

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique
Université De BLIDA 1



Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie
Département De Biologie Et De Physiologie Cellulaire

Mémoire De Fin D'étude

En Vue De L'obtention Du Diplôme De Master Académique
En Sciences Biologiques
Option : Microbiologie –Bactériologie

Thème

Effets des anticoccidiens naturels sur la croissance de deux probiotiques

Présenté par :

SEDDIKI Ahlem TAIBI Mouna

Soutenance prévue le:

Devant le jury:

M ^r BOUKHATEM		Président
M ^{me} AISSANI		Examinatrice
M ^r GUETARNI.DJ	P ^r USDB 1	Promoteur
M ^{lle} BENAMIROUCHE.K	CP CRAPC	Co-promotrice

Promotion : 2015/2016

Remerciements

Dans le cadre de la réalisation de ce mémoire de fin d'étude nous remercions :

Tout d'abord Dieu, le tout puissant et miséricordieux, pour nous avoir donné la force, le courage et surtout la patience pour bien accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nos profonds remerciements sont adressés à notre promoteur PR GUETARNI Djamel, professeur l'Université de Blida, pour avoir proposé ce sujet, pour ses conseils scientifiques judicieux et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail malgré ses charges professionnelles.

Nos reconnaissants remerciements à M^{me} BENAMIROUCHE Karima, chercheur promotrice au centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimiques (CRAPC), pour avoir été disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, pour son aide, son soutien, son orientation et ses conseils.

Nous adressons nos sincères remerciements à M^r BOUKHTEM, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury examinant ce travail.

Nous tenons à adresser nos vifs remerciements à M^{me} AISSANI pour l'honneur d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à tous les enseignants et les professeurs du département de biologie de l'université de Blida 1. Pour leurs efforts fournis durant toute la période d'étude ainsi qu'à tous ceux qui ont collaboré d'une façon ou d'une autre à notre formation.

Nous remercions infiniment toute l'équipe de laboratoire, nous avons eu la chance et le plaisir de travailler en collaboration avec eux ainsi pour l'accueil, la disponibilité, l'aide dans la réalisation de ce travail, pour tous le temps consacré pour nous orienter sur les grands titres de notre stage.

Nous remercions aussi tout ce qui ont contribué de près au de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

Avant tous, Mes profonds remerciements vont à ALLAH qui m'a aidé et donné le courage et la patience pour effectuer ce travail.

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents qui ont été toujours à mes cotés pour leur générosité et leurs sacrifices et me donner le courage pour terminer mes études.

*Merci beaucoup et je vous aime beaucoup
(Allah ykhalikoume lya Inchallah)*

A mes frères Oussama et Walid et ma très chère petite sœur Amel

A toute la famille « SEDDIKI » et « DOUA »

A tous les membres de la famille « BEURGVUEL » particulièrement à la merveilleuse madame Lynda, ami Saïd et mon frère Sofiane pour leur générosité et leur compréhension

A monsieur HAMIDENE AHMED

A tous mes amis(es) sans exception surtout : Kenza, Samia, Fatima, Amel, Mehdi, Mohamed...

A tout le personnel du centre de radiothérapie oncologie sans exception de directeur jusqu'au les agents de sécurité

A toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont apporté leur aide en particulier à ami Hessen et Fadja et Bassma.

A tous, du fond de mon cœur je vous dédie ce travail.

A tous mes collègues d'études surtout la promotion de microbiologie

Ahlem...

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents, source à laquelle j'ai toujours puisé courage, confiance et persévérance. Pour tout l'amour qu'ils m'ont toujours porté ; leurs encouragements et leurs grands sacrifices. J'espère que j'ai été à la hauteur de vos espérances. Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers vous. Je vous dédie ce travail en témoignage d'un grand amour et reconnaissance infinie. Que Dieu vous protège, vous comble de santé, de bonheur et vous procure longue et heureuse vie.

A ma très chère sœur que j'aime « Meriem », à mes trois frères « Abderrahmane, Mohamed et Abdelmoumène », Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite. Puisse Dieu, le tout puissant, vous protéger.

A mes amies surtout : Amira, Asma, Mounira, Meriem, Sarah qui m'ont toujours aidé et encouragé. J'espère de tout mon cœur que notre amitié durera éternellement.

A mon grand père et mes grandes mères, que dieu vous comble de santé et de bonheur.

A la mémoire de mon grand père et ma grande mère .Même si corporellement absents, vous êtes et vous serez toujours présents dans mon cœur. J'espère que vous êtes fières de ce que je suis devenue. Que votre âme repose en paix,

A mes oncles et mes tentes, que dieu vous protège.

A tous mes cousins et mes cousines je vous souhaite le succès et la réussite.

A toute ma famille.

A Ma chère amie et binôme Ahlem qui m'a accompagné durant toutes ces années. Merci beaucoup, et à toute sa famille.

A tous les membres de ma promotion.

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

Mouna

RESUME

L'objectif du présent travail consiste en l'évaluation de l'effet de l'anticoccidien naturel à base de la plante *Yucca schidigera* sur l'association probiotique de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Dans la première partie de l'étude, nous avons étudié l'effet de différentes concentrations de l'extrait de *Yucca schidigera* sur la croissance de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae* au milieu solide. Les résultats obtenus ont révélé que les concentrations testées de *Yucca schidigera* n'ont montré aucun effet sur la croissance de *P. acidilactici*, alors des zones d'inhibition de *S. cerevisiae* ont été observées à partir de la concentration 10µl/ml augmentaient considérablement avec la concentration de l'extrait.

Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons évalué l'effet de l'extrait de *Yucca schidigera* sur l'association probiotique de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae* en milieu liquide par suivi de croissance dans différents intervalles de temps et mesure de pH. Les résultats obtenus ont montré que l'enrichissement de milieu de culture par l'extrait de *Yucca schidigera* a affecté le temps de génération ; soit un gain de temps de génération de 8min pour *P. acidilactici*, et un ralentissement de croissance de *S. cerevisiae* à l'ordre de 23min de temps de génération.

Sur la base des résultats obtenus, nous pouvons dire que la formulation à base de l'anticoccidien à base de plante *Yucca schidigera* et les deux probiotiques *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* demeure intéressante comme alternative aux suppléments d'antibiotiques dans l'élevage des volailles, malgré que la levure a montré une sensibilité en présence de cet extrait.

Mots clés : *Yucca schidigera*, *Pediococcus acidilactici*, *Saccharomyces cerevisiae*, temps de génération, probiotiques.

المخلص

الهدف من هذا العمل هو تقييم التأثير الطبيعي لنبات *Yucca schidigera* على مزيج بروبيوتيك من بكتيريا *Pediococcus acidilactici* وخميرة الجعة.

في الجزء الأول من الدراسة، درسنا تأثير تركيزات مختلفة من *Yucca* على نمو كل *Pediococcus acidilactici* و خميرة الجعة في وسط صلب. أثبتت النتائج أن تركيزات *Yucca* المختبرة لم تظهر أي تأثير على نمو البكتيريا *Pediococcus acidilactici* ، في حين لوحظ مناطق تثبيط نمو الخميرة انطلاقاً من التركيز $10 \mu\text{l/ml}$ مع زيادة معتبرة بازدياد تركيز مستخلص *Yucca*.

في الجزء الثاني من الدراسة، درسنا تأثير مستخلص *Yucca* على نمو مزيج *Pediococcus acidilactici* و خميرة الجعة في وسط سائل بتسجيل النمو في فترات زمنية مختلفة و قياس درجة الحموضة. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن اثرء الوسط بالمستخلص النباتي *Yucca* يؤثر على وقت الجيل المقدر بزم من 8 دقائق للبكتيريا و تباطؤ نمو الخميرة بفرق 23 دقيقة.

وبناء على هذه النتائج، يمكننا القول أن التركيب المكون من *Yucca* وكلا البروبيوتيك تظل فعالة و مهمة كبديل للمضادات الحيوية في تربية الدواجن، على الرغم من أن الخميرة أظهرت حساسية في وجود هذا المستخلص.

كلمات البحث:

Yucca schidigera ، *Pediococcus acidilactici* ، خميرة الجعة، وقت الجيل، البروبيوتيك.

Abstract

The objective of this work is the evaluation of the natural anticoccidial effect of the plant *Yucca schidigera* on the probiotic combination of *Pediococcus acidilactici* and *Saccharomyces cerevisiae*.

In the first part of the study, we investigated the effect of different concentrations of *Yucca schidigera* extract on the growth of *Pediococcus acidilactici* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid medium. The results proved that the concentrations tested *Yucca Schidigera* showed no effect on growth of *P. acidilactici*, while zones of inhibition of *S. cerevisiae* were observed from the concentration 10µl / ml increased significantly with the concentration of the extract.

In the second part of the study, we evaluated the effect of *Yucca schidigera* extract the probiotic combination of *Pediococcus acidilactici* and *Saccharomyces cerevisiae* in liquid medium followed by growth in different time intervals and measuring pH. The results obtained showed that the enrichment of culture medium with the extract of *Yucca Schidegera* affected generation time; or save time 8min generation for *P. acidilactici* and *S. cerevisiae* of slowing growth in the order of generation time of 23min.

Based on the results, we can say that the formulation based on the anticoccidial herbal *Yucca schidigera* and both probiotic *P. acidilactici* and *S. cerevisiae* remains attractive as an alternative to antibiotics in the rearing of supplements poultry, although the yeast showed a sensitivity in the presence of the extract.

Keywords: *Yucca schidigera*, *Pediococcus acidilactici*, *Saccharomyces cerevisiae*, generation time, probiotics.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des différents genres microbiens autorisés en tant qu’additifs en alimentation porcine et avicole en Europe (AFCA-CIAL, 2009)6

Figure 2 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques. Adapté de Mercenier et al. ,(2003). 9

Figure 3 : Aspect morphologique de *S. cerevisiae* (Tortora et al., 2003). 18

Figure 4 : Représentation schématique du cycle cellulaire de *S. cerevisiae* (Madigan et al. , 2000). 19

Figure 5 : *Yucca schidigera* : plante et fleur (Bietrix, 2004). 23

Figure 6: Illustration de l’effet de différentes concentrations l’extract de *Yucca schidigera* sur la croissance des probiotiques au milieu solide. 34

Figure 7 : Diagramme de la culture mixte de *P. acidilactici* et de *S. cerevisiae* au présence et absence de l’extract de *Yucca schidigera*. 37

Figure 8 : Culture de *P. acidilactici* sur milieu MRS (photo originale). 38

Figure 9 : Observation microscopique de frottis de *P. acidilactici* (x100) (photo originale)..38

Figure 10 : Culture de *S. Cerevisiae* sur milieu Sabouraud (photo originale). 39

Figure 11 : Observation microscopique de frottis de *S. Cerevisiae* (x100) (photo originale).39

Figure 12 : Illustration de l’effet de différentes concentrations de *Yucca schidegera* sur la croissance de *P. acidilactici* et *S. cerevisiae*. 40

Figure 13 : Courbes de croissance de *P. acidilactici* en association avec *S. cerevisiae* dans le bouillon nutritif seul et enrichis avec un extract de *Yucca schidigera* exprimée en Log UFC/ml 42

Figure 14 : Courbes de croissance de *S. cerevisiae* en association avec *P. acidilactici* dans le bouillon nutritif seul et enrichis avec un extract de *Yucca schidigera* exprimée en Log UFC/ml..... 43

Figure 15 : Courbes de l’évolution de pH lors de la croissance de *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* en association sur milieu nutritif seul ou additionné d’un extract de *Yucca schidigera* 44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau (1): Principaux critères de sélection des probiotiques. Adapté de (Klaenhammer et Kullen, 1999; Saarela et al., 2000; Ouwehand et al. 2002 et Gueimonde et Salminen, 2006)..... 5

Tableau (2) : Principales souches probiotiques commercialisées en Europe (Izquierdo, 2009)..... 8

Tableau (3) : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Salminen et al., 2004 ; Patterson, 2008)..... 10

Tableau(4) : Classification des bactéries lactiques (**Bergey’ , 2009**).....12

Tableau (5): Classification des bactéries lactiques « Pédiocoques » **Bergey’ 2009**..... 14

Tableau(6) : Caractéristiques biochimiques de la souche *P. acidilactici* obtenues par galerie API 50 CH (Lallemand, 2005).....16

Tableau (7) : Principales applications de La levure *S. cerevisiae* (**Camonis, 1990**)..... 21

Tableau (8) : Les différents milieux de cultures utilisés. 30

Tableau (9) : Les équipements de laboratoire utilisés 31

Tableau(10) : Diamètre de zone d’inhibition autour des disques (mm) de différentes concentrations l’extrait brut de *Yucca schidigera* vis-à-vis les *P.a* et *S.c*..... 39

Tableau(11) : Résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 h) de *P. a* et *S. c* en association sur milieu nutritif seul ou additionné d’un extrait de *Yucca schidigera*.....41

LISTE DES ABREVIATIONS

°C: degré celsius

µm: micromètre

ARN: acide ribonucléique

ATB : Antibiotique

B. lactis: *Bifidobacterium lactis*

Bf: bifidobactéries

C. difficile: *Clostridium difficile*

C: cytosine

CO₂: Dioxyde de carbone

FAO: Food and Agriculture Organization

G: guanine

L. rhamnosus: *Lactobacillus rhamnosus*

LAB : lactic acid bacteria

Lb: Lactobacilles

mm: millimeter

MRS: Géluse de Man, Rogosa, Sharpe

NK: Natural killer

OMS: organisation mondiale de la santé

P. acidilactici : *Pediococcus acidilactici*

pH: Potentiel hydrogène

S. cerevisiae : *saccharomyces cerevisiae*

sp: sans précision

Y. schidigera : *Yucca schidigera*

Sommaire

Introduction	1
Partie théorique	3
Chapitre I : LES PROBIOTIQUES	4
I.1.Définition	4
I.2.Critères de sélection des probiotiques	4
I.3.Microorganismes probiotiques	5
I. 4.Les effets des probiotiques	8
Chapitre II : LES BACTERIES LACTIQUES : <i>Pediococcus acidilactici</i>	11
II.1. Définition et caractéristiques générales des bactéries lactiques	11
II.2. Classification des bactéries lactiques	12
II.3. Exigences nutritionnelles	12
II.4. Intérêt des bactéries lactiques	13
II.5. <i>Pediococcus acidilactici</i>	14
Chapitre III : LES LEVURES : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
III.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
III.2. Caractéristiques de <i>S. cerevisiae</i>	18
III.3. Cycle cellulaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
III.4. Condition de culture de la levure <i>S. cerevisiae</i>	20
III.5. Principales applications de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
III .6. Intérêt nutritionnel des levures.....	21
III .7. Intérêt des levures dans la nutrition animale	22
Chapitre IV : LES EXTRAITS DES PLANTES : EXTRAIT DE <i>Yucca schidigera</i>	23
IV.1.Présentation de la plante.....	23
IV.2.Composition chimique.....	24
IV.3.Etude pharmacologique	25
Partie pratique	28
Chapitre I : MATERIELS ET METHODES	29
I.1.Matériels	30
I.2.Méthodes	32

Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSION	38
II.1. Viabilité des probiotiques.....	38
II.2. Effet de l'extrait de <i>Yucca schidigera</i> sur la croissance de <i>Pediococcus acidilactici</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
II.3. Effet de l'extrait de <i>Yucca schidigera</i> sur l'association probiotique de <i>Pediococcus acidilactici</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
Conclusion.....	48
Références bibliographiques.....	50

INTRODUCTION

L'usage des antibiotiques en tant que facteurs de croissance dans l'alimentation des animaux a été interdit en Europe depuis le 1^{er} janvier 2006 et en Algérie en 2012. Dans le souci de maintenir un niveau satisfaisant de production, plusieurs ingrédients additionnels à la ration alimentaire des animaux améliorent la résistance aux maladies et participent par leurs propriétés et leurs molécules bioactives à l'état de santé général des animaux, ont été entreprises récemment comme alternative à l'utilisation des antibiotiques, dont les enzymes, les acides organiques, les extraits des plantes naturelles, les probiotiques et les prébiotiques **(Dorman et Deans, 2000)**.

Les probiotiques se définissent comme un supplément alimentaire de microbes vivants qui a un effet bénéfique sur l'animal hôte. Ils sont présentés comme de futurs ingrédients capables de contrôler le portage et la dissémination d'agents pathogènes et zoonotiques. De nombreux travaux ont montré qu'en plus de l'efficacité zootechnique **(Simon, 2005 et Vittorio et al., 2005)** les probiotiques ont des effets bénéfiques sur la santé des volailles **(Awad et al., 2005 ; Vandeplas et al., 2009 et Higgins et al., 2010)**. Les travaux de Djeddar et al. **(2013 et 2014)** ont montré que l'utilisation de *Pediococcus acidilactici* (Bactocell, souche MA 18/5M) permet certes une amélioration des performances des poulets dans nos conditions d'élevage.

Les extraits de plantes ou certains de leurs métabolites, possèdent diverses activités biologiques ; antimicrobienne, antiparasitaire antioxydant et anti-inflammatoire, pouvant intervenir dans le maintien de la santé de l'animal. D'ailleurs, l'extrait à base de la plante *Yucca schidigera* (Yuquina XO) a montré son efficacité comme anticoccidien dans nos conditions d'élevage de poulets **(Djeddar et al., 2014)**.

Des travaux antérieurs sur les modes d'action des extraits de plantes et des souches probiotiques ont démontré la possibilité de synergie entre ces composants. Kim et al. **(2007)** ont suggéré que des extraits de végétaux et des *Lactobacillus spp.* pourraient être utilisés comme alternatives aux antibiotiques pour l'amélioration des performances de croissance des poulets de chair. Sarker et al. **(2010)** ont rapporté également que le thé vert fermenté améliore la prise de poids et n'a aucun effet négatif sur le profil sanguin des veaux. De même, Kim et al. **(2010)** ont étudié une association entre des plantes médicinales avec des probiotiques et ont conclu que *Alisma canaliculatum*, *Viscum album*, et *Cornus officinalis* avec des probiotiques pourraient être utilisés comme substituts des antibiotiques pour augmenter les performances de croissance et renforcer la réponse immunitaire des porcs en croissance.

En effet, dans une étude menée sur des poulets de chair, Hossain et al. (2011) ont noté que des souches de probiotiques associé avec *Alisma canaliculatum* inhibent la prolifération d'*E. coli*, et n'ont pas d'effets néfastes sur les performances des poulets.

Sur la base de ces observations et en vue d'une application *in vivo*, nous nous proposons d'étudier *in vitro* l'effet de l'anticoccidien à base de la plante *Yucca schidigera* sur l'association probiotique de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae sp.*

Nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Etudier l'effet de l'extrait de *Yucca schidigera* sur la croissance de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae* en milieu solide.
- Etudier l'effet de *Yucca schidigera* sur l'association probiotique de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae* en milieu liquide.

PARTIE PRATIQUE

Chapitre I

MATERIELS ET METHODES

Le présent travail est une continuité de l'étude réalisée dans le cadre d'un mémoire de fin d'étude (**Belkaid, 2014**) portant sur l'évaluation des interactions entre deux probiotiques *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae* et quelques souches pathogènes du tractus digestif du poulet de chair. Les résultats obtenus ayant montré qu'il existe une interaction de type proto-coopération (stimulation) entre *S. cerevisiae* et *P. acidilactici*.

En vue d'une application in vivo de cette association probiotique en élevage de volailles, et vu le problème de la coccidiose pathologie parasitaire très récurrente dans nos élevages, dont les moyens de lutte contre cette parasitose se résument à l'usage d'anticoccidiens chimiques dans l'aliment et l'eau de boisson, et toujours dans un but d'utiliser les produits naturels dites bio, nous nous proposons d'associer avec ces deux probiotiques un extrait naturel à base de la plante *Yucca schidigera* comme anticoccidien.

Pour cela, nous avons lancé la présente étude qui se propose d'étudier l'effet de l'extrait naturel de *Yucca schidigera* sur l'association probiotique de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae* par:

1. L'étude de l'effet de différentes concentrations l'extrait de *Yucca schidigera* sur la croissance de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae* au milieu solide.
2. L'étude de l'effet de *Yucca schidigera* sur l'association probiotique de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae* en milieu liquide par suivi de croissance dans différents intervalles de temps et mesure de pH.

Période et lieu de l'étude

L'ensemble de ce travail a été réalisé au laboratoire de post graduation de biologie (P^f GUETARNI) de l'université de Blida 1, durant la période de mars à septembre 2015.

I.1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé est :

- Deux souches de probiotiques:
 - La bactérie lactique *P. acidilactici* sous la forme de poudre hydrodispersible, commercialisée sous la désignation (Bactocell®) produite par la Société Lallemand.
 - La levure *S. cerevisiae* sous la forme de poudre hydrodispersible, commercialisée sous la désignation (Levucell®) produite par la Société Lallemand
- Un anticoccidien à base de la plante *Yucca schidigera* sous forme d'un liquide «Norponin XO» produit par la société NORFEED SUD (France).

1.2. Milieux de culture et réactifs

Les milieux de culture utilisés lors de ce travail sont rapportés dans (le tableau 8)

Tableau 8 : Les différents milieux de cultures utilisés

Milieu de culture	Utilisation
Gélose MRS « MAN ROGOSA et SHARP »	Culture de <i>Pediococcus acidilactici</i>
Gélose Sabouraud	Culture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Bouillon TSE «Tryptophane Sel Eau »	Diluant
Bouillon nutritif	Milieu pour la technique en milieu liquide
Gélose Muller-Hinton	Milieu pour la technique en milieu solide

Les réactifs utilisés sont :

- Violet de gentiane, lugol et fuchsine pour la coloration de Gram.
- Bleu de méthyle

1.3. Les équipements de laboratoire

Les appareils et les verreries utilisés dans ce travail sont donnés au (tableau 9).

Tableau 9 : Les équipements de laboratoire utilisés

Verrerie	Appareillages	Autres matériel
<ul style="list-style-type: none">• Tubes à essai secs stériles• Pipettes Pasteur• Pipettes graduées stériles (1ml, 5ml et 10ml)• Flacons stériles• Bêchers stériles• Erlenmeyer• Lames• Lamelles	<ul style="list-style-type: none">• Balance• Autoclave• Etuve à 37 °C• Réfrigérateur• Microscope optique• Plaque chauffante• Micropipette (1000µl et 500 µl)• PH mètre	<ul style="list-style-type: none">• Écouvillon sterile• Disques vierges• Microfiltres• Bain marie• Portoirs• Bec bunsen• Boites de Pétri• Eppendorf

I.2. Méthodes

2.1. Revivification des souches

La revivification des probiotiques a été réalisée à partir des cultures lyophilisées. Un aliquote de poudre de *P. acidilactici* est repiqué dans 7ml de bouillon MRS et incubation à 37°C pendant 24h. Pour la poudre de *Saccharomyces Cerevisiae*, un aliquote est inoculé dans 7ml de bouillon Sabouraud et incubé à 25°C pendant 24h. Les suspensions ont été utilisées pour ensemercer par étalement des boîtes de Pétri contenant en préalable ; le milieu gélosé MRS pour *P. acidilactici* laquelle a été incubée à 37°C pendant 48 heures, et le milieu gélosé Sabouraud pour *Saccharomyce Cerevisiae*, laquelle a été incubée à 25°C pendant 5 jours.

Après incubation, des tests ont été réalisés afin de vérifier la viabilité et la pureté de probiotique:

- Observation macroscopique des caractères des colonies: forme, couleur, contour, taille.
- Observation microscopique avec un examen à l'état frais (pour observer la mobilité, la forme, l'arrangement des cellules) suivi d'une coloration de Gram, et de bleu de méthylène.

2.2. Préparation de l'inoculat

- ***Pediococcus acidilactici***

L'inoculum *P. acidilactici* a été préparé par repiquage de deux colonies sur milieu gélosé dans du bouillon MRS pendant 18 heures à 37°C.

- ***Saccharomyces cerevisiae***

L'inoculum de la levure est préparé par ensemenement à partir des étalements sur boîtes dans du bouillon Sabouraud pendant 18 heures à 25°C.

2.3. Etude de l'effet de différentes concentrations l'extrait de *Yucca schidigera* sur la croissance de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae* au milieu solide

2.3.1 Préparation de différentes concentrations d'extrait de *Yucca schidigera*

A partir de l'extrait de *Yucca schidigera* des dilutions ont été réalisé avec l'eau distillée stérile afin d'arrêter différentes concentrations allant de 0.1 à 30µl/ml.

2.3.2. Technique en milieu solide

Nous avons utilisé la méthode des disques (**figure 6**).

- **Ensemencement**

L'ensemencement a été fait selon les étapes suivantes :

- Tremper l'écouvillon stérile dans l'inoculum (*P. acidilactici* ou *S. cerevisiae*).
- Enlever l'excès d'inoculum par pression sur les bords du tube.
- Ecouvillonner régulièrement en frottant délicatement l'écouvillon sur la gélose MRS pour *P. acidilactici* et Sabouraud pour *S. cerevisiae*, en tournant plusieurs fois la boîte de façon à croiser les stries jusqu'à ensemencement de la totalité de la surface.

- **Application des disques**

Des disques d'un diamètre de 6 mm imbibés par l'extrait à différentes concentrations sont déposés à la surface du milieu gélosé ensemencé, en respectant une distance minimale de 30mm entre deux disques.

Nous avons utilisé comme témoin négatif des disques imprégnés d'eau distillée stérile et comme témoin positif des disques imprégnés par l'Ampicilline (antibiotique) et le Fluconazole (antifongique).

- **Incubation**

L'incubation a été faite à la température de 37°C pendant 24h pour *P. acidilactici* et 25°C pendant 48h pour *S. cerevisiae*.

- **Lecture**

Absence ou présence de zones claires autour des disques. Des zones d'un diamètre égal ou supérieur à 8mm sont révélatrices d'une inhibition (Anastasiadou et al., 2008).

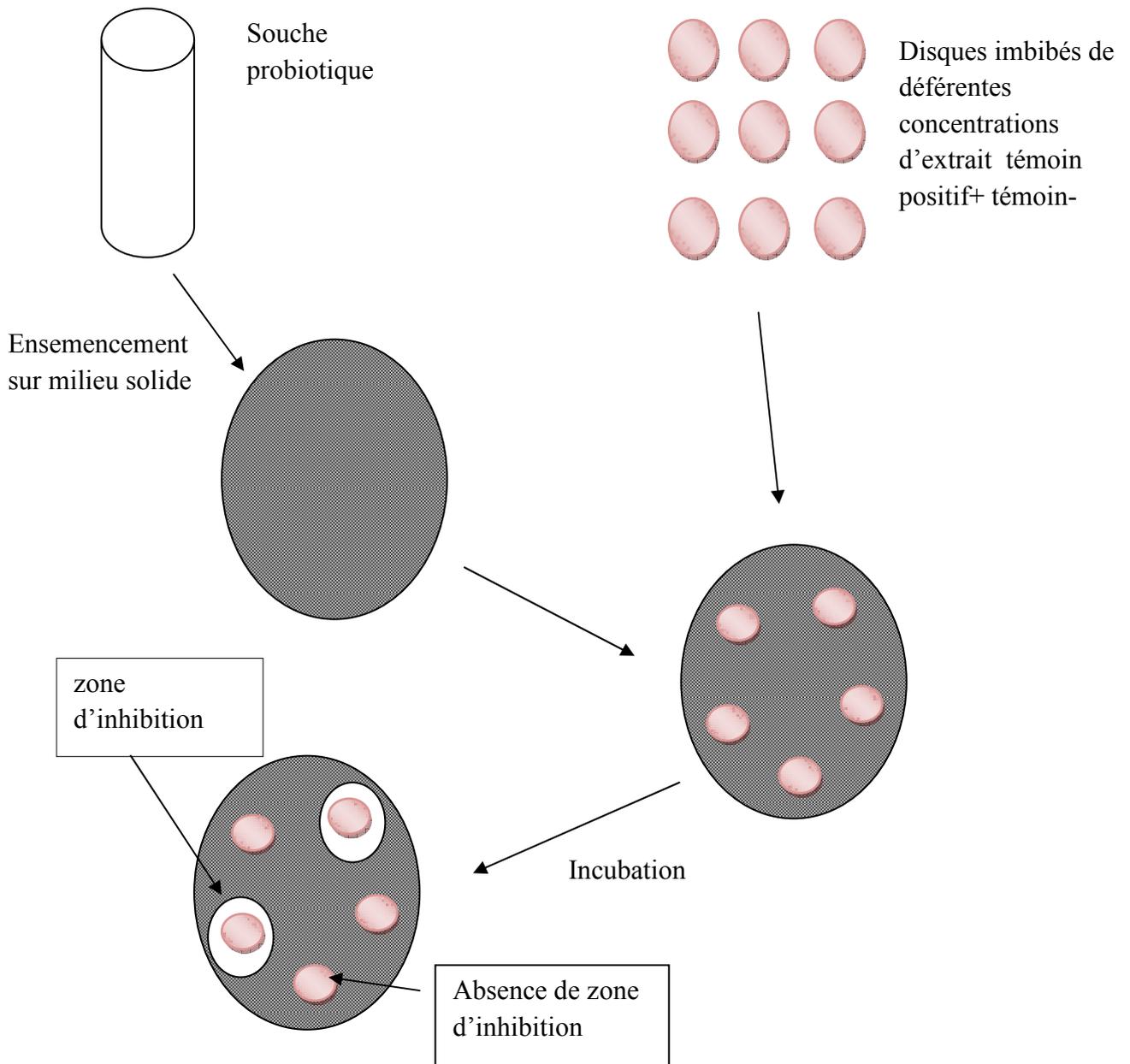


Figure (6) : Illustration de l'effet de différentes concentrations l'extrait de *Yucca schidigera* sur la croissance de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae* au milieu solide

2.4. Etude de l'effet de *Yucca schidigera* sur l'association probiotique de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae*

Afin d'évaluer l'effet de l'extrait de *Yucca schidigera* sur l'association probiotique de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae*, la croissance de chacun d'eux a été suivie dans le bouillon nutritif seul et enrichis avec cet extrait à raison de 1µl/ml de bouillon.

La cinétique de croissance à différents temps (0h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 48h, et 72h) a été évaluée par dénombrement des cellules viables sur milieu gélosé et le pH du milieu cultivé a été mesuré aux mêmes intervalles.

Technique

Deux séries de neuf tubes ont été préparé ; la première, les tubes contenant 10ml de bouillon nutritif sert comme témoin, cependant, la deuxième les tubes ont été remplis avec 10ml de bouillon nutritif additionné de l'extrait de *Yucca schidigera*. Chaque série a étéensemencée à raison 100µl par tube par l'inoculum de *P. acidilactici* et de *S. cerevisiae* préalablement préparés (**figure 7**).

➤ **Mesure du pH**

Le pH du milieu de culture est mesuré au moyen d'un pH mètre à temps réguliers : 0h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 48h et 72h.

➤ **Dénombrement**

Une série de dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ... 10^{-7}) dans des tubes contenant 9 ml de TSE a été préparée pour chaque culture.

Seules les trois dernières dilutions sontensemencées à raison de 0,1ml de chaque dilution sur des boîtes de Pétri contenant au préalable le milieu spécifique pour chaque souche :

- Gélose MRS pour *P. acidilactici*.
- Gélose Sabouraud chloramphénicol pour *S. cerevisiae*.

Après 24h à 48h d'incubation à 37 °C pour *P. acidilactici* et 5 jours à 30 °C pour *S.cerevisiae*, les colonies qui apparaissent dans les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies par boîte sont comptées par observation à l'œil nu ou sous la loupe. Le dénombrement est réalisé selon la formule suivante :

$$N = \frac{\Sigma c}{1,1 \times d} \times V$$

Où : **N** : concentration en cellules viables (UFC/ml), **Σ c** : somme des colonies comptées sur les deux boîtes successives ; **d** : taux de dilution correspondant à la première dilution ; **V** : volume de la suspension ensemencée.

Après on détermine le log du nombre des UFC/ml, le taux de croissance (μ) et le temps de génération (G).

- Taux de croissance (μ , h^{-1}) ou le nombre des divisions qui se produisent dans une heure:

$$\mu = (\text{Log } N - \text{Log } N_0) / (t - t_0) \text{ Log } 2 \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

ou :

N_0 - nombre initial de cellules de milieu, en UFC/cm³

N - nombre de cellules pendant le temps t , en UFC/cm³

t_0 - temps zéro de la détermination, en h

t - intervalle du temps étudié, en h

- Temps de génération (G) représente l'intervalle du temps nécessaire pour le doublage par division d'une seule cellule :

$$G = 1 / \mu \text{ (min)}$$

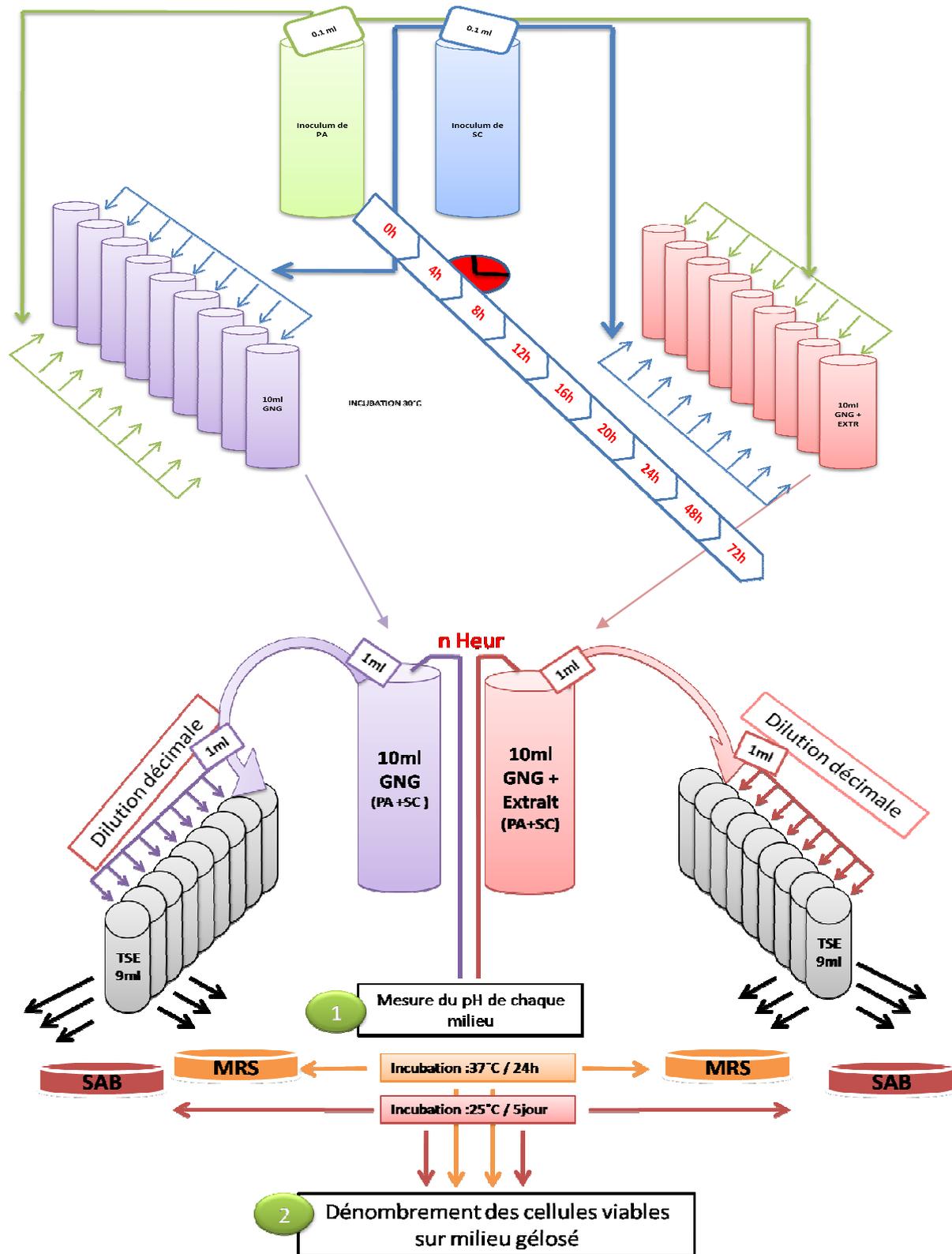


Figure 7 : Diagramme de la culture mixte de *P. acidilactici* et de *S. cerevisiae* au présence et absence de l'extrait de *Yucca schidigera*

Chapitre II

Résultats et discussion

II.1. Viabilité des probiotiques

Après revivification des souches probiotiques, nous avons enregistré :

- **Sur milieu MRS :** l'apparition de colonies rondes mesurant environ 1,5mm de couleur blanchâtre à crème (**figure 8**). L'examen microscopique après coloration de Gram a révélé la présence de cellules microbiennes sous forme de coques réunies en paires et aussi en tétrade et parfois en amas (**figure 9**).
- **Sur milieu Sabouraud :** L'apparition de colonies bombées de 2 à 4 mm de diamètre, de couleur crème brillante (**figure 10**). L'examen microscopique à l'état frais et après coloration au bleu de méthylène montre que ces colonies sont constituées de cellules de forme ovale à ronde, cependant quelques unes présentent sur des sites de leurs parois, des invaginations, ce qui indique le mode de reproduction végétative par bourgeonnement bipolaire (**figure 11**).



Figure 10 : Culture de *P. acidilactici* sur milieu MRS (photo originale)



Figure 11 : Observation microscopique de frottis de *P. acidilactici* (x100) (photo originale).



Figure 10 : Culture de *S. Cerevisiae* sur milieu Sabouraud (photo originale)



Figure 11 : Observation microscopique de frottis de *S. Cerevisiae* (x100) (photo originale).

Nous confirmons donc que les deux probiotiques *P. acidilactici* et *S. Cerevisiae* sont des souches pures et viables.

II.2. Effet de l'extrait de *Yucca schidigera* sur la croissance de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae*

L'effet de l'extrait de *Yucca schidigera* aux différentes concentrations vis-à-vis des deux probiotiques étudiés, représenté par la présence ou l'absence de zone d'inhibition autour des disques, est rapporté dans le (tableau 10) et la (figure 12).

Tableau 10) : Diamètre de zone d'inhibition autour des disques (mm) de différentes concentrations l'extrait brut de *Yucca schidigera* vis-à-vis les *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae*

Témoin / Concentration de l'extrait de <i>Yucca schidigera</i> (µl/ml)	Diamètres de zones autour les disques obtenus avec :	
	<i>P. acidilactici</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Eau distillée	0	0
Fluconazole	/	18
Ampicilline	30	/
0.1	0	0
0.5	0	0
0.7	0	0
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
10	0	8
20	0	10
30	0	15

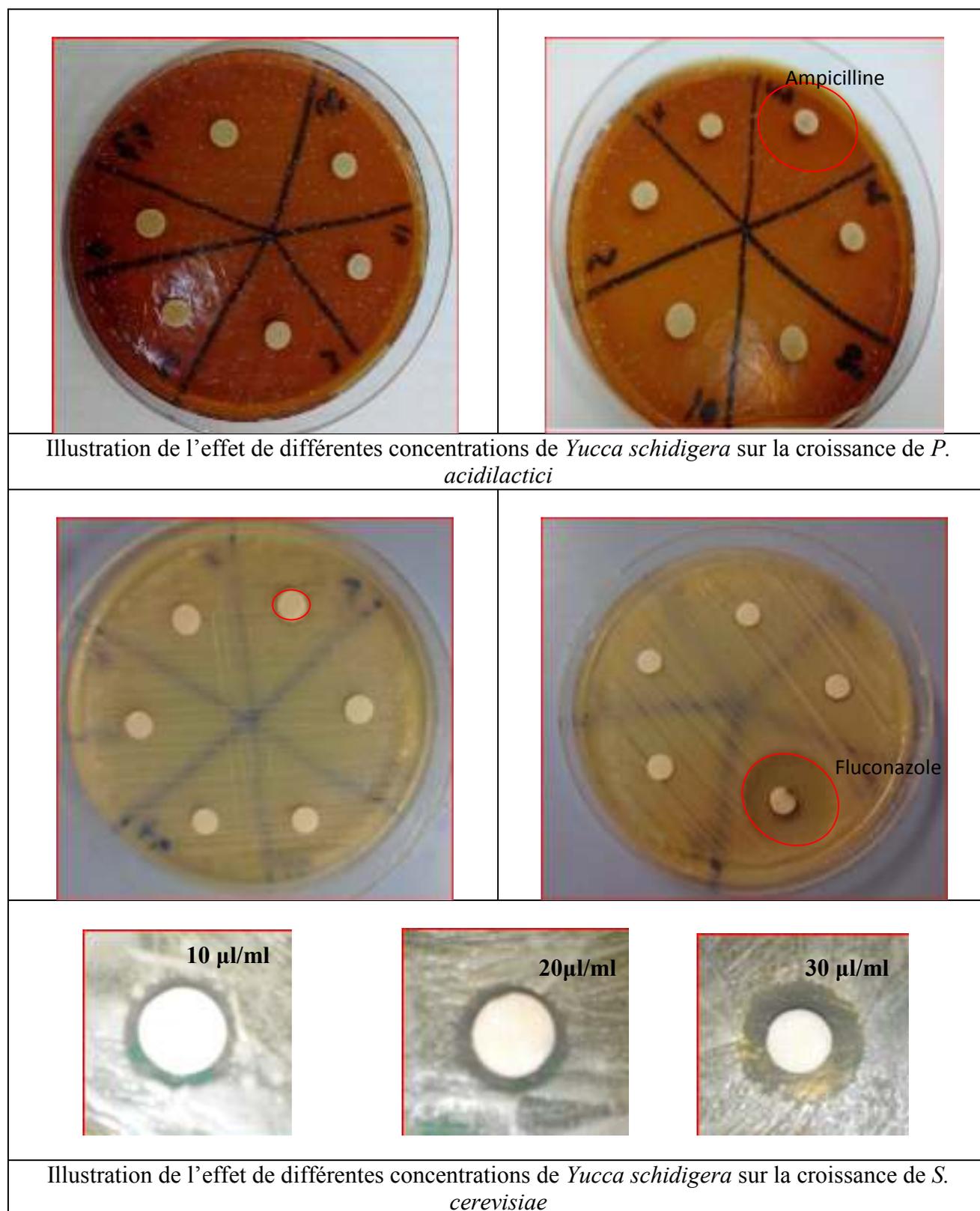


Figure 12 : Illustration de l'effet de différentes concentrations de *Yucca schidigera* sur la croissance de *P. acidilactici* et *S. cerevisiae*

Le traitement des résultats a montré que :

- Les différentes concentrations testées de *Yucca schidigera* n'ont aucun effet sur la croissance *P. acidilactici*.
- La levure *S. cerevisiae* a montré une sensibilité envers l'extrait de *Yucca schidigera*. Les zones d'inhibition observées sont apparues à partir de la concentration 10µl/ml, elles augmentent considérablement avec la concentration de l'extrait.

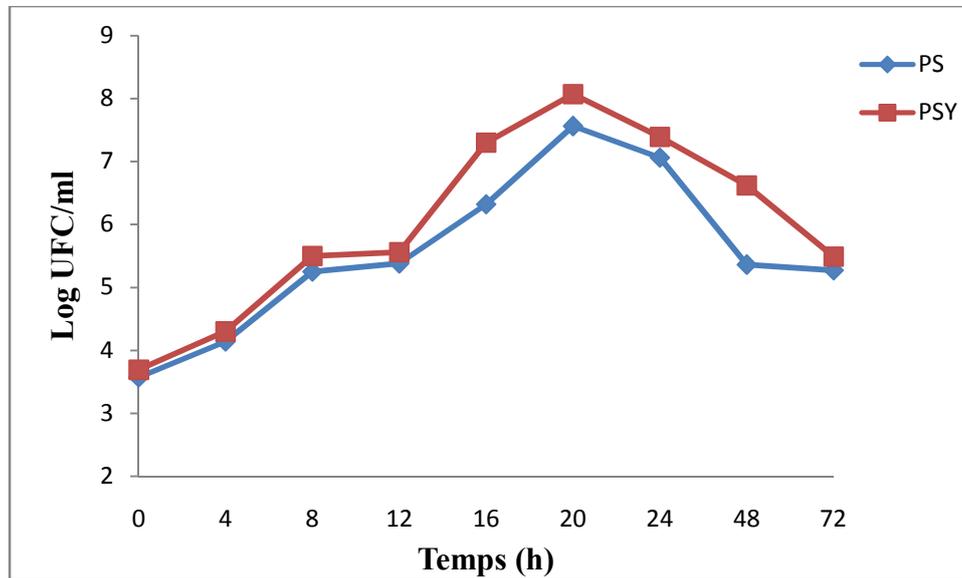
II.3. Effet de l'extrait de *Yucca schidigera* sur l'association probiotique de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae*

Les résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 h) de *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* en association sur milieu nutritif seul ou additionné d'un extrait de *Yucca schidigera* sont rapportés dans le (tableau 11).

Tableau 11 : Résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 h) de *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* en association sur milieu nutritif seul ou additionné d'un extrait de *Yucca schidigera*.

Temps (h)	Bouillon nutritif seul			Bouillon nutritif enrichis avec un extrait de <i>Yucca schidigera</i>		
	Valeurs de cinétique de croissance (LogUFC/ml)		Valeurs de pH	Valeurs de cinétique de croissance (LogUFC/ml)		Valeurs de pH
	<i>P. acidilactici</i>	<i>S. cerevisiae</i>		<i>P. acidilactici</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
0	3.57	3.43	5.30	3.69	3.39	5.6
4	4.14	4.54	4.75	4.30	3.43	5.35
8	5.25	5.00	4.30	5.50	4.56	4.80
12	5.38	6.38	3.70	5.56	4.36	4.45
16	6.32	6.47	3.50	7.30	4.85	3.80
20	7.56	7.49	3.40	8.07	5.20	3.50
24	7.06	8.13	3.20	7.39	5.18	3.35
48	5.36	5.55	2.80	6.62	4.10	3.15
72	5.27	5.33	3.00	5.49	3.97	3.10
Taux de croissance	0.66 h ⁻¹	0.67 h ⁻¹	/	0.72 h ⁻¹	0.30 h ⁻¹	/
Temps de génération	1h 31min	1h 29min		1h 23min	2h	

Les résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) pour la cinétique de croissance (à 72 h) de *P. acidilactici* en association avec *S. cerevisiae* dans le bouillon nutritif seul et enrichi avec un extrait de *Yucca schidigera* sont représentés graphiquement dans la (figure 13) ci-dessous.



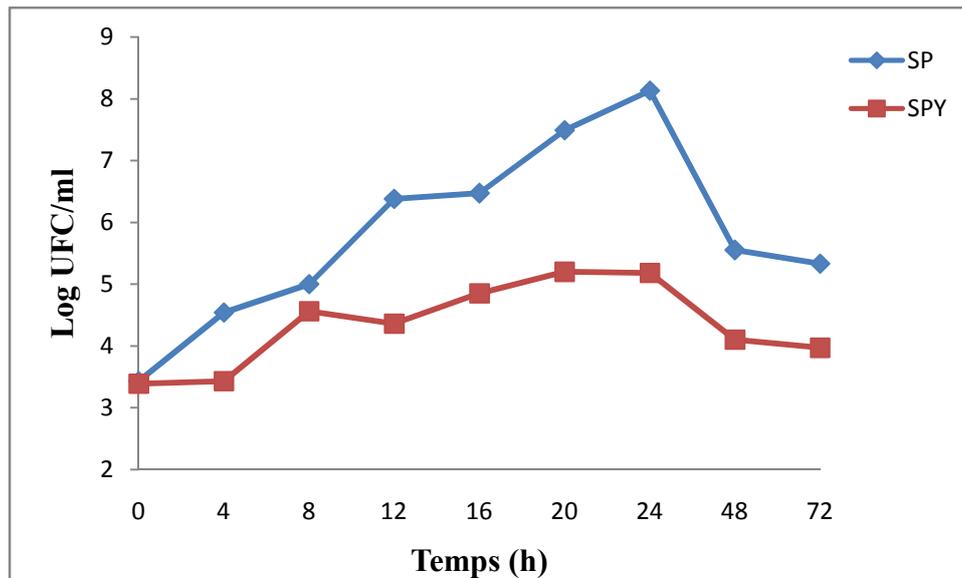
PS: *P. acidilactici* associé avec *S. cerevisiae* cultivé dans le bouillon nutritif seul, PSY : *P. acidilactici* associé avec *S. cerevisiae* cultivé dans le bouillon nutritif enrichi avec un extrait de *Yucca schidigera*

Figure 13 : Courbes de croissance de *P. acidilactici* en association avec *S. cerevisiae* dans le bouillon nutritif seul et enrichi avec un extrait de *Yucca schidigera* exprimée en Log UFC/ml.

Il en ressort que :

- Pour les deux les milieux de culture, *P. acidilactici* évolue positivement durant les 20 premiers heurs de croissance, cependant, après ce moment une diminution de croissance a été enregistrée.
- Le niveau maximal de la population de *P. acidilactici* enregistré après 20 h d'incubation, atteint $3,7 \times 10^7$ UFC/ml lorsque *P. acidilactici* est cultivé au milieu nutritif seul, en parallèle, au milieu nutritif enrichi avec *Yucca schidigera*, cette valeur augmente pour atteindre $1,18 \times 10^8$ UFC/ml.
- Un gain de temps de près de seulement 8 min de temps de génération est signalé lorsque *P. acidilactici* est mis en croissance dans le milieu nutritif enrichi avec l'extrait de *Yucca schidigera*.

Les courbes de croissance de *S. cerevisiae* en association avec *P. acidilactici* dans le bouillon nutritif seul et enrichi avec un extrait de *Yucca schidigera* exprimée en Log UFC/ml sont présentées graphiquement dans la (figure 14)



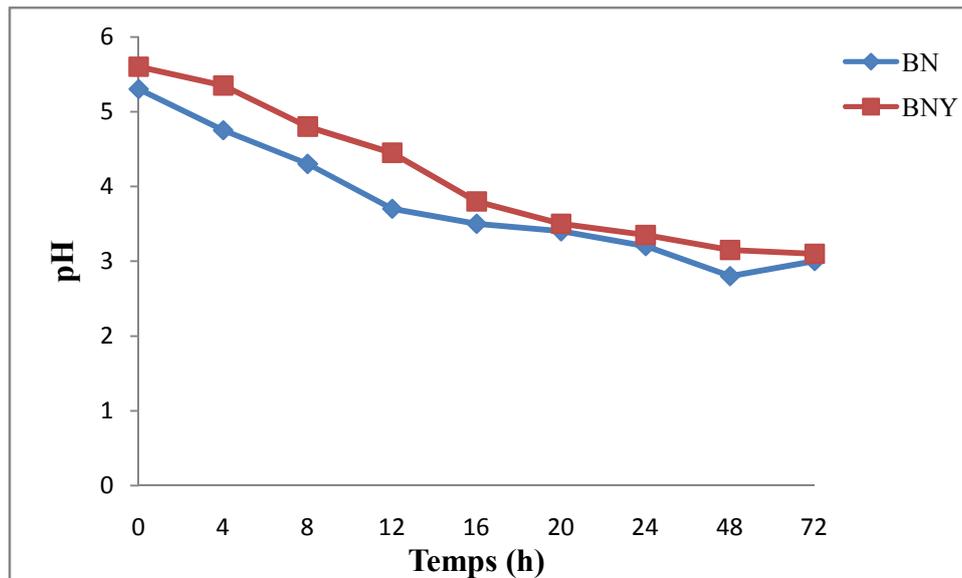
SP: *S. cerevisiae* associé avec *P. acidilactici* cultivé dans le bouillon nutritif seul, SPY : *S. cerevisiae* associé avec *P. acidilactici* cultivé dans le bouillon nutritif enrichi avec un extrait de *Yucca schidigera*

Figure 14 : Courbes de croissance de *S. cerevisiae* en association avec *P. acidilactici* dans le bouillon nutritif seul et enrichi avec un extrait de *Yucca schidigera* exprimée en Log UFC/ml.

Il en résulte que :

- Au milieu nutritif seul, durant les vingt et quatre premières heures, la population de *S. cerevisiae* évolue positivement, puis, un ralentissement a été enregistré. En revanche, au milieu nutritif enrichi avec *Yucca schidigera* une faible croissance a été remarquée.
- La plus grande population de *S. cerevisiae* de l'ordre de $1,36 \times 10^8$ UFC/ml est obtenue lorsqu'elle est cultivée au milieu nutritif seul.
- Le temps de génération de *S. cerevisiae* cultivée au milieu nutritif additionné de *Yucca schidigera* est de 2 h, ce qui montre une augmentation de 23min de temps par rapport celui obtenu au milieu nutritif seul.

Les résultats de l'évolution des valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 heures) de *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* en association sur milieu nutritif seul ou additionné d'un extrait de *Yucca schidigera* sont présentés dans la (figure 15).



BN : *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* en association sur milieu nutritif seul, BNY : *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* en association sur milieu nutritif additionné d'un extrait de *Yucca schidigera*

Figure 15: Courbes de l'évolution de pH lors de la croissance de *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* en association sur milieu nutritif seul ou additionné d'un extrait de *Yucca schidigera* ;

Il en ressort que le pH de deux milieux de culture évolue négativement en fonction du temps d'incubation:

- En milieu de culture sans extrait de *Yucca schidigera*, le pH diminue de 5,30 à 3,00 après 72h d'incubation.
- En milieu de culture additionné de l'extrait de *Yucca schidigera*, le pH diminue de 5,60 pour atteindre la valeur de 3,10 après 72h d'incubation.

Les résultats de l'effet de l'extrait de *Yucca schidigera* sur la croissance de *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* et leur association probiotique seront discutés selon une démarche qui repose sur deux étapes, à savoir :

Etape 1 : Effet de *Yucca schidigera* sur la croissance de *P. acidilactici* et *S. cerevisiae*

A la lumière des résultats de l'essai au milieu solide (méthode des disques) et l'essai au milieu liquide (suivi de croissance de deux probiotiques), nous pouvons dire que l'extrait de *Yucca schidigera* a :

- **Une action stimulatrice vis-à-vis *P. acidilactici* :**

De nombreux travaux ont déjà étudié l'effet des plantes à saponines sur la croissance des bactéries lactiques dans une tentative de développer des compléments alimentaire

naturels en santé humaine qu'en santé animale ; Grandhi et son groupe (1998) ont signalé un effet simulant de l'extrait de *Yucca schidigera* sur la croissance des bifidobactéries. De même, l'étude de Shori, (2013) a révélé que l'addition de soja connu par sa richesse en composées actives (polyphénols, saponines,...) au yaourt stimule la croissance de *Lactobacillus spp.* et *Streptococcus thermophilus*. Aussi, l'équipe de He (2011), ont étudié l'effet des saponines stéroïdes de *Fructus tribuli* sur la croissance des souches de bifidobactéries et de *Lactobacillus acidophilus* par suivi de croissance et mesure de pH, les résultats montraient que ces saponines ont un effet stimulateur de la croissance de bifidobactéries alors ils n'ont pas un effet évident sur la croissance de *Lactobacillus acidophilus*. En revanche, l'étude de Salem *et al.* (2010) a montré que des métabolites secondaires extraits de la plante *Acacia saligna leaves* tels les polyphénols totaux et les saponines ayant des effets négatifs sur la croissance de *L. plantarum*, *E. faecium* isolées de tube digestif de moutons.

- **Une action inhibitrice à l'égard de *S. cerevisiae* :**

L'effet inhibiteur de *Yucca schidigera* et les propriétés antimicrobiennes de leurs substances bioactives, particulièrement les saponines a déjà été rapporté par de nombreux auteurs vis-à-vis quelques levures et bactéries pathogènes (Price *et al.*, 1998 ; Cheek, 1996 et Wallace, 2004). La levure *S. cerevisiae* s'est avérée sensible à l'extrait de *Yucca*, résultat qu'est en accord avec ceux de Killen *et al.* (1998) indiquant que les saponines stéroïdes de *Yucca schidigera* inhibent la croissance *S. cerevisiae* et *Bacillus pasteurii* comme souches test des eucaryotes et procaryotes, respectivement, cette inhibition a été observée seulement avec les populations microbiennes en faible densité, qu'avec les populations denses il y a pas eu d'inhibition. L'étude de Simons *et al.* (2006) montre que les saponines stéroïdes de tomate (α -tomatine and tomatidine) inhibent la croissance de *S. cerevisiae*, cette activité antifongique est généralement attribuée à leurs propriétés de perméabilisation de la membrane de levure. Aussi, Avato *et al.* (2006) ont rapporté l'effet inhibiteur des saponines de *Medicago sp.* vis-à-vis des bactéries ayant un intérêt médical tel : *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*, et aussi à l'égard de la levure *S. cerevisiae* qu'a également montré une sensibilité envers ces saponines.

L'effet antimicrobienne de l'extrait de *Yucca schidigera* est attribué à l'action des saponines (Killen *et Madigan*, 1998) qui provoquent une diminution de la tension de surface de la membrane des cellules microbiennes entre phase hydrophile et hydrophobe causant une fragilisation (Hostettmann *et al.*, 1995) et une perturbation de la membrane (Price *et al.*, 1987) ; action semblable à celle des ionophores (Cheeke, 2001).

La variabilité de la sensibilité des souches probiotiques vis à vis l'extrait de *Yucca schidigera* pourrait s'expliquer par :

- La nature de la souche testée et sa densité : Les travaux de Wang *et al.* (2000) ont montré que certains champignons (*Neocallimastix frontalis* et *Piromyces rhizinflata*) sont plus

sensibles vis-à-vis l'extrait de *yucca schidigera* que les bactéries. Cependant, les travaux de Killen *et al.* (1998), montrent que les saponines de *Yucca schidigera* peuvent empêcher la croissance microbienne à de basses densités cellulaires et n'ont aucun effet sur les populations microbiennes denses.

- La dose de l'extrait : Selon Sen *et al.* (1998) il existe une forte corrélation entre la concentration des saponines et l'inhibition ou stimulation d'*E. coli*.
- La méthode d'évaluation de l'activité biologique, à savoir la méthode de diffusion dans l'agar ou la méthode de dilution. D'après nos résultats, la deuxième méthode est avérée la meilleure. En effet, selon Hammer *et al.* (1999) l'activité antimicrobienne des huiles de citronnelle et d'origan observée était deux fois plus élevée avec la méthode de dilution qu'avec la méthode de diffusion.

Etape 2 : Effet de *Yucca schidigera* sur l'association probiotique de *P. acidilactici* et *S. cerevisiae*

L'étude de Belkaid, (2014) porte sur l'évaluation de l'interaction entre *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* a montré qu'il existe une proto-coopération entre ces deux probiotiques, il a enregistré un gain de temps de génération près de 3h 8min et 1h 50min pour *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* respectivement.

Dans la présente étude, l'enrichissement de milieu de culture de l'association probiotique par l'extrait de *Yucca schidigera* utilisé en élevage de volailles comme anticoccidien a révélé un gain de temps de génération de 8min pour *P. acidilactici*, alors pour la levure *S. cerevisiae* un ralentissement de croissance a été enregistré à l'ordre de 23min de temps de génération ; pour ce qu'est de l'évolution de pH, nous avons enregistré presque la même chute pour les deux milieux de culture (de 5.30 à 3.00 et de 5.60 à 3.10 pour milieu de culture sans extrait et avec extrait, respectivement).

Donc, il apparaît clairement que *P. acidilactici* profite non seulement de la présence de *S. cerevisiae*, selon Roostita et Fleet (1996) et Hencké (2000) au phénomène de proto-coopération les levures profitent des produits du métabolisme bactérien; d'une part et les bactéries bénéficient des vitamines et des acides aminés produits par les levures ou libérés lors de leur lyse, d'autre part, mais aussi de l'ajout de l'extrait de *Yucca schidigera* au milieu nutritif malgré qu'il a montré une action légèrement stimulatrice.

Sur la base des résultats de l'étude de Belkaid (2014) et de notre étude, l'utilisation de l'extrait de *Yucca schidigera* avec l'association probiotique de *P. acidilactici* et *S. cerevisiae*, malgré que la levure a montré une sensibilité en présence de cet extrait; semble intéressante.

Au Corée, l'étude de Hossain et al. (2012) in vivo porte sur la supplémentation d'aliment des poulets de chair par une synergie entre la plante *Alisma canaliculatum* connu par son activité antibactérienne (vis-à-vis *Escherichia coli*) et des probiotiques à base de bactéries lactiques

(*Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111, *Enterococcus faecium* KCTC 2022, *Bacillus subtilis* KCTC 3239) et la levure *Saccharomyces cerevisiae* KCTC, a montré une amélioration des performances zootechniques des poulets et la qualité de viande.

A ce stade, des essais supplémentaires sont nécessaires afin d'optimiser cette formulation à base de probiotiques et des extraits de plantes, de travailler *in vitro* avec différentes concentrations soit de l'extrait ou de probiotiques, en vu d'une application *in vivo* comme alternative aux suppléments d'antibiotiques dans l'élevage des volailles.

CONCLUSION

CONCLUSION

Le présent travail est une continuité des travaux réalisés dans le cadre d'un PFE (voir matériel et méthodes), porte sur l'évaluation de l'effet de l'anticoccidien à base d'extrait de la plante *Yucca schidigera* sur l'association probiotique de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae* en vu d'une application *in vivo* dans nos conditions d'élevage de volailles.

Les résultats obtenus ont montré que :

- Les différentes concentrations de *Yucca schidigera* testées par la méthode des disques n'ont montré aucun effet sur la croissance de *P. acidilactici*, alors la levure *S. cerevisiae* a eu une sensibilité vis-à-vis cet extrait où des zones d'inhibition ont été observées à partir de la concentration 10µl/ml augmentaient considérablement avec la concentration de l'extrait.
- L'enrichissement de milieu de culture par l'extrait de *Yucca schidigera* a eu un effet sur la croissance des deux probiotiques en culture mixte; soit un gain de temps de génération de 8min pour *P. acidilactici*, et un ralentissement de croissance de *S. cerevisiae* à l'ordre de 23min de temps de génération.

L'ensemble de ce travail de mémoire a permis de dire que l'association de l'extrait de *Yucca schidigera* avec les deux probiotiques *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* semble intéressante, malgré que la levure *S. cerevisiae* a montré une sensibilité vis-à-vis cet extrait, des essais supplémentaires sont nécessaires afin d'optimiser cette formulation, de travailler *in vitro* avec différentes concentrations soit de l'extrait ou de probiotiques, en vu d'une application *in vivo* comme alternative aux suppléments d'antibiotiques dans l'élevage des volailles.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I

LES PROBIOTIQUES

Les antibiotiques ont été largement utilisés à des doses sub-thérapeutiques, en production animale, comme facteur de croissance. Cependant, l'apparition de souches de bactéries résistantes ainsi que la présence de résidus dans la viande ont conduit à la recherche d'alternatives aux antibiotiques, parmi lesquelles les probiotiques (**Tisserand, 2009**).

I.1.Définition

Le mot «probiotique» a été proposé en 1974 par Parker pour désigner des micro-organismes vivants dont le mode d'action s'oppose à celui des antibiotiques (pro-anti). Ces probiotiques favorisent l'équilibre des micro-organismes de tout milieu, et en particulier de la flore intestinale (**Parker, 1974**).

Marie-Christiane Moreau, a donné une définition actuelle du mot "probiotique": « Des microorganismes vivants qui peuvent être ingérés en grande quantité sous forme de médicaments (ou suppléments), mais aussi à partir d'aliments comme les laits fermentés ou certains fromages.» (**Moreau.2000**)

La Food and Agriculture Organization des Nations unies (FAO) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) ont établi des lignes directrices pour l'utilisation du ce terme « probiotique » dans les aliments (**FAO/OMS, 2002**) et formulé la définition : « *micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère* ».

I.2.Critères de sélection des probiotiques:

Les micro-organismes potentiellement probiotiques doivent être sélectionnés selon différents critères décrits dans **le tableau 1 (Izquierdo, 2009)**

Tableau 1 : Principaux critères de sélection des probiotiques. (Izquierdo, 2009)

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

I.3. Microorganismes probiotiques

De nombreuses espèces microbiennes ont été utilisées en tant qu'agents probiotiques (**figure 1**).

➤ Bactéries:

- genre *Bacillus*,
- genre *Bifidobacterium*,
- genre *Enterococcus*,
- genre *Lactobacillus*,
- genre *Lactococcus*,
- genre *Streptococcus*

➤ Levures:

→ genre *Saccharomyces*

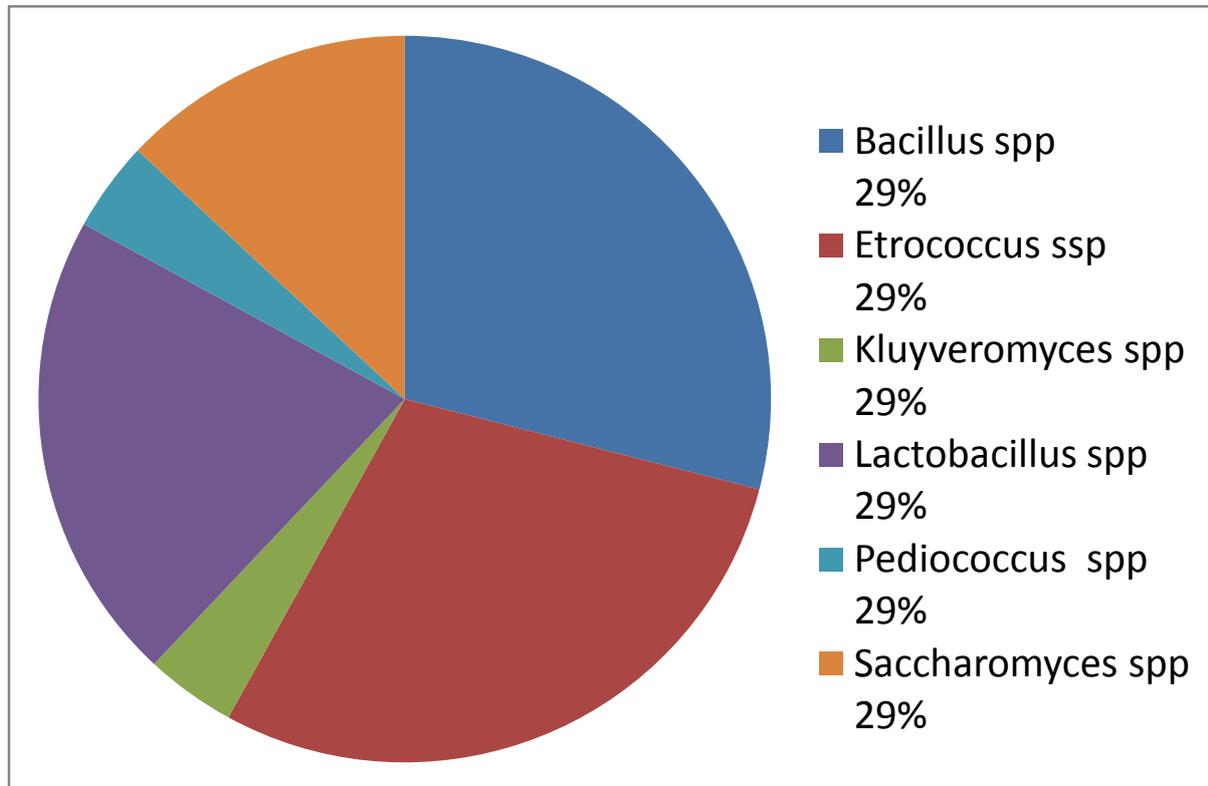


Figure 1 : Représentation des différents genres microbiens autorisés en tant qu'additifs en alimentation porcine et avicole en Europe (AFCA-CIAL, 2009).

I.3.1. Les levures probiotiques

Les levures sont des champignons unicellulaires microscopiques de taille variable (6 à 10 μ m). Elles sont connues depuis très longtemps et employées en alimentation (œnologie, boulangerie,...) Et en santé humaine (synthèse d'antibiotiques, régulation de la flore digestive). Par ailleurs les extraits de levures sont largement utilisés pour la culture des bactéries du fait de la richesse des levures en nutriments et facteurs de croissances nécessaire à la croissance bactérienne. La principale espèce utilisée en alimentation animal est *saccharomyces cerevisiae* son emploi a eu des effets contrastés (effets nuls et positifs) à la fois sur les fermentations ruminales et les performances zootechniques. (Desnoyers et al., 2009)

I.3.2. Les bactéries lactiques probiotiques

Les bactéries lactiques (lactic acid bacteria ou LAB) constituent un groupe hétérogène de bactéries bénéfiques (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* *Bifidobacterium*...) qui ont

en commun la capacité de produire de l'acide lactique comme produit final des fermentation, cette propriété est exploitée par l'homme depuis des milliers d'années pour la production de produits fermentés . Les propriétés métaboliques de ces bactéries sont encore exploitées mais à plus grande échelle et l'une de leur application consiste à les utiliser comme probiotiques pour améliorer la santé humaine et animale grâce à leur effet bénéfiques sur la microflore de l'hôte (**Bernardeau et al.,2006**). En plus de l'effet de la santé, chez l'animal, cette supplémentation a aussi pour but d'améliorer la croissance (efficacité alimentaire, gain de poids, production de lait).

Les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont majoritairement utilisés pour des applications en nutrition humaine, alors que les genres *Bacillus*, *Enterococcus* sont les micro-organismes les plus appliquées dans les élevages (**Simon et al., 2001**)

Les lactobacilles, avec une grande diversité d'espèces, représentent aujourd'hui 21% des souches utilisées comme additifs en alimentation porcine et avicole, 3^{ème} groupe microbien après les genres *Bacillus* et *Enterococcus* représentant chacun 29% des utilisations(**AFCA-CIAL, 2009**).

Les principales souches probiotiques commercialisées en Europe sont décrits dans le (**tableau 2**)

Tableau2: Principales souches probiotiques commercialisées en Europe (Izquierdo, 2009).

Espèces	Firme	Espèces	Firme
<i>Lb. acidophilus</i> La5	Chr Hansen	<i>Streptococcus thermophilus</i> 1131	Meiji Milk
<i>Lb. acidophilus</i> NCFM	Rhodia	<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Cernelle
<i>Lb. bulgaricus</i> 2038	Meiji Milk	<i>P. acidilactici</i> Bactocell®	Lallemand.
<i>Lb. casei</i> CRL431	Chr Hansen	<i>Sc. boulardii</i>	Biocodex
<i>Lb. casei</i> DN114001	Danone	Ultra-levure®	
<i>Lb. casei</i> Shirota	Yakult		
<i>Lb. johnsonii</i> La1	Nestlé		
<i>Lb. plantarum</i> 299v	ProViva		
<i>Lb. reuteri</i>	BioGaia		
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Valio		
<i>Bf. breve</i> Yakult	Yakult		
<i>Bf. lactis</i> Bb12	Chr Hansen		
<i>Bf. longum</i> BB536	Morinaga		
<i>Bf. animalis</i> N173010	Danone		

I.4. Les effets des probiotiques

Les probiotiques ont des effets multiples sur la santé. Ces effets dépendent notamment de l'espèce et de la souche de micro-organisme utilisé. Il faut que les probiotiques ingérés survivent à la traversée du tube digestif, en particulier l'estomac, et s'installent en quantité suffisante dans l'intestin. Donc, les souches de probiotiques mis sur le marché à des fins nutritionnels ou physiologiques ont été sélectionnées selon différents critères (capacité de colonisation de l'intestin, antagonisme avec les pathogènes, résistance à l'acidité et à la toxicité biliaire etc...) (Brassar et chifrin, 2000).

D'après (P. Marteau, J-C. Ramb 1998) les probiotiques ont montré :

- Des effets protecteurs envers des infections :
 1. Diarrhées infectieuses.
 2. Infections microbiennes du système digestif.
 3. Infections microbiennes du système urogénital.

Ainsi, les probiotiques ont un effet barrière, ils s'opposent au développement de bactéries pathogènes par **D. Rigaud.(2003)**

- La sécrétion de molécules antibactériennes,
- La production d'acides gras volatils (qui inhibent la croissance cellulaire) et/ou l'occupation des récepteurs d'accroche qui permettent à une bactérie d'adhérer à la muqueuse intestinale,
- L'inhibition de la production ou des effets de toxines bactériennes, la compétition pour les substrats.

Donc plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques. La (**Figure 2**) et le (**tableau 3**) illustrent la diversité des effets santé documentés et rapportés dans la littérature.

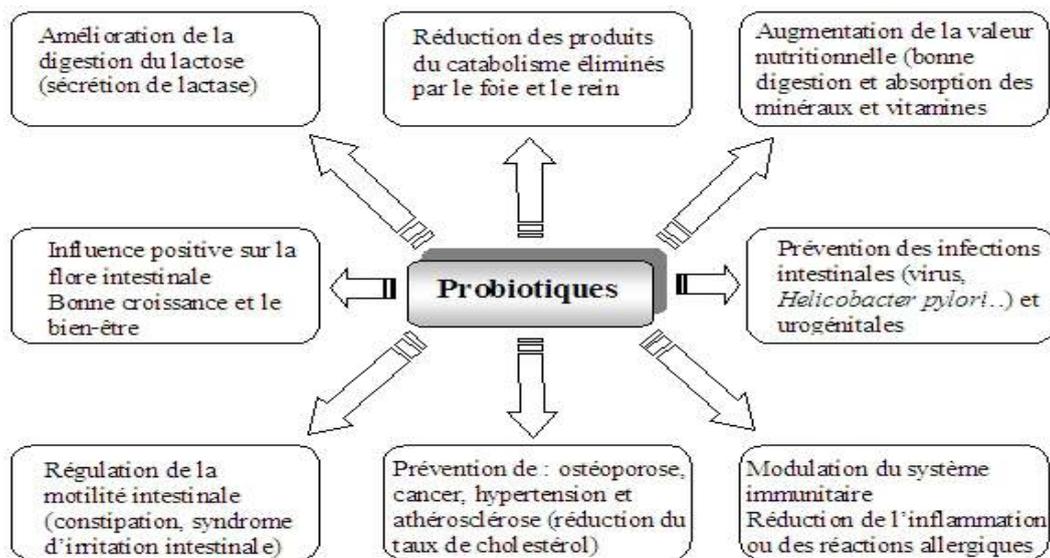


Figure 2: Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques. **Adapté de Mercenier et al. (2003)**

Tableau 3 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Salminen et al., 2004 ; Patterson, 2008).

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autres effets
<p><u>Contrôle des troubles suivants :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Mauvaise digestion du lactose - Diarrhée due aux rotavirus et diarrhée-associée aux antibiotiques - Syndrome du côlon irritable - Constipation - Infection par <i>Helicobacter pylori</i> - Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle - Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin <p>Prévention de l'entérocolite nécrosante du nouveau-né</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Modulation immunitaire - Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation - Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella, Shigella</i>) 	<p><u>Réduction du risque de :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein) - Coronaropathie - Maladie des voies urinaires - Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes <p>Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle</p>

CHAPITRE II

LES BACTERIES LACTIQUES : *Pediococcus acidilactici*

Les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes dont les ancêtres auraient pu voir le jour il y a trois milliards d'années. Elles seraient donc apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques qui ont transformé l'atmosphère terrestre ancienne sans oxygène en atmosphère aérobie (Drider et Prevost, 2009).

II.1. Définition et caractéristiques générales des bactéries lactiques

II.1.1. Définition

Les bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique (Djidel, 2007) sont des cellules procaryotes organotrophes ubiquitaires, formant un groupe hétérogène constitué de Cocci et de Bacilli (Badis et al., 2005). Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50% (Ababsa, 2012). Elles se retrouvent dans différents types d'habitat (Matamoros, 2008). Ce dernier est extrêmement varié : lait, végétaux, peaux des animaux, eau de mer, eau douce, poisson, viande excréments et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Hadeef, 2012).

II.1.2. Les caractéristique des bactéries lactiques

- Elles décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, elles constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique (Fedrighi, 2005).
- Bactéries à Gram positif, immobiles, asporulées, catalase et oxydas négative, nitrate réductase négative, anaérobies ou aérotoleérantes (Laurent et al., 1998).
- Elles ont une forme de Cocci ou des bâtonnets (Bourgeois et Larpent, 1996)
- Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance : vitamine B, acide aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques.
- Elles produisent des quantités abondantes d'acide lactique par fermentation de substances carbonées.
- Elles se caractérisent par un métabolisme exclusivement fermentaire qui les conduit à produire à partir du glucose de quantités importantes d'acide lactique, accompagné dans certains cas d'autres métabolites (éthanol, CO₂ autres acides organiques)
- Elles ont une faible capacité de biosynthèse (Luquet, 1986).
- Elles produisent des quantités abondantes d'acide lactique par fermentation de substance carbonée.

II.2. Classification des bactéries lactiques

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur :

- ✓ la morphologie,
- ✓ le mode de fermentation de glucose,
- ✓ la croissance à différentes températures,
- ✓ la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6,5%, 18%),
- ✓ La tolérance aux pH acides, alcalins et à l'éthanol,
- ✓ la configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose,
- ✓ l'hydrolyse de l'arginine,
- ✓ la formation d'acétoïne, etc.

Les marqueurs chimio taxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (**Konig et Frohlich, 2009**). L'identification des espèces de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbo-hydrates à l'aide du système API50CH (**Curk et al. ,1993**). L'analyse comparative des séquences d'ARN ribosomal 16S a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (**Salminen et al. ,2004**).

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009) (**tableau 4**), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes , la Classe des Bacilli et l'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente cinq genres répartis sur six familles. Parmi ces genres , seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de : *Aerococcus* , *Carnobacterium* , *Enterococcus* , *Lactobacillus* , *Lactococcus* , *Leuconostoc* , *Oenococcus* , *Pediococcus* , *Streptococcus* , *Vagococcus* , *Tetragenococcus* , *Weissella* (**Dridier et Privost, 2009**).

Tableau 4 : Classification des bactéries lactiques (**Bergey' , 2009**)

Règne	Bacteria
Embranchement:	Firmicutes
Classe:	Bacilli
Ordre:	Lactobacillales
Famille:	Lactobacillaceae

II.3. Exigences nutritionnelles

Les bactéries lactiques ont une faible aptitude biosynthétique et sont en principe incapables d'assimiler directement les principaux précurseurs de leur environnement. Elles sont considérées comme un groupe bactérien le plus exigeant du point de vue nutritionnel, car elles requièrent non seulement des substrats carbonés, azotés, phosphatés et soufrés mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligoéléments dont le rôle des coenzymes est plus important (**Boudjema, 2008**).

II.3.1- Exigences en acides aminés

Les bactéries lactiques sont en principe incapables d'effectuer la synthèse des acides aminés, et doivent par conséquent faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme (Luquet, 1986).

II.3.2- Exigences en vitamines

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser les vitamines qui jouent un rôle irremplaçable de coenzymes dans le métabolisme cellulaire.

II.3.3- Exigences en bases azotées

Les bases puriques et pyrimidiques ne sont pas vraiment essentielles au métabolisme des bactéries lactiques (Desmazeaud, 1983).

II.3.4- Exigences en cations

(Boudjema, 2008) a montré le rôle précis des cations dans la résistance à l'oxygène, dans les différentes réactions métaboliques et dans la nutrition des bactéries lactiques.

II.3.5- Exigence en glucides

Pour croître, les bactéries lactiques ont besoin d'un apport de nutriments comportant au moins un sucre fermentescible comme source d'énergie. La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes : Premièrement, le transport du sucre à travers la barrière hydrophobe de la membrane cellulaire. Deuxièmement, le catabolisme intracellulaire du sucre et enfin la formation et l'expulsion extracellulaire des métabolites terminaux généralement acides (Monnet et Gripon, 1994). Deux types de métabolismes fermentaires sont rencontrés. Un métabolisme aboutit de façon quasi-exclusive à la production d'acide lactique (caractère homo-fermentaire). L'autre peut produire de l'acide lactique, mais également de l'éthanol et de l'acide acétique suivant les conditions de cultures (caractère hétéro-fermentaire) (Renouf, 2006).

II.4. Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

II.4.1- Dans l'industrie alimentaire

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bio conservation de différents aliments ainsi les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem et al., 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis et al., 2005). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservation chimique grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart, 2009). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères:

- Absence de pathogénicité ou activité toxique,

- Capacité de d'améliorer les caractéristiques organoleptiques,
- Capacité de dominance, facilité de culture et de conservation,
- Et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001) .

II.4.2- Dans le domaine thérapeutique

Etant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem et al. ,2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs type de diarrhées (Mkrтчan et al. ,2010). D'autre ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El .Ghaish et al. ,2011 et Uehara et al. , (2006), ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires à empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

II.5. Pediocoques:

Les Pédiocoques appartiennent au groupe des bactéries lactiques et peuvent être classés phylogénétiquement de la façon suivante (Bergey' 2009).(Tableau 5)

Tableau 5 : Classification des bactéries lactiques « Pédiocoques » (Bergey', 2009).

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Lactobacillales</i>
Famille	<i>Lactobacillaceae</i>
Genre	<i>Pediococcus</i>

- ✓ Ces bactéries sont des microbes GRAM+.
- ✓ Strictement homofermentaires produisant, à partir d'hexoses, de l'acide lactique DL ou L(+) selon les espèces, l'espèce *acidilactici* ne produisant que le type L(+).
- ✓ Les cellules sont sphériques (coques), organisées en diplocoques voire en tétrades, et ne forment jamais de chaînettes.
- ✓ Les colonies mesurent de 1,0 à 2,5 µm de diamètre et ont une couleur allant du gris-blanc au blanc-crème.
- ✓ Toutes les espèces se développent bien à 30°C, et leurs températures optimales de croissance sont comprises entre 25°C et 40°C.
- ✓ Leur croissance est dépendante de la présence de sucres fermentables, de facteurs de croissance (vitamines : acide nicotinique, biotine, acide pantothenique) et d'acides aminés.
- ✓ Elles ont généralement une faible activité protéolytique et une incapacité à utiliser le lactose, ce qui les empêche d'acidifier et de coaguler le lait.

- ✓ Les pédiocoques ne possèdent pas d'activité catalase ni de cytochromes, bien que l'existence d'une pseudo-catalase ait été détectée chez *P. acidilactici* et *P. pentosaceus*.
 - ✓ Du point de vue phénotypique, ce genre est plus proche des genres *Lactobacillus* que des autres bactéries lactiques. Les différentes espèces peuvent être discriminées par leur sensibilité à la température, au pH et à la concentration en chlorure de sodium.
 - ✓ Toutes les espèces peuvent être cultivées sur milieu MRS (**Rogosa et Sharpe, 2005**).
- ***Pediococcus acidilactici***

Pediococcus acidilactici est une bactérie Gram⁺, non sporulante. Les cellules se présentent sous forme de coques d'environ 1µm de diamètre, groupées par paires ou par tétrades. Sa mise en culture est effectuée sur milieu MRS à une température de 45°C. Elle forme alors des colonies d'un diamètre compris entre 1 et 2,5 mm, de couleur blanche, opaque, de forme ronde et d'une surface lisse. La croissance de cette souche dépend de la disponibilité en glucides fermentescibles dans le milieu. Elle est entre autre capable de fermenter des glucides simples comme le glucose, le fructose, le galactose, le mannose ou encore l'N-acétylglucosamine. Elle est susceptible de se développer dans une gamme de pH compris entre 4,2 et 8. *Pediococcus acidilactici* ne présente aucune activité protéolytique et aucune activité anti-microbienne n'a été détectée contre 8 espèces bactériennes, parmi lesquelles *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* (**Lorgeoux, Bénédicte, 2007**). Les caractéristiques biochimiques de la souche, basées sur sa capacité à fermenter certains sucres, sont présentées dans le **tableau(6)**.

Pediococcus acidilactici utilise comme probiotique, il présente des effets positifs sur l'équilibre et le rôle de la flore intestinale (**Jin et al., 2000**) tout en améliorant également les performances de l'animal (**Simon et al., 2001**). *P. acidilactici* renforce l'écosystème microbien des volailles, contribue à la défense immunitaire et protège les poulets contre les conséquences de stress tels que la vaccination ou les changements de températures. Une amélioration de la consommation, du gain de poids et de l'indice de consommation a été observée (**Jin et al., 1998 et Simon et al., 2001**).

Tableau 6 : Caractéristiques biochimiques de la souche *P. acidilactici* obtenues par galerie API 50 CH (Lallemand, 2005).

Glycérol	(-)	Starch	(-)	Xylitol -	(-)	D-Xylose	(+)
Mannitol	(-)	D-arabinose	(-)	Ribose	(+)	Amygdalin	(-)
D-Raffinose	(-)	αMethyl	(-)	NAcetyl Glucosamin	(+)	D- Turanose	(-)
Erythritol	(-)	D-mannoside	(-)	βGentiobiose	(-)	L-Xylose*	(-)
Erythritol	(-)	Glycogen	(-)	D-Lyxose	(-)	Arbutin	(-)
Sorbitol	(-)	L-arabinose	(+)	Esculin	(+)	Adonitol	(-)
αMethyl	(-)	D-glucoside	()	D-Tagatose	(+)	Galactose	(+)
βMethyl	(-)	Salicin	(-)	D-Fucose	(-)	Cellobiose	(+)
Xyloside	(-)	L-Fucose	(-)	D-Glucose	()	Maltose	(-)
D-Arabitol	(-)	D-Fructose	(+)	Lactose	(-)	L-Arabitol	(-)
D-Mannose	(+)	Malibiose	(-)	Gluconate	(-)	L-Sorbose	(-)
Sucrose	(-)	2ceto-gluconate	(-)	Rhamnose	()	Trehalose	(+)
5ceto-gluconate	(-)	Dulcito-	(-)	Inuline	(-)	Inositol	(-)
Melezitose	()						-

CHAPITRE III

LES LEVURES : *Saccharomyces cerevisiae*

Les Levures sont des Champignons microscopiques unicellulaires qui se multiplient par bourgeonnement ou sporulation. il existe plusieurs centaines d'espèces, quelques unes présentent un grand intérêt industriel du fait de leur pouvoir fermentaire (**Ripert, 2013**).

Les représentants les plus utilisés par l'homme sont les levures de bière et de boulangerie, agents très actifs de la fermentation alcoolique. La levure de boulangerie, produite industriellement et vendue sous forme de pains cubiques, est donc un amas de cellules vivantes.

S. cerevisiae est l'organisme eucaryotique dont la biologie cellulaire est la mieux étudiée pour les raisons suivantes :

- Importance industrielle ;
- Simplicité de l'organisation unicellulaire et la croissance rapide dans les conditions de laboratoire (**Larpent, 1991**) ;
- Exigence des substrats peu économiques (**Munier, 1973**).

III.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae vient du mot saccharose qui signifie «sucre», mycetes «champignon», tandis que *cerevisiae* fait référence à «cervoise», c'est un terme scientifique, nom qu'on donnait autrefois à la bière, c'est un terme utilisé pour désigner le petit champignon microscopique qui compose les différentes sortes de levures qu'on utilise pour la fermentation. Elle est littéralement connue comme levure du sucre (**Larpent et Gourgoud, 1985**).

Saccharomyces cerevisiae est un champignon levuriforme (unicellulaire) appartenant au genre des ascomycètes. Cette levure se développe préférentiellement en aérobiose, mais peut également croître en anaérobiose, sous certaines conditions, notamment l'adjonction d'ergostérol au milieu de culture (**Moller et al., 2001; Visser et al., 1990**).

III.2. Caractéristiques de *S. cerevisiae*

III.2.1. Classification

Selon Larpent (1992), la place de la levure *S. cerevisiae* dans la classification des êtres vivants est la suivante :

Règne : *Protistes*

Embranchement : *Eucaryotes*

Classe : *Ascomycetes*

Sous-classe : *Hemiascomycetes*

Ordre : *Endomycetales*

Famille : *Saccharomycetaceae*

Sous-famille : *Saccharomycetoideae*

Genre : *Saccharomyces*

Espèce : *Saccharomyces cerevisiae*.

III.2.2. Morphologie

S. cerevisiae (**Figure 3**) est une cellule sphérique, ovoïde ou allongée de taille très variable « 3-10 μ m x 4-14 μ m ». Certaines cellules sont cylindriques et de grande taille, jusqu'à 20 μ m de long ou plus (**Larpent, 1991**).

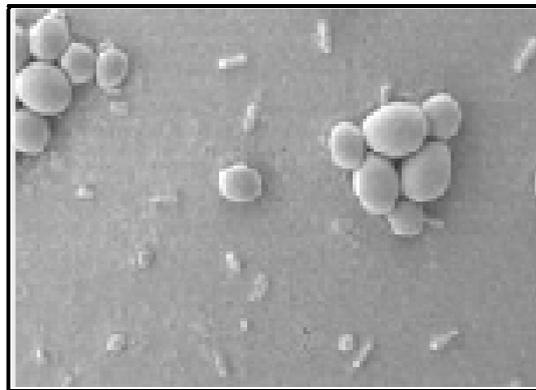


Figure 3 : Aspect morphologique de *S. cerevisiae* (Tortora et al., 2003).

III.2.3. Reproduction:

La reproduction végétative se fait généralement par bourgeonnement. Dans certaines conditions de culture, les levures sporogènes peuvent se reproduire par voie sexuée (Bourgeois et Leveau, 1991).

III.3. Cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*

Le cycle cellulaire de *S. cerevisiae* comprend deux modes de reproduction (Figure 4). Le premier est la prolifération cellulaire ou reproduction asexuée, un processus par lequel une cellule donne naissance à une autre cellule essentiellement identique, tandis que le second est la transition de la ploïdie au cours du cycle cellulaire ou reproduction sexuée. Lors de cette transition, les cellules haploïdes de sexe opposé se conjuguent pour former des cellules diploïdes tandis que les cellules diploïdes sporulent pour former des cellules haploïdes (Herskowitz, 1988).

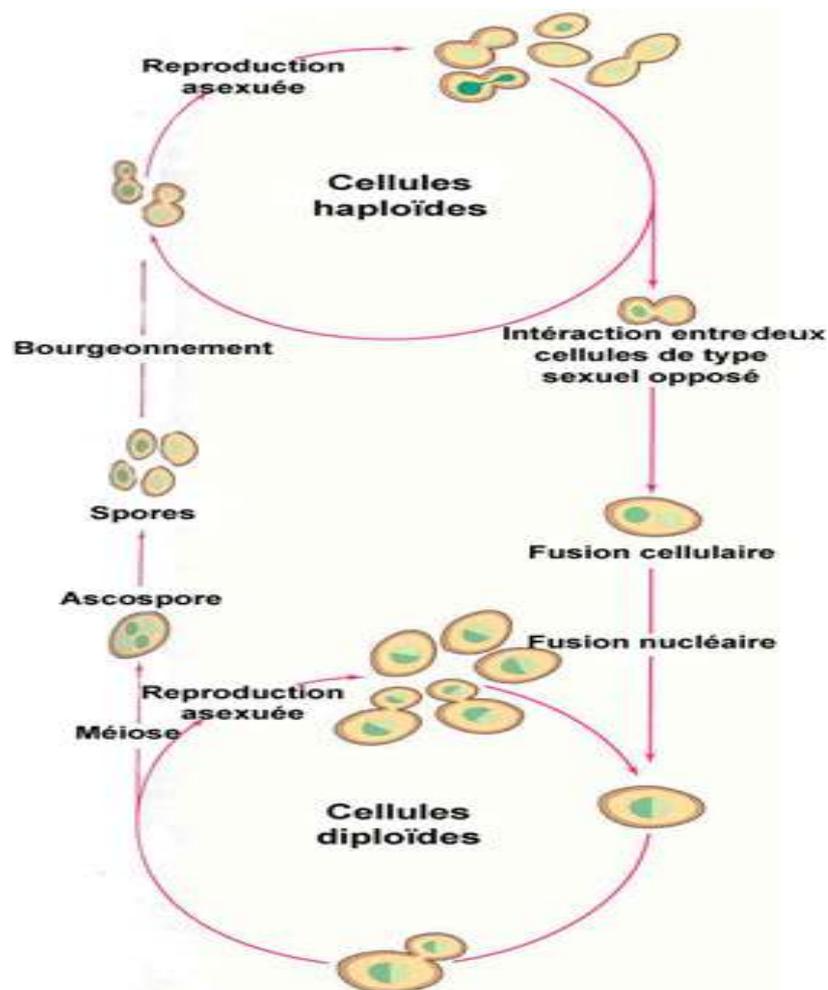


Figure 4 : Représentation schématique du cycle cellulaire de *S. cerevisiae* (Madigan *et al.*, 2000).

Lors de la reproduction asexuée, les cellules haploïdes et diploïdes se reproduisent par bourgeonnement. Lors de la reproduction sexuée, les cellules haploïdes de sexe opposé se conjuguent pour former des cellules diploïdes tandis que les cellules diploïdes sporulent pour former des cellules haploïdes.

III.4. Condition de culture de la levure *S. cerevisiae*

La croissance d'un micro-organisme peut être considérée comme une série d'interaction entre les cellules et l'environnement. Pour cela, le milieu de culture doit apporter tous les éléments nécessaires aux systèmes cellulaires et aux besoins énergétiques de la levure (**Bouix et Leveau, 1993**).

III.4.1. Besoins nutritionnels

- **Source de carbone et d'énergie :** Les sources de carbone et d'énergie les plus généralement utilisées sont des hydrates de carbone, y compris mono-, di- et tri-saccharides, dextrines plus supérieures et amidons.
- **L'azote :** Quantitativement c'est le deuxième constituant apporté par le milieu de culture, il est utilisé par les cellules pour la constitution des acides aminés, des nucléotides et certaines vitamines. A côté des sources organiques de l'azote (acides aminés, peptides, amines, pyrimidines et purines), la levure est capable d'assimiler l'azote et le soufre minérales, *S. cerevisiae* ne peut pas utiliser le nitrate ou le nitrite, mais assimile aisément les ions d'ammonium.
- **Sources minérales :** *S. cerevisiae* a besoin aussi du phosphore, du potassium, du magnésium et du calcium. Des oligo-éléments (Fe, Na, Cu...) sont nécessaires mais à l'état de trace.
- **Source vitaminique :** l'apport des vitamines est indispensable pour assurer une bonne croissance, ses besoins surtout en thiamine (B_1) de 5 mg/l, biotine (H) de 1mg/l et en pyridoxine (B_6) de 6.25 µg/l. (**Bouix et Leveau, 1993 et Boulton et al., 2001**).

III.4.2. Besoins physico-chimiques

- **La température :** la température convenable pour la croissance de *S. cerevisiae* est de 30° C (**Larpent et Gourgoud, 1985**).
- **Le PH :** *S. cerevisiae* représente l'avantage de croître sur un milieu acide, lequel la plupart des bactéries ne se développent pas. Elle préfère un PH compris entre 4 et 4.5 (**Revuz, 1979**).
- **L'aération :** La levure s'adapte à deux modes de vie en présence ou en absence d'oxygène. L'oxydation a pour but d'homogénéiser la circulation dans le fermenteur. Il est nécessaire d'apporter l'oxygène sous forme d'air filtré. Le mode aérobie est employé pour éviter la production des certaines métabolites qui minimisent la production de biomasse (**Revuz, 1979**).

- **La pression osmotique :** La levure *S. cerevisiae* est une espèce osmophile qui tolère des pressions osmotiques élevées et développe sur des milieux à forte concentration en sucres et en sel mais avec un métabolisme lent au contraire de certaines espèces. (Noui, 2001).

III.5. Principales applications de *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *S. cerevisiae* est le microorganisme le plus appliqué aux procédés microbiologiques traditionnels, industriels et dans la fabrication de divers produits dont les principales applications sont mentionnées dans (le tableau 7). (Camonis, 1990).

Tableau 7 : principales applications de La levure *S. cerevisiae* (Camonis, 1990).

Produits de <i>S. cerevisiae</i>	Applications
Alcool et CO_2	Fabrication du pain, vin, bière
Ethanol	Solvants
Glycérol	Chimie de matières plastiques
Protéines animales	Alimentation de l'homme et bétail
Vitamines	Industrie pharmaceutique
Invertase	Confiserie

III .6. Intérêt nutritionnel des levures

Sur le plan nutritionnel, les protéines des levures jouent un rôle important pour combler le déficit protéique des pays en voie de développement, dont l'alimentation est essentiellement à base des céréales.

Pour résoudre ce problème, la science est orientée vers la production des levures-aliments en vue d'obtenir des sources protéiques et vitaminiques.

En plus, l'azote aminé représente 70 à 80 % de l'azote total des cellules de *S. cerevisiae*. On trouve aussi des acides aminés essentiels dont la teneur est comparable à celle des protéines du blé et du blanc d'œuf. par rapport à ce dernier les protéines de la levure de boulangerie *S. cerevisiae* sont bien équilibrées (Rivière, 1975).

Les premières expérimentations en nutrition, ont été rapportées en 1945 en utilisant des levures de bière sèches. De nombreux essais nutritionnels sous contrôle médical ont été faits au niveau des centres hospitaliers, sur des malades, sur des vieillards, sur des sportifs, et également sur des enfants scolarisés. Tous ces essais ont fait la preuve qu'une quantité de 15 à 20 g par jour de levure procure toujours une amélioration de l'état générale et plus de résistance à la fatigue (Larpen, 1991).

III.7. Intérêt des levures dans la nutrition animale

Les effets de la levure *S. cerevisiae* en tant que substitut d'un mélange de vitamines et d'oligoéléments ajouté à la ration des poulets de chair sur la croissance et différentes caractéristiques des carcasses (poids des organes internes, proportions des cendres du tibia) ont été étudiés. En résultats, aucun des différents régimes alimentaires n'a significativement modifié les poids des viscères mais cependant, les dépôts de graisse abdominale ont été significativement accrus lorsque la ration appauvrie en vitamines et oligoéléments a été supplémentée par 5% de levure. La proportion des cendres osseuse (tibia) a significativement diminuée chez les oiseaux nourris par une ration appauvrie mais une supplémentation par 1% à 5% de levure a complètement annihilé cet effet. Ces résultats indiquent que la croissance des poulets est nettement ralentie par une réduction dans la ration des apports en vitamines et en oligoéléments durant toute la période de croissance indépendamment d'une supplémentation en levure alors que les effets négatifs sur l'os ont été contrecarrés par l'inclusion de levure dans la ration chez le poulet. (Sacakli, 2013).

CHAPITRE IV

LES EXTRAITS DES PLANTES : EXTRAIT DE *Yucca schidigera*.**IV.1.Présentation de la plante**

C'est un arbuste à feuilles persistantes ou un petit arbre avec une habitude de croissance variable. Typiquement, il ya plusieurs tiges, Webber (**Webber, 1953**) indique que 4 à 7 tiges par touffe sont fréquentes, mais jusqu'à 23 tiges sont signalés. Les tiges sont sans branches ou peu ramifiée (**Kartesz, 1988**). La hauteur de la tige varie généralement de 2 à 20 pieds (0.5- 5 m) (**Little et Elbert, 1950**), quelques spécimens exceptionnels ont atteint 30 pieds (9 m) (**Munz et Philip, 1973**) munie d'un petit tronc vigoureux et presque lisse et dont les feuilles jaune-vert à bleu-vert, longues de 30 à 150 cm, larges à la base de 4 à 11 cm, épaisses, très rigides aux bords dentelés, et disposées en spirale en haut du tronc donnent à l'arbuste l'aspect d'une dense couronne de baïonnettes(**Little et Elbert, 1950**). (**Figure 5**)



Figure (5) : *Yucca schidigera* : plante et fleure (Bietrix, 2004)

L'âge de la plante peut être estimée par le nombre de faisceaux vasculaires, le nombre de lames de feuille, ou la hauteur (**Wallace et al., 1972**). *Yucca* produit 6 feuilles à la fois et produit 2 à 4 séries par an. En utilisant le nombre de feuilles de plantes, les plus anciens *Yucca* étaient jusqu'à 200 ans (**Rundel et al., 1996**).

IV.2.Composition chimique

La plante contient plusieurs substances phyto-chimiques physiologiquement actives, représentées par deux grandes familles, les saponines et les composés phénoliques.

IV.2.1.Les saponines

La présence de saponines, largement distribuées dans le règne végétal, est rapportée dans plus d'une centaine de familles de plantes et dans quelques sources marines (poissons, étoiles, concombres de mer). Ils sont généralement caractérisés par un goût amer, sauf certaines dites "douces" comme la réglisse (acide glycyrrhizique) qui présente un goût particulièrement sucré (**Güclü-Ustundag et Mazza, 2007**). Les saponines sont des glycosides dont la structure se caractérise par la présence d'un noyau aglycone stéroïde ou triterpène nommé sapogénine et d'une ou plusieurs chaînes latérales de glucides. Elles sont classées en fonction du nombre de chaînes latérales de leur structure, en saponines mono-, di- ou tri-desmosidiques (**Cheeke et al., 2005**).

Les principales sources commerciales de saponines sont deux plantes du désert : *Yucca schidigera* du Mexique et *Quillaja saponaria* originaire du Chili (cette dernière contient des saponines de structure triterpénoïde) (**Cheeke, 2000**). .

La complexité structurelle des saponines résulte en un certain nombre de propriétés physiques, chimiques et biologiques diversifiées (**Güclü-Ustundag et Mazza, 2007**). En 2000, **Miyakoshi et al.** publient l'isolement de 13 saponines structurellement différentes, toutes monodesmosides (**Miyakoshi et al.,2000**), avec des propriétés antifongiques notables, mais leurs résultats s'avèreront imprécis. C'est un an plus tard en 2001, dans une étude réalisée sur de la poudre de *Yucca schidigera*, qu'**Oleszek et al.** isolent et identifient 8 saponines stéroïdiennes dont 5 de structure connue spirostanol [sarsapogénine (66%), gloriogénine (24%), markogénine (3.5%)] et 3 nouvelles de structure furostanol inédite, bidesmosidiques, représentant seulement 6.8 % des saponines totales isolées. Les monodesmosides spirostanol sont largement prépondérants pour environ 93% des saponines totales. Selon eux, elles déterminent de façon prédominante les propriétés biologiques connues du *Yucca*. Les auteurs évaluent, après extraction, la concentration totale des saponines à environ 10% de la matière sèche initiale, ce qui rend effectivement *Yucca schidigera* une des sources les plus riches en saponines du monde végétal (**Oleszek et al., 2001**).

IV.2.2.Les composés phénoliques

D'autres constituants physiologiquement actifs de la plante *Yucca schidigera* ont été identifiés. Ils répondent à plusieurs dénominations: phénols, polyphénols, composés phénoliques ou composés polyphénoliques.

Dès 2001 cinq d'entre eux sont identifiés et leurs structures établies par spectrométrie .Il s'agit de . 2 stilbènes : - le trans-3, 4', 5-trihydroxystilbène, appelé Resvératrol - le trans-3, 3', 5, 5'-tétrahydroxybutyl-4'*methoxy*stilbène, (appelé dérivé *méthoxy* du Resvératrol) . 3 nouveaux composés : les yuccaols A, B et C. Molécules complexes dont les *spiro*-structures sont inhabituelles car rarement retrouvées dans le règne végétal (**Piacente et al., 2002**). La famille est complétée par la yuccaone A, puis les yuccaols D et E et le larixinol. La spectrométrie de masse est la technique la mieux adaptée à ces molécules. Elle est facilement applicable à cette plante dont elle permet l'identification rapide, directe et la quantification des composés particuliers à partir des produits bruts (**Piacente et al., 2002**). Les dérivés phénoliques sont présents exclusivement dans l'écorce de *Yucca* et dans ses produits dérivés. Ils sont absents des produits obtenus par extraction mécanique (jus et extraits).

IV.3.Etude pharmacologique

IV.3.1.Les saponines

Les saponines sont responsables de nombreuses propriétés biologiques de *Yucca schidigera*. Elles sont surtout utilisées comme additif alimentaire dans les productions animales.

a. Sur la production d'ammoniac :

L'introduction dans l'alimentation d'espèces non ruminantes (porc, volaille, lapin) des produits à base de yucca à hauteur de 100-150 ppm (parties par million) réduit nettement la concentration d'ammoniac dans le lieu de vie des animaux et dans leurs excréments. Les polyphénols pourraient aussi être impliqués en se liant au groupe amine des acides aminés; ils pourraient ainsi se lier à l'ammoniac. Une action anti-uréase est également possible, mais pas chez les volailles qui excrètent de l'acide urique et non de l'urée. Des essais se sont aussi montrés convaincants dans la gestion de l'ammoniac s'accumulant dans l'eau de mer dans l'élevage de la crevette tigrée (*Penaeus monodon*). L'utilisation du *Yucca* pourrait être envisagée dans la mariculture (**Santacruz-Reyes et Chien, 2009**).

b. Sur les odeurs fécales :

Ajouté à l'alimentation de chiens et chats, *Yucca* réduit les odeurs fécales et modifie le tableau des matières fécales volatiles. Parmi plusieurs modes d'action envisagés, la fixation directe de composés odorants à certains composants du *Yucca* est plausible. De plus il a été observé une diminution significative de la production d'hydrogène sulfuré chez des chiens nourris au *Yucca* entraînant la baisse des flatulences à odeurs désagréables à cause de la lyse cellulaire (**Cheeke, 2000**).

c. Sur le cholestérol :

Il est connu de longue date que les saponines forment des complexes insolubles avec le cholestérol. La partie lipophile de la saponine (aglycone ou sapogénine) s'associe au noyau stérol hydrophobe du cholestérol en un agrégat micellaire. Le cholestérol sérique s'en trouve diminué (**Öztasan et al., 2008**)

d. Sur les parasites :

Action connue sur les protozoaires et les nématodes. La complexation irréversible des saponines avec le cholestérol contenu dans les membranes des protozoaires entraînant la lyse puis la mort des cellules a été montré *in vitro* et *in vivo* (**Piacente et al., 2006**).

Une application a été envisagée dans la lutte contre la giardiose, causée par un protozoaire pathogène intestinal humain et animal, *Giardia duodenalis*, très répandu dans le monde. L'étude d'**Allister et al. (2001)** indique que la poudre de *Yucca* a réduit *in vitro* la présence des trophozoïtes (inhibition de l'adhérence), au même titre que le métronidazole. *In vivo* chez des gerbilles, l'administration de poudre de *yucca* a diminué l'excrétion du parasite seulement à partir de l'iléon. Des agneaux recevant 10 g de poudre de *Yucca* par jour ont excrété plus de parasites que le groupe témoin mais la prévalence de la maladie n'a pas baissé. Les auteurs suggèrent que la durée ou les doses de traitements étaient insuffisants pour se prononcer clairement (**Allister et al., 2001**).

e. Sur les bactéries et les champignons :

Certaines saponines ont une activité anti-bactérienne; or, les stérols sont absents des membranes bactériennes, suggérant un mode d'action différent pour cette activité. Un mode d'action par adsorption est mis en évidence par (**Killen et al. 1998**). De plus, *Yucca* peut se lier à NH_4 lorsque les taux sont élevés dans le rumen et le libérer lorsque son taux est faible, régulant ainsi l'approvisionnement nutritif pour la synthèse des protéines des populations microbiennes spécifiques: bénéfique pour les bactéries amylolytiques (ruminants nourris à base de grains de haute valeur alimentaire), négatif sur les populations cellulolytiques et les champignons intraruminaux. Cela pourrait être utilisé pour orienter les populations microbiennes intraruminales désirées (**Wang et al., 2000**). L'activité anti-levure décrite pourrait contribuer à une meilleure conservation des produits alimentaires (**Miyakoshi et al., 2000**).

f. Sur la croissance des animaux :

Les saponines de *Yucca schidigera* ont montré une amélioration de la croissance et de l'efficacité alimentaire chez les volailles, les porcs et certains poissons (Carpe commune) (**Yen et Pond, 1993**). Habituellement les saponines sont réputées toxiques chez les poissons par effet destructeur de l'épithélium respiratoire et de la muqueuse intestinale (**Francis et al., 2002**).

g. Sur l'oxydation :

Yucca schidigera montre des propriétés anti-oxydantes notables (**Cicergi et al., 2009**), mais les publications sur l'étude des saponines ne sont pas suffisamment précises pour que l'on puisse attribuer ce caractère aux saponines de cette plante, alors même qu'elle contient d'autres molécules très impliquées dans ce processus (les polyphénols).

IV.3.2. Les poly-phénols

Les composés phénoliques présents dans *Yucca schidigera* sont à l'origine d'une large gamme d'activités biologiques dont les plus étudiés sont l'activité antioxydant et anti-inflammatoire.

a. Effet antioxydant

Yucca schidigera montre des propriétés anti-oxydantes notables (Cicergi et al., 2009). Cependant, l'activité est attribuée plus précisément aux composants phénoliques. Après identification précise des molécules phénoliques présentes dans *Yucca*, Piacente et al. (Piacente et al., 2004) analysent la fraction phénolique, afin d'évaluer son activité antioxydante en mesurant sa capacité de capture des radicaux libres, qui sont des éléments d'oxydation nocifs pour la cellule, selon deux protocoles différents. Dans les deux cas l'activité très significative des composés phénoliques de *Yucca schidigera* est démontrée, par comparaison avec le Trolox (antioxydant de synthèse) et la Vitamine E.

b. Effet anti-inflammatoire

Les propriétés anti-inflammatoires de *Yucca schidigera* ont été démontrées dans plusieurs études, particulièrement *in vitro*. Une étude a été réalisée en 2008 à partir d'une fraction riche en composés phénoliques issus de *Yucca schidigera* sur les enzymes clefs du métabolisme de l'arachidonate. Elle a démontré que les composés phénoliques purs ainsi que la fraction de produit testé sont capables d'inhiber non sélectivement les cyclo-oxygénases COX-1 et COX 2 (Wenzig et al., 2008).

Marzocco et al., (2004) testent *in vitro* la capacité des yuccaols A, B et C issus de l'écorce de *Yucca schidigera* à réduire la production de NO et/ou à inhiber l'expression de la protéine iNOS, pour des doses de 0.01 à 100 microM. Finalement, ils ont conclu que : le yuccaol A n'a inhibé significativement que la libération de NO, et ce à la plus haute dose utilisée (100 microM) ; Le yuccaol B n'a montré aucune action sur ces paramètres; Le yuccaol C réduirait l'expression de la protéine iNOS via le facteur de transcription NF-kB. Les propriétés anti-inflammatoires de *Yucca schidigera* peuvent être liées à la présence du resvératrol mais aussi du yuccaol C.

IV.4. La Coccidioses :

La coccidiose aviaire est une protozoose infectieuse, due à la présence et dans les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale principalement, de diverses coccidies pathogènes du genre *Eimeria*, généralement très spécifiques (Fontaine et Cadoré, 1995 ; Fortineau et Troncy, 1985). Chez le poulet de chair, elle se traduit cliniquement par des troubles digestifs (entérite, entérocolite, typhlite parfois hémorragique), mortels dans les formes graves, entraînant de fortes baisses de production dans les formes atténuées (Fontaine et Cadoré, 1995).

Les anticoccidiens sont encore aujourd'hui la principale méthode de lutte contre les coccidioses. En élevage de poulets de chair, la méthode consiste à administrer aux animaux, pendant toute la durée de l'élevage (à l'exception de la période de retrait légale avant l'abattage) et dans l'aliment, une substance capable d'inhiber le développement du parasite ou de le détruire.

L'utilisation intensive et prolongée des anticoccidiens a conduit à l'apparition plus ou moins rapide, sur le terrain, de coccidies résistantes (Chapman, 1997). La chimiorésistance est un phénomène qui semble exister avec tous les anticoccidiens actuellement utilisables (Chapman, 1984). L'apparition dans les élevages de souches résistantes est plus ou moins rapide suivant la substance considérée. Les différences dans les vitesses d'apparition des souches résistantes laissent supposer que les mécanismes mis en jeu sont différents. Enfin, si une souche peut être résistante à plusieurs anticoccidiens il ne semble pas exister pour l'instant de résistance croisée à des anticoccidiens de familles chimiques différentes.

Diverses publications font état d'études d'efficacité des produits à base de plantes sur la prévention des coccidioses *in vivo*. Une étude réalisée par Allen *et al.* (1997) a démontré que l'extrait de feuille d'absinthe utilisé sous forme d'additif alimentaire posséderait un effet protecteur contre les lésions intestinales produites par le parasite.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **ABABSA., 2012.,** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Mémoire de magister en Génie microbiologie, Université Ferhat Abbas Setif.
- **Avato P., Bucci R., Tava A., Vitali C., Rosato A., Bialy Z. and Jurzysta M., 2006.,** Antimicrobial Activity of Saponins from *Medicago* sp.: Structure-Activity Relationship, *Phytotherapy Research*, Vol. 20, p.454–457.
- **Awad, W.A., Afify, M. A., Zouel-Fakar, S.A., Shalaby, B., Chevaux, E., Delforge, J., Dussert, L. et Khetrou, M., 2005.,** Effets de l’addition de *Pediococcus acidilactici* sur l’infection à *Escherichia coli* et sur la colonisation par *Clostridium perfringens* et *Salmonella typhimurium* chez le poulet, In: *Proceedings des 6èmes Journées de la Recherche Avicole*, p. 502-505.
- **Badis, Laouabdia-Sellami , Guetarni, Kihal et Ouzrout, 2005,** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle», *Sci. Technol.*, Vol 23, p. 30-37.
- **Belkaid, 2014,** Evaluation De L’interaction Entre Deux Additifs Alimentaires (*Pediococcus Acidilactici*, *Saccharomyces Cerevisiae*) Et Certains Pathogenes Bacteriens Du Tractus Digestif Du Poulet De Chair (Etude In Vitro) , Université De – Blida 1-
- **Bernardeau M, Vernoux,** Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, Caen, France, *UTILISATION DES PROBIOTIQUES EN ALIMENTATION PORCINE ET AVICOLE*, p 62 – 66.
- **Bietrix J., 2004,** Utilisation des nutraceutiques dans la gestion de l’arthrose du cheval, Etude bibliographique, Thèse Méd. Vét., Lyon, n° 119, p.218.
- **Boudjema, 2008,** Essai d’optimisation de la production d’acide lactique sur lactosérum par *streptococcus thermophilus*. Mémoire de magister en biologie .Université M’Hamed Bougara Bumerdès.
- **Bouix M. et Leveau J.Y, 1993,** Microbiologie industrielle, Les micro-organismes d’interet industriel, Ed. Technique et documentation-Lavoisier-Apiria, Paris, p.512-523.

- **Boulton C.A, Briggs D.E, Brookes P.A et Stevens R, 2001**, Brewing science and practice, Ed. Woodhead publishing limited and CRC press, LLC, England, USA, , p. 379-557.
- **Bourgeois C.M, Larpent J.P, 1996**, Microbiologie alimentaire,Tome II,Aliments fermentés et fermentations alimentaires ,Ed, Technique et Documentation, p.523.
- **Bourgeois C.M. et Leveau J.Y, 1991**, Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, le contrôle microbiologique, Ed. Lavoisier, Paris, Vol 13, p. 451.
- **Brassart D et Schifrin, 2000**, pre and probiotics in functionl food labass ted in press, p.9 .
- **Camonis J.H, 1990**, Modulation de l'activité des protéines RAS et régulation du cycle de division cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Thèse doctorat, Paris , p.192-196 .
- **Cheeke P.R et Otero R, 2005**, Yucca quillaja may have role in animal nutrition, *Feedstuffs*, p.11-14.
- **Cheeke P.R, 2000**, Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition, *j. Anim. Sci.*, Vol 77, p.1- 10.
- **Cheeke P.R., Piacente S and Oleszek W, 2006**, Anti-inflammatory and antiarthritic effects of *Yucca schidigera*,a review. *J. Inflamm*, p. 3- 6.
- **Cheeke P.R., 2001**, Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition, Recent Advances in Animal Nutrition in Australia, Vol 13, p. 115-126.
- **Cheeke, P.R, 1996**, Biological effects of feed and forage saponins and their impacts on animal production. *Advances in Experimental Biology*, Vol 405, p. 377-385.

- **Chevaux E. ,Delforge J. , Dussert L , Khetrou M ,2005**, *Lallemand S.A.S., BP 59 . 31702 Blagnac Cedex, France* Effets de l'addition de *Pediococcus acidilactici* sur l'infection a *Escherichia coli* et sur la colonisation par *Clostridium perfringens* et *Salmonella typhimurium* chez le poulet, p.501.
- **Cicergi I.H et al, 2009**, The protective potential of *Yucca schidigera* against nitrite-induced oxidative stress in rats, *J. Nat. Med.*, Vol 63, n°3, p.311- 317.
- **Curk M.C., Peladan F., Hubert J.C, 1993**, Caractérisation biochimique des lactobacilles brassicoles. *Lait*. Vol 73, p.215-231.
- **Desmazeaud M, 1983**, Comment les bactéries lactiques se comportent elles dans le lait. *Technique laitière*, Vol 976, p.11-14.
- **Desnoyers, M., Giger-Reverdin, S., Sauvant, D., Bertin, G., et Duvaux-Ponter, C. 2009** ,The influence of acidosis and live yeast (*saccharomyces cerevisiae*) supplementation on timebudget and feeding behaviour of dairy goats receiving two diets of differing concentrate proportion. *Applied Animal Behaviour Science*, p. 121
- **Djidel A, 2007**, Production d'acide lactique par *Lactococcus casei subsprhamnosus* sur jus de datte: cinétique discontinues semi-continues et continues. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnologique de Lorraine. France.
- **Dorman, H.J.D. and Deans, S.G., 2000**, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal of Applied Microbiology*, Vol 88, p. 308-316.
- **Dortu C., Thonart P, 2009**, Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bio conservation des produits alimentaires.Ed *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* Vol .13, 1, p. 143-154.
- **Dridier J., Prevost H, 2009**, Bactéries lactiques. *Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*. Ed . *Economica.*, paris, p. 99 - 120.
- **El-Ghaish S., Ahmadova A., Hadji-Sfaxi I., El-Mecherfi K.E., Bazukyan I., Choiset I., Rabesona H., Sitohy M., Popov Y. G., Kuliev A. A., Mozzi F., Chobert J. M., Haertle T, 2011**, Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Food Sci. Technol.* Vol. 22, p.509-516.

- **Federighi M, 2005**, Bactériologie alimentaire compendium d'hygiène des aliments, 2^{ème} Ed, Economica., paris., p. 220-224.
- **Francis G., Kerem Z., Makkar H and Becker K, 2002**, The biological action of saponins in animals systems, a review, *Brit. J. Nut.*, Vol 88, n°6, p. 587 – 605.
- **Grandhi R.R, 1998**, Efficacy of Biopowder-M and Bioliquid-3000 (Yucca schidigera plant extract products) for reduction of odours in swine manure. Final report of the MII project 8466 prepared by the Brandon Research Centre, Brandon.
- **Güclü-ustundag O et Mazza G, 2007**, Saponins : properties, applications and Processing. *Crit. Rev. Food sci.*, vol 47, n°3, p.231 – 258.
- **Gueimond .M And Salmin .S , 2006**, new methodes for selecting evaluating probiotics, p.247.
- **Hadef S, 2012**, Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques , Université Kasdi Merbah ,Ouargla Mémoire de magister, p.7-8.
- **Hammer, K. A., Carson C.F, and Riley T.V, 1999**, Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, Vol 86, p. 985-990.
- **He C., Man H., Guowei S., Tao Q. and Jiangping W, 2011**, , Effect of steroidal saponins from *Fructus tribuli* on growth of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*, *Key Engineering Materials*, Vol. 480-481, p.70-74.
- **Herskowitz I, 1988**, Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol Rev* 52, p. 536-553.
- **Higgins, S. J.P., Higgins, E., Wolfenden, A.D. ,Henderson, S.N., Torres-Rodriguez, A., Vicente, J.L. Hargis, B.M. and Tellez, G, 2010**, Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers, *Poultry Science*, Vol.89, p. 243-247.
- **Hossain M.E., Kim G.M., Lee1 S.K. and Yang C.J, 2012**, Growth Performance, meat yield, oxidative stability, and fatty acid composition of meat from broilers fed

- diets supplemented with a medicinal plant and probiotics, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, Vol. 25, N^o. 8, p. 1159 – 1168.
- **Hossain, M. E., Ko S. Y., Kim G. M., Firman J. D. and Yang C. J., 2011**, Water plantain (*Alisma canaliculatum*) probiotics as an alternative feed additive for broiler, *Poult. Sci.*, Vol 90, p. 14.
 - **Hostettmann K., Hostettmann M. and Marston A, 1995**, Saponins: Chemistry and pharmacology of natural products, Cambridge University Press, p. 560.
 - **Izquierdo E, 2009** , Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique (Thèse de doctorat). *IPHC Strasbourg* .
 - **Jin L.Z., Ho Y.W., Abullah N., Ali M.A., Jalaludin S., 1998** ,*Anim. Feed Sci. Technol.*, p70
 - **Kartesz and Thomas ,1988**, A flora of Nevada, Reno, University of Nevada, p.1729.
 - **Killen G.F., madigan C.A, Connolly C.R and walsh G.A,1998**, Antimicrobial Saponins of *Yucca schidigera* and the implications of their in vitro properties for their in vivo impact, *J. Agric. Food chem.*, Vol 46, n^o8, p.3178 – 3186.
 - **Kim S.W et al, 2003**, Hypocholesterolemic property of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts in human body, *Arch. Pham. Res.*, Vol 26, n^o 12, ,p. 1042 – 1046.
 - **Kim, D. W., Kim S. H., Yu D. J., Kang G. H., Kim J. H., Kang H. G., Jang B. G., Na J. C., Suh O. S., Jang I. S. and Lee K. S, 2007**, Effects of single or mixed supplements of plant extract, fermented medicinal plants and *Lactobacillus* on growth performance in broilers. *Korean J. Poult. Sci.*, Vol.34, p. 187-196.
 - **Kim, K. S., Kim G. M., Hossain M. E., Park S. W. and Yang C. J, 2010**, Effect of *Alisma canaliculatum*, *Viscum albumas* and *Cornus officinalis* probiotics feed additives on growth performance and immunity in growing pigs. In: Proceeding of the Annual Congress of Korean Society of Animal Sciences and Technology, Jinju. South Korea, p. 217.
 - **König H., Fröhlich J, 2009**, Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Ed Springer-Verlag., Berlin Heidelberg.

- **Lallemand H., 2005**, Evaluation of probiotic bacteria *Pediococcus acidilactici* MA18/5M on penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia , p.117.
- **Larpent et Gourgoud., 1985**, Elément de microbiologie, Ed. Herman, Paris, p.464.
- **Larpent J.P., 1991**, Biotechnologie des levures, Ed. Masson, Paris, p. 426 .
- **Larpent J.P., 1992**, La microbiologie de la fermentation panaire, (Ed) Technologie et documentation, Cedex, p.51.
- **Laurent S., Federighi M., Jouve J. L., 1998**, Manuel de bacteriologies alimentaire. Ed, polytechnica., Paris, p.308.
- **Little et Elbert L., 1950**, A guide to the native species of New Mexico and Arizona J. Southwestern trees, Agriculture Handbook, n° 9. Washington, Department of Agriculture, Forest Service, p.109.
- **Luquet F.M,1986**, Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre), T3; qualité, énergie et tables de composition. Ed Technique et Documentation., Paris, p.442.
- **Madigan M.T., Martinko J.M., and Parker J.,2000**, *Brock Biology of Microorganisms, Upper Saddle River: Prentice Hall.*
- **Marie-Christiane Moreau, 2000**, Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif (UEPSD) INRA,Jouy-en-Josas, "PROBIOTIQUES ET SANTE, BILAN ET PERSPECTIVES.
- **Marth E. H., Steele J. L,2001**, Applied dairy microbiology. 2 èmeEd. Marcel Dekker, Inc. New York.
- **Marzocco S., Piacente S., Pissa C., Oleszek W., Stochmal A. and Pinto A., 2004**, Inhibition of inducible nitric oxide synthetase expression by yuccaol C from *Yucca schidigera* Roezl, *Life Sci.*, Vol 75, n°12, p.1491-1501.
- **Matamoros S, 2008**, Caractérisation des bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au. Thèse de Doctorat. Université de Nantes,Fance, p.17.

- **Mc-Allister T.A., Annett C.B., Cockwill C.L., Olson M.E., Wang Y And Cheeke P.R., 2001**, Studies on the use of *Yucca schidigera* to control giardiasis, *J.vet. Parasit.*, Vol 97, n°2, p. 85 – 99.
- **Mercenier.A, Paran .S ,2003**, probiotics us biotherapeutic agents present konwledge and futur prospects , p. 175.
- **Miyakoshi M., Tamura Y., Masuda H., Mizutani K., Tanaka O., Ikeda T et al., 2000**,Antiyeast steroidal saponins from *Yucca schidigera* (Mohave Yucca), a new anti-food-deteriorating agent, *J. Nat. Prod.*, Vol.63, n°3, p. 332 -33.
- **Mkrtchyan H., Gibbons S., Heidelberger S., Zloh M., Limaki H.K., 2010**, Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents*, Vol. 35, p. 255-260.
- **Montoro P., Piacente S., Olmeszek W et Pizza C.,2004**, Liquid Chromatographiy / tandem mass spectrometry of unusual phenols from *Yucca Schidigera* bark: comparison with other analytical techniques, *J. Mass spectrum*, Vol.39, n° 10, p. 1131 – 1138.
- **Munier P., 1973**, Le palmier dattier, Ed. MAISONNEUVE, Paris, p. 221 .
- **Munz et Philip A, 1973**, Record of an unusually tall *Yucca schidigera*, *Aliso*, Vol 8,n°1, p. 13-14.
- **Noui Y., 2001**, L’optimisation de la production de la biomasse *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur un extrait de datte, Mémoire d’Ingénieur, Institut d`Agronomie, Université de Batna, p.62 .
- **Oleszek O., Sitek M., Stochmal A., Piacente S., Pizza C and Cheeke P,2001**, Steroidal saponins of *Yucca schidigera* roezl, *J. Agric. Food chem.*, Vol 49, n°9, p. 4392 – 4396.
- **Oleszek W., Sitek M., Stochmal A., Piacente S., Pizza C and Cheeke P., 2001**, Resverateol and other phenolics from the bark of *Yucca schidigera* roezl, *J.Agric. Food chem.*, Vol 49, n°2, p.747 – 752.

- **Öztasan N., Bülbül A., Eryavuz A., Avcı G. Küçük Kurt I And Fidan F., 2008**, Effect of *Yucca schidigera* extract on blood pressure, antioxidant activity and some blood parameters in the l-name-induced hypertensive rats, *Ankara üniv.vet., Fak. Derg.*, Vol 55, p. 149 - 153.
- **P. Marteau, J-C. Ramb., 1998**, Probiotiques en gastroentérologie: bases rationnelles, effets démontrés et perspective. *Hepato-gastro n°4*. Vol. 5.
- **Parker R.B., 1974**, Probiotics: the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, December, 4-8, source : * Les probiotiques en élevage ,TOURNUT, p.533
- **Piacente S., Montoro P., Oleszek W and Pizza C, 2004**, *Yucca schidigera* bark: Phenolic constituents and antioxidant activity, *J. Nat. Prod.*, Vol 67, n°5, p.882 -885.
- **Pierre Guiraud, J.Philippe Rosec. J., 2004**, Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Ed, Afnor, p.238-241.
- **Pr. D. Rigaud., 2003**, L'intestin : un prodige d'adaptation et de coopération, *Objectif Nutrition .n°67*.
- **Price, K.R., Johnson, I.T. and Fenwick, G.R., 1987**, The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedstuffs, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol .26, n°1, p. 127-135.
- **Revuz B., 1979**, Microbiologie et industrie alimentaire (culture de la levure sur mélasse)., Ed. Lavoisier. Paris, p. 113-120.
- **Ripert C., 2013**, Mycologie médicale, Ed. Lavoisier, Vol 750, p.68-69.
- **Rivière J, 1975**, Les applications industrielles de la microbiologie, Ed. Masson, p. 129 .
- **Rousseau V,2004**, Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale (Thèse de doctorat). *INSA Toulouse* .
- **Rundel, Philip W., Gibson, Arthur C., 1996**, Ecological communities and processes in a Mojave Desert ecosystem: Rock Valley, Nevada, Cambridge, New York, Cambridge University Press, p.369.
- **Sacaklı P., Koksal B.H., Ergun A., Ozsoy B., 2013**, Usage of brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a replacement of vitamin and trace mineral premix in broiler diets, *Rev Méd. Vét.*, Vol 164, n° 1, p.39-44.

- **Salem A.Z.M., Robinson P.H., López S., Gohar Y.M., Rojo R and Tinoco J.L., 2010**, Sensitivity of sheep intestinal lactic acid bacteria to secondary compounds extracted from *Acacia saligna* leaves, *Animal Feed Science and Technology*. V.161, 85-93.
- **Salminen S., Wright A. V., Ouwehand A, 2004**, Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
- **Sarker M. S. K., Ko S. Y., Lee S. M., Kim G. M., Choi J. K. and Yang C. J., 2010**, Effect of different feed additives on growth performance and blood profiles of Korean Hanwoo calves, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, Vol.23, p.52-60.
- **Sen S., Makkar H.P.S., Muetzel S. and Becker K., 1998**, Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*, *Applied Microbiology*, Vol .27, p.35-38.
- **Shi M.S., Han S.K. and Ji A.R, 2008**, Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use, *Journal of Applied Microbiology*, vol.105, n°6, p.2203-2212.
- **Shori, A. B., 2013**, Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk, *Journal of Taibah University for Science* .
- **Simon, O.,2005**, Micro-organisms as Feed Additives- Probiotics. *Advances in Pork Production*, Vol.16, p.161.
- **Simons V., Morrissey J.P., Latijnhouwers M., Csukai M., Cleaver A.,Yarrow C. and Osbourn A., 2006**, Dual Effects of Plant Steroidal Alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Vol. 50, n°. 8, p. 2732–2740.
- **Tortora G., Funke B.R.,2003**,Case C.L. et Martin L., introduction à la microbiologie, Ed. ERPI, Paris, p.4-869.
- **Uehara S., Monden K., Nomoto K., Seno Y., Kariyama R., Kumon H ,2006**, A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents*. Vol. 28 .p 30-34.

- **Vandeplas, S., Dubois Dauphin, R., Thiry C., Beckers, Y., Welling, G.W., Thonart, P. and Théwis, A. 2009**, Efficiency of a *Lactobacillus plantarum*-xylanase combination on growth performances, microflora populations, and nutrient digestibilities of broilers infected with *Salmonella* Typhimurium, *Poultry Science*, Vol.88, p.643-1654.

- **Vittorio, S. A., Mauro, F., Carla, B., Giovanna, D. D., Giovanni, S. et Chevaux, E. 2005**, Effets de l'addition de *Pediococcus acidilactici* dans la ration de poulets de chair sur les performances zootechniques et la microflore intestinale, 6èmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo (FRA), p. 208-211.

- **Wallace A. and Romney E.M., 1972**, Radioecology and ecophysiology of desert plants at the Nevada Test Site, Atomic Energy Commission, Office of Information Services, p.439.

- **Wallace R.J. 2004**, Antimicrobial properties of plant secondary metabolites, *Proceedings of the Nutrition Society*, Vol.63, p.621-629.

- **Wang Y., Mcallister T.A., Yanke L.J and Cheeke P.R., 2000**, Effect of steroidal Saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes, *J. Appl. Microbiol.*, Vol 88, n°5, p. 887 – 896.

- **Wang Y., McAllister T.A., Yanke L.J. and Cheeke P.R., 2000**, Effect of steroidal saponin from yucca schidigera extract on ruminal microbes, *J. Appl. Microbiol.*, Vol.88, n°5, p. 887-896.

- **Webber and Milton J.,1953**, *Yuccas of the Southwest*, Agriculture Monograph, Forest Service, p.97.

- **Wenzig E.M., Oleszek W., Stochmal A., Kunert O. and Bauer R., 2008**, Influence of phenolic constituents from yucca schidigera bark on arachidonate metabolism *In vitro*, *J. Food Chem.*, Vol 56, n°19, p.8885-8890.

- **Yateem A., Balba M. T., Al-Surrayai T., Al-Mutairi B., Al-Daher R., 2008**, Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci.* Vol. 3. p194-199.