décrite. En ce qui concerne la peau du fruit et les pépins, seules certaines classes de molécules ont été relativement bien étudiées. Chacun de ses compartiments possède des constituants spécifiques dont les teneurs dépendent de la variété, la saison, le stade de maturité, ainsi que du lieu géographique et des conditions de culture (*Gil, TomasBarberan et al. 2000; Al-Maiman and Ahmad 2002; Kulkarni and Aradhya 2005; Mirdehghan and Rahemi 2007; Schwartz, Tzulker et al. 2009*).

V.2.1 Le jus

Le jus de grenade, comme de nombreux autres jus de fruits, se compose de sucres tels que le glucose, le fructose et le saccharose et d'acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide malique, l'acide oxalique et l'acide tartrique. Le tableau N°11 montre les valeurs minimales et maximales obtenues pour les acides organiques et les sucres selon une étude élaborée par Melgarejo et al. (2000). Lansky et al. (2007) ont montré que parmi les acides aminés trouvés dans la grenade, il y a la valine, proline et méthionine. D'autres études ont montré que le jus a une composition élevée en vitamines hydrosolubles dont le plus important

est la vitamine C avec une concentration qui varie entre 4 et 6 mg/100g de proportion comestible selon le codex alimentarius en 2009. La grenade a aussi une concentration assez importante en minéraux (*tableau N°11*).

Tableau 11 : Composition du jus de grenade en acides organiques, en sucres et en minéraux (mg/100 g de la partie comestible du fruit)

	Composé	Quantité
Acides organiques (Melgarejo et al., 2000)	Acide citrique	0,09- 0,32
	Acide malique	0,10- 0,21
	Acide oxalique	0,01- 0,07
	Acide tartrique	0,01- 0,05
	Acide fumarique	0,01
Sucres (Melgarejo et al., 2000)	Fructose	5,54- 8,24
	Glucose	5,53- 7,80
	Saccharose	0,01- 0,07
Minéraux et métaux lourds (codex alimentarius, 2009)	Phosphore	0,30
	Fer	259,00
	Potassium	3,00
	Calcium	3,00
	Sodium	3,00
	Manganèse	0,12
	Magnésium	0, 15
	Cuivre	0,07
	Sélénium	0,60
(codex alimentarius, 2009)	Vitamine B1	0,03
	Vitamine B2	0,03
(Tehraniifar et al., 2010)	Vitamine C	9,90- 17,60

Il contient aussi une part non négligeable de phyto-micronutriments de type polyphénolique (0,2 à 1%) (*Aviram, Volkova et al. 2008*), les polyphénols majeurs sont les anthocyanes. Les tannins hydrolysables y sont également présents, notamment la punicalagine et la punicaline. On y trouve aussi, en petite quantité des flavan-3-ols (*catéchine, épicatechine, quercétine, rutine*), des acides hydroxycinnamiques (*acide caféique, chlorogénique, pcoumarique*) et de l' α -tocophérol (*Tzulker, Glazer et al. 2007; Alighourchi, Barzegar et al. 2008; Mousavinejad, Emam-Djomeh et al. 2009*).

Ainsi, du fait de sa composition, le jus de grenade est doté d'un fort pouvoir antioxydant, trois fois supérieur à celui du vin rouge et du thé vert (*Lansky and Newman 2007; Edeas 2010*).

V.2.2 Les graines et leur huile

Les graines, sont composées d'une matrice rigide dont la composition est bien moins décrite. Elle comporte en majorité des lignines ($\approx 35,3\%$), des protéines ($\approx 13,2\%$), des pectines ($\approx 6\%$), des sucres ($\approx 4,7\%$) (*Dalimov, Dalimova et al. 2003*) et des acides hydroxycinnamiques (*Wang, Xie et al. 2004*).

L'huile, obtenue à partir des graines de grenade, se compose à 80% d'acides gras insaturés, représentés par l'acide punique, mais également par les acides oléiques et linoléiques (*Hornung et al., 2002*). Elle se compose aussi d'acides gras saturés, comme les acides palmitiques et stéariques (*Lansky et al., 2007*).

V.2.3 L'écorce du fruit

L'écorce 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 (*Jahfar, Vijayan et al. 2003; Viuda-Martos, Fernández-López 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*).

V.3 Intérêts thérapeutiques

Que ce soit comme aliment de qualité ou comme véritable produit de santé, la grenade dont l'utilisation médicale relève d'une tradition millénaire et dont les vertus sont confirmées aujourd'hui par la science, est de plus en plus appréciée. Plus de 250 études scientifiques ont démontré que les substances protectrices de la grenade, ses polyphénols, peuvent protéger contre le stress oxydatif, les maladies cardio-vasculaires, la démence, les réactions inflammatoires virulentes et même le cancer (*Ahmed et al., 2005*).

- Des études précliniques actuelles montrent que les polyphénols de grenade peuvent combattre la dégénérescence inflammatoire du tissu cartilagineux en particulier en cas d'arthrite rhumatoïde (*Ahmed et al., 2005*) ;
- L'écorce du fruit est utilisée par de nombreux peuples contre les diarrhées, les ulcères, les parodontoses, les stomatites et les pharyngites. L'écorce et les racines de l'arbre et en partie aussi l'écorce du fruit, furent utilisées contre les parasites intestinaux, en particulier contre le ténia et la dysenterie amibienne ;
- Les fleurs de grenade étaient utilisées en Perse pour le traitement du diabète gras (*Jung et Curtay, 2010*) ;
- La protection antioxydante chez l'homme s'améliore de 9% après une cure d'une semaine de consommation journalière de 250 ml de jus de grenade (*Aviram et al., 2000*). Une autre étude a montré une augmentation du SAT dans le sang de 130% après une cure d'un an d'une consommation journalière d'un verre de jus de grenade (*Aviram et al., 2004*).

Evidemment, d'autres organes peuvent aussi profiter de l'effet protecteur antioxydant des polyphénols de grenade : ainsi, de forts effets protecteurs antioxydants ont été constatés sur la muqueuse de l'estomac contre les ravages de l'alcool et de l'acide acétylsalicylique (*Ajaikumar et al., 2005*) ainsi que sur le foie (*Kaur et al., 2006*) ;

- Une étude de Hartmann (2006) a démontré que le jus de grenade réduit de moitié le dépôt de la protéine bêta-amyloïde dans le cerveau. Celle-ci joue un rôle décisif dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer. En outre, les polyphénols de grenade inhibent la production de TNF-alpha dans les cellules inflammatoires au niveau du cerveau (*Jung et al., 2006*) ;
- Les propriétés antimicrobiennes des plantes sont étudiées par un grand nombre de chercheurs à travers le monde. Il a été observé que des extraits ou des composés purifiés, issus de diverses parties du grenadier, possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et antihelminthiques. Il semble que les principes actifs de *Punica granatum* sont ses tanins et ses alcaloïdes (*Elodie, 2009*) ;
- Haidiri et al. (2009), ont montré que les composés phénoliques de grenade tuent également le virus de la grippe Influenza-A et inhibent sa multiplication ;
- Ils ont aussi une action contre les virus HIV (*Neurath et al., 2004 et 2005*), contre les plasmodies de la malaria, contre certaines bactéries (*Reddy et al., 2007*).

I. Probiotiques

L'action des probiotiques ne reposent pas sur un mécanisme unique mais sur de multiples modes.

Chaque souche détient sa propre carte d'identité avec une action précise, donc une indication donnée. Pour être active, une bactérie doit adhérer à la muqueuse intestinale. Les bactéries ont à la fois un rôle métabolique, par la sécrétion d'enzymes, et un rôle immunomodulant, par la sécrétion de cytokines.

Il est généralement admis que les probiotiques contribuent à l'homéostasie intestinale par quatre grands modes d'action :

- Amélioration des fonctions digestives ;
 - Exclusion ou inhibition des pathogènes ;
 - Renforcement de la fonction barrière de l'intestin ;
 - Modulation du système immunitaire.
- **Renforcement de la fonction barrière de l'intestin** : ou modification de la flore intestinale les probiotiques protège le tube digestif et l'organisme de l'implantation et de la multiplication de germes pathogènes ou opportunistes grâce à un "effet barrière" qui s'exerce entre autre par un processus qui inhibent la colonisation de la muqueuse par de bactéries pro-inflammatoires par encombrement de leurs sites d'adhésion, compétition nutritionnelle, en libérant des métabolites toxiques pour les autres germes (*acidification du milieu par le lactate*) ou des composés antimicrobiens tels que des bactériocines ou le peroxyde d'hydrogène ;
- **Modulation du système immunitaire** : Cette stimulation passe par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes comme l'activation de la production de macrophages et l'accélération de la phagocytose par ces derniers (*Perdigón et coll., 1998*), l'augmentation de la production de lymphocytes T et la sécrétion d'interférony par ces derniers (*Halpern et coll., 1991*) et la stimulation de la sécrétion d'IgA lors d'une infection à rotavirus (*Kaila et coll., 1992*). Tous ces effets des probiotiques sur le système immunitaire mènent à un combat plus efficace des infections bactériennes et virales, à une diminution des symptômes de certaines pathologies comme la maladie inflammatoire du côlon ou à une diminution des allergies alimentaires (*Fooks et Gibson, 2002; GournierChâteau et coll., 1994; Isolauri et coll., 2001*) ;
- **Amélioration de la digestion du lactose** : Le lactose est hydrolysé par une β -galactosidase présente sur les entérocytes de la bordure en brosse de l'intestin grêle. L'activité de cette enzyme, également appelée lactase, est maximale à la naissance puis diminue après le sevrage pour aboutir à un déficit partiel (*hypolactasie*) chez l'adulte. *Bifidobacterium*

possède une β -galactosidase, ce qui les rend intéressants pour la diminution des troubles liés à une intolérance au lactose : Les deux tiers de la population mondiale souffrent d'intolérance au lactose dont les symptômes sont des douleurs abdominales, des nausées ou des flatulences. L'origine de ce trouble digestif est due à une déficience de l'activité β -galactosidase. A quantité égale de lactose, les yaourts seraient plus digestes que le lait, probablement par l'apport de l'activité de β -galactosidase des bactéries lactiques. Des laits non fermentés enrichis avec les probiotiques *B. longum* B6 ou *L. bulgaricus* 449 permettent également de réduire la production d'hydrogène et les symptômes associés à l'intolérance (Vesa et al., 2000) ;

- **Prévention des maladies atopiques** : qui sont d'origine allergique, les propriétés immunomodulatrices des probiotiques leur confèrent un intérêt certain dans la prévention de ces pathologies. La dermatite atopique est une maladie dermatologique caractérisée par des zones d'inflammation de l'épiderme sous forme d'eczéma, survenant les plus souvent avant l'âge de 5 ans et pouvant se prolonger jusque dans la vie adulte. L'administration quotidienne pendant 12 semaines de *L. sakei* KCTC 10755BP permet de réduire significativement la sévérité de cette maladie chez des enfants (Woo et al., 2010). *L. rhamnosus* GG s'est également révélé efficace pour réduire les symptômes chez des enfants présentant un terrain favorable à la dermatite atopique (Kalliomaki et al., 2003). Cependant, le même probiotique a été décrit comme peu efficace contre l'asthme et la dermatite dans un contexte de maladies atopiques (Rose et al., 2010), montrant la nécessité de compléter les connaissances actuelles sur les effets des probiotiques dans le traitement des maladies atopiques pour valider leur usage dans un but préventif ou thérapeutique.
- **Prévention du cancer colorectal** : Le flux fécal véhicule de très nombreux carcinogènes, et la flore intestinale joue un rôle majeur dans la santé du côlon. Il a donc été suggéré que certaines bactéries lactiques pourraient moduler de façon favorable les mécanismes de carcinogenèse intestinale. Les éléments dont nous disposons sont essentiellement expérimentaux, avec les limites de l'extrapolation de données expérimentales à la cancérogenèse humaine. Cependant, certains travaux chez l'homme suggèrent un effet bénéfique potentiel. Les mécanismes impliqués dans un effet anticarcinogène des probiotiques sont :
 - Antigénotoxicité ;
 - Inhibition de l'activité d'enzymes coliques ;
 - Contrôle de la croissance de bactéries potentiellement néfastes ;
 - Interaction avec les colonocytes ;

- Stimulation du système immunitaire ;
- Production de métabolites physiologiquement actifs.

Des travaux en cours, en particulier au niveau européen, devraient permettre dans les années à venir de mieux apprécier l'intérêt potentiel des probiotiques dans la prévention du cancer colorectal.

Tableau 12 : Récapitulatif des mécanismes d'action des probiotiques

Mécanismes d'actions
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activités antimicrobiennes, immunomodulation, compétition nutritionnelle, inhibition d'adhésion des pathogènes ; ▪ Dégradation du lactose par les B-galactosidases bactériennes ; ▪ Métabolisme des lactobacilles : favorise la flore bénéfique et inhibe les pathogènes ; ▪ Amélioration des défenses non spécifiques. (<i>augmentation de la production d'IgA, multiplication lymphocytaire, adjuvants de la réponse immune spécifique, régulation de la balance Th1/Th2</i>) ; ▪ Restauration de l'homéostasie du système immunitaire, régulation de la production de cytokines, prévention de la translocation d'antigènes exogènes ; ▪ Dégradation de composés cancérogènes ; ▪ Interactions avec le système nerveux entérique ; ▪ Assimilation du cholestérol, diminution de l'activité des hydrolases de sels biliaires, production d'antioxydants ; ▪ Hydrolyse de chélateurs.

Source : (Mercenier *et al.*, 2003; de Vrese & Schrezenmeir, 2008).

II. Prébiotiques

▪ Modulation de la flore intestinale

Malgré leur résistance à la digestion au cours de leur transfert dans le tractus digestif, les prébiotiques sont fermentés sélectivement par la flore bénéfique commensale au détriment des pathogènes entériques.

La consommation de FOS supporte la croissance de bifidobactéries, inhibe les Clostridium et permet d'améliorer le bien-être de l'enfant (Waligora-Dupriet *et al.*, 2007). Ces effets bifidogènes ont été confirmés par d'autres travaux (Hernot *et al.*, 2009).

▪ Amélioration de la motilité intestinale et soulagement de la constipation

L'augmentation de la concentration du butyrate qui est un acide gras à courtes chaînes dérivé de la fermentation des prébiotiques par la flore bénéfique, et source d'énergie privilégiée pour les colonocytes.

La consommation de polydextroses augmente la vitesse de ce transit et permet ainsi d'obtenir une amélioration de la consistance des fèces chez des sujets souffrant de constipation chronique (Hengst *et al.*, 2009).

▪ Augmentation de l'absorption minérale et prévention de l'ostéoporose

La consommation des prébiotiques favorise la croissance des bactéries lactiques, ce qui permet d'acidifier le milieu. Cette baisse de pH induit une meilleure solubilité des ions calcium, magnésium et ferreux, et facilite donc leur absorption intestinale.

L'administration de fructanes à des adolescents permet d'augmenter l'absorption de calcium, 8 semaines après le début du traitement. Après un an, la minéralisation et la densité des os étaient significativement améliorées chez le groupe ayant reçu les prébiotiques (*Abrams et al., 2005*).

▪ Modulation du métabolisme lipidique et glucidique

La fermentation des prébiotiques par les probiotiques induit à une production d'acétate et de propionate modulant la lipogenèse et la néoglucogenèse hépatiques.

Un mélange d'inuline et de FOS module le métabolisme lipidique hépatique de rats au cours d'un régime riche en graisses et pauvre en fibres. Ces prébiotiques permettent de diminuer ainsi la concentration plasmatique de triglycérides (*Delzenne et al., 2002*).

Chez l'humain, la consommation d'inuline fait baisser le cholestérol total et le LDL chez des sujets souffrant d'hypercholestérolémie (*Davidson et al., 1998*).

▪ Diminution des diarrhées

Les prébiotiques inhibent la croissance de la flore pathogène. Par contre, ils favorisent et stimulent la croissance de la flore bénéfique qui se fixe aux sites d'adhésion des pathogènes.

La consommation de FOS a permis de prévenir des phénomènes de rechute chez des patients souffrant d'infections intestinales à *Clostridium difficile* (*Lewis et al., 2005*).

▪ Immunomodulation et effet antiinflammatoire

Les prébiotiques peuvent exercer des effets immuno-modulateurs à travers la stimulation de la croissance de bactéries bénéfiques, mais ne possèdent pas de propriété leurs permettant d'agir directement sur le système immunitaire (*de Vrese & Schrezenmeir, 2008*). C'est pourquoi ces effets ont toujours été mis en évidence en présence d'une flore intestinale.

L'administration d'inuline à des rats traités au TNBS réduit la sévérité des lésions inflammatoires du côlon, la production de cytokines pro-inflammatoires et l'activité myéloperoxydase mucosale (*Videla et al., 2001*).

L'ingestion d'inuline et de FOS permet de diminuer l'inflammation du côlon sigmoïde, la production de TNF α et d'IL-1 α chez des sujets souffrants de RCH, en association avec le probiotique *B. longum* (*Furrie et al., 2005*). La consommation de FOS par une petite cohorte de patients atteint de MC a entraîné une baisse significative des symptômes qui s'est

accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules dendritiques productrices d'IL-10 et de la proportion de bifidobactéries dans la flore fécale (*Lindsay et al., 2006*).

▪ **Prévention du cancer colorectal**

Le butyrate produit par la fermentation des prébiotiques inhibe la prolifération des cellules cancéreuses et activent l'apoptose de celles-ci. La fermentation d'inuline et de FOS en SCFA a permis de réduire le développement de tumeurs chimio-induites chez le rat en activant l'apoptose de cellules cancéreuses (*Hughes & Rowland, 2001*).

Les prébiotiques sembleraient également agir chez l'humain contre le développement de CCR. Une méta-analyse reprenant les résultats de 13 études montre que la consommation quotidienne de 27 grammes de différentes fibres prébiotiques permet de diminuer de 50 % le facteur de risque de développer cette pathologie (*Friedenreich et al., 1994*).

En conclusion, les probiotiques et maintenant les prebiotiques représentent une approche nouvelle du contrôle de la flore digestive chez l'homme et plus particulièrement chez les sujets les plus à risque comme l'enfant. Parmi les divers effets observés, les plus patents sont ceux qui concernent la protection contre les infections digestives, notamment virales. Seules les recherches futures permettront de préciser si les diverses autres propriétés également invoquées actuellement se révèlent douées d'un intérêt clinique ou préventif chez l'homme.

1. Probiotiques

L'utilisation d'un micro-organisme comme probiotique à des fins industrielles, suppose que la souche utilisée soit parfaitement identifiée, déclarée lors de la mise sur le marché de l'aliment, et régulièrement contrôlée.

De nos jours, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes :

- Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales ;
- Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation ;
- Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimé.

Les probiotiques sont généralement associés aux produits laitiers de culture, parce que les consommateurs s'attendent à y trouver des cultures vivantes. Les protéines dans les produits laitiers produisent un effet tampon lorsque le probiotique traverse le milieu agressif du système digestif, et la réfrigération accroît la stabilité et prolonge la durée de conservation des probiotiques.

Les probiotiques sont extrêmement sensibles à la chaleur et aux autres conditions de transformation. Les nouvelles technologies, comme la microencapsulation et la technologie des cellules immobilisées, offrent une protection additionnelle aux organismes probiotiques et de nouvelles façons d'inclure des probiotiques dans les produits alimentaires.

La gamme de produits probiotiques comprend maintenant des fromages, des crèmes glacées et des yogourts glacés de même que des aliments et des boissons non laitiers.

Les fabricants commercialisent de nouveaux vecteurs d'administration de probiotiques comme des pailles et des capsules de bouteille qui, lorsque percées ou brisées, délivrent des doses thérapeutiques de probiotiques dans un produit alimentaire.

Les chercheurs travaillent à la mise au point de « *symbiotiques* », mélanges d'organismes probiotiques ou combinaisons de probiotiques et d'ingrédients prébiotiques spécifiques, afin d'améliorer la santé intestinale, de renforcer le système immunitaire et d'accroître la résistance aux maladies.

III.1.1 Le chocolat aux probiotiques

Lactobacillus casei R-215* est disponible depuis juin 2008 en microcapsules. L'institut Rosell-Lallemand et l'entreprise Lal'Food étendent ainsi leur gamme de bactéries probiotiques disponibles sous format Probiocap, technologie d'encapsulation de bactéries lactiques par des couches d'acides gras végétaux brevetée par le groupe Lallemand. C'est la quatrième souche

disponible sous cette forme avec *Lactobacillus helveticus* R-52, *Lactobacillus rhamnosus* R-11 et *Bifidobacterium longum* R-175.

III.1.2 Probiotiques en industrie fromagère

En raison d'un pH relativement élevé (*pH* 5,5), les industriels et les chercheurs se tournent vers le fromage de type cheddar qui présente l'avantage d'être un bon porteur de microorganismes probiotiques en vue son bon pouvoir tampon et sa teneur relativement élevée en matières grasses, il offre une protection aux bactéries probiotiques contre la dégradation enzymatique et l'environnement acide du tractus gastro-intestinal, ce fromage est donc précieux, car la bactérie peut rester en vie pendant au moins 6 mois. (*Gardiner et al., 1998, Stanton et al., 1998*) (*Dinakar et Mistry, 1994*).

III.1.3 Probiotiques comme compléments alimentaires

Lactibiane Référence est un complément à base de 4 souches probiotiques : *Bifidobacterium longum* LA 101, *Lactobacillus helveticus* LA 102, *Lactococcus lactis* LA 103, *Streptococcus thermophilus* LA 104, qui contribue au renfort de la flore intestinale, à la diminution des troubles intestinaux (*ballonnements, sensations d'inconfort, etc.*) et à la régulation du transit. Ses effets se remarquent dès la première semaine de prise.

Il existe aussi des compléments alimentaires de type levure tels que la levure de bière dite aussi « *active* » qui contient des micro-organismes vivants tels que les probiotiques comme la levure *Saccharomyces* nécessaires pour régénérer toute la flore intestinale. ... Son action sur le foie, l'estomac et les intestins permet de lutter contre les intoxications alimentaires ou médicamenteuses.

III.1.4 Probiotiques dans le yaourt

Ces dernières années, les industriels ont lancé des nouveaux produits laitiers (*Actimel®*, *Activia® au bifidus...*) car il a été prouvé que l'incorporation de cellules vivantes probiotiques dans le yaourt augmente sa valeur thérapeutique et améliore la digestion et diminuent les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (*Chen et Chen, 2007, Weichselbaum, 2009*).

Cependant, ils ont une faible viabilité dans le yaourt en raison du faible pH (*de 4,2 à 4,6*). Des études ont montré que l'utilisation de bactéries probiotiques encapsulées était meilleure pour leur survie. De plus, l'incorporation de cellules probiotiques dans les yaourts pourrait être effectuée sans faire beaucoup de modifications par rapport au processus traditionnel (*Kailasapathy, 2009*).

III.1.5 Probiotiques comme médicaments

Le laboratoire Sanofi- Aventis a produit Bioflorin[®], un médicament à base de probiotiques de types *Enterococcus faecium* SF68[®] qui aide à lutter contre la diarrhée. Il renforce les capacités d'auto-guérison du corps, normalise l'activité intestinale et offre à la flore intestinale une protection biologique.

BIOPROTUS Buccal est un probiotique innovant qui apporte une réponse aux désagréments tels que la mauvaise haleine, l'inflammation des gencives ou encore la formation de la plaque dentaire donc participant au soutien de la flore buccale. Il contient également du calcium, nécessaire au maintien d'une dentition normale. Proposé sous forme de sticks, il apporte aux consommateurs la juste dose de probiotiques nécessaire à son bon fonctionnement.

Les probiotiques sont un axe de développement majeur. Les géants américains ont annoncé un investissement de 94 millions d'euros pour augmenter de 70 % les capacités de production de leurs usines. Au programme : de nouveaux fermenteurs et d'autres équipements pour répondre à la demande croissante de ce marché. « Les consommateurs veulent prendre soin de leur santé de façon proactive et ils se tournent de plus en plus vers les probiotiques.

2. Prebiotiques

Les prébiotiques sont des ingrédients fonctionnels qui permettent aux industriels de mettre l'accent sur la santé des consommateurs. Ils sont incorporés dans les différents aliments, transformés en poudre ou en gélules pour être présentés comme des compléments alimentaires. Les prébiotiques sont aussi le principe actif de certains médicaments, et ils sont même ajoutés aux produits cosmétiques.

III.2.1 Addition des prébiotiques dans le lait infantile

Parmi les constituants alimentaires spécifiques des nourrissons, figurent certains prébiotiques couramment utilisés dans les formules infantiles pour tenter de mimer la composition du lait maternel.

En 2017, Danone a lancé aux États-Unis Neocate Splash, la première formule hypoallergénique prête à l'emploi ; qui est la seule à contenir une combinaison unique de prébiotiques (FOS) et de probiotiques. Elle favorise le développement d'une flore intestinale équilibrée chez les nourrissons souffrant d'allergie au lait de vache, d'autres allergies alimentaires et de troubles intestinaux.

III.2.2 Ajout de Brana Vita dans plusieurs aliments

En 2011, la start-up belge Fugeia s'engage dans une collaboration avec Nestlé sur le développement de produits alimentaires contenant Brana Vita.

Brana Vita est un ingrédient alimentaire riche en oligosaccharides d'arabinoxylane dérivées des parois cellulaires du son de blé. Ces oligosaccharides d'arabinoxylane contenus dans Brana Vita sont des prébiotiques très puissants, qui stimulent la croissance des bactéries bénéfiques du côlon à savoir les bifidobactéries.

III.2.3 Introduction des prébiotiques dans les céréales

Kellogg Company, une entreprise américaine qui met l'accent sur la santé intestinale et sortira en janvier 2020 deux nouvelles références de la gamme « *Happy Guts* ». Ces deux nouveautés auront la particularité de contenir des fibres prébiotiques sous forme d'inuline de racine de chicorée.

III.2.4 Prébiotiques sous forme de gélules végétales

Nutrixeal a mis en oeuvre Prébiosoft qui est un complément alimentaire présenté sous forme de gélules. Les composants majeurs de ce produit sont les fibres de gomme d'acacia qui ont un effet prébiotique, un impact très doux sur le fonctionnement intestinal et ne génèrent aucun ballonnement, même à dose élevée.

III.2.5 Des prébiotiques naturels en poudre

L'entreprise française Vegane lance une poudre d'inuline qui provient des profondeurs de la forêt amazonienne et de la plante exotique de Chicorée. Cette poudre est un complément qui peut être facilement mélangé dans toutes sortes de boissons et d'aliments.

III.2.6 Introduction des prébiotiques dans les médicaments

L'entreprise Mylan produit une solution buvable « *Duphalac* » dont le principe actif est le lactulose, une des plus communs prébiotiques commercialisés.

III.2.7 Les prébiotiques dans les produits cosmétiques

Bio Provence a intégré les prébiotiques dans la composition d'un soin hydratant. Grâce à ces prébiotiques Perfect Selfie protège la peau des agressions extérieures et renforce les bonnes bactéries.

Les aliments sont actuellement de plus en plus souvent stérilisés pour des raisons d'hygiène et de conservation, ce qui les appauvrit en « *probiotiques naturels* ». Cela conduit les industries agro-alimentaires à compléter en probiotiques et prébiotiques certains aliments comme les laits fermentés et les produits dérivés. Tous les effets bénéfiques conduisent à des enjeux économiques importants.

Notre travail consiste à étudier la viabilité des bifidobactéries en culture pure et au niveau d'une matrice alimentaire (*yaourt*) en présence d'extrait hydro-alcoolique d'écorce de grenade supposant contenir des prébiotiques.

1. Microorganismes

Les souches bactériennes utilisées dans notre étude ont été isolées à partir du yaourt Activia de Danone, fabriqué et commercialisé en Algérie à base de bifidobactéries et des bactéries classiques d'un yaourt *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

2. Milieux et conditions de culture

2.1. Milieux de culture utilisés

MRS cystéiné + acide nalidixique (*Man Rogosa Sharpe*) (*De Man et al., 1960*) en bouillon et en gélose.

Lait écrémé UHT Candia Silhouette.

2.2. Conditions des cultures

Les bifidobactéries sont des bactéries anaérobies strictes incapables de se cultiver en présence d'oxygène (O₂). Cette action nous impose à suivre des conditions particulières de culture, qui sont :

- **Réductions des milieux :** Tous les milieux et solutions utilisés pour cultiver les souches de bifidobactéries sont additionnées de la cystéine chlorhydrique, qu'est un agent réducteur et non toxique pour les bactéries. La concentration finale utilisée est de 0.05% (p/v) ;
- **Optimisation des milieux :** Le milieu MRS est additionné de l'antibiotique acide nalidixique qui est un inhibiteur de nombreuses bactéries à Gram négatif. Cette action permet de rendre le milieu sélectif en vue d'isoler les bifidobactéries. La concentration finale utilisée est de 0,002% (p/v) ;
- **Régénération des milieux :** Les milieux, juste avant leurs utilisations sont liquéfiés par ébullition à 100°C dans un bain-marie pendant 20 min ;
- **Réalisation d'une atmosphère anaérobie :** Tout au long du travail, les cultures de bifidobactéries (*soit en milieu liquide ou milieu solide*) sont incubées dans un tambour en inox en présence d'une bougie, l'ensemble est une enceinte close dans laquelle il est possible de réaliser une atmosphère sans O₂.

3. Extraction et préparation de l'extrait

3.1. Extraction hydro-alcoolique du gel

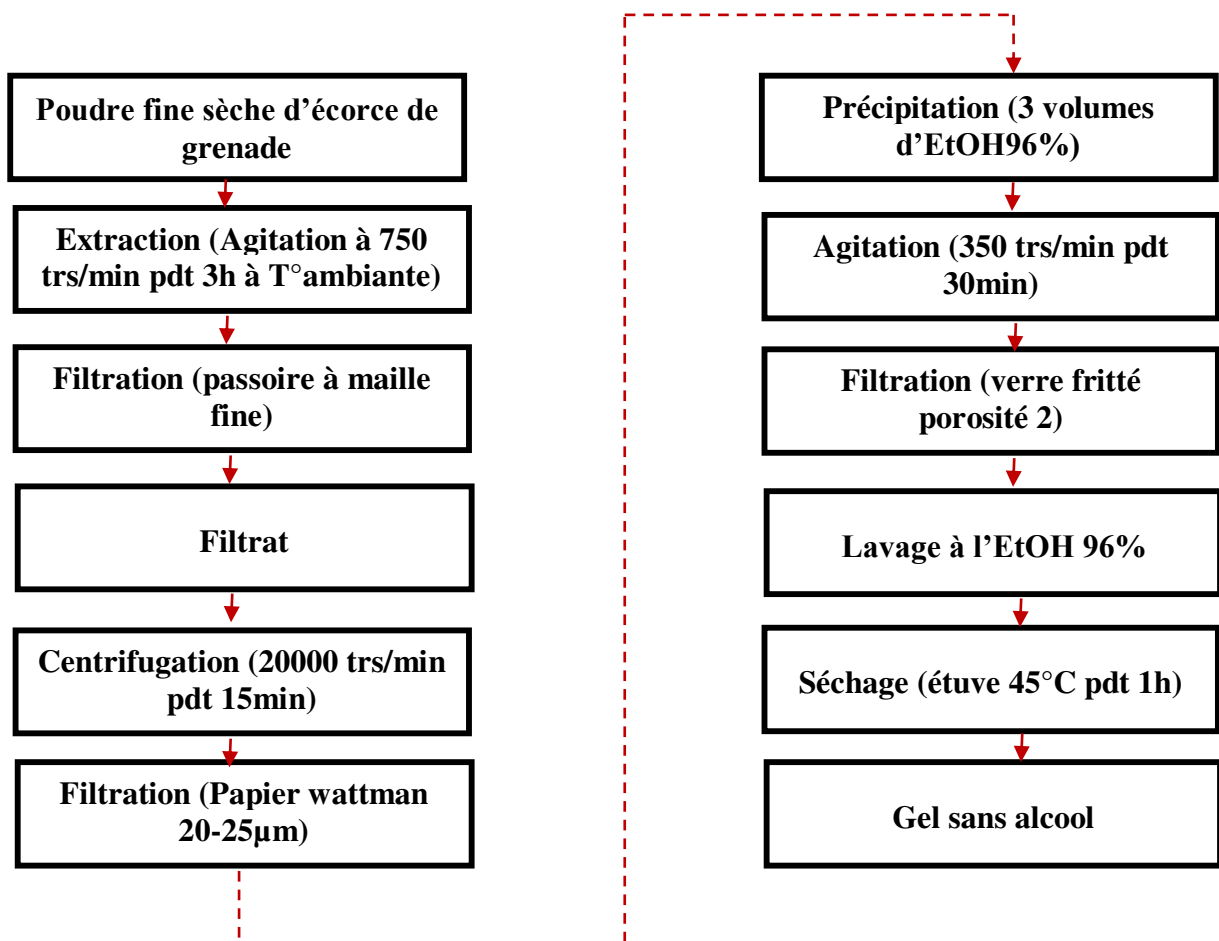
Les écorces de grenade ont été nettoyées, séchées au soleil durant une semaine ; elles ont ensuite été fractionnées en petits morceaux puis broyées et tamisées afin d'obtenir une poudre fine.

50 g de poudre d'écorce de grenade sont mises en suspension dans 1L d'eau distillée. Le mélange est homogénéisé sous agitation à 750 trs/min pendant 3 heures à température ambiante à l'aide d'un agitateur magnétique, puis filtré à travers une passoire à mailles fines pour retirer les débris macroscopiques insolubles.

Le filtrat obtenu est centrifugé à 20 000 trs/min pendant 15 minutes à l'aide d'une centrifugeuse.

Le surnageant est filtré à l'aide d'un Buchner muni de papier Wattman de porosité 20-25 μm . Le filtrat est précipité par 3 volumes d'éthanol 96 %, mis sous agitation (350 trs/min) pendant 30 minutes et récupéré par filtration sur verre fritté de porosité 2.

Le gel obtenu (*supposant contenir des polysaccharides*) est lavé à l'éthanol sur une passoire à mailles fines, puis transvasé dans un creuset qui est placé dans une étuve à 45°C durant 1h pour permettre la volatilisation totale de l'éthanol.



Source : Réalisé par nous même à partir des données collectées.

Figure N° 3 : Schéma général du procédé d'extraction du gel à partir de l'écorce de grenade

3.2. Préparation des dilutions du gel

Nous avons réalisé des dilutions à différentes concentrations avec le gel obtenu :

- Préparer 5 béchers lavés et stérilisés au préalable ;
- Peser dans chaque bécher 2g de gel ;
- Ajouter 100ml, 75ml, 50ml, 10ml d'eau distillée stérile dans chaque bécher afin d'obtenir respectivement les concentrations suivantes (g/ml) : 0.02 – 0.03 – 0.04 – 0.08 – 0.2 ;
- Conserver à 4°C.



Figure 4 : Les dilutions du gel à différentes concentrations

3.3. Analyses physico -chimiques du gel

3.3.1. Degrés de Brix

Le réfractomètre de Brix (*Rbrix*) optique ou numérique mesure l'indice de réfraction de la lumière et le rapporte sur une échelle de Brix. Cette échelle fait référence à la concentration en sucre d'une solution, où 1 % correspond à un gramme de sucre dans 100 g de solution (*Son et al., 2009*).

Une petite quantité de gel a été étalée sur le prisme du réfractomètre numérique, après étalonnage de ce dernier.

3.3.2. Extrait sec

La détermination de l'extrait sec total nous permet d'avoir le taux d'humidité et la matière sèche totale de notre gel.

Nous avons pesé une boîte de Pétri séchée préalablement à 45°C pendant 30min et refroidie dans un dessiccateur (m_0).

Une prise d'essai du gel a été pesée dans cette boîte (m_1).

La masse de la boîte ajoutée à celle du gel correspondent à (m_2), l'ensemble est étuvé sans couvercle à 45°C/ 30min, et refroidi dans un dessiccateur jusqu'à température ambiante, puis pesé (m_3).

L'opération est répétée jusqu'à stabilisation du poids.

L'humidité est calculée avec la formule suivante :

$$\text{Humidité (\%)} = [(m_2 - m_3) / m_1] \times 100$$

D'où l'extrait sec total (%) = 100% - Humidité (%)

4. Isolement des bifidobactéries :

L'isolement à partir du yaourt a été réalisé sur milieu MRS additionné de 0,05% de cystéine HCl et de 0,002% d'acide nalidixique. Nous avons pris 10 g de yaourt, mis dans un erlenmeyer contenant 100ml de Tryptone Sel Eau cystéine (*voir annexe*), et nous avons réalisé des dilutions décimales à partir de cette suspension mère.

Après homogénéisation pendant 3min à l'aide d'un vortex, 1ml de ces différentes dilutions décimales 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} est porté aseptiquement dans des boîtes de Pétri vides préparées à cet usage., puis coulées avec le milieu MRSc + AN. Nous avons pris 2 boîtes de chaque dilution ; deux témoins sont ajoutés, un contenant le milieu de culture uniquement, l'autre le milieu et la solution TSEc.

L'incubation est faite dans un tambour à 37°C en anaérobiose pendant 72h.

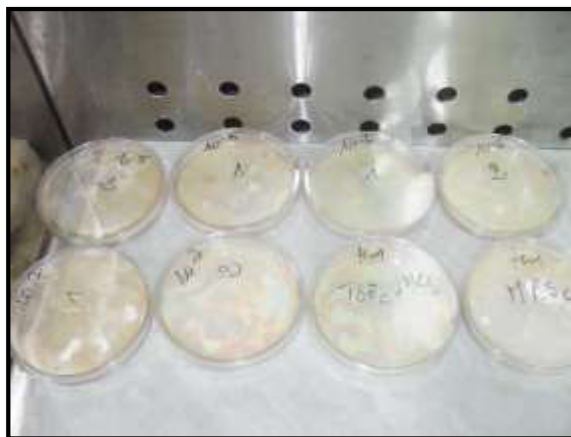


Figure N°5 : Ensemencement des dilutions sur milieu MRSc + AN

5. Purification des bifidobactéries

Les colonies obtenues ont été ensemencées dans un bouillon MRSc et incubées en anaérobiose durant 18h à 37°C. Après incubation elles ont été repiquées en surface (*en stries*) sur milieu gélosé (MRSc + AN). Ceci conduit à obtenir une culture pure.

6. Confirmation des souches

Nous avons réalisé des tests de confirmation à partir des boîtes obtenues après repiquage.

6.1. Coloration de Gram (*Larpent et Larpent, 1990*)

Sur les frottis fixés, nous avons ajouté quelques gouttes de violet de gentiane qu'on laisse agir 1 minute. Le colorant est jeté, et la préparation est recouverte de lugol (*solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium*) pendant 30s, l'opération est répétée une deuxième fois. Ensuite la préparation est décolorée à l'alcool 90°. Rincer avec de l'eau distillée. Enfin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir 1 minute. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique à l'immersion. (×100).

6.2. Recherche de la catalase (*Larpent et Larpent, 1990*)

Le test consiste à déposer une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂) sur une colonie prélevé du milieu solide.

La présence de la catalase se traduit par le dégagement de bulles gazeuses et le contraire indique l'absence de l'enzyme.

6.3. Production de gaz (*Garvie, 1984*)

Pour déterminer la production de CO₂ de la fermentation du glucose par les souches de bifidobactéries, une colonie d'une culture pure a étéensemencée dans le bouillon MRSc mis dans un tube contenant une cloche de Durham, additionné d'huile de vaseline stérile et incubé à 37°C pendant 24h en anaérobiose.

La présence de gaz dans la cloche indique qu'il y a production de CO₂.

6.4. Production d'indole (*Beerens, 199 ; Crociani et al., 1996*)

Une colonie de bifidobactérie est inoculée dans un tube d'eau peptonnée exempte d'indole additionnée d'huile de vaseline stérile et incubée en anaérobiose à 37°C/ 48h. La recherche d'indole a été effectuée à l'aide du réactif Kovacs.

La réaction positive se traduit par la formation d'un anneau rouge en surface.

7. Conservation des souches

Les souches obtenues sont cultivées sur milieu MRSc + AN, après 24h d'incubation les boîtes de Pétris sont conservées à 4°C dans des conditions d'anaérobiose. Les cultures sont repiquées toutes les deux semaines (*Scardovi, 1986*).

8. Etude de l'effet de l'ajout du gel d'extrait d'écorce de grenade sur les bifidobactéries en culture pure et dans le yaourt

8.1. Préparation d'inoculum

Des tubes de lait écrémé et stérile contenant 0.05% (p/v) de cystéine et 0.5% (p/v) d'extrait de levure (*Frank et al., 1993*), ont été inoculés avec une solution de TSEc chargée de colonies de bifidobactéries jusqu'à une densité optique de 0.135 lue à 625nm (*Voir la courbe d'étalonnage dans la partie annexe III*). Une couche d'huile de vaseline stérile a été ajoutée. Les tubes ont été fermés et scellés avec du papier parafilm et incubés en anaérobiose à 37°C pendant 24h.

8.2. Etude de l'effet de l'ajout du gel d'extrait d'écorce de grenade sur les bifidobactéries en culture pure

A partir d'un ml d'inoculum bien homogénéisé, nous avons réalisé une série de dilutions décimales dans une solution de TSEc jusqu'à 10^{-8} .

Nous avons pris 1ml de la dilution : 10^{-4} que nous avons mélangé à 1ml de chacune de ces dilutions du gel à différentes concentrations (g/ml) : 0.02 – 0.03 – 0.04 – 0.08 – 0.2.

L'opération est répétée pour les dilutions / 10^{-5} / 10^{-6} / 10^{-7} / 10^{-8} .

Un millilitre des différents mélanges ont étéensemencés sur milieu MRSc + AN

Douze témoins ont été ajoutés : 5 contenant les dilutions du gel, 5 autres contenant les dilutions de l'inoculum, 1 contenant le milieu de culture uniquement et un dernier le milieu et la solution TSEc.

L'incubation est faite à 37°C en anaérobiose pendant 72h.

8.3. Etude de l'effet de l'ajout du gel de l'extrait d'écorce de grenade sur les bifidobactéries dans une matrice alimentaire (Yaourt)

Pour étudier la croissance des bifidobactéries dans le yaourt nature que nous avons préparé au préalable, quatre erlenmeyers ont été préparés :

- Le premier contient 10g de yaourt nature ;
- Le second contient 10g de yaourt nature additionné à 1ml de la dilution optimale du gel (0.2 g/ml) ;
- Le troisième contient aussi 10g de yaourt nature additionné à 1 ml d'inoculum ;
- Le dernier contient 10g de yaourt nature additionné à 1ml de la dilution optimale du gel et 1ml d'inoculum.

NB : Les trois premiers erlenmeyers sont considérés comme des témoins.

L'erlenmeyer contenant 10g de yaourt nature additionné à 1ml d'inoculum et à 1ml de la dilution optimale du gel et l'autre contenant 10 g de yaourt nature additionné à 1ml

d'inoculum seulement ont été fermés et scellés avec du papier parafilm et incubés simultanément à 42°C pendant 18h et 24h. (*Pour l'incubation en anaérobiose, l'huile de vaseline a été ajoutée.*)

Après 18h d'incubation, des dilutions décimales ont été réalisées pour chaque suspension ; 1ml des dilutions 10^{-4} / 10^{-5} / 10^{-6} / 10^{-7} / 10^{-8} ont étéensemencées sur milieu MRSc + AN.

L'incubation est faite en anaérobiose à 37°C pendant 72h.

.

1. Analyses physico -chimiques du gel

I.1. Degré de Brix

Après avoir étalé la petite quantité de gel sur le prisme le réfractomètre a indiqué une valeur de 19,6 (figure 6). Cela signifie que le gel contient 19,6 % de sucre.



Figure N° 06 : Résultat du degré de Brix

I.2. Extrait sec

L'humidité est calculée avec la formule suivante :

$$\text{Humidité (\%)} = [(m_2 - m_3) / m_1] \times 100$$

Où : $m_0 = 46,624\text{g}$ (la masse de la boîte vide).

$m_1 = 1,416\text{g}$ (la masse de la prise d'essai du gel).

$m_2 = m_0 + m = 48,040\text{g}$ (la masse de la boîte ajoutée à celle du gel avant étuvage).

$m_3 = 47,517\text{g}$ (la masse de la boîte ajoutée à celle du gel après étuvage).

▪ Application numérique :

$$\text{Humidité (\%)} = (48,040 - 47,517) / 1,416 \times 100$$

$$\text{Humidité (\%)} = 36,94\%$$

D'où l'extrait sec total (%) = 100% - Humidité (%)

▪ Application numérique :

$$100\% - 36,94\% = 63,06\%$$

Ce résultat démontre que le taux d'extrait sec total du gel est de 63,06 %

2. Isolement des bifidobactéries

2.1. Observation macroscopique

L'observation des souches de bifidobactéries isolées à partir du yaourt Activia de Danone développées sur milieu MRSc +_{AN} (*figure 07*) ; nous montre des petites colonies blanchâtres, à contour régulier et diamètres variables.

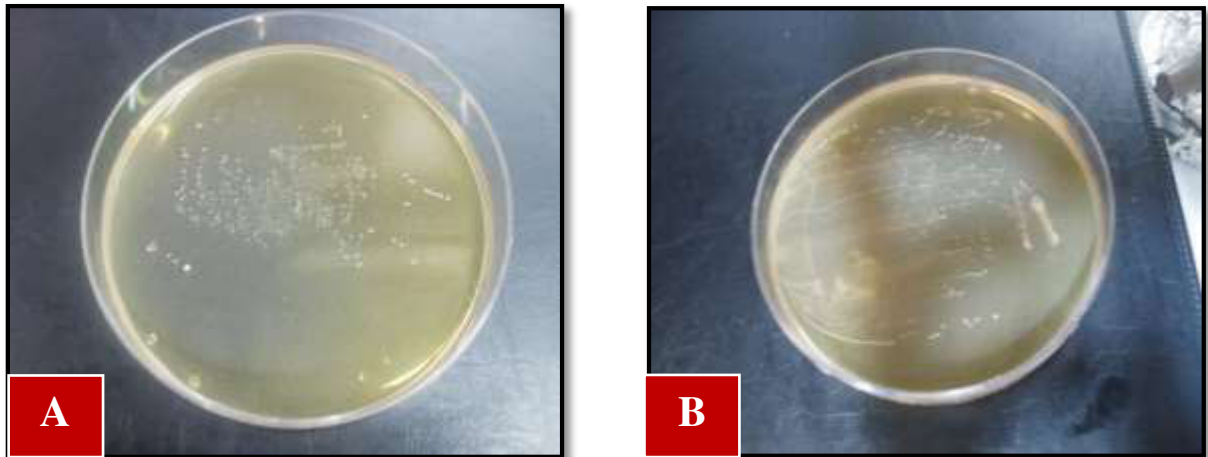
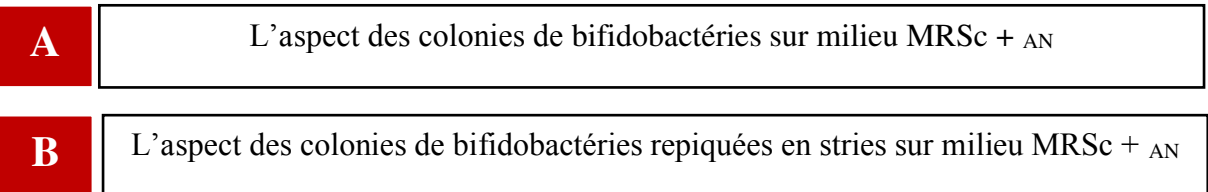


Figure 7 : Aspect macroscopique des bifidobactéries



2.2. Observation microscopique

L'observation microscopique après coloration de Gram montre la présence de bacilles en forme Y et V ou incurvées avec des extrémités bifurquées. Elles sont isolées ou en amas (*figure 08*) avec une couleur rose donc ce sont des bactéries à Gram positif.

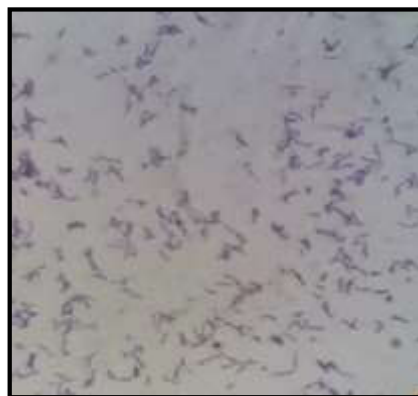


Figure 08: Aspect microscopique des bifidobactéries après coloration de Gram, observé sous microscope optique avec l'objectif à immersion (x100)

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.

2.3. Tests physiologiques et enzymatiques

2.3.1 Production de gaz

La culture pure de la souche dans le bouillon MRSc contenant une cloche de Durham et incubé à 37°C pendant 24h en anaérobiose n'a montré aucune production de gaz dans la cloche. (*Figure 09*). Ce résultat nous démontre que ces souches fermentent le glucose sans production de CO₂.



Figure 09 : Test de production de gaz

2.3.2 Recherche de catalase

Le test de catalase nous montre une absence de dégagement gazeux (*figure 10*) ce qui indique que les souches sont dépourvues de toute activité catalase.



Figure 10 : Test de recherche de la catalase

2.3.3 Production d'indole

L'ajout d'une goutte du réactif de Kovacs nous montre l'absence de l'anneau rouge (*figure11*) ; ce qui démontre que cette souche ne forme pas d'indole.



Figure 11 : Test de recherche d'indole

Les résultats des tests physiologiques et enzymatiques sont résumés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Résultats des tests physiologiques et enzymatiques des souches isolées

	Production de CO2 à partir du glucose	Catalase	Indole
Réaction	Négative	Négative	Négative

Source : Réalisé par nous-même.

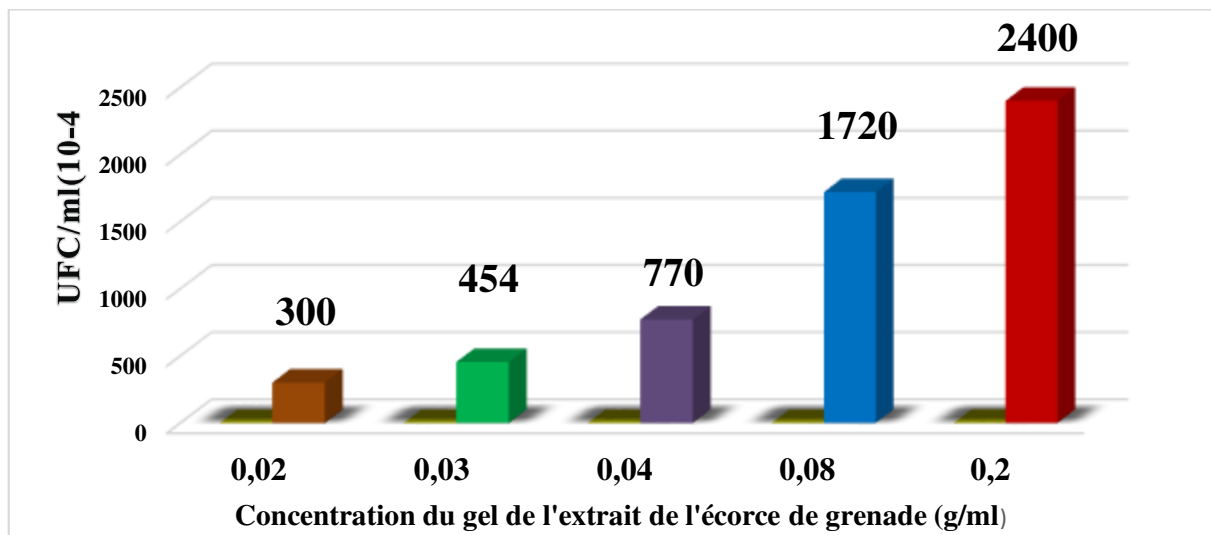
Ces caractéristiques correspondent à ceux du genre *Bifidobacterium* rapportés par plusieurs auteurs (*Baratte-Euloge, 1992 ; Crociani et al, 1996 ; Ventura et al, 2004 ; Leahy et al, 2005 ; Mahmoudi et al, 2013 ; Mattarelli et al, 2018*).

3. Etude de l'effet de l'ajout du gel d'extrait d'écorce de grenade sur les bifidobactéries en culture pure et dans le yaourt

3.1. Etude de l'effet de l'ajout du gel d'extrait d'écorce de grenade sur les bifidobactéries en culture pure

Absence de contaminations dans toutes les boîtes témoins.

Le dénombrement des boîtes contenant la dilution 10^{-4} avec les différentes concentrations du gel d'écorce de grenade a montré qu'une diminution de la concentration en gel correspond à une diminution du nombre de colonies de bifidobactéries. (Figure 12)



Source : Réalisé par nous-même.

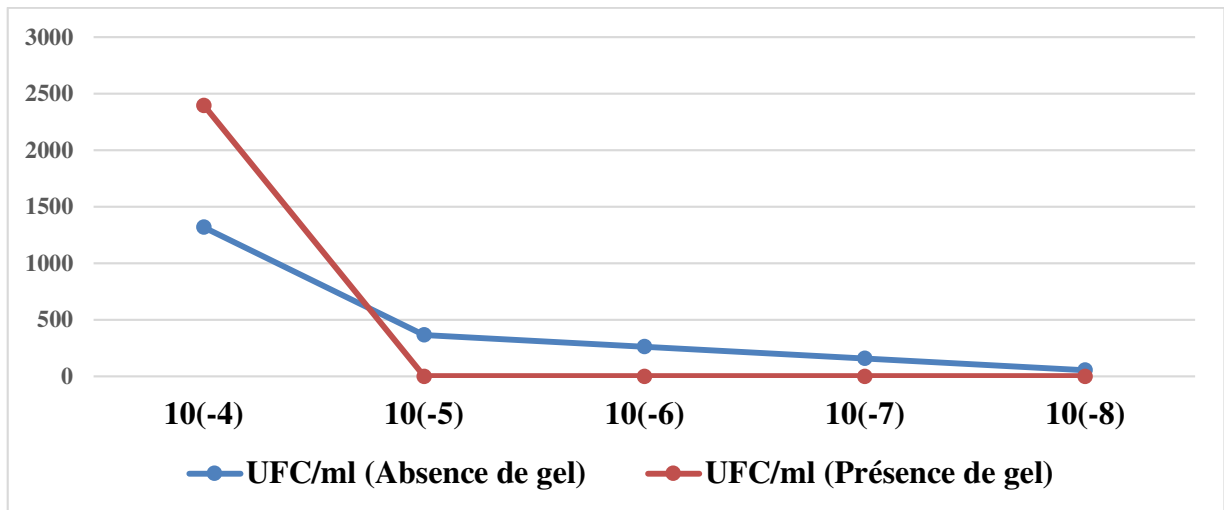
Figure 12 : Nombre de bifidobactéries (UFC/ml) dans la dilution 10^{-4} en culture pure en présence des différentes concentrations du gel d'extrait d'écorce de grenade

Un dénombrement des boîtes contenant les dilutions 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} de l'inoculum de densité optique 0.135 lue à 625nm en absence et en présence de gel d'extrait d'écorce de grenade nous a donné les résultats représentés dans le tableau suivant :

Tableau 14 : Nombre de Bifidobactéries (UFC/ml) en culture pure en absence et en présence du gel de l'extrait d'écorce de grenade

Dilutions	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
UFC/ml (Absence de gel)	1320	365	261	157	53
UFC/ml (Présence de gel)	2400	0	0	0	0

Source : Réalisé par nous-même.



Source : Réalisé par nous-même.

Figure N°13 : Nombre de bifidobactéries (UFC/ml) en culture pure en absence et en présence du gel de l'extrait d'écorce de grenade

Les résultats ci-dessus révèlent que le nombre de colonies des bifidobactéries bactéries est plus important en présence du gel d'extrait d'écorce de grenade mais exclusivement dans la dilution 10^4 . Cela démontre que le gel d'extrait d'écorce de grenade stimule la croissance des bifidobactéries.

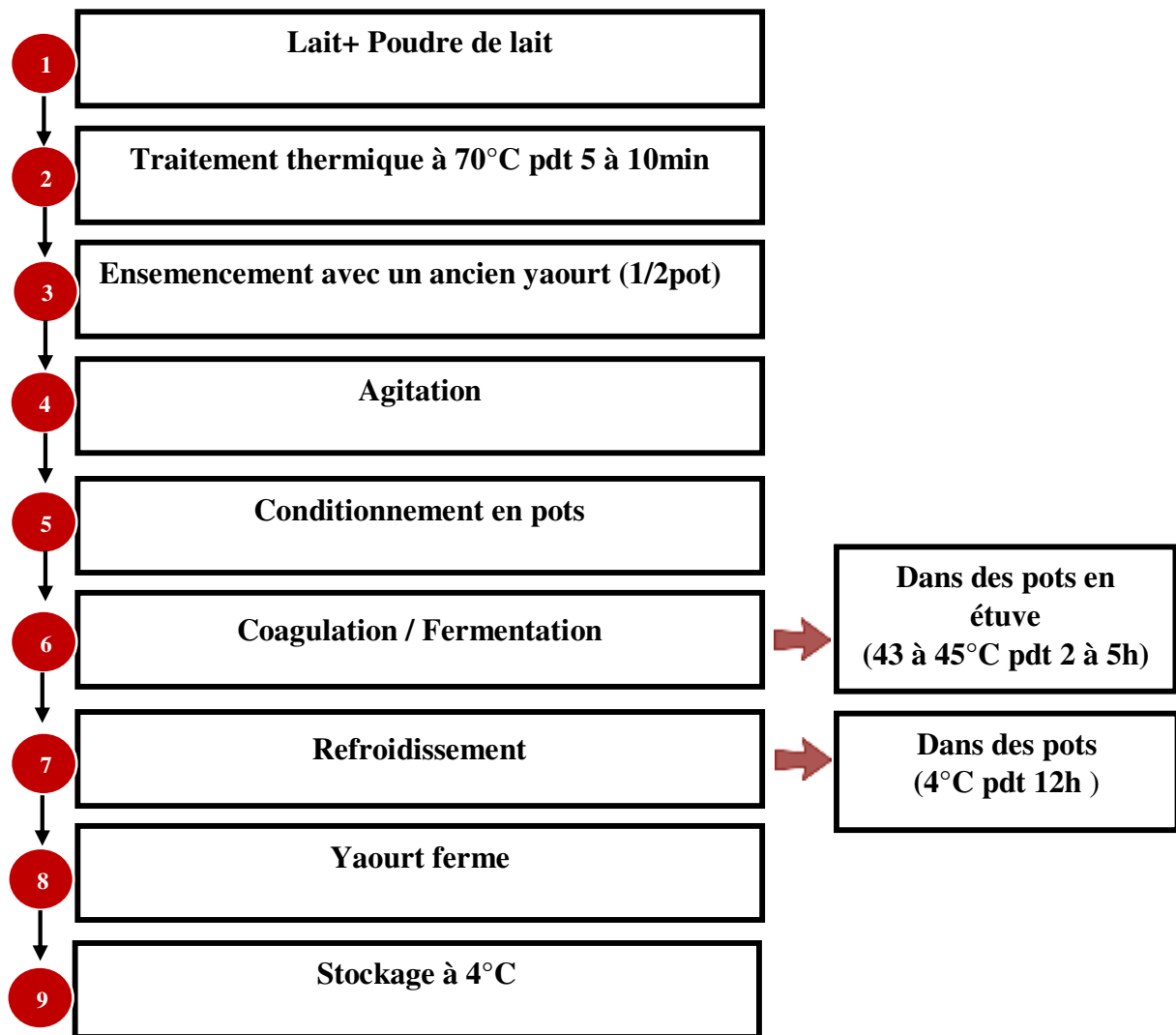
Nous avons aussi remarqué une extinction totale des colonies de bifidobactéries dans la suite des dilutions ; ceci peut s'expliquer par le phénomène « *Quorum Sensing* »,

Selon un article publié le 19 mai 2019 sur PubMed par KALEB O. et AIDER M. le Quorum Sensing fait référence à un mécanisme de synchronisation de l'expression des gènes en fonction de la densité cellulaire et des conditions environnementales. Pour communiquer entre elles, les bactéries synthétisent, sécrètent et accumulent de petites molécules de signal diffusible, appelées phéromones ou auto-inducteurs.

Dans notre cas la densité cellulaire des bifidobactéries ont diminué dans les dilutions 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} , les conditions environnementales ont aussi changé avec l'ajout de l'extrait d'écorce de grenade.

En déduction le gel d'extrait d'écorce de grenade à un effet stimulateur sur la croissance des bifidobactéries et la concentration la plus adéquate correspond à 0,2g/ml (*concentration maximale*). Nous l'avons choisi en vue de l'ajouter pour étudier son effet dans le yaourt que nous avons préparé.

2.2. Etude de l'effet de l'ajout du gel de l'extrait d'écorce de grenade sur les bifidobactéries dans une matrice alimentaire (Yaourt)



Source : Réalisé par nous-même.

Figure N°12 : Diagramme de fabrication du yaourt

Après 18h d'incubation, nous avons remarqué que le nombre de colonie de bifidobactéries est toujours plus important en présence du gel qu'en absence de ce dernier et cela dans les dilutions retenues : 10^{-4} / 10^{-5} / 10^{-6} . (Voir figure 13).

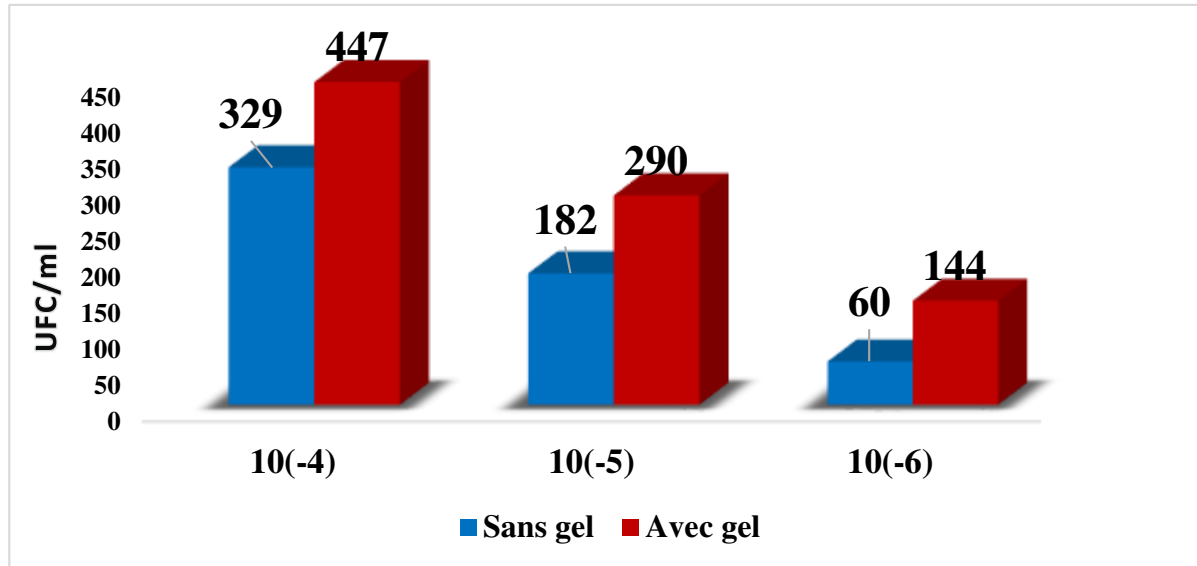


Figure N°13 : Nombre de bifidobacteries (UFC/ml) dans le yaourt en absence et en présence du gel de l'extrait d'écorce de grenade

Cela démontre que l'ajout de l'extrait d'écorce de grenade dans le yaourt, a un effet sur les bifidobactéries qui se traduit par la stimulation de leur croissance.

Conclusion générale

Au cours de cette étude nous avons réalisé une extraction hydro-alcoolique d'un gel supposant contenir des polysaccharides afin d'étudier son effet prébiotique sur les bifidobactéries.

Les analyses physicochimiques du gel nous ont permis d'avoir son taux de sucre et son extrait sec qui sont respectivement de l'ordre de 19,% et de 63,06%.

Les souches bactériennes sont isolées à partir du yaourt Activia de Danone.

L'utilisation des milieux de culture sélectifs et des conditions de culture (*anaérobiose*) qui répondent aux exigences des bifidobactéries nous ont permis de les bien isoler et purifier. La confirmation des souches isolées par les tests usuels : Gram, recherche de catalase, production de gaz, recherche d'indole confirme l'appartenance de nos souches au genre *Bifidobacterium*.

L'étude de l'effet de l'ajout du gel de l'extrait d'écorce de grenade à différentes concentration sur les bifidobactéries en culture pure à 37°C a montré une diminution de nombre de colonies correspondant à une diminution de concentrations en gel, ce qui nous a permis de choisir la concentration la plus adéquate (*maximale*) qui est de l'ordre de 0,2g/L.

L'extinction totale des bifidobactéries dans les boites à densité cellulaire réduite nous a permis de supposer l'existence du Quorum Sensing chez les bifidobactéries ; c'est un phénomène de communication entre les bactéries et fait l'objet de nombreuses recherches récentes.

L'utilisation du gel de l'extrait d'écorce de grenade dans la cultivation des bifidobactéries seules et dans le yaourt a permis d'obtenir une charge bactérienne plus importante en sa présence qu'en son absence. Cela nous confirme l'effet prébiotique qu'il exerce sur le genre *Bifidobacterium*.

Perspectives

Les probiotiques et les prébiotiques sont encore à un stade précoce d'utilisation et surtout à l'échelle industrielle, suite aux résultats de notre étude il serait intéressant de réaliser les points suivants :

- Des études supplémentaires, comportant une étape de validation des résultats par des applications In Vivo et In Situ ;
- la détermination de la composition adéquate de la microflore qui sera mise dans le tractus gastro-intestinal ;
- étude de l'expression des gènes des bifidobactéries en fonction de la densité cellulaire en présence des prébiotiques.

- Ait Abdeslam, A., 2008. Etude de croissance des bifidobacterium sp. dans le lait de brebis. Mémoire Magister : Microbiologie Alimentaire. Algérie. Université d'Oran. 132p.
- Ali, R., Hasnia, Z., 2010. Croissance et viabilité des bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille. Revue Nature et Technologie. Laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS). Département de Biotechnologie. Algérie. Université Abdelhamid Ibn Badis. 17-24.
- Amara, S., 2012. Effets probiotiques des bactéries lactiques sur le poulet chair. Mémoire de Magister : Écosystèmes microbiens complexes. Algérie. Université d'Oran. 158p.
- Amrouche, T., 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.
- Andrea, Q., Marta, S., Caterina, G., Mina, P., Giuseppe, A., Alberto, A., Stefano, R., & Maddalena, R., 2015. Comparison of culture-dependent and independent approaches to characterize fecal bifidobacteria and lactobacilli. Anaerobe. Article in ScienceDirect. 1-8.
- Ayse, S., Serap, F., & Necati, A., 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage, 39. International Journal of Food Science and Technology. Turquie. Université d'Ege. 613-621.
- Benjamin, P., 2016. Extraction et caractérisations (structurale et physico-chimique) de polysaccharides hydrosolubles issus de cladodes de *Cereus triangularis*. Thèse de Doctorat en Sciences des aliments. France. Université d'Auvergne. 237p.
- Benmeziane, D., Bedja, B., 2012. Effet de l'extrait acétonique de l'écorce de deux variétés de grenade (Quares et Lahlou) sur *Candida albicans*. Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état : Contrôle de qualité et analyses. Algérie. Université de Bejaia. 102p.
- Bruno, E., 2012. Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz. Thèse de Doctorat : Sciences de l'alimentation. France. Université de Bourgogne. 205p.
- Darbandi, A., Mirshekar, M., Shariati, A., Moghadam, M. T., Lohrasbi, V., Asadolahi, P., & Talebi, M., 2019. The Effects of Probiotics on Reducing the Colorectal Cancer Surgery Complications: A Periodic Review during 2007-2017. Clinical Nutrition. 28p.
- Dib, T., Benalia, D., 2018. Etude de la viabilité des bifidobactéries isolées à partir d'un yaourt probiotique en présence d'extrait d'écorce de grenade. Mémoire de Master II en Agroalimentaire et contrôle de qualité. Algérie : Université de Tizi-Ouzou. 93p.

- Djouadi, T. 2014. Evaluation de la qualité physicochimique et microbiologique du lait cru utiliser au niveau de l'unité Danone Djurdjura Algérie. Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état : Génie Biologique. Algérie. Université de Bejaia. 66p.
- Dupont, C., 2001. Probiotiques et Prébiotiques. Pédiatrie générale puériculture. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS. France. 77-81.
- Emilie, B., 2014. Probiotiques et prébiotiques, intérêt chez l'enfant : de l'aliment au médicament. Thèse de doctorat en pharmacie. France. Université de Nantes, 235p.
- Enkelejda, P., 2004. Interactions physico-chimiques et sensorielles dans le yaourt brassé aromatisé : quels impacts respectifs sur la perception de la texture et de la flaveur. Thèse de Doctorat en Sciences des aliments. France. Institut National agronomique Paris- Grignon. 258p.
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- Géraldine, F., 2004. Prébiotiques et probiotiques : ont-ils un réel intérêt pour la santé ? Rôle du pharmacien dans leur conseil à l'officine. Thèse de Doctorat en Pharmacie. France : Université de Grenoble. 99p.
- Halima, B., 2010. Caractérisation technologique des bifidobactéries à intérêt thérapeutique. Mémoire de Magister : Contrôle et hygiène microbiologique. Algérie. Université d'Oran. 85p.
- Hamedi, A., 2009. Etude du potentiel probiotique et technologique des lactobacilles isolés du lait cru de chamelle. Mémoire de Magister : Microbiologie appliquée. Algérie. Université d'Oran. 81p.
- Heyman, M., 2007. Effet des probiotiques sur le système immunitaire : Mécanismes d'action potentiels. Cahiers de nutrition et de Diététique, 42. 69-75.
- Ivonne F., Gabriela R., Lorena G., Mariano G., & Alma, C., 2019. Prebiotic effect of commercial saccharides on probiotic bacteria isolated from commercial products. Food Sci. Technol, Campinas, 39(3): 747-753.
- Julien, G., 2010. Probiotiques, prébiotiques, symbiotiques et prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : proposition d'un crible de sélection in vitro. Thèse de doctorat en ingénieries microbienne et enzymatiques. France. Université de Toulouse, 186p.
- Khalié, M.A., 2013. Microencapsulation de probiotiques pour la fabrication d'un fromage Cheddar fonctionnel. Mémoire maitre en Sciences en Microbiologie appliquée. Québec : Université : Institut Armand-Frappier. 122p.

- Kurmann, J. A., 1993. Une nouvelle génération de cultures en industrie laitière : aspects microbiologiques, biotechnologiques et probiotiques des cultures de bactéries composées de souches sélectionnées d'origine intestinale humaine. *Le Lait*, 73(2), 233–239.
- Leila, B., 2012. Etude du dialogue hôte/ bactéries lactiques du yaourt chez des rats gnotobiotiques. Thèse de doctorat en microbiologie. France. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. 146p.
- Lockyer, S., Stanner, S., 2019. Prebiotics – an added benefit of some fibre types. *Nutrition Bulletin* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Nutrition Foundation, 44, 74–91.
- Mahmoud, A., Dawood, Haitham G., Abo-Al-Ela., & Tawheed, H., 2019. Modulation of transcriptomic profile in aquatic animals: Probiotics, prebiotics and synbiotics scenarios. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 95, pp. 1–704.
- Marie-Christine, B., 2007. Probiotics and colorectal cancer. *Nutrition clinique et métabolisme* 21 (2), 85–88.
- Mehdi, K., 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.
- Mélanie, S., 2013. Intérêt de la grenade dans la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose. Thèse de doctorat en nutrition. France. Université d'Auvergne. 299p
- Monica, M., 2018. Isolation, Cultivation, and Storage of Bifidobacteria. Chapitre 4. Département of Agricultural Sciences. Italy. Université de Bologna. 67-99.
- Olivier, M., 2007. Contribution à l'étude du rôle des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections entériques à *Listeria Monocytogenes* : Analyse *In Vitro* et étude *In Vivo* des mécanismes d'action antimicrobien. Thèse de doctorat en Sciences et technologie des aliments. Canada. Université Laval, 135p.
- Paulina, M., Katarzyna, S., 2017. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9). 30p.
- Pelletier, J.-F., Faurie, J.-M., François, A., & Teissier, P., 2007. Lait fermenté : la technologie au service du goût. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, 15–20.
- Rayanatou, I., 2017. Étude de la coagulation du lait par l'extrait de feuilles de *Calotropis procera* en réponse au contexte laitier dans la région de Maradi, au Niger. Thèse de doctorat en Sciences de l'aliment. France. Université Bretagne. 207p.

- Rofes, C., 2014. Intérêts du microbiote intestinal et probiotiques. Thèse de doctorat en pharmacie. France. Université de Toulouse III, 79p.
- Roy, D., 2005. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le Lait*. INRA, Toulouse. 85 (1-2),39-56.
- Schneider, M., 2008. Probiotiques. *Médecine des maladies Métaboliques* Vol. 2 - N°4. 363-367.
- Wanda, S., Smoragiewicz, W., Bielecka, M., Babuchowski, A., Boutard, A., & Dubeau, H., 1993. Les probiotiques. *Canadian journal of Microbiology*, 39 (12). 1089-1095.
- World Gastroenterology Organisation, 2017. Probiotiques et prébiotiques.
- Yann, D., 2003. Production en continu des ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de doctorat en Sciences de l'agriculture et l'alimentation. Canada. Université Laval, 148p.
- Zakaria, B., Abdellah, K., Aicha, H., Philippe, M., & Ould El Hadj Mohammed D., 2013. Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* L. : Activité prébiotique. *Lebanese Science Journal*, Vol. 14, No. 2. 41-51.

Références webographiques

- Alexane. Culture Nutrition. Kellogg's évolue : entre alternatives végétales et prébiotiques. Consulté le 22 oct 2019.
<https://www.culture-nutrition.com/2019/12/26/kelloggs-evolue-entre-alternatives-vegetales-et-prebiotiques/>
- Amélie Dereuder, 2016. Process Alimentaire. Probiotiques, le marché se concentre. Consulté le 03 oct 2019.
<https://www.processalimentaire.com/ingredients/probiotiques-le-marche-se-concentre-29946?sso=1580054723>
- Anonyme. Doctissimo Médicaments. Duphalac 10 g/15 mL Solution buvable boîte de 400 sachets de 15 ml. Consulté le 23 oct 2019.
<https://www.doctissimo.fr/medicament-DUPHALAC.htm>
- Anonyme. Nutrixéal. PREBIOSOFT, Fibres prébiotiques BIO* en poudre hydrosoluble. Consulté le 22 oct 2019.
<https://www.nutrixéal.fr/prebiosoft-fibres-prebiotiques-bio-poudre-c2x12351059>
- Anonyme. WeightWorld. Inulin powder. Consulté le 22 sept 2019.
<https://www.weightworld.fr/inulin-powder.html>

- Anonyme. Zone Bourse. Nestlé s'associe à Fugeia sur le Brana Vita. Consulté le 15 sept 2019.
<https://m.zonebourse.com/NESTLE-SA-69991/actualite/Nestle-s-associe-a-Fugeia-sur-le-Brana-Vita-13879793/>
- Florence Cultier, 2017. Peps'Work. Les probiotiques : une tendance qui se confirme. Consulté le 15 oct 2019.
<https://pepswork.com/2017/06/19/les-probiotiques-une-tendance-qui-se-confirme/>
- Josselin Moreau, 2008. Process Alimentaire. La microencapsulation de probiotiques gagne du terrain. Consulté le 30 sept 2019.
<https://www.processalimentaire.com/ingredients/la-microencapsulation-de-probiotiques-gagne-du-terrain-7228?sso=1578695936>
- Olivier Deleglise, 2019. Pulpe de vie. Les prébiotiques. Consulté le 16 oct 2019.
<https://www.pulpedevie.com/blog/le-prebiotique-pour-les-nuls/>
- Sylvie Leboulenger, 2005. L'UsineNouvelle. La course aux probiotiques. Consulté le 20 sept 2019.
<https://www.usinenouvelle.com/article/la-course-aux-probiotiques.N46403>

Annexes

Annexes I : Matériels et appareillage

- Moulinette
- Tamis
- Agitateur magnétique
- Passoire à mailles fines
- Centrifugeuse
- Papier Wattman de porosité 20-25 μm
- Verre fritté de porosité 2
- Creusets
- Etuves
- Béchers
- Balance électronique
- Réfractomètre
- Dessiccateur
- Erlenmeyers
- Bec benzène
- Vortex
- Pipettes
- Tubes à essai
- Boîtes de pétri
- Jarre
- Pipettes Pasteur
- Poire
- Once de platine
- Bain marie
- Autoclave
- pH-mètre
- Lames et lamelles
- Microscope optique
- Entonnoirs
- Epprouvettes
- Alcoomètre

- Spectrophotomètre
- Papier parafilm

Annexes II : Composition des milieux de culture et solutions utilisés

Ethanol 96%

Milieu MRS (Man Rogosa Sharpe) (De Man *et al.*, 1960)

- 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
- Glucose 20g
- Tween 80 1ml ure
- Eau distillée 1000ml
- Agar Agar 17g
- pH= 6,8
- Autoclavage à 120°C/20min

Milieu MRSc+AN

- Peptone 10g
- Cystéine hydrochloride 0,5g
- Acide nalidixique 0,02g
- 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
- Tween 80 1ml
- Eau distillée 1000ml

- Agar Agar 17g
- pH= 6,8
- Autoclavage à 120°C/20min

Bouillon MRSc

- Peptone 10g
- Cystéine hydrochloride 0,5g
- 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
- Tween 80 1ml
- Eau distillée 1000ml
- pH= 6,8
- Autoclavage à 120°C/20min

Lait écrémé

- 0,5 de cystéine Hcl
- 1000ml de lait écrémé UHT (Candia Silhouette)

Tryptone Sel Eau cystéiné

- 8,5g de NaCl
- 0,5g de cystéine HCl
- 0,5g de peptone
- 1000ml d'eau distillée

La fuschine

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

Violet de gentiane

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

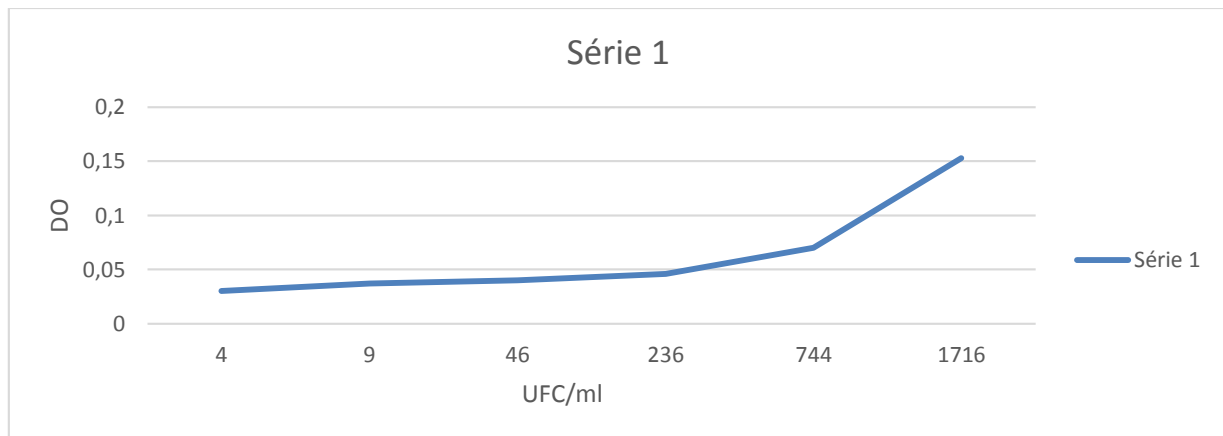
Lugol

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

Réactif de Kovacs

- p-diméthylamino-benzaldéhyde
- Alcool iso-amylque 75ml
- Acide Chlorhydrique pur 25 ml

Annexes III :



Annexes IV : Tableaux concernant l'expérimentation

Tableau I : Nombre de bifidobactéries (UFC/ml) dans la dilution 10^{-4} en culture pure en présence des différentes concentrations du gel d'extrait d'écorce de grenade.

Concentration du gel	0.2	0.08	0.04	0.03	0.02
UFC/ml	2400	1720	770	454	160

Tableau II : Nombre de Bifidobactéries (UFC/ml) dans les dilutions 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} dans le yaourt en présence de la concentration 0.2 g/ml du gel d'extrait d'écorce de grenade.

Dilutions Décimales	CONCENTRATIONS EN GEL	
	Sans extrait d'écorce de grenade	Avec extrait d'écorce de grenade
10^{-4}	329	447
10^{-5}	182	290
10^{-6}	60	144

ATCC, American Type Culture Collection; CNCM, National Collection of Microorganisms Cultures; NCIMB, National Collection of Industrial and Marine Bacteria.