

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mentouri de Constantine

*Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-
Alimentaires
(INATAA)*

Département de : Biotechnologie Alimentaire

N° d'ordre :

N° de série :

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du :

Diplôme de Magistère en : *Sciences Alimentaires*
Option : *Biotechnologie Alimentaire*

Yaourts probiotiques algériens et ferments commerciaux utilisés dans leur fabrication : contrôle de qualité et de l'étiquetage

Présenté par : M^{elle} BOUCHEFRA Amina

Devant le jury composé de :

<i>Président :</i>	Dr. BEKHOUCHE F.	MCA	Dpt Biotechnologie alimentaire/ INATAA/ Université Mentouri Constantine
<i>Examineurs :</i>	Dr. IDOUI T.	MCA	Dpt Biologie moléculaire et cellulaire/ Université de Jijel
	Dr. KHARROUB K.	MCA	Dpt Biotechnologie alimentaire/ INATAA/ Université Mentouri Constantine
<i>Promotrice :</i>	Dr. BOUSHABA R.	MCA	Dpt Biotechnologie alimentaire/ INATAA/ Université Mentouri Constantine
<i>Membre invité :</i>	Mme BENCHARIF W.	Ing	Directrion du CACQE (Wilaya de Jijel)

Année universitaire 2011-2012

Remerciements aux membres du jury

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, Le tout Puissant pour le courage qu'il nous a donnés pour mener ce travail à terme.

Je commence par exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à **Dr. BOUSHABA Rihab** qui m'a honorée en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. J'ai été satisfaite de votre qualité exceptionnelle de bonne enseignante. Merci de m'avoir guidée avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit; je ne peux que sincèrement vous exprimer mon respect et ma gratitude.

Je tiens à remercier **Dr. BEKHOUCHE Farida** pour avoir accepté la présidence du jury de soutenance, qu'elle trouve ici toutes mes expressions respectueuses.

Je tiens à remercier **Dr. IDOUI Tayeb** pour avoir accepté de faire partie des membres du jury. Je tiens à vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté tout au long de mes études. Vous avez su faire partager votre expérience et vous m'avez guidée dans le monde de la recherche scientifique.

Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à **Dr. KHARROUB Karima**, pour avoir accepté de juger ce modeste travail. Vous trouvez ici toutes mes expressions respectueuses.

Thème : ***Yaourts probiotiques algériens et ferments commerciaux utilisés dans leur fabrication : contrôle de qualité et de l'étiquetage***

Nature du diplôme : **Magister en Sciences Alimentaires**

Option : **Biotechnologie Alimentaire**

Résumé :

Les produits laitiers ont toujours été perçus auprès des consommateurs comme des produits sains et constituent une partie importante du régime alimentaire. L'incorporation de bactéries probiotiques comme additifs alimentaires dans les différents produits laitiers a renforcé les propriétés acclamées pour la santé et donné lieu à une consommation de plus en plus importante de ces produits. L'efficacité des probiotiques dépend de leur viabilité qui doit être maintenue au cours du processus technologique, de stockage et de conservation. De plus, les souches probiotiques commercialisées doivent survivre l'environnement du tractus gastro-intestinal. La viabilité des probiotiques est par conséquent un facteur principal dans l'aptitude des souches commercialisées à fournir les effets désirés/ acclamés. En outre, les allégations de santé exprimées sur les aliments probiotiques ont suscité un débat dans la communauté internationale concernant la meilleure approche réglementaire à adopter vis-à-vis cette nouvelle catégorie d'aliments. Ce débat est d'autant plus pertinent qu'il existe des inconsistances dans les études scientifiques qui ont été réalisées afin de 'prouver' les propriétés bénéfiques de ces produits.

Ce travail comporte deux parties : (1) Contrôle microbiologique et analyse des allégations de santé figurant sur l'étiquetage de yaourts commercialisés en Algérie sous le label « probiotique » et (2) Contrôle microbiologique, mise en évidence de quelques propriétés probiotiques et évaluation de la viabilité de trois échantillons de ferments lactiques collectés auprès d'une entreprise laitière algérienne. Deux de ces ferments sont utilisés comme levains et l'autre comme additif pour fabriquer des yaourts probiotiques.

Nous avons énuméré les bactéries lactiques probiotiques livrées dans deux yaourts fabriqués en Algérie et commercialisés en tant que « probiotiques ». L'effet du diluant utilisé sur le résultat du dénombrement a été examiné. Nous avons aussi examiné l'étiquetage de cinq yaourts commercialisés en Algérie sous le label « probiotique ». En outre, nous avons évalué différentes caractéristiques probiotiques *in vitro* : la résistance à l'acidité, la tolérance à la bile et l'activité antimicrobienne de trois échantillons de ferments lactiques commerciaux lyophilisés (formule DVS) utilisés dans l'industrie laitière algérienne pour la fabrication de yaourts probiotiques: ST-M6 (*Streptococcus thermophilus*), LB-12 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) et LA-5 (*Lactobacillus acidophilus*). Enfin, nous avons évalué l'influence de certaines conditions technologiques (stockage réfrigéré, acidité, ajout d'arômes artificiels et texturants) sur la viabilité de ces ferments lactiques.

Notre étude a révélé une différence significative entre les deux diluants utilisés dans le dénombrement de ces bactéries (eau peptonée tamponnée, trypton-sel). Nous avons également constaté qu'il existe des lacunes réglementaires en matière d'étiquetage des produits probiotiques qui emploient des allégations de santé. Nous avons constaté que les ferments analysés sont dotés de propriétés probiotiques souhaitables en termes de résistance à l'acidité et aux sels biliaires et la présence d'activité antimicrobienne. Cependant, le stockage réfrigéré, l'acidité et l'ajout des arômes artificiels et texturants ont un effet néfaste sur la viabilité de ces espèces lactiques.

Mots clés: *Diluant, ferment lactique, in vitro, probiotique, produits laitiers fermentés, viabilité*

Theme: **Algerian probiotic yogurts and commercial starter cultures used in their manufacture: quality control and labeling issues**

Nature of the diploma: **Magister**

Option: **Food Biotechnology**

Abstract:

Fermented milk products are generally regarded by consumers as healthy and as such, they represent an important part of the diet. The incorporation of probiotic bacteria as dietary supplements in various fermented milk-derived products has enhanced their acclaimed healthy properties and lead to increased consumption of these products. However, the efficiency of probiotics depends on their viability which needs to be maintained during the manufacturing, storage and conservation processes. In addition, the probiotic strains must survive the environment of the gastrointestinal tract. The viability of probiotics is therefore a key factor in the ability of commercialized strains to provide the desired effects. In addition, recent controversies have sparked an international debate with regards to approaches to regulate this new category of food products.

This study comprises two main parts: (1) Microbiological quality control and analysis of health claims in the labeling of yogurts marketed in Algeria as "probiotic" and (2) Quality control, evaluation of some probiotic properties and the viability of three samples of commercial cultures collected from an Algerian dairy company. Two of these samples are used as starter cultures and the other as an additive to manufacture probiotic yogurts.

We tested the probiotic lactic acid bacteria delivered in two yogurts manufactured in Algeria and commercialized as "probiotics". The effect of the solution used to prepare decimal dilutions for the enumeration of these bacteria on the result of the count was examined. We also examined the labeling of five yogurts which are commercialized as "probiotics". In addition, we assessed various characteristics of probiotics *in vitro*, namely resistance to acid, bile tolerance and antimicrobial activity of three samples of commercial DVS cultures used in the Algerian dairy industry to manufacture probiotic yogurts: ST-M6 (*Streptococcus thermophilus*), LB-12 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) and LA-5 (*Lactobacillus acidophilus*). Finally, we assessed the influence of technological conditions (cold storage, acidity, addition of artificial flavors and thickening agents) on the viability of these lactic bacteria samples.

Our study revealed a significant difference between the two diluents used in the enumeration of these bacteria (buffered peptone water, tryptone-salt). We have also noted that labeling of probiotic foods which make health claims is not addressed by the Algerian regulatory authorities. *In vitro* results have shown that the commercial starters analyzed have desirable probiotic properties in terms of resistance to acid and bile salts and the presence of antimicrobial activity. On the other hand, we found that cold storage, acidity and the addition of artificial flavors and texture-enhancing agents have a detrimental effect on the viability of these starter lactic bacteria samples.

Keywords: *Diluent, lactic ferment, in vitro, probiotic, fermented milk products, viability.*

الأطروحة : بروبيوتيك الياغورت الجزائري و الخمائر التجارية المستعملة في صنعها : مراقبة الجودة

و الوصف.

طبيعة الشهادة : ماجستير في العلوم الغذائية.

إختصاص : بيوتكنولوجيا الغذائية

ملخص

تعد منتجات الحليب المخمرة من قبل المستهلكين منتجات صحية و تألف جزء كبير من النظام الغذائي ، بالإضافة إلى ذلك ، لقد زاد إدماج بكتيريا البروبيوتيك و المكملات الغذائية في الحليب المخمر مختلف الخصائص الصحية المشهود لها و أسفر ذلك على الاستهلاك الهائل لهذه المنتجات . فعالية البروبيوتيك تعتمد على قدرتها في الاستمرار على قيد الحياة خلال مختلف المراحل التكنولوجية و خلال عملية التخزين و الحفظ و البقاء قيد الحياة في البيئة المعوية . و بالتالي بقاء البروبيوتيك له أهمية قصوى في قدرة الألبان المحتوية على البروبيوتيك.

في هذه المذكرة نريد تحديد الظروف التجريبية المثالية (المذيبات و التخفيفات) لتعداد بكتيريا البروبيوتيك اللبنية في زيادي البروبيوتيك المصنعة محليا . درسنا مختلف خصائص البروبيوتيك له أهمية قصوى في الألبان المحتوية على البروبيوتيك .

في هذه المذكرة نريد تحديد الظروف التجريبية المثالية (المذيبات و التخفيفات) لتعداد بكتيريا البروبيوتيك في المختبر : المقاومة للحمض ، الصفراء و النشاط المضاد للمكروبات لسلسلة من الخمائر اللبنية . نحن موجهون للتقييم تأثير بعض الظروف التكنولوجية و هم (التخزين البارد و الحموضة و العطور و المكثفات) على بقاء حيوية بكتيريا اللبن.

لقد بينت دراستنا فرقا واضحا بين المذبيين المستعملين (ماء البيبتون المعدل ، تريبتون الملح) بالإضافة إلى مجموعة التخفيفات لتعداد مختلف أنواع بكتيريا حمض اللبن المدروسة .بينت نتائج المختبر أن بكتيريا حمض اللبن تتميز بخصائص البروبيوتيك المرجوة فيما يخص مقاومة الحموضة الصفراء و النشاط المضاد للمكروبات . بالإضافة إلى ذلك، التخزين البارد ، العطور و المكثفات لها تأثير مميز على حيوية بكتيريا حمض اللبن.

الكلمات المفتاحية : المذيبات، الخمائر اللبنية ، البروبيوتيك ، مختبر ، منتجات الحليب المخمرة

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des annexes	
Liste des abréviations	
1) Introduction.....	1
1.1. Présentation du problème.....	1
1.2. Objectifs de l'étude.....	1
1.3. Intérêt de l'étude	2
2) Synthèse Bibliographique.....	3
2.1. Probiotiques et aliments fonctionnels : le concept.....	3
2.1.1. Historique de développement.....	4
2.1.2. Définitions.....	5
2.1.2.1. Probiotique.....	5
2.1.2.2. Aliment fonctionnel.....	5
2.1.3. Principales souches microbiennes au potentiel probiotique.....	6
2.1.3.1. Bactéries lactiques.....	8
2.1.3.2. Bifidobactéries.....	9
2.1.3.3. Préparations commerciales.....	9
2.1.4. Caractéristiques souhaitables des probiotiques.....	10
2.2. Critères de sélection des souches bactériennes potentiellement probiotiques.....	11
2.2.1. Propriétés fonctionnelles.....	11
2.2.1.1. Survie au cours du transit digestif	11
2.2.1.2. Activité antimicrobienne.....	12
2.2.1.3. Colonisation et adhésion aux cellules intestinales.....	12
2.2.2. Propriétés technologiques.....	12
2.2.2.1. Viabilité et stabilité des microorganismes.....	12
2.2.2.2. Propriété acidifiante.....	13
2.3. Microflore intestinale : un écosystème complexe.....	13
2.3.1. Description générale de l'écosystème digestif.....	13
2.3.2. Microflore intestinale.....	13
2.4. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine.....	15
2.4.1. Soulagement de la constipation.....	16
2.4.2. Améliorer l'utilisation du lactose par l'organisme.....	16
2.4.3. Prévention ou le raccourcissement de la durée des diarrhées.....	17

2.4.4. Contrôle des infections intestinales par <i>Helicobacter pylori</i>	17
2.4.5. Diminution des allergies alimentaires.....	18
2.4.6. Réduction du taux de cholestérol sanguin.....	18
2.5. Production et maintenance de la viabilité des bactéries probiotiques dans les produits laitiers.....	19
2.5.1. Emploi des bactéries probiotiques dans les produits laitiers.....	19
2.5.2. Viabilité des bactéries probiotiques	20
2.5.2.1. Effet du procédé technologique sur la viabilité des bactéries probiotiques utilisées comme additifs alimentaires.....	21
2.5.2.2. Méthodes d'améliorations de la viabilité des microorganismes probiotiques.....	23
2.6. Défis technologiques associés au développement des cultures probiotiques.....	24
2.6.1. Méthodes de production	24
2.6.1.1. Lyophilisation.....	24
2.6.1.2. Microencapsulation.....	25
2.6.1.3. L'ajout des prébiotiques.....	25
2.6.2. Méthodes de détection	26
2.7. Spécification d'un produit probiotique, assurance qualité et questions réglementaires..	26
2.7.1. Allégations, face visible de la fonctionnalité.....	26
2.7.1.1. Concept d'allégation.....	27
2.7.1.2. Typologie d'allégation.....	27
2.7.2. Lignes directrices pour l'assurance qualité des aliments probiotiques.....	28
2.7.2.1. Lignes directrices pour l'évaluation des microorganismes probiotiques.....	28
2.7.2.2. Lignes directrices spécifiques en matière d'étiquetage.....	29
2.7.3. Consommation des aliments probiotiques.....	31
2.7.3.1. Perception du consommateur.....	31
2.7.3.2. Protection du consommateur des arnaques.....	31
2.7.4. Difficultés réglementaires.....	31
2.7.4.1. Textes réglementaires algériens.....	32
3) Matériel et Méthodes.....	37
3.1. Matériel.....	37
3.1.1. Matériel biologique.....	37
3.1.1.1. Yaourts probiotiques.....	37
3.1.1.2. Lait écrémé.....	37
3.1.1.3. Ferments industriels.....	37
3.1.1.4. Bactéries pathogènes.....	38
3.2. Méthodologie	38

3.2.1. Contrôle microbiologique de deux yaourts probiotiques commercialisés en Algérie.....	39
3.2.1.1. <i>Evaluation de l'effet du diluant</i>	39
a. Préparation de la solution mère.....	40
b. Dénombrement de la flore lactique.....	40
c. Calcul de la concentration de cellules viables.....	41
3.2.1.2. Tests de confirmation.....	41
a. Examen macroscopique.....	42
b. Examen microscopique.....	42
c. Production de la catalase.....	42
3.2.1.3. Evaluation de milieux de culture modifiés pour l'énumération selective de <i>L. acidophilus</i> en présence de <i>S. thermophilus</i> et <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	42
a. Préparation des milieux de culture modifiés.....	42
b. Evaluation de la capacité de croissance.....	43
3.2.1.4. Contrôle de la qualité microbiologique des yaourts probiotiques.....	44
a. Dénombrement des coliformes totaux et coliformes thermotolérants.....	44
b. Dénombrement de la flore fongique.....	44
3.2.1.5. <i>Evaluation de l'étiquetage des yaourts commercialisés sous le label « probiotique »</i>	44
3.2.2. Mise en évidence <i>in vitro</i> de quelques propriétés probiotiques dans les ferments commerciaux utilisés en Algérie.....	44
3.2.2.1. Préparation des cultures stock.....	44
3.2.2.2. Résistance aux conditions gastro-intestinales simulées.....	45
a. <i>Tolérance aux conditions acides de l'estomac</i>	45
b. <i>Résistance aux sels biliaires</i>	46
3.2.2.3. Activité antibactérienne.....	47
3.2.3. Evaluation de la viabilité des ferments commerciaux utilisés e Algérie pour la fabrication des yaourts probiotiques	48
3.2.3.1. Influence du stockage frigorifique à 4°C sur la viabilité.....	48
3.2.3.2. Activité acidifiante.....	49
3.2.3.3. Influence des arômes sur la viabilité.....	49
3.2.3.4. Influence des texturants sur la viabilité.....	49
3.2.4. Méthodes d'analyse des données.....	50
4) Résultats et Discussion	51
4.1. Contrôle de yaourts commercialisés sous le label « probiotique ».....	51
4.1.1. Effet du diluant sur le dénombrement de la flore lactique.....	51

4.1.1.1. Dénombrement de <i>S. thermophilus</i>	51
4.1.1.2. Dénombrement de <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	52
4.1.1.3. Dénombrement de <i>L. acidophilus</i>	53
4.1.1.4. Tests de confirmation.....	54
4.1.1.5. Evaluation de la capacité de croissance sur des milieux modifiés.....	55
4.1.1.6. Contrôle de qualité microbiologique de deux yaourts probiotiques (A et B).....	56
4.1.1.7. Analyse de l'étiquetage de yaourts commercialisés en Algérie sous le label« probiotique ».....	57
4.2. Evaluation de ferments commerciaux utilisés pour la fabrication de yaourts probiotiques.....	58
4.2.1. Mise en évidence <i>in vitro</i> de quelques propriétés probiotiques.....	58
4.2.1.1. Résistance aux conditions acides de l'estomac.....	58
4.2.1.2. Résistance aux sels biliaires.....	61
4.2.1.3. Activité antimicrobienne.....	63
4.2.2. Evaluation de la viabilité sous différentes conditions de conservation.....	64
4.2.2.1. Influence de la conservation à 4 °C.....	64
a. Viabilité pendant la période de stockage à 4°C.....	64
b. Variation du pH pendant la période de stockage à 4°C.....	65
4.2.2.2. Influence des arômes sur la viabilité.....	66
a. Arôme banane.....	66
b. Arôme fraise.....	68
c. Arôme vanille.....	70
4.2.2.3. Influence des texturants sur la viabilité.....	71
a. Phosphate de diamidon hydroxypropylé (E1442).....	71
b. Gomme arabe (E414).....	72
4.3. Discussion des résultats.....	73
4.3.1. Principaux constats.....	73
4.3.1.1. Concentration de cellules viables dans les yaourts commercialisés sous le label « probiotique ».....	73
4.3.1.2. Développement de milieux sélectifs pour le dénombrement des souches probiotiques en présence des autres bactéries du yaourt.....	74
4.3.1.3. Etiquetage des yaourts commercialisés sous le label « probiotique ».....	74
4.3.1.4. Viabilité des ferments commerciaux utilisés en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques locaux.....	76
4.3.2. Limites de l'étude.....	77
4.3.3. Perspectives.....	77

5) Conclusions et perspectives	80
5.1. Conclusion.....	80
5.2. Perspectives.....	81
Références bibliographiques.....	84
Annexe.....	99

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
<i>Tableau 1</i>	Classification de bactéries lactiques considérées comme probiotiques	7
<i>Tableau 2</i>	Sélection de souches bactériennes probiotiques commercialisées par les principaux fabricants de produits laitiers et levains industriels.	10
<i>Tableau 3</i>	Ensemble des textes réglementaires utilisés comme référentiels pour la réalisation des analyses de contrôle de qualité du lait et produits dérivés au CACQE (Wilaya de Jijel).	34
<i>Tableau 4</i>	Description des ferments lactiques industriels utilisés dans l'étude.	38
<i>Tableau 5</i>	Conditions expérimentales utilisées pour le dénombrement de la flore lactique des yaourts probiotiques A et B.	41
<i>Tableau 6</i>	Méthode de préparation des milieux de culture modifiés.	43
<i>Tableau 7</i>	Concentrations de <i>S. thermophilus</i> dans deux yaourts probiotiques locaux (A et B) stockés à 4°C en utilisant le diluant eau peptonée tamponnée et le tryptone-sel, à 37°C en aérobiose.	51
<i>Tableau 8</i>	Concentrations de <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> dans deux yaourts probiotiques locaux (A et B) stockés à 4°C en utilisant le diluant eau peptonée tamponnée et le tryptone-sel, à 37°C en aérobiose.	52
<i>Tableau 9</i>	Concentrations de <i>L. acidophilus</i> dans deux yaourts probiotiques locaux (A et B) stockés à 4°C en utilisant le diluant eau peptonée tamponnée et le tryptone-sel, à 37°C en aérobiose.	53
<i>Tableau 10</i>	Principaux caractères de la collection lactique	55
<i>Tableau 11</i>	Croissance de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> et <i>L. acidophilus</i> dans cinq milieux de cultures modifiés, à 37°C en aérobiose.	56
<i>Tableau 12</i>	Résultats du contrôle microbiologique de deux yaourts probiotiques (A et B).	56
<i>Tableau 13</i>	Informations figurant sur l'étiquetage d'une sélection de yaourts commercialisés en Algérie sous le label « probiotique ».	57
<i>Tableau 14</i>	Activité antagoniste de LA-5, LB-12 et ST-M6 sur les bactéries pathogènes.	63
<i>Tableau 15</i>	Concentrations des bactéries lactiques dans : (a) deux yaourts probiotiques analysés durant la première semaine de leur fabrication, (b) lait fermenté inoculé de ferments commerciaux utilisés pour la fabrication de yaourts probiotiques (sans additifs).	74

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Taille du marché mondiale des aliments fonctionnels (RoW : Rest of the World) (a) et part du marché des différents catégories d'aliments (b).	4
Figure 2	Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'Homme.	14
Figure 3	Présentation des effets bénéfiques sur la santé humaine de la consommation des probiotiques.	16
Figure 4	Schéma représentant la méthodologie expérimentale adoptée dans la présente étude.	39
Figure 5	Méthode pour déterminer l'effet du pH gastrique simulé sur la viabilité de <i>L. acidophilus</i> (LA-5); <i>L. delbrueckii subsp.bulgaricus</i> (LB-12) et <i>S. thermophilus</i> (ST-M6).	46
Figure 6	Résistance aux pH acides (2,0 et 3,0) des ferments commerciaux, utilisés en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques pendant 180 min d'incubation à 37°C: (a) LA-5, (b) LB-12 et (c) ST-M6. Des témoins incubés au pH 6,8 ont été utilisés comme référence. Les barres verticales représentent les écart-types de trois expériences indépendantes.	60
Figure 7	Résistance des ferments commerciaux, utilisés en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques aux sels biliaires (0,5%) pendant 240 min d'incubation à 37°C : (a) LA-5, (b) LB-12 et (c) ST-M6. Les barres verticales représentent les écart-types de trois expériences indépendantes.	62
Figure 8	Viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6, utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques pendant 28 jours de stockage à 4°C.	64
Figure 9	Changement du pH du lait fermenté inoculé de LA-5, LB-12 et ST-M6, utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, pendant le stockage à 4°C.	66
Figure 10	Viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6, utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, en présence de : (a) 0,1% et (b) 0,2% d'arôme banane. Les échantillons étaient incubés à 4°C pour 24h.	67
Figure 11	Viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6, utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, en présence de : (a) 0,1% et (b) 0,2% d'arôme fraise. Les échantillons étaient incubés à 4°C pour 24h.	69
Figure 12	Viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6 utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, en présence de 0,14% d'arôme vanille. Les échantillons étaient incubés à 4°C pour 24h.	70

<i>Figure 13</i>	Viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6, utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, en présence de 0,2% phosphate de diamidon hydroxypropylé (E1442). Les échantillons étaient incubés à 4°C pour 24h.	71
<i>Figure 14</i>	Viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6 utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, en présence de 0,1% gomme arabique (E414). Les échantillons étaient incubés à 4°C pour 24h.	72
<i>Figure 15</i>	Impact des conditions de conservation sur la viabilité des souches étudiées : viabilité satisfaisante (> 70%), viabilité faible (entre 30% et 70%) et viabilité inacceptable (< 30%).	77

Liste des annexes

Numéro	Titre	page
<i>Annexe 1</i>	Photographies des échantillons de ferments utilisés.	99
<i>Annexe 2</i>	Milieux de cultures, produits (chimiques et réactifs), matériels et appareillages	101
<i>Annexe 3</i>	Composition des bouillons et des géloses.	102
<i>Annexe 4</i>	Colorants et réactifs.	104
<i>Annexe 5</i>	Fiches techniques des espèces de bactéries analysées.	105
<i>Annexe 6</i>	Coloration de Gram	108
<i>Annexe 7</i>	Tableaux des résultats bruts.	109
<i>Annexe 8</i>	Procédé de fabrication du yaourt.	113
<i>Annexe 9</i>	Photos des colonies isolées sur géloses MRS et M17 et de l'activité antibactérienne.	115

Liste des abréviations

Abs : Absence

ACIA : Agence Canadienne d'Inspection des Aliments

AFSA : Agence Française de Sécurité des Aliments

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ANOVA : Analyse de Variance à un Facteur

ARN_r : Acide Ribonucléique Ribosomique

BAL : Bactérie de l'Acide Lactique

BPF : Bonne Pratique de Fabrication

BSH_S : Sels Biliaires Hydrolases

°C : Degré Celsius

CO₂ : Dioxyde de Carbone

CT : Coliformes Totaux

CTT : Coliformes Thermotolérants

D.O: Densité optique

e⁻ : Electron

E : Europe

EPS : Exopolysaccharide

E.P.T : Eau Peptonée Tamponnée

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

FISH: Hybridation Fluorescente *in situ*

FOSHU: Foods for Specified Health Use

g: Gramme

GI: Gastro-intestinale

GRAS: Generally Recognized As Safe

H⁺ : Proton

h : Heure

HCL : Acide Chlorhydrique

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

j : Jour

L : Litre

Log : Logarithme

M : Molarité

mg : Milligramme

m² : Mètre carré

min : Minute

ml : Millilitre

µl : Microlitre

mm : Millimètre

MRS : Man, Rogosa et Sharpe

nm : Nanomètre

O₂ : Oxygène

OGA : Gélose Glucosée à l'Extrait de Levure et à l'Oxytétracycline

OMS : Organisation Mondiale de Santé

P : Probabilité ou risque de commettre une erreur

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : Potentielle d'Hydrogène

Sb, BL : Sel biliaire

Sig : Niveau de signification (α)

t : Temps

T : Témoin

TGI : Tractus Gastro-intestinale

TPY : Peptone Tryptose Levure

T.S : Tryptone-Sel

UE : Union Européenne

UFC/g : Unité Formant Colonie par Gramme

UFC/ml : Unité Formant Colonie par Mililitre

WHO : World Health Organization

+ : Croissance invisible

- : Croissance visible

< : Inférieur

> : Supérieur

% : Pourcentage

1) Introduction

1.1. Présentation du problème

Selon l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), une grande variété d'allégations actuellement utilisées pour l'étiquetage des denrées alimentaires et la publicité en faveur de celles-ci se rapportent à des substances dont les avantages n'ont pas été prouvés ou qui ne bénéficient pas d'un consensus scientifique suffisant. Il apparaît ainsi que la justification scientifique des allégations fonctionnelles constitue l'un des plus grands défis actuels pour les chercheurs dans le domaine des sciences alimentaires (**Marcel *et al.*, 2008**). En ce qui concerne les probiotiques, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes fiables permettant de différencier les "vrais" probiotiques du reste de la flore microbienne, et la détermination des mécanismes physiologiques par lesquels ces bactéries contribuent aux effets avérés demeure un grand défi (**Izquierdo, 2009**).

En Algérie, un nombre de yaourts commercialisés sont acclamés pour leurs propriétés dites « probiotiques », qui possèdent des effets favorables à la santé. Toutefois, pour fournir les effets désirés, les souches bactériennes qui sont livrées dans une matrice alimentaire (telle que le yaourt ou le lait fermenté par exemple), doivent être présentes en concentration suffisante et en état de viabilité telle que leurs supposés bienfaits puissent opérer dans l'organisme du consommateur. Les conditions du procédé technologique et de préservation peuvent aussi influencer sur les propriétés fonctionnelles des bactéries probiotiques.

1.2. Objectifs de l'étude

Ce travail comprend deux parties :

- **Partie 1 :** Contrôle microbiologique et analyse des allégations santé figurant sur l'étiquetage de yaourts commercialisés en Algérie, sous le label « probiotique ».
- **Partie 2 :** Contrôle microbiologique, mise en évidence de quelques propriétés probiotiques et évaluation de la viabilité de trois échantillons de ferments lactiques collectés auprès d'une entreprise laitière algérienne. Les trois ferments sont utilisés pour fabriquer des yaourts probiotiques.

Notre étude avait pour objectifs de répondre aux questionnements principaux suivants :

- Quelle est la concentration de cellules viables des bactéries utilisées pour l'ensemencement des yaourts probiotiques dans les produits finis ?

-
- Quel est l'effet du diluant utilisé sur le résultat du dénombrement ?
 - Quels types d'allégations figurent sur l'étiquetage des yaourts commercialisés en Algérie, sous le label « probiotique »?
 - Comment la viabilité des ferments commerciaux utilisés pour la fabrication des yaourts probiotiques est-elle affectée par l'ajout des arômes et texturants et la conservation à 4°C ?

1.3. Intérêt de l'étude

Les microorganismes probiotiques et leur exploitation pour fabriquer de nouveaux aliments fonctionnels représentent un défi d'envergure pour la recherche en biotechnologie alimentaire. Actuellement, le marché est segmenté en cultures technologiques banales utilisées comme levains et cultures probiotiques valorisées en tant qu'additifs ou suppléments alimentaires. Pour la sélection de souches probiotiques, la biodiversité offre des sources inépuisables, en revanche, les sources d'isolement de souches techniques robustes sont de plus en plus limitées et cet état de fait justifie la continuation de la recherche de nouvelles souches plus performantes (**Giraffa, 2009**). Les données recueillies dans notre étude pourraient être utiles en vue d'améliorer la qualité des yaourts probiotiques produits en Algérie. En outre, étant donné que l'industrie laitière nationale dépend fortement des matières premières importées (y compris les ferments utilisés), il devient nécessaire de promouvoir l'analyse des produits mis sur le marché en utilisant les méthodes et techniques scientifiques modernes et ce afin d'évaluer leur performance dans les contraintes du contexte algérien et, éventuellement, de comparer ces produits/ procédés avec des alternatives locales afin de valoriser et mettre en valeur la biodiversité algérienne.

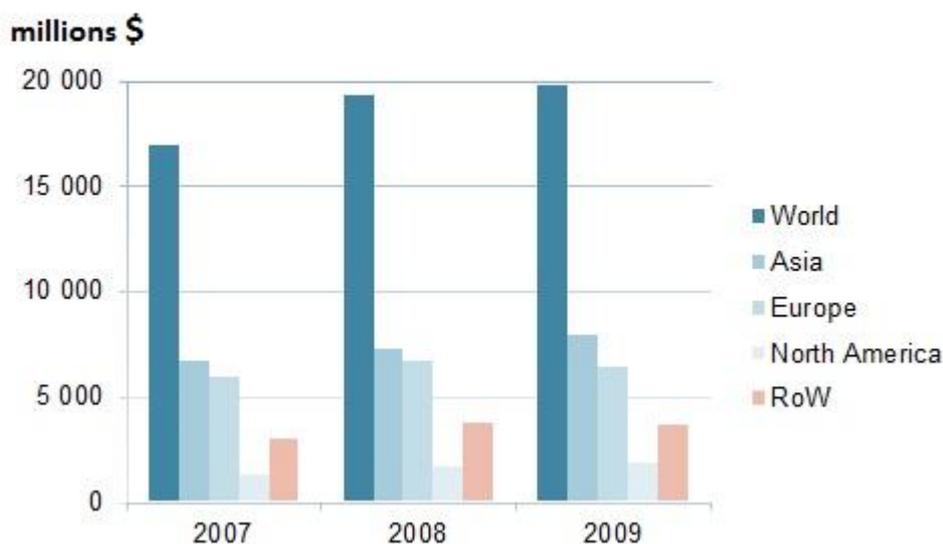
Sur les plans réglementaire et commercial, notre étude pourrait contribuer à mettre en relief la nécessaire complémentarité entre l'industrie laitière et les autres acteurs socio-économiques. En effet, l'industrie laitière ne devrait pas se limiter à travailler en collaboration avec les autorités réglementaires algériennes, mais envisager des collaborations avec le corps médical, les spécialistes en nutrition humaine ainsi que les associations de consommateurs et ce afin d'étayer les allégations de santé associées aux produits laitiers commercialisés sous le label « probiotique ». Le consommateur joue aussi un rôle central dans l'acceptabilité de nouveaux produits tels que les produits dits '*fonctionnels*'. Il serait donc nécessaire de sensibiliser le consommateur aux différents aspects relatifs à la promotion et régulation de tels produits au niveau local mais aussi, éventuellement, déterminer la meilleure façon de communiquer avec le consommateur algérien en prenant en considération les particularités socio-économiques, culturelles et ethnographiques.

2) Synthèse Bibliographique

2.1. Probiotiques et aliments fonctionnels : le concept

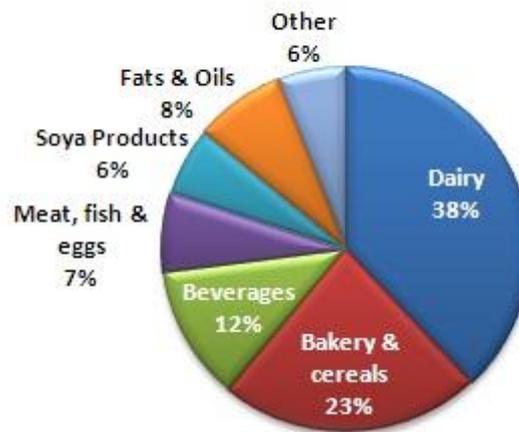
Aujourd'hui, un nombre croissant de consommateurs deviennent de plus en plus intéressés par leur santé personnelle et sont conscients du lien entre l'alimentation et la santé. Les crises sanitaires qui ont récemment secoué l'industrie alimentaire ont ébranlé la confiance des consommateurs dans certains produits transformés. Par conséquent, le marché des produits « naturels », « bio » ou encore « fonctionnels » a connu un essor remarquable étant donné que de plus en plus de consommateurs privilégient les aliments qui sont perçus comme étant capables de prévenir la maladie (voir Figure 1). Dans ce paysage et suite à l'apparition des maladies dites « *de civilisation* », la réflexion sur la préservation de la santé devient indissociable de la réflexion sur l'alimentation. En effet, l'alimentation est susceptible de moduler diverses fonctions de l'organisme, et peut aussi contribuer à diminuer le risque de certaines pathologies (Marcel *et al.*, 2008).

Market Size Probiotic Functional Food



(a)

Functional Foods Market by Sector, 2009 (% value)



(b)

Figure 1 : Taille du marché mondial des aliments fonctionnels (RoW = Rest of the World) (a) et part du marché des différentes catégories d'aliments (b). (**Leatherhead Food Research, 2009**).

2.1.1. Historique de développement

Le concept d'aliment fonctionnel est né dans l'Extrême-Orient au Japon dans les années 1980s. À cette époque, les pratiques ancestrales de gastronomie, l'accroissement des maladies liées à l'alimentation, et en particulier à la population vieillissante, conduit le gouvernement japonais à subsidier un programme de recherches visant à identifier les fonctions physiologiques des aliments (**Buttriss, 2000; Hasler, 1998**). Dès 1991, le législateur japonais autorise la distinction commerciale des aliments fonctionnels par le label « FOSHU » pour « *Foods for Specified Health Use* » et en détermine les conditions d'octroi (**Ninane et al., 2009**).

Importé en Europe dans les années 1990s, le concept d'aliment fonctionnel s'y est développé en prenant, dans l'esprit du public, une signification plus large. Pour le consommateur européen, les aliments fonctionnels représenteraient en effet simplement une alternative " plus saine " à l'alimentation classique (**Renard, 2000**). Parmi les ingrédients liés aux aliments fonctionnels, les probiotiques, qui trouvent leur origine dans les travaux de Metchnikoff, au début du 20^{ème} siècle. D'après la synthèse de ses travaux réalisée par **Tannock (2002)**, Metchnikoff avait pour théorie que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé. Ainsi, Metchnikoff avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie. A peu près au même temps, un médecin français, Henry Tissier, a suggéré qu'il y avait une possibilité d'administrer de bifidobactéries isolées des selles d'enfants en bonne santé à des enfants malades.

Durant les années 1930s, Shirota réussit à isoler une bactérie ; *Lactobacillus casei* Shirota, et ensuite l'intégrer dans une boisson lactée fermentée connue sous le nom « Yakult ». Depuis ce temps, de nombreux chercheurs ont isolé d'autres microorganismes qui ont des avantages associés à la santé de l'homme, et ils ont été commercialisés.

2.1.2. Définitions

2.1.2.1. Probiotique

Le terme « probiotique » a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques (Ait-Belgnaoui, 2006). Une des premières définitions des probiotiques comme « *facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes* » a été proposée par Lilly et Stillwell en 1965. Plus tard, Fuller propose une définition très proche du sens actuel : « *supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale* » (Fuller, 1989).

Récemment, les probiotiques se définissent comme « *des cultures microbiennes vivantes survivant le transit gastro-intestinale, où elles colonisent le système* » (Saarela et al., 2000; Matilla-Sandholm et al., 2002; Betoret et al., 2003). D'autre part selon Margoles et Garcia (2003), le terme probiotique se réfère à des « *cultures de microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés à l'homme ou aux animaux (par le biais de cellules déshydratées ou des aliments fermentés), améliorent les propriétés de la microflore autochtone de l'hôte* ».

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

2.1.2.2. Aliment fonctionnel

On dit d'un aliment qu'il est fonctionnel lorsqu'il a été clairement démontré qu'il affecte avantageusement une ou plusieurs fonctions cibles de l'organisme indépendamment des effets nutritionnels adéquats, en provoquant une amélioration de l'état de santé et du bien-être et/ou

une réduction des risques d'apparition de maladies. Les aliments fonctionnels sont, comme leur nom l'indique, des aliments, et leurs effets doivent être perceptibles après leur ingestion en quantités normales. Il ne s'agit en aucun cas de capsules/gélules ou de comprimés, mais bien d'aliments (**Izquierdo, 2009**).

En ce qui concerne l'aliment probiotique, il est défini comme un produit transformé qui contient des microorganismes probiotiques viables en concentration appropriée dans une matrice alimentaire (**Saxelin et al., 2003**). Cela signifie que la viabilité et l'activité métabolique doivent être maintenues à travers toutes les étapes de transformation des aliments, depuis leur fabrication jusqu'à leur ingestion par le consommateur, et aussi qu'ils doivent être capables de survivre dans les voies gastro-intestinales de l'hôte (**Sanz, 2007**).

2.1.3. Principales souches bactériennes au potentiel probiotique

Les bactéries probiotiques sont principalement des bactéries lactiques et des bifidobactéries (**Ait-Belgnaoui, 2006**). En effet, ces bactéries sont des membres de la flore normale de l'intestin (**Dunne et al., 2001**), connues pour ne pas présenter de risques toxique ou infectieux (GRAS) et sont relativement faciles à inclure dans des produits laitiers (**Izquierdo, 2009**). La plupart des microorganismes employés comme probiotiques sont cités dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Classification de bactéries lactiques considérées comme probiotiques
(Dacosta, 2001 ; Holzapfel *et al.*, 2001 ; Marteau et Seksik, 2005)**

Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres bactéries lactiques
<i>Lb.acidophilus</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lb.brevis</i>	<i>B.animalis</i> DN 173010	<i>Enterococcus faecium</i> SF ^a 568
<i>Lb.amylovorus</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ^c
<i>Lb.bulgaricus</i>	<i>B.brève</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ^c
<i>Lb.casei</i> DN 114001	<i>B.infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lb.casei shirota</i>	<i>B.lactis</i> Bb 12 ^b	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Lb.crispatus</i>	<i>B.langum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lb.gallinarum</i> ^a	<i>B.thermophilus</i>	
<i>Lb.gasseri</i>		
<i>Lb.johnsonii</i> La1		
<i>Lb.lactis</i>		
<i>Lb.paracasei</i>		
<i>Lb.plantarum</i> 299v		
<i>Lb.reutri</i>		
<i>Lb.rhamnosus</i> GG		
<i>Lb.cellubiosus</i>		
<i>Lb.fermentum</i>		
<i>Lb.salivarius</i>		

a : surtout utilisé pour le animaux

b : identique à *B.animalis*

c : très peu d'information sur leur propriétés probiotiques

2.1.3.1. *Bactéries lactiques*

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont Gram +, généralement immobiles, asporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.*, 1994). Douze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Elles ont des formes en bâtonnets ou en coques, elles ont également un métabolisme aérobie facultatif. Les bactéries lactiques ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique (Sanders, 2001 ; Fooks et Gibson, 2002). Certaines sont dites « *homofermentaires* » car elles produisent majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites « *hétérofermentaires* » et produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate, éthanol et CO₂) (Sillanpaa, 2001 ; Fooks et Gibson, 2002 ; Klaenhammer *et al.*, 2002). Parmi les principales bactéries lactiques probiotiques utilisées on trouve :

- **Le genre *Lactobacillus***

Les lactobacilles sont les microorganismes probiotiques les plus en vue par leur association populaire avec les produits laitiers fermentés. Il s'agit en général de bâtonnets non flagellés, non sporulés, l'absence de catalase mais parfois une pseudo-catalase est détectée, Gram-positifs faisant partie des BAL. Elles sont importantes pour l'industrie alimentaire, notamment dans les fermentations lactières (Corrieu, 2008, Izquierdo, 2009). Elles sont anaérobies (mais aérotoles) et obtiennent leur énergie du métabolisme fermentatif, mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène grâce à leur activité peroxydase capable d'inactiver le peroxyde d'hydrogène. Elles ont également la capacité de survivre à des pH bas dans les milieux qu'elles acidifient par la production d'acide lactique, produit final de la fermentation des carbohydrates. Cette capacité à produire de l'acide lactique donne aux lactobacilles un avantage compétitif dans les environnements riches en nutriments, ce qui peut en partie expliquer leur potentiel probiotique (Ait-Belgnaoui, 2006).

Une grande variété de lactobacilles sont utilisées comme probiotiques, parmi lesquelles *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, sont les espèces les plus étudiées (Izquierdo, 2009).

- **Le genre *Streptococcus***

Les cellules de streptocoques sont des coques ou coccobacilles chimioorganotrophes (**Corrieu et Luquet, 2008**). Généralement groupées en paires et surtout en chaînes, de longueur variable. L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), par son caractère non pathogène et ses propriétés probiotiques et technologiques (**Guiraud et Rodec, 2004 ; Iyer, 2010**).

2.1.3.2. Bifidobactéries

Les bifidobactéries sont des bâtonnets aux formes variées (bifide ou ramifié) dont la caractéristique principale est une forme en Y. Les bifidobactéries sont Gram +, immobiles, non sporulées, non productrices de gaz, anaérobies strictes (sauf quelques espèces pouvant tolérer l'oxygène), catalase (-) négatives (excepté *B.indicum* et *B.asteroides*) hétérofermentaires et saccharolytiques, ayant un pourcentage de bases G+C compris entre 55 et 67%, et dont la composition de leurs peptidoglycanes est très variable. La température de croissance des bifidobactéries varie respectivement de 36 à 38°C et de 41 à 43°C et à des valeurs de pH comprises entre 6,5 à 7. Les espèces les plus utilisées comme probiotiques sont *Bifidobacterium lactis* et *Bifidobacterium longum* (**Dong et al., 2000**).

2.1.3.3. Préparations commerciales

Les bactéries probiotiques ont été largement utilisées pour le développement d'une gamme de produits avec diverses propriétés fonctionnelles. Plusieurs préparations commerciales de cultures probiotiques sont disponibles sur le marché (voir Tableau 2). Les cultures utilisées pour la fabrication des produits probiotiques comprennent généralement des souches des espèces de *L. acidophilus* et *Bifidobacterium spp.*

Tableau 2 : Selection de souches bactériennes probiotiques commercialisées par les principaux fabricants de produits laitiers et levains industriels (Chandan *et al.*, 2008)

Fabricant	Espèce	Souches probiotiques/ Appellation commerciale
Chr. Hansen	<i>L. acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. paracasei</i> <i>B. animalis</i>	LA-1, LA-5 LB-12 CRL431 BB-12
Danisco	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>B. lactis</i>	NCFM [®] , La-14 Lpc-37 HOWARU [™] , B1-04
Nestle	<i>L. johnsonii</i>	La1
Yakult	<i>L. casei</i> <i>B. breve</i>	Shirota Yakult
Danone	<i>L. casei</i> <i>B. animalis</i>	Immunitas DN173010 (Bioactivia)
DSM Food Specialties	<i>L. acidophilus</i> <i>L. paracasei</i> <i>B. lactis</i>	LAFTI [®] L10 LAFTI [®] L26 LAFTI [®] B94

2.1.4. Caractéristiques souhaitables des probiotiques

De façon plus spécifique, pour qu'un microorganisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes :

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

Les microorganismes probiotiques doivent également être technologiquement adaptés à interagir dans les produits alimentaires, tels qu'ils conservent à la fois la viabilité et l'efficacité dans les produits alimentaires (sur une échelle commerciale) pendant et après la consommation. Les probiotiques doivent être capables de survivre aux applications

industrielles (par exemple la transformation des produits laitiers) et aussi être en mesure de croître ou survivre à des niveaux élevés dans le produit à la fin de la durée de conservation (Farnworth, 2008).

2.2. Critères de sélection des souches bactériennes potentiellement probiotiques

2.2.1. Propriétés fonctionnelles

Afin d'être conformes à la définition des probiotiques, les microorganismes doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte. Les exigences fonctionnelles des probiotiques doivent être établies à l'aide de tests *in vitro* qui se réfèrent souvent à des propriétés bactériennes, telles que :

2.2.1.1. Survie au cours du transit digestif

Plus de deux litres de suc gastrique avec un pH faible sont sécrétés par les cellules qui tapissent l'estomac chaque jour, fournissant une barrière acide contre l'entrée de bactéries viables dans le tractus gastro-intestinal. L'effet du pH gastrique sur la viabilité des bactéries en empêchant la colonisation bactérienne de l'intestin grêle est bien étudié (Simon et Gorbach, 1987; Heatley et Sobala, 1993). Par conséquent, tout organisme probiotique doit avoir une tolérance élevée à l'acide pour survivre dans l'estomac.

La bile est le second facteur important qui influence le pourcentage de survie des microorganismes probiotiques. Le taux d'acides biliaires synthétisés dans le foie à partir du cholestérol est estimé à 500-700 ml / jour. Ces acides sont sécrétés par la vésicule biliaire dans le duodénum, après la prise alimentaire par un individu.

Les sels biliaires hydrolases (BSHs) catalysent l'hydrolyse des sels biliaires. L'hydrolyse des sels biliaires est médiée par les différents genres de la microflore intestinale, y compris *Lactobacillus* (Lundeen et Savage, 1990 ; Christiaens *et al.*, 1992 ; Gopal *et al.*, 1996), *Bifidobacterium* (Grill *et al.*, 2000a). Un certain nombre de BSHs ont été identifiés et caractérisés chez les bactéries probiotiques, et la capacité des souches probiotiques à tolérer des concentrations de sels biliaires a souvent été parmi les critères de sélection des souches probiotiques (Begley *et al.*, 2006).

2.2.1.2. *Activité antimicrobienne*

Les bactéries probiotiques doivent essentiellement maintenir de bonnes conditions sanitaires au niveau du tractus digestif, il est donc important qu'elles soient aptes à inhiber le développement des germes indésirables soit :

- Par la production de substances antagonistes de type bactériocines ou autres tels que les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène
- En empêchant l'adhésion des germes pathogènes aux cellules de la paroi intestinale (**Simon et al., 2005**).

2.2.1.3. *Colonisation et adhésion aux cellules intestinales*

Il est généralement convenu que les bactéries probiotiques doivent adhérer au mucus intestinal ou aux cellules épithéliales dans le but de persister dans l'intestin. La capacité des BAL à adhérer aux surfaces des muqueuses empêche leur évacuation rapide par la contraction intestinale et après écoulement péristaltique du digeste, et pourrait également conférer un avantage concurrentiel. Un grand nombre de recherches ont été menées à l'écran des bactéries probiotiques pour leur capacité à se fixer aux cellules intestinales (**Goktepe et al., 2006**).

2.2.2. Propriétés technologiques

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

2.2.2.1. *Viabilité et stabilité des microorganismes*

Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les probiotiques doivent survivre en grand nombre au procédé de fabrication, et à la période d'entreposage au froid qui s'ensuit. Il est en effet généralement admis qu'un nombre minimal de 10^7 cellules viables par gramme de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique. Cependant, la stabilité physique et génétique des cellules ainsi que toutes les propriétés nécessaires pour exercer leurs bienfaits sur la santé doivent également être assurées (**Izquierdo, 2009**). De plus, ces souches devraient être viables sans se multiplier pour ne pas provoquer d'effet indésirable sur le goût ou l'arôme du produit ni augmenter l'acidité (**Mattila-Sandholm et al., 2002**).

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que des cellules en phase stationnaire de croissance, plus tolérantes aux stress environnementaux que des cellules en phase exponentielle, devraient

être privilégiées pour la confection de produits contenant des probiotiques en grand nombre (Kolter, 1993; Hartke *et al.*, 1994; Rallu *et al.*, 1996; Heller, 2001).

2.2.2.2. Propriété acidifiante

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

2.3. Microflore intestinale : un écosystème complexe

Quelques considérations écologiques sur la flore intestinale sont nécessaires pour comprendre l'importance pour la santé humaine du concept d'aliment probiotique (Izquierdo, 2009).

2.3.1. Description générale de l'écosystème digestif

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. De part sa surface totale (muqueuse) estimée de 200 – 300 m², il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement (Holzappel *et al.*, 1998). L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable entre l'épithélium gastro-intestinal, le système immunitaire et une importante flore microbienne.

2.3.2. Microflore intestinale

Selon la définition de Isolauri *et al.*, (2002), la flore intestinale normale est une collection complexe et en équilibre de microorganismes qui habitent normalement le tractus gastro-intestinal (TGI) et remplissant un rôle dans la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire de l'hôte. Après une colonisation complète, la microflore intestinale est considérée comme un organe acquis après la naissance. Il est constitué d'une grande diversité d'espèces microbiennes assurant différentes fonctions pour l'hôte et cette microflore est estimée à près de 10¹³ – 10¹⁴ cellules microbiennes représentant 400 à 500 espèces et sous espèces (Bjorksten, 2004). Deux catégories de bactéries ont été identifiées : les bactéries autochtones ou indigènes se trouvant dans les niches particulières et les bactéries allochtones ou transitoires rencontrées dans d'autres habitats du tractus (Hao et Lee, 2004).

Du point de vue microbiologique, l'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions très différentes pour la survie des différents microorganismes. Ces trois régions sont signalées par les symboles (+) dans la Figure 2.

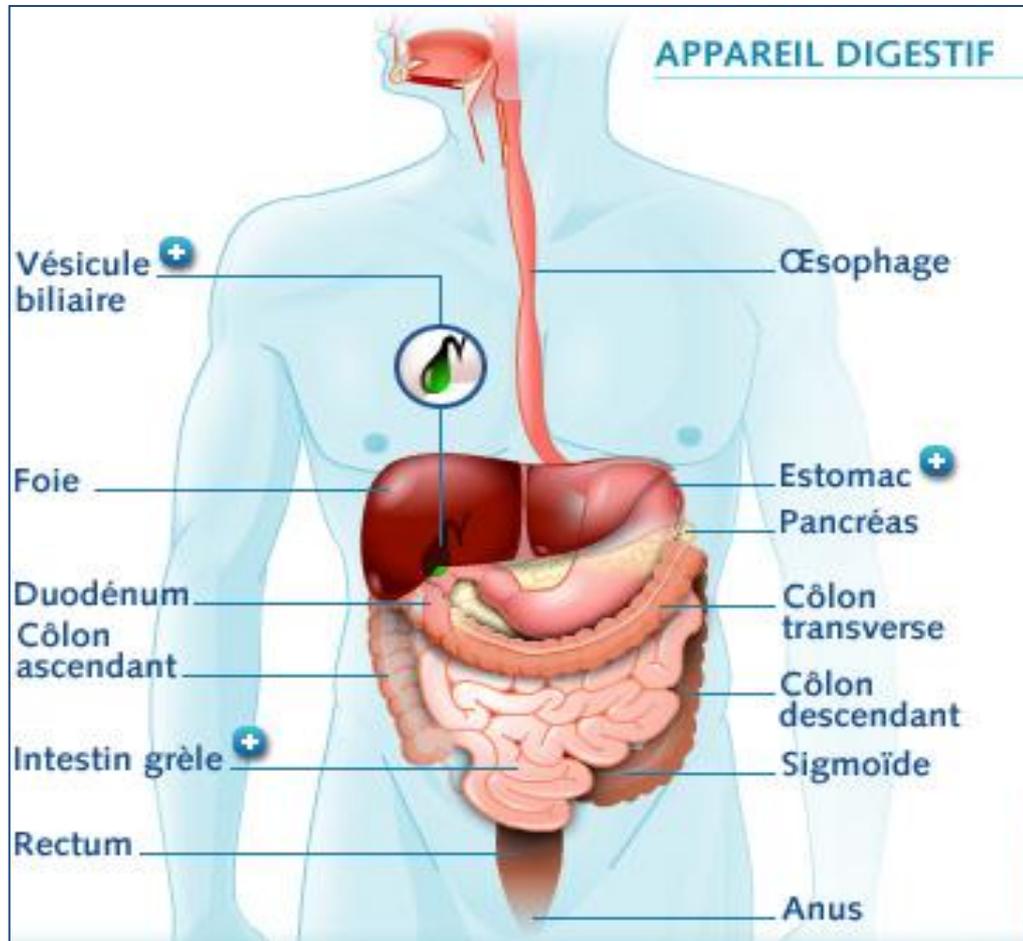


Figure 2 : Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'Homme (Ouwehand et Vesterlund, 2003).

L'estomac : l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acidotolérants, Gram positif et anaérobies facultatifs comme les lactobacilles et les streptocoques (Ait-Belgnaoui, 2006).

L'intestin grêle : la microflore est constituée essentiellement de bactéries anaérobies facultatives à Gram négatif apparaissant à côté des espèces à Gram positif, telles que les lactobacilles : *Lactobacillus acidophilus*, *L. planturum*, *L. casei* et *L. rhamnosus*, les streptocoques et les entérobactéries et anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies (Farnworth, 2008).

Le colon : c'est le dernier compartiment, dépourvu d'oxygène. La microflore du colon est très complexe et dominée pas les bactéries anaérobies strictes et comprenant à la fois les bactéries à Gram positif et Gram négatif (*Bactéroides spp*, *Clostridium spp*, *Bifidobacterium* : *B. longum*, *B. bifidum* et *B. infantis*) (**Farnworth, 2008**).

La charge microbienne dans les différents compartiments a été estimée à environ 10^3 à 10^4 UFC/ml ou g dans le contenu de l'estomac; 10^7 UFC / ml dans le jéjunum, jusqu'à 10^9 UFC / g dans l'iléon terminal et d'environ 5×10^{11} UFC / g dans le contenu du côlon distal (**Goktepe et al., 2006**).

Les bifidobactéries, les lactobacilles, et les streptocoques se distinguent par leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (**Gibson et Roberfroid, 1995 ; Rastall, 2004**). Ces bactéries utilisées pour la restauration de la microflore indigène sont appelés probiotiques (**Losada et Olleros, 2002**).

2.4. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle de l'intestin. D'innombrables avantages pour la santé sont fournis par l'ingestion des aliments contenant des cultures probiotiques (Figure 3) (**Da Cruz et al., 2010**). Il est important de mentionner que les effets de la promotion de la santé dépendent de la souche présente dans la formulation du produit, et qu'il n'y a pas une souche probiotique en mesure de fournir tous les avantages (**Shah, 2007**).

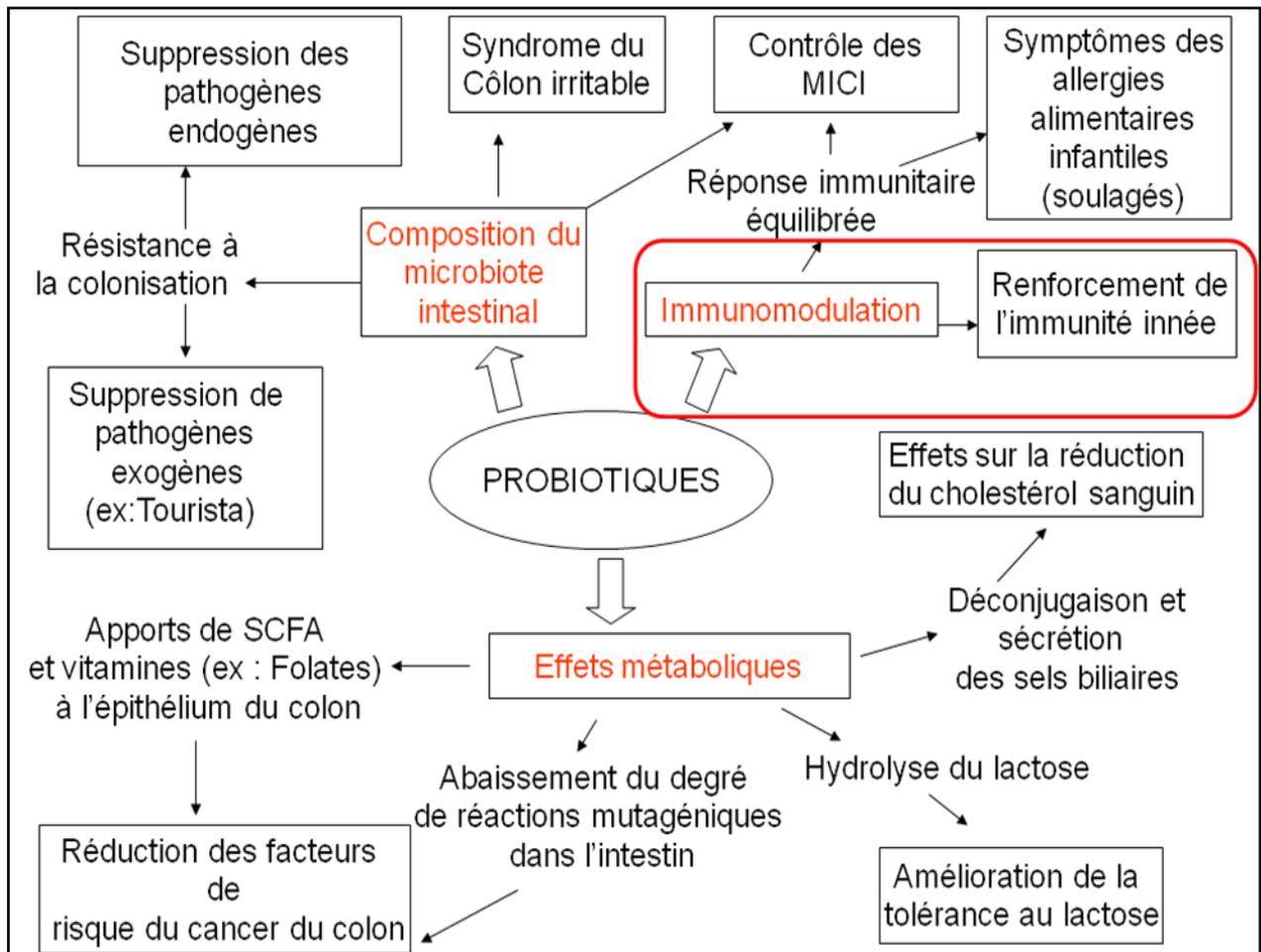


Figure 3 : Présentation des effets bénéfiques sur la santé humaine de la consommation des probiotiques (Saarela *et al.*, 2000).

Les principaux effets bénéfiques sur la santé de l'hôte sont les suivants:

2.4.1. Soulagement de la constipation

Les lactobacilles peuvent avoir des effets sur la constipation (selles difficiles, dureté excessive des selles, transit intestinal lent) et permettent de réduire l'utilisation de laxatifs, qui ont l'inconvénient majeur d'éliminer différentes substances essentielles à l'organisme comme les acides aminés, les minéraux... (Guarner *et al.*, 2008).

2.4.2. Améliorer l'utilisation du lactose par l'organisme

L'un des effets des BAL qui a été le plus mis en avant et démontré chez l'Homme est celui qui concerne l'amélioration de l'intolérance au lactose (De Vrese *et al.*, 2001). Chez les personnes souffrant d'intolérance au lactose, un déclin de la production de β -galactosidase est observé au-delà de la petite enfance. La deuxième cause d'intolérance (intolérance secondaire) est

représentée par les maladies comme les résections intestinales, les gastro-entérites, la maladie céliaque ou les gastrectomies.

Plusieurs études ont montré que la β -galactosidase des BAL participait à la digestion du lactose dans l'intestin. En principe, le remplacement du lait par du yaourt conduit à une meilleure absorption et une meilleure tolérance chez les sujets présentant une intolérance au lactose (primaire et secondaire). Il a été démontré que les bactéries qui survivaient dans l'intestin gardaient une activité métabolique suffisante pour hydrolyser le lactose, et que celles dont la membrane est facilement lysée par les acides biliaires libéraient leur lactase dans l'intestin (**Drouault et al., 1999**). *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* améliorent la digestion du lactose et réduisent les symptômes liés à l'intolérance au lactose (douleurs abdominales, ballonnements). Plusieurs travaux explicatifs ont montré que la lactase de bactéries lactiques participe à la digestion du lactose du yaourt (90%) chez les sujets déficients en lactase (**Guarner et al., 2008**).

2.4.3. Prévention ou le raccourcissement de la durée des diarrhées

Des études cliniques ont démontré que la diarrhée du voyageur, diarrhée aux rotavirus, diarrhée associée aux antibiotiques comme celle causée par *Clostridium difficile*, peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques tels que : *L. rhamnosus*, *B. bifidum*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* (**Wang et al., 2004**).

Les mécanismes potentiellement impliqués incluent la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines, la compétition pour des nutriments ou des récepteurs d'adhésion, des actions anti-toxines et la stimulation du système immunitaire (**Gill, 2003**). Plusieurs études randomisées contrôlées sur l'Homme ont montré l'efficacité des souches probiotiques pour prévenir ou atténuer les perturbations digestives liées à la prise d'antibiotiques (**Cremonini et al., 2002 ; Fooks, et Gibson, 2002**) et les diarrhées nosocomiales infantiles dues surtout à des rotavirus (**Szymanski et al., 2006**). Cependant, ces effets ne sont pas universels et les probiotiques ne semblent pas efficaces en toutes circonstances.

2.4.4. Contrôle des infections intestinales par *Helicobacter pylori*

L'infection par *Helicobacter pylori* favorise les risques d'ulcère du duodénum et de l'estomac et de certains cancers et lymphomes gastriques (**Dial et Lichtenberges, 2002**). **Wang et al., (2004)**

ont rapporté que la consommation régulière de yaourt additionné de *L. acidophilus* La5 ou de *Bifidobacterium lactis* Bb12 induit une suppression effective de l'infection due à *Helicobacter pylori*. La croissance d'*H. pylori* est inhibée par la production de quantités importantes d'acide lactique (Zubillaga *et al.*, 2001) et par la production de bactériocines notamment la lacticine produite par *Lactococcus lactis* et qui exerce une activité antimicrobienne contre plusieurs souches d'*Helicobacter pylori*.

2.4.5. Diminution des allergies alimentaires

L'allergie alimentaire du nourrisson se traduit souvent par de l'eczéma atopique. Les traitements curatif et préventif de cette pathologie par des BAL ont été évalués lors d'une étude clinique sur 27 enfants nourris au sein et souffrant d'eczéma atopique (Arvola *et al.*, 2000). Il a été notamment observé qu'après deux mois de traitement avec une formule supplémentée en *L. rhamnosus* GG et *B. lactis* Bb12, il y a eu une amélioration plus rapide de l'état atopique en comparaison avec le groupe placebo. Un effet préventif de *L. rhamnosus* GG a aussi été observé chez des enfants à risque nés de parents atopiques (Kalliomaki *et al.*, 2001).

Les mécanismes ainsi que les processus régulateurs de l'allergie sont loin d'être tous connus. Plusieurs mécanismes touchant à l'immunité ou à l'état de la muqueuse ont été suggérés pour expliquer l'effet protecteur des BAL. Celles-ci pourraient, en diminuant la perméabilité intestinale très augmentée en période de réactivité allergique, participer à la diminution du passage des protéines alimentaires (Rautava *et al.*, 2002).

2.4.6. Réduction du taux de cholestérol sanguin

Des tests *in vitro* ont montré une réduction du taux de cholestérol dans un milieu de culture avec certains *Lactobacillus* (Zhang *et al.*, 2008). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par les bactéries ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués.

Les acides biliaires, synthétisés par le foie à partir du cholestérol, sont "recyclés" et utilisés en moyenne trois fois pendant un même repas. L'hydrolyse des sels biliaires conjugués (les acides biliaires doivent être conjugués à la taurine et à la glycine pour être solubles) rend nécessaire la synthèse de sels biliaires supplémentaires, ce qui conduirait à une réduction du cholestérol (Liong et Shah, 2005). Bien que la déconjugaison des sels biliaires puisse avoir des effets bénéfiques sur l'hôte, comme la diminution des niveaux de cholestérol, une déconjugaison

excessive ou une déshydroxylation des acides biliaires par certains microorganismes semble avoir plusieurs effets néfastes sur l'hôte. Les bactéries les plus fréquemment désignées comme probiotiques, telles que les souches des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, sont incapables de déshydroxyler les sels biliaires déconjugués.

Une autre explication évoque une diminution du taux de cholestérol qui serait uniquement due à la co-précipitation du cholestérol avec les sels biliaires déconjugués, phénomène qui ne peut pas se produire *in vivo* car le pH est plus élevé que dans un milieu de culture acidifié par les BAL. Des études ont été réalisées sur des humains pour tester l'influence de la consommation de produits laitiers fermentés sur le taux de cholestérol sanguin, mais les résultats n'ont jamais été concluants (**Pereira et Gibson, 2002**).

D'autres bienfaits sur la santé sont fréquemment cités dans la littérature comme : les activités antimutagène et anticancéreuse, l'amélioration de la santé urogénitale, l'optimisation des effets du vaccin et le traitement des rhumes et les infections hivernales, (**Bomba et al., 2002; Nagpal et al., 2007; Sanders, 2008; Sánchez et al., 2009**).

2.5. Production et maintenance de la viabilité des bactéries probiotiques dans les produits laitiers

2.5.1. Emploi des bactéries probiotiques dans les produits laitiers

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

Le yaourt a longtemps été reconnu comme un produit avec de nombreuses caractéristiques appréciées par les consommateurs, ce qui en fait un choix évident en tant que porteur de souches

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

Une revue récente dans le *British Journal of Nutrition* (**Guarner et al., 2005**) comprend la conclusion suivante:

"Le concept de «probiotiques » a évolué vers une notion simple et directe: Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates confèrent un avantage sur la santé l'hôte. La consommation de yaourt a été montrée à induire des avantages mesurables sur la santé liés à la présence de bactéries vivantes, par rapport aux produits avec des bactéries tuées. Ainsi, les levains du yaourt remplissent clairement le concept actuel des probiotiques au moins pour ses effets bénéfiques sur la digestion du lactose in vivo. "

Les cultures probiotiques de lactobacilles et de bifidobactéries restent viables dans le yaourt au cours du stockage réfrigéré à des niveaux supérieurs à 10^6 UFC/g. Cependant, des problèmes de stabilité des bactéries probiotiques dans le yaourt et les produits laitiers fermentés ont été rapportés (**Farnworth, 2008**).

2.5.2. Viabilité des bactéries probiotiques

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

Au Japon, l'association des laits fermentés et les boissons lactées a mis au point un chiffre standard, qui recommande la présence d'un minimum de 10^7 UFC/ml de bactéries lactiques viables dans les produits laitiers (**Tamime, 2002**). La viabilité peut être assez

facilement évaluée par la méthode de culture ou par cytométrie de flux (Virta *et al.*, 1998; Bunthof *et al.*, 2001).

2.5.2.1. Effet du procédé technologique sur la viabilité des bactéries probiotiques utilisées comme additifs alimentaires

La viabilité de bactéries probiotiques dans les yaourts au cours du procédé technologique dépend des souches utilisées, l'interaction entre les espèces présentes, la production de peroxyde d'hydrogène par le métabolisme bactérien, les composants de la matrice alimentaire et l'acidité finale du produit (Farnworth, 2008). La viabilité dépend également de la disponibilité des éléments nutritifs, les activateurs et inhibiteurs de croissance, la concentration des sucres, l'oxygène dissous et de l'oxygène perméable à travers l'emballage (en particulier pour les espèces *Bifidobacterium*), le niveau d'inoculation et le temps de fermentation (Oliveira et Damini, 2003). Parmi ces derniers, les principaux facteurs responsables de la perte de la viabilité des lactobacilles sont :

- **La composition du milieu de fermentation**

Les bactéries probiotiques sont utilisées dans la fermentation du lait dans une mesure limitée en raison du ralentissement de leur croissance dans le lait. Bien que *Lb. acidophilus* montre un certain niveau de l'activité β -galactosidase, la raison de la faible croissance est directement liée aux faibles concentrations en acides aminés libres et des peptides dans le lait, qui sont insuffisantes pour soutenir la croissance de ces microorganismes (Tamime, 2005). En général, les bactéries probiotiques se développent mieux dans les milieux synthétiques riches à savoir, peptone tryptose levure (TPY) et le bouillon Man, Rogosa et Sharpe (MRS), que dans le lait. Toutefois, ces milieux sont complexes et coûteux pour la propagation à grande échelle des bactéries probiotiques et peuvent également conférer une saveur avant l'incorporation. Pour la fabrication d'un produit de qualité, tant en termes de texture et de viabilité de bactéries probiotiques, un milieu à base de lait est habituellement nécessaire en raison de la présence de la caséine (Shah, 2000).

- **L'oxygène**

Au cours de la production de yaourt, l'oxygène peut facilement envahir et se dissoudre dans le lait. L'oxygène peut également pénétrer dans le produit à travers les matériaux d'emballage pendant le stockage (Dave et Shah, 1998). L'oxygène affecte les cultures probiotiques de deux façons :

-
- Premièrement, il est directement toxique pour les cellules; certaines cultures probiotiques sont sensibles à l'oxygène et meurent en sa présence.
 - Deuxièmement, dans la présence d'oxygène, certaines cultures, notamment *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, produisent le peroxyde. Une inhibition synergique de cultures probiotiques à cause du peroxyde d'hydrogène et d'acide a été rapportée (**Lankaputhra et Shah, 1996**).

▪ Les additifs

Les additifs alimentaires sont indispensables pour (et parfois même caractéristique de boissons lactières) et d'autres produits laitiers. Cependant, les effets des additifs sur la croissance des bactéries lactiques probiotiques n'ont pas été largement étudiés. D'après le comité FAO–OMS, un additif alimentaire est défini comme une substance dotée ou non d'une valeur nutritionnelle, ajoutée intentionnellement à un aliment dans un but technologique, sanitaire, organoleptique ou nutritionnel. Son emploi doit améliorer les qualités du produit fini sans présenter de danger pour la santé, aux doses utilisées. Il peut être d'origine naturelle, ou artificielle : produits de transformation de substances naturelles (amidons transformés comme agents de texture *etc.*) ou encore être un arôme de synthèse. L'additif porte la mention « E » (pour « Europe »), suivie d'un numéro d'identification. Sa présence et la dose doivent être précisées sur l'emballage. Ce sont à l'époque moderne les amidons modifiés (E 1404 à E 1451), la cellulose et ses dérivés (E 460 à E 466) et les gommes (**Bourrier, 2006**).

La gomme arabique et le phosphate de diamidon hydroxypropylé sont des additifs largement utilisés dans les yaourts fabriqués en Algérie. La gomme arabique (E414) consiste essentiellement en polysaccharides de poids moléculaire élevé (200 et 300 kilodaltons), ainsi que de leurs sels de calcium, de potassium et de magnésium, qui donnent par hydrolyse de l'arabinose, du galactose, du rhamnose et de l'acide glucuronique. On trouve la gomme arabique dans le commerce sous forme de poudre ou de cristaux non moulus plus ou moins ronds de couleur jaune pâle à jaune brunâtre. La gomme arabique E414 est listée comme agent de texture, gonflant, de glaçage, et peut selon le *codex alimentarius* être ajoutée à une large gamme d'aliments dont les produits laitiers, sans limite de dosage (BPF). Cet additif est admis dans l'alimentation labellisée Bio (**Zhiri, 2011**).

Le phosphate de diamidon hydroxypropylé (E1442) est de l'amidon réticulé au trimétaphosphate de sodium ou à l'oxychlorure de phosphore et éthérifié à l'oxyde de propylène. L'amidon E1442 est listé comme stabilisant, épaississant, liant, émulsifiant, le *codex alimentarius* l'attribue à une

vaste gamme d'aliments divers dont les produits laitiers, et à n'importe quelle dose (BPF) (Zhiri, 2011).

Les arômes sont ajoutés aux aliments pour donner une odeur et/ou un goût, exception faite des goûts acides, salés ou sucrés. Ce sont des arômes naturels ou des arômes de synthèse.

2.5.2.2. Méthodes d'améliorations de la viabilité des microorganismes probiotiques

- **Sélection des souches**

Il est important que la viabilité de la souche et la stabilité des caractéristiques souhaitables soient maintenues pendant la production commerciale, ainsi que dans le produit fini (Godward *et al.*, 2000; Talwalker et Kailasapathy, 2004). La viabilité et le taux de survie lors du passage dans l'estomac sont nécessaires pour permettre aux probiotiques vivants des produits laitiers fermentés d'exercer un rôle biologique dans l'intestin humain. Ainsi, la sélection de souches appropriées sur la base de leur tolérance à l'acidité et aux sels biliaires contribuerait à améliorer la viabilité de ces souches bactériennes probiotiques (Takahashi *et al.*, 2004).

- **Taux d'inoculation**

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

- **L'utilisation des pièges à oxygène**

La teneur en oxygène et le potentiel redox sont des facteurs importants pour la viabilité pendant le stockage à froid. L'acide ascorbique (vitamine C) agit comme un capteur d'oxygène et est autorisé comme additif alimentaire. En outre, le lait et les produits laitiers offrent seulement 10-15% des besoins quotidiens en vitamine C. Ainsi, la fortification du yaourt avec de l'acide ascorbique pourrait augmenter sa valeur nutritive (Dave et Shah, 1997). *S. thermophilus* est aérobic, et leur nombre devrait rester faible en présence d'acide ascorbique. La viabilité de *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (étant des microaérophiles) devrait s'améliorer avec une

concentration plus importante en acide ascorbique. Bien que l'ajout d'acide ascorbique contribue à améliorer la survie de *Lb. acidophilus*, l'effet du piégeage d'oxygène est insuffisant pour améliorer la viabilité des bifidobactéries anaérobies (Tamime, 2005).

- **L'ajout de Cystéine**

La cystéine est un acide aminé contenant du soufre, fournit l'azote aminé comme facteur de croissance tout en réduisant le potentiel d'oxydoréduction. La cystéine à 250 mg L⁻¹ semble améliorer la survie de *Lb. acidophilus* et *Bifidobacterium spp.* Il convient de noter que la faible concentration en cystéine (50 mg L⁻¹) améliore la croissance de *S. thermophilus* (Dave et Shah, 1997).

Une légère baisse du potentiel redox est bénéfique pour la survie de *S. thermophilus*, mais lorsque la concentration en cystéine est supérieure à 50 mg L⁻¹, la dépression du potentiel redox affecte la croissance bactérienne. La croissance de *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* serait améliorée grâce à de faibles niveaux de cystéine, mais elle serait inhibée à des niveaux plus élevés (Tamime, 2005).

2.6. Défis technologiques associés au développement des cultures probiotiques

La production et la commercialisation des probiotiques à l'échelle industrielle exposent les microorganismes à des conditions défavorables qui peuvent tuer une grande partie des bactéries. Parmi les ressources innovatrices dont on peut se servir pour préserver la viabilité, on compte sur l'application de conditions de stress (température, acidité, etc.) pour induire une réponse d'adaptation qui rend les probiotiques résistants. Entre autres, les nouvelles technologies de séchage, notamment de lyophilisation (*freeze drying*), exposent les microorganismes à des conditions plus douces et permettent une augmentation substantielle de la viabilité. Si les baisses de viabilité sont inacceptables lors de la fermentation, la lyophilisation, la production de cultures concentrées dans des billes de gel d'alginate ou de carraghénane est une alternative au processus traditionnel (Macouzet et Champagne, 2007).

2.6.1. Méthodes de production

2.6.1.1. Lyophilisation

La lyophilisation est une méthode pratique pour la préservation et la conservation à long terme des bactéries probiotiques. Elle consiste à retirer de l'eau de la suspension de cellules congelées

par sublimation sous pression réduite. La sublimation est le processus par lequel l'eau est éliminée directement à partir de la glace, sans passer par l'état liquide (**Malik, 1990**). La lyophilisation est bien adaptée pour la conservation de matériel biologique sensible, car le gel ralentit ou arrête la plupart des réactions chimiques. Ce processus se déroule sous vide et en l'absence d'oxygène qui font qu'il est impossible que les réactions d'oxydation se produisent. Pour surmonter l'inactivation au cours du séchage et une mauvaise stabilité pendant le stockage les cryoprotecteurs comme le glycérol, la cystéine ou le sucrose sont ajoutés en période de lyophilisation des lactobacilles. La lyophilisation est considérée comme l'étalon-or des méthodes de séchage où la viabilité, la saveur et l'arôme sont préservés à long terme durant le stockage, la commercialisation et la consommation (**Farnworth, 2008**).

2.6.1.2. Microencapsulation

La microencapsulation est un processus par lequel les cellules microbiennes sont enfermées dans une couche protectrice. L'encapsulation réduit la perte de la viabilité des cellules, en séparant les cellules bactériennes de l'environnement défavorable. La couche de protection permet de réduire la perte de cellules et de blessures en bloquant les composants actifs tels que l'humidité, l'oxygène atmosphérique et les acides (**Sultana et al., 2000**).

Il a été constaté que les bactéries lactiques probiotiques utilisées dans les applications alimentaires enfermées dans des microcapsules de graisse solide conservent toute leur activité biologique. Deux méthodes d'encapsulation couramment utilisées sont la technique d'extrusion et technique de l'émulsion (**Krasaekoopt et al., 2003**).

2.6.1.3. L'ajout des prébiotiques

Les probiotiques (bactéries en soi) et les prébiotiques (composés qui favorisent sélectivement la croissance des bactéries probiotiques) sont des ingrédients qui peuvent être consommés séparément. Toutefois, lorsqu'on prépare des aliments fonctionnels avec un mélange de bactéries probiotiques et de composés prébiotiques, ces produits sont nommés synbiotiques. En fait le terme synbiotique a été créé récemment pour caractériser ce mélange particulier d'ingrédients bioactifs pour le marché des aliments fonctionnels. Les prébiotiques sont principalement des oligosaccharides et les plus connus incluent: inuline, fructo-oligosaccharides, lactulose, galacto-oligosaccharides et amidons modifiés. Les synbiotiques ont été conçus pour avoir un effet dans le système gastro-intestinal. Toutefois, on leur découvre de plus en plus de bénéfices secondaires. En effet, une croissance accrue de probiotiques s'observe parfois dans les laits

fermentés ainsi qu'une plus grande stabilité lors de l'entreposage (**Macouzet et Champagne, 2007**).

2.6.2. Méthodes de détection

Les méthodes utilisées pour la détection de cellules viables probiotiques comprennent les techniques de comptage conventionnelles (culture à charge) et les techniques moléculaires (indépendants de la culture). Bien que des techniques de comptage sont généralement critiquées en raison de la possibilité de sous-estimation des chiffres à la suite de l'agglutination des cellules (**Lahtinen et al., 2006**) et l'inadaptation de cellules viables aux milieux de culture, il n'existe aucune méthode qui peut remplacer celles-ci encore même si un certain nombre de méthodes ont été tentées.

De nouvelles méthodes comprennent des techniques moléculaires telles que polymérase en chaîne (PCR), hybridation fluorescente *in situ* (FISH) (**Boulos et al., 1999**). Par exemple, la PCR est basée sur l'ADN bactérien qui est non seulement présent dans les cellules vivantes, mais peut aussi être retenu par les cellules mortes en quantités importantes. FISH est basée sur la détection de l'ARNr 16S, dont la présence n'est pas une preuve directe de l'activité métabolique, mais plutôt une indication potentielle de la viabilité (**Biggerstaff, 2006**).

Les deux techniques PCR ou FISH ne sont pas indépendantes car elles nécessitent la détermination d'une courbe standard qui est déterminée la plupart du temps en utilisant les chiffres standards des techniques de comptage conventionnelles. Cependant, les limites de détection pour la PCR et FISH sont environ 10^4 cellules / ml et 10^6 cellules / ml, respectivement (**Biggerstaff, 2006**).

2.7. Spécification d'un produit probiotique, assurance qualité et questions réglementaires

2.7.1. Allégations, face visible de la fonctionnalité

L'industrie alimentaire a incorporé les produits alimentaires dans son offre, qui ont été bien accueillis par les consommateurs. La publicité de ces aliments n'utilise plus exclusivement les images et a progressivement intégré de nouvelles expressions et légendes. Cette situation est particulièrement ressentie dans les pays industrialisés, exportateurs de produits alimentaires. L'utilisation de telles expressions (appelées allégations alimentaires) a provoqué une certaine

confusion chez les consommateurs ; et l'industrie a, elle aussi, manifesté son malaise provoqué par l'absence d'un cadre réglementaire (Vilella, 2008).

2.7.1.1. Concept d'allégation

Le *Codex alimentarius* (2000) donne la définition suivante :

«Toute représentation qui énonce, suggère ou laisse entendre qu'une denrée possède des qualités particulières liées à son origine, ses propriétés nutritives, sa nature sa transformation, sa composition ou toute autre qualité ».

De son côté le nouveau règlement **CE 1924/ 2006** définit comme allégation :

« Tout message ou toute représentation, non obligatoire en vertu de la législation nationale, y compris la représentation sous la forme d'images, d'éléments graphiques ou de symboles, quelle qu'en soit la forme, qui affirme, suggère ou implique qu'une denrée alimentaire possède des caractéristiques particulières».

A priori, nous pouvons dire qu'une allégation est :

- Une déclaration (entendant par là toute information, message, représentation ou description) ;
- écrite, en image, graphique ou symbolique ;
- effectuée par un producteur alimentaire y compris dans l'étiquetage, présentation ou publicité d'un aliment ;
- de manière volontaire ;
- qui affirme, implique ou suggère ;
- qu'il existe un lien entre l'ingestion de ce produit ou de ces ingrédients et la nutrition et /ou la santé.

2.7.1.2. Typologie d'allégation

Deux catégories d'allégations spécifiques aux aliments fonctionnels ont été identifiées respectivement comme allégation de type A et allégation de type B. Dans son dernier projet de recommandation pour encadrer l'utilisation des allégations (claims), le *Codex alimentarius* (2000) les définissant comme :

Type A ou allégations qui concernent les effets bénéfiques spécifiques découlant de la consommation d'aliments ou de leur(s) constituant(s) sur des fonctions physiologiques ou psychologiques ou des activités biologiques mais qui sont différentes des allégations liées aux

fonctions des nutriments. De telles allégations se réfèrent à une contribution positive pour la santé, à l'amélioration d'une fonction ou à une modification ou une préservation de la santé.

Type B ou allégations de réduction du risque d'une maladie ; se réfèrent à la consommation d'un aliment ou d'un composant alimentaire qui, dans le contexte de l'alimentation quotidienne, peut réduire le risque d'une maladie particulière.

La Consultation **FAO/OMS (2001)** recommande que les allégations relatives à la réduction des maladies soient autorisées pour certains probiotiques s'il a été démontré que ceux-ci sont conformes aux directives contenues dans son rapport. Par exemple, mentionner « réduit l'incidence et la sévérité des diarrhées à rotavirus chez les enfants ».

2.7.2. Lignes directrices pour l'assurance qualité des aliments probiotiques

2.7.2.1. Lignes directrices pour l'évaluation des microorganismes probiotiques

Une grande variété de produits probiotiques a été développée et mise sur le marché ces dernières années. Cependant, les effets attribués à bon nombre de ces produits ne sont pas soutenus par une justification scientifique adéquate. Les produits de qualité médiocre doivent être dénoncés car ils discréditent les autres aux yeux des non spécialistes. Par conséquent, il est nécessaire d'établir des critères rationnels pour le criblage et la sélection des microorganismes candidats, sans oublier d'évaluer l'efficacité des souches sélectionnées sur l'Homme avec des essais cliniques contrôlés (**FAO/WHO, 2002**).

Le rapport de la **FAO/WHO (2002)** a établi des critères et une méthodologie à utiliser pour l'évaluation des probiotiques.

a. Désignation du Genre/Espèce/Souche : il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée, car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne. Le probiotique doit porter un nom reconnu scientifiquement et son identification doit être effectuée à l'aide de méthodes récentes et valides combinant les tests phénotypiques et génotypiques.

b. Dépistage des probiotiques potentiels par des tests *in vitro* : les tests *in vitro* sont réalisés afin de déterminer les mécanismes par lesquels les microorganismes probiotiques exercent leurs effets bénéfiques. Il est recommandé d'utiliser des tests spécifiques à la cible et

appropriés pouvant corrélérer avec les résultats des essais *in vivo*. Les principaux tests *in vivo* réalisés pour étudier les probiotiques sont :

- Résistance à l'acide gastrique,
- Résistance aux acides biliaires,
- Adhérence au mucus et/ou cellules épithéliales humaines,
- Activité antimicrobienne contre les bactéries potentiellement pathogènes,
- Capacité de réduire l'adhésion des pathogènes aux surfaces,
- Activité de l'hydrolyse sur les sels biliaires (dissociation des sels biliaires)

c. Innocuité de souches probiotiques : les probiotiques utilisés dans les produits alimentaires sont des microorganismes appartenant à la flore normale intestinale. Cependant, l'innocuité de la souche microbienne doit être prouvée avant toute utilisation du probiotique dans l'aliment. Les bifidobactéries ne présentent aucun risque d'infection chez l'Homme.

d. Etudes *in vivo* sur des animaux et humain : afin de confirmer ou valider les résultats des tests *in vitro*, il serait nécessaire de réaliser des essais *in vivo* sur des animaux de laboratoire ou de préférence sur des sujets humains dans des conditions expérimentales appropriées. En général, une méthode standard d'évaluation clinique des probiotiques comprend les phases suivantes :

- ◆ **Phase 1** : consistant à évaluer l'innocuité de la souche probiotique
- ◆ **Phase 2** : permet d'étudier l'efficacité d'un probiotique par comparaison à un placebo
- ◆ **Phase 3** : permet de comparer des probiotiques avec un traitement standard (condition spécifique).
- ◆ **Phase 4** : consisterait à surveiller l'utilisation du probiotique (effets produits)

e. Allégations santé et marque du produit : la mention d'allégations générales est actuellement autorisée sur les produits contenant des probiotiques dans certains pays comme les Etats-Unis et l'Angleterre. Il est cependant recommandé de mentionner sur les produits des allégations spécifiques lorsque des données scientifiques sont disponibles.

2.7.2.3. Lignes directrices spécifiques en matière d'étiquetage

Les lignes directrices spécifiques en matière d'étiquetage sont énoncées dans *le Guide d'étiquetage et de publicité sur les aliments de l'ACIA (2009)*, s'appliquant à tous les produits

renfermant des microorganismes probiotiques. Selon la description appropriée d'un produit probiotique, telle qu'indiquée dans l'étiquetage, devrait inclure les points suivants :

- **Identification de la souche :** toute allégation relative à un probiotique doit être accompagnée du nom latin du microorganisme (c.-à-d. le genre et l'espèce), ainsi que du nom de la souche du microorganisme. La nomenclature appropriée doit être utilisée. À des fins d'uniformité, il est recommandé que la souche soit identifiée au moyen du numéro attribué par une banque de cultures reconnue internationalement (eg. l'American Type Culture Collection). En ce qui concerne la publicité, si le microorganisme probiotique est identifié ou mentionné dans l'annonce, il doit être désigné selon la nomenclature appropriée (genre, espèce et souche). Par exemple, si on allègue que le « produit contient deux probiotiques », il faut identifier les deux microorganismes dans l'annonce.
- **Déclaration de la quantité :** La quantité du ou des microorganismes probiotiques présente dans le produit à la fin de sa durée de conservation doit être indiquée en unités formant colonies (UFC) dans une portion déterminée de l'aliment. Cette déclaration doit figurer à côté du tableau de la valeur nutritive ou de la liste des ingrédients, ou à proximité de l'allégation. Dans le cas d'une culture composite, si des microorganismes appartenant à plusieurs genres sont utilisés, on s'attend généralement à ce que la quantité de chaque genre soit indiquée. Si l'aliment renferme plusieurs espèces d'un même genre ou souches d'une même espèce, la décision d'inclure une déclaration distincte pour chaque espèce sera prise au cas par cas.
- **Liste des ingrédients :** Tout aliment contenant un ou des microorganismes probiotiques doit afficher une liste des ingrédients, conformément aux articles du *Règlement sur les aliments chapitre 8 (ACIA, 2009)*. Le microorganisme probiotique doit être désigné par son nom usuel ou par le nom de classe. Le nom de classe « culture bactérienne » peut être utilisé pour décrire toutes les espèces bactériennes ajoutées à un produit alimentaire. Lorsque le nom de classe (en l'occurrence « culture bactérienne ») figure dans la liste des ingrédients, l'identité (c.-à-d. le genre, l'espèce et la souche) de la ou des cultures bactériennes probiotiques doit être indiquée à proximité de l'allégation, au moyen de la nomenclature appropriée.

2.7.3. Consommation des aliments probiotiques

2.7.3.1. Perception du consommateur

Plusieurs chercheurs ont commenté le manque de sensibilisation des consommateurs en ce qui concerne les aspects des probiotiques relatifs à la santé (**Fitzpatrick, 2005**). Il a été signalé que le consommateur ne comprend pas vraiment les probiotiques parce qu'il y a peu de connaissances préexistantes sur lesquelles miser, telles que l'acceptation traditionnelle des avantages pour la santé de certaines bactéries dans le régime. Une autre question est que les avantages vantés des probiotiques sont trop génériques et pas suffisamment spécifiques. Par conséquent, dire que les probiotiques assurent l'immunité peut être trop vague pour les consommateurs (**Fitzpatrick, 2005**).

L'acceptabilité des produits alimentaires innovants par le consommateur est modulée par différents facteurs objectifs tels que l'âge, le sexe, l'état de santé, le pouvoir d'achat ...*etc.* En outre, elle relève aussi de différents aspects subjectifs tels qu'une moindre motivation ou capacité perçue à remettre en cause l'alimentation dans son ensemble, un degré de confiance plus élevé vis-à-vis des messages émanant des industriels et des marques, une attirance pour les produits innovants, un rapport d'adhésion à la société de consommation...*etc.* (**Marcel et al., 2008**).

2.7.3.2. Protection du consommateur des arnaques

Les allégations des aliments fonctionnels sont régies par le règlement **CE 1924/2006**. Le règlement a pour but d'assurer aux consommateurs européens un niveau élevé de protection (**Marcel et al., 2008**). Le nouveau règlement **CE 1924/2006** exige que les allégations soient véridiques et compréhensibles pour le consommateur moyen.

2.7.4. Difficultés réglementaires

Bien que les scientifiques continuent d'étudier et de débattre le potentiel des effets santé des probiotiques, il y a un regain d'intérêt par les régulateurs et les membres de l'industrie sur la signification exacte du terme « probiotique ». Les réglementations gouvernementales diffèrent d'un pays à l'autre, toutefois le statut des probiotiques en tant que composante d'un aliment n'est pas établi actuellement à l'échelon international (**Marcel et al., 2008**).

Sur le plan international, les approches législatives varient beaucoup en fonction des pays : tandis que certains pays comme le Japon ont établi des réglementations méticuleuses, d'autres états se sont limités à formuler des déclarations par le biais d'organismes gouvernementaux (*eg.* les Etats Unis) ou de promouvoir des rapports scientifiques de consensus (ce qui était le cas de l'UE) (Marcel *et al.*, 2008).

Cette façon de faire est due à l'absence d'une définition juridique des aliments fonctionnels. En effet, certains pays considèrent que les aliments fonctionnels constituent une catégorie à part et doivent donc être réglementés. D'autres, en revanche, ont limité leur intervention à la réglementation des allégations alimentaires, considérant que les autres aspects sont couverts par la législation alimentaire générale. Sans oublier enfin ceux qui ne se sont pas encore prononcés à ce sujet tels que l'Algérie (Marcel *et al.*, 2008).

2.7.4.1. Textes réglementaires algériens

Les textes réglementaires algériens relatifs au lait et produits dérivés se limitent aux aspects qui touchent à la qualité hygiénique et sanitaire de ces aliments. Actuellement, il n'y a aucune législation nationale qui traite du sujet des aliments fonctionnels ou les probiotiques. Cependant, il existe un nombre de textes qui concernent l'étiquetage des aliments. Le Tableau 3 résume l'ensemble des textes réglementaires parus dans le Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire depuis 1998. C'est l'ensemble de textes utilisés comme références pour la réalisation des analyses de contrôle de qualité par le Centre Algérien de Contrôle de la Qualité et de l'Emballage (CACQE) de la Wilaya de Jijel, concernant le lait et dérivés ainsi que l'étiquetage des denrées alimentaires. Selon l'article n° 3 du décret exécutif n° 03-318 du 4 Chaâbane 1424 correspondant au 30 septembre 2003 modifiant et complétant le décret exécutif n° 89-147 du 8 août 1989 portant création, organisation et fonctionnement du centre algérien du contrôle de la qualité et de l'emballage "CACQE" (page 5)¹ :

“Art. 3. — Les missions du Centre s'inscrivent dans le cadre de la réalisation des objectifs de la politique nationale de la qualité et ayant trait notamment :

- à la contribution, à la protection de la santé, de la sécurité et des intérêts matériels et moraux des consommateurs ;

¹ <http://www.mincommerce.gov.dz/fichiers/dec03318fr.pdf>

-
- à la promotion de la qualité de la production nationale des biens et services ;
 - à la formation, l'information, la communication et la sensibilisation des consommateurs”.

Tableau 3 : Ensemble des textes réglementaires utilisés comme référentiels pour la réalisation des analyses de contrôle de qualité du lait et produits dérivés au CACQE (Wilaya de Jijel)

Année de publication	Référence	Aspects abordés
JO n° 96 du 23 décembre 1998	Arrêté interministériel du 21 chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation.	Dénomination du beurre, ingrédients ajoutés, additifs autorisés, indice de peroxyde, concentration maximales des contaminants tolérés, emballages utilisés, étiquetage (dénomination de vente, taux de matière grasse, listes des additifs, les mentions (salé, demi- salé, foisonné et cru, conserver à ...suivie de la température à respecter.
JO n° 94 du 16 décembre 1998	Arrêté interministériel du 13 Chaâbane 1419 correspondant au 2 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des laits en poudre et aux conditions et modalités de leur présentation.	La dénomination « lait entier en poudre », « lait partiellement écrémé en poudre » et « lait écrémé en poudre », les taux d'humidité et d'acidité au moment de l'ouverture de l'emballage, conditionnement. L'étiquetage des laits en poudre préemballés pour la vente au détail (la dénomination de vente, le pourcentage de matières grasses laitières, le pourcentage de protéines laitières, la liste des additifs, le numéro du lot de production, le nom ou la raison sociale et l'adresse du fabricant et, le cas échéant, le numéro d'identification officiel de l'usine, a mention « ne donner aux nourrissons que sur avis médical » pour les laits écrémés et partiellement écrémés.
JO n° 086 du 18-11-1998	Arrêté interministériel du 16 Joumada Ethania 1419 correspondant au 7 octobre 1998 relatif aux spécifications techniques des yaourts et aux modalités de leur mise à la consommation.	Dénomination du yaourt, quantité d'acide lactique libre, yaourt (gras, partiellement écrémé, écrémé, sucré et aromatisé), la teneur minimale en matière sèche laitière non grasse, les ingrédients ajoutés, l'étiquetage doit comporter (la dénomination de vente « Yaourt » ou « Yoghourt » complétée, selon le cas par " au lait cru ", " au lait reconstitué ", " au lait recombiné ", "au mélange de lait "; " nature " " sucré ", " édulcoré " le taux de matière grasse, la mention " contient des céréales " pour le yaourt contenant ces produits; la mention " conserver à " suivie de l'indication de la température à respecter.

Année de publication	Référence	Aspects abordés
JO n° 80 du 14 novembre 1999	Arrêté du 17 Rajab 1420 correspondant au 27 octobre 1999 relatif aux spécifications du lait en poudre industriel et aux conditions et modalités de sa présentation, sa détention, son utilisation et sa commercialisation.	Composition de la matière grasse laitière anhydre, concentrations maximales des contaminants, concentrations radioactives maximales, critères microbiologiques, emballages, conditionnement et étiquetage (la dénomination de vente; le nom ou la raison sociale ou la marque du fabricant et de l'importateur. Lorsque le produit est importé : le poids net du produit; la date de fabrication; la date limite d'utilisation; la teneur en matière grasse; le pays d'origine; le numéro du lot; le numéro d'identification officiel de l'usine de fabrication; les conditions particulières de conservation).
JO n° 19 du 05 avril 2000	Arrêté du 27 Dhou El Hidja 1420 correspondant au 2 avril 2000, modifiant et complétant l'arrêté du 17 Rajab 1420 correspondant au 27 octobre 1999 relatif aux spécifications du lait en poudre industriel et aux conditions et modalités de sa présentation, sa détention, son utilisation et sa commercialisation.	Les spécifications microbiologiques, les concentrations radioactives maximales, les spécifications toxicologiques du lait en poudre industriel.
JO n° 32 du 23 mai 2004	Arrêté du 27 mars 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des germes totaux à 30 °C pour les poudres de lait et de lactosérum.	Définition des germes totaux, principe, appareillage et verrerie, milieu de culture, diluant, préparation des dilutions, incubation des boîtes de Pétri, numération des colonies, expression des résultats.
JO n° 32 du 23 mai 2004	Arrêté du 27 mars 2004 rendant obligatoire une méthode de contrôle microbiologique pour le lait stérilisé.	Echantillonnage et préparation des échantillons, contrôle à effectuer avant incubation (sur au moins un des échantillons ou récipients), incubation, contrôles à effectuer après incubation, exigences imposées pour que l'échantillon puisse être reconnu satisfaisant, appréciation de la qualité d'un lot.
JO n° 32 du 23 mai 2004	Arrêté du 27 mars 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des organismes microbiens pour le lait fermenté.	Définition des organismes microbiens de contamination, principe de dénombrement, appareillage et verrerie, milieu de culture, diluant, mode opératoire, incubation, expression des résultats.

Année de publication	Référence	Aspects abordés
JO n° 43 du 4 juillet 2004	Arrêté du 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de recherche des staphylocoques à coagulase positive pour le lait en poudre	Principe, reconstitution du lait en poudre et préparation des dilutions, formules des milieux et directives pour leur préparation, mode opératoire
JO n° 70 du 7 novembre 2004	Arrêté du 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des coliformes pour les crèmes glacées et les glaces au lait.	Définition des coliformes, principe, appareillage et verrerie, milieu de culture, diluant, préparation des dilutions, incubation des boîtes de Pétri, numération des colonies, expression des résultats.
JORA n° 42 du 15 juin 2005	Arrêté du 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode d'analyse microbiologique du beurre.	Echantillonnage, préparation de l'échantillon pour essai, préparation de la phase aqueuse, dilution primaire, diluants et préparation des dilutions décimales, flores recherchées, expression des résultats.
JO n° 42 du 15 juin 2005	Arrêté du 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode de recherche des salmonella dans le lait et les produits laitiers.	Définition, préparation des milieux de cultures, pré-enrichissement dans un milieu liquide, enrichissement dans des milieux liquides sélectifs, isolement et identification, confirmation, expression des résultats.
JORA n° 03 du 18 janvier 2006	Arrêté du 25 septembre 2005 rendant obligatoire une méthode de recherche de <i>Listeria monocytogènes</i> dans le lait et les produits laitiers.	Définition de <i>Listeria monocytogènes</i> , principe, appareillage et verrerie, milieu de culture, diluant, préparation des dilutions, incubation des boîtes de Pétri, numération des colonies, expression des résultats.

3) Matériel et Méthodes

L'intégralité de notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie du CACQE de la wilaya de Jijel dans la période 03/01/2011 - 02/05/2011.

3.1. Matériel

3.1.1. Matériel biologique

Lors de la réalisation des différentes parties expérimentales, nous avons utilisé le matériel biologique suivant :

3.1.1.1. Yaourts probiotiques

Cinq échantillons de yaourts probiotiques fabriqués en Algérie (yaourt A – E) ont été collectés du supermarché Ben Souhali, Wilaya de Jijel. Nous avons sélectionné les yaourts dont l'étiquetage comporte des allégations de santé et mentionne explicitement le mot « probiotique ».

3.1.1.2. Lait écrémé

Pour la réhydratation et la culture des ferments lactiques industriels, le lait écrémé nous a été fourni par l'unité Tchinelait Candia de Bejaia.

3.1.1.3. Ferments industriels

Pour l'étude des propriétés probiotiques *in vitro* et l'évaluation de la viabilité, les ferments lactiques nous ont été fournis par la laiterie Igilait de Jijel. Nous avons utilisé dans notre étude deux souches probiotiques (LA-5 et LB-12) et une souche de *S. thermophilus* (ST-M6) couramment utilisée dans la fabrication des yaourts commercialisés en Algérie. Les ferments utilisés dans cette étude sont décrits dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Description des ferments lactiques industriels utilisés dans l'étude

<i>Fabricant</i>	<i>Appellation commerciale</i>	<i>Description</i>
Chr. Hansen	ST-M6	Mélange de souches pures thermophiles (<i>Streptococcus thermophilus</i>) Fourni dans l'emballage initial (voir Annexe 1), contenant 50 Unités sous forme lyophilisée
Chr. Hansen	LA-5 ^{®2}	Mélange de souches pures de <i>Lactobacillus acidophilus</i> Fourni dans des tubes d'échantillonnage sous forme lyophilisée (voir Annexe 1)
Chr. Hansen	LB-12	Mélange de souches pures de <i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i> Fourni dans l'emballage initial, contenant 50 Unités sous forme lyophilisée

3.1.1.4. Bactéries pathogènes

Un soucier de bactéries impliquées dans différentes infections, ayant comme origine les selles d'hommes et d'enfants, a été utilisé pour l'étude *in vitro* des interactions avec les ferments analysés. Il s'agit des genres et espèces suivantes : *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus* et *Helicobacter pylori*. Le soucier nous a été fourni par le laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Jijel.

Les milieux de culture, produits (chimiques et réactifs), matériels et appareillages utilisés dans la présente étude sont cités dans l'Annexe 2. La composition des milieux de culture est détaillée dans l'Annexe 3 et celle des réactifs chimiques utilisés, dans l'Annexe 4.

3.2. Méthodologie

Notre étude comprend deux parties principales :

- **Partie 1 :** Contrôle microbiologique et analyse des allégations santé figurant sur l'étiquetage de yaourts commercialisés sous le label « probiotique ».
- **Partie 2 :** Contrôle microbiologique et évaluation de la viabilité de trois échantillons de ferments collectés auprès d'une entreprise laitière algérienne. Les trois ferments sont utilisés pour fabriquer des yaourts probiotiques.

Les différents paramètres étudiés sont illustrés dans la Figure 4 ci-dessous.

² <http://www.chr-hansen.com/products/product-areas/probiotics-for-human-health/strains/la-5r.html>

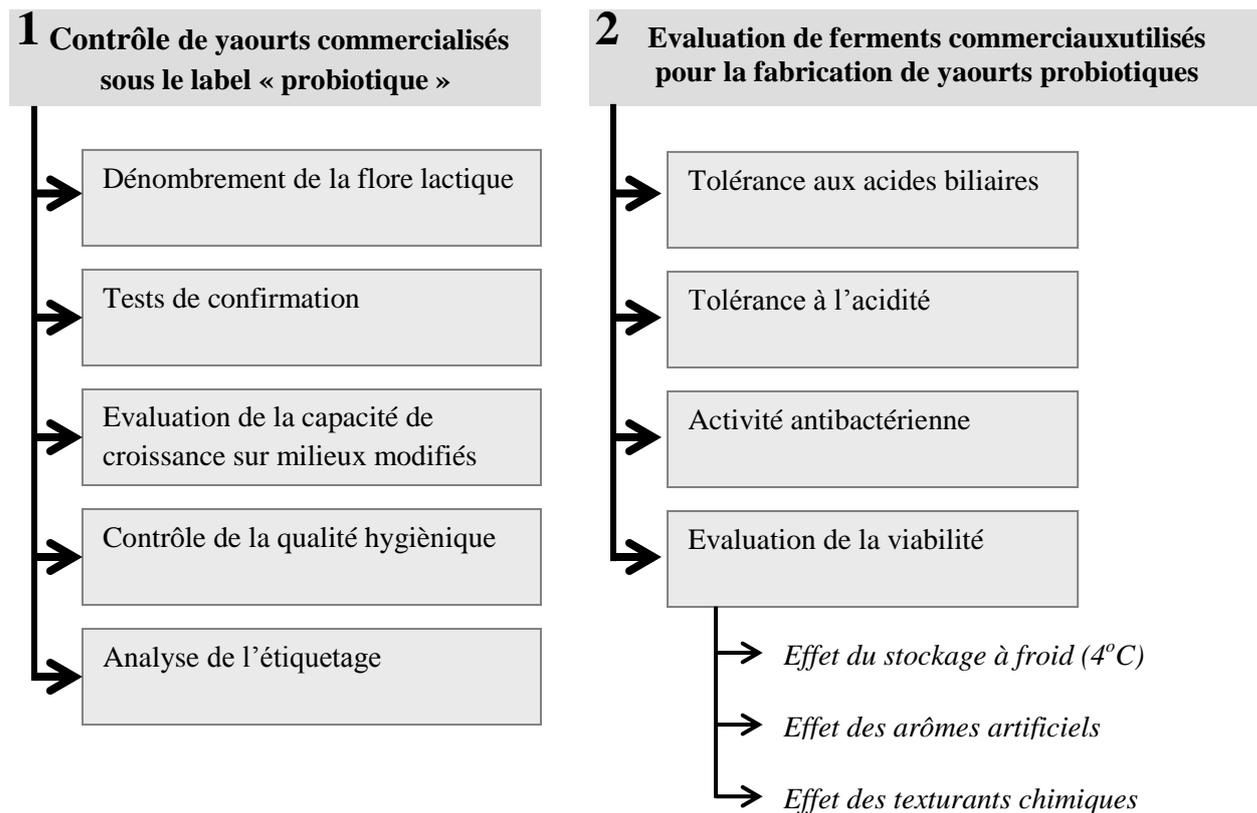


Figure 4 : Schéma représentant la méthodologie expérimentale adoptée dans la présente étude

3.2.1. Contrôle microbiologique de deux yaourts probiotiques commercialisés en Algérie

Deux yaourts probiotiques fabriqués en Algérie, codés A et B sont collectés durant la première semaine de leur production. Afin de définir les tests de contrôle de qualité à effectuer, nous avons contacté le fabricant pour obtenir des renseignements sur le procédé de fabrication ainsi que les espèces lactiques qui ont été incorporées dans le produit. Les espèces lactiques utilisées par les deux fabricants sont : *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus acidophilus* (l'Annexe 5 contient les informations taxonomiques de chacune de ces espèces). La composition des deux yaourts est comme suit :

- **Yaourt A :** Lait reconstitué partiellement écrémé, sucre, ferments lactiques (sélection de l'industrie), bifidus, arôme fraise.
- **Yaourt B :** Lait entier reconstitué, sucre, arôme fraise, ferments lactiques (sélection de l'industrie), Bifidobactérium.

3.2.1.1. Evaluation de l'effet du diluant

Afin de déterminer l'effet du diluant sur les résultats du dénombrement, nous avons utilisé deux diluants différents: l'eau peptonée tamponnée (0,1%) et le tryptone-sel. Ce choix est motivé par

le fait que le tryptone-sel et l'eau peptonée tamponnée (0,1%) sont destinés à la préparation des suspensions mères de laits en poudre et concentrés, de produits laitiers et yaourts, en vue de leur analyse microbiologique. Ils sont également utilisés pour effectuer les dilutions décimales puisqu'ils ont des propriétés qui favorisent la croissance³.

a. Préparation de la solution mère

Pour être capable d'analyser la microflore présente dans un yaourt, il faut agiter vigoureusement le yaourt avant de l'ouvrir pour le rendre le plus liquide possible. Après avoir mélangé vigoureusement le contenu de chaque échantillon de yaourt, nous avons pesé 10g. Le prélèvement est introduit aseptiquement à l'aide d'une spatule stérile dans un bécher contenant 90 ml du diluant, ainsi on obtient la solution mère. Après agitation manuelle, on prépare avec la solution mère une gamme de dilutions, par la technique des dilutions successives.

b. Dénombrement de la flore lactique

Nous nous sommes concentrés, dans notre analyse, sur les trois flores lactiques utilisées dans la fabrication des deux yaourts probiotiques A et B, telles que décrites par les fabricants de ces produits, à savoir : *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus acidophilus*. Avant d'entamer les techniques de dénombrement des flores lactiques, les échantillons à analyser doivent subir des dilutions décimales. Un millilitre de la solution mère dans 9 ml du diluant, homogénéiser, et ainsi de suite jusqu'à la dilution finale 10^{-9} (**Yeganehzad et al., 2007**). Nous avons effectué le dénombrement des colonies isolées à partir des deux yaourts probiotiques A et B pendant leur stockage à 4°C, en utilisant deux diluants : eau peptonée tamponnée stérile (0,1%) et le tryptone-sel (**Al-Otaibi, 2009**). La technique de l'ensemencement en masse est utilisée et les boîtes de Petri contenant entre 25 et 250 colonies lenticulaires sont énumérées (**Chougrani et al., 2008**). Les conditions expérimentales utilisées sont résumées dans le Tableau 5.

³ www.biokar-diagnostics.fr

Tableau 5: Conditions expérimentales utilisées pour le dénombrement de la flore lactique des yaourts probiotiques A et B

	<i>Milieu</i>	<i>Dilutions</i>	<i>Incubation</i>
<i>S. thermophilus</i>	Gélose M17	10 ⁻¹ - 10 ⁻⁹	37°C pendant 24 à 48h en aérobiose
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Gélose MRS à pH 5,4	10 ⁻¹ - 10 ⁻⁹	37°C pendant 48 à 72h en aérobiose
<i>L. acidophilus</i>	Gélose MRS	10 ⁻¹ - 10 ⁻⁹	37°C pendant 48 à 72h en aérobiose

Chaque expérience est indépendamment répétée trois fois. La moyenne arithmétique des trois boites Petri est calculée pour chaque dilution.

c. Calcul de la concentration de cellules viables

Le Log UFC/ml des colonies dénombrées (n) dans une boîte de Petriensemencée par une dilution dénombrable 10^{-x} (25 < n < 250) est calculé selon l'équation 1 :

$$\text{Log UFC/ml} = \text{Log} (n \times 1/10^{-x}) = \text{Log } C_{\text{UFC/ml}} \quad \text{[Equation 1]}$$

La concentration de cellules viables dans 1 g de yaourt ($C_{\text{UFC/g}}$) est calculée selon l'équation 2:

$$C_{\text{UFC/g}} = \frac{\sum C_{\text{UFC/ml}}}{\eta} \times C_{\text{g/ml}} \quad \text{[Equation 2]}$$

$C_{\text{UFC/ml}}$ est la concentration de cellules viables dénombrées par 1 ml de solution mère (voir Equation 1)

$C_{\text{g/ml}}$ est la concentration de la solution mère (= 0,11 g/ml)

η représente le nombre de dilutions dénombrables

3.2.1.2. Tests de confirmation

Après l'obtention des colonies homogènes, ces dernières sont soumises aux principaux tests d'identification qui sont les suivants : examens macroscopique et microscopique (coloration de Gram) et production de catalase (Bukola et Abidun, 2008).

a. Examen macroscopique

Ce test vise à apprécier la taille des colonies, leurs couleurs et leurs formes, si elles sont opaques ou translucides sur boîte de Petri.

b. Examen microscopique

L'examen microscopique est révélé par la coloration de Gram (voir Annexe 6 pour la méthode détaillée). Cette coloration permet la distinction de deux groupes majeurs de bactéries : à Gram positif et à Gram négatif et aussi entre les coques et les bâtonnets ainsi que le mode de regroupement (**Ahmed et Kanawal, 2004**).

c. Production de la catalase

La catalase est une enzyme qui permet la dégradation de l'eau oxygénée (H₂O₂) qui résulte de l'oxydation par l'O₂ de l'air, des électrons : e⁻, et des protons : H⁺, issus des voies d'oxydation directe, selon l'équation 3 :



[Equation 3]

On dépose sur une lame quelques gouttes de la suspension bactérienne puis on rajoute de l'H₂O₂. L'apparition d'un dégagement gazeux témoigne de la présence de la catalase dans le métabolisme bactérien (**Karem et Karem, 2005**).

3.2.1.3. Evaluation de milieux de culture modifiés pour l'énumération sélective de *L. acidophilus* en présence de *S. thermophilus* et *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*

a. Préparation des milieux de culture modifiés

Traditionnellement, les bactéries lactiques sont dénombrées dans la gélose MRS ou M17 pour les *S. thermophilus*. Cependant, ces milieux ne sont pas sélectifs pour le dénombrement des bactéries probiotiques ajoutées comme additifs dans les yaourts dits « probiotiques », en présence des autres bactéries lactiques utilisés comme levains dans tous les yaourts (*i.e. L. delbrueckii subsp bulgaricus* et *S. thermophilus*) (**Lima et al., 2009**). En effet, le yaourt contient un mélange de bactéries lactiques ayant différentes fonctions (*eg. texture, saveur, acidification etc.*). L'optimisation de conditions de culture appropriées pour le dénombrement direct des souches probiotiques ajoutées aux aliments fermentés tels que le yaourt pourrait contribuer à l'amélioration des techniques de contrôle de qualité des produits probiotiques (**Lima et al., 2009**). Le but de cette expérimentation était de comparer la capacité de croissance des bactéries

probiotiques additionnées aux yaourts probiotiques commercialisés en Algérie (*L. acidophilus*) et des bactéries utilisées dans tous les yaourts (*L. delbrueckii subsp bulgaricus* et *S. thermophilus*) sur des milieux de culture modifiés. Nous avons modifié les milieux de culture MRS et M17 par l'ajout de sels biliaires et la réduction du pH à 2,5 unités en ajoutant quelques gouttes de HCl. Il convient de noter que HCl pourrait modifier les propriétés de milieux utilisés et il aurait été préférable d'utiliser des solutions tampons ou des acides organiques. Cependant, nous n'avons pas réussi à nous procurer ces réactifs pendant la période où ce travail a été réalisé. La méthode de préparation des milieux de culture modifiés est présentée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Méthode de préparation des milieux de culture modifiés

Milieux de culture	Méthode de préparation
MRS agar à pH 2,5	A l'aide d'une pipette pasteur on ajoute quelques gouttes d'HCl (1M) au milieu de culture MRS agar, jusqu'à ce que le pH baisse vers environ 2,5-3.
BL-MRS agar à pH 2,5	On ajoute 1,25 g de sels biliaires à 250 ml du milieu de culture MRS agar à pH 2,5, pour obtenir une concentration finale de 0,5% de sels biliaires.
BL-MRS agar à pH 5,4	On ajoute 1,25 g de sels biliaires à 250 ml du milieu de culture MRS agar à pH 5,4, pour obtenir une concentration finale de 0,5% de sels biliaires.
M17 agar à pH 2,5	A l'aide d'une pipette pasteur on ajoute quelques gouttes d'HCl (1M) au milieu de culture M17 agar, jusqu'à ce que le pH baisse vers environ 2,5-3.
BL-M17 agar à pH 2,5	On ajoute 1,25 g de sels biliaires à 250 ml du milieu de culture M17 agar, pour obtenir une concentration finale de 0.5% de sels biliaires.

b. Evaluation de la capacité de croissance

- **Préparation de la solution mère:** A l'aide d'une spatule stérile on prélève aseptiquement 10g d'un yaourt probiotique, que l'on place dans 90 ml d'eau peptonée tamponnée (0,1%). On procède à l'homogénéisation de la solution mère avec le vortex.
- **Ensemencement :** Les boîtes de Petri sontensemencées en masse par 0,1 ml de la solution mère.
- **Incubation :** Les boîtes de Petri sont incubées à 37°C pendant 48 à 72h en aérobiose (**De Carvalho et al., 2009**).

La croissance sur les différents milieux modifiés est évaluée visuellement pour déterminer les milieux qui donnent une croissance visible (+) et ceux où aucune croissance n'a été détectée (-). Les colonies formées dans chaque boîte (n) ont été dénombrées en UFC/ ml de la solution mère selon l'équation 4 :

$$\text{Log UFC/ml} = \text{Log} (n \times 10) = \text{Log } C_{\text{UFC/ml}} \quad \text{[Equation 4]}$$

3.2.1.4. Contrôle de la qualité microbiologique des yaourts probiotiques

a. Dénombrement des coliformes totaux et coliformes thermotolérants

Le dénombrement est réalisé sur milieu solide (gélose au désoxycolate 0,1%) fondu et refroidi à 45 °C, par ensemencement en masse de 1 ml de la dilution 10^{-3} et incubation à 37°C pendant 24h pour les coliformes totaux, dilution 10^{-1} et incubation à 44°C pendant 24h pour les coliformes thermo-tolérants. On dénombre les colonies rouges (Lactose +) (**Guiraud, 1998**). L'expérience est indépendamment répétée trois fois.

b. Dénombrement de la flore fongique

Pour réaliser ce dénombrement, on ensemence deux boîtes de Petri contenant la gélose OGA, par 1 ml de la dilution 10^{-2} . Cette flore est dénombrée après 24h d'incubation à température ambiante (**Guiraud, 1998**). L'expérience est indépendamment répétée trois fois.

3.2.1.5. Evaluation de l'étiquetage des yaourts commercialisés sous le label « probiotique »

Nous avons examiné l'étiquetage des cinq yaourts A – E pour identifier les allégations qui y sont mentionnées ainsi que les informations sur la composition de ces yaourts.

3.2.2. Mise en évidence *in vitro* de quelques propriétés probiotiques dans les ferments commerciaux utilisés en Algérie

3.2.2.1. Préparation des cultures stock

Les échantillons de ferments lactiques *L. acidophilus* (LA-5), *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (LB-12) et *S. thermophilus* (ST-M6) (Chr. Hansen) nous ont été fournis sous forme lyophilisée (Direct Vat Set). Ils sont conservés à -20°C avant toute expérimentation (**Kacem et Kaid-Harche, 2008**). Les ferments lyophilisés sont immédiatement réhydratés par ensemencements à raison de 1% w/v dans du lait écrémé pré-stérilisé à 121°C pendant 15 min et incubés à 37°C

jusqu'à la coagulation du lait. Pour s'assurer d'obtenir des mono-cultures, 1 ml de chaque culture estensemencé par étalement sur milieu de culture solide : gélose MRS pour *L. acidophilus*, gélose M17 pour *S. thermophilus* et gélose MRS à pH (5,4) pour *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 72h (Oudina *et al.*, 1997). Les souches pures sont repiquées sur bouillons MRS (LA-5 et LB-12) et M17 (ST-M6) et conservées dans le réfrigérateur à 4°C (Badis *et al.*, 2003). Ces cultures représentent les cultures stock utilisées dans les différentes expériences.

Avant chaque expérience les cultures sont rajeunies par incubation dans les bouillons MRS (pour LA-5 et LB-12) et M17 (pour ST-M6) à 37°C pendant (18 à 24 h) pour obtenir des cultures en fin de phase exponentielle. En effet, d'après la littérature scientifique, 18 à 20 h d'incubation sont nécessaires pour atteindre la fin de la phase exponentielle, indiquée par l'apparition de trouble dans la suspension bactérienne qui témoigne de la présence d'une biomasse bactérienne.

3.2.2.2. *Résistance aux conditions gastro-intestinales simulées*

a. Tolérance aux conditions acides de l'estomac

Ce test a été réalisé selon la technique décrite par (Mosilhey, 2003 ; Kanam *et al.*, 2007 ; Izquierdo, 2009; Thirabunyanon *et al.*, 2009) et qui comporte les étapes suivantes :

- **Préparation des solutions acides simulées au pH de l'estomac humain** : des solutions d'eau distillée sont ajustées au pH 2 et 3 avec l'HCl 1 M. L'eau distillée au pH 6,8 est utilisée comme témoin. Les solutions sont préparées dans un volume de 250 ml, stérilisées et conservées à température ambiante avant leur utilisation (Figure 5). Par la suite, 1 ml de chaque culture lactique rajeunie est transféré dans 9 ml de chaque solution acide et les tubes sont incubés à 37°C pour les intervalles de temps 0, 60, 120 et 180 minutes afin de simuler la survie des espèces dans les conditions acides de l'estomac humain. Le dénombrement des cellules viables est ensuite effectué. Afin de ne pas perturber les conditions d'incubation, nous avons utilisé un tube indépendant pour chaque intervalle de temps.

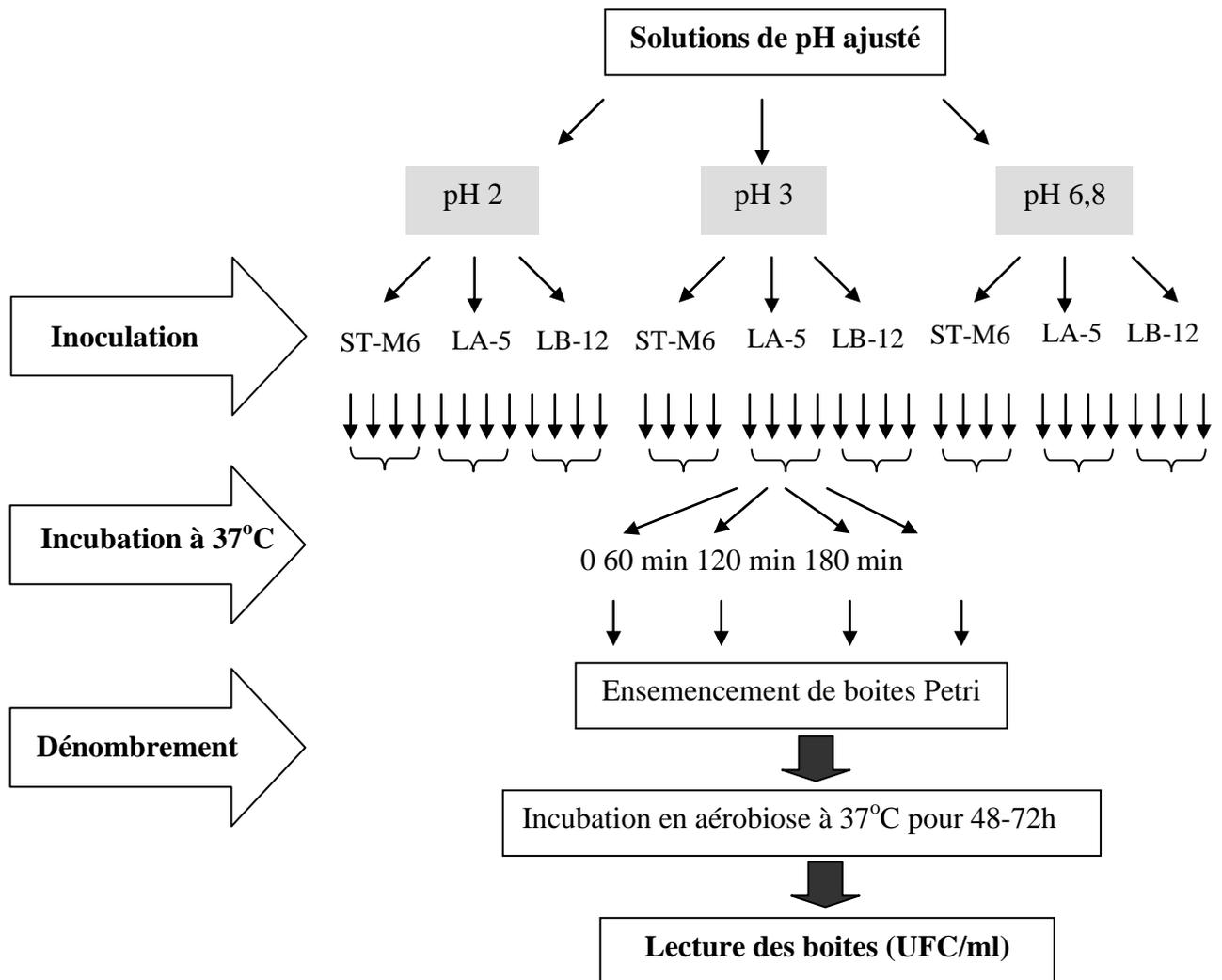


Figure 5 : Méthode pour déterminer l'effet du pH gastrique simulé sur la viabilité de *L. acidophilus* (LA-5); *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (LB-12) et *S. thermophilus* (ST-M6).

- **Enumération des cellules viables dans les solutions de pH gastrique simulé :** Pour dénombrer les cellules viables après chaque intervalle d'incubation dans les solutions acides, nous avons prélevé des aliquotes de 1 ml de chaque culture après le temps d'incubation prédéterminé et avons réalisé des dilutions en cascade jusqu'à 10^{-7} . Les dilutions sont ensemencés en masse sur la gélose MRS, M17 agar et MRS agar à pH 5,4. Les boîtes de Petri ainsi préparées sont incubées à 37°C pendant 48 à 72h. L'expérience est indépendamment répétée trois fois.

b. Résistance aux sels biliaires

La technique décrite par (Mosilhey, 2003 ; Vijendra et Prasad, 2005 ; Kotikalapudi, 2009; Thirabunyanon *et al.*, 2009) a été appliquée :

-
- **Préparation des solutions biliaires :** Une concentration de 0,5% de sels biliaires est préparée dans l'eau distillée. L'eau distillée sans sels biliaires est utilisée comme témoin. Les solutions sont préparées dans un volume de 250 ml, stérilisées et conservées à température ambiante avant leur utilisation. Le choix de la concentration de bile pour notre contrôle (0,5%) était basé sur sa concentration physiologique dans le duodénum (**Brashears *et al.*, 2003**). Par la suite, 1 ml de chaque culture lactique rajeunie est transféré dans 9 ml de la solution de sels biliaires (0,5%). Nous avons également préparé un tube témoin (T : sans sels biliaires). Les tubes sont incubés à 37°C pour 0 et 240 minutes avant la réalisation du dénombrement.
 - **Enumération des cellules viables dans les solutions de sels biliaires :** Nous avons prélevé 1 ml de chaque tube et préparé des dilutions en cascade jusqu'à 10⁶ dans le diluant approprié. Nous avons ensuite procédé à l'ensemencement dans les géloses MRS agar, M17 agar et MRS agar à pH 5,4 suivi d'incubation à 37°C pendant 48 à 72h.

3.2.2.3. *Activité antibactérienne*

Il s'agit d'étudier l'activité inhibitrice des ferments commerciaux analysés vis-à-vis de bactéries pathogènes. Pour mettre en évidence cette activité, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disque décrite par (**Schillinger et Lucke, 1989 et Thirabunyanon *et al.*, 2009**). Cette technique comporte les étapes suivantes :

- **Préparation de cultures jeunes de bactéries pathogènes :** Les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp*) ainsi que *Staphylococcus aureus* et *Helicobacter pylori* ont été rajeunies sur bouillon Luria Bertani après une incubation à 37°C pendant 24 heures. Pour *Helicobacter pylori* (anaérobies strictes), les tubes ont été bien fermés et recouverts de plusieurs couches de parafilm et bande adhésive afin de minimiser l'introduction d'air.
- **Préparation des cultures indicatrices :** Chaque tube contenant 15 ml de gélose Hektoen fondue et refroidie, est coulé en boîte de Petri et laissé prendre en masse. Chaque boîte gélosée reçoit 50µl d'une souche de bactéries pathogènes.
- **Application:** Chaque disque de papier Wattman stérile (de 5mm de diamètre) est imbibé par 20µl d'une culture rajeunie (voir section 3.2.2.1.) de ferments lactiques commerciaux, et déposé à la surface de la gélose contenant la souche indicatrice.
- **Lecture :** Après incubation des boîtes à 37°C pendant 24h, on mesure le diamètre des zones d'inhibition avec une règle. L'expérience est indépendamment répétée trois fois.

3.2.3. Evaluation de la viabilité des ferments commerciaux utilisés en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques

L'objectif de cette partie de l'étude était d'évaluer l'effet de la durée de conservation à 4°C, des arômes et des texturants sur la viabilité des souches probiotiques utilisées dans les yaourts probiotiques fabriqués en Algérie (LA-5, LB-12 et ST-M6). Afin d'éliminer l'effet des autres additifs et ne tenir compte que de celui du stockage à 4°C, nous avons procédé à la fabrication d'un échantillon de lait fermenté par inoculation avec les ferments industriels étudiés. Le lait fermenté représente la matrice alimentaire basique la plus proche du yaourt puisqu'il ne contient pas les additifs ajoutés au yaourt (produit fini). Il permet donc de simuler le yaourt pour effectuer des études de viabilité des souches bactériennes et c'est pour cette raison qu'il a été utilisé dans d'autres travaux scientifiques (**Riazi et Ziar, 2008**).

3.2.3.1. Influence du stockage frigorifique à 4°C sur la viabilité

- **Préparation du lait fermenté :** Des lots de 100 ml de lait écrémé et traité à 37°C pendant 10 min jusqu'à coagulation sont inoculés avec 5% w/v de chaque ferment, conformément au protocole d'inoculation utilisé en industrie (en général, le taux d'inoculation varie de 2 à 7%). Après 8h d'incubation à 37°C (coagulation), le lait fermenté est transféré à 4°C et conservé à cette température pour une durée totale de 28 jours. L'évaluation de la viabilité est effectuée juste après l'inoculation (nombre initial de cellules) et ensuite à 7 jours d'intervalle de stockage frigorifique (après 7, 14, 21 et 28 jours de stockage à 4 °C) (**Georgieva et al., 2009**).
- **Dénombrement des cellules viables :** Nous avons procédé à la préparation de la solution mère comme elle est décrite ci-dessus (voir section 3.2.1.1) : 10 g de lait fermenté par les différents levains sont homogénéisés dans 90 ml de diluant. Par la suite des dilutions décimales jusqu'à 10⁻⁷ sont réalisées en dissolvant 1 ml de chaque solution mère dans 9 ml de diluant (tryptone-sel pour *L. acidophilus* et *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, et l'eau peptonée tamponnée stérile (0,1%) pour *S. thermophilus*). Une aliquote de 1 ml de chaque dilution estensemencé en masse des géloses MRS agar pour *L. acidophilus*, M17 agar pour *S. thermophilus* et MRS agar à pH 5,4 pour *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Les boîtes de Petri sont incubées à 37°C pendant 48 à 72 heures en aérobiose (**Riazi et Ziar, 2008**).

La viabilité est calculée selon l'équation 5 (Ustunol et Gandhi, 2001) :

$$\text{Viabilité (\%)} = (\text{UFC après } n \text{ semaine(s) de stockage} / \text{UFC initial}) \times 100 \quad \text{[Equation 5]}$$

3.2.3.2. *Activité acidifiante*

Le processus d'acidification du yaourt dépend de l'activité symbiotique de *S. thermophilus* et *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. La capacité acidifiante de ces deux souches est déterminée par mesure du pH (Georgieva *et al.*, 2009) d'une solution de lait écrémé (100 ml) et stérilisé à 121°C pour 15 minutes, inoculée avec *S. thermophilus* (5% w/v) et *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (5% w/v). Le pH est déterminé à intervalles réguliers par immersion de l'électrode du pH-mètre dans les échantillons à température ambiante (Al-Otaibi, 2009). L'expérience est indépendamment répétée trois fois.

3.2.3.3. *Influence des arômes sur la viabilité*

Les arômes utilisés sont : la fraise 0,1 % v/v et 0,2 % v/v ; banane 0,1 % v/v et 0,2 % v/v et la vanille 0,14 %. Les concentrations choisies pour cette étude correspondent à celles utilisées dans l'industrie laitière algérienne. L'effet des arômes sur la viabilité des souches est déterminé par la croissance sur milieux liquides (bouillon MRS pour les Lactobacilles et M17 pour les Streptocoques) comme suit : 2% w/v de chaque ferment est inoculé dans des tubes tests contenant 3 ml de milieu de culture en plus des arômes avec les concentrations mentionnées. Un tube témoin contenant la culture microbienne sans arôme est utilisé comme référence. La viabilité des souches est mesurée par spectrophotomètre (600 nm) après incubation à 4°C pour 24 h en présence et absence des arômes. La viabilité elle est exprimée en pourcentage de densité optique par rapport à la référence (Equation 6) (Thirabunyanon *et al.*, 2009).

$$\% \text{ Cellules viables} = (\text{D.O. échantillon} / \text{D.O. témoin}) \times 100 \quad \text{[Equation 6]}$$

Les valeurs inférieures à 30% ou supérieures à 70% sont considérées comme inacceptable ou satisfaisante respectivement. Les valeurs entre ces deux limites sont considérées comme faibles (Vinderola *et al.*, 2002). L'expérience est indépendamment répétée trois fois.

3.2.3.4. *Influence des texturants sur la viabilité*

Nous avons pris en considération dans cette étude deux texturants utilisés dans la fabrication du yaourt : E414 (gomme arabique) et E1442 (phosphate de diamidon hydroxypropylé) avec des

concentrations de 0,1% w/v et 0,2% w/v respectivement. Ces concentrations correspondent aux valeurs utilisées par l'industrie algérienne. Leur effet sur la croissance des souches est évalué dans le bouillon MRS et M17, complétés par les texturants cités ci-dessus. Un volume de 2 ml du bouillon MRS et M17 est inoculé avec 10% w/v de chaque culture bactérienne (**Georgieva *et al.*, 2009**). Un tube témoin contenant la culture microbienne sans conservateur est utilisé comme référence. La viabilité des souches est mesurée par spectrophotomètre (600 nm) après 24 h d'incubation à 4°C en présence et absence des texturants. La viabilité est exprimée en pourcentage de densité optique par rapport au témoin selon l'équation 6 (**Vinderola *et al.*, 2002**). L'expérience est indépendamment répétée trois fois.

3.2.4. Méthodes d'analyse des données

L'analyse des données a été réalisée avec les logiciels SPSS (version 13.0) [SPSS Inc., France] et Excel 2007 [Microsoft Corporation, USA]. Les résultats obtenus ont été soumis au test de Student (test d'égalité des espérances observations paires) ainsi qu'à l'analyse de variance (ANOVA : Analyse de Variance à un Facteur). A $p < 0,05$, la différence est considérée significative.

Le test de Student pour observations paires sert à comparer les moyennes de deux populations. Il peut s'agir de comparer deux traitements, les données étant considérées comme des paires d'observations (première observation de la paire recevant le traitement 1 et deuxième observation recevant le traitement 2). L'objectif était de déterminer le diluant le plus adapté au dénombrement des bactéries lactiques probiotiques : eau peptonée tamponnée et le tryptone-sel. La procédure de l'analyse de variance ANOVA à un facteur permet d'effectuer une analyse de variance univariée sur une variable quantitative continue dépendante par une variable critère simple (indépendante). L'analyse de variance vise à optimiser des protocoles expérimentaux pour individualiser l'influence de différents facteurs sur un paramètre à mesurer. L'objectif était de déterminer s'il existe une différence significative entre les groupes de bactéries lactiques probiotiques ciblés par notre étude pour les facteurs : acidité, sels biliaries, stockage à 4°C, pH, arômes et texturants.

4) Résultats et Discussion

Tous les résultats bruts sont présentés dans l'Annexe 7 pour référence.

4.1. Contrôle de yaourts commercialisés sous le label « probiotique »

4.1.1. Effet du diluant sur le dénombrement de la flore lactique

4.1.1.1. Dénombrement de *S. thermophilus*

Les résultats obtenus lors du dénombrement de *S. thermophilus* dans deux yaourts probiotiques fabriqués en Algérie (A et B) stockés à 4°C, sur milieu solide (gélose M17 agar) et en utilisant deux diluants (eau peptonée tamponnée, tryptone-sel), pour chaque dilution dénombrable exprimés en log UFC/ml sont résumés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Concentrations de *S. thermophilus* dans deux yaourts probiotiques (A et B) fabriqués en Algérie, stockés à 4°C en utilisant le diluant eau peptonée tamponnée et le tryptone-sel, à 37°C en aérobiose.

Yaourt probiotique	Diluants	Dilutions dénombrables (log UFC/ml)				Moyenne (log UFC/ml)
		10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	T	
A	Eau peptonée tamponnée	6,9±0,1	7,8±0,2	8,5±0,1	absence	7,7±0,1
	Tryptone-sel	6,6±0,1	7,7±0,1	8,3±0,0	absence	7,5±0,1
B	Eau peptonée tamponnée	6,7±0,0	7,6±0,1	8,5±0,1	absence	7,6±0,1
	Tryptone-sel	6,8±0,1	7,6±0,0	8,1±0,0	absence	7,5±0,1

T : boîte témoin (gélose M17 nonensemencée).

Les moyennes ± écarts type de trois expériences indépendantes sont données.

Il ressort du Tableau 7 que l'intervalle des dilutions dénombrables de l'espèce *Streptococcus thermophilus* ($25 > \text{nombre des colonies} < 250$) dans le diluant eau peptonée tamponnée s'étale de la dilution 10⁻⁵ à 10⁻⁷ pour les deux yaourts probiotiques (A et B). Les dilutions inférieures à 10⁻⁵ sont non dénombrables suite à la formation d'un tapis microbien. D'autre part, les deux dilutions 10⁻⁸ et 10⁻⁹ sont non significatives avec un nombre de colonies inférieur à 25.

La gamme des dilutions dénombrables de *S. thermophilus* dans le diluant tryptone-sel est identique à celle enregistrée pour le diluant eau peptonée tamponnée. Cependant, la moyenne obtenue en utilisant l'eau peptonée tamponnée est supérieure à celle obtenue en utilisant le tryptone-sel et ce pour les deux yaourts.

Les résultats du test de Student montrent que la différence observée entre les résultats de dénombrement de *S. thermophilus* des yaourts A et B est statistiquement significative par rapport à la nature du diluant («Statistique t» = 1,73 > à 0,06 pour le yaourt A) et («Statistique t» = 0,57 > à 0,29 pour le yaourt B). Donc, le diluant eau peptonée tamponnée est le mieux adapté pour le dénombrement de l'espèce *Streptococcus thermophilus*.

4.1.1.2. Dénombrement de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*

Les résultats obtenus lors du dénombrement de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* dans deux yaourts probiotiques (A et B) fabriqués en Algérie, stockés à 4°C sur milieu solide (gélose MRS agar à pH 5,4) et en utilisant deux diluants (eau peptonée tamponnée, tryptone-sel), sont résumés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Concentrations de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* dans deux yaourts probiotiques (A et B) fabriqués en Algérie, stockés à 4°C en utilisant le diluant eau peptonée tamponnée et le tryptone-sel, à 37°C en aérobiose

Yaourt probiotique	Diluant	Dilutions dénombrables (log UFC/ml)						Moyenne (log UFC/ml)
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	T	
A	Tryptone-sel	Ind.	7,2±0,0	8,0±0,0	8,6±0,0	9,4±0,0	abs	8,3±0,0
	Eau peptonée tamponnée	6,2±0,0	6,9±0,2	8,0±0,0	8,7±0,0	9,4±0,0	abs	7,8±0,0
B	Tryptone-sel	Ind.	Ind.	7,9±0,1	8,5±0,1	NS	abs	8,2±0,1
	Eau peptonée tamponnée	6,0±0,0	6,90±0,0	7,6±0,0	8,5±0,0	NS	abs	7,3±0,0

T : Boîte témoin (gélose MRS agar à pH5.4 nonensemencée)

abs: Absence

NS : Non significatif < 25 ; Ind. : Indénombrable > 250

Les moyennes ± écarts type de trois expériences indépendantes sont données.

Les résultats représentés dans le Tableau 8 indiquent que les dilutions dénombrables de l'espèce *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (25 > nombre des colonies < 250) différent entre les deux échantillons de yaourts probiotiques en utilisant le diluant eau peptonée tamponnée.

Dans le cas du yaourt probiotique A : l'intervalle des dilutions dénombrables de l'espèce *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* est de 10⁻⁵ à 10⁻⁸ (tryptone-sel) et de 10⁻⁴ à 10⁻⁸ (eau peptonée tamponnée). Les dilutions inférieures à 10⁻⁵ sont indénombrables suite à la formation d'un tapis

microbien. D'autre part, la dilution 10^{-9} est non dénombrable avec un nombre de colonies inférieur à 25.

Dans le cas du yaourt probiotique B : l'intervalle des dilutions dénombrables de l'espèce *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* est de 10^{-6} à 10^{-7} (tryptone-sel) et 10^{-4} à 10^{-7} (eau peptonée tamponnée).

Les résultats du test de Student montrent que la différence observée entre les résultats de dénombrement de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* des yaourts A et B est statistiquement significative par rapport à la nature du diluant («Statistique t» = 0,74 > à 0,23 pour le yaourt A) et («Statistique t» = 3,32 > à 0,0034 pour le yaourt B). Donc, le diluant tryptone-sel est le mieux adapté pour le dénombrement de l'espèce *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

4.1.1.3. Dénombrement de *L. acidophilus*

Les résultats obtenus lors du dénombrement de *L. acidophilus* dans deux yaourts probiotiques (A et B) fabriqués en Algérie, stockés à 4°C, sur milieu solide (gélose MRS agar) et en utilisant deux diluants (eau peptonée tamponnée, tryptone-sel), sont résumés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Concentrations de *L. acidophilus* dans deux yaourts probiotiques (A et B) fabriqués en Algérie, stockés à 4°C en utilisant le diluant eau peptonée tamponnée et le tryptone-sel, à 37°C en aérobiose

Yaourt probiotique	Diluants	Dilutions dénombrables (log UFC/ml)					Moyenne (log UFC/ml)
		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	T	
A	Eau peptonée tamponnée	6,8±0,0	7,6±0,1	8,5±0,0	NS	abs	7,6±0,0
	Tryptone-sel	7,0±0,0	7,9±0,0	8,6±0,0	9,5±0,0	abs	8,2±0,0
B	Eau peptonée tamponnée	6,7±0,2	7,6±0,0	8,4±0,0	NS	abs	7,6±0,0
	Tryptone-sel	7,1±0,1	7,9±0,1	8,8±0,0	9,6±0,1	abs	8,4±0,0

T : Boîte témoin (gélose MRS agar nonensemencée)

abs: Absence

NS: Non significatif < 25

Les moyennes ± écarts type de trois expériences indépendantes sont données.

Il ressort du Tableau 9 que l'intervalle des dilutions dénombrables de l'espèce *L. acidophilus* dans le diluant eau peptonée tamponnée est entre 10^{-5} et 10^{-7} pour les deux yaourts probiotiques. La gamme des dilutions dénombrables de *L. acidophilus* en utilisant le diluant tryptone-sel est plus large que celle enregistrée pour le diluant eau peptonée tamponnée ; et cela en s'étalant de 10^{-5} à 10^{-8} pour les deux yaourts probiotiques A et B.

Les résultats du test de Student montrent que la différence observée entre les résultats de dénombrement de *L. acidophilus* des yaourts A et B est statistiquement significative par rapport à la nature du diluant («Statistique t» = 2,08 > à 0,03 pour le yaourt A) et («Statistique t» = 2,38 > à 0,018 pour le yaourt B). Donc, le diluant tryptone-sel est le mieux adapté pour le dénombrement de l'espèce *L. acidophilus*.

4.1.1.4. Tests de confirmation

Notre travail a ciblé les espèces de bactéries lactiques que les fabricants des yaourts analysés ont affirmé utiliser dans le procédé de fabrication des yaourts A et B (l'Annexe 8 contient un schéma illustrant le procédé de fabrication des yaourts analysés). Les aspects morphologiques des trois espèces de bactéries lactiques isolées sont résumés dans le Tableau 10 (voir l'Annexe 9 pour les photographies des colonies obtenues). Sur gélose M17 agar, il y a apparition de petites colonies bien isolées, distinctes d'une taille inférieure à 1mm, de couleur blanchâtre, crème, avec une forme lenticulaire. Sur gélose MRS agar à pH 5,4, il y a apparition de petites colonies, bien isolées, distinctes, de couleur blanchâtre, à pourtour régulier, surface lisse, certaines ont des formes circulaires et lenticulaires (convexe) avec un diamètre d'environ 1mm. Sur gélose MRS agar, il y a apparition de petites colonies, bien isolées, distinctes, de couleur blanchâtre, forme ronde et avec un diamètre compris entre 1-2 mm.

Les résultats ont montré que toute la collection est à catalase négative (pas d'apparition des bulles d'air). Après coloration de Gram, les observations microscopiques révèlent que toutes les bactéries retiennent la couleur violette, ce qui tend à confirmer l'appartenance aux bactéries lactiques. Ces observations microscopiques ont permis aussi de déterminer la forme et le mode de regroupement :

- Des coques disposées en pair et surtout en chaînes (*S. thermophilus*).
- Des bâtonnets courts (*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*).
- Des bâtonnets disposés en chaînes plus ou moins longues (*L. acidophilus*).

Tableau 10 : Principaux caractères de la collection lactique

Aspect macroscopique		Coloration de Gram	Aspect microscopique	Test de catalase
<i>S. thermophilus</i>	Forme : Lenticulaire Couleur : Blanchâtre, crème Diamètre : Petites colonies, difficile à mesurer (inférieur à 1 mm)	+	Coques disposés en paires et surtout en chaînes	-
<i>L. bulgaricus</i>	Forme : Circulaire, lenticulaire Couleur : Blanchâtre Diamètre : 1 mm	+	Bâtonnets courts	-
<i>L. acidophilus</i>	Forme : Ronde Couleur : Blanchâtre Diamètre : 1-2 mm	+	Bâtonnets disposés en chaînes plus ou moins longues	-

4.1.1.5. Evaluation de la capacité de croissance sur des milieux modifiés

Le développement de milieux de culture qui peuvent discriminer entre les souches probiotiques et la flore lactique présente habituellement dans le yaourt (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*) est un aspect important pour le dénombrement fiable des souches probiotiques dans le yaourt. L'objectif de cette expérimentation était de comparer les capacités de croissance de *S. thermophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* et *L. acidophilus*, présentes dans un yaourt probiotique produit en Algérie, sur des milieux modifiés pour favoriser la croissance des souches probiotiques. Les résultats obtenus en utilisant cinq milieux de cultures modifiés sont résumés dans le Tableau 11.

D'après les résultats obtenus dans le Tableau 11, les trois espèces lactiques (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* et *L. acidophilus*) isolées des yaourts A et B sont capables de croître sur les milieux modifiés testés. Le milieu BL-MRS agar à pH 2,5 est le seul milieu parmi les milieux modifiés testés qui a démontré un potentiel de discrimination entre *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (-) et *L. acidophilus* (+). Les deux espèces sont par ailleurs capables de pousser sur les milieux MRS agar à pH 2,5 et BL-MRS agar à pH 5,4. Pour ce qui est de *S. thermophilus*, nos résultats ont démontré que le milieu M17 est sélectif par rapport à cette espèce. Nous avons observé une croissance de *S. thermophilus* sur le milieu M17 acidifié M17 agar à pH 2,5 et M17 acidifié et additionné de sels biliaires BL-M17 à pH 2,5.

Tableau 11: Croissance de *S. thermophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* et *L. acidophilus* dans cinq milieux de cultures modifiés, à 37°C en aérobiose

Milieux de culture	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>L. acidophilus</i>
MRS agar à pH 2,5	-	+	+
BL-MRS agar à pH 2,5	-	-	+
BL-MRS agar à pH 5,4	-	+	+
M17 agar à pH 2,5	+	-	-
BL-M17 agar à pH 2,5	+	-	-

MRS, MRS agar, M17, M17 agar, BL, sels biliaries

+ : croissance visible ; - : absence de croissance visible.

4.1.1.6. Contrôle de qualité microbiologique de deux yaourts probiotiques (A et B)

Les résultats représentés dans le Tableau 12 montrent l'absence des germes d'altérations dans les yaourts A et B analysés.

Tableau 12 : Résultats du contrôle de qualité microbiologique de deux yaourts probiotiques (A et B)

Germes d'altérations	Yaourt probiotique A	Yaourt probiotique B	Norme algérienne
Coliformes totaux (dilution 10^{-3})	0	0	10/ml
Coliformes thermotolérants (dilution 10^{-1})	0	0	1/ml
Flore fongique (dilution 10^{-2})	Absence	Absence	Absence

Les résultats résumés dans le Tableau 12 démontrent que les deux yaourts probiotiques sont de très bonne qualité microbiologique. L'absence des contaminants signes de contamination fécale est liée à la bonne pratique d'hygiène au niveau des yaourteries, au respect du processus technologique notamment la pasteurisation et la stérilisation du lait qui sont suffisants pour détruire les microorganismes non sporulés pathogènes ou non, et au rôle inhibiteur qu'exercent les bactéries lactiques envers les différentes flores par le biais de leurs produits métaboliques à savoir l'acide lactique (pH inférieur ou égal à 4) qui rend le milieu hostile pour la plupart des bactéries indésirables.

4.1.1.7. Analyse de l'étiquetage de yaourts commercialisés en Algérie sous le label

« probiotique »

Les allégations de santé qui figurent sur les étiquettes des produits alimentaires jouent un rôle crucial dans l'information des consommateurs et peuvent influencer leurs décisions d'achat. Les informations qui figurent sur l'étiquetage de cinq yaourts, commercialisés en Algérie sous le label « probiotique », sont présentées dans le Tableau 13.

Tableau 13: Informations figurant sur l'étiquetage d'une sélection de yaourts commercialisés en Algérie sous le label « probiotique »

Produit	Composition	Poids net	Conservation	Allégations
<i>Yaourt A</i>	Lait reconstitué partiellement écrémé, sucre, ferments lactiques, bifidus, arôme	110g	4°C – 6°C	« صحي و لذيذ » <i>(Bénéfique pour la santé et délicieux)</i>
<i>Yaourt B</i>	Lait entier reconstitué, sucre, arôme, ferments lactiques (sélection de l'industrie), Bifidobactérium	100g	6°C	<i>Bifidus</i> , ferments lactiques, contribuent à l'équilibre de notre flore intestinale et à réguler le transit dans les 2 semaines.
<i>Yaourt C</i>	Lait reconstitué partiellement écrémé, sucre, préparation aux fruits, E1442, ferments lactiques, Bifidobactérium	100g	2°C – 6°C	Facilite le transit.
<i>Yaourt D</i>	Lait écrémé reconstitué, sucre, matière grasse, E414, arôme vanille, ferments [Marque du fabricant] au <i>Bifidus actiregularis</i> TM	100g	2°C – 6°C	Aide à combattre les sensations de ballonnement, le seul prouvé scientifiquement.
<i>Yaourt E</i>	Lait écrémé reconstitué, sucre, matière grasse, protéine du lait, arôme vanille, caramel, ferments [Marque du fabricant] au <i>Bifidus actiregularis</i> TM	95ml	2°C – 6°C	Aide à combattre les sensations de ballonnement, le seul prouvé scientifiquement.

Nous constatons que les allégations mentionnées sur les yaourts probiotiques examinés sont toutes de type A : allégations qui se réfèrent à une contribution positive pour la santé, à l'amélioration d'une fonction ou à une modification ou une préservation de la santé. Toutes les allégations se réfèrent à l'amélioration de l'équilibre gastro-intestinal mais les formulations diffèrent d'un produit à l'autre et certaines sont vagues (eg. le yaourt A). Certaines étiquettes

comportent des détails spécifiques. Par exemple, le yaourt B précise un délai de 2 semaines pour l'aboutissement de l'action probiotique. Les yaourts D et E spécifient que leurs allégations sont 'prouvées scientifiquement', ce qui sous-entend que les allégations des concurrents ne le sont pas.

Pour ce qui est des informations relatives à la composition des yaourts A – E, nous constatons que certaines étiquettes ne spécifient pas la souche probiotique utilisée (yaourts A – C). En outre, aucune des étiquettes ne précisent le nombre de cellules viables présentes dans le yaourt. La concentration de cellules viables est un paramètre important puisque les effets probiotiques dépendent de la concentration des bactéries probiotiques qui est livrée à l'organisme.

4.2. Evaluation de ferments commerciaux utilisés pour la fabrication de yaourts probiotiques

4.2.1. Mise en évidence *in vitro* de quelques propriétés probiotiques

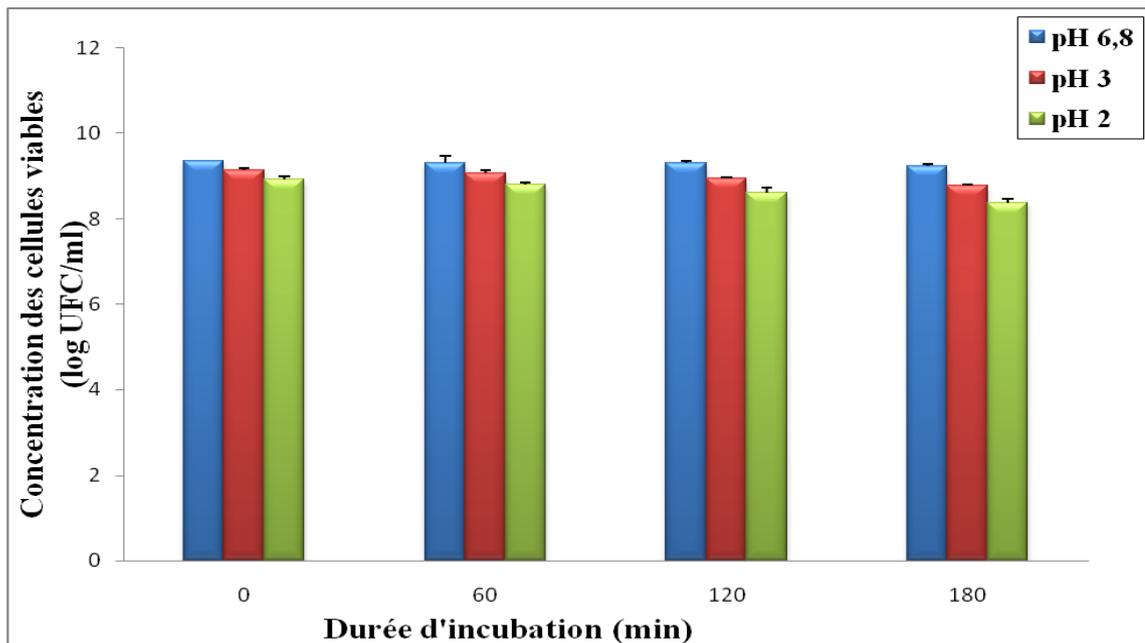
4.2.1.1. Résistance aux conditions acides de l'estomac

L'une des conditions principales pour qu'une souche puisse répondre à la définition de « probiotique » est qu'elle doit être viable de la production à la consommation et pendant le transit gastro-intestinal. Avant de pouvoir adhérer et s'installer, même de façon transitoire, les bactéries probiotiques doivent survivre au passage par l'estomac. Afin de déterminer cette capacité de survie chez les souches LA-5, LB-12 et ST-M6, l'effet de l'exposition à un milieu acide sur ces bactéries a été examiné. Ces dernières ont été exposées à des pH acides 2 et 3 et pH 6,8 comme contrôle pendant 180 minutes, ensuite la proportion de cellules viables a été évaluée par dénombrement dans des boîtes de gélose. D'après les résultats obtenus, la concentration des cellules viables a diminué pour les deux pH acides 2 et 3 avec la progression du temps au cours de l'incubation par rapport au contrôle pH 6,8.

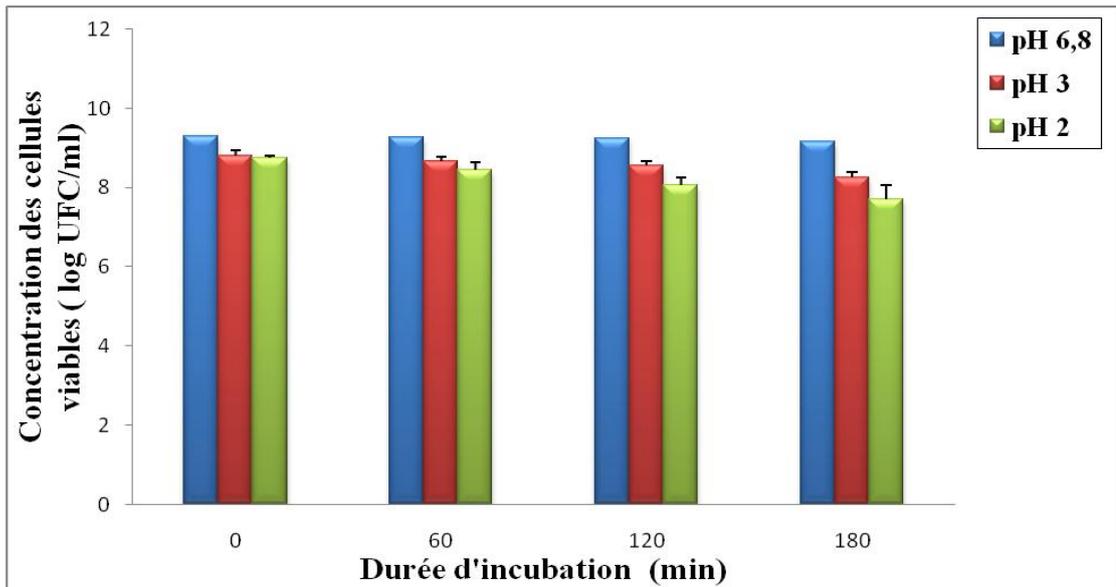
En ce qui concerne LA-5 (voir Figure 6(a)), à pH 3, le nombre initial de cellules viables est de $9,1 \pm 0,0$ log UFC /ml et, après 180 minutes d'incubation, le nombre de cellules viables chute à $8,8 \pm 0,0$ log UFC/ml, ce qui représente une diminution de 0,4 log. D'autre part, l'incubation à pH 2 produit une réduction de 0,6 log, avec $8,9 \pm 0,1$ log UFC /ml à t_0 et $8,4 \pm 0,1$ log UFC /ml après 180 minutes d'incubation. La culture contrôle (pH 6,8) a enregistré un nombre de cellules viables de $9,2 \pm 0,0$ log UFC /ml après 180 minutes d'incubation, ce qui correspond à une réduction de 0,1 log par rapport au nombre initial à t_0 .

Concernant LB-12 (voir Figure 6(b)), le nombre initial de cellules viables à pH 3 est de $8,8 \pm 0,1$ log UFC/ml et de $8,2 \pm 0,1$ log UFC/ml après 180 minutes d'incubation. D'autre part, l'incubation à pH 2 produit un nombre total de cellules viables de $8,7 \pm 0,0$ log UFC/ml à t_0 et $7,7 \pm 0,1$ log UFC/ml après 180 minutes d'incubation. La réduction de la capacité de croissance est de 0,6 log à pH 3 et 0,9 log à pH 2. Cependant la réduction de la capacité de croissance pour la culture contrôle (pH 6,8) est faible (0,2 log).

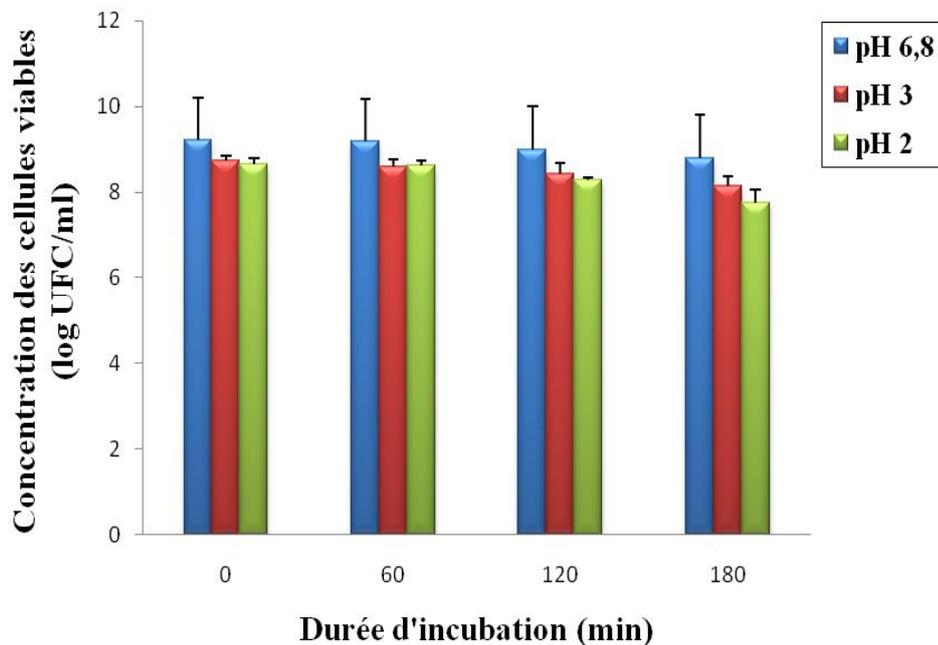
Pour ST-M6 (voir Figure 6(c)), à pH 3 le nombre initial de cellules viables est de $8,7 \pm 0,1$ log UFC/ml et, après 180 minutes d'incubation, $8,2 \pm 0,2$ log UFC/ml. Ce qui représente une diminution de la capacité de croissance de 0,6 log. D'autre part, l'incubation à pH 2 produit une réduction des UFC/ml de 0,6 log, avec $8,6 \pm 0,1$ log UFC/ml à t_0 et $8,0 \pm 0,1$ log UFC/ml après 180 minutes d'incubation. La culture contrôle (pH 6,8) a enregistré un nombre de cellules viables de $8,8 \pm 0,5$ log UFC/ml après 180 minutes d'incubation, correspondant à une réduction de 0,4 log.



(a)



(b)



(c)

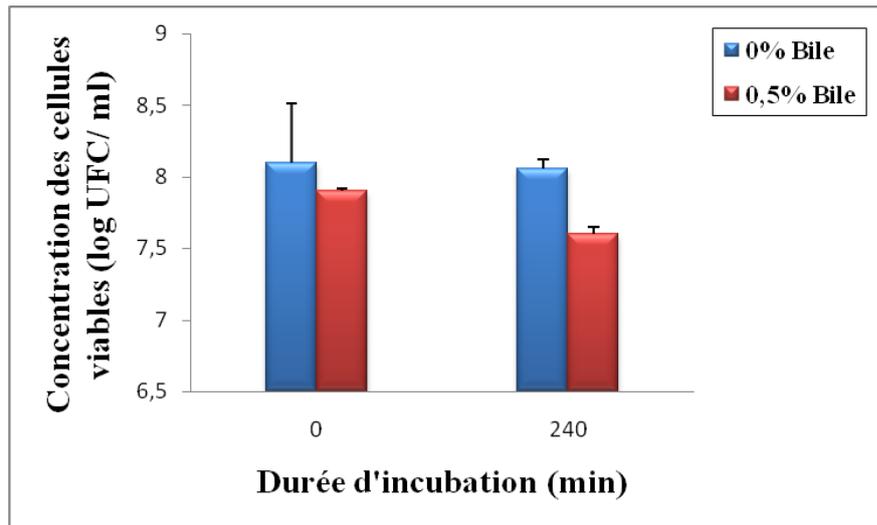
Figure 6: Résistance aux pH acides (2,0 et 3,0) des ferments commerciaux utilisés en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, pendant 180 min d'incubation à 37 °C: (a) LA-5, (b) LB-12 et (c) ST-M6. Des témoins incubés au pH 6,8 ont été utilisés comme référence. Les barres verticales représentent les écart-types de trois expériences indépendantes.

Les résultats du test ANOVA démontrent que la résistance aux conditions acides de LA-5, LB-12 et ST-M6 étudiées est significativement différente, à chaque pH testé (Sig = 0,005 < 0,05) pour le pH 3 et (Sig = 0,036 < 0,05) pour le pH 2.

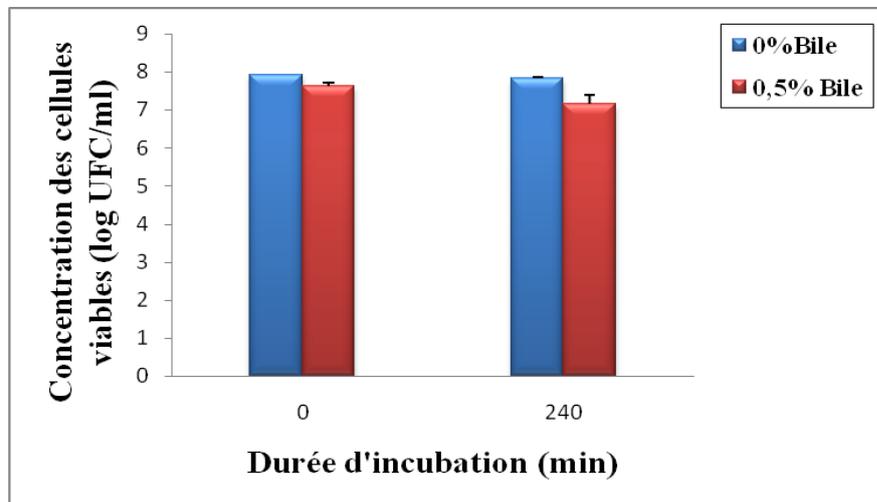
4.2.1.2. Résistance aux sels biliaries

La résistance de LA-5, LB-12 et ST-M6 en présence de bile a été également testée. Ces souches ont été exposées à 0,5% de bile pendant 240 minutes et ensuite la proportion de cellules viables a été évaluée par dénombrement sur des boîtes de gélose (Figure 7).

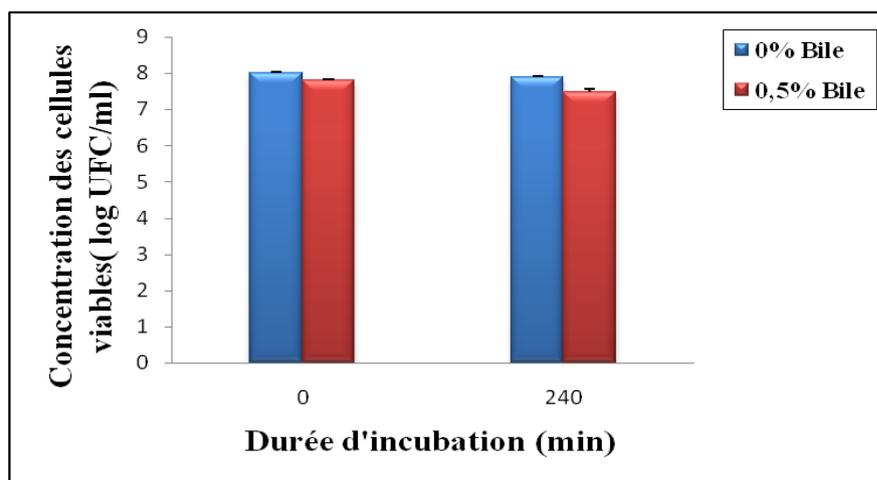
D'après les résultats présentés dans la Figure 7, il apparaît que les souches LA-5, LB-12 et ST-M6 possèdent une résistance aux sels biliaries avec une réduction de 0,3 log (ST-M6 et LA-5) et de 0,5 log (LB-12), après 240 minutes d'incubation dans une solution contenant 0,5% de sels biliaries. En l'absence de sels biliaries, la diminution de la capacité de croissance est négligeable pour les trois souches (variant de 0,0 à 0,1 log).



(a)



(b)



(c)

Figure 7 : Résistance des ferments commerciaux, utilisés en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, aux sels biliaires (0,5%) pendant 240 min d'incubation à 37°C : (a) LA-5, (b) LB-12 et (c) ST-M6. Les barres verticales représentent les écart-types de trois expériences indépendantes.

Les résultats du test ANOVA démontrent que la résistance à la bile de LA-5, LB-12 et ST-M6, étudiées à une concentration de 0,5% de sels biliaires est significativement différente, (Sig = 0,021 < 0,05).

4.2.1.3. *Activité antimicrobienne*

Ce test permet de mettre en évidence les caractéristiques que possèdent certaines souches de bactéries lactiques à simuler ou inhiber d'autres souches une fois mises en contact. Les résultats relatifs à ce test sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14: Activité antagoniste de LA-5, LB-12 et ST-M6 sur les bactéries pathogènes

Souches	Zone d'inhibition (mm)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella spp</i>
LA-5	8±2	11±2	13±2	7±2
LB-12	9±2	8±2	12±2	8±1
ST-M6	10±2	12±2	14±1	9±2

Les moyennes ± écarts type de trois expériences indépendantes sont données.

Il est clair d'après les résultats que les souches étudiées manifestent un antagonisme prononcé vis-à-vis des bactéries pathogènes dont on a pu distinguer :

- La présence des zones d'inhibition qui est le résultat d'un hétéro antagonisme exercé par les bactéries lactiques envers les souches pathogènes. Les diamètres des zones d'inhibition étaient entre 7±2 à 13±2 mm pour LA-5, 8±1 à 12±2 mm pour LB-12 et 9±2 à 14±1 mm pour ST-M6.
- L'absence des zones d'inhibition, qui est le résultat d'une interaction positive qui s'exprime par la stimulation de la croissance des souches mises en contact, n'a pas été observée.

4.2.2. Evaluation de la viabilité sous différentes conditions de conservation

4.2.2.1. Influence de la conservation à 4 °C

a. Viabilité pendant la période de stockage à 4°C

Une propriété très importante des cultures destinées à être utilisées comme probiotiques est qu'elles doivent demeurer viables pendant le stockage avant la consommation. Toutefois, de telles cultures alimentaires ne joueront pas un rôle efficace dans les produits biologiques, sauf si elles sont présentes en un nombre suffisant de cellules viables au moment de la consommation. Pour cette raison, tout changement dans la population de bactéries viables pendant la durée de vie prévue du produit en question devrait être connu. Dans notre étude, la viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6, a été évaluée pendant une durée de stockage de 28j à 4°C. La période de 28j est la période au cours de laquelle la sécurité microbiologique et la salubrité des produits laitiers fermentés sont maintenues pour une température de stockage précise, d'autre part c'est la durée de vie des produits laitiers fermentés de la date de fabrication jusqu'à la date de péremption dans l'industrie laitière algérienne.

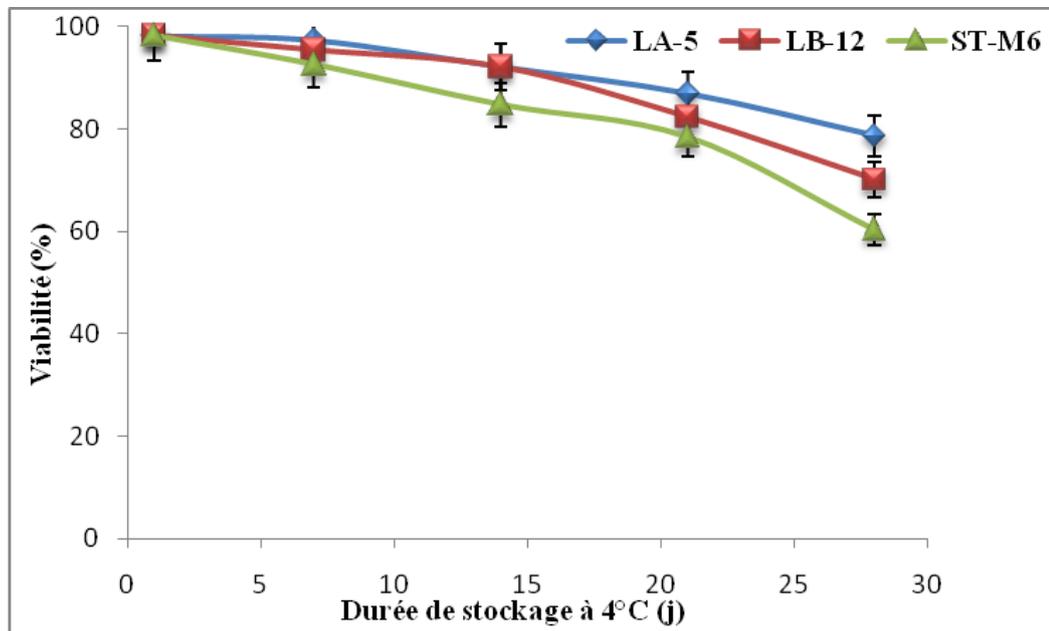


Figure 8: Viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6, utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, pendant 28 jours de stockage à 4°C.

D'après les résultats obtenus dans la Figure 8, il apparaît que la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 dans le lait fermenté décroît graduellement durant la période de stockage réfrigéré. Après 1j de stockage, la viabilité enregistrée pour les trois souches est à son maximum en dépassant 98% de cellules viables, ce qui correspond à $> 8 \log$ UFC/ml. Après une semaine de stockage à 4°C, LA-5 enregistre le plus grand pourcentage de cellules viables (97,2%) comparé à LB-12 (95,4%) et ST-M6 (92,6%). Au 14^{ème} jour, le pourcentage de cellules viables de LA-5 et LB-12 est similaire avec 92,1%, cependant il est nettement différent de celui de ST-M6 qui n'atteint pas les 85% (84,8%). En arrivant à la dernière semaine de stockage réfrigéré (21^{ème} jour), la viabilité des deux lactobacilles dépassent 80% (avec 86,9% pour LA-5 et 82,3% pour LB-12), tandis que ST-M6 a enregistré 78,5%. Au dernier jour de la période de stockage réfrigéré (28^{ème} jour), la viabilité est de 78,7% pour LA-5, 70,1% pour LB-12 et 60,3% pour ST-M6. Après 28 jours de stockage réfrigéré à 4°C, la réduction de cellules viables est de 0,1 log pour LA-5, 0,2 log pour LB-12 et 0,2 log pour ST-M6.

Les résultats du test ANOVA démontrent que les viabilités de LA-5, LB-12 et ST-M6 étudiées à 4°C sont significativement différentes d'une souche à une autre, (Sig = 0,017 < 0,05) pour 1j, (Sig = 0,017 < 0,05) pour 7j, (Sig = 0,001 < 0,05) pour 1j4, (Sig = 0,011 < 0,05) pour 21j et (Sig = 0,001 < 0,05) pour 28j.

b. Variation du pH pendant la période de stockage à 4°C

La Figure 9 comprend les résultats de la variation du pH du lait fermenté inoculé de ferments commerciaux utilisés en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, durant la période de stockage réfrigéré à 4°C.

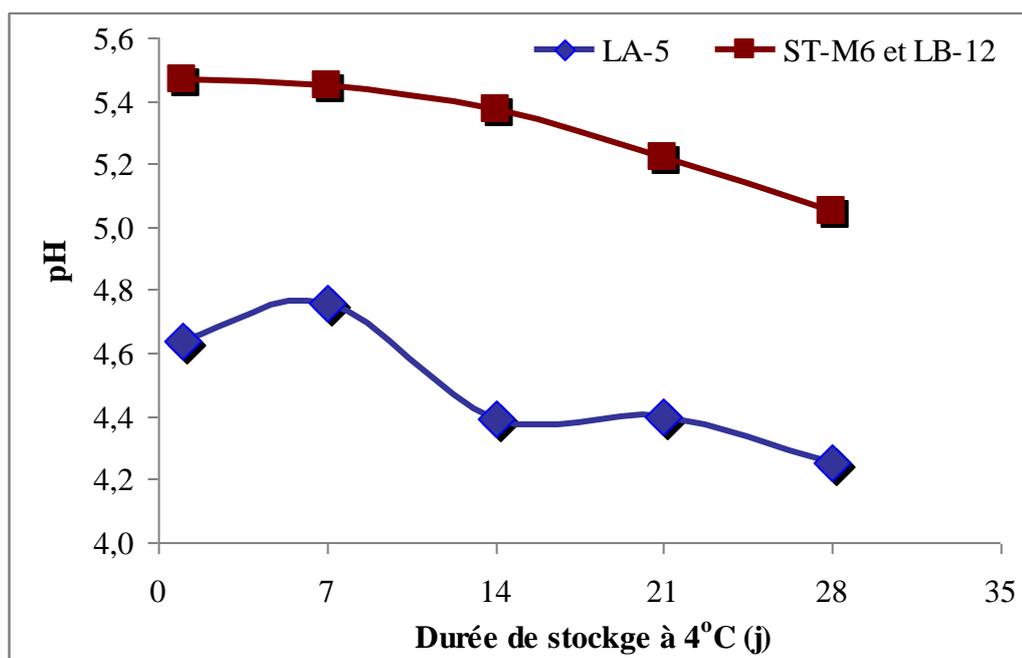


Figure 9: Changement du pH du lait fermenté inoculé de LA-5, LB-12 et ST-M6, utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, pendant le stockage à 4°C.

Le pH initial du lait fermenté inoculé de LA-5 était 4,6 et le pH initial du lait fermenté inoculé d'un mix de souches pures de LB-12 et ST-M6 (1 :1) était 5,5. Nous avons observé que le pH décroît graduellement du premier jour jusqu'à la fin de la période de stockage (voir Figure 8) et ce pour les deux lots de lait fermenté. Les résultats du test ANOVA démontrent que la différence de pH est significative durant toute la période de stockage (Sig = 0,000 < 0,05).

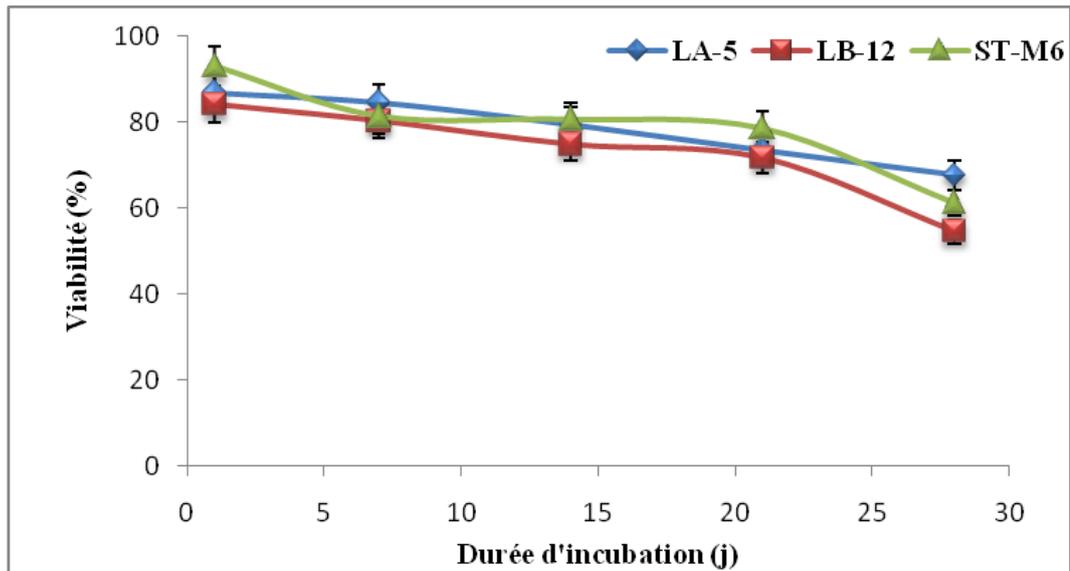
4.2.2.2. Influence des arômes sur la viabilité

a. Arôme banane

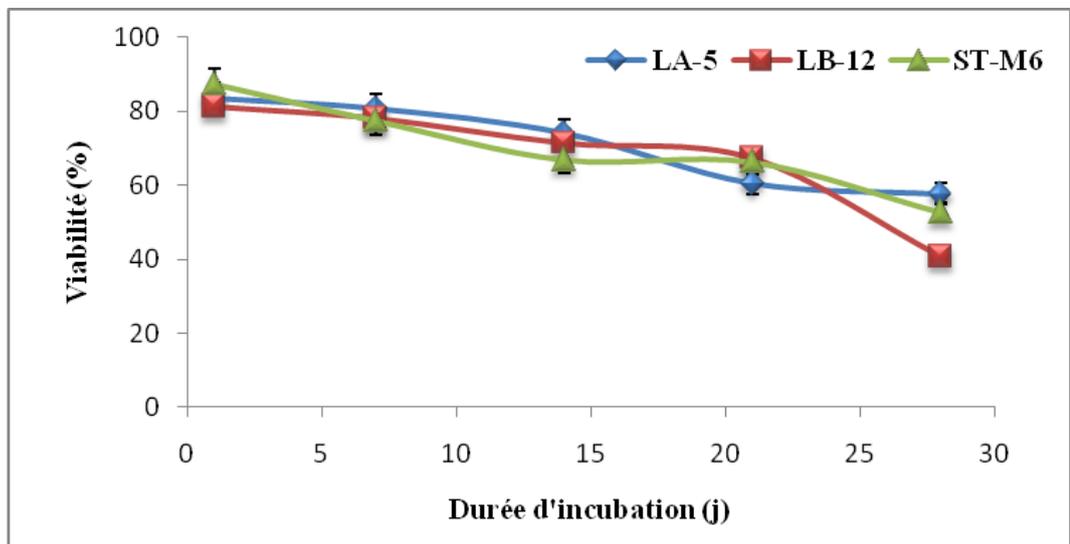
La Figure 10 comprend les résultats de l'évaluation de la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 en présence de l'arôme banane utilisé dans l'industrie laitière.

Les résultats obtenus indiquent que la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 est affectée par la présence de l'arôme banane. La viabilité des trois souches en présence de 0,1% d'arôme banane est considérée comme satisfaisante jusqu'au 21j (> 70%): 73,4±1,6%, 71,6±0,4% et 78,5±0,5% respectivement. Par contre, cette dernière est faible (30% < cellules viables < 70%) au 28j avec 67,6±1,8%, 54,5 ±1,3% et 61,2±1,0% respectivement.

En présence de 0,2% d'arôme banane, la viabilité de LA-5 et LB-12 est considérée comme satisfaisante jusqu'au 14j ($74,1\pm 0,7\%$ et $71,5\pm 0,5\%$), et faible au 21j et 28j avec $60,5\pm 1,1\%$ et $57,6\pm 0,8\%$ pour LA-5 et $67,4\pm 0,6\%$ et $40,8\pm 0,7\%$ pour LB-12. Cependant, pour la même concentration, ST-M6 a enregistré une viabilité satisfaisante seulement au 7j avec $77,3\pm 0,7\%$. Aux 14j, 21j et 28j, la viabilité est considérée comme faible avec $66,8\pm 0,8\%$, $66,2\pm 0,8\%$ et $52,7\pm 0,7\%$ respectivement.



(a)



(b)

Figure 10: Viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6, utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, en présence de : (a) 0,1% et (b) 0,2% d'arôme banane. Les échantillons étaient incubés à 4°C pour 24h.

Les résultats du test ANOVA démontrent que l'effet de l'arôme banane sur la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 est significativement différent d'une souche à une autre, à chaque concentration testée :

A 0,1% d'arôme banane : (Sig = 0,001 < 0,05) pour 1j, (Sig = 0,000 < 0,05) pour 7j, 14j, 21j et 28j.

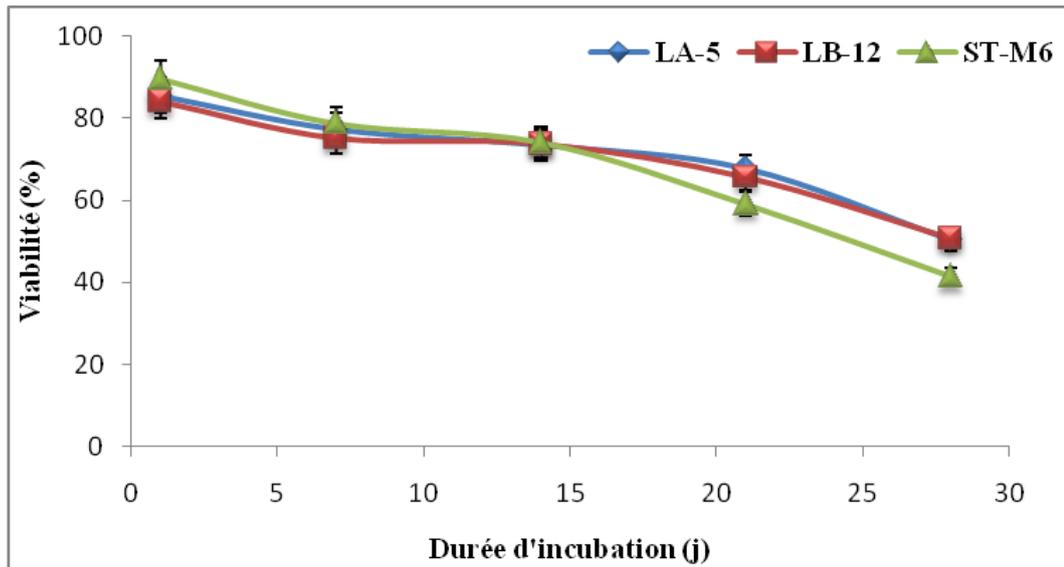
A 0,2% d'arôme banane : (Sig = 0,000 < 0,05) pour 1j, (Sig = 0,027 < 0,05) pour 7j, (Sig = 0,03 < 0,05) pour 14j, (Sig = 0,000 < 0,05) pour 21j et 28j.

b. Arôme fraise

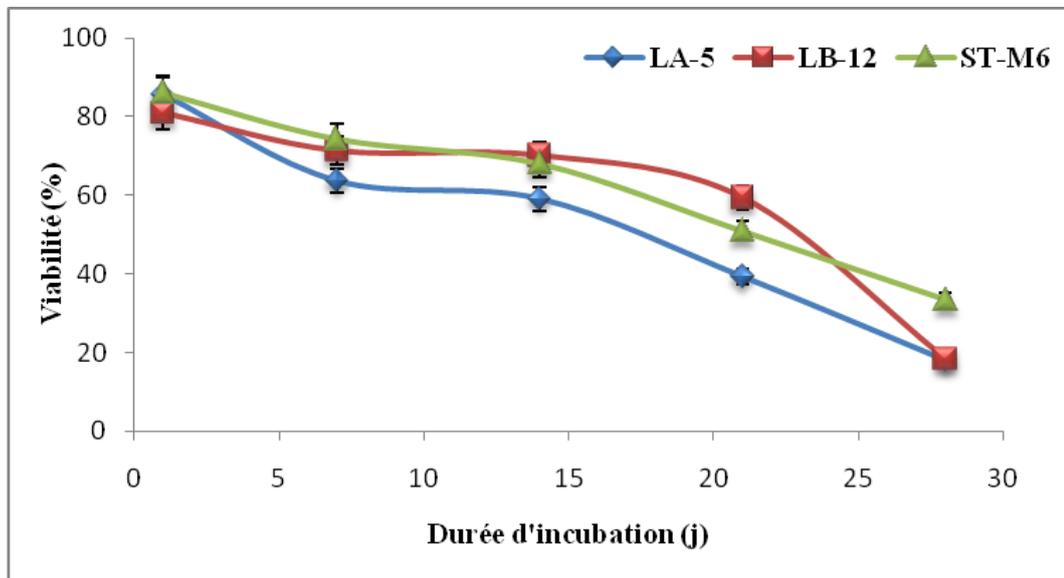
La Figure 11 présente les résultats de l'évaluation de la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 en présence de l'arôme fraise utilisé dans l'industrie laitière.

Les résultats illustrés démontrent que la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 est affectée par la présence de l'arôme fraise. La viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 en présence de 0,1% d'arôme fraise est considérée comme satisfaisante jusqu'au 14j (> de 70%) : 73,5±0,6%, 73,8±0,4% et 74,2±0,4% respectivement. Par contre, cette dernière est faible (30% < cellules viables < 70%) au 21j et 28j avec 67,7±2,0%, 50,4±0,4% pour LA-5, 65,7±0,8%, 50,8±0,8% pour LB-12 et 59,1±2,9%, 41,5±1,8% pour ST-M6.

A la concentration de 0,2% d'arôme fraise, la viabilité est satisfaisante seulement au 1j avec 85,6±0,9% pour LA-5, jusqu'au 14j avec 70,0±0,7% pour LB-12 et 7j pour ST-M6. La viabilité est considérée comme faible au 21j pour LA-5 et LB-12 39,27±0,38%, 59,3±0,8% respectivement et jusqu'au 28j pour ST-M6 (33,4±0,7%). LA-5 et LB-12 ont enregistré des taux de viabilité inacceptables (< 30%) au 28j, les valeurs respectives étant de 18,0±0,4% et 18,2±0,4%.



(a)



(b)

Figure 11: Viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6, utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, en présence de : (a) 0,1% et (b) 0,2% d'arôme fraise. Les échantillons étaient incubés à 4°C pour 24h.

Les résultats du test ANOVA démontrent que la viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6 en présence de l'arôme fraise est significativement différente d'une souche à une autre, à chaque concentration testée :

A 0,1% d'arôme fraise : (Sig = 0,000 < 0,05) pour 1j, (Sig = 0,005 < 0,05) pour 7j, (Sig = 0,013 < 0,05) pour 14j, (Sig = 0,006 < 0,05) pour 21j et (Sig = 0,000 < 0,05) pour 28j.

A 0,2% d'arôme fraise : (Sig = 0,001 < 0,05) pour 1j, (Sig = 0,000 < 0,05) pour 7j, 14j, 21j et 28j.

c. Arôme vanille

La Figure 12 comprend les résultats de l'évaluation de LA-5, LB-12 et ST-M6 en présence de l'arôme vanille utilisé dans l'industrie laitière.

Les résultats indiquent que la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 est affectée par la présence de l'arôme vanille. La viabilité de LB-12 et ST-M6 est considérée comme satisfaisante jusqu'au 21j (> 70%): 81,2±0,4%, 82,1±0,7% respectivement, et seulement jusqu'au 14j pour LA-5 (77,4±0,9%). Au 28j, la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 est faible (30% < cellules viables < 70%) enregistrant 61,6±0,6%, 67,5± 0,9% et 59,6±1,0% respectivement.

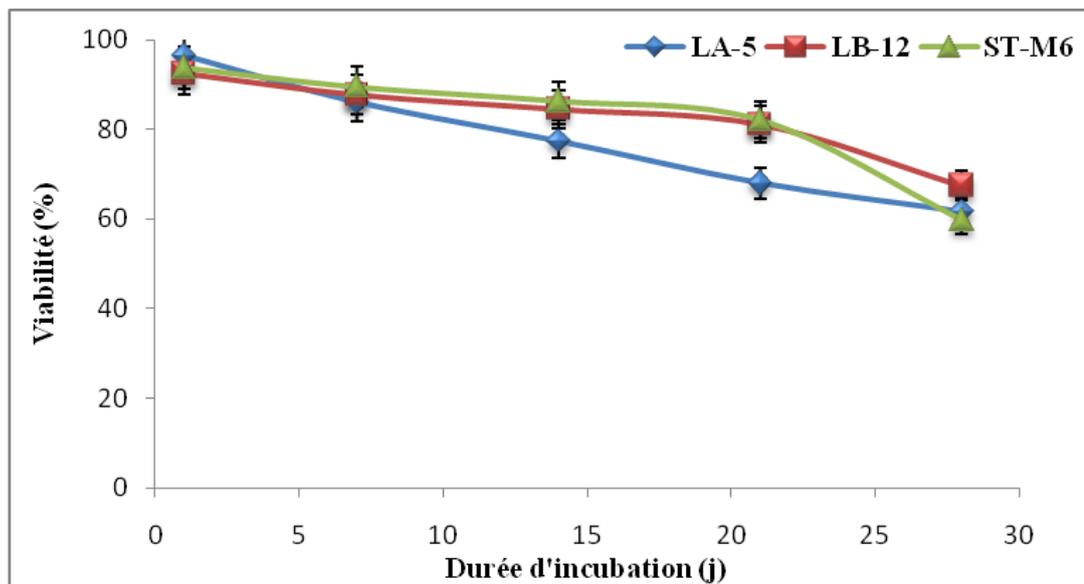


Figure 12: Viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6, utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, en présence de 0,14% d'arôme vanille. Les échantillons étaient incubés à 4°C pour 24h.

Les résultats du test ANOVA démontrent que la viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6 en présence de l'arôme vanille (0,14%) est significativement différente d'une souche à une autre, (Sig = 0,015 < 0,05) pour 1j, (Sig = 0,007 < 0,05) pour 7j, (Sig= 0,000 < 0,05) pour 14j, 21j et 28j.

4.2.2.3. Influence des texturants sur la viabilité

a. Phosphate de diamidon hydroxypropylé (E1442)

La Figure 13 comprend les résultats de l'évaluation de la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 en présence du texturant E1442 (phosphate de diamidon hydroxypropylé) utilisé dans l'industrie laitière algérienne.

Les résultats représentés dans la Figure 13 démontrent que la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 est affectée par la présence du texturant E1442 à la concentration de 0,2%. Nous avons remarqué que cette viabilité diminuait progressivement tout au long de la période d'incubation. Du 1j au 21j, la viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6 est considérée comme satisfaisante ($> 70\%$) : $74,7 \pm 0,4\%$ pour LA-5, $74,5 \pm 1,4\%$ pour LB-12 et $70,2 \pm 0,5\%$ pour ST-M6. Au 28j, la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 est faible ($30\% < \text{cellules viables} < 70\%$) enregistrant $67,8 \pm 0,9\%$, $68,2 \pm 0,5\%$ et $51,1 \pm 0,7\%$ respectivement.

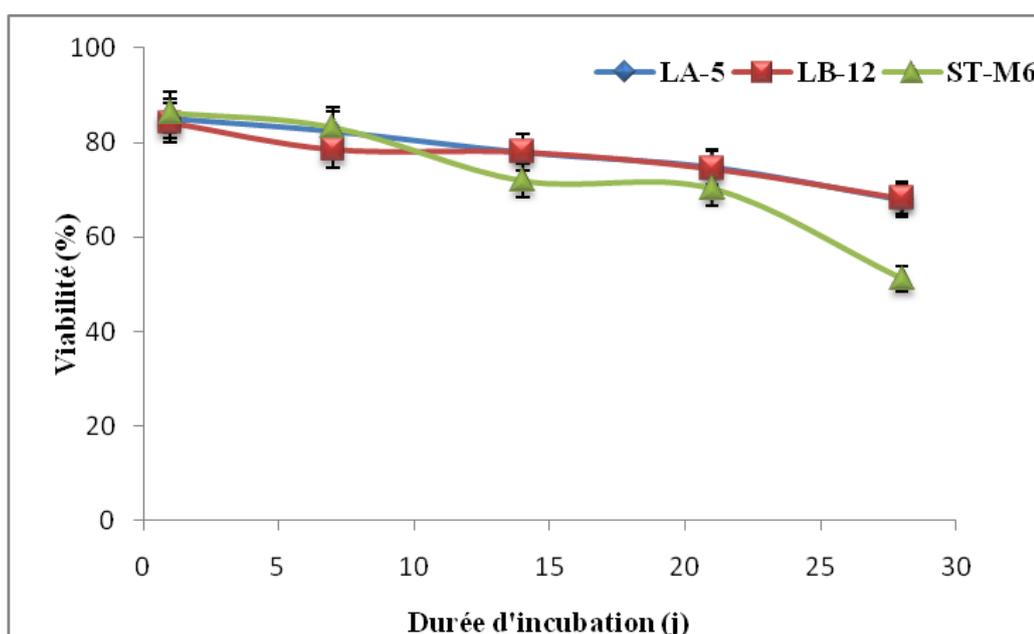


Figure 13: Viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6, utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, en présence de 0,2% phosphate de diamidon hydroxypropylé (E1442).

Les échantillons étaient incubés à 4°C pour 24h.

Les résultats du test ANOVA démontrent qu'en présence de E1442 à 0,2%, la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 est significativement différente d'une souche à une autre : (Sig = 0,016 < 0,05)

pour 1j, (Sig = 0,000 < 0,05) pour 7j, (Sig = 0,000 < 0,05) pour 14j, (Sig = 0,002 < 0,05) pour 21j et (Sig = 0,000 < 0,05) pour 28j.

b. Gomme arabique (E414)

La Figure 14 comprend les résultats de l'évaluation de la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 en présence de gomme arabique (E414), texturant utilisé dans l'industrie laitière.

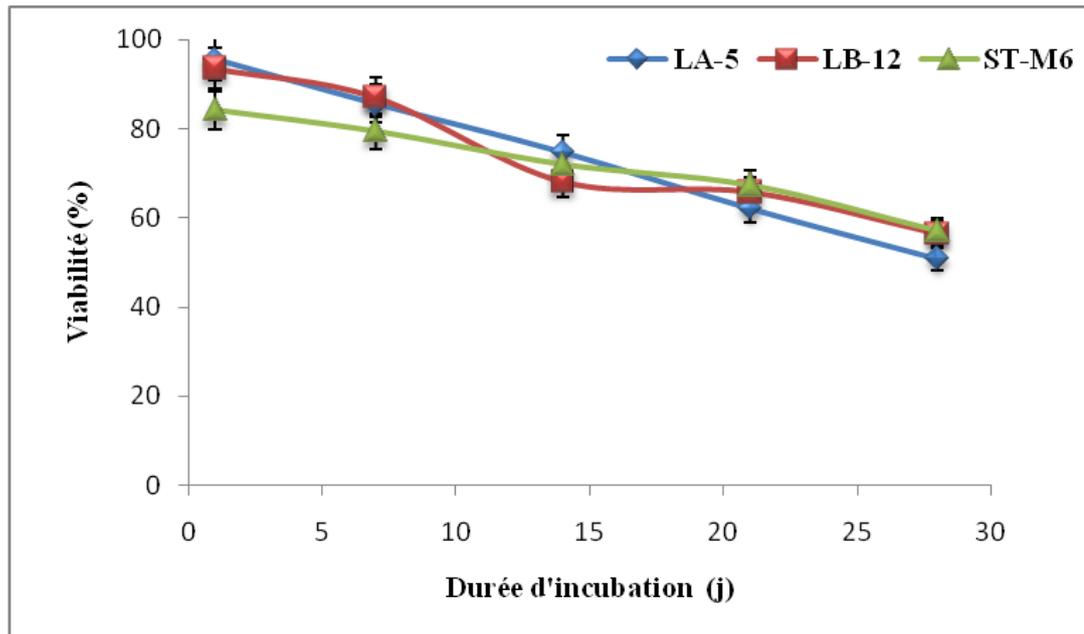


Figure 14 : Viabilité des souches LA-5, LB-12 et ST-M6, utilisées en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques, en présence de 0,1% gomme arabique (E414). Les échantillons étaient incubés à 4°C pour 24h.

D'après les résultats illustrés dans la Figure 14, il apparaît que la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 est affectée par la présence du texturant E414 à la concentration de 0,1%. Cette viabilité a diminué progressivement au cours de la période d'incubation. Au 1j, LA-5, LB-12 et ST-M6 ont enregistré une viabilité de 95,5±0,5%, 93,5±0,5% et 84,2±2,8% respectivement. Cette viabilité est restée satisfaisante (> 70%) jusqu'au 14j pour LA-5 et ST-M6 avec 74,7±0,4% et 71,9 ±0,4% respectivement, et seulement jusqu'au 7j pour LB-12 (87,1± 1,1%). A la fin de la durée de stockage (28j), la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 est faible (30% < cellules viables < 70%) enregistrant 50,9±0,7%, 56,4±0,8% et 56,9±1,5% respectivement.

Les résultats du test ANOVA démontrent qu'en présence du texturant E414 à 0,1%, la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 est significativement différente d'une souche à une autre : (Sig = 0,000 < 0,05) pour 1j, 7j, 1j4, 21j et (Sig = 0,001 < 0,05) pour 28j.

4.3. Discussion des résultats

4.3.1. Principaux constats

4.3.1.1. Concentration de cellules viables dans les yaourts commercialisés sous le label « probiotique »

Les réglementations gouvernementales diffèrent d'un pays à l'autre, toutefois le statut des probiotiques en tant que composante d'un aliment n'est pas établi actuellement à l'échelon international (FAO/OMS, 2001). La réglementation algérienne exige une concentration totale de bactéries lactiques d'au moins 10^7 UFC/g. En effet, selon l'arrêté interministériel du 16 *Jumada Ethania* 1419 correspondant au 7 octobre 1998 relatif aux spécifications techniques des yaourts et aux modalités de leur mise à la consommation⁴ :

« Les bactéries lactiques thermophiles spécifiques doivent êtreensemencées simultanément et se trouver vivantes dans le produit fini à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme rapportées à la partie lactée. »

Les résultats du dénombrement des flores lactiques des deux yaourts probiotiques analysés sont résumés dans le Tableau 15(a). Nous déduisons que les deux yaourts sont conformes à la réglementation algérienne. Il convient de noter également que le diluant utilisé influe sur le résultat du dénombrement. Il est donc nécessaire d'établir des procédures standard qui soient harmonisée au niveau national afin de s'assurer de la qualité des analyses microbiologiques réalisées dans les différents laboratoires.

Pour ce qui est des souches probiotiques, les lignes directrices diffèrent selon les pays. La FAO et l'OMS recommandent un minimum de 10^6 UFC de bactéries probiotiques viables par gramme

⁴ <http://www.mincommerce.gov.dz/fichiers/pdfqualite/arr071098fr.pdf>

(Versalovic et Wilson, 2008). Récemment, des concentrations dans la gamme de 10^8 - 10^9 UFC/g de produit, à la fin de sa durée de conservation, ont été recommandées pour compenser la perte de viabilité qui a lieu lors du passage dans le tract gastro-intestinal (Versalovic et Wilson, 2008).

Tableau 15: Concentrations des bactéries lactiques dans : (a) deux yaourts probiotiques analysés durant la première semaine de leur fabrication, (b) lait fermenté inoculé de ferments commerciaux utilisés pour la fabrication de yaourts probiotiques (sans additifs)

(a)

	Yaourt A (moyenne [UFC/g])		Yaourt B (moyenne [UFC/g])	
	<i>Tryptone-sel</i>	<i>Eau peptonée tamponnée</i>	<i>Tryptone-sel</i>	<i>Eau peptonée tamponnée</i>
<i>S. thermophilus</i>	$2,98 \times 10^8$	$4,72 \times 10^8$	$2,98 \times 10^8$	$3,58 \times 10^8$
<i>L. bulgaricus</i>	$1,71 \times 10^9$	$6,23 \times 10^8$	$1,36 \times 10^9$	$1,68 \times 10^8$
<i>L. acidophilus</i>	$1,56 \times 10^9$	$3,84 \times 10^8$	$2,01 \times 10^9$	$3,34 \times 10^8$

(b)

Souche	Moyenne [UFC/g]				
	<i>1j</i>	<i>7j</i>	<i>14j</i>	<i>21j</i>	<i>28j</i>
ST-M6	$1,70 \times 10^{10}$	$1,67 \times 10^{10}$	$1,58 \times 10^{10}$	$1,49 \times 10^{10}$	$1,35 \times 10^{10}$
LB-12	$1,62 \times 10^{10}$	$1,55 \times 10^{10}$	$1,49 \times 10^{10}$	$1,33 \times 10^{10}$	$1,13 \times 10^{10}$
LA-5	$1,58 \times 10^{10}$	$1,46 \times 10^{10}$	$1,34 \times 10^{10}$	$1,24 \times 10^{10}$	$9,54 \times 10^9$

4.3.1.2. Développement de milieux sélectifs pour le dénombrement des souches probiotiques en présence des autres bactéries du yaourt

La plupart des aliments fermentés représentent des écosystèmes complexes contenant une multitude de microorganismes différents. Une méthode pour la détermination fiable de la viabilité des souches probiotiques dans les aliments commercialisés sous le label « probiotique » est donc nécessaire (Lima *et al.*, 2009). Par conséquent, le développement de milieux de culture pouvant discriminer entre les souches probiotiques et les autres bactéries lactiques présentes dans la matrice alimentaire représente une perspective intéressante.

4.3.1.3. Etiquetage des yaourts commercialisés sous le label « probiotique »

La variation entre les informations présentées sur l'étiquetage des cinq échantillons de yaourts probiotiques examinés reflète le vide réglementaire qui existe actuellement en matière

d'étiquetage des produits probiotiques. L'obligation de l'information du consommateur est régie par la réglementation algérienne par les deux décrets exécutifs suivants:

- Décret exécutif n° 90-367 du 10 novembre 1990 relatif à l'étiquetage et à la présentation des denrées alimentaires
- Décret exécutif n° 05-484 du 22 décembre 2005 modifiant et complétant le décret exécutif n° 90-367 du 10 novembre 1990 relatif à l'étiquetage et à la présentation des denrées alimentaires produits et services

Actuellement, il n'existe pas un statut légal pour les aliments probiotiques ou fonctionnels dans la réglementation algérienne. A l'échelle internationale, il existe un débat concernant le statut légal que devraient avoir les aliments fonctionnels qui avancent des allégations de santé. L'une des questions importantes qui se posent est si ces aliments devraient être régulés selon les mêmes mécanismes empruntés pour les produits thérapeutiques. Le Japon semble être le seul pays qui reconnaît légalement que certains aliments ont des propriétés bénéfiques pour la santé. En effet, selon la *Japanese Nutrition Improvement Law*, il existe cinq catégories d'"Aliments aux usages diététiques spéciaux". Une de ces catégories est "Aliments à usage précis relatif à la santé" ou "FOSHU"⁵. Ceci étant dit, les recommandations de la commission d'experts de la FAO et l'OMS préconisent néanmoins de spécifier la souche probiotique incorporée dans l'aliment (**FAO/OMS, 2001**). Afin de protéger le consommateur des arnaques, il y a actuellement un effort mondial visant à rationaliser les règlements sur les allégations santé acceptables. L'Union Européenne a également entamé une grande campagne afin d'établir un cadre réglementaire et procédural pour les produits alimentaires autorisés à porter des allégations de santé (**Pothoulaki et Chryssochoidis, 2009**).

En effet, bien que des preuves substantielles existent actuellement pour soutenir certains effets bénéfiques de la consommation du yaourt sur la santé gastro-intestinale, il y a également plusieurs inconsistences dans les résultats rapportés (**Adolfsson et al., 2004**). Ces inconsistences peuvent être dues à des différences dans les souches de bactéries lactiques utilisées, les voies d'administration, les procédures d'investigation ou encore à l'absence de définition objective et universellement agréée du concept de « la santé (gastro-)intestinale ». Des études plus contrôlées

⁵ http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/label-etiquet/claims-reclam/nutra-funct_foods-nutra-fonct_aliment-fra.php

et mieux conçues, impliquant des sujets humains de statut sanitaire bien défini et ayant une durée suffisante sont nécessaires pour confirmer ou étendre ces résultats (**Adolfsson et al., 2004**).

4.3.1.4. Viabilité des ferments commerciaux utilisés en Algérie pour la fabrication de yaourts probiotiques

Les échantillons de ferments commerciaux analysés ont montré des propriétés probiotiques satisfaisantes (résistance au pH acides, résistance aux sels biliaries et activité antibactérienne). Cependant nous avons constaté que les arômes et les texturants utilisés dans le procédé de fabrication du yaourt ont un impact négatif sur la viabilité de ces ferments. Ceci pourrait expliquer l'écart noté entre les concentrations des cellules viables dénombrées dans les produits finis et le lait fermenté sans additifs (Tableau 15). Cet écart pourrait aussi être dû aux taux d'inoculation utilisés ; bien que nous ayons utilisé le même taux qui nous a été communiqué par l'entreprise laitière qui nous a fourni les ferments, il se pourrait que les yaourts analysés n'aient pas reçu la même quantité d'inoculum. Les interactions entre les différentes souches dans le yaourt pourraient également diminuer la concentration maximale de cellules atteinte dans une mono culture (comme l'était le cas pour le lait fermenté sans additifs, Tableau 15(b)).

Les résultats de l'étude de viabilité réalisée dans ce travail sont synthétisés dans la Figure 15. Nos résultats montrent que les souches étudiées ont un taux de viabilité satisfaisant pendant la durée de stockage à 4°C. Cependant, les arômes artificiels ont un effet prononcé sur la viabilité, en particulier l'arôme fraise à 0,2% qui a résulté en un taux de viabilité inacceptable des souches probiotiques LA-5 et LB-12. Pour les autres arômes, les taux de viabilité étaient faibles au-delà du 14^{ème} ou 21^{ème} jour de stockage.

Nos résultats sont conformes avec les résultats obtenus par d'autres auteurs en utilisant ces mêmes additifs. Dans une étude faite par (**Vinderola et al., 2002**), ces mêmes arômes ont été responsables de la diminution de la viabilité de quelques souches de bactéries (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* et *L. acidophilus*). D'autre part, des mélanges commerciaux d'arôme-colorants se sont avérés avoir un potentiel d'inhibition important même à la concentration recommandée par les fournisseurs. Pour ce qui est des texturants, un effet similaire a été noté avec le phosphate de diamidon hydroxypropylé (E1442) à une concentration de 0,1%. Une diminution de la viabilité cellulaire de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* et *S. thermophilus* a été observée. En plus de la perte de viabilité, le phosphate de diamidon

hydroxypropylé (E1442) peut ralentir la dégradation des aliments dans l'intestin et pourrait potentiellement poser un risque d'allergie pour les intolérants au gluten, au cas où il s'agirait d'amidon de blé (Zhiri, 2011).

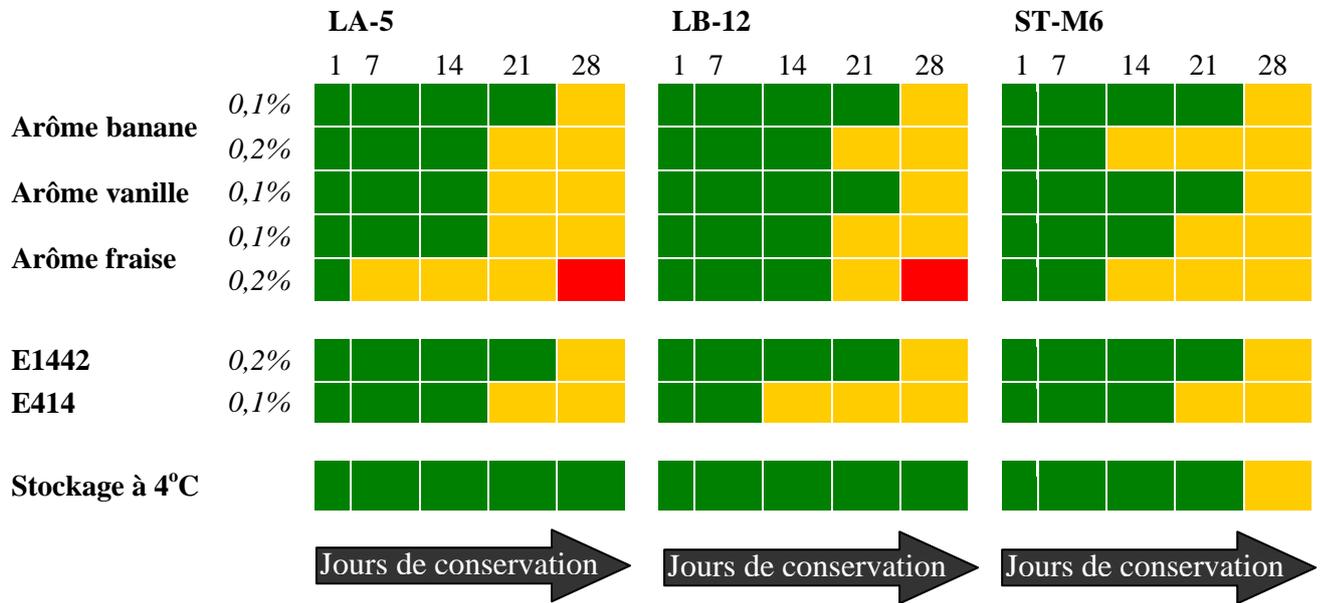


Figure 15: Impact des conditions de conservation sur la viabilité des souches étudiées : (■) viabilité satisfaisante (> 70%), (■) viabilité faible (entre 30% et 70%) et (■) viabilité inacceptable (< 30%)

Bien que la quantité de cellules nécessaire pour produire des avantages thérapeutiques ne soit pas connue et peut varier en fonction de la souche et l'effet santé recherché, en général les bactéries probiotiques doivent être viables dans les produits à raison de 7-9 log UFC/ml pendant leur durée de vie (Mosilhey, 2003 ; Roy, 2005). Etant donné que la viabilité des probiotiques est un paramètre clé pour le développement des aliments probiotiques, il est clair qu'il serait nécessaire de trouver des alternatives aux additifs utilisés actuellement dans la fabrication du yaourt ou bien utiliser des ferments qui soient plus robustes par rapport à ces additifs.

4.3.2. Limites de l'étude

Notre étude présente un nombre de limitations dont nous citons :

- Etant donné que l'évaluation de l'effet des additifs a été réalisée dans les bouillons MRS et M17, l'effet potentiellement protecteur de la matrice alimentaire (le lait) n'a pas été pris en compte. Plusieurs études indépendantes ont mis en évidence l'effet positif du lait sur la survie

des bactéries dans l'environnement gastro-intestinal (**Charteris *et al.*, 1998 ; Schillinger *et al.*, 2005 ; Guglielmotti *et al.*, 2007**).

- L'effet des additifs sur la viabilité a été évalué dans notre étude en utilisant des solutions de bouillons MRS ou M17 additionné d'un additif à la fois. Le yaourt contient plusieurs additifs simultanément et cette combinaison pourrait avoir un effet plus prononcé sur la viabilité des bactéries inoculées.

- Nous avons utilisé dans les différentes analyses réalisées sur les ferments commerciaux des mono cultures comprenant des souches pures. Par conséquent, les effets symbiotiques ou antagonistes n'ont pas été pris en compte. En effet, le yaourt est un écosystème qui comprend plusieurs souches de bactéries et les interactions entre ces différentes souches pourraient avoir un effet sur la viabilité des bactéries sous différentes conditions de stress (comme l'ajout des additifs ou les conditions technologiques du procédé de fabrication).

- La tolérance à l'environnement gastro-intestinal est l'une des caractéristiques recherchées lors de la sélection des bactéries probiotiques pour que le plus grand nombre possible de bactéries traversent le duodénum en direction de leur site d'action, tout en restant viables et capables de se multiplier. Contrairement à l'acidité qui s'estompe après le passage gastrique, la bile entrant en contact avec les cellules bactériennes ayant survécu ce passage, demeure en contact avec celles-ci pendant un temps plus long. Ainsi, il serait judicieux d'observer la capacité de croissance d'un nombre limité de bactéries en présence de bile (tolérance), au lieu de seulement mesurer la survie (résistance) d'une population importante après une exposition pendant un temps donné. En outre, l'effet des enzymes protéolytiques n'a pas été évalué.

- Le dénombrement sélectif des souches probiotiques en présence d'autres bactéries lactiques est important pour assurer des résultats fiables concernant les yaourts commercialisés sous le label « probiotique ». Nous avons évalué cinq milieux de culture modifiés par rapport à la croissance des trois souches étudiées dans ce travail. Cependant, nous nous sommes limités à la modification de la composition des milieux alors que les conditions d'incubation ont aussi un rôle critique dans les analyses de dénombrement (*eg.* température, anaérobiose/ aérobiose, durée d'incubation).

- Notre enquête auprès des industriels a révélé que les bactéries utilisées pour ensemercer les yaourts probiotiques commercialisés en Algérie sont : *S. thermophilus*, *L. bulgraicus*, *L. acidophilus* et les bifidobactéries. Notre analyse n'a cependant considéré que les trois premières espèces (qui sont anaérobies facultatives) ; étant donné que notre analyse a été effectuée sous conditions d'aérobiose.

- L'incubation en anaérobiose pourrait donner des résultats différents. Il serait donc intéressant d'optimiser les conditions de culture et dénombrement au-delà de l'effet du diluant pour examiner l'effet de la température et atmosphère d'incubation. Les résultats obtenus pour l'évaluation de l'activité antibactérienne contre *Helicobacter pylori* devraient être confirmés par une manipulation identique réalisée sous anaérobiose stricte.

5) Conclusions & Perspectives

5.1. Conclusions

Les consommateurs modernes sont de plus en plus intéressés par leur santé personnelle, et s'attendent à des aliments capables de prévenir la maladie. La santé gastro-intestinale est le secteur clé dans le marché mondial des aliments fonctionnels et ce secteur est dominé par les produits probiotiques. Ce marché est toujours en forte croissance avec des gammes de produits sans cesse plus larges, à mesure que de nouveaux ingrédients fonctionnels apparaissent. Il ne fait aucun doute qu'il connaîtra encore une croissance dans les années à venir. La viabilité et la stabilité des probiotiques sont à la fois un défi technologique et de marketing pour les producteurs industriels. Les aliments probiotiques devraient contenir des souches probiotiques à un niveau approprié de cellules viables lors de la conservation du produit. En outre, cette nouvelle catégorie d'aliments innovants nécessite des considérations réglementaires nouvelles afin de préserver le potentiel d'innovation des entreprises alimentaires d'un côté et de protéger le consommateur des arnaques d'un autre côté.

Ce travail comprend deux parties : (1) Contrôle microbiologique et évaluation de l'étiquetage de yaourts commercialisés sous le label « probiotique » et (2) Contrôle microbiologique, mise en évidence de quelques propriétés probiotiques et évaluation de la viabilité de trois échantillons de ferments collectés auprès d'une entreprise laitière. Les trois ferments sont utilisés pour fabriquer des yaourts probiotiques commercialisés en Algérie.

Les résultats de la première partie démontrent que les yaourts probiotiques commercialisés sont de bonne qualité microbiologique et sont conformes aux normes nationales en matière de concentration des cellules viables et d'étiquetage. Cependant, nous avons constaté qu'il existe des lacunes dans la réglementation par rapport aux aliments fonctionnels et l'étiquetage des aliments contenant des additifs microbiologiques (probiotiques). En outre, la réglementation algérienne ne fait pas de prévisions pour différentes catégories d'aliments comme c'est le cas dans d'autres pays.

Les résultats de la deuxième partie ont mis en exergue l'effet des arômes (banane, fraise et vanille) et texturants (gomme arabique et le phosphate de diamidon hydroxypropylé), couramment utilisés dans l'industrie laitière algérienne, sur la viabilité des souches ST-M6 (*S. thermophilus*), LB-12 (*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*) et LA-5 (*L. acidophilus*). Ces souches

sont commercialisées sous forme lyophilisée prête à l'emploi (DVS) et utilisées pour l'inoculation de yaourts commercialisés sous le label « probiotique ». Nous avons observé que la viabilité de ces souches diminue de façon significative en présence d'arômes artificiels et texturants alimentaires pendant le stockage réfrigéré.

Pour avoir des effets bénéfiques sur l'hôte, les cultures probiotiques livrées dans une matrice alimentaire composée tel que le yaourt (présence d'additifs alimentaires : arômes et texturants) doivent demeurer viables durant toute la période de stockage réfrigéré. Les effets des additifs sur la croissance des ferments lactiques n'ont pas beaucoup été étudiés et des informations supplémentaires sont encore nécessaires. Notre étude représente une contribution dans ce sens.

5.2. Perspectives

Les perspectives de poursuite de cette étude sont très larges, puisque la recherche sur les probiotiques représente un domaine qui intéresse les scientifiques, les législateurs, les technologues/ industriels ainsi que les spécialistes du business et marketing. Nous nous contenterons de suggérer ici les perspectives les plus pertinentes aux résultats obtenus dans notre étude :

Evaluation de l'effet de la matrice alimentaire

Pour les probiotiques livrés dans une matrice alimentaire, des quantités supplémentaires de cellules sont nécessaires avant le traitement pour tenir compte de la perte de cellules au cours de la phase de traitement et / ou de stockage. Maintenir un niveau élevé du nombre de cellules viables dans les yaourts probiotiques tout au long de la durée de vie n'est pas une tâche simple (Ng *et al.*, 2010). De nombreux facteurs affectent la viabilité des probiotiques dans les yaourts durant le stockage: la variation des souches, l'accumulation des acides, le niveau d'oxygène dissous, de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), température et matériaux d'emballage (Talwalkar et Kailasapathy, 2003; Donkor *et al.*, 2006).

Ainsi, les différentes formes de matrices alimentaires doivent être étudiées et optimisées afin de garantir que les probiotiques soient viables et livrés en nombre suffisant avant la date d'expiration (Godward *et al.*, 2000). Basé sur des études antérieures qui caractérisent une large gamme des espèces probiotiques, une dose très élevée - au moins 10⁸ UFC par jour, principalement dans la gamme de 10¹⁰ - 10¹¹ UFC / jour serait nécessaire (Lourens-Hattingh et Viljoen, 2001; Tamime *et al.*, 2005; Parvez *et al.*, 2006). Par exemple, *Lactobacillus*

acidophilus, une espèce commune probiotique, a été administrée à un niveau minimum de 10^9 UFC par jour pour prévenir ou traiter certains troubles gastro-intestinaux (GI) (**WGO, 2008**).

Développement de nouvelles approches pour la livraison de souches actives et viables

Plusieurs approches de la biotechnologie moderne ont été étudiées afin d'améliorer la viabilité des cellules au cours du traitement en aval, le stockage et, éventuellement, la digestion, ainsi que d'assurer un haut rendement à grande échelle. Il s'agit notamment de l'application de stress sub-létaux pendant la fermentation, l'ajout de prébiotiques, y compris des solutés compatibles (bétaine), et la protection des cellules par micro encapsulation (**Christophe et Yildirim, 2007**).

Développement d'alternatives 'naturelles' aux texturants et arômes

Les lactobacilles ont la capacité de produire différents types d'exopolysaccharides (EPS) présentant un éventail diversifié de structures. Les exopolysaccharides sont classés, selon leur composition en *homopolysaccharides* et *hétéropolysaccharides*. Une de leurs applications les plus décrites est leur utilisation comme agents de texture synthétisés naturellement dans les produits alimentaires fermentés. Aujourd'hui, de plus en plus de consommateurs mettent l'accent sur les aliments sains sans additifs chimiques, ceci ouvre de nouvelles perspectives de développement pour ces biopolymères. Le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) dont bénéficient les bactéries lactiques leur confère un avantage comme sources d'EPS consommables. Les principaux inconvénients qui limitent leur exploitation par l'industrie laitière sont cependant leur faible rendement et la validation de leurs allégations santé (**Badel et al., 2011**).

Pour ce qui est des arômes naturels, les cellules de *Lactobacillus* ont été immobilisées sur les pièces de fruits (pommes et coings). Ces biocatalyseurs immobilisés ont été utilisés pour la fermentation du lait immédiatement après leur préparation et après une longue période de stockage à basse température. Aucune infection n'a été signalée au cours de la période de stockage. Les produits laitiers avaient un goût fruité, un arôme distinctif qui est resté durant toute la période de stockage. Cette technique peut constituer une alternative naturelle à l'utilisation des arômes artificiels (**Kourkoutas et al., 2005**).

Avancement des études sur la santé du système gastro-intestinal

Ces dernières années, le yaourt a été présenté comme un aliment ayant des vertus pour l'amélioration de « la santé gastro-intestinale ». Ce message est central dans les stratégies de

marketing de plusieurs produits commercialisés sous le label « probiotique ». Cependant, en l'absence d'une définition universellement acceptée ou toute autre définition de la « santé gastro-intestinale », il est difficile d'étayer ces allégations. Des études supplémentaires portant sur la détermination des caractéristiques d'un intestin sain seraient extrêmement utiles pour évaluer l'effet du yaourt sur la santé intestinale, élucider les mécanismes par lesquels le yaourt exerce ces effets et déterminer les éléments essentiels du yaourt impliqués dans ces mécanismes d'action.

Exploitation des outils biotechnologiques modernes pour mieux caractériser les souches probiotiques

La biotechnologie moderne offre plusieurs outils qui nous permettraient de mieux caractériser les souches probiotiques afin de rationaliser l'exploitation de leurs activités métaboliques en fabrication de produits laitiers fermentés ou autres aliments fonctionnels. Par exemple, le génotypage de souches de bactéries autochtones ayant un potentiel probiotique, l'analyse transcriptionnelle et fonctionnelle du génome de ces souches et la génomique des écosystèmes microbiens (métagénomique) alimentaires représentent des perspectives prometteuses pour la valorisation de notre patrimoine biologique et l'amélioration de la qualité des produits alimentaires algériens.

Références bibliographiques

A

ACIA., 2009. Agence canadienne d'inspection des aliments. Chapitre 8, Allégations santé Sections 8.7 - 8.16. Downloaded from *www.inspection.gc.ca*.

Adolfsson O., Meydani S. K. and Russell R. M., 2004. Yogurt and gut function. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80 (2), pp : 245-256.

Ahmed T. and Kanawal R., 2004. Biochimical characteristics of lactic acid bacteria producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture. *Pakistan Vet. J.*, 24 (2), pp : 87-91.

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

Al-Otaibi M.M., 2009. Evaluation of some probiotic fermented milk from el ahsa markets, Saudi Arabia. *Amer. J. Food.Tech.*, 4 (1) pp : 1-8.

Arvola T., Sutas Y., Moilanen E. and Salminen S., 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy.*, 30 .1604-1610.

B

Badel S., Bernardi T. and Michaud P., 2011. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances.*, 29 pp : 54–66.

Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarnie D., Kihal M. and Ouzrout R., 2003. Caractérisation phénotypiques des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales – Arabia et Kabyle-. *Sci et Tech* ., 23pp : 30-37.

Begley M., Gahan C.G. and Hill C., 2006. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol.Rev.*, 29pp: 625-651.

Betoret, N., Puente L., Díaz M. J., Pagán M.J., García, M. J., Gras M.L., Martínez-Monzó J. and Fito P., 2003. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*.,56pp : 273-277.

Biggerstaff J. P., Puil M. L., Weidow B.L., Prataer J., Glass K., Radosevich M. and White D.C., 2006. New methodology for viability testing in environmental samples. *Molecular and Cellular probes* .,20pp: 141-146.

Bjorksten B., 2004. Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Seminars in Immune*., 25. pp: 257-27.

Bomba A., Nemcova R., Mudronova D. and Guba P., 2002. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. Trends in *Food Science and Technology*., 13(4)pp:121-126.

Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallir, J. and Desjardins R., 1999. BacLight TM: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological methods* .37pp : 77-86.

Bourrier T., 2006. Intolérances et allergies aux colorants et additifs. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 46 pp : 68–79.

Brashears M. M., Jaron D. and Trimble J., 2003. Isolation, selection and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of Escherichia coli O157:H7 in cattle. *J. Food Prot.*, 66 pp: 355-363.

Bukola C. A. and Abidun A. O., 2008. Screening of lactic acid bacteria strains isolated from some Nigerian Fermented Foods for EPS production. *W. App.Sci. J.*, 4 (5)pp:741-747.

Bunthof C. J., Bloemen K., Breeuwer P., Rombouts F. M. and Abee T., 2001. Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 pp : 2326–2335.

Buttriss J., 2000. Is Britain ready for FOSHU? *Nutrition Bulletin*, 25 pp: 159–161.

C

Charteris W. P., Kelly P. M., Morelli L. and Collins J. K., 1998. Development and application of an in vivo methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic

Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84 pp: 759–768.

Chougrani F., Cheriguene A. and Bensoltane A., 2008. Use of lactic strains isolated from Algerian ewe's milk in the manufacture of a natural yogourt. *Afr. J. Biotech.*, 7(8) pp:1181-1186.

Christophe L. and Yildirim S., 2007. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnolog.*, 18 pp:176–183.

Christiaens H., Leer R. J., Pouwels P. H., and Verstraete W., 1992. Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 pp: 3792-3798.

Codex alimentarius, 2008. Proposed draft symbiotic for the Use of Health Claim .*Geneva WHO.*

Corrieu G. et Luquet F. M., 2008. Bactéries lactiques : de la génétique aux ferments. *Tec et Doc, Lavoisier, Paris* : 269-306.

Cremonini F., S. Di Caro E. C., Nista F., Bartolozzi G., Capelli G. and Gasbarrini A., 2002. Meta-analysis: The effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16 pp:1461-1467.

D

Dacosta Y. et Aou T., 2000. La bioprotection des aliments : l'antagonisme bactérien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique. *Ed. Yves Dacosta. Paris*: 3-21.

Da Cruz A.G., Adriano Gomes C., Jose de Assis F. F. and Susana Marta I. S., 2010. High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing. *Trends in Food Science and Technology* pp: 1-11.

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

Dave R.I. and Shah N.P., 1997d. Effectiveness of cysteine as redox potential reducing agent in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7 pp: 537–545.

Dave R. I. and Shah N. P., 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt. *Journal of Dairy Science*, 81 pp: 2804–2816.

De Carvalho K. J., Kruger M. F., Behrens J , Destro M. T., Landgraf M. and De Melo Franco B., 2009. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Food Science and Technology*, 42 pp: 491–495.

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

Delorme C., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, 126 pp: 274–277.

De Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C. and Schrezenmeir J., 2001. Probiotics – Compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 pp: 421-429.

Dial E. J. and Lichtenberger L. M., 2002. Effect of laetolerrin on Helicobacter felidis induced gastritis. *Biochem Cell Biol.*, 80(1) pp: 113-117.

Dong X., Cheng G. and Jian W., 2000. Simultaneous identification of five Bifidobacterium species isolated from human beings using multiple PCR primers. *Syst. App. Micr. Université de Laval.*, 23 pp : 386-390.

Donkor O. N., Henriksson A., Vasiljevic T. and Shah N. P., 2006. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16 pp : 1181–1189.

Dunne C., Omahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., Ohalloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O’sullivan G. C., Shanahan F. and Collins J. K., 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73 pp: 386-392.

F

FAO/ OMS, 2001. World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: 34.

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

Farnworth E.R., 2008. Kefir: from folklore to regulatory approval. *J. Nutraceuticals Funct. Med. Foods*, 1 pp: 57-68.

Fitzpatrick K.C., 2005. Probiotique, Rapport présenté à la Direction des produits de santé naturels. Santé Canada : 19 -20.

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

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

G

Gastro Net Australia, 2001. Your digestive system, downloaded from http://www.gastro.net.au/frame_digestive.html.

Georgieva R., Danova S., Iliev I., Haertle T., Chobert J. M. and Ivanova S., 2009. Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Int. Dairy J.*, 19. pp : 696–702.

Gibson G. R. and Roberfroid M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. of Nutr.* Thèse doctorat. Université de Laval. Québec, 125 pp: 1401-1412.

Gill H. S., 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastro-intestin. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 17 pp :755-773.

Giraffa G., 2009. Natural dairy starters: microbiological aspects and importance in the field. *SciTopics*. Consulté le 25 novembre 2011 sur : http://www.scitopics.com/Natural_dairy_starters_microbiological_aspects_and_importance_in_the_field.html

Godward G., Sultana K., Kailasapathy K., Peiris P., Arumugaswamy R. and Reynolds N., 2000. The importance of strain selection on the viability and survival of probiotics bacteria in dairy foods. *Milchwissenschaft.*, 55 pp: 441–445.

Goktepe I., Juneja V. K. and Ahmedna M., 2006. Probiotics in food safety and human health. Boca Raton, FL: *Taylor and Francis group*: 494.

Gopal A., Shah N. P. and Roginski H., 1996. Bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Milchwissenschaft.*, 51 pp : 619-623.

Grill J. P., Perrin S. and Schneider F., 2000a. Bile salt toxicity to some Bifidobacteria strains: role of conjugated bile salt hydrolase and pH. *Can. J. Microbiol.*, 46 pp : 878-884.

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

Guarner F., Khan A., Garisch J., Eliakim R. and Gangl A., 2008. Recommendation Pratique : Probiotique et prébiotiques. *Organisation mondiale de Gastroentérologie* : 3-17.

Guglielmottia D. M., Golowczycb M., Jorge A. and Reinheimera L., 2007. Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants, *International Dairy Journal*, 17 pp : 916–925.

Guiraud J. P., 1998. Microbiologie alimentaire. *Dunod, Paris* : 387-433.

Guiraud J. P. et Rosec J. P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire, *Dunod, Paris* : 238-245.

H

Hao W. L. and Lee Y. K., 2004. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Met in Mol Biol.* Thèse doctorat. *Université de Laval. Québec*, 268 pp: 491-502.

Hasler C. M., 1998. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology*, 52 pp: 63–70.

Heatley R. V. and Sobala G. M., 1993. Acid suppression and gastric flora. *Baillere's Clin. Gastroenterol.*, 7 pp: 167-181.

Heller K. J., 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 pp: 374–379.

Holzapfel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. and Huis-Veld H. J., 2001. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. of Food Micr.*, 41 pp :85-101.

I

Isolauri E., Kirjavainen P. V. and Salminen S., 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut. Université de Laval, Québec*, 50 pp: 54-59.

Iyer R. and Tomar T., 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 20 pp :133.

Iyer R., Tomar S. K. and Kapila S., 2010. Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Research International*, 43 pp:103–110.

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

J

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

K

Kacem M. and Kaid-Harche M., 2008. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria. *Grasas Y Aceitis*, 59(3) pp : 218-224.

Kalliomaki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P. and Isolauri E., 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A symbiotic placebo-controlled trial. *Lancet*, 357 pp :1076-1079.

Kanam T., Taku M., Harun-ur-Rachid M. D. and Minoru U., 2007. Probiotic Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Milk–Dahi- in Bangladesh. *Pakistan J. Nutr.*, 6(6) pp : 647-652.

Klaenhammer T., Altermann E., Arigoni F., Bolotin A. and Breidt F., 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics, Antonie Van Leeuwenhoek, *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, 82 pp: 29–58.

Kotikalapudi B.L., 2009. Characterization and encapsulation of probiotic bacteria using a pea-protein alginate matrix. Thèse de Doctorat, *University of Saskatchewan* : 2-91.

Kourkoutas Y., Xolias V., Kallis M., Bezirtzoglou E. and Kanellaki M., 2005. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additives, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry*, 40 pp: 411-416.

Krasaekoopt W., Bhandari B. and Deeth H., 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(3) pp: 399.

L

Lahtinen S. J., Gueimande M., Ouwehand A. C., Reinikainen J. P. and Salminen S. J., 2006. Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiology*, 23 pp:571-577.

Lankaputhra W. E. V. and Shah N. P., 1996. A simple method for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Milchwissenschaft*, 51 pp : 446–451.

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

Leatherhead Food Research, 2009.

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

Lima K. G., Kruger M. F., Behrens J., Destro M. T., Landgraf M. et Franco B. D. G., 2009. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*

and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, *LWT – Food Science and Technology*, 42 pp :491–495.

Liong M. T. and Shah N. P., 2005. Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties. *Food Research International.*, 38 pp: 135-142.

Lourens-Hattingh A. and Viljoen B. C., 2001. Yoghurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11 pp: 1–17.

Losada M. A. and Olleros T., 2002. Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. *Nutrition Research*, 22 pp : 71-84.

Lundeen S. G. and Savage D. C., 1990. Characterization and purification of bile salt hydrolase from *Lactobacillus spp.* strain 100-100. *J. Bacteriol.*, 172 pp : 4171-4177.

M

Macouzet M. et Champagne C. P., 2007. Les bactéries probiotiques : innovations et tendances de développement technologique. *Bioveille*, pp :4-16.

Marcel B.R., Coxam V. and Delzenne N., 2008. Aliments fonctionnels. *Tec. Doc.* 2 ed *Lavoisier*: 23-1015.

Margoles A. and Garcia L., 2003. Characterisation of a bifidobacterium strain with acquired resistance to cholate: A preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 80 pp : 191–198.

Marteau P. et Seksik P., 2005. Probiotiques et alicaments in Bactéries lactiques et probiotiques. De Luquet F.M. et Corrieu G. *Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris* : 256-260.

Malik K. A., 1990. Freeze-drying of microorganisms simple apparatus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8 pp : 76-79.

Matilla-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R. and Saarela M., 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12 pp: 173-182.

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

Mosilhey S. H., 2003. Influence of Different Capsule Materials on the Physiological Properties of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. Doktor-Ingenieur. *Institut für Lebensmitteltechnologie*: 3-113.

N

Nagpal R., Yadav H., Puniya A. K., Singh K., Jain S. and Marotta F., 2007. Potential of probiotic and prebiotics for symbiotic functional dairy foods: an overview. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 2 pp : 75-84.

Nge W., Yeung M. and Tong B. S., 2010. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. *Int. J. Food. Microbiol* : 2-7.

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

O

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

Olson D.W and Aryana K. J., 2008. An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. *Food Science and Technology*, 41 pp: 911-918.

Oudina S., Mouatas A. et Idoui T., 1997. Isolement, purification et identification des souches de bactéries lactiques à partir du beurre traditionnel de brebis et de vache de la région de Skikda. *INFSA* : 1-8.

Ouwehand A. C. and Vesterlund S., 2003. Health aspects of probiotics and drugs. Thèse doctorat. Université Laval. Québec., 6 pp :573-580.

P

Parvez S., Malik K. A., Ahkang S. and Kim H.-Y., 2006. Probiotic and their fermented foodproducts are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100 pp: 1171–1185.

Pereira D. I. A. and Gibson G. R., 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37 pp:259-281.

Pothoulaki M. and Chryssochoidis G., 2009. Health claims : Consumers' matters, *J. Funct. Foods*, 1(2) pp :222-228.

R

Rastall R. A., 2004. Bacteria in the gut: Friends and foes and how to alter the balance. *J. of Nutr. Québec*. 134 pp : 2022-2026.

Rautava S., Kirjavainen P. and Salminen S., 2002. Role of probiotics in food hypersensitivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2 pp:263-271.

Renard A.C., 2000. Les ingrédients santé à la conquête de l'Europe. *Rev. Lait. Fr.*, 598 pp : 16-21.

Règlement (CE) n° 1924/2006 du Parlement européen et du Conseil, du 20 décembre 2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portants sur les denrées alimentaires. *Journal officiel de l'Union Européenne*. L. 404/9 du 30 décembre 2006.

Riazi A. and Ziar H., 2008. Growth and viability of yogurt starter organisms in honey-sweetened skimmed milk. *Afr. J. Biotech.*, 7(12) pp: 2055-2063.

Roy D., 2005. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le Lait*, 85 pp : 39–56.

S

Saarela M., Lahteenmaki L., Crittenden R., Salminen S. and Mattila-Sandholm T., 2000. Gut bacteria and health foods: the European perspective. *Int. J. Food Micr.*, 78 pp: 99-117.

-
- Sanchez B., Reyes-Gavilan C. G., Margolles A. and Gueimonde M., 2009.** Probiotic fermented milks: present and future. *International Journal of Dairy Technology*, 62(4) pp: 472-483.
- Sander M., 2001.** Lactic acid bacteria and human health. *Dairy and Food Cul. Tec. USA*, 73 pp:361-364.
- Sanders M., 2008.** Use of probiotics and yogurts in maintenance of health. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42(2) pp: 71-74.
- Sanz Y., 2007.** Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of Bifidobacterium: a way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, 17(11) pp: 1284-1289.
- Saxelin M., Korpela R. and Mayara-Makinen A., 2003.** Functional dairy products. *Boca Raton LA, USA: CRC Press* : 1-16.
- Schillinger U. and Lucke F., 1989.** Antimicrobial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 pp:1901-1906.
- Shah N.P., 2000.** Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83 pp: 894–907.
- Shah N.P., 2007.** Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal.*, 17(11) pp :60-65.
- Sillanpaa J., 2001.** Tissue-adherence in lactic acid bacteria: Identification and characterization of the collagen-binding S-Layer protein of *Lactobacillus crispatus*. Academic Dissertation in General Microbiology. Faculty of Science of the University of Helsinki. Finland.
- Simon G. L. and Gorbach, S. L., 1987.** Intestinal flora and gastrointestinal function. In *Physiology of Gastrointestinal Tract*. 2nd ed. L. R. Johnson, ed. Raven Press, New York, NY. 2: 1729.
- Sultana K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R., Peiris P. and Kailasapathy K., 2000.** Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62 pp : 47-55.

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

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

Szymanski H., Pejcz J., Jawien M., Chmielarczyk A., Strus M. and Heczko P. B., 2006. Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three *Lactobacillus rhamnosus* strains – A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 23 pp :247-253.

T

Takahashi N., Xiao J. Z., Miyaji K., Yaeshiima T., Hiramatsu A., Iwatsuki K., Kokubo S. and Hosono A., 2004. Selection of acid tolerant bifidobacteria and evidence of a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Research*, 71 pp:340–345.

Talwalkar A. and Kailasapathy K., 2003. Metabolic and biochemical responses of probioticsbacteria in oxygen. *Journal of Dairy Science*, 86 pp: 2537–2546.

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

Talwalkar A. and Kailasapathy K., 2004. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5 pp :1–8.

Tamime A., 2005. Probiotic Dairy Products. Dairy Science and Technology Consultant. *Blackwell publishing*: 56-62.

Tannock G. W., 2002. Probiotics and prebiotics: where are we going? In: Tannock G.W., ed. Probiotics and prebiotics: where are we going? Norfolk, U.K. *Caister Academic Press*: 1-40.

Thirabunyanon M., Boonprasom P. and Niamsup P., 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol. Lett.*, 31 pp: 571–576.

U

Ustunol Z. and Gandhi H., 2001. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium spp* in honey-sweetened skim milk. *J. Food Protec.*, 64 (11) pp: 1775-1779.

V

Versalovic M. and Wilson T., 2008. Therapeutic Microbiology: Probiotics and Related Strategies. ASM Press 420.

Vijendra M. and Prasad D.N., 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology.*, 103 pp : 109–115

Vilella S. B., 2008. Aliment fonctionnels et allégations alimentaire dans l'Union Européenne : une approche juridique in : aliments fonctionnels. *Tec. Doc Lavoisier* : 23.

Vinderola C. G., Costa G. A. and Regenhardt S., 2002. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, 12 pp : 579–589.

Virta M., Lineri S., Kankaanpää P., Karp M., Peltonen K., Nuutila J. and Lilius E. M. 1998. Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 pp : 515–519.

W

Wang M. F., Lin H. C., Wang Y. Y. and Hsu C. H., 2004. Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Paed. Aller. Immun.*, 15 pp :152-158.

World Gastroenterology Organisation (WGO), 2008. Practice guideline. Probiotics and Prebiotics.

www.biokar-diagnostics.fr

Y

Yeganehzad S., Mostafa M. and Tehrani F., 2007. Studying microbial, physiochemical and sensory properties of directly concentrated probiotic yoghurt. *Afr. J. Agr. Res.*, 2(8) pp : 366-369.

Z

Zhang M., Hang X., Fan D., Li H. and Yang X., 2008. Characterization and selection of Lactobacillus strains for their effect on bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 pp:7-14.

Zhiri., 2011. <http://mangersain.medicalistes.org/>.

Zubillaga M., Weill R., Postaire E., Goldman C., Caro R. and Boccio J. B., 2001. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutr. Res.*, 21 pp : 569-579.

Annexe 1 : Photographies des échantillons de ferments utilisés



(a) (b)

Figure I : Photographie de l'échantillon de ferment lactique *Streptococcus thermophilus* (ST-M6) utilisé dans notre étude : (a) recto, (b) verso. Sur l'emballage on lit :

<p>ST-M6 Thermophilic lactic culture</p> <p>Freeze-dried lactic culture for Direct Vat Set (DVS)</p> <p>Storage: -18°C or below Package size: 50U Batch no: 2775099</p>
--



Figure II : Photographie de l'échantillon de ferment lactique *Lactobacillus acidophilus* (LA-5®) utilisé dans notre étude (tel que fourni par Agilait – Wilaya de Jijel)

Annexe 2 : Milieux de cultures, produits (chimiques et réactifs), matériels et appareillages

Les milieux de culture utilisés au cours de notre étude sont :

- **Gélose et bouillon MRS (Man Rogosa Sharpe)** : Pour la culture des Lactobacilles ;
- **Gélose et bouillon M17** : Pour la culture des Streptocoques ;
- **Gélose Hektoen** : Pour l'étude de l'activité antibactérienne ;
- **Gélose au désoxycolate 0,1%** : Pour le dénombrement des C.T et C.T.T. ;
- **Gélose OGA** : Pour le dénombrement de la flore fongique ;
- **Bouillon Luria Bertani** : Pour la culture des entérobactéries.

Nous avons utilisé l'ensemble des produits suivants :

- **Diluant** : Eau peptonée tamponnée stérile (0,1%), Tryptone-sel ;
- **Eau oxygénée** : pour la recherche de la catalase ;
- **HCl (1M)** : Pour l'ajustement du pH des géloses MRS et M17 et la préparation des solutions acides ;
- **L'huile à immersion** : Pour l'observation microscopique ;
- **Sels biliaires en poudre** : Pour tester la résistance à cette substance ;
- **Violet de genciane, fushine, lugol et l'éthanol** : pour la coloration de Gram.
- **Arômes et texturants** : Il s'agit des arômes Banane, Fraise et Vanille. Les texturants utilisés sont l'E414 (gomme arabique) et l'E1442 (Phosphate de diamidon hydroxypropylé). Ils nous ont été fournis par l'unité Tchinelait Candia de Bejaia.

Le matériel et l'appareillage utilisé sont cités ci-après :

- Agitateur vortex (IKAMS1) ;
- Bain marie (GERHARDT) ;
- Balance de précision (Mettler Toledo PR 8002) ;
- Etuve bactériologique 37°C, 44°C (Binder WTB115L) ;
- Microscope optique (WITZLARC300) ;
- pH- mètre (Mettler Toledo MP 220) ;
- Réfrigérateur (ENIEM) ;
- Spectrophotomètre ;

Annexe 3 : Composition des bouillons et des géloses

MRS (Bouillon et gélose) :

▪ Peptone.....	10g
▪ Extrait de viande.....	8g
▪ Extrait de levure.....	4g
▪ Acétate de sodium.....	5g
▪ Phosphate bipotassique.....	2g
▪ Citrate d'ammonium.....	2g
▪ Sulfate de magnésium, 7H ₂ O.....	2g
▪ Sulfate de manganèse, 4H ₂ O.....	0.05g
▪ Glucose.....	20g
▪ Tween 80.....	1ml
▪ Agar (dans le cas de la gélose).....	15g
▪ Cystéine.....	0.1g
▪ Eau distillée.....	1000ml

pH : 6,2 et 5,4

Autoclaver 15 min à 120 °C

M17 (Bouillon et gélose) :

▪ Tryptone.....	2,5g
▪ Peptone pepsique de viande	2,5 g
▪ Peptone papaïnique de soja	5 g
▪ Extrait autolytique de levure.....	2,5 g
▪ Extrait de viande	5 g
▪ Lactose	5 g
▪ Glycérophosphate de sodium	19 g
▪ Sulfate de magnésium	0,25 g
▪ Acide ascorbique	0,5g
▪ Agar agar bactériologique (dans le cas de la gélose).....	15g
▪ Eau distillée.....	1000ml

pH : 7,1

Autoclaver 15 min à 120 °C

Bouillon Luria Bertani :

▪ Bactopectone.....	5g
▪ Extrait de levure.....	2.5g
▪ Nacl.....	2.5g
▪ Eau distillée	500ml

pH : 7,1

Autoclaver 15 min à 120 °C

Gélose Hektoen :

- Protéose-peptone.....12g
- Extrait de levure..... 3g
- Chlorure de sodium.....5g
- Thiosulfate de sodium.....5g
- Sels biliaire.....9g
- Citrate de fer ammoniacal..... 1.5g
- Salicine.....2g
- Lactose.....12g
- Saccharose.....12g
- Fushine acide.....0.1g
- Bleu de bromothymol..... 65mg
- Gélose.....13mg

pH : 7,6

Autoclaver 15 min à 120 °C

Gélose OGA :

- Extrait de levure.....5g
- Glucose.....20g
- Oxytétracycline.....0.1g
- Agar.....12g
- Eau distillée.....1000ml

PH : 7

Autoclaver 15 min à 120 °C

Gélose au désoxycolate 0.1%

- Peptone.....10g
- Lactose.....10g
- Citrate de sodium.....1g
- Rouge neutre.....0.03g
- Désoxycholate de sodium.....1g
- Chlorure de sodium.....5g
- Hydrogénophosphate de potassium.....2g
- Agar.....13g
- Eau distillée.....1000ml

pH : 7,3

Autoclaver 15 min à 120 °C

Annexe 4 : Colorants et réactifs

Catalase :

- Eau oxygénée.....10V

Fushine :

- Fushine basique 1g
- Alcool éthylique a 90% 10ml
- Phénol..... 5g
- Eau distillée..... 100ml

Lugol :

- Iode..... 1g
- Iodure de potassium..... 2g
- Eau distillée..... 300ml

Violet de gentiane :

- Violet de gentiane..... 1g
- Ethanol a 90%..... 10ml
- Phénol..... 2g
- Eau distillée..... 100ml

Annexe 5 : Fiches techniques des espèces de bactéries analysées

Lactobacillus acidophilus

❖ Taxonomie :

Règne : Bacteria

Division : Firmicutes

Classe : Bacill

Ordre : Lactobacillales

Famille : Lactobacillaceae

Genre : Lactobacillus

Espèce : *Lactobacillus acidophilus*

❖ Caractéristiques microbiologiques :

Lactobacillus acidophilus (*L. acidophilus*) est un bacille à Gram positif avec des extrémités arrondies, groupé par paires ou en courtes chaînes. La taille typique est 0,6 à 0,9 um de longueur. Il est non flagellé, non mobile et non sporulé, et est intolérant au sel et microaérophiles. La plupart des souches de *L. acidophilus* peuvent fermenter le cellobiose, le fructose, le galactose, le glucose, le lactose, le maltose, le mannose, la salicine, le saccharose, le tréhalose et esculine. *L. acidophilus* utilise le saccharose plus efficacement que le lactose, de telles observations peuvent être attribuées à des différences dans l'activité de la β -galactosidase et β -fructofuranosidase. La croissance de *L. acidophilus* peut se produire à une température aussi élevée que 45 °C, mais a une croissance optimale de 35-40 °C. La tolérance acide varie de 0,3% à 1,9% d'acidité titrable, avec un pH optimal de 5,5 à 6,0 (Mosilhey *et al.*, 2003).

❖ Effet technologiques et probiotiques dans le yaourt :

Lactobacillus acidophilus est souvent ajouté au yaourt en raison de ses effets probiotiques. Les effets bénéfiques éventuels de la consommation de yaourt contenant *L. acidophilus* incluent : l'amélioration de la digestion du lactose chez les personnes qui ont cette difficulté, l'abaissement de niveau de cholestérol, prévenir certains types de cancer, la stimulation du système immunitaire, le contrôle des infections urogénitales chez les femmes, et la prévention ou le contrôle des infections intestinales (Olson et Aryana, 2008).

❖ **Taxonomie :**

Règne : Bacteria

Division : Firmicutes

Classe : Bacill

Ordre : Lactobacillales

Famille : Lactobacillaceae

Genre : Lactobacillus

Espèce : *Lactobacillus delbrueckii*

Sous-espèce : *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*

❖ **Caractéristiques microbiologiques**

L. delbrueckii subsp. bulgaricus est un bacille à Gram positif, généralement immobile, asporulé, anaérobie (mais aérotolérant). Ces bactéries obtiennent leur énergie du métabolisme fermentatif, mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène grâce à leur activité peroxydase capable d'inactiver le peroxyde d'hydrogène. Elles ont également la capacité de survivre à des pH bas (Ait-Belgnaoui, 2006).

❖ **Effet technologiques et probiotiques dans le yaourt :**

L. delbrueckii subsp. bulgaricus contribue au développement rapide de l'acidité, la saveur et la texture des yaourts. Des études ont clairement démontré que les yaourts contenant des bactéries viables de *L. bulgaricus* améliorent la digestion du lactose et éliminent les symptômes d'intolérance au lactose. Ainsi, ces cultures correspondent clairement au concept actuel de probiotiques. En outre, de nombreuses études ont rapporté des effets thérapeutiques contre des maladies comme le cancer, les troubles intestinaux, des propriétés immunomodulatrices et immunostimulantes (Guglielmotti *et al.*, 2007).

❖ **Taxonomie :**

Règne : Bacteria

Division : Firmicutes

Classe : Coccus

Ordre : Lactobacillales

Famille : Streptococcaceae

Genre : Streptococcus

Espèce : *Streptococcus thermophilus*

❖ **Caractéristiques microbiologiques**

Streptococcus thermophilus est identifiée comme anaérobie, aérotolérante, à catalase négatif et à Gram positif, groupée en chaînes linéaires de cellules ovoïdes et incapables de croître à 10 °C, à pH 9,6 ou 6,5% de NaCl, hydrolyse l'arginine et l'esculine, fermente le cellobiose, l'inuline, le maltose, le mannitol, le raffinose et N-acétylglucosamine, capacité à croître à 45 °C (**Delorme, 2008**).

❖ **Effet technologiques et probiotiques dans le yaourt**

Streptococcus thermophilus possède des aptitudes texturantes et aromatisantes (acétaldéhyde) arôme majeur du yaourt. Bien que *Streptococcus thermophilus* soit d'origine non humaine, elle est connue pour résister aux conditions acides de l'estomac, une capacité modérée à adhérer à l'intestin et pour survivre le transit gastro-intestinal. Par conséquent, *S. thermophilus* pourrait être considérée comme un transitoire probiotique. En outre, elle améliore la microflore intestinale et la digestion de lactose pour les individus intolérants au lactose, stimule le système immunitaire de l'intestin, produit des quantités élevées d'acide folique extracellulairement. Des effets d'atténuation des risques de certains cancers, l'ulcère et l'inflammation, capacité de déconjugaison des sels biliaires et résistance à la barrière gastrointestinales (suc gastrique et des sels biliaires) sont également des propriétés qui ont été observées chez *S. thermophilus* (**Iyer et al., 2010**).

Annexe 6 : Coloration de Gram

La réalisation de la coloration de Gram passe par les étapes suivantes :

- Préparation du frottis : étalement de l'aliquote bactérien sur une lame puis fixation par la chaleur ;
- Première coloration avec le violet de Gentiane durant environ 1 minute. Tous les éléments sont colorés en violet ;
- Laver à l'eau ;
- Faire agir le mordant, c'est la solution de Lugol durant environ 30 secondes. Le Lugol fixe le violet sur les structures membranaires des bactéries Gram +. Tous les éléments sont colorés en noir;
- Laver à l'eau ;
- Décolorer par la solution éthanol 90°C ; Les bactéries Gram + sont colorées en violet foncé, les autres éléments sont incolores ;
- Laver à l'eau ;
- Colorer à la fuchsine et laisser agir de 1 à 2 minutes ;
- Les éléments tissulaires et les bactéries Gram - sont colorés en rose. Les bactéries Gram + sont toujours colorées en violet ;
- Observer après séchage à l'immersion (objectif $\times 100$) et à pleine lumière.

Annexe 7 : Tableaux des résultats bruts

Les valeurs représentent la moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes.

Tableau I : Effet de l'exposition pendant 180 min aux pH acides sur la viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6

Souche	pH	Concentrations en log UFC/ml			
		0 min	60 min	120 min	180 min
LA-5	2,0	8,9 \pm 0,1	8,8 \pm 0,1	8,6 \pm 0,1	8,4 \pm 0,1
	3,0	9,1 \pm 0,0	9,1 \pm 0,1	8,9 \pm 0,0	8,8 \pm 0,0
	6,8	9,3 \pm 0,0	9,3 \pm 0,1	9,3 \pm 0,0	9,2 \pm 0,0
LB-12	2,0	8,7 \pm 0,0	8,4 \pm 0,2	8,0 \pm 0,2	7,8 \pm 0,4
	3,0	8,8 \pm 0,1	8,7 \pm 0,1	8,6 \pm 0,1	8,2 \pm 0,1
	6,8	9,3 \pm 0,0	9,3 \pm 0,0	9,2 \pm 0,0	9,2 \pm 0,0
ST-M6	2,0	8,6 \pm 0,1	8,5 \pm 0,1	8,3 \pm 0,0	8,0 \pm 0,1
	3,0	8,7 \pm 0,1	8,6 \pm 0,2	8,4 \pm 0,2	8,2 \pm 0,2
	6,8	9,2 \pm 0,2	9,2 \pm 0,1	9,0 \pm 0,4	8,8 \pm 0,5

Les résultats sont exprimés en log UFC/ml, déterminé par dénombrement sur boîtes de gélose.

Tableau II : Effet de l'exposition pendant 240 min aux sels biliaries (0,5%) sur la survie de LA-5, LB-12 et ST-M6

Souche	Sels biliaries (%)	Concentration en log UFC/ml	
		0min	240min
LB-5	0,5	7,9 \pm 0,0	7,6 \pm 0,0
	0	8,1 \pm 0,4	8,1 \pm 0,1
LB-12	0,5	7,6 \pm 0,1	7,2 \pm 0,2
	0	7,9 \pm 0,0	7,8 \pm 0,0
ST-M6	0,5	7,8 \pm 0,0	7,5 \pm 0,1
	0	8,0 \pm 0,0	7,9 \pm 0,0

Les résultats sont exprimés en log UFC/ml, déterminé par dénombrement sur boîtes de gélose par rapport à un témoin non traité.

Tableau III : Viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 pendant 28 jours de stockage frigorifique à 4°C

Souche	Viabilité (%)				
	1j	7j	14j	21j	28j
LA-5	98,1±0,4	97,2 ±0,7	92,1±1,6	86,9±0,3	78,7±0,6
LB-12	98,2±0,0	95,4 ±0,2	92,1±2,0	82,3±3,8	70,1±3,1
ST-M6	98,2±0,0	92,6±2,3	84,8±0,4	78,5±0,3	60,3±4,0

% de viabilité = (UFC après (n) semaines de stockage /UFC initial) × 100.

Tableau IV : Changement des valeurs du pH du lait fermenté inoculé de LA-5, LB-12 et ST-M6, durant la période de stockage réfrigéré à 4°C

Souche	Changement du pH				
	1j	7j	14j	21j	28j
LA-5	4,6±1,2	4,8±0,0	4,4±0,0	4,4±0,1	4,2±0,0
ST-M6 et LB-12	5,5±0,3	5,4±0,4	5,4±0,1	5,2±0,1	5,0±0,1

Tableau V : Viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6 en milieu liquide (bouillon MRS) en présence d'arôme banane utilisé dans l'industrie laitière

Souche	Arôme banane (%)	Viabilité (%)				
		1j	7j	14j	21j	28j
LA-5	0,1	86,9±1,9	84,6±0,7	79,4±1,0	73,4±1,6	67,6±1,8
	0,2	83,43± 0,6	80,7± 0,8	74,1±0,7	60,5±1,1	57,6 ±0,8
LB-12	0,1	84,1 ±2,0	80,3±0,1	74,8± 0,2	71,6± 0,4	54,5 ±1,3
	0,2	81,4± 0,4	78,2 ±1,6	71,5 ±0,5	67,4± 0,6	40,8 ±0,7
ST-M6	0,1	92,9± 0,4	81,3±0,9	80,6±0,5	78,5±0,5	61,2±1,0
	0,2	87,2± 0,5	77,3±0,7	66,8±0,8	66,2±0,8	52,7±0,7

La croissance est exprimée en pourcentage de densité optique de la culture témoin (sans arômes).

La capacité de croissance est estimée après incubation à 37°C pour 24h suite à la période de stockage.

Tableau VI : Viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6, en milieu liquide (bouillon MRS) en présence d'arôme fraise utilisé dans l'industrie laitière

Souche	Arôme fraise (%)	Viabilité (%)				
		1j	7j	14j	21j	28j
LA-5	0,1	85,5±0,6	77,3±0,9	73,5±0,6	67,7±2,0	50,4±0,4
	0,2	85,6 ±0,9	63,6 ±1,8	59,1 ±0,0	39,3± 0,4	18,0± 0,4
LB-12	0,1	84,1± 0,7	75,2± 0,2	73,8±0,4	65,7± 0,8	50,8± 0,8
	0,2	80,9± 0,7	71,2 ±0,7	70,0 ±0,7	59,3± 0,8	18,2 ±0,4
ST-M6	0,1	89,7± 0,8	78,8± 1,1	74,2± 0,4	59,1± 3,0	41,5±1,8
	0,2	86,1± 1,0	74,3± 0,2	68,0 ±0,8	50,8± 0,5	33,4 ±0,7

La croissance est exprimée en pourcentage de densité optique de la culture témoin (sans arômes).

La capacité de croissance est estimée après incubation à 37°C pour 24h suite à la période de stockage.

Tableau VII : Viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6, en milieu liquide (bouillon MRS) en présence d'arôme vanille utilisé dans l'industrie laitière

Souche	Arôme vanille (%)	Viabilité (%)				
		1j	7j	14j	21j	28j
LA-5	0,14	96,4± 1,7	86,0± 1,4	77,4±0,9	68,02±1,2	61,6±0,6
LB-12	0,14	92,5±0,8	87,8± 0,1	84,6±1,2	81,2±0,4	67,5±1,0
ST-M6	0,14	93,8±0,5	89,5±1,2	86,3±0,8	82,1±0,7	59,6±1,01

La croissance est exprimée en pourcentage de densité optique de la culture témoin (sans arômes).

La capacité de croissance est estimée après incubation à 37°C pour 24h suite à la période de stockage.

Tableau VIII : Viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6, en milieu liquide (bouillon MRS) en présence de phosphate de diamidon hydroxypropylé (E1442) utilisé dans l'industrie laitière

Souche	E1442 (%)	Viabilité (%)				
		1j	7j	14j	21j	28j
LA-5	0,2	85,1± 1,1	82,4±0,2	77,9±0,9	74,7±0,4	67,8±0,9
LB-12	0,2	84,2± 0,2	78,6 ±0,3	78,0 ±0,8	74,5±1,4	68,2±0,5
ST-M6	0,2	86,4± 1,2	83,3 ±0,6	71,9±1,0	70,2 ±0,5	51,1 ±0,7

La viabilité est exprimée en pourcentage de densité optique de la culture témoin (sans texturants).

La capacité de croissance est estimée après incubation à 37°C pour 24h suite à la période de stockage.

Tableau IX : Viabilité de LA-5, LB-12 et ST-M6, en milieu liquide (bouillon MRS) en présence de gomme arabique utilisée dans l'industrie laitière

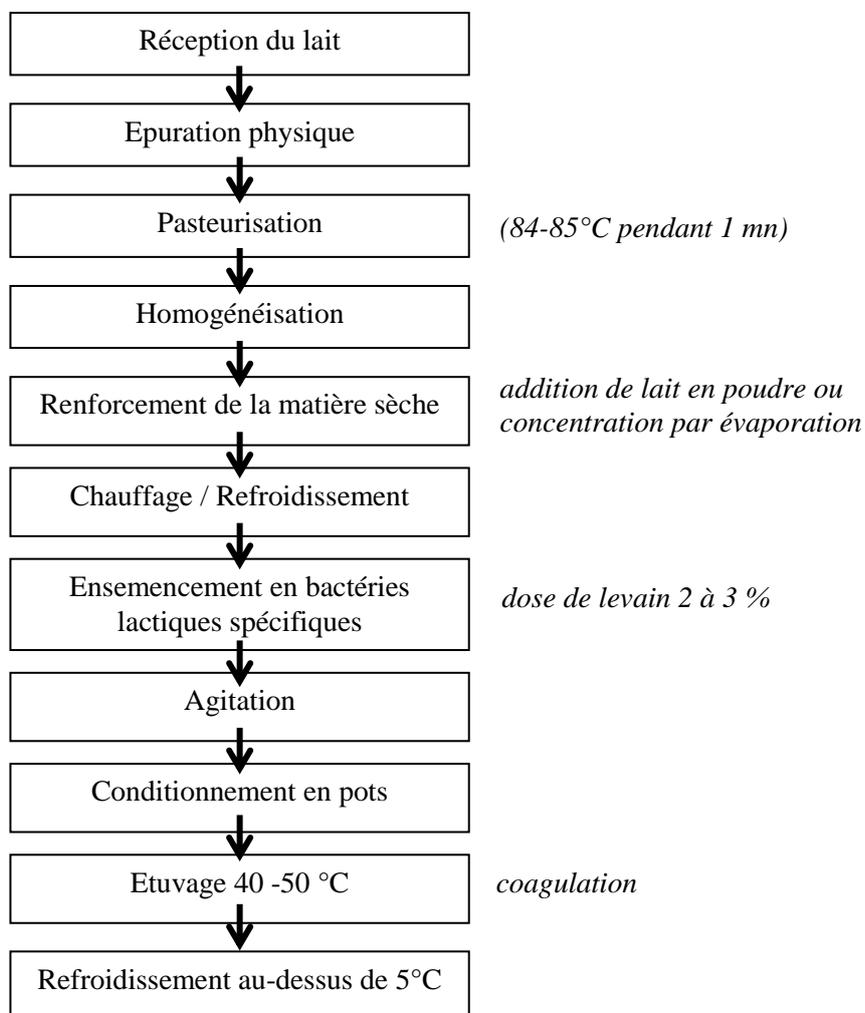
Souche	E414 (%)	Viabilité (%)				
		1j	7j	14j	21j	28j
LA-5	0,1	95,5±0,5%	85,6±0,5%	74,7±0,4%	62,1±0,7%	50,9±0,7%
LB-12	0,1	93,5±0,5%	87,1±1,1%	68,1 ±0,1%	65,8±0,4%	56,4±0,8%
ST-M6	0,1	84,2± 2,8%	79,4±1,0%	71,9 ±0,4%	67,2±0,1%	56,9 ±1,5%

La viabilité est exprimée en pourcentage de densité optique de la culture témoin (sans texturants).

La capacité de croissance est estimée après incubation à 37°C pour 24h suite à la période de stockage.

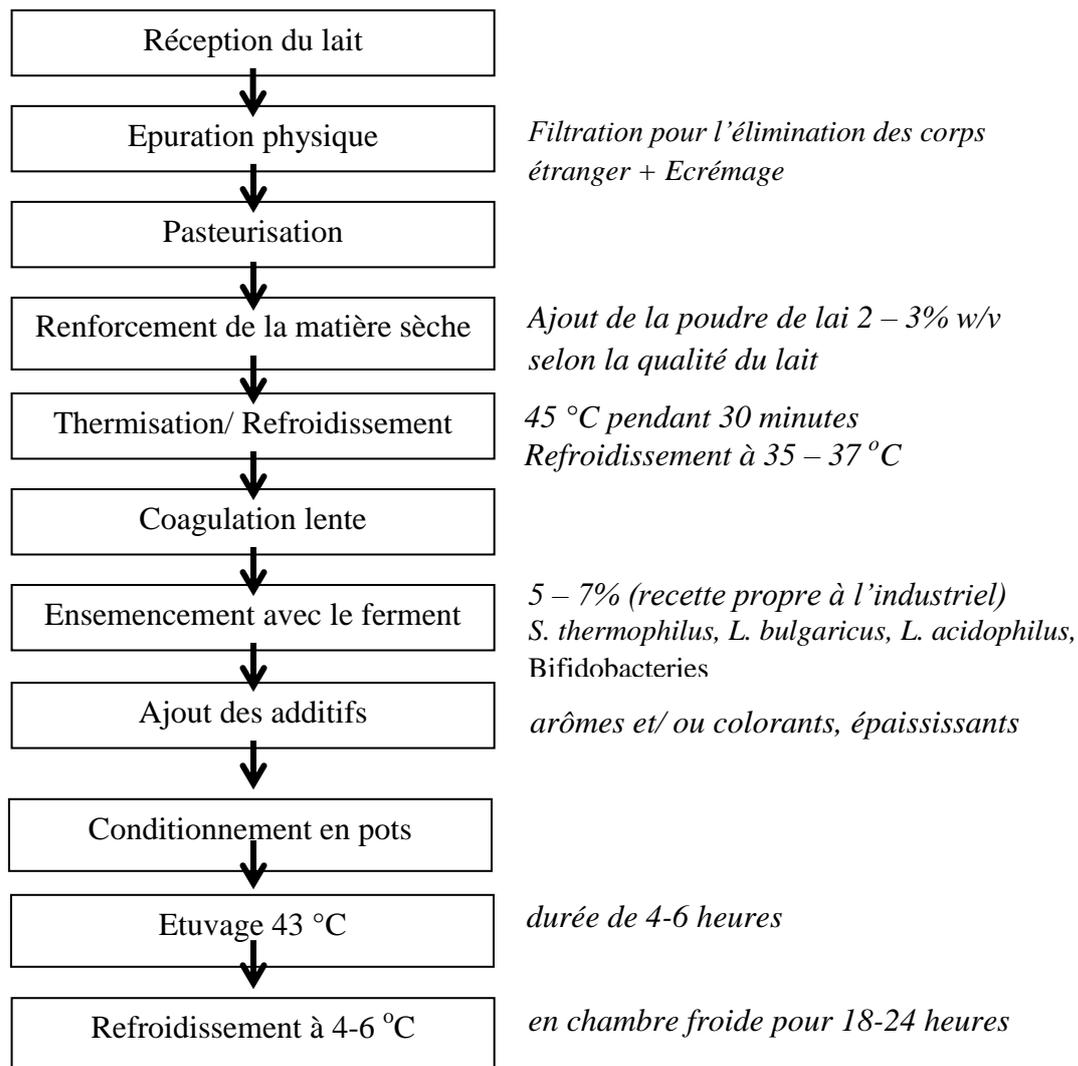
Annexe 8 : Procédé de fabrication du yaourt

Selon le « Guide des déterminations analytiques des laits et produits laitiers »⁶, élaboré par la Direction Générale du contrôle Economique et de la Répression des Fraudes (**Ministère du Commerce, 2005**), le diagramme de fabrication du yaourt est comme suit :



(a)

⁶ <http://www.mincommerce.gov.dz/gtech/GUIDE.pdf>



(b)

Figure III : Procédé de fabrication du yaourt : (a) selon les directives générales du ministère du Commerce, (b) selon les informations qui nous ont été fournies par une entreprise laitière qui fabrique des yaourts probiotiques.

Annexe 9: Photos des colonies isolées sur géloses MRS et M17 et de l'activité antibactérienne

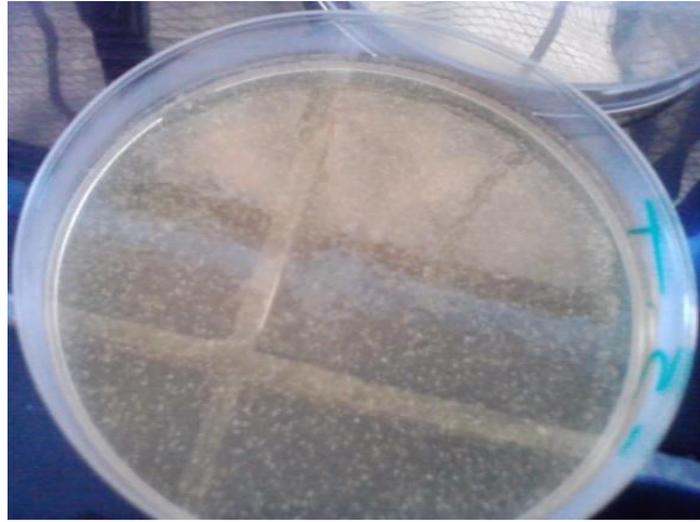


Photo 1 : *Streptococcus thermophilus*

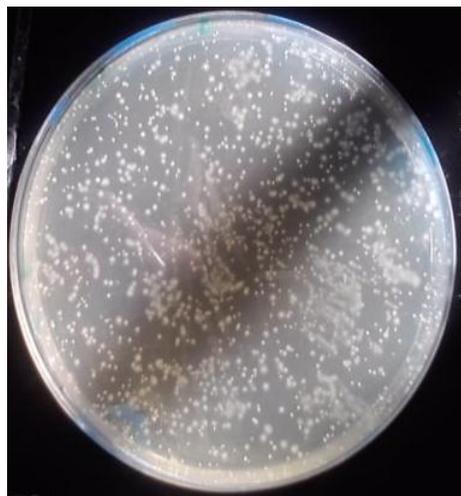


Photo 2 : *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*



Photo 3 : *Lactobacillus acidophilus*

Les photos 4-7 illustrent les effets d'antagonisme entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes.

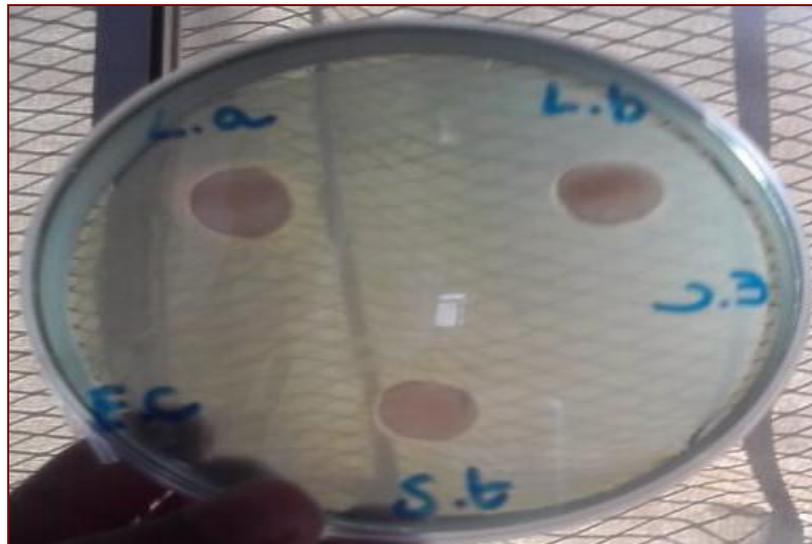


Photo 4 : Activité antagoniste de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* et *S. thermophilus* vis-à-vis de *Escherichia coli*.



Photo 5 : Activité antagoniste de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* et *S. thermophilus* vis-à-vis de *Helicobacter pylori*.



Photo 6 : Activité antagoniste de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* et *S. thermophilus* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.



Photo 7 : Activité antagoniste de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* et *S. thermophilus* vis-à-vis de *Klebsiella spp.*