



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques

Référence ..... /

# MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

---

Présenté et soutenu par :

**SMIDA Imene    CHAITER Ferdaous**

Le : samedi 3 juillet 2021

## **Contribution à l'évaluation du potentiel probiotique de *Lactobacillus* isolées à partir de selles de nourrissons**

---

**Jury :**

Mme. ABSI Rima	MAA	Université de Biskra	Président
M. BENKADDOUR Bachir	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. BABA ARBI Souad	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020 - 2021

## Remerciements

Avant tout nous remercions tout d'abord Allah de nous avoir donné le courage, la force, la santé, et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

Nous remercions notre encadrant **BENKADDOUR Bachir** pour ses précieux conseils, son aide et ses orientations.

Notre 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 d'université de biologie 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.

# Dédicace

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 côtés pour leur générosité et leurs sacrifices.

Et me donner le courage pour terminer mes études.

Merci beaucoup et je vous aime beaucoup.

A mes très chers frères « Adem » et « Seifeeddine »

A mes belles sœurs « Abir », « Yasmine », « Hadjer », « Khouloud » et « Douaa »

Qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

A tous mes amis

Enfin, je remercie mon binôme « Imene », qui a contribué à la réalisation de ce travail.

CHAITER Ferdaous

# Dédicace

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 côtés pour leur générosité et leurs sacrifices.

Et me donner le courage pour terminer mes études.

Merci beaucoup et je vous aime beaucoup.

A mes très chers frères « Azzeddine » et « Younes »

A mes belles sœurs « Asma » et « Zineb »,

Qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

A tous mes amis

Enfin, je remercie mon binôme « Ferdaous », qui a contribué à la réalisation de ce travail.

SMIDA Imene

# Table des matières

Remerciements

Dédicace

Table des matières

Liste des Tableaux..... I

Liste des Figures..... II

Liste des Abréviations ..... III

Introduction ..... 1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les lactobacilles

1.1. Les lactobacilles ..... 3

1.2. Taxonomie ..... 3

1.3. Habitat ..... 3

1.4. Caractères morphologiques ..... 3

1.5. Caractères culturels ..... 4

1.6. Exigence nutritionnelle..... 4

1.7. Caractères physiologiques et biochimiques..... 5

Chapitre 2 : Les probiotiques

2.1. Historique et définition ..... 6

2.2. Classification des probiotiques ..... 6

2.3. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques ..... 7

2.4. Mécanismes d'action ..... 8

2.5. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine ..... 9

2.6. Effets probiotiques des lactobacilles ..... 10

Partie II : la partie expérimentale

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

3.1. Isolement et identification des isolats de lactobacilles ..... 11

3.1.1. Échantillonnage..... 11

3.1.2. Isolement et purification ..... 11

3.1.3. Identification ..... 11

3.2. Mis en évidence *in vitro* de quelques propriétés probiotiques ..... 12

3.2.1. Tolérance à l'acide..... 12

3.2.2. Tolérance à la bile .....	12
3.2.3. Sensibilité aux antibiotiques .....	14
3.2.4. Activité antimicrobienne .....	13
3.2.5. Test d'adhésion .....	13
<b>Chapitre 4 : Résultats et discussion</b>	
4.1. Isolement et identification .....	16
4.2. Etude des caractères probiotiques.....	17
4.2.1. Tolérance à la bile .....	17
4.2.2. Tolérance à l'acide .....	19
4.2.3. Sensibilité aux antibiotiques .....	21
4.2.4. Activité antimicrobienne.....	22
4.2.5. Test d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales .....	23
Conclusion.....	26
Bibliographie.....	27
Annexes	
Résumés	

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Habitat des lactobacilles adopté à partir (Miller <i>et al.</i> , 2016 ; Montoro <i>et al.</i> , 2016 ; Etzold <i>et al.</i> , 2014) .....	3
<b>Tableau 2 :</b> Liste des microorganismes considérés comme des probiotiques (Naïmi, 2014) ..	7
<b>Tableau 3 :</b> Critères de sélection des probiotiques adapté par Salminen (2006) .....	8
<b>Tableau 4 :</b> Les principaux effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine adopté à partir de (Debeyer, 2020 ; Kagambèga <i>et al.</i> , 2019 ; Aureli <i>et al.</i> , 2011).....	10
<b>Tableau 5 :</b> Analyse de pourcentage des souches <i>Lactobacillus</i> identifiées communs adoptée à partir 3 études réalisées par (Xanthopoulos <i>et al.</i> , 2000; Kirtzalidou <i>et al.</i> , 2011; Halimi et Mirsalehian., 2016). .....	17
<b>Tableau 6 :</b> Tolérance à la bile des isolats de <i>Lactobacillus</i> après 24 h d'incubation avec présence de bile. Les valeurs représentent la transformation log <sub>10</sub> des comptes viables (Kirtzalidou <i>et al.</i> , 2011) .....	18
<b>Tableau 7 :</b> Tolérance au pH des isolats de <i>Lactobacillus</i> après 1,5 et 3 h d'incubation à pH 3 et pH 2, respectivement. Les valeurs représentent la transformation log 10 des comptes viables (Kirtzalidou <i>et al.</i> , 2011) .....	20
<b>Tableau 8 :</b> Les cellules de lactobacilles adhérentes aux cellules intestinales Caco-2 (Kirtzalidou <i>et al.</i> , 2011) .....	24

# Liste des Figures

**Figure 1 :** Aspect microscopique d'une souche de lactobacilles observé par microscope électronique à balayage. (Tirée de [www.inra.fr](http://www.inra.fr)) ..... 4

# Liste des abréviations

**FAO:** Food and Agriculture Organization

**OMS :** Organisation Mondial de la Santé

**Lb :** Lactobacilles

**Bf :** *Bifidobacterium*

**Et :** *Enterococcus*

**E:** *Escherichia*

**B:** *Bacillus*

**S:** *Staphylococcus*

**Sc:** *Sacharomyces*

**St :** *Streptococcus*

**Sa :** *Salmonella*

**P :** *Pseudomonas*

**L :** *Listeria*

**IL :** Interleukine

**TGF:** Transforming Growth Factor

**TNF:** Tumor necrosis factor

**NK :** Natural Killer

**LT :** Lymphocytes T

**IgA :** Immunoglobuline A

**SII :** Syndrome de l'intestin irritable

**MICI :** Maladie Inflammatoire Chronique de l'intestin

**MRS:** Man, Rogosa et Sharp

**MRSc:** Man, Rogosa et Sharp cystéiné

**ADN :** Acide désoxyribonucléique

**PCR :** Polymerase Chain Reaction

**ARNr 16s** : Acide Ribonucléique 16 Svedberg

**TGI** : Tractus gastro-intestinal

**PBS** : Phosphate Buffer salin

**t** : temps

**T** : Température

**P/V** : poids/volume

**°C** : Degrés Celsius

**pH** : Potentiel Hydrogène

**%** : Pour cent

**HCL** : Chlorure d'hydrogène

**h** : heur

**NaCl** : Chlorure de Sodium

**DMEM** : milieu minimum essentiel d'Eagle

**BHI** : brain heart infusion

# **Introduction**

# Introduction

Le corps humain abrite des milliards de cellules microbiennes dont les actions coordonnées sont considérées comme important pour la vie humaine. De telles populations de cellules microbiennes atteignent leur densité la plus élevée dans le compartiment intestinal, où ils forment collectivement une communauté microbienne complexe connus sous le nom de microbiote intestinal. (Lozupone *et al.*, 2012 ; Milani *et al.*, 2017).

Les probiotiques sont définis comme des «micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, confèrent un avantage sanitaire à l'hôte» par l'Organisation mondiale de la santé. Bien que l'idée d'utiliser les probiotiques pour des prestations de santé ne soit pas nouvelle, l'intérêt a considérablement augmenté ces dernières années (Islam, 2016).

Les probiotiques sont connus pour être une stratégie potentielle pour prévenir et traiter de nombreuses maladies gastro-intestinales, notamment la diarrhée virale, la diarrhée du voyageur, la diarrhée associée aux antibiotiques, *Helicobacter pylori* infection et maladie inflammatoire de l'intestin (MICI) (Chen *et al.*, 2015).

Les lactobacilles et les bifidobactéries sont les principaux microorganismes reconnus par leur avantages nutritionnelles en tant que probiotiques pour la santé. (Bahri *et al.*, 2014).

Les lactobacilles sont des bactéries Gram-positives exigeantes qui peuplent les habitats riches en nutriments associés aux aliments, aux aliments pour animaux, aux plantes, aux animaux vertébrés et invertébrés et aux humains. En raison de leur utilisation dans les applications alimentaires, biotechnologiques et thérapeutiques, les lactobacilles ont une importance économique considérable. (Duar *et al.*, 2017).

Des souches de lactobacilles et bacilles Probiotiques isolées à partir de diverses sources sont utilisées comme des candidats probiotiques et il est peu probable que chaque espèce/souche possède toutes les caractéristiques souhaitées qui en feront un probiotique plus efficace et actif (Swain *et al.*, 2014 ; Parveen rani *et al.*, 2016).

Dans notre travail on a proposerait de réaliser un tour d’horizon sur le potentiel probiotique des *Lactobacillus* et plus particulièrement sur l’évaluation du potentiel probiotique de *Lactobacillus* isolées à partir de selles de nourrissons.

L’objectif premier de ce travail était d’isoler et identifier des souches de lactobacilles à partir de selles de nourrissons afin d’évaluer leur profil probiotique par des tests *in vitro*. Toutefois, suites aux conditions de l’épidémie due au COVID-19 une analyse d’articles a été adoptée. Un article en relation avec l’intitulé du mémoire est comme partie pratique puis les résultats sont analysé et discuté avec d’autre article dans la même thématique.

Le manuscrit comporte deux parties :

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

- 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 I : Synthèse bibliographique**

# **Chapitre 1 : Les lactobacilles**

### 1.1. Les lactobacilles

Les lactobacilles sont des bactéries lactiques (LAB) 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).

### 1.2. Taxonomie

Le genre *Lactobacillus* fait partie du phylum des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, ordre des *Lactobacillales*, la famille des *Lactobacellaceae*. Il regroupe des espèces présentant des caractères phénotypiques très hétérogènes, cette hétérogénéité est due à un GC% allant de 32-55% (Mokoena, 2017).

Actuellement le genre *Lactobacillus* comprend 261 espèces (à mars 2020) extrêmement divers sur les plans phénotypique, écologique, génétique et niveaux otypiques (Zheng *et al.*, 2020).

### 1.3. Habitat

Les lactobacilles forment un groupe hétérogène de bactéries, ubiquistes et très répandues dans l'environnement végétal, animal et humain (Tailliez, 2004). (tab. 1) présente les différents habitats de quelques espèces de lactobacilles.

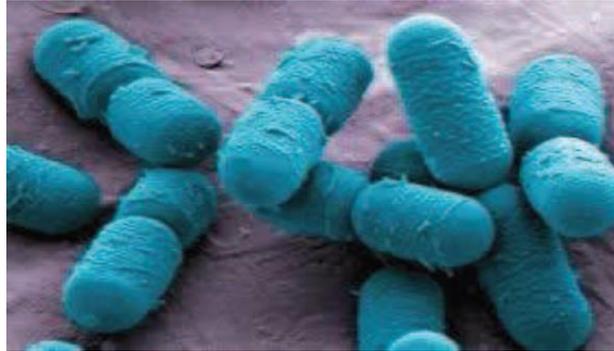
**Tableau 1 :** Habitat des lactobacilles adopté à partir (Miller *et al.*, 2016 ; Montoro *et al.*, 2016 ; Etzold *et al.*, 2014)

Habitat	Espèce	Activité ou produit
Matériel végétal en décomposition	<i>Lb.Plantarum</i> , <i>Lb.Casel</i> , <i>Lb.acidophilus</i>	Cornichons, ensilage et choucroute
Laiterie	<i>Lb. delbrukii</i> , <i>Lb.lactis</i>	Fromage, yaourts
Tractus gastro-intestinal des animaux - oral - intestinal	<i>Lb. Salivarius</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. rhamnosus</i> <i>Lb.Casi</i> , <i>Lb.Plantarum</i> <i>Lb. gasseri</i>	Formation de carie dentaire Flore normale
Vagin des mammifères	<i>Lb.vaginalis</i> , <i>Lb.ssp</i>	Flore normale

### 1.4. Caractères morphologiques

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulées et généralement non Mobiles. Ils sont la forme de bâtonnets longs et fins où très courts ou coccobacilles, groupées

en paires ou en chaînes (Azam *et al.*, 2017). La figure 1 montre l'aspect microscopique d'une souche de lactobacilles observée par microscopie électronique.



**Figure 1 :** Aspect microscopique d'une souche de lactobacilles observé par microscope électronique à balayage. (Tirée de [www.inra.fr](http://www.inra.fr))

### 1.5. Caractères cultureux

Les colonies des lactobacilles sont généralement de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques. Dans les cas rares, certaines espèces comme *Lb.plantarum*, donnent des colonies jaunâtres ou rougeâtres. Les lactobacilles cultivent également, bien que plus difficilement, sur gélose enrichie en sang frais ou cuit donnent de petites colonies sans zones d'hémolyse (Denis *et al.*, 2007).

Le milieu de culture et d'isolement de base le plus connu est le milieu Man Rogosa et Sharpe (MRS) (Jomehzadeh *et al.*, 2020).

### 1.6. Exigence nutritionnelle

En plus de la source de carbone et d'azote, les lactobacilles sont caractérisés par des exigences nutritionnelles en vitamines et en base azotés. Toutes les espèces ont un besoin absolu en vitamine. Les déficiences en vitamines (B12) peuvent induire une diminution à la synthèse de l'ADN et entraîner des changements morphologiques et les cellules deviennent filamenteuses. (De Vos *et al.*, 2009).

Les ions  $Mg^{2+}$  ou  $Fe^{2+}$  sont nécessaires pour la croissance de lactobacilles, le manganèse et le magnésium interviennent comme activateurs d'un grand nombre de réactions enzymatiques et comme stabilisateur de la structure des acides nucléiques, de l'intégrité des ribosomes et de la membrane cellulaire de lactobacilles (De Vos *et al.*, 2009).

### 1.7. Caractères physiologiques et biochimiques

Ils sont anaérobies facultatifs, mais poussent mieux sous atmosphère enrichie de 5 à 10% de CO<sub>2</sub> (Laprent, 2000), leur pH optimum de croissance est de 5,5 mais ils poussent aussi à pH neutre. Leur température optimale de croissance est généralement de 37°C pour la plupart des espèces (Prasad *et al.*, 2020).

Les lactobacilles sont catalase négative, nitrate réductase négative ils sont microaérophiles ou anaérobies. Le métabolisme énergétique des lactobacilles est fermentaire (Chaudhari *et al.*, 2012). Les lactobacilles sont subdivisés selon leur type fermentaire en trois groupes selon la classification d'Orla-Jensen remaniée par Kandler et Weiss 1986 selon (Devos *et al.*, 2009).

Le groupe I : Comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire qui produisent uniquement de l'acide lactique à partir du glucose et qui sont incapables de fermenter les pentoses ou le gluconate. Elles possèdent un fructose 1,6-diphosphate aldolase et une phosphofructokinase. 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. Exemple : *Lb.acidophilus* et *Lb.gasseri*.

Le groupe II : Comprend les espèces à métabolisme hétérofermentaire facultatif. Ces espèces utilisent la voie homofermentaire mais elles sont capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration de glucose limitée. Elles ont un fructose 1,6-diphosphate aldolase et une 6-phosphogluconate déshydrogénase. Exemple : *Lb.casei*, *Lb.sake*, *Lb.curvatus* et *Lb.plantarum*.

Le groupe III : Comprend les espèces hétérofermentaires obligatoires qui forment des quantités équimolaires de CO<sub>2</sub>, d'acide lactique, d'acide acétique et / ou d'éthanol. Les pentoses sont fermentés en acides lactique et acétique par la voie de la phosphocétolase. En outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'homme et participent à l'équilibre de la flore intestinale. Exemple : *Lb.brevis* et *Lb.fermentum*.

# **Chapitre 2 : Les probiotiques**

## 2.1. Historique et définition

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, Elie Metchnikoff (scientifique russe, lauréat du Nobel et professeur à l'institut Pasteur à Paris) a postulé que les bactéries produisant de l'acide lactique (LAB) offraient des bénéfices pour la santé, il identifie deux bactéries bienfaites : *St. thermophilus* et *Lb.bulgaricus* (Guarner, 2017). En 1917, c'est au tour du scientifique Alfred Nissil de faire une avancée importante dans ce domaine en isolant pour la première fois une souche non pathogène d'*Escherichia coli* (*E.coli Nissle 1917*), il s'agit d'une des exceptions de probiotiques n'appartenant pas aux bactéries lactiques (Kimmel, 2018). En 1954, Ferdinand Vergin a été le premier à associer le terme « Probiotique », au fait que les microorganismes bactériens peuvent nous servir du bien et de nous garder en vie (Abul Kalam Azad *et al.*, 2018). Puis en 1989, Roy Fuller a ajouté une précision sur la nécessité de la viabilité des probiotiques et a précisé leur effet bénéfique sur l'hôte (Simon, 2019).

En 2002, l'organisation des nations unies pour l'agriculture et l'alimentation et l'organisation mondiale pour la santé (FAO et L'OMS) 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 bénéfiques sur la santé de l'hôte qui les ingère » (Budić, 2019).

## 2.2. Classification des probiotiques

Les probiotiques peuvent être classés en quatre catégories. La première catégorie est le genre *Lactobacillus*, les lactobacilles sont des bactéries Gram-positif, elles se présentent sous forme de bacilles ou de coques et sont anaérobies facultatives, immobiles, non flagellés, et non sporogènes (Bondy *et al.*, 2021). Les lactobacilles généralement reconnues comme parmi les bactéries d'acide lactique qui sont capables de produire de l'acide lactique par la fermentation de certains sucres comme le lactose (Salvetti *et al.*, 2012).

La deuxième catégorie est les bifidobactéries (bifidus) sont phylogénitiquement très éloignées des bactéries lactiques (Pokusaeva et Fitzgerald, 2011), elles se présentant sous forme du bâtonnet à Gram-positif, elles peuvent être isolées ou s'assembler en chaînes ou amas, immobiles, non sporulantes et anaérobies strictes (Killer *et al.*, 2011). Le troisième groupe de probiotiques comprend d'autres bactéries lactiques en forme de coques telles que les *Enterococcus* et les *Streptococcus* (Eslami *et al.*, 2020).

Le quatrième groupe constitué de microorganismes non-lactique, *Bacillus subtilis*, *B.cereus* ou encore les bactéries appartenant à l'espèce *Propionibacterium freudenreichii* et *Escherichia coli* Nissle1917, ainsi que certaines levures de type *Sacharomyces* (Kaspar *et al.*, 2008).

**Tableau 2 :** Liste des microorganismes considérés comme des probiotiques (Naïmi, 2014).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autre bactéries lactiques	Micro-organismes non lactiques
<i>Lb.acidophilus</i>	<i>Bf.adolescentis</i>	<i>Et.faecalis</i>	<i>B.subtilis</i>
<i>Lb.amylovirus</i>	<i>Bf.animalis</i>	<i>Et.faecium</i>	<i>B. cereuse</i>
<i>Lb.brevis</i>	<i>Bf.bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>E.coli</i> Nissle1917
<i>Lb.casei</i>	<i>Bf.breve</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Lb.cellobius</i>	<i>Bf.infantis</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>Lb.crispatus</i>	<i>Bf.lactis</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Sc.cerevisae</i>
<i>Lb.curvatus</i>	<i>Bf.longum</i>	<i>acidilactici</i>	<i>Sc.boulardii</i>
<i>Lb.delbrueckii</i>	<i>Bf.thermophilus</i>	<i>Sporolactobacillus</i>	
<i>Lb.farciminis</i>		<i>inulinus</i>	
<i>Lb.fermentum</i>		<i>St.thermophilus</i>	
<i>Lb.gallinarum</i>		<i>St.diacetylactis</i>	
<i>Lb.gasseri</i>		<i>St.intermedius</i>	
<i>Lb.paracasei</i>			
<i>Lb.plantarum</i>			
<i>Lb.rhamnosus</i>			

### 2.3. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques

Les probiotiques présentent des propriétés fonctionnelles, sécuritaires et technologiques (FAO/WHO, 2002), le choix des probiotiques dépend de ces propriétés et du type d'utilisation, 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 (Ebel, 2012). Les principaux critères de sélection des probiotiques sont décrits dans (tab. 3).

**Tableau 3** : Critères de sélection des probiotiques adapté par Salminen (2006).

Critères de sécurité	Identification taxonomique précise. Origine humaine pour l'utilisation chez l'humain. Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques. Historique de non pathogénicité et non-invasion de l'épithélium intestinal. Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques.
Critères fonctionnels	Tolérance à l'acidité, à la bile et aux enzymes digestives. Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus intestinal. Production de substances antimicrobiennes (bactériocines, acide organiques, peroxyde d'hydrogène ou autres composés inhibiteurs) et antagonisme envers les pathogènes. Immunomodulation. Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé.
Critères technologiques	Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini. Conservation des propriétés probiotiques après production. Non modification des propriétés organoleptiques du produit fini.

#### 2.4. Mécanismes d'action

Les modes d'action des probiotiques sont multiples et complexes et varient d'une souche à l'autre en fonction des applications recherchées (Bleau, 2020). Parmi les mécanismes d'action des probiotiques est le renforcement de la barrière épithéliale, plusieurs études indiquent que les probiotiques améliorent l'expression des gènes impliqués dans la signalisation des jonctions serrées (Zaylaa, 2018), ils peuvent également augmenter l'expression de gènes responsables des mucines (MU2 et MU3) et la sécrétion de mucines sur des cellules intestinales comme un mécanisme pour améliorer la fonction de la barrière et l'exclusion des agents pathogènes (Arlène *et al.*, 2018). D'autre mécanisme est la production de substances inhibitrices de la croissance des pathogènes telles que l'acide organique, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone et les bactériocines d'inhibition à large spectre (Diaz *et al.*, 2019), d'autre part les probiotiques entrent en compétition avec les agents

pathogènes pour les sites d'adhésion situés sur les muqueuses intestinales, par ailleurs ils sont également entrent en compétition pour les nutriments (Mohapatra *et al.*,2012), modification du pH local de manière à créer un environnement défavorable aux pathogènes (Kagambèga *et al.*, 2019).

Finalement, ils ont aussi le potentiel moduler le système immunitaire incluant l'immunité innée et adaptative. Des effets sur le système immunitaire inné tels que la production de cytokines anti-inflammatoire telles que l'interleukine (IL-10 et TGF- $\beta$ ) et inhiber la production des cytokines pro-inflammatoires telles que (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6,IL-8 et IL-1 $\beta$ ) (Joffre *et al.*,2018), augmentant la sécrétion de mucines, la stimulation de l'activité des phagocytose, lymphocytes Natural Killer (NK) et régulent les réponses des lymphocytes T (LT) (Yousefi *et al.*, 2018), les études réalisées sur des enfants en bas âge ont permis de comprendre l'impact des probiotiques sur l'immunité adaptative par la sécrétion d'IgA au niveau de la muqueuse intestinale vis-à-vis de pathogènes viraux ou bactériens (Milliot, 2015). Par conséquent, les probiotiques agissent comme des adjuvants en modulant une réponse rapide de la muqueuse intestinale et renforçant ainsi le système immunitaire intestinale (Galdeano *et al.*, 2019).

## **2.5. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine**

Les probiotiques ont été largement étudiés et explorés commercialement dans de nombreux produits différents dans le monde (Lokhande *et al.*, 2020), sans aucun doute, les probiotiques varieront dans leur efficacité et il se peut que les mêmes résultats ne se produisent avec toutes les espèces (Butel, 2013).

Des études suggèrent que l'ingestion de probiotiques peut être recommandée comme approche préventive pour maintenir l'équilibre de la microflore intestinale et pour l'intervention dans des maladies et troubles spécifiques (Prabhurajeshwar et Chandrakanth, 2017).

Plusieurs effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine sont résumées dans le (tab. 4).

**Tableau 4** : Les principaux effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine adopté à partir de (Debeyer, 2020 ; Kagambèga *et al.*, 2019 ; Aureli *et al.*, 2011).

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaires	Autre effets
<p>Amélioration de l'intolérance au lactose.</p> <p>Réduction de diarrhée aiguë infectieuse, diarrhées liée aux antibiotiques et diarrhées du voyageur « turista ».</p> <p>Contrôle des troubles suivant : infection par <i>Helicobacter pylori</i>, syndrome du côlon irritable (SII), maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), constipation, les infections liées à <i>Clostridium difficile</i>.</p>	<p>Modulation ou maturation du système immunitaire.</p> <p>Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes (<i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>).</p> <p>Régulation de la réponse immune allergique et inflammatoire.</p>	<p>Réduction du risqué de certains maladies comme les cancers (colorectal, vessie, col utérine), maladies des reins, des voies respiratoires, du cœur, Alzheimer, l'obésité et le diabète.</p> <p>Réduit la concentration sérique de cholestérol et la tension artérielle chez les hypertendus.</p> <p>Améliorer la santé génito-urinaire.</p> <p>Optimise effets des vaccins.</p>

## 2.6. Effets probiotiques des lactobacilles

De nombreuses études scientifiques pionnières sur les effets probiotiques des lactobacilles. Il a été rapporté que *Lb.casei*, et *Lb.delbrueckii* a montré une inhibition maximale contre cinq agents pathogènes bactéries : *Staphylocoque spp*, *Bacille spp*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp*, et *E. coli spp* (Estifanos.,2014 ; Deng *et al.*, 2015).

De plus, le thé fermenté par *Lb.paracasei subsp. paracasei* NTU 101 a un effet réducteur plus important sur le gain de poids corporel et la teneur en graisse corporelle (Wang *et al.*, 2017). En plus, *Lb.plantarum* NTU 102 a été bénéfique pour les lésions de la muqueuse gastrique et la réponse immunitaire à *Litopenaeus vannamei* (Chiang et Pan, 2011).

Il a également été rapporté que la souche *Lb.rhamnosus* GG est efficace dans la prévention des toxicités radio-induites et induites par la chimiothérapie (Capurso, 2019).

# **Partie II : la partie expérimentale**

# **Chapitre 3 :**

## **Matériel et méthodes**

Afin d'identifier et d'établir les caractéristiques du potentiel probiotique des souches de *Lactobacillus*, la partie matériel et méthodes a été inspirée à partir des travaux menés par (Kirtzalidou *et al.* 2011), intitulé "Screening for Lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota".

### **3.1. Isolement et identification des isolats de lactobacilles**

#### **3.1.1. Échantillonnage**

Les matières fécales ont été collectées à partir de 63 nourrissons, en bonne santé, naissent à terme, allaité au sein ou nourris au lait maternisé. La collecte des matières fécales ont été faites après 4,30 et 90 jours après l'accouchement.

#### **3.1.2. Isolement et purification**

L'isolement a été faite selon la méthode rapportée par (Kotsou *et al.*, 2008). Les échantillons ont été dilué etensemencés en utilisant la méthode d'isolement en surface sur milieu MRS en boîte de Pétri (Man Rogosa Sharp) (annexe1). Les boîtes de pétri ont été incubés en condition anaérobie à 37°C pendant 48 à72h afin d'obtenir des colonies bien distinctes.

Après l'incubation les colonies bactériennes obtenues ont été purifiés par plusieurs repiquages successifs sur milieu MRS agar dans les mêmes conditions d'isolement.

#### **3.1.3. Identification**

L'identification phénotypique préliminaire des isolats été faite selon (Kotsu *et al.*, 2008) en utilisant la coloration de gram, le test de la catalase et sur la capacité de fermentation des sucres par la galerie API 50 CHL .

Les isolats Gram positif, catalase négatifs et de forme bâtonné ont été suspecté être des lactobacilles et ont été maintenus en milieu MRSc bouillon supplémenté avec 20 % de glycérol à -80°C, les isolats ont été activés deux fois dans le bouillons MRSc avant chaque expérience.

L'identification des souches de *Lactobacillus* l'échelle de l'espèce a été confirmée par ribotypage de l'ADN16s et vérifiée par séquençage de produits PCR, l'ADN bactérien a été

extrait de cultures bactériennes à l'aide du Kit NucleoSpin® Tissue selon les instructions décrites par le fabricant.

Deux amorces universelles P0 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3') et P6 (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3') ont été utilisés pour l'amplification du gène de l'ARNr 16s.

L'identification des souches de *Lactobacillus* par le logiciel BLAST, ainsi les séquences traitées ont été comparées à des bases de données GENBANK pour l'attribution des espèces.

### **3.2. Mis en évidence *in vitro* de quelques propriétés probiotiques**

#### **3.2.1. Tolérance à l'acide**

Nombreuses études ont utilisées l'acidité afin d'évaluer la survie des souches probiotiques lors du passage de l'estomac, dans cette étude des souches de *Lactobacillus* ont été testé vis-à-vis différents pH bas.

La tolérance à des pH bas a été effectuée selon la technique décrite par (Charteris *et al.*, 1998). Les sucs gastriques simulés ont été préparés comme suit : une solution tampon PBS, contenant la pepsine (0,3g/L) et de NaCl à 0,5% (P/V), à été ajustée à pH à 2 et 3 avec HCL.

La solution a été répartie dans des tubes essais à raison de 10 ml puis autoclavée à 121°C pendant 15 min.

Chaque suspension cellulaire du des cultures de *Lactobacillus* sélectionnées contenant environ 10<sup>9</sup> cellules/ml ont été ajoutées à la solution pH 2, 3, et mélangé. Des aliquotes de 1ml ont été prélevées à temps 0, 1,5 et 3 h heures afin de déterminer le comptes viables.

La récupération des cellules a été faite par la méthode d'ensemencement en profondeur dans le MRS après dilution de chaque solution de pH avec une solution saline stérile à 0,85%. Les boites de pétri ont été incubées en anaérobie à 37°C pendant 72 h.

#### **3.2.2. Tolérance à la bile**

La tolérance à la bile des isolats a été examinée selon la méthode décrite par (Kotsou *et al.*, 2008). Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 2236 g pendant 5 min, ensuite le

culot est récupéré et remis en suspension dans 0,5 ml de MRS pour être utilisé comme inoculum.

Un volume de 5 ml de MRS contenant 0,3% de bile, ou MRS (contrôle) a été inoculé avec 50 µl de l'inoculum décrit ci-dessus. Des aliquotes de 0,1 ml ont été prélevées à temps 0 h et après 24 h d'incubation à 37°C dans une chambre anaérobie pour la détermination des comptes viables comme décrit précédemment.

### 3.2.3. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par diffusion sur disque en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les antibiotiques testés sont à savoir : des inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire (l'ampicilline 10µg, Amoxicilline 20 µg / Acide clavulanique 10 µg, céphalothine 30 µg, vancomycine 30 µg, bacitracine 10 µg), des inhibiteurs de la synthèse des protéines (l'Amikacin 30 µg, Kanamycine 30 µg, tétracycline 30 µg, chloramphénicol 30 µg, érythromycine 15 µg), et des inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (Ciprofloxacine 5 µg, Rifampicine 5 µg).

Des boîtes contenant de la gélose MRS ont étéensemencées par des cultures bactériennes fraîches, ensuite, les boîtes ont été laissées à température ambiante pendant 15 min avant le dépôt de disques contenant les antibiotiques.

Après incubation en anaérobiose à 37°C pendant 24 h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

### 3.2.4. Activité antimicrobienne

Pour la détection de l'activité antimicrobienne une modification de la méthode de spots décrite par (Schillinger et Lüke, 1989) a été utilisée pour étudier la capacité des souches de *Lactobacillus* à inhiber des agents pathogènes intestinaux : *E.coli* ATCC 25922, *E. coli* EDL 933, *Sa<sub>2</sub>cholerasuis* DSM554, *L.monocytogenes* DSM12464, *Et.faecalis* ATCC51299, *Et.hirrae* CIP5855, *S.aureus* ATCC6538.

Un volume de (3 µl) des cultures fraîche de 24 h est déposé en spots (tache) à la surface de boîte de MRS et incubées en anaérobiose à 37 °C pendant 24 h. Ensuite un volume de 20 ml de gélose BHI fondue contenant 0,7% agar et inoculé par 0.3 ml des souches indicatrice est versé sur la surface des boîte de MRSensemencée par les souches lactiques.

Après incubation en anaérobie pendant 24 h à 37°C, les boîtes ont été examinées pour le développement de zones claires. Les souches présentant des zones d'inhibition supérieures à 1 mm vis-à-vis des bactéries indicatrices ont été considérées comme possédant une activité antimicrobienne.

### 3.2.5. Test d'adhésion

L'adhésion bactérienne des souches de *Lactobacillus* aux cellules épithéliales humaines Caco-2 de type entérocyte (ATCC HTB-37) a été étudiée selon la méthode décrite par (Kotsu *et al.*, 2008). Le test a été réalisé selon les étapes suivantes :

#### - Préparation des cellules Caco-2

Les cellules ont été cultivées en routine dans le milieu essentiel minimal d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, PAA Laboratories GmbH, E15-843, avec L-glutamine et pyruvate de sodium) additionné de 10% de sérum bovin foetal (PAA Laboratories GmbH, A11-043), 100 U ml<sup>-1</sup> pénicilline et 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycine. L'incubation des cellules Caco-2 a été réalisée à 37°C dans une atmosphère enrichie de 5% et 95% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de culture cellulaire à 6 puits à des concentrations de 1,7 x 10<sup>4</sup> cellules par puits. Le milieu de culture a été changé tous les deux jours. Les plaques de culture ont été incubées pendant 15 jours à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

#### - Préparation des cultures bactériennes

Les cultures bactérienne fraîches ont été centrifugées à 3500 g pendant 5min puis les culots ont été lavés deux fois avec du PBS (pH 7,4), puis remises en suspension dans le milieu DMEM sans antibiotiques, et resuspendus dans cette solution jusqu'à obtenir une concentration de 1 x 10<sup>9</sup> cellules.ml<sup>-1</sup>.

#### - Adhésion des bactéries aux cellules Caco-2

Pour les tests d'adhésion, les monocouches Caco-2 ont été lavées 2 fois avec Tampon phosphate salin (PBS; 0,724 g.l<sup>-1</sup> N / A2HPO<sub>4</sub>, 0,18523 g.l<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9 g.l<sup>-1</sup> NaCl, ajusté à pH 7,4) et préincubé avec 3 ml de milieu DMEM frais non supplémenté d'antibiotiques pendant au moins 30 min avant l'inoculation avec des souches de *Lactobacillus* pour éliminer les cellules non attachées aux monocouches. Ensuite 1 ml de la solution DMEM de chaque

souche de *Lactobacillus* ( $10^9$  cellules.ml<sup>-1</sup>) a été ajouté aux puits, et incubée pendant une 1,5 h à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>.

Ensuite, après l'incubation, les puits a été lavés 3 fois avec du PBS pour éliminer les cellules bactériennes non adhérentes. Les bactéries adhérentes aux cellules Caco-2 ont été fixées avec du méthanol, colorées à Gram par du cristal violet et déterminées au microscope à immersion en comptant 30 champs randomisés par lamelle (grossissement×100).

*Lb.acidophilus* DSM20079 a été utilisé comme souche de type non adhésif (contrôle négatif).

# **Chapitre 4 :**

## **Résultats et discussions**

#### 4.1. Isolement et identification

Dans ce travail, Soixante quatorze (74) souches de *Lactobacillus* ont été isolées à partir de selles de 63 nourrissons sains. 44 souches ont été sélectionnées et examinées par des tests *in vitro* pour évaluer leur potentiel probiotique.

L'examen microscopique des 44 souches a révélé qu'elles sont de forme bacille, Gram positif et catalase négative.

L'identification par Kit API 50 CHL ainsi par amplification puis séquençage de gènes codant l'ARNr 16s ont montré qu'ils appartenaient au genre *Lactobacillus* et ils étaient étroitement liés à *Lb.gasseri* (41%), *Lb.paracasei* (18%), *Lb.crispatus*, *Lb.salivarius*, *Lb.oris*, deux souches identifiées comme *Lb.rhamnosus* et deux souches comme *Lb.fermentum* (voir tableau2).

L'espèce *Lb.gasseri* s'est révélé l'espèce prédominante d'après les résultats enregistrés avec un pourcentage de 41%. Plusieurs auteurs ont confirmé la présence de *Lactobacillus* dans les selles de nourrissons.

Une étude rapportée par Halimi et Mirsalehian. (2016), où 120 souches de *Lactobacillus* ont été isolées à partir de 80 échantillons de selles de nourrissons allaités, âgés de 1 à 6 mois, l'espèce prédominante était *Lb.rhamnosus* (44%). Les autres espèces ont partagées les scores suivant : *Lb. gasseri* (19,5%), *Lb.paracasei* (15%), *Lb.fermentum* (17,5%) et enfin *Lb.plantarum* (2%), *Lb.crispatus* (1%) et le groupe *Lb.delbrueckii* (1%).

Une autre étude menée par Xanthopoulos *et al.* (2000), portée sur 20 isolats de *Lactobacillus* isolées à partir de selles de nourrissons a permet d'identifier 5 espèces à savoir ; *Lb.paracasei subsp.paracasei* (6 souches), *Lb.rhamnosus* (6 souches), *Lb.gasseri* (3 souches), *Lb.reuteri* (3 souches) et *Lb.acidophilus* (2 souches).

En comparant les résultats obtenus par l'article pris comme notre partie expérimentale et Halimi et Mirsalehian. (2016) ainsi Xanthopoulos *et al.* (2000), les espèces *Lb.gasseri*, *Lb.rhamnosus*, *Lb.paracasei* et *Lb.fermentum* ont marquée une présence partagée entre les trois travaux.

**Tableau 5 :** Analyse de pourcentage des souches *Lactobacillus* identifiées communs adoptée à partir 3 études réalisées par (Xanthopoulos *et al.*, 2000 ; Kirtzalidou *et al.*, 2011 ; Halimi et Mirsalehian., 2016).

Etude Souches <i>Lb</i>	(Xanthopoulos <i>et al.</i> , 2000)	(Kirtzalidou <i>et al.</i> , 2011)	(Halimi et Mirsalehian., 2016)	Moyenne
<i>Lb.gasseri</i>	15%	41%	19%	25.1%
<i>Lb.paracasei</i>	30%	18%	15%	21%
<i>Lb.rhamnosus</i>	30%	4.5%	44%	26.1%
<i>Lb.fermentum</i>	0%	4.5%	17.5%	7.3%

## 4.2. Etude de caractères probiotiques

### 4.2.1. Tolérance à la bile

La tolérance à la bile est un critère de sélection *in vitro* des bactéries probiotiques et est généralement considérée comme nécessaire pour évaluer leur aptitude à résister aux effets des acides biliaires qui conditionnent leur aptitude à survivre aux conditions du tractus gastro-intestinal (TGI) et à coloniser l'environnement intestinal (Reyes-Nava *et al.*, 2016). Les résultats de test de la tolérance à la bile sont indiqués dans (tab, 6).

**Tableau 6 :** Tolérance à la bile des isolats de *Lactobacillus* après 24 h d'incubation avec présence de bile. Les valeurs représentent la transformation log10 des comptes viables (Kirtzalidou *et al.*, 2011).

	Identification	Bile		Control	
		0 h	24 h	0 h	24 h
C1	<i>L. crispatus</i>	3.58 (0.15)	5.37 <sup>c</sup> (0.21)	3.77 (0.10)	8.29 (0.09)
C3	<i>L. salivarius</i>	4.76 (0.04)	7.65 <sup>c</sup> (0.17)	4.85 (0.06)	8.90 (0.11)
C4	<i>L. paracasei</i>	7.10 (0.01)	7.82 <sup>c</sup> (0.09)	7.12 (0.05)	9.09 (0.05)
C5	<i>L. gasseri</i>	6.63 (0.01)	6.51 (0.01)	7.13 (0.02)	8.46 (0.01)
C7	<i>L. gasseri</i>	7.21 (0.05)	5.30 <sup>c</sup> (0.06)	7.57 (0.04)	8.81 (0.03)
C8	<i>L.reuteri</i>	7.13 (0.06)	6.43 (0.02)	7.08 (0.05)	9.27 (0.02)
C9	<i>L. gasseri</i>	7.36 (0.07)	4.64 (0.15)	7.41 (0.06)	8.96 (0.02)
C10a	<i>L. gasseri</i>	7.02 (0.02)	5.10 <sup>c</sup> (0.10)	6.41 (0.09)	8.85 (0.01)
C10b	<i>L. gasseri</i>	6.95 (0.07)	5.77 (0.10)	6.69 (0.05)	9.10 (0.03)
C11	<i>L. oris</i>	6.04 (0.13)	7.78 <sup>c</sup> (0.09)	6.32 (0.05)	8.52 (0.19)
C12	<i>L. crispatus</i>	4.39 (0.05)	7.21 <sup>c</sup> (0.16)	3.97 (0.26)	7.44 (0.15)
C13	<i>L. oris</i>	7.18 (0.10)	5.83 (0.07)	7.17 (0.02)	9.20 (0.06)
C14	<i>L. fermentum</i>	5.27 (0.02)	8.85 (0.02)	5.34 (0.03)	9.24 (0.08)
C15	<i>L. gasseri</i>	7.40 (0.10)	6.73 (0.02)	7.02 (0.02)	9.30 (0.11)
C20	<i>L. gasseri</i>	7.25 (0.11)	2.53 (0.23)	7.39 (0.02)	8.62 (0.17)
C21	<i>L. gasseri</i>	5.85 (0.15)	7.04 <sup>c</sup> (0.23)	6.13 (0.05)	7.17 (0.12)
C27	<i>L. fermentum</i>	7.39 (0.06)	8.76 <sup>c</sup> (0.19)	7.21 (0.06)	9.02 (0.04)
C28	<i>L. gasseri</i>	7.17 (0.11)	7.04 (0.05)	7.28 (0.02)	8.88 (0.08)
C30	<i>L. gasseri</i>	6.03 (0.07)	7.01 <sup>c</sup> (0.10)	6.28 (0.09)	8.30 (0.30)
C32	<i>L. gasseri</i>	7.19 (0.00)	6.10 (0.03)	7.18 (0.04)	9.09 (0.04)
C35	<i>L. gasseri</i>	7.14 (0.48)	8.12 <sup>c</sup> (0.09)	7.28 (0.01)	9.20 (0.05)
C40	<i>L. plantarum</i>	7.28 (0.05)	4.90 (0.15)	7.21 (0.02)	8.66 (0.03)
C41	<i>L. paracasei</i>	7.62 (0.03)	7.69 (0.05)	7.68 (0.01)	9.00 (0.06)
C44	<i>L. rhamnosus</i>	4.40 (0.05)	7.61 <sup>c</sup> (0.07)	4.48 (0.07)	7.42 (0.03)
C45	<i>L. gasseri</i>	6.81 (0.03)	4.53 (0.07)	7.04 (0.04)	8.53 (0.10)
C46	<i>L. gasseri</i>	6.78 (0.06)	4.82 (0.03)	7.13 (0.04)	8.88 (0.06)
C48	<i>L. brevis</i>	6.96 (0.02)	7.28 (0.14)	6.71 (0.07)	9.17 (0.17)
C49	<i>L. crispatus</i>	6.46 (0.09)	5.28 (0.11)	6.45 (0.02)	8.61 (0.12)
C51	<i>L.crispatus</i>	7.04 (0.03)	7.55 <sup>c</sup> (0.07)	7.24 (0.06)	8.88 (0.09)
C53	<i>L. salivarius</i>	3.77 (0.17)	7.95 <sup>c</sup> (0.25)	4.02 (0.07)	8.77 (0.04)
C54	<i>L. oris</i>	5.99 (0.04)	6.70 <sup>c</sup> (0.11)	5.48 (0.10)	7.39 (0.08)
C57	<i>L. crispatus</i>	6.17 (0.04)	1.41 (0.28)	6.39 (0.06)	9.21 (0.12)
C58	<i>L. rhamnosus</i>	6.76 (0.06)	7.72 <sup>c</sup> (0.03)	6.78 (0.07)	8.67 (0.06)
C59	<i>L. gasseri</i>	6.52 (0.01)	6.16 (0.18)	6.54 (0.02)	8.64 (0.11)
C60	<i>L. salivarius</i>	2.96 (0.02)	4.39 <sup>a</sup> (2.3)	2.97 (0.02)	9.33 (0.02)
C63	<i>L. gasseri</i>	5.78 (0.09)	8.34 <sup>c</sup> (0.12)	5.73 (0.22)	9.08 (0.11)
C64	<i>L. gasseri</i>	6.26 (0.02)	8.51 <sup>c</sup> (0.12)	6.36 (0.11)	8.77 (0.16)
C65	<i>L. paracasei</i>	7.02 (0.01)	7.32 (0.12)	7.06 (0.02)	9.03 (0.15)
C68	<i>L. paracasei</i>	6.02 (0.12)	8.4 <sup>c</sup> (0.11)	6.27 (0.05)	8.41 (0.04)
C69	<i>L. paracasei</i>	6.25 (0.03)	8.04 <sup>c</sup> (0.06)	6.47 (0.11)	8.40 (0.07)
C70	<i>L.paracasei</i>	5.97 (0.10)	8.69 <sup>c</sup> (0.07)	6.16 (0.01)	9.26 (0.03)
C71	<i>L. paracasei</i>	7.04 (0.03)	7.72 <sup>c</sup> (0.05)	7.03 (0.05)	8.59 (0.07)
C72	<i>L. gasseri</i>	7.83 (0.15)	3.41 (0.23)	5.52 (0.04)	7.83 (0.15)
C74	<i>L. gasseri</i>	6.07 (0.12)	6.06 (0.09)	5.90 (0.16)	9.01 (0.16)
20079	<i>Lacidophilus</i>	7.12 (0.01)	3.30 <sup>b</sup> (0.6)	7.20 (0.06)	8.65 (0.11)

Selon les résultats obtenus, Vingt souches sur quarante quatre présentaient une tolérance élevée aux 0,3% de sels biliaires après 24 h d'exposition, car ils ont pu se développer d'une manière significative ( $p < 0,05$ ).

Ces résultats sont en accord avec les résultats de Davoodabadi *et al.* (2015), où selon leurs résultats, 27 souches de *Lactobacillus* ont montré une tolérance élevée au 0,3% de bile après 8h d'exposition.

Tulumoglu *et al.* (2013) en évaluant les caractères probiotiques de 20 souches de *Lactobacillus*, ont trouvé que toutes les souches présentent une résistance importante en présence de 0,25%, 0,5% et 0,75% de bile. Toutefois, la résistance à 0.25% était moins importante par rapport à 0,5% et 0,75. Dans cette étude 5 souches ont montrées la capacité à résister à 0,75% de bile et seulement une souche à résister à 0,25 %.

Une autre étude portée par Wang *et al.* (2010) a mentionnée une résistance intéressante de la souche *Lb.paracasei* F08 et *Lb.plantarum* C06 au 1% de bile.

Les lactobacilles sont capable de métaboliser les acides biliaries ce qui les protègent contre la bile grâce au mécanisme de déconjugaison des acides biliaries par les enzymes *biles salts hydrolase* (BSH), et le mécanisme de l'extrusion de la bile grâce aux systèmes *multidrug resistance* (MDR) (Foley *et al.*, 2020).

En effet, la variation des résultats d'une étude à l'autre peut être due à la différence de l'activité de BSH et la capacité de dégradation des sels biliaries des souches testées.

#### **4.2.2. Tolérance à l'acide**

Un autre critère essentiel dans la sélection d'un microorganisme à potentiel probiotique est sa capacité de survivre aux pH bas (Wang *et al.*, 2010).

Dans cette étude, après le test de tolérance à la bile les 20 souches ont été testées pour la résistance aux conditions de pH (pH 2 et pH 3), les résultats sont indiqués dans (tab, 7).

**Tableau 7 :** Tolérance au pH des isolats de *Lactobacillus* après 1,5 et 3 h d'incubation à pH 3 et pH 2, respectivement. Les valeurs représentent la transformation log 10 des comptes viables (Kirtzalidou *et al.*, 2011).

	pH 3			pH 2		
	0 h	1.5 h	3 h	0 h	1.5 h	3 h
C1	7.24 (0.27)	6.49 (0.49)	4.41 <sup>a</sup> (0.26)	7.39 (0.11)	<3.00	<3.00
C3	7.23 (1.41)	7.13 (1.53)	6.89 (1.66)	8.35 (0.18)	4.47 (1.15)	<3.00
C4	7.49 (0.06)	7.66 (0.30)	7.70 (0.35)	7.64 (0.20)	<3.00	<3.00
C11	8.58 (0.17)	8.64 (0.22)	8.14 (0.47)	8.45 (0.30)	7.83 (0.60)	5.16 <sup>a</sup> (0.60)
C12	7.58 (0.30)	7.08 (0.20)	7.05 (0.18)	7.71 (0.34)	<3.00	<3.00
C21	7.81 (0.19)	7.84 (0.18)	7.53 (0.03)	7.95 (0.03)	4.87 <sup>a</sup> (0.13)	<3.00
C27	7.48 (0.05)	7.56 (0.19)	7.52 (0.31)	7.51 (0.19)	4.57 (1.39)	3.86 <sup>a</sup> (1.18)
C30	7.43 (0.38)	7.36 (0.36)	7.42 (0.37)	7.54 (0.53)	7.02 (0.48)	6.74 (0.58)
C35	7.95 (0.16)	7.91 (0.21)	6.62 (1.32)	7.88 (0.25)	5.65 <sup>a</sup> (0.21)	4.13 <sup>a</sup> (0.55)
C44	7.87 (0.49)	7.05 <sup>a</sup> (0.41)	6.97 <sup>a</sup> (0.27)	6.99 (0.54)	<3.00	<3.00
C51	8.35 (1.00)	6.92 (1.47)	8.23 (0.59)	7.62 (0.51)	<3.00	<3.00
C53	5.87 (1.25)	5.52 (1.32)	4.84 (1.83)	5.39 (1.12)	<3.00	<3.00
C54	6.27 (0.70)	6.13 (0.66)	5.92 <sup>a</sup> (0.71)	6.11 (0.74)	3.65 <sup>a</sup> (0.79)	<3.00
C58	7.27 (0.07)	7.28 (0.13)	7.15 (0.07)	7.17 (0.03)	3.74 <sup>a</sup> (0.51)	<3.00
C63	7.81 (0.22)	7.60 (0.30)	7.47 (0.43)	7.86 (0.27)	6.49 (1.04)	3.57 <sup>a</sup> (1.05)
C64	7.93 (0.17)	7.56 (0.14)	7.55 (0.07)	7.78 (0.09)	6.88 (0.15)	5.35 (1.10)
C68	7.79 (0.48)	7.43 (0.26)	7.40 (0.23)	7.67 (0.32)	<3.00	<3.00
C69	7.92 (0.02)	7.68 (0.11)	7.88 (0.08)	7.77 (0.16)	3.82 <sup>a</sup> (0.48)	<3.00
C70	8.30 (0.12)	8.41 (0.21)	8.29 (0.15)	8.77 (0.10)	3.14 <sup>a</sup> (1.00)	<3.00
C71	7.77 (0.20)	7.71 (0.22)	7.69 (0.26)	7.64 (0.28)	<3.00	<3.00
20079	7.97 (0.25)	7.91 (0.20)	7.75 (0.22)	8.19 (0.15)	7.21 (0.50)	4.97 <sup>a</sup> (0.89)

La plupart des souches 85% (17 souches) étaient tolérants a pH 3 après 3h d'incubation où les souches n'ont pas marqué une différence entre t= 0 et t= 3h (tab, 7). D'autre part, 6 souches (*L.gasseri* C30, *L.oris* C11, *L.gasseri* C63, *L.gasseri* C64, *L.gasseri* C35, *L.gasseri* C21) se sont révélées résistantes à pH 2 après 1,5 h mais seulement deux souches (*L.gasseri* C30 et *L.gasseri* C64) sont trouvées résistantes après 3h d'incubation au même pH.

Ces résultats en accord avec ceux obtenus à partir d'étude de Tulumoglu *et al.* (2013), où leurs résultats montrent que pour toutes les souches isolées des selles d'enfants, les nombres de cellules viables ont diminué après 4h d'incubation avec la réduction des valeurs de pH.

À pH 3 le pourcentage de survie de la plupart des souches de *Lactobacillus* était important que leur survie à pH 2.

De même, d'autre étude enregistrée par Koutsou *et al.* (2008) ont également déclaré de bons taux de survie pour 24 souches à pH 3 après 3h d'incubation, au contraire, la viabilité des souches de *Lactobacillus* était très faible à pH 2.

Néanmoins, un taux de survie enregistré dans la présente étude pour les souches *Lb.paracasei*, été plus faible que celui signalé par Bahri *et al.* (2014), où la souche *Lb.paracasei* B13 a montré une résistance à pH 1,5 après 2 h d'incubation.

Les lactobacilles sont naturellement bien adaptés à des pH bas par la production d'acide organique et l'acide lactique lors de la fermentation lactique, qui entraînent une diminution de pH et par conséquent fournissant des conditions optimales pour leur croissance au pH stomacal très bas (Van de Guchte *et al.*, 2002).

Les lactobacilles peuvent réagir au stress acide par trois mécanismes ; en limitant l'entrée des acides dans leurs cytoplasme, en alcalinisant le milieu intracellulaire grâce aux ATPases et en protégeant les macromolécules contre les dérivés chargés par les protéines chaperonnes (Nantani et Abe, 2011).

Dans la présente étude on a constaté que la plupart des souches de *Lactobacillus* testées avaient une plus grande tolérance au suc intestinale qu'au liquide gastrique. De tels résultats ont été signalés par Halimi et Mirsalehian, (2016) et Tulumoglu *et al.* (2013).

Par contre, Bahri *et al.* (2014) ont annoncé que cinq souches de *Lactobacillus* ont montré une résistance remarquable au liquide gastrique mais seulement quatre souches avaient une bonne tolérance aux conditions intestinales simulées.

#### **4.2.3. Sensibilité aux antibiotiques**

Les résultats obtenus ont indiqué que toutes les souches testées étaient sensibles à l'ampicilline, amoxicilline, tétracycline, érythromycine, chloramphénicol, rifampicine et à la céphalothine sauf *Lb.brevis* C48 où à marquée une résistance intermédiaire pour le dernier antibiotique.

Ces résultats se convergent ceux mentionnés par Arici *et al.* (2004), Xanthopoulos *et al.* (2000) et Bahri *et al.* (2014), où ont rapportées que les lactobacilles sont généralement sensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de protéines comme le chloramphénicol, érythromycine, tétracycline, et sensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la paroi bactériennes telles que l'ampicilline.

En outre, quatre souches *Lb.rhamnosus* C44, *Lb.rhmanosus* C58, *Lb.paracasei* C65, *Lb.paracasei* C69 étaient résistantes à la bacitracine et trois souches de *Lb.paracasei* C41, *Lb.paracasei* C68, *Lb.paracasei* C70 étaient intermédiaires. Toutefois, toutes les souches étaient résistantes à l'amikacine sauf la souche *Lb.plantarum* C40 qui était sensible et les souches *Lb.crispatus* C12, *Lb.fermentum* C14 et *L.rhmanosus* C44 qui étaient intermédiaire.

Ces résultats sont similaires à ceux signalé par Koutsou *et al.* (2008) où ont rapporté que toutes les *Lactobacillus* testées sont résistantes aux principaux types d'antibiotiques, tels que la bacitracine et à l'amikacine.

D'autre part, quinze souches à savoir, *Lb.paracasei* C4, *Lb.oris* C13, *Lb.fermentum* C14, *Lb.plantarum* C40, *Lb.paracasei* C41, *Lb.rhmanosus* C44, *Lb.brevis* C48, *Lb.salivarius* C53, *Lb.oris* C54, *Lb.rhamnosus* C58, *Lb.paracasei* C65, *Lb.paracasei* C68, *Lb.paracasei* C69, *Lb.paracasei* C70, *Lb.paracasei* C71 étaient résistantes à la vancomycine .

Des résultats similaires ont été retrouvés par Davoodabadi *et al.* (2015), Jomehzadeh *et al.* (2020), Kotsou *et al.* (2008) et Halimi et Mirsalehian. (2016), où la plupart des souches de *Lactobacillus* testées étaient résistantes envers la vancomycine.

Ces résultats étaient prévisibles car certaines espèces de *Lactobacillus* sont connus pour être naturellement résistant à la vancomycine, par exemple : *Lb.rhamnosus*, *Lb.casei*, *Lb.plantarum*, *Lb.fermentum*, *Lb.brevis* et *Lb.curvatus*.

En effet les gènes de résistance à la vancomycines chez les lactobacilles sont chromosomiquement codés et non inductible ou transfert (Kirtzalidou *et al.*, 2011).

De plus toutes les souches étaient résistantes à la kanamycine sauf *Lb.salivarius* C3 et *Lb.crispatum* C51 qui était intermédiaires. De même, Wang *et al.* (2010) ont rapporté également que toutes les souches de lactobacilles étaient résistantes à la Kanamycine.

Enfin, la plupart des souches étaient résistantes à la ciprofloxaciné sauf les souches *Lb.salivarius* C3, *Lb.rhamnosus* C44, *Lb.salivarius* C53 et *Lb.paracasei* C58 qui étaient sensibles et les souches *Lb.paracasei* C4, *Lb.paracasei* C41, *Lb.salivarius* C60, *Lb.paracasei* C65 et *Lb.paracasei* C71 qui étaient intermédiaires, et on pense qu'il s'agit d'une caractéristique potentiellement naturelle des lactobacilles.

#### 4.2.4. Activité antimicrobienne

Les résultats de la méthode de spots ont montré que seul la souche *Lb.fermentum* C27 présentait une zone d'inhibition contre *E.coli* ATCC259922, *E.coli* EDL 933 et *Et.hirae* CIP58.

Par contre, Halimi et Mirsalehian. (2016), Bahri *et al.* (2014) et Tulumoglu *et al.* (2013), ont rapporté une bonne activité antibactérienne par toutes les *Lactobacillus* testés

contre toutes bactéries pathogènes : *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, *P.aeruginosa*, *Sa.Typhimurium*, *B.cereus*.

Dans la présente étude les souches *Lb.crispatus* C1, *Lb.salivarius* C3, *Lb.gasseri* C30, *Lb.gasseri* C63 et *Lb.gasseri* C64 présentait une zone d'inhibition contre *S.aureus* ATCC6538, la souche *Lb.gasseri* avaient la plus haute activité d'inhibition contre la bactérie *S.aureus* ATCC6538.

Tandis que, le résultat trouvé par Halimi et Mirsalehian. (2016), a montré que parmi les bactéries étudié, les isolats de *Lb.gasseri* avaient la plus faible activité d'inhibition contre les bactéries pathogènes : *S.aureus*, *L.monocytogenes*, *E.coli* et *P.aeruginosa*, parce que les isolats *Lb.gasseri* pourrait produire moins de composés inhibiteurs que autres souches testées.

Les souches *Lb.salivarius* C3, *Lb.fermentum* C27, *Lb.gasseri* C63, *Lb.paracasei* C70 et *Lb.paracasei* C71 présentaient une forte activité inhibitrice contre *Sa.choleriesus* DSM554.

Ces résultats sont bien meilleurs que les résultats trouvé par Koutsou *et al.* (2008), où seulement la souche *Lb.acidophilus* LA-B2 présentait des zones d'inhibition contre *Sa.choleriesus* DSM554.

Par ailleurs, seule la souche *Lb.salivarius* C3 présentait une zone d'inhibition contre *L.monocytogenes*, cette constatation diffère des résultats rapportés par Halimi et Mirsalehian. (2016) et par Bahri *et al.* (2014) qui sont constaté que *L.monocytogenes* était significativement sensible à tous les souches de *Lactobacillus* testé.

Les lactobacilles possèdent une activité antimicrobienne contre une série de bactéries pathogènes qui peuvent être attribuées à une adhérence compétitive à l'épithélium ou à la production de composés inhibiteurs tels qu'acides organiques, peroxyde d'hydrogène, bactériocines ou reutérmie (Kirtzalidou *et al.*, 2011).

#### **4.2.5. Test d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales**

Les souches probiotiques de lactobacilles ont plusieurs mécanismes qui leur permettent d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales. Cette propriété pourrait conférer un avantage concurrentiel qui est un critère de colonisation de souches de lactobacilles dans le tractus gastro-intestinale humain (Dayong *et al.*, 2014).

En effet, la lignée cellulaire Caco-2 est une lignée cellulaire d'adénocarcinome au côlon qui exprime les caractéristiques morphologiques et physiologiques d'entérocytes humains matures normaux, et est donc largement utilisé comme modèle *in vitro* pour sélectionner et évaluer les propriétés adhésives des souches de *Lactobacillus* (Kirtzalidou *et al.*, 2011).

Il a été rapporté que la quantité de cellules lactobacilles se liant à les cellules Caco-2 sont directement liées au nombre de bactéries ajoutées à chaque puits (Kotsou *et al.*, 2008).

L'adhésion des souches de lactobacilles aux cellules humaines intestinales Caco-2 a été évaluée et les résultats sont indiqués dans (tab, 8).

**Tableau 8 :** Les cellules de lactobacilles adhérentes aux cellules intestinales Caco-2 (Kirtzalidou *et al.*, 2011).

	<u>Mean log10</u>
C1	1.54 (0.11)
C3	3.19 <sup>a</sup> (0.39)
C4	2.12 (0.18)
C11	0.88 (0.54)
C12	2.03 (0.08)
C21	2.12 (0.16)
C30	1.67 (0.13)
C35	0.65 (0.25)
C44	2.25 <sup>a</sup> (0.83)
C51	1.21 (0.21)
C53	2.73 (0.38)
C54	2.05 (0.14)
C58	2.54 (0.25)
C63	1.66 (0.30)
C64	1.40 (0.26)
C68	1.67 (0.11)
C69	1.50 (0.30)
C70	1.84 (0.35)
C71	1.87 (0.12)
DSM20079	1.68 (0.16)

Les résultats montrent que des différences significatives ont été observées dans les propriétés adhésives des souches de *Lactobacillus*, la comparaison entre la souche témoin négative *Lb.acidophilus* DSM20079 et les autres souches ont révélé de manière significative une meilleure adhérence aux monocouches Caco-2 pour les souches *Lb.salivarius* C3 et *Lb.rhamnosus* C44.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux précédemment signalés par Koutsou *et al.* (2008) qui ont trouvé que la souche *Lb.rhamnosus* parmi les souches les plus adhésives aux monocouches Caco-2 par rapport au témoin négative *Lb.acidophilus* DSM20079.

Cependant une étude précédente, montre que les trois souches *Lb.reuteri* F03, *Lb.paracasei* F08 et *Lb.plantarum* C06 avait une bonne adhérence aux cellules Caco-2, par rapport à la souche de référence *Lb.rhamnosus* GG ATCC 53103 (Wang *et al.*, 2010).

par rapport à la même souche de référence cité, Davoodabadi *et al.* (2015) ont marqué cinq souches de *Lactobacillus* possédant une capacité élevée d'adhésion aux cellules intestinales humaine HT-29.

Bien que, Jomehzadeh *et al.* (2020), ont marqué que six souches de *Lactobacillus* avait une bonne adhésion, parmi lesquelles la souche *Lb. fermentum* N7 a présenté la plus fort taux adhésions, et 25 autres souches présentait des propriétés adhésion modérées à faibles.

L'adhésion des bactéries probiotiques sur les cellules épithéliales humaines a été suggérée comme un mécanisme important pour empêcher la colonisation par des entéropathogènes et constitue une propriété spécifique de la souche (Davoodabadi *et al.*, 2015).

# Conclusion

## Conclusion

En conclusion, cette analyse nous a donné l'opportunité de mettre à jour nos connaissances sur certaines des caractéristiques des lactobacilles humaines.

Comme nous l'avons trouvé précédemment, les probiotiques sont des microorganismes, lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, confèrent un avantage pour l'hôte et peut être utilisé comme alternative possible à traitement conventionnels pour nombreuses maladies. Les lactobacilles sont également généralement jouent un rôle important dans la nutrition, l'immunité et la défense contre les agents pathogènes (Foley *et al.*, 2020).

Étant donné que la recherche de nouvelles souches probiotiques est essentielle pour répondre aux besoins croissants du marché (Foley *et al.*, 2020). Au cours de ce travail l'objectif fixés est visait à évaluer le potentiel probiotique des souches de lactobacilles isolées à partir des selles de nourrissons et ont été examinés par des testes *in vitro* pour évaluer leur potentiel probiotique. Ces tests comprenaient l'étude de leur aspect sécuritaire par la sensibilité aux antibiotiques, leur survie aux conditions gastro-intestinales simulées, l'activité antimicrobienne contre des germes pathogènes intestinaux et l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales.

Cette étude indique que les selles des nourrissons en bonne santé est une bonne origine pour l'isolement de différentes espèces de *Lactobacillus* avec un potentiel probiotique.

Les résultats suggèrent que parmi les souches de lactobacilles testées, les deux souches *Lb.salivarius* C3 et *Lb.Rhamnosus* C44, remplissaient les critères probiotiques *in vitro* que les autres isolats testées, et sont de bons candidats pour d'autres essais *in vitro* et *in vivo*.

Il est assez difficile pour qu'une souche répond à toutes les caractéristiques probiotiques désirables, et même certaines souches commercialement utilisées comme probiotiques ne remplissent pas un ou plusieurs de ces critères.

# **Bibliographie**

## Bibliographie

**Abul Kalam Azad M., Sarker M., Li T., Yin J.2018.** Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota. *BioMed Research International* 10 (2019) : 1155-94786.

**Arlène G., Berney M., Teta D., Genton L., Pruijm M.2018.**Microbiote et maladies rénales. liaison dangereuse. *Revue médicale* 14 (595) : 422-425.

**Aureli P., Capurso L., Castellazi A., Clerici M., Giovannini M., Morelli L., Poli A., Pregliasco F., Salvini F., Zuccotti.2011.** Probiotics and health. An evidence-based review. *Pharmacological research* 63 (5): 366-376.

**Azam M., Mohsin M., Ijaz H., Tulain U., Ashraf M., Fayyaz A., Abdeen Z., Kamran Q.2017.** Lactic acid bacteria in traditional fermented Asian foods. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* 30 (5): 1803-1814.

**Bleau N.2020.** Effet des probiotiques sur le microbiote intestinal de l'abeille mellifère (*Apis mellifera*) et sur la performance des colonies au printemps en climat nordique. *Biologie*. Thèse de doctorat, université de Québec, Canada, 81 p.

**Bondy L., Tan C., L Howard.2021.**Infection à *Lactobacillus paracasei* d'une prothèse totale de la hanche. *Microbiology* 193 (2):74-77.

**Budić K.2019.** The effect of polysaccharide of Probiotic Bacteria : Biotechnology. Thèse de doctorat, université of Rijeka, Croatie, 37p.

**Butel M.2013.**Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et maladies infectieuses* 44 (1) : 1-8.

**Charteris WP., Kelly PM., Morelli L., Collins JK. 1998.** Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology* 84 (5): 759-768.

**Chen Y., Hsu C., Hung W., Chen M.2015.**Effects of *Lactobacillus paracasei* 01 fermented milk beverage on protection of intestinal epithelial cell *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96 (6): 2154-2160.

**Chiang S., Pan T.2011.** Beneficial effect of *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* subsp.*paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (3) : 903-916.

**Debeyer C.2020.** Les probiotiques dans la prise en charge d'affection gastro-intestinales et vaginales : Pharmacie. Thèse de doctorat, université de Lille, France, 100 p.

**Deng K., Chen T., Wu Q., Wei Q., Wang X., Wang X., Wei H., Sah N. 2015.***In vitro* and *in vivo* examination of anticolonization of pathogens by *Lactobacillus paracasei* FJ861111.1. *Journal of Dairy Science* 98 (10): 6759-6766.

**De Vos P., Gamity G., Jones D., Krieg N., Ludwig W., Rainey F., Schleifer K., Whitmanet W.2009.** Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria* In. *Bergeys manual of systematic bacteriology-The Firmicutes* 3: 19-511.

**Diaz J., Javier F., Campos M., Gil A.2019.** Mechanisms of action of probiotics. *Nutrition* 1

**Duar R., Lin X., Zheng J., Martino M., Grenier T., Pérez-Munoz M., Leulier F., Gänzle., Walter J.2017.** Lifestyles in transition : evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews* 41 (1) : 27-48.

**Ebel B.2012.** Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz : Microbiologie. Thèse de doctorat, Ecol Doctorale Environnement-Santé, 218 p.

**Ennahar S. 2011.** Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiology* 11 (1): 1-11.

**Eslami M., Bahar A., Keikha M., Karbalaei M., Kobylak N., Yousefi B.2020.** Probiotics function and modulation of the immune system in allergic diseases. *Allergologia et Immunopathologia* 48 (6): 771-788.

**Etzold S., Kober O., MacKenzie D., Tailford L., Gunning A., Walshaw J., Hemmings A., Juge N. 2014.** Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. *Environmental Microbiology* 16 (3): 888-903.

**Foley M., Flaherty S., Allen G., Rivera A., Stewart A., Barrangou R., Theriot C. 2020.** Lactobacillus bile salt hydrolase substrate specificity governs bacterial fitness and host colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (6): 1-10.

**Galdeano C., Cazorla S., Dumit J., Vélez E., Perdígón. 2019.** Beneficial Effect of Probiotic Consumption on the Immun System. *Annals of Nutrition and Metabolism* 74 (2): 115-12.

**Guarner F., Khan A.G., Garisch J., Eliakim R., Gangel A., Thomson A., Krabshuis J., Le Mair A. 2017.** Probiotiques et prébiotiques : Gastroenterology. *Recommandation Pratique*, World Gastroenterology Organisation Global Guidelines, France, 39 p.

**Hawaz E. 2014.** Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from curd and in vitro evaluation of its growth inhibition activities against pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research* 8 (13) : 1419-1425.

**Islam s. 2016.** Clinical uses of probiotics. *Medicine* 95 (5).

**Joffre C., Dinel A., Layé S. 2018.** Neuro-inflammation dans les maladies neurologiques. Rôle des probiotiques. *Phytothérapie* 16 (6): 326-335.

**Kagambèga B., Cissé H., Tapsoba F., Sawadoga A., Zongo C., Traoré Y., Savadogo A. 2019.** Boouillis fermentées traditionnelles à base de céréales au Burkina Faso : diversité, technologies de production et microorganismes à potentiel probiotiques associés. *Revue des sciences et de la Technologie* 25 (2): 12-24.

**Kaspar H., Kesarcodi-Watson A., Josei M., Gibson L. 2007.** Probiotics in aquaculture: the need, principales and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274 (1): 1-14.

**Killer J., Kopečný J., Mrázek J., Koppová I., Havlík J., Benada O. 2011.** Bifidobacterium actinocoloniiforme sp. nov. And Bifidobacterium bohemicum sp. nov ., frpm the bumblebee digestive tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61(6):1315-1321.

**Kimmel R. 2018.** Intérêt des probiotiques dans le traitement de l'infection à *Helicobacter pylori* : Médecine. Thèse de doctorat, université de Lorraine, France, 152 p.

**Lokhande S., Wankhade P., Khatede R., Umekar M. 2021.** Health Benefits of Probiotics in Disease Prevention. *Pharmaceutical Sciences* 11(2): 2249-6807.

- Milani C., Duranti S., Bottacini F., Casey E., Turrone F., Mahony J., Belzer C., Palacio S., Montes S., Mancabelli L., Lugli G., Rodriguez J., Bode L., Vos W., Gueimonde M., Margolles A., Sinderen D., Ventura M. 2017.** The First Microbial Colonizers of the Human Gut : Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews* 81 (4): 36-17.
- Miller E., Beasley D., Dunn R., Archie E. 2016.** Lactobacilli Dominance and Vaginal pH: Why Is the Human Vaginal Microbiome Unique. *Frontiers in microbiology* 7: 1936.
- Milliot R. 2015.** Les probiotiques : veni vidi MICI. : Science Pharmaceutiques et Biologiques. Thèse de doctorat, université de Lille, France, 109 p.
- Mohapatra S., Chakroborty T., Kumar V., DeBoeck G., Mohanta K. 2012.** Aquaculture and stress management : a review of probiotic intervention. *Journal of Animal physiology and animal nutrition* 97 (3): 404-430.
- Montoro B., Benomar N., Lerma L., Gutiérrez S., Gálvez A., Abriouel H. 2016.** Fermented Alorena Table Olives as a Source of Potential Probiotic *Lactobacillus pentosus* Strains. *Frontiers in microbiology* 7: 1583.
- Naïmi S. 2014.** Isolement, caractérisation et étude in vitro de l'activité anti-inflammatoire de différentes souches probiotiques : Microbiologie agroalimentaire. Thèse de doctorat, université de Québec, Canada, 112 p.
- Parveen Rani R., Anandharaj M., Hema S., Deepika R., Ravindran A. 2016.** Purification of antilisterial peptide (Subtilisin) from novel *Bacillus tequilensis* FR9 and demonstrate their pathogen invasion protection ability using human carcinoma cell line. *Frontiers in microbiology* 7 : 1910.
- Peres C., Peres C., Mendoza H., Malcata F. 2012.** Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria-with an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology* 26 (1): 31-42.
- Prabhurajeshwar C., Chandrakanth R. 2017.** Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An *in vitro* validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical Journal* 40 (14): 2319-4170.

- Prasad J., Sahoo T., Naveen S., Jayaraman G. 2020.** Evaluation engineering of *Lactobacillus bulgaricus* reduces enzyme usage and enhances conversion of lignocellulosics to D-lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. *Biotechnology for biofuels* 13 (1): 1-11.
- Ren D., Li C., Qin Y., Yin R., Du S., Ye F., Liu C., Liu H., Wang M., Li Y., Sun Y., Li X., Tian M., Jin N. 2014.** In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe* 30: 1-10.
- Reyes-Nava LA., Garduno-Sicilian L., Santos ELP., Hernández-Sánchez H., Arauz J., Muriel P., Rivera-Espinoza Y. 2016.** Use of bile acids as a selection strategy for *Lactobacillus* strains with probiotic potential. *J Food Nutr Disor* 5:1.
- Salveti E., Torriano S., Felis G. 2012.** The Genus *Lactobacillus*. A Taxonomic Update. *Food Microbiology Laboratory* 4 (4): 217-226.
- Simon M. 2019.** Intérêt de l'utilisation des probiotiques dans la prise en charge thérapeutique : Vétinaire. Thèse de doctorat, université Paul-Sabatier de Toulouse, France, 104 p.
- Swain M., Anandharaj M., Ray R., Rani R. 2014.** Fermented Fruits and Vegetables of Asia : A Potential Source of Probiotics. *Biotechnology research international*. 19.
- Van de Guchte M., Serrero P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich SD., Maguin E. 2002.** Stress responses in lactic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82 (1): 187-2016.
- Wang L., Pan T., Tsai T. 2017.** Lactic acid bacteria-fermented product of green tea and *Houttuynia cordata* leaves exerts anti-adipogenic and anti-obesity effects. *Journal of food and drug analysis* 26 (3): 973-984.
- Yousefi B., Eslami M., Ghasemian A., Kokhaei P., Farrokhi A., Darabi N. 2018.** Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *Journal of cellular physiology* 234 (6) : 8008-8018.
- Zaylaa M. 2018.** Probiotique et autophagie : exploration de l'impact possible sur la maladie de Crohn : Bactériologie, virologie et hygiène hospitalière. Thèse de doctorat, université de Lille, France, 258 p.
- Zheng J., Wittouck S., Salveti E., Franz C., Harris H., Mattarelli P., Toole P., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., Felis G., Gänzle M., Lebeer S. 2020.** A taxonomic note on the genus *Lactobacillus* : Description of 23 novel genera, emended

description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. International journal of systematic and evolutionary microbiology 70 (4): 2782-2858.

**Site web:**

[WWW.inra.fr](http://WWW.inra.fr)

# **Annexes**

**Annexes 1****Composition de milieu de culture d'isolement Gélose MRS (Bouguerra, 2012)****Milieu MRS (g/l)**

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Phosphate dipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Tween 80 (polysorbate 80)	1 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de magnésium	0,1 g

Agar

PH  $5,7 \pm 0,1$ . Stérilisation à 120°C

## Annexes 2

### Coloration de Gram (Bahri, 2014)

Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre

Prélever une colonie et mélanger avec la goutte d'eau physiologique, strier et fixer à la chaleur par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène

Ajouter le Violet de Gentiane pendant 1 mn, jeter le colorant

Ajouter le Lugol pendant 1 mn

Décolorer avec de l'alcool pendant 30 secondes

Ajouter le deuxième colorant, la Fushine et laisser 1mn puis laver à l'eau

Sécher la lame et mettre une goutte d'huile à immersion puis passer à l'observation microscopique au grossissement  $\times 100$ .

## Annexes 3

## Les articles inclus dans la partie expérimentale

- Arici M., Bilgin B., Sagdic O., Ozdemir C. 2004.** Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. *Food Microbiology* 21 (1): 19-24.
- Bahri F., Lejeune A., Dubois R., Elmejdoub T., Boulahrouf A., Thonart P. 2014.** Characterization of *Lactobacillus* strains from Algerian children faeces for their probiotic properties. *African Journal of Microbiology Research* 8 (3): 297-303.
- Davoodabadi A., Soltan M., Foroushani A., Douraghi M., Yazdi M., Harati F. 2015.** Antibacterial activity of *Lactobacillus spp.* Isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. *Anaerobe* 34: 53-58.
- Halimi S., Mirsalehian A. 2016.** Assesment and comparaison of probiotic potentiel of four *Lactobacillus* species isolated from feces samples of Iranian infants. *Microbiology and immunology* 60 (2): 73-81.
- Jomehzadeh N., Javaherizadeh H., Amin M., Saki M., AL-Ouqaili M., Hamidi H., Seyedmahmoudi M., Gorjian Z.2020.** Isolation and identification of potential probiotic *Lactobacillus* species from feces of infant in southwest Iran. *International Journal of infectious Diseases* 96: 524-530.
- Kirtzalidou E., Pramateftaki P., Kotsou M., Kyriacou A. 2011.** Screening for *lactobacilli* with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe* 17 (6): 440-443.
- Kotsu M., Mitsou E., Oikobomou I., Kyriacou A.2008.** In Vitro Assessment of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains from Infant Gut Microflora. *Food Biotechnology* 22 (1): 1-17.
- Tulumoglu S., Yuksekdağ Z., Beyatli Y., Simsek O., Ciner B., Yasar. 2013.** Probiotic properties of *lactobacilli* species isolated from children's. *Anaerobe* 24 : 36-42.
- Wang C., Lin P., Ng C., Shyau Y.2010.** Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the faces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe* 16 (6): 578-585.

**Xanthopoulos V., Tzanetaki E., Tzanetakis N.2000.** Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. Food Microbiology 17 (2) : 205-215.

العصيات اللبنية هي واحدة من الكائنات الحية الدقيقة بروبيوتيك الرئيسية التي لها تأثير مفيد كبير على صحة الإنسان . الهدف من هذه الدراسة هو تقييم بعض الخصائص الحيوية لسلسلة *Lactobacillus* المعزولة من براز الرضع ، وتم اختيار 44 سلالة من براز 63 رضيعًا سليمًا وفحصها في الاختبارات المعملية لتقييم البروبيوتيك المحتمل لديهم . تمت زراعة العزلات على وسط MRS، وقد نجح التعرف على النمط الظاهري والوراثي لها وهي عصيات ، موجبة الجرام ، سلبية الكاتالاز ، وتنتمي إلى جنس *Lactobacillus* ، تضمنت دراسة خصائصها البروبيوتيك بقائها على قيد الحياة تحت ظروف معدية معوية محاكية ، حساسيتها للمضادات الحيوية ، نشاطها المضاد للميكروبات والتصاقها بالخلايا الظاهرية المعوية. أشارت نتائج هذه الاختبارات إلى أن سلالتين فقط *salivarius.Lb C3* و *rhamnosus.Lb C44* ، استوفيا معايير الكائنات البروبيوتيك في المختبر ، وتم تقديمهما كمرشحين جيدين لمزيد من الاختبارات في المختبر وفي الجسم الحي .

**الكلمات المفتاحية :** *Lactobacillus*، بروبيوتيك ، براز ، رضع ، في المختبر.

## Résumé

Les lactobacilles sont l'un des principaux microorganismes probiotiques qui ont un grand effet bénéfique sur la santé humaine. Le but de cette étude est basé sur l'évaluation de quelques caractères probiotiques des souches de *Lactobacillus* isolées à partir de selles de nourrissons. 44 souches ont été sélectionnées à partir de selles de 63 nourrissons sains et examinés par des tests *in vitro* pour évaluer leur potentiel probiotique. Les isolats ont été cultivés sur milieu MRS, leur identification phénotypique et génotypique est aboutis qui sont de forme bacille, Gram positif, catalase négative et appartenaient au genre *Lactobacillus*, l'étude de leur caractère probiotique comprenaient leur survie aux conditions gastro-intestinales simulées, leur sensibilité aux antibiotiques, leur activité antimicrobienne et leur adhésion aux cellules épithéliales intestinales. Les résultats de ces tests ont montré que seulement les deux souches *Lb.salivarius C3* et *Lb.Rhamnosus C44*, remplissaient les critères probiotiques *in vitro*, et se sont présentés comme de bons candidats pour d'autres essais *in vitro* et *in vivo*.

**Mots clé :** *Lactobacillus*, probiotiques, selles, nourrissons, *in vitro*.

## Summary

Lactobacilli are one of the main probiotic microorganisms which have a great beneficial effect on human health. The aim of this study is based on the evaluation of some probiotic characters of strains of *Lactobacillus* isolated from the stools of infants. 44 strains were selected from the stools of 63 healthy infants and examined by *in vitro* tests to evaluate their potential probiotic. The isolates were cultured on MRS medium, their phenotypic and genotypic identification is successful which are bacillus, Gram positive, catalase negative, and belonged to the genus *Lactobacillus*, the study of their probiotic character included their survival under simulated gastrointestinal conditions, their sensitivity to antibiotic, their antimicrobial activity and their adhesion to intestinal epithelial cells. The results of these tests indicate that only two strains *Lb.salivarius C3* and *Lb.rhamnosus C44*, met the probiotic criteria *in vitro*, and are presented as good candidates for further *in vitro* and *in vivo* assays.

**Keywords:** *Lactobacillus*, probiotics, stool, infants, *in vitro*.