



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la  
vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

## MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques  
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :  
HADEF Saida  
NEKAA Imen

Le : Mercredi 30 Septembre 2020

### **Contribution a l'évaluation de quelques caractères probiotiques du lactobacille isolé a partir des matières fécales des poulets.**

---

#### **Jury :**

Mme BABA ARBI Souad	MCB	Université de Biskra	Président
Pr BENKADDOUR Bachir	MAB	Université de Biskra	Rapporteur
Mme YAKOUB Fadria	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019/2020

# DEDICACE

*Je dédie ce modeste travail, à mes très chers parents*

*A*

*Ma mère, tes prières m'ont toujours accompagnée pour  
M'accomplissement de ce travail.*

*A*

*Mon Frère Noureddine ,Walid,et hicham*

*A*

*Mes soeurs malika, laatra ,leila et mina*

*A*

*A tous mes amies sans exception: imen, khouloud, Ferial, nessrin, salsabile et  
hanine*

*A*

*A la promotion master microbiologie 2019/2020*

**HADEF SAIDA.**

# DEDICACE

*Je dédie ce modeste travail, à mes très chers parents*

*A*

*Ma mère, tes prières m'ont toujours accompagnée pour  
M'accomplissement de ce travail.*

*A*

*Mon Frère Issam et hicham*

*A*

*Mes soeurs Noura et karima*

*A*

*A tous mes amies sans exception : Saida, khouloud, Ferial, nessrin et salsabile*

*A*

*A la promotion master microbiologie 2019/2020*

NEKAA IMEN.

## Remerciements

*Avant tout je remercie tout d'abord Allah de m'avoir donné le courage, la force, la santé, et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.*

*Je tiens à remercier mon encadreur **benkaddour bachir** pour ses précieux conseils, son aide et ses orientations.*

*Mes remerciements vont aussi aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Tous les mots de merci à toute et à tous les enseignants de biologie d'université de Biskra pour leurs disponibilité et conseils.*

*Enfin, nous remercions sincèrement tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail*

## Liste des abréviations

<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organisation
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>LAB</b>	Bactérie lactique
<b>LB</b>	Lactobacilles
<b>DMEM</b>	milieu minimum essentiel de Eagle
<b>MRS CYS</b>	Man Rogosa sharpe Cystéiné
<b>CACL2</b>	Chlorure de calcium
<b>PBS</b>	Phosphate saline
<b>UFC</b>	Unité fondamentale du colonie
<b>GRAS</b>	Milieu gras
<b>B12</b>	Vitamine B12
<b>MIN</b>	Minute
<b>MG</b>	milligramme
<b>NACL</b>	Chlore de Sodium
<b>CACO 3</b>	Carbonate de calcium
<b>PH</b>	Potentiel Hydrogène
<b>TSA</b>	Trypto-caseine soja
<b>PCR</b>	Polymérase chaine Réaction
<b>%</b>	Pour cent
<b>CO2</b>	Dioxyde de carbone
<b>FE+2</b>	Fer
<b>MN+2</b>	Manganèse

# Liste des tableaux

<b>Tableau 01.</b> Principaux critères de sélection des probiotiques (Ouwehand et <i>al.</i> , 2002; Gueimonde et Salminen, 2006). .....	05
<b>Tableau 2:</b> Principaux groupes formés au sein du genre <i>Lactobacillus</i> , sur la base des caractéristiques phénotypiques (Saad,2011)....	11
<b>Tableau 3.</b> Les séquences génétiques de l'ARNr 16S de 13 isolats.....	17
<b>Tableau04.</b> Sensibilité aux antibiotiques des isolats.....	21
<b>Tableau 5.</b> Capacité de réduction du cholestérol, activité BSH et production d'exopolysaccharrides.....	22
<b>Tableau 6 .:</b> Activité antimicrobienne (mm) des isolats contre une bacteSHA potentiellement pathogène.....	23

# Liste des figures

<b>Figure 01.</b> principaux bienfait des probiotique (Nagpal et <i>al.</i> , 2012).....	06
<b>Figure 02.</b> <i>Lactobacillus sp</i> (Anonyme 1,2020).....	09
<b>Figure03.</b> Taux de survie de 13 souches de <i>Lactobacilles</i> isolées dans des conditions acides (pH 2,0 et pH 3,0) pendant 3 h .....	18
<b>Figure04.</b> Taux de survie de 13 souches de lactobacilles isolées à 0,5 et 1% de sels biliaries	19
<b>Figure05.</b> Taux de croissance des souches de lactobacilles dans un bouillon MRS supplémenté avec 100 mg / L de lysozyme et un bouillon MRS sans lysozyme considérer comme contrôle.....	20
<b>Figure 06.</b> Capacité d'adhésion des isolats à la lignée de cellules Caco-2. La capacité d'adhérence est calculée en pourcentage d'isolats adhérant aunombre total d'isolats ajoutés.....	20

## Sommaire

<b>Liste des abréviations</b>	<b>I</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>II</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>III</b>
<b>Introduction générale</b> .....	01
<b>Partie bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Généralités sur les probiotiques</b>	
I.1.1. Historique et définition.....	03
I.1.2. Classification des probiotiques .....	03
I.1.3. Mécanisme d'action des probiotiques .....	04
I.1.4. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques.....	05
I.1.5. Effets bénéfiques des probiotiques.....	05
I.1.6. Effets secondaires associés à la consommation des probiotiques.....	06
I.1.7. Applications des probiotiques .....	07
<b>Chapitre II : Généralités sur le lactobacillus</b>	
II.1.1. Propriétés générales de lactobacilles .....	08
II.2. Habitat.....	09
II.3. Taxonomie .....	09
II.4. Caractères biochimique.....	09
II.5. Identification des lactobacilles.....	10
II.6. Effet probiotique des lactobacilles .....	10
<b>Partie pratique</b>	
<b>III.I Matériel et méthodes</b> .....	<b>IV</b>
III.1.1. Collecte et culture des échantillons.....	11
III.1.2. Screening et identification des isolats.. .....	11
III.1.3 Survie sous condition GIT. ....	12
III.1.3.1. Tolérance aux acides et tolérance à la bile .....	12
III.1.3.2. Activité d'hydrolase des sels biliaires.....	12
III.1.3.3. Résistance au lysozyme.....	12
III.1.4. Production d'exopolysaccharide.....	12
III.1.5. Résistance aux antibiotiques .....	13



III.1.6. Activité anti-microbienne.....	13
III.1.7. Assimilation du cholestérol.....	13
III.1.8. Adhésion à la cellule Caco-2.....	14
III.9. Analyses statistiques.....	15
<b>IV.1. Résultats et Discussion.....</b>	<b>V</b>
IV.1.1. Identification des lactobacilles.....	16
IV.1.2. Tolérance aux acides et à la bile.....	16
IV.1.3. Activité de l'hydrolase des sels biliaires.....	19
IV.1.4. Résistance au lysozyme .....	19
IV.1.5. Production d'exopolysaccharide.....	20
IV.1.6. Résistance aux antibiotiques .....	20
IV.1.7. Activité anti-microbienne .....	21
IV.1.8. Assimilation du cholestérol .....	23
IV.1.9. Adhésion à la cellule Caco-2.....	23
<b>IV.2. Discussion.....</b>	<b>24</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>26</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>27</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>33</b>
<b>Résumé</b>	<b>VII</b>

# **Introduction**

Les probiotiques sont définis comme « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, confèrent des effets bénéfiques pour l'hôte » (FAO/OMS, 2001). La sélection de ces dernières se base non seulement sur leur effet bénéfique sur la santé de l'hôte ou dans le traitement liées au système gastro-intestinale (Corcoran et al., 2001), mais aussi sur leur capacité à adhérer à la muqueuse intestinale (Ehrmann et al., 2001) ainsi que pour leur capacité à survivre aux stress du transit digestif (Elahi et al., 2008) et donc résister au suc gastrique et aux sels biliaires (Ruiz-moyano et al., 2008).

La majorité de micro-organismes probiotiques appartiennent principalement aux genres de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* qui sont des habitants naturel de la flore intestinale du poulet (Gabriel et al, 2005) et de celui de l'abeille (Powell et al., 2014). Il y a également d'autres genres de bactéries et de quelques levures employées couramment (Malago et al, 2011).

Les *lactobacilles* sont des bactéries lactiques (BL) qui produisent par fermentation de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme énergétique. Ils sont représentatifs du microbiote intestinal bénéfique de l'Homme et par conséquent sont les microorganismes les plus en vue en tant que probiotiques (Kesarcodi - Watson et al., 2008). Plusieurs études cliniques ont démontré l'efficacité des bactéries lactiques probiotiques, en particulier les souches de lactobacilles dans les diarrhées infantiles d'origine microbienne (Preidis et al., 2011). Les lactobacilles sont aussi utilisés comme des levains dans plusieurs variétés de fromage, les aliments, végétaux fermentés et les viandes fermentées (Leory et de Vuyst, 2004).

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude, qui consiste à l'isolement de genre de Lactobacilles à partir des excréments du poulet et les identifiés puis l'évaluation de quelques aptitudes probiotiques de souches isolées.

Pour atteindre cet objectif notre travail comporte les étapes suivantes :

- L'isolement et caractérisation phénotypiques des *Lactobacillus*.
- Etude de certains facteurs physiologiques des *Lactobacillus*.
- Etude de quelques propriétés probiotiques des *Lactobacillus*.

Ce travail comporte deux parties d'investigations complémentaires :

- Une première partie relative à l'étude bibliographique comprenant deux chapitres dont le premier ; Généralité sur les probiotiques, la deuxième présente généralité sur les *Lactobacilles*

- Une deuxième partie expérimentale présentant le matériel utilisé et les méthodes .En outre, dans cette partie, nous présentons les résultats obtenus et discussions.

Enfin une conclusion générale résume les différents résultats obtenus et les perspectives de ce travail.

## **Partie Bibliographique**

**CHAPITRE I**  
**Généralité sur les probiotiques**

## I.1. Probiotiques

### I.1.1. Historique et définition

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. La notion de probiotique a été développée principalement grâce aux travaux de Metchnikoff ayant suggéré que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes accroît la longévité en réduisant dans le tube digestif la population de bactéries putréfiâtes ou produisant des toxines. Une des premières définitions des probiotiques a été proposée par Lilly et Stillwell en 1965 comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes ».

Depuis ce temps, la définition du terme probiotique a été modifiée à plusieurs reprises (Ait-Belgnaoui et *al.* 2005).

En 1989, Roy Fuller a mis l'accent sur la demande de viabilité des probiotiques et a incorporé l'idée qu'ils avaient un effet bénéfique sur l'hôte (Guarner et *al.*, 2008).

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

### I.1.2. Classification des probiotiques

Les probiotiques peuvent être classés en quatre catégories. La première catégorie renferme des espèces du genre *Lactobacillus*. Les lactobacilles sont des bactéries Gram-positif, classées dans le phylum des *Firmicutes* et appartenant à la famille de *Lactobacillaceae* (Hammes et Vogel, 1995). Elles se présentent sous forme de bacilles ou de coques et sont anaérobies facultatives, immobiles, non flagellés et non sporogènes. Les *LB* forment une grande partie des bactéries lactiques qui sont capables de produire de l'acide lactique par la fermentation de certains sucres comme le lactose. Ces espèces colonisent l'être humain et sont généralement présentes dans le tractus gastro-intestinal, les muqueuses vaginales et la cavité buccale.

La deuxième catégorie est composée des espèces de *Bifidobacterium*. Ce sont des bacilles à Gram-positif, anaérobies strictes, immobiles et forment le groupe bactérien prédominant de la

intestinale humaine (Mitsuoka, 1990). *Les bifidobactéries* sont majoritairement utilisées comme probiotiques surtout par l'industrie agroalimentaire en raison de leurs nombreux bienfaits sur la santé. C'est le cas de la souche commerciale *B. animalis* sp. *Lactis*Bb12 (Kabeerdoss *et al.*, 2011).

Le troisième groupe de probiotiques comprend d'autres bactéries lactiques en forme de coques telles que les *Enterococcus* et les *Streptococcus*. Quant au quatrième groupe, il est constitué de micro-organismes non-lactiques notamment les bactéries sporulées (*Bacillus cereus*), les bactéries appartenant à l'espèce *Propionibacterium freudenreichii* ainsi que certaines levures de type *Saccharomyces* principalement utilisées par l'industrie agroalimentaire.

### **I.1.3. Mécanisme d'action des probiotiques**

Les probiotiques agissent principalement en stimulant les interactions entre l'intestin (cellules épithéliales intestinales), le système immunitaire (cellules immunocompétentes) et le contenu digestif (nutriments et flore endogène) (Backhed *et al.*, 2005). En revanche, les mécanismes d'action des probiotiques sur l'hôte sont complexes, multiples et dépendent de la souche microbienne considérée (Rambaud, 1993). En outre, les vrais mécanismes d'action des probiotiques restent méconnus (Organisation mondiale de Gastroentérologie, 2008).

Les deux premiers mécanismes d'action des probiotiques sont la compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion, ceci concerne leurs capacités d'adhésion à la muqueuse intestinale, en tenant compte que la plupart des infections intestinales sont dû à l'adhésion des pathogènes aux entérocytes. Cependant, certaines souches de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* auraient la capacité de bloquer l'accès vers ces cellules (Servin, 2004; Picard *et al.*, 2005) par une compétition à l'adhésion. Ce mécanisme d'action serait similaire à celui exercé par le microbiote intestinal face aux infections microbiennes (Liévin-Le Moal *et Servin*, 2006).

L'activité antibactérienne et antivirale, par la sécrétion directe de bactériocines sont des principales propriétés des probiotiques (Cotter *et al.*, 2005). Une influence importante des bactéries de l'intestin sur la fonction immunitaire est suggérée par un grand nombre de structures lymphoïdes organisées dans la muqueuse de l'intestin grêle (plaques de Peyer).

Certains composés exocellulaires ou endocellulaires des micro-organismes (pathogènes ou non) sont impliqués dans les effets immunomodulateurs (Medzhitov *et al.*, 1997). Les effets des probiotiques sur l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes Gram négatif, et sur la stabilisation de la barrière épithéliale sont également associés à une diminution de la translocation bactérienne. Ainsi chez l'animal, le traitement par certains



probiotiques tels que *Lactobacillus* (Suzuki et al., 1997) ou *S. boulardii* (Berg et al., 1993) diminue la translocation bactérienne

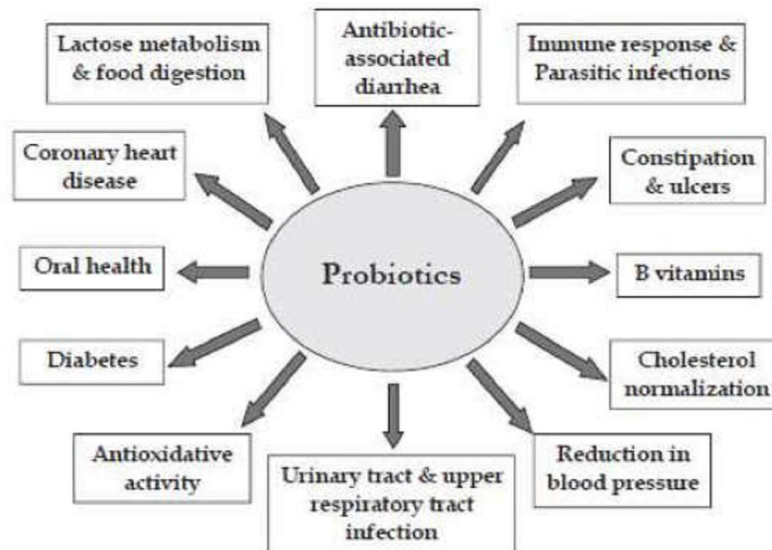
#### I.1.4. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques

Afin de satisfaire à la définition des probiotiques, les micro-organismes doivent posséder propriétés de survie, d'activité et de persistance dans le tractus digestif qui leurs permettront d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte. Ces propriétés sont propres à chaque souche et ne peuvent pas être extrapolées d'une souche à l'autre même au sein d'une seule espèce (Dunne et al., 2001). Principaux critères de sélection des probiotiques sont décrit dans le tableau 1

<b>Critères de sécurité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identification taxonomique précise.</li> <li>- Origine humaine pour utilisation chez l'humain.</li> <li>- Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques.</li> <li>- Historique de non pathogénicité et non-invasion d'épithélium intestinal.</li> <li>- Pas de transmission possible de gènes de résistance aux Antibiotiques</li> </ul>
<b>Critères fonctionnels</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tolérance à l'acidité, la bile et aux enzymes digestives.</li> <li>- Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus intestinal.</li> <li>- Production de substances antimicrobiennes (bactériocines, acides organiques, peroxyde d'hydrogène ou autres composés inhibiteurs) et antagonisme envers les pathogènes.</li> <li>- Immunomodulation.</li> <li>- Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé.</li> </ul>
<b>Critères technologiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini.</li> <li>- Conservation des propriétés probiotiques après production</li> <li>- Non modification des propriétés organoleptiques du produit fini</li> </ul>

#### I.1.5. Effets bénéfiques des probiotiques

Afin de satisfaire à la définition des probiotiques, les micro-organismes doivent posséder propriétés de survie, d'activité et de persistance dans le tractus digestif qui leurs permettront d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte. Ces propriétés sont propres à chaque souche et ne peuvent pas être extrapolées d'une souche à l'autre même au sein d'une seule espèce (Dunne et al., 2001) La figure 01 résume les principaux effets bénéfiques des probiotiques sur la santé.



**Figure 01. principaux bienfait des probiotique (Nagpal et al., 2012)**

### I.1.6. Effets secondaires associés à la consommation des probiotiques

La majorité des LB sont utilisées depuis très longtemps dans divers procédés alimentaires et possèdent une longue histoire de consommation humaine (Ishibashi et Yamazaki, 2001). Les bactéries lactiques et les probiotiques ne sont donc pas considérés comme étant des organismes pathogènes ou opportunistes et le statut « GRAS » (Generally Recognized As Safe) leur est conféré, ce qui signifie que les risques associés à leur consommation sont très faibles (Feord, 2002). La possibilité de translocation bactérienne, processus par lequel les microorganismes traversent le tractus gastro-intestinal vers d'autres parties du corps, comme les nodules lymphatiques, le sang, le foie, les reins ou la rate, semble entraîner des effets néfastes pour la santé. S'il y a perte d'intégrité au niveau de l'épithélium cutané ou intestinal découlant d'une blessure, d'un cancer ou d'une anomalie provoquée par un agent toxique, n'importe quelle bactérie présente dans l'intestin peut atteindre le sang ou certains organes et entraîner des effets néfastes (Ishibashi et Yamazaki, 2001). La crainte est qu'une consommation excessive des probiotiques accentue ce phénomène et en aggrave les conséquences. Cependant, malgré les milliards de doses de probiotiques consommés annuellement à travers le monde, les complications observées sont extrêmement rares et ne semblent se produire que dans des cas particuliers, surtout chez les patients âgés, les individus immunodéprimés ou les gens ayant de graves problèmes intestinaux (Cassone *et al.*, 2003) rapportent une épidémie de *Saccharomyces boulardii* dans l'unité des soins intensifs d'un centre hospitalier secondaire de Rome, Italie. Cette épidémie a affecté trois patients qui n'avaient pas reçu de *S. boulardii* et l'infection aurait été transmise par le site d'insertion d'un

cathéter. Toutefois, une conclusion semble faire de plus en plus l'unanimité dans le domaine de probiotiques : les probiotiques ne devraient pas être administrés directement pour des maladies sévères ou chez des individus fortement immunodéprimés comme dans le cas de lésions intestinales, en raison du risque accru de translocation bactérienne (Tamboli et *al.*, 2003).

### **I.1.7. Applications des probiotiques**

Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques humains ou animaux sont constitués soit d'un seul microorganisme (produits dits mono-souches) ou d'une association de plusieurs espèces (produits dits pluri-souches). De nos jours, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes :

- Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales.
- Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation.
- Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimés (Patterson, 2008).

Les probiotiques sont généralement associés aux produits laitiers de culture. la gamme de produits probiotiques comprend maintenant des fromages, des crèmes glacées et des yogourts glacés de même que des aliments et boissons non laitiers (Patterson, 2008).

## **CHAPITRE II**

### **Généralité sur lactobacille**



## II.1. Propriétés générales de *lactobacilles*

Les LB regroupent de nombreuses espèces bactériennes omniprésentes dans la nature, mais rarement pathogènes, (Denis et *al.*, 2007).

Les lactobacilles sont des bactéries Gram positif, catalase négatif, en forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chaînes quelquefois très longues, immobiles ou mobiles grâce à des flagelles péritriches, asporogènes, anaérobie facultatives ou microaérophiles et incapables à réduire le nitrate et à hydrolyser la gélatine (de Roissart et Luquet, 1994).

Les LB ont un métabolisme soit homofermentaire avec production uniquement d'acide lactique à partir du glucose, soit hétérofermentaire avec production d'acide lactique, d'acide acétique et de CO<sub>2</sub> (Desai, 2008). En outre, ces bactéries sont caractérisés par des exigences nutritionnelles nombreuses; en plus de la source de carbone et d'azote, toutes les espèces ont un besoin absolu en vitamines telles que la vitamine (B5), la niacine (B3) et en cobalamine (B12), et les ions Mg<sup>2+</sup> et Mn<sup>2+</sup> ou Fe<sup>2+</sup> sont aussi nécessaires pour la croissance des lactobacilles (De Vos et *al.*,2009) un large spectre de température de croissance (2 à 53°C) ; elles sont acidophiles avec un pH optimal de croissance de 5,5 à 6,2 (de Roissart et Luquet, 1994).

La figure 2 montre l'aspect microscopique d'une souche de *lactobacilles* observée par microscopie électronique

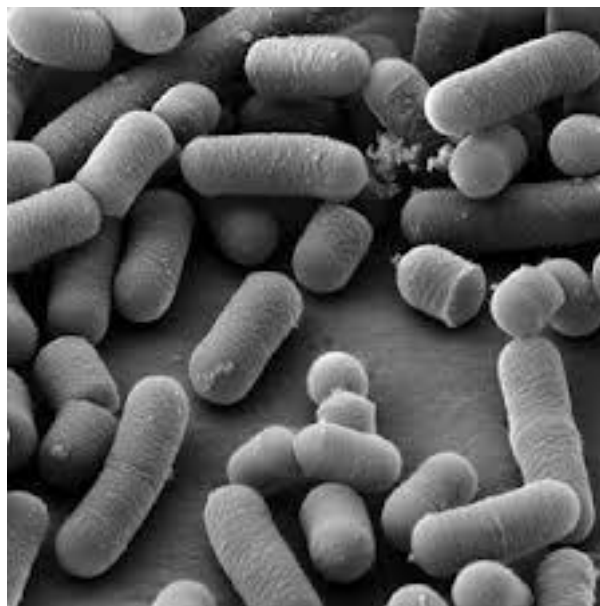


Figure 02. *Lactobacillus sp* (Anonyme 1,2020)

## II.2. Habitat

Les *LB* sont isolés de diverses niches écologiques, ils sont principalement retrouvés dans les substrats riches en hydrates de carbone, ainsi que dans d'autres habitats tel que les muqueuses de l'homme et de l'animal (cavité buccale, intestinale et vaginale), ils sont retrouvés en faibles quantités sur les végétaux mais s'y développent rapidement lorsqu'ils sont abimés (Tailliez, 2004).

## II.3. Taxonomie

Au sein des BAL, les *LB* constituent un genre important reconnu pour sa capacité fermentaire ainsi que pour la santé et la nutrition humaine (Kannahi et Viji., 2014). Ils appartiennent au groupe des phylum *Firmicutes*, à la bienfaits classe des Bacilli, à l'ordre des *LB* et à la famille des Lactobacillaceae (De Vos et al., 2009). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des BL découvert, il comprend actuellement, plus de 175 d'espèces reconnues qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême (Salminen et al. ; 1998).

## II.4. Caractères biochimique

Les *LB* sont catalase négative, certains ont une pseudocatalase. Ils sont dépourvus de cytochrome. Généralement, nitrate réductase négative, gélatinase négative et ils sont microaérophiles ou anaérobies. Le métabolisme énergétique des *LB* est exclusivement fermentaire (Prescott et al., 2003).

En se basant sur le mode de fermentation le genre *LB* a été subdivisé en trois groupes:

**Groupe I :** comprend les espèces homofermentaires obligatoires thermophiles, qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Produisent uniquement de l'acide lactique à partir du glucose et qui sont incapables de fermenter les pentoses ou le gluconate. Ce groupe est constitué majoritairement d'espèces présentes chez l'homme et les animaux et qui participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme (Guiraud et Rosec, 2004).

### **Groupe II**

Ce sont des espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capable d'utiliser la voie hétérofermentaire à partir du glucose, dans certaines conditions comme une concentration du glucose limitée. Ces *LB* sont mésophiles qui se développent à 15°C et comportent l'espèce *Lb. casei* qui est également le lactobacille dominant du lait (Guiraud et Rosec, 2004).

### **Groupe III**

Comprend les LB hétérofermentaires obligatoires qui forme des quantités équimolaires de CO<sub>2</sub>, d'acide lactique et acétique et /ou éthanol Ce groupe rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, dont certaines font partie de la flore des levains de panification (Federighi et al., 2005; De vos et al., 2009).

Dans les conditions standards les espèces de ce genre sont anaérobies facultatives ou aérotoles. Elles sont catalase négative à l'exception de *Lb. kunkeei*, et quelques souches de *Lb. mali*, mais possèdent une peroxydase, leur permettant de pousser en présence d'O<sub>2</sub> (Amantidou et al., 2001)

**Tableau 02.** Principaux groupes formés au sein du genre *Lactobacillus*, sur la base des caractéristiques phénotypiques (Saad, 2010).

<b>Groupe I Homo-fermentaires strictes</b>	<b>Groupe II Hétéro-fermentaires facultatifs</b>	<b>Groupe III Hétéro-fermentaires strictes</b>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. acetotolerans</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. amylophilus</i>	<i>Lb. agilis</i>	<i>Lb. buchneri</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. collinoides</i>
<i>Lb. aviariussubsp.</i>	<i>Lb. bif fermentans</i>	<i>Lb. fermentum</i>
<i>Araffinosus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. fructivorans</i>
<i>Lb. aviariussubsp. Aviarius</i>	<i>Lb. coryniformis subsp.</i>	<i>Lb. fructosus</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>torquens</i>	<i>Lb. hilgardii</i>
<i>Lb. delbrueckii subsp.</i>	<i>Lb. coryniformis subsp.</i>	<i>Lb. kefir</i>
<i>bulgaricus</i>	<i>Coryniformis</i>	<i>Lb. malefermentans</i>
<i>Lb. delbrueckii subsp.</i>	<i>Lb. cuvatus</i>	<i>Lb. oris</i>
<i>delbrueckii</i>	<i>Lb. graminis</i>	<i>Lb. panis</i>
<i>Lb. delbrueckii subsp. lactis</i>	<i>Lb. Hamsteti</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>
<i>Lb. farciminis</i> <i>Lb. gallinarum</i>	<i>Lb. Homohiochii</i>	<i>Lb. parakefir</i>
<i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. intestinalis</i>	<i>Lb. pontis</i>
<i>bL.jensenii</i> <i>Lb. johnsonii</i> <i>Lb.</i>	<i>Lb. murinus</i>	<i>Lb. reuteri</i>
<i>kefirnofaciens</i> <i>Lb.</i>	<i>Lb. paracasei subsp.</i>	<i>Lb. Sanfrancisco</i>
<i>kefirgranum</i> <i>Lb. mali</i> <i>Lb.</i>	<i>paracasei</i> <i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. suebicus</i>
<i>ruminis</i> <i>Lb. salivarius subsp.</i>	<i>subsp tolerans</i>	<i>Lb. vaccinostercus</i>
<i>salicinus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. Paraplantarum</i>	<i>Lb. vaginalis</i>
<i>subsp. salivarius</i> <i>Lb.</i>	<i>Lb. plantarum</i>	
<i>sharpeae</i>	<i>Lb. pentosus</i>	



	<i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. sake</i>	
--	---	--

## II.5. Identification des lactobacilles

L'identification d'espèce de Lb peut être difficile à réaliser par les méthodes biochimiques en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Elle repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres. La galerie APIC50 CH avec l'utilisation du milieu pour Lb, est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (de Roissart et Luquet, 1994 ; Ozgan et Vural, 2011).

L'utilisation des outils de taxonomie moléculaire comme hybridation quantitative ADN/ADN et le séquençage des gènes d'ADNr 16s ont permis de lever des ambiguïtés et de nommer précisément les espèces de Lb d'intérêt en santé et en alimentation humaine (Dellaglio et Felis, 2005)

## II.6. Effet probiotique des lactobacilles

Certains LB du tractus gastro-intestinal ont également été associés à des bienfaits pour la santé qui ont donné lieu à leur désignation comme probiotique. Il ressort de certaines études de la diarrhée des voyageurs, que la souche Lb. *GG* est efficace en prévention des diarrhées survenant chez les touristes (Fedorak et Madsen, 2004).

Aussi, l'ingestion de lait contenant Lb. *acidophilus* par des personnes intolérantes au lactose améliorerait la digestion chez ces derniers (Leveau et Bouix, 1993).

Les lactobacilles probiotiques inhibent l'adhésion des pathogènes aux cellules intestinales (Kim et Ho, 2010). Certains lactobacilles auraient la capacité de bloquer physiquement l'accès des pathogènes aux entérocytes (Lebeer et *al.* 2010).

# **PARTIE PRATIQUE**



**CHAPITRE III**  
**Matériel et méthode**



### III.1. Matériel et Méthodes

#### III.1.1. Collecte et culture des échantillons

Vingt échantillons de caecums de poulets sains ont été collectés à partir de différentes régions. Le contenu des caecums est dilué et une série de dilution décimale a été effectuée dans du tampon PBS (0,1 M, pH 7,2).

Un volume de 100 µl d'échantillons dilués ont été étalés en surface de gélose MRSc additionné de 1% de CaCO<sub>3</sub> préalablement coulée en boîtes de Pétri (Merck, Darmstadt, Allemagne). Les boîtes ont été ensuite incubées à 37 ° C pendant 3 jours afin d'obtenir des colonies bien distinctes. Uniquement les colonies montrant une production d'acide ont été sélectionnées pour une caractérisation avancée.

#### III.1.2. Screening et identification des isolats.

Les isolats sélectionnés ont été soumis à une coloration de Gram, au test de la catalase et à une observation microscopique pour déterminer la morphologie.

Les isolats de lactobacilles à Gram positifs, catalase négatifs et de forme bâtonné ont été suspecté être des lactobacilles et ont été maintenus en milieu MRS bouillon supplémenté avec 20% de glycérol à -80 ° C.

Avant chaque expérience, tous les isolats étaient cultivés deux fois en milieu MRSc bouillon.

Les 13 isolats de LAB présentant des caractéristiques correspond au genre *lactobacillus* ont été soumis à test de confirmation au moyen de PCR.

À cette fin, l'ADN génomique total des isolats de LAB a été extrait en utilisant le kit de purification d'ADN génomique (TransGen Biotech Co., Ltd., Beijing, Chine) suivant les instructions du fabricant. Les amorces 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' et 5' CCGTCAATT [Y] MTTTRAGT3' ont été utilisées afin d'amplifier les séquences d'ADNr 16s.

Les fragments ont été amplifiés dans un thermocycleur Techne-TC 512 dans les conditions suivantes : dénaturation initiale à 94 ° C pendant 2 min suivi de 30 cycles de dénaturation à 94 ° C pendant 1 min, recuit à 52 ° C pendant 1 min et extension à 72 ° C pendant 2 min puis la finale extension à 72 ° C pendant 5 min.

Le fragment amplifié a été analysé sur gel d'agarose et séquencé par la firme Gen Script Company, Nanjing, Chine. Les séquences obtenues ont été comparées à celles préexistant

dans la banque des gènes en utilisant le programme BLAST. Les séquences ont été déposées dans la banque de gènes. L'alignement des séquences a été effectué en utilisant le logiciel clustalw2. (Tamura et al., 2004)

### III.1.3. Survie sous condition GIT

#### III.1.3.1 Tolérance aux acides et tolérance à la bile.

La tolérance aux acides a été déterminé selon la méthode décrit par (Yu et al. 2013). Les isolats sont cultivé dans un bouillon MRS à 37 ° C pendant une nuit puis inoculé (1%v/v) en milieu MRS bouillon ajusté préalablement à pH 2,0, pH 3,0 et pH 6,5 avec HCl (3,0 M).

Le compte viable a été déterminé après 180 mn d'incubation à 37° C. le taux de survie des isolats a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \text{Final (Log cfu / mL)} / \text{Initial (log cfu / mL)} \times 100.$$

#### III.1.3.2 Activité d'hydrolyse des sels biliaires

Hydrolyse des sels biliaires a été examiné par la méthode des spots. un volume de 10µL de d'une culture fraîche est déposé sur des boîtes de gélose MRSc supplémenté avec 0,37 g / L de CaCl<sub>2</sub> et 5g /L de sel de *sodium de l'acide taurodésoxycholique*. Les gélouses ont été ensuite incubées en aérobiose à 37 ° C pendant 3 jours.

La formation d'un précipité autour des colonies a été considérée comme résultat positif. L'expérience a été effectuée trois fois.

#### III.1.4. Résistance au lysozyme

La résistance au lysozyme était évaluée selon la méthode rapportée par (Dias et al. 2015) avec mineur modification. Les différentes cellules des isolats ont été cultivées dans un bouillon MRSc à 37 ° C pendant 24 heures, ensuite les cellules ont été centrifugées, lavées 2 fois avec tampon PBS (0,1 M, pH 7,2) et remise en suspension dans le même tampon.

Un volume de 1ml a été inoculé dans 10 mL de MRSc additionné de 100 mg/l de lysozyme. Une suspension bactérienne inoculée dans MRSc bouillon sans lysozyme a été considérée comme un témoin. Tous les traitements ont été incubés 120 minutes 37° C. le compte viable a été effectué sur gélose MRSc. les boîtes de gélose ont été incubées à 37° C pendant 3 jours. le taux de survie est calculé selon l'équation suivante :  $\text{taux de survie\%} = (\log \text{cfu/ml final} / \log \text{cfu/ml intial}) \times 100$  (Rajoka 2018) .

#### III.1.5. Production des exopolysaccharides

Le pouvoir des isolats à produire des polysaccharides a été examiné suivant la méthode décrite par Manini et al 2016. Les isolats ont cultivées en surface de gélose MRSc pendant 5 jours. Les boîtes de gélose MRSc ont été examinées selon l'apparence de la propriété mucoid.

### **III.1.6.Résistance aux antibiotiques**

la résistance des isolats LAB envers les antibiotiques a été testés par la méthode de diffusion en disque selon (Domingos-Lopes et al., 2017). Les discs d'antibiotiques sont utilisés pour déterminer la résistance a 11 antibiotiques à savoir, la vancomycine 30 µg, tétracycline 30 µg, streptomycine (10 µg, rifampicine 5 µg, pénicilline 10 µg, ofloaxcine 5µg, kanamycine30 µg, érythromycine 30 µg, gentamycine10 µg, chloramphénicol 30 µg et amoxicilline 20 µg.(Rajoka.2018)

Les disques ont été placés en surface de boîtes de gélose Mueller-Hintonensemencée préalablement par les isolats. Après incubation à 37 ° C pendant 24 h, le diamètre du halo entourant les disques a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

Chaque isolat a été classé comme sensible, résistant ou intermédiaire selon le diamètre de la zone d'inhibition en accord avec le Tableaux du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2014). Toutes les analyses ont été effectuées en triple.

### **III.1.7.Activité anti-microbienne**

L'activité antimicrobienne a été testée par la méthode de diffusion en puits sur gélose décrite par Bian et al., 2010 et Fontana et al., 2015).

20 ml de gélose TSA (45 ° C) ont été mélangés avec 500 uL de culture d'une nuit de souches indicatrices et versés dans des boîtes de pétri. Des puits de 6 mm de diamètre sont ensuite creusés dans la gélose puis remplis avec 100 µL de surnageant natif de la culture des souches lactiques. Les boîtes sont laissées par la suite à une température de 4°C pendant 30 minutes pour la diffusion de surnageant, puis incubées à 37° C/24h.

L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. Après quoi , les boîtes ont été examinées si il y a l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. Les diamètres des zones d'inhibition apparues sont mesurés en millimètres.

### **III.1.8.Assimilation du cholestérol**



un volume de 10 ml bouillon mras contenant 0,3% oxgall, 0,2% thioglycolate de sodium p/v et 100µ g/ml de cholestérol est inoculé par les souches isolées (1% v/v et incubé en anaérobiose à 37° c pendant 24 heures. MRS bouillon contenant uniquement la thioglycolate a été utilisé comme contrôle. Après incubation, les cellules sont centrifugé (10000 g, 4° C, 10min) et la concentration restante de cholestérol t dans le bouillon a été déterminée en utilisant la méthode modifié au phtaladéhyde de (Rudel et Morris 1973). Les observations ont été comparées à une courbe standard préparée en utilisant des concentrations appropriées de cholestérol lues à 550 nm, et le pourcentage de réduction a été déterminé dans le bouillon épuisé en comparant les valeurs avec un témoin non inoculé.

### III.1.9. Adhésion aux cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 ont été cultivées dans des flacons de culture cellulaire en utilisant le milieu EAGLE modifié de Dulbecco (DMEM) supplémenté avec L-glutamine(2 mM), 10% de sérum bovin fœtal inactivé par la chaleur, 100 µg/ml de streptomycine, 1% d'acide aminé non essentiel et 100 µl/ml de pénicilline.

Les cellules Caco-2 ont ensuite étéensemencées dans des plaques de culture de 24 puits à une concentration de  $2,5 \times 10^5$  cellules par puits et les laissant se différencier 3 jours, en changeant le milieu chaque jour. Les cellules ont été incubées à 37 ° C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cultures d'une nuit des isolats ont été centrifugées, lavées deux fois en utilisant du PBS (0,1 M, pH 7,2) et remises en suspension dans le même tampon à des dilutions appropriées (Absorbance OD 630 0,2, environ  $2 \times 10^8$  CFU / ml).

des cultures d'une nuit des isolats ont été centrifugées, lavées deux fois en utilisant du PBS (0,1 M, pH 7,2) et remises en suspension dans le même tampon a une absorbance de 0,2 à 630nm(approxitivement  $2 \times 10^8$  UFC / mL).(Rajoka .2018)

Ensuite, les cellules bactériennes ont été ajoutées dans chaque puits et les cultures ont été incubées à 37 ° C pendant 4 h.

Après l'incubation, les cellules ont été lavé avec PBS (0,1 M, pH 7,2) et lysé avec une solution de Triton X-100 à 0,1%.

Les cellules lysées ont été diluées et étalé sur milieu MRSc agar, puis incubées à 37 ° C pendant 3 jours.

Le pourcentage d'adhésion bactérienne a été calculé comme suit :

$$\% \text{ D'adhésion} = (\text{bactéries adhérentes} / \text{total des bactéries ajouté}) \times 100.$$

### **III.1.10. Analyses statistiques**

Les valeurs sont données sous forme de valeurs moyennes et d'écart type avec des déterminations en triple.

Les résultats de l'ANOVA ont été suivis avec le Multiple de Tukey Test de comparaison dans tous les tests et différents étaient considéré comme statistiquement significatif si  $p < 0,05$ .

**CHAPITRE IV**  
**Résultat et discision**

## IV.1 Résultats et discussion

### IV.1.1. Identification des lactobacilles

Un total de 120 isolats ont été isolés d'intestin de volailles. 13 isolats ont présentés une apparence de bactéries lactiques sur milieu MRSc supplémenté avec 1% de CaCO<sub>3</sub> et ont été ensuite aléatoirement sélectionné pour d'autres expériences.

Les 13 isolats étaient Gram positif, catalase négative, sous forme bâtonnet et montrant une zone claire autour des colonies.

les isolats étaient mésophiles et capables de croître à 30 et 37 ° C et en présence de 2,5 à 5% de concentration de NaCl dans le milieu. Un arbre phylogénétique a été construit basé sur leurs séquences d'ADNr 16S en utilisant leS méthodes voisines (Fig. 1).

Les résultats de séquençage de l'Adn 16s ont montré que les isolats ont montré que les isolats SHA101, SHA103, SHA104, SHA107, SHA111 et SHA113 avait 99% d'homologie avec l'espèce *Lactobacillus reuteri*,

les isolats SHA106, SHA108, SHA109, SHA110 et SHA112 avaient 99% d'homologie avec l'espece *Lactobacillus vaginalis*. Quant a l'isolat SHA105 et SHA102 ont montré une homologie de 100 avec *Lactobacillus johnsoniin* et *Lactobacillus fermentum*, respectivement.

Les séquences génétiques de l'ARNr 16S de 13 isolats ont été déposées au Gene Bank sous les numéros d'accès motionné dans (tableau3).

**Tab. 3.** Les séquences génétiques de l'ARNr 16S de 13 isolats

Code d'isolat	Espèce	Pourcentage homologé	Code de Gene Bank
SHA101	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99%	KY679594
SHA103			KY679596
SHA104			KY679597
SHA107			KY679600
SHA111			KY679604
SHA113			KY679605
SHA106			<i>Lactobacillus vaginalis</i>
SHA108	KY679601		
SHA109	KY679602		
SHA112	KY679605		
SHA105	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	100%	
SHA102	<i>Lactobacillus fermentum</i>	100%	KY679595

#### IV.1.2. Tolérance aux acides et à la bile

La tolérance à l'acidité est une caractéristique importante que les souches doivent avoir pour quelle aura un impact positif sur le système gastro-intestinale

Les sels biliaries à tendance à endommager la structure de membrane cellulaire et c'est pourquoi la tolérance aux sels biliaries est une caractéristique importante de toutes les souches qui peut survivre dans l'intestin.

La capacité de souches isolées à survivre dans des conditions acides a été évaluée in vitro. La (figure 3) montre les taux de survie des souches isolées à pH 2,0 et pH 3,0 après 3 h d'incubation.

Dans l'ensemble, à pH 3,0, le taux de survie était plus élevé en comparaison avec pH 2,0 pour tous les isolats testés.

La taux survie de SHA101, SHA102, SHA103, SHA104, SHA105, SHA106, SHA107, SHA108, SHA109, SHA110, SHA111, SHA112 et SHA113 ont été retenus plus de 82 et 93% après exposition à pH 2,0 à pH 3,0 pendant 3 h.

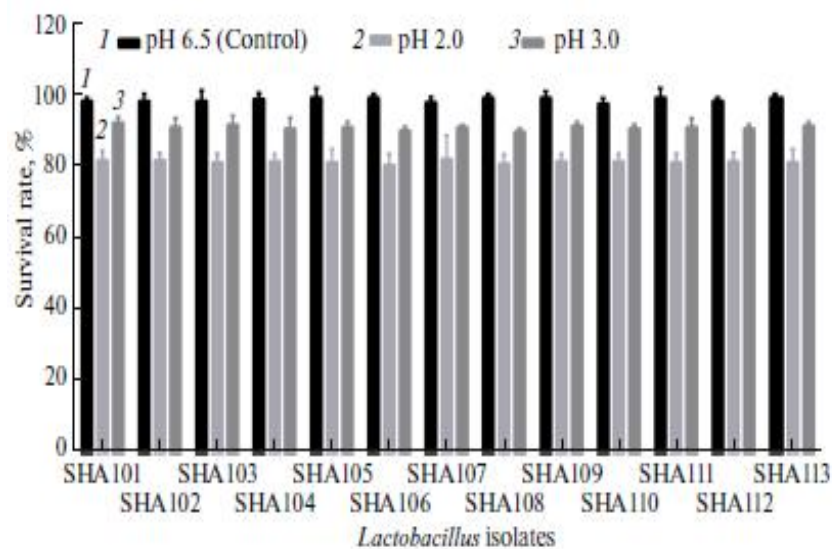
Les résultats ont démontré que toutes les souches testées ont exprimées une résistance élève aux conditions acides.

Les taux de survie des différents isolats différaient considérablement par rapport au contrôle ( $P > 0,05$ ) à chaque valeur de pH.

La (figure 4) montre le taux de survie des 13 isolats en milieu MRSc supplémenté avec 0,5 et 1% de sel biliaire après 3 h d'incubation.

Les résultats ont montré que les 13 isolats résistaient à diverses concentrations en sels biliaires. Cependant, avec l'augmentation de la concentration leur taux de croissance a diminué.

Trois isolats, SHA115, SHA116 et SHA117 ont montré une viabilité maximum. Cependant, l'isolat SHA116 a montré une meilleure tolérance de sel biliaire à 0,3, 0,5 et 1% par rapport aux autres isolats.



**Fig. 3.** Taux de survie de 13 souches de *Lactobacilles* isolées dans des conditions acides (pH 2,0 et pH 3,0) pendant 3 h.

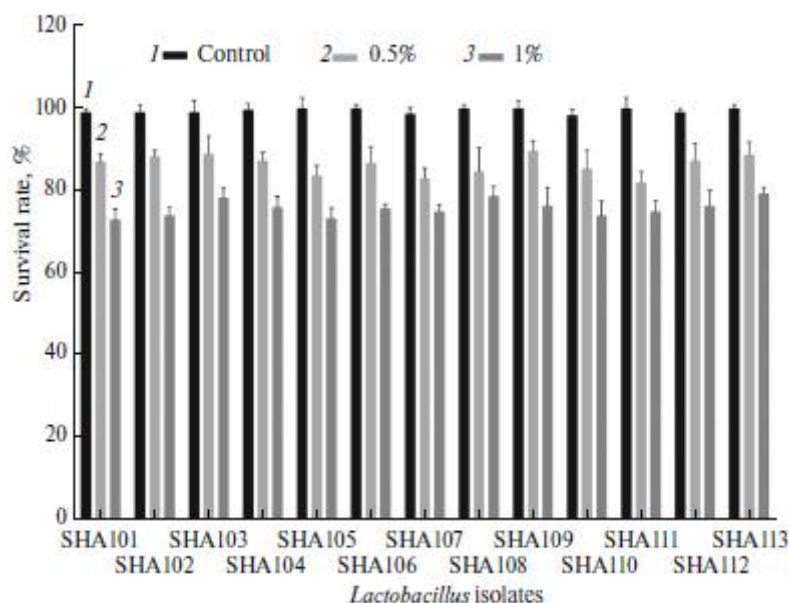


Fig. 4. Taux de survie de 13 souches de lactobacilles isolées à 0,5 et 1% de sels biliaires.

#### IV.1.3. Activité de l'hydrolase des sels biliaires

Les 13 isolats ont montré la capacité d'hydrolyser le taurodésoxycholate de sodium.

La présence d'un autour des colonies après croissance sur gélose MRSc en boîte supplémenté avec  $\text{CaCl}_2$ , 0,37 g/l et 5 g/L l'acide taurodésoxycholique de sodium (tableau 2).

#### IV.1.4. Résistance au lysozyme

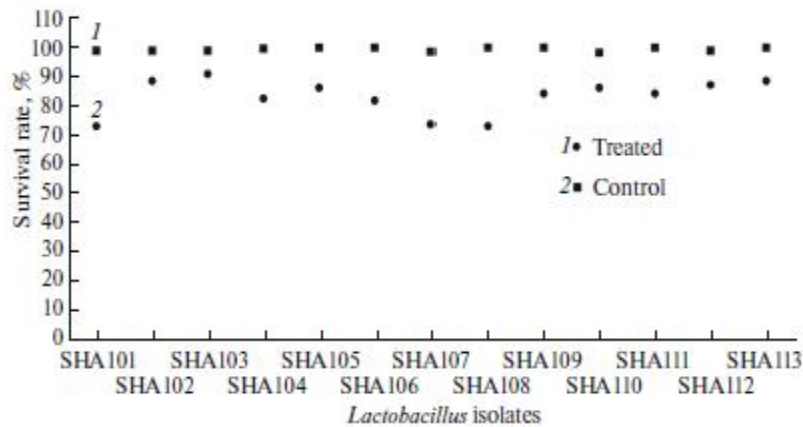
Les isolats testés ont montré une résistance au lysozyme à des concentrations allant jusqu'à 100 mg / L.

la résistance globale des isolats au lysozyme était exprimé en pourcentage du taux de survie allant du minimum 70% au maximum 90%.

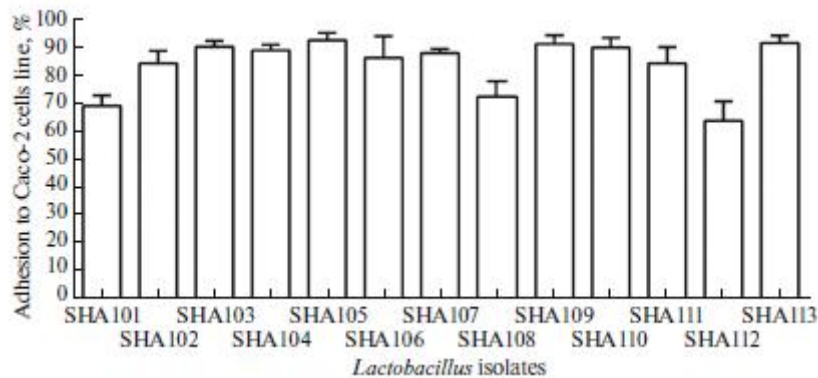
La (Figure 5) mentionne le taux de survie des bactéries après traitement au lysozyme pendant 120 min.

Les isolats SHA103, SHA110 et SHA113 montrés une résistance élevée (> 90%) après 120 min d'incubation et cela est considérée comme un traitement sévère.

Tous les isolats testés ont été identifiés comme résistants à lysozyme (100 mg / L).



**Fig. 5.** Taux de croissance des souches de lactobacilles dans un bouillon MRS supplémenté avec 100 mg / L de lysozyme et un bouillon MRS sans lysozyme considéré comme contrôle



**Fig. 6.** Capacité d'adhésion des isolats à la lignée de cellules Caco-2. La capacité d'adhérence est calculée en pourcentage d'isolats adhérant au nombre total d'isolats ajoutés.

#### IV.1.5. Production d'exopolysaccharide

Tous les isolats avaient la capacité de produire d'exopolysaccharide en gélose MRSc supplémenté avec glucose (2% v / v) comme source de carbone (tableau 5).

#### IV.6. Résistance aux antibiotiques

L'antibioresistance des isolats a été testé vis –a-vis 11 Antibiotiques par la méthode des disc (tableau 4).

Selon la concentration critique tous les isolats étaient résistants à la vancomycine (30 µg / disque), tétracycline (30 µg / disque), streptomycine (10 µg / disque), rifampicine (5 µg /



disque), pénicilline (10 µg / disque), ofloxacine (5 µg / disque), kanamycine (30 µg / disque), érythromycine (30 µg / disque), gentamycine (10 µg / disque).

Et sensible au chloramphénicol (30 µg / disque) et amoxicilline (20 µg / disque).

#### IV.7. Activité anti-microbienne

Tous les isolats ont montré une zone d'inhibition (avec diamètre supérieur à 15 mm) contre les trois déformations indicatrices. Cependant, les résultats obtenus à partir de la méthode de diffusion des puits d'agar variait de 6 à 14 mm parmi différentes souches.

Comparativement, l'antimicrobienne activité de tous les isolats contre *E. coli* et *Staphylococcus* (8–13 mm) était plus élevé que contre *Salmonella* (7 mm) (Tableau 6).

**Tableau04.**Sensibilité aux antibiotiques des isolats

Antibiotics	Dose	Isolates												
		SHA 101	SHA 102	SHA 103	SHA 104	SHA 105	SHA 106	SHA 107	SHA 108	SHA 109	SHA 110	SHA 111	SHA 112	SHA 113
Vancomycin	30 µg/disc	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tetracycline	30 µg/disc	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Streptomycin	10 µg/disc	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rifampicin	5 µg/disc	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Penicillin	10 µg/disc	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ofloxacine	5 µg/disc	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Kanamycin	30 µg/disc	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Erythromycin	30 µg/disc	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R
Gentamicin	10 µg/disc	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Chloramphenicol	30 µg/disc	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R
Amoxicillin	20 µg/disc	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

\* S = susceptible, R = resistant.

<b>Tableau 5. Capacité de réduction du cholestérol, activité BSH et production d'exopolysaccharides</b>			
<b>Isolâtes</b>	<b>Assimilation du cholestérol, <math>\mu\text{g} / \text{mL}</math></b>	<b>Activité BSH</b>	<b>production d'Exopolysaccharide</b>
SHA101	$22.51 \pm 0.1$	+	+
SHA102	$19.32 \pm 0.11$	+	+
SHA103	$21.5 \pm 0.14$	+	+
SHA104	$22.17 \pm 0.19$	+	+
SHA105	$22.51 \pm 0.11$	+	+
SHA106	$21.81 \pm 0.15$	+	+
SHA107	$20.17 \pm 0.19$	+	+
SHA108	$11.3 \pm 0.19$	+	+
SHA109	$19.18 \pm 0.14$	+	+
SHA110	$20.1 \pm 0.19$	+	+
SHA111	$21.2 \pm 0.10$	+	+
SHA112	$19.9 \pm 0.45$	+	+
SHA113	$20.54 \pm 0.88$	+	+

#### IV.8. Assimilation du cholestérol

Les résultats montrent que la quantité de cholestérol assimilé pendant 24 h d'incubation à 37 ° C a révélé une variation allant de 22 à 11 µg / mL.

Les isolats SHA101, SHA103, SHA104, SHA105, SHA106, SHA107, SHA110, SHA111 et SHA113 avaient des capacités d'assimilation du cholestérol (<20 µg / mL) (tableau 3), tandis que l'isolat SHA108 (11 µg / mL) avait moins assimilation du cholestérol (tableau 1).

#### IV.9. Adhésion aux cellules Caco-2

La capacité d'adhésion des isolats aux cellules intestinales était évaluée en utilisant des cellules Caco-2.

Aucune différence significative n'a été trouvée parmi différents isolats sur l'adhérence capacités. Comparativement, l'isolat SHA105, SHA109, SHA110 et SHA113 ont montré la capacité d'adhésion la plus forte (90%) à la cellule Caco-2

**Tableau6. Activité antimicrobienne (mm) des isolats contre une bacteSHA potentiellement pathogène**

Isolates	<i>Staphylococcus petrasii</i> subsp. Pragensis KY196531	<i>Salmonella enteric sv. typhimurium</i> CMCC (B) 50115	<i>E.coli</i> ATCC 25922
SHA101	10.3 ± 0.51	8.6 ± 0.51	13.3 ± 0.51
SHA102	9.5 ± 0.11	8.1 ± 0.51	12.8 ± 0.51
SHA103	11.2 ± 0.14	7.8 ± 0.51	12.4 ± 0.51
SHA104	12.7 ± 0.18	8.5 ± 0.51	13.1 ± 0.51
SHA105	12.5 ± 0.15	8.0 ± 0.51	9.3 ± 0.51
SHA106	11.8 ± 0.10	7.9 ± 0.51	14.1 ± 0.51
SHA107	20.17 ± 0.19	7.8.3 ± 0.51	11.2 ± 0.51
SHA108	11.3 ± 0.19	8.3 ± 0.51	10.8 ± 0.51
SHA109	9.8 ± 0.12	9.1 ± 0.51	13.5 ± 0.51
SHA110	10.1 ± 0.13	8.7 ± 0.51	10.2 ± 0.51
SHA111	11.2 ± 0.15	7.6 ± 0.51	11.1 ± 0.51
SHA112	9.9 ± 0.10	8.1 ± 0.51	9.8 ± 0.51
SHA113	10.4 ± 0.18	8.9 ± 0.51	14.2 ± 0.51

\* Presented values are mean of triplicate determinations. += Growth, – = no growth.

## IV.II. Discussion

Afin qu'un microorganisme puisse être reconnu en tant que potentiel probiotique, tout d'abord, il lui faut répondre à certains critères, il doit être non pathogène en répondant aux aspects sécuritaires. Il doit avoir la capacité de survivre et de croître dans les conditions physiologique du tube digestif, ainsi qu'avoir une bonne tolérance aux PH acides rencontré au niveau de l'estomac ainsi que les sels biliaires rencontrés au niveau du duodénum (Dunne et *al.*, 2001). Dans cette étude, 13 isolats de lactobacilles ont été obtenus à partir d'intestin de poulets sains et ont été sélectionnés en fonction de leur capacité de survie dans les conditions artificiellement simulées au système digestif.

les isolats ont montré un taux de survie dépassant les 90% en présence des sels biliaires (1% p/v), ces résultats sont comparables aux résultats enregistré par Zommiti et *al.*(2017) pour la souche *Lb. Curvatus* DN317. De même que, le niveau de concentration biliaire utilisé dans cette étude a été plus élevé que celui habituellement utilisé dans d'autres études.

Les 13 isolats sélectionnés dans cette étude ont montré un taux de survie supérieure à 82% à pH 2,0 et plus de 91% à pH 3,0 après une exposition de 3 h, indiquant qu'ils peuvent survivre à travers les systèmes digestifs. Le taux de survie enregistré dans la présente étude a été plus élevé que celui signalé par d'autres auteurs pour des souches de *L. acidophilus* CF07, et *Lactobacillus casei* sous des pH aussi bas (Ahn et *al.*,2002 ; Asghar et *al.*,2016 ).

En général, la tolérance des LAB à l'acidité dépend du profil de pH de la H $\beta$  -ATPase ainsi que à la composition de la membrane cytoplasmique. Ceci dernier est largement influencé par l'espèce e de bactérie, le type de milieu de croissance et les conditions d'incubation (Hood et Zotolla 1988; Madureira et *al.*2005).

La tolérance des lactobacilles au lysozyme a été trouvée auparavant dépendante de l'espèce et de la souche (Dias et *al.*, 2015). Nos résultats ont montré que l'isolat SHA103, SHA110, SHA11 et SHA113 sont résistants à 100 mg/l de lysozyme exprimant un taux de survie supérieur à 91%, ces résultats sont supérieurs aux résultats signalé par Zommiti et *al.*(2017) pour la souche *Lb. Curvatus* DN317(73%) et *Lb.plantarum*(85%) respectivement.

Cela indique que la capacité de résistance au lysozyme des isolats est suffisamment élevé pour survivre dans la salive, car 100 mg / L est le niveau le plus élevé de lysozyme utilisé pour simuler l'état de salive in vivo (Turchi et *al.*, 2013).

L'exopolysaccharide est un composé multifonctionnel qui a une application intéressante dans les industries alimentaires. De plus, c'est important pour la santé humaine car il possède

la capacité in vivo d'adhésion à la muqueuse humaine, possédant une propriété empêchant la formation des biofilm et aussi possédant une immuno-modulation (Russo et *al.*, 2012; Rendueles et *al.*, 2013).

les isolats obtenus ont également été testés sur leur capacité de résistance aux antibiotiques. Nos résultats montrent, qu'aucun des isolats testés était résistant à l'amoxicilline et au chloramphénicol, ces résultats sont comparables aux résultats mentionnés par d'autres chercheurs pour les souches *Lactococcus* DN317 (Zommiti et *al.*, 2017).

Tous les isolats ont exprimé une résistance à la vancomycine (30 µg), tétracycline (30 µg), streptomycine (10 µg), rifampicine (5 µg), pénicilline (10 µg), ofloxacine (5 µg), kanamycine (30 µg) érythromycine (30 µg), gentamycine (10 µg), de tels résultats ont été rapportés par Chang et *al.*, 2009) en testant l'antibiogramme de l'espèce *L. rhamnosus* GG.

La production de composés antimicrobiens est l'une des caractéristiques importantes que les souches probiotiques doivent avoir afin de concurrencer et exclure les agents pathogènes présents dans le tractus intestinal et exprimer l'effet probiotique chez leurs hôtes (Salminen et *al.*, 1998; Collado et *al.*, 2005). Dans cette étude, tous les isolats sélectionnés avaient une forte activité antimicrobienne contre *E. coli*, ces résultats sont en accord avec les précédents travaux rapportés par Musikasang et *al.* (2009) et Asguar et *al.* (2016) pour les souches KT4S13, KT3L20, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus casei*. L'activité antibactérienne du LAB peut souvent être due à la production d'acides organiques, avec une réduction conséquente du pH, ou à la production de peroxyde d'hydrogène. LAB pourrait produire divers composés tels que les acides organiques, le diacétyle, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (Venkatasatyanarayana et *al.*, 2017).

L'étude du pouvoir d'adhésion des différentes souches isolées aux cellules Caco-2 a fluctué entre 70 et 90% (figure). ces résultats sont bien meilleurs que les résultats précédemment trouvés par Collado et *al.*, 2006 et Caggia et *al.*, 2015.

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est un critère de sélection recommandé pour le choix des probiotiques. L'adhésion constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests in vitro puis in vivo en utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine (Reyes-Gavilan et *al.*, 2011). Les effets bénéfiques exercés par les probiotiques, y compris l'activité antimicrobienne contre les agents pathogènes, l'immuno-modulation, la réduction du

cholestérol, etc. n'est possible que avec une forte adhérence aux cellules épithéliales de l'intestin (Shokryazdan et *al.*, 2014).

La cellule Caco-2 est largement utilisé pour évaluer les propriétés d'adhésion des souches probiotiques car elle peut refléter la différenciation morphologique *in vitro* (De Palencia et *al.*, 2008). Dans notre étude, la capacité d'adhésion aux cellules Caco-2 variaient de 70 à 90% entre différents isolats. De même que, Gusils et al. (1999) ont signalé que *L. fermentum subsp. cellobiosus* a montré une grande capacité d'adhésion à l'épithélium intestinal. Par contre, la capacité d'adhésion aux cellules Caco-2 de nos isolats sont bien meilleurs que celle de la souche *Lact. curvatus* DN317 (Zommiti et *al.*, 2017).

## **Conclusion**

Dans cette étude, une recherche des bactéries lactiques à partir de matière fécale du poulet, a été effectuée, dans le but de sélectionner des souches à potentiel probiotique.

L'identification éventuelle basée sur l'étude morphologique, la production de catalase et la production d'oxydase a montré que les 13 isolats bactériens obtenus appartiennent au genre *LACTOBACILUS*.

Tous les isolats testés avaient un potentiel élevé adhérer et traverser le tractus gastro-intestinal.

Dans l'ensemble, les isolats SHA111 et SHA113 avaient comparativement potentiel plus élevé dans l'application pratique probiotiques à l'homme en raison de leur capacité élevée d'activité antimicrobienne, résistance du lysozyme, antibiotiques et production d'expolysaccharides.

Notre les résultats suggèrent également que tous les isolats ont un potentiel pour une application future comme probiotique dans la promotion de la santé aliments et ont le potentiel d'améliorer l'immunité du nourrisson contre les microbes pathogènes envahissants.

Notre étude a indiqué que l'intestin de la volaille est un bon ressource pour isoler les bactéries lactiques avec de bonnes caractéristiques comme probiotiques.

Cependant, plus in vitro et in vivo des investigations sont encore nécessaires pour confirmer le bénéfice rôle des isolats obtenus dans cette étude chez l'animal et Santé humaine.

Les résultats obtenus montrent que ces souches peuvent présenter de bon candidats pour les utiliser autant que Probiotiques.

A la lumière de nos résultats, nous préconisant un approfondissement de la présente étude et en tenant compte de :

- 1- L'identification complète des isolats bactériens sélectionnés ;
2. L'étude de la résistance des souches isolées aux conditions gastro-intestinales
3. L'étude du pouvoir antagoniste des souches isolées vis-à-vis des souches pathogènes
4. Détermination de la résistance des bactéries isolées aux différents types des antibiotiques
5. Détermination et purification des substances à effet anti microbienne synthétisée par les souches isolées



## **Bibliographie**

**A**

**Ait-Belgnaoui A., Lamine F., Han W., Eutamene H., Fioramonti J., Bueno L., Theodorou V (2005).** A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct.* 3: 59-63.

**Amanatidou A., Bennik M.H., Gorris L.G. et Smid E.J (2001).** Superoxide dismutase plays an important role in the survival of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen. *Arch Microbiol.*, 176:79-88.

**B**

**Ballongue J (2004).** Bifidobacteria and probiotic action. In Salminen, S., von Wright, A. and Ouwehand, A. Eds., *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and function Aspects.* Marcel Dekker, New York, pp 67-123.

**Beausoleil M., Fortier N., Guénette S., L'Ecuyer A., Savoie M., Franco M., Lachaine j., Weiss K (2007).** "Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* C11285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Canadian Journal Gastroenterol.*; 21(11): 732–736.

**Berg R.D et Savage D.C.** Immune responses of specific pathogen-free and gnotobiotic mice to antigens of indigenous and nonindigenous microorganisms. *Infect Immun* 1975;11:320-9.

**Butel M.J (2014).** Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *Journal des Antiinfectieux* [http:// dx.doi.org/10.1016/j.antinf.2014.01.010](http://dx.doi.org/10.1016/j.antinf.2014.01.010)

**C**

**Cassone M., Serra P., Mondello F., Girolamo A., Scafetti S., Pistella E., Venditti M (2003).** Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *Journal of clinical microbiology*, vol. 41. p. 5340-534

**Conway P.L, Gorbach S.L., Goldin B.R (1987).** Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 70:1–12

Denis F., poly M.C., Bengen E., et. Quentin R. (2007). *Bactériologie médicale, techniques usuelles.* 2ème Ed. , Elsevier Masson, paris : p.417

**Concoran, B.M., Ross, R., Fitzgerald, G.F. et Stanton, C., 2003:** Comparative survival of probiotic *Lactobacilli* spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J Appl. Microbiol.* 96,

**Cotter P.D., Hill C., Ross R.P (2008).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. Natural Review.

## D

**De Vos P, Garrity G.M, Jones D, Krieg N.R, Ludwig W, Rainey F.A, Schleifer KH, 108 Whitmanet WB (2009).** Genus Lactobacillus, Bacillus and Listeria. In : « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Springer éd., New York.pp.19-511

**Denis F., poly M.C., Bengen E., et. Quentin R. (2007).** Bactériologie médicale, techniques usuelles. 2ème Ed. , Elsevier Masson, paris : p.417

**De Roissart H. et Luquet F. M. (1994).** Bactéries lactiques : Aspect fondamentaux et technologiques. (I) : Tome I : 25-590. Ed. Lorica. France.

**Desai A. (2008).** Strain Identification Viability and Probiotics Properties of lactobacillus casei. Thesis doctorat of philosophy. UniversityWerrabee Campus Victoria School of Biomedical and Health Sciences, Australia. 228p

## E

**Ehrmann M.A., Kurzak P., Bauer J., Vogel R.F (2002).** Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. J Appl Microbiol. 92:966–75.

**Elahi,S.,Farnell,P.,Thurlow,K.J.,Scotti,C.et Varnam,A.H.,2008:**Refree analysis of probiotic food supplements.Short communication.food control9,25-29.

## F

**Feord J. (2002).** Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. Antonie van leeuwenhoek, vol. 82. p. 353-360.

**Federighi M., Magras C., Pilet M F.(2005).** Bactériologie alimentaire: compendium d'hygiène des aliments. 2 ème édition. Paris : 220 p.

**Fitzpatrick K.C (2005).** Probiotiques : document de travail rapport présenté à la direction des produits de santé naturels, santé Canada. 32p.

**FAO/OMS (2002).** Guidelines for the evaluation of probiotics in food.Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS).Working Group Report. London, Ontario, Canada

## G

**Garriga M, Pascual M., Monfort J .M., Hugas M (1998).** Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts *J Appl Microbiol.* 84(1):125-32.

**Guarner F., Khan A.G., Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A., Krabshuis J., Le Mair T (2008).** Recommandation Pratique : Probiotiques et Prébiotiques. Organisation mondiale de gastroentérologie.

**Gournier-château N, Larpent J P, Castillanos M I, et Larpent J L. (1994).** Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Édition Technologie et documentation Lavoisier pp. 1-192, Paris, France. Secretin M.C Pro-, Prebiotiques : developpement et mise au point dans les formules

**Guiraud J.P., Rosec J.P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR : 241 p

**Gueimonde M., Jalonen L., He F., Hiramatsu M., Salminen, S. (2006).** Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food research international*, 39(4), 467-471.

## H

**Hood SK, Zotolla EA (1988)** Effect of low pH on the viability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J Food Sci* 53:1514–1516.

## I

**Ishibashi N. et Yamazaki S (2001).** Probiotics and safety. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73 (supplement 2). p. 465S-470S.

## J

**Jacobsen C.N., Nielsen V.R., Hayford A., Møller P., Michaelsen K., Paerregaard A, Sandström B., Tvede M., Jakobsen M (1999).** Screening of probiotic activities of fortyseven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 65(11):4949-4956.

**Jin. L. Z., Y. W. Ho, Abdullah N., Jalaludin S ( 1998).** Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett. Appl. Microbiol.* 27:183-185.

## K

**Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L (2008).** Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*. 274: 1–14.

Kannahi, M. and Viji, N. (2014) Isolation and Characterization of Bacteriocin Producing Lactobacilli from Dairy Butter Sample. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research , 29, 183-186.

## L

**Liévin-Le Moal V et Servin A.L (2006).** The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: Mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. Clin Microbiol Rev

**Liong M.T et Shah N.P (2005).** Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of Lactobacillus strains. J Dairy Sci 88:55–66

## M

**Madsen K., Cornish A et al. (2001).** "Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function." Gastroenterology.121(3): 580-591.

**Madureira A.R, Pereira C.I., Truszkowska K., Gomes A.M., Pintado M.E., Malcata F.X (2005).** Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. Int Dairy J 15:921–927.

**Malago J, Koninkx J F J G et Marinsek L. (2011).** Probiotic bacteria and enteric infections. Springer. London New York. ISBN 978-94-007-0385-8.

**Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A (1997).** A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature.

**Musikasang H., A. Tani ., kittikun A. H., Maneerat S.** Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. World J Microbiol Biotechnol.25:1337–1345

## O

**Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E (2002).** Probiotics: an overview of beneficial effects. In Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications (pp. 279-289). Springer, Dordrecht.

## P

**Patterson C.A. (2008).** Probiotiques : bien faits au-delà des fonctions nutritionnelles de base .AAFC.1-4.

**Picard C., Fioramonti J., Francois A., Robinson T., Neant F., Matuchansky C (2005).** Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. Aliment Pharmacol Ther.

**Prescott L.M., Harley J.P et Klein D.A (2003).** Les bactéries lactiques : les Gram – positif pauvres en GC. Dans : microbiologie, 2eme éd. française. Prescott, L.M., M-Pharley, D.A. Klein (eds). De Book Université, Bruxelles, Belgique, 5A-535

**Polak-Berecka M.A, Waśko R.P., Skrzypek P., Sroka-Bartnicka A (2014).** The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 106:751–62.

## **R**

**Rajoka M.Sh.R., Hayat H. F., Sarwar S. Mehwish H. M., Ahmad F., Hussain, Shah N.S.Z.H., Khurshid M., Siddiqui M., Sh J (2018)** Isolation and Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Poultry Intestine *Microbiology*. 87, (1) :116–126.

**Reuben R.C., Roy P.C., Sarkar S.L., Alam R.U., Jahid I.K. (2019).** Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *Reuben et al. BMC Microbiology* .19:253

**Rothe M et Blaut M(2013).** . Evolution of the gut microbiota and the influence of diet. *Benef Microbes*. 4(1):31—7.

**Rudel L.L., Morris M.D (1973).** Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde *J Lipid Res*. 14(3):364-6

## **S**

**Salminen, S. J., M. Gueimonde, et al. (2005).** "Probiotics that modify disease risk." *The Journal of nutrition*. 135(5): 1294-1298.

**Saad N. (2010).** Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299V avec l'hôte : approche in vitro. Thèse de Doctorat de l'université de Limoges, Ecole doctorale Biologie – Santé, faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, France. 266p.

**Servin A.L (2004).** .Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*.

**Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L et al(2006).** Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:106-11.

**Suzuki T., Itoh K., Kaneko T., Suzuki H (1997)** Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of a culture condensate of *Bifidobacterium longum*. *J Vet Med Sci*. 59:665-9.

## T

**Tamboli C.P., Caucheteux C., Cortot A., Colombel J.F., Desreumaux. P(2003).** Probiotics in inflammatory bowel disease: a critical review, *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, vol. 17. p. 805-820.

**Tailliez P. (2004).** Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. Masson, Paris. 6. 35-41.

**Todorov S.D., Furtado D.N., Saad S.M.I ., Tome E., Franco B.D.G.M (2011).** Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, , Vol. 110 (4), p. 971-986

**Tortora G., Derrickson B. (2007).** Principes d'anatomie et de physiologie. Edition duRenouveau Pédagogique.Paris : De Boeck. XXX-1246 p.

**Tulumoglu S.,Yuksekdag ZN, Beyathl Y, Simsek O, Cinar B,Yasar E (2013)** Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe* 24:36–42

## Z

**Zommiti M., Connil N., Ben Hamida J., Ferchichi M. (2017).** Probiotic Characteristics of *Lactobacillus curvatus* DN317, a Strain Isolated from Chicken Ceca Probiotics & Antimicro. *Prot.* 9:415–424.

### Les sites d'internet

**Anonyme 1., (2020).**

**(Anonyme 02., 2020).**<https://www.luxia-scientific.com/fr/blog/microbiote-et-cholesterol>

## Annexes

### Annexe 1 les articles inclus dans la partie expérimentale

**Zommiti M., Connil N., Ben Hamida J., Ferchichi M. (2017).** Probiotic Characteristics of *Lactobacillus curvatus* DN317, a Strain Isolated from Chicken Ceca Probiotics & Antimicro. Prot. 9:415–424.

**Rajoka M.Sh.R., Hayat H. F., Sarwar S. Mehwish H. M., Ahmad F., Hussainc, Shah N.S.Z.H., Khurshid M., Siddiqu M., Sh J (2018)** Isolation and Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Poultry Intestine Microbiology. 87, (1) :116–126.

**Hood SK, Zotolla EA (1988)** Effect of low pH on the viability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. J Food Sci 53:1514–1516.

**Venkatasatyanarayana N, Vishwanathan S, Kadirvelu J (2017).** Molecular characterization of antimicrobial *Lactobacillus* isolates and evaluation of their probiotic characteristics in vitro for use in poultry. Food Biotechnol. 31(1):20–41. <https://doi.org/10.1080/08905436.2016.1269289>.

**Shokryazdan P, Kalavathy R, Sieo C.C, Alitheen N.B, Liang J.B, Jahromi M.F, Ho Y.W (2014).** Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for chickens. Pertanika J Tropical Agric Sci.37(1):141–57.

**Hood S.K et Zotolla E.A (1988).** Effect of low pH on the viability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. J Food Sci 53:1514–1516.

**Madureira A.R, Pereira C.I, Truszkowska K, Gomes A.M, Pintado M.E, Malcata F.X (2005).** Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. Int Dairy J 15:921–927. doi:10.1016/j.idairyj.2004.08.025

**Salminen, S. J., M. Gueimonde, et al. (2005).** "Probiotics that modify disease risk."The Journal of nutrition.135(5): 1294-1298.

**Desai A. (2008).** Strain Identification Viability and Probiotics Properties of *Lactobacillus casei*. Thesis doctorat of philosophy. University Werrabee Campus Victoria School of Biomedical and Health Sciences, Australia. 228p



**Federighi M., Magras C., Pilet M F.(2005).** Bactériologie alimentaire: compendium d'hygiène des aliments. 2 ème édition. Paris : 220 p.

## **Résumé**

## Résumé

L'objectif d'étude et la présente est l'isolement à partir de matière fécale du poulet des souches de Lactobacilles et les identifiées, dont le but de leur attribué le potentiel probiotique. 13 souches ont été isolées à partir des excréments du poulet cultivés sur milieu MRS cysteine gélose. L'identification basée sur l'étude des caractères morphologiques, test de catalase et le test d'oxydase a permis de rattacher les souches isolées au genre Lactobacillus. Les propriétés probiotiques ont été testées dans les aspects de sensibilité aux antibiotiques, activité antimicrobiens, production d'exopolysaccharides, tolérance au lysozyme, tolérance à l'état de l'intestin (pH bas, tolérance aux sels biliaries) l'adhésion à la lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal humain (Caco-2). La plupart des isolats étaient résistants à streptomycine (10 µg / mL), gentamicine (10 µg / mL), kanamycine (30 µg / mL), pénicilline (10 µg / mL) et chloramphénicol (30 µg / mL). Les isolats montrent de fortes capacités à adhérer à la cellule Caco-2 dans la gamme de (76 à 85%). Les isolats SHA101 à SHA113 ont montré un taux de survie élevé dans des conditions du tractus gastro-intestinal (> 80%), indiquant leur potentiel dans l'application des probiotiques. Les résultats de ces tests indiquent que les bactéries lactiques isolés de l'intestin de volaille peuvent être utilisés comme probiotiques dans divers produits.

**Mots clés :** lactobacilles, probiotiques, tube digestif, poulet.

### Abstract

The objective of this study and this is the isolation from chicken feces of strains of Lactobacillus and identified, the purpose of which ascribed them to probiotic potential. 13 strains were isolated from chicken excreta cultured on MRS cysteine agar medium. The identification based on the study of morphological characters, catalase test and oxidase test made it possible to relate the isolated strains to the genus Lactobacillus. The probiotic properties were tested in the aspects of sensitivity to antibiotics, antimicrobial activity, production of exopolysaccharides, tolerance to lysozyme, tolerance to the state of the intestine (low pH, tolerance to bile salts) adherence to the lineage human colorectal adenocarcinoma cell (Caco-2). Most isolates were resistant to streptomycin (10 µg / mL), gentamicin (10 µg / mL), kanamycin (30 µg / mL), penicillin (10 µg / mL) and chloramphenicol (30 µg / mL). The isolates show strong abilities to adhere to the Caco-2 cell in the range of (76-85%). The SHA101 to SHA113 isolates showed a high survival rate under gastrointestinal tract conditions (> 80%), indicating their potential in the application of probiotics. The results of these tests indicate that lactic acid bacteria isolated from poultry intestine can be used as probiotics in various products.

**Keywords:** lactobacilli, probiotics, digestive tract, chicken.

### الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو عزل براز الدجاج من سلالات Lactobacillus وتحديدها والغرض منها يعزى الى احتمالية بروبيوتيك. تم عزل 13 سلالة من براز الدجاج المستزرع على وسط أجار السيستين MRS. إن التحديد المعتمد على دراسة الصفات المورفولوجية واختبار الكاتالاز واختبار الأوكسيداز جعل من الممكن ربط السلالات المعزولة بالجنس Lactobacillus. تم اختبار خصائص البروبيوتيك في جوانب الحساسية للمضادات الحيوية ، والنشاط المضاد للميكروبات ، وإنتاج السكريات الخارجية ، والتسامح مع الليزوزيم ، والتسامح مع حالة الأمعاء (انخفاض درجة الحموضة ، والتسامح مع أملاح الصفراء) والالتزام بالنسب خلوية سرطان القولون والمستقيم البشرية (كاكو -2). كانت معظم العزلات مقاومة للستربتومايسين (10 ميكروغرام / مل) والجنتاميسين (10 ميكروغرام / مل) والكاناميسين (30 ميكروغرام / مل) والبنسلين (10 ميكروغرام / مل) والكلورامفينيكول (30 ميكروغرام / مل). تُظهر العزلات قدرة قوية على الالتصاق بخلية Caco-2 في حدود (76-85%). (أظهرت عزلات SHA101 إلى SHA113 معدل بقاء مرتفعاً في ظل ظروف الجهاز الهضمي (> 80%) ، مما يشير إلى إمكاناتها في تطبيق البروبيوتيك. تشير نتائج هذه الاختبارات إلى أن بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من أمعاء الدواجن يمكن استخدامها كبروبيوتيك في منتجات مختلفة.

الكلمات المفتاحية: العصيات اللبنية - بروبيوتيك - الجهاز الهضمي - دجاج