



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 / 2021

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :
CHETTI Wafa et FADHNOUNI Elatra

Le : samedi 3 juillet 2021

Contribution à l'évaluation du potentiel probiotique de *bifidobactérium* isolés à partir des selles de nourrissons

Jury:

Dr.	BENBELAID Fathi	MCA	Université de Biskra	Président
M.	BENKADDOUR Bachir	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
M.	BELLOUCIF Nasser	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

Au terme de cette étude, nous tentions à remercier tout d'abord Allah le tout puissant et maître de l'univers qui nous a donné la capacité nécessaire, la forte volonté et la patience afin d'accomplir ce travail et qui nous a toujours guidé vers le bon chemin.

*Puis, nous tenons à cœur à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur **Mr. Ben kaddour Bachir** qui nous a suivis tout au long de ce travail et à le remercier infiniment pour ses conseils avisés, pour sa disponibilité continuelle et pour son encadrement déterminé.*

Nos 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.

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie:

A l'âme pure de mon père

A ma mère pour ses encouragements et son sacrifice

Ma adorable sœur : Khawla

Mes chers frères : Oussama et Ahmed

A mon grand-père, grand-mère et à mes tantes

À toute les membres de ma famille, petits et grands sans exception

A mon cher binôme EL atra

À mes chers collègues et copines EL atra, Dalila Romaiïssa, Youssra,

Rayane et Meriem.

À ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans les moments difficiles.

Et à tous ceux qui me sont chers.

« Chetti Wafa »

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie:

À la plus chère à mon coeur, ma mère, qui m'a fait toujours le courage et m'a donné tout l'amour du monde, qu'elle trouve ici mon amour et mon affection Wassila

À ma source de bonheur, mon père, qui est toujours disponible pour nous, et prêt à nous aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect M^{ed} Zine eddine

Mes adorables soeurs : « Ikram », « Sirine » ;

À mon unique frère : Abde elazize

À mes cousines Manel , Zahia, Madjda .

À les filles de mes tantes Dounia, Soussa, Maram, Soundous, Amira, Fatima, Sara, Safia, Sabrina, Nora, Rima.

À toute les membres de ma famille, petits et grands sans exception

A mon cher binôme Wafa

À mes chers collègues et copines wafa, Romaïssa, Rayane, Youssra, Hanou.

À ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans les moments difficiles.

Et à tous ceux qui me sont chers.

« Fadhouni Elatra »

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Sommaire	
Liste des Tableaux	I
Liste des Figures	II
Liste des abbréviations	III
Introduction	1

Partie I: Synthèse bibliographiques

Chapitre 1: les bifidobacteries

1.1	Historique et Taxonomie	3
1.2	La microflore intestinale	3
1.2.1	l'implantation du microbiote chez les nourissons	5
1.3	Propriétés phénotypiques	5
1.3.1	Morphologie	5
1.4	Propriétés physiologique	6
1.4.1	Température optimal, pH et sensibilité à l'oxygène.....	6
1.5	Ecologie des bifidobactéries.....	7
1.6	Métabolisme	7
1.7	Sensibilité aux antibiotiques.....	8

Chapitre 2 : Les probiotiques

2.1	Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique	9
2.2	Critères de sélection des propiotiques.....	10
2.3	Effets bénéfiques des probiotiques	11
2.4	Mode d'action.....	12
2.5	Les bifidobactéries comme probiotiques.....	12

Partie II : La partie expérimentale

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

3.1	Isolement des bifidobactéries	13
3.2	Identification des isolats.....	13

3.3	Extraction d'ADN à partir de cultures pures	14
3.4	La caractérisation moléculaire des isolats	14
3.5	Les propriétés probiotiques fonctionnelles	15
3.5.1	Tolérance aux acides et à la bile	15
3.5.2	Évaluation de la pathogénicité et de la sécurité.....	15
3.5.2.1	Confirmation de la formation d'amines biogènes	15
3.5.2.2	L'activité hémolytique.....	15
3.5.2.3	La sensibilité aux antibiotiques	16
3.5.3	Test d'adhésion <i>In Vitro</i>	16
3.5.4	La caractérisation moléculaire des gènes marqueurs probiotiques.....	18
3.5.5	Évaluation de l'activité antibactérienne.....	18
3.5.6	L'activité de l'hydrolase des sels biliaires.....	18
3.5.7	La production d'exopolysaccharides	18
Chapitre 4: Résultats et discussion		
4.1	Isolement et l'identification.....	19
4.2	Les propriétés probiotiques fonctionnelle	21
4.2.1	Tolérance aux acides et à la bile	21
4.2.1	Évaluation de la pathogénicité et de la sécurité.....	22
4.2.1.1	L'activité hémolytique et la production d'amine biogène	22
4.2.1.2	La résistance aux antibiotiques.....	23
4.2.2	Adhésion aux cellules Caco-2.....	23
4.2.3	La caractérisation moléculaire des gènes marqueurs probiotiques	24
4.2.4	L'activité antibactérienne	25
4.2.5	L'activité d'hydrolase des sels biliaires	26
4.2.6	Production d'exopolysaccharides	26
Conclusion.....		27
Bibliographie		28
Annexe		
Résumés		

Liste des Tableaux

Tableau 1: Les différents espèces de <i>Bifidobacterium</i> et leurs origines (Ait Abdeslam, 2008)	7
Tableau 2: Micro-organismes probiotiques les plus importants à usage humain (Benjamin,2016).	10
Tableau 3: Principaux critères utilisées pour la sélection des souches probiotiques (FAO/OMS,2002 ; Benkaddour, 2013 ; Bahri,2014).....	10
Tableau 4: Les étapes des méthodes RAPD et Rep-PCR	14
Tableau 5 : Des amorces oligonucléotidiques utilisées dans l'étude.	17

Liste des Figures

Figure 1: Schéma du tractus gastro-intestinal et répartition de son microbiote pour chaque partie du tractus digestif (Caudeyras et frostier, 2010).....	4
Figure 2: Observation au microscope électronique des cellules de <i>Bifidobacterium sp</i> (Biavati <i>et al.</i> , 2000).....	6
Figure 3 : Schéma général de la voie bifide F6PPK (Lee <i>et al.</i> , 2010).....	8
Figure 4: Schéma récapitulatif des effets bénéfiques des probiotiques adopté par (Matib <i>et al.</i> , 2020).....	11
Figure 5: Mécanismes d'action des probiotiques selon (Bermudez-Brito <i>et al.</i> , 2012).	12
Figure 6 : Dendrogramme construit à l'aide du logiciel méga 5 utilisé le modèle UPMG A pour les scores binaires obtenus à partir de : a- Rep-PCR (GTG) 5 profil ; b- profil RAPD M13.	20
Figure 7: Image représentative de l'adhésion bifidobactérienne à la lignée cellulaire Caco2 : (a) <i>B. longum</i> NCIM5672, (b) <i>B. bifidum</i> NCIM5697.	24

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNr/ARNr : ADN ou ARN ribosomal
ADNr 16S : Acide Ribonucléique 16Svedberg
ARN : Acide ribonucléique
B: *Bifidobacterium*
BA: biogenic amines
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
BHI : brain heart infusion
BSH : hydrolase de sel biliaire
CF : Filtration de culture
Caco2 : human caucasian colon adenocarcinoma
CO2 : Dioxyde de carbone
°C : Degré Celsius
Cys : Sharpe Lactosé cystéiné
GRAS: Generally Regarded As Safe
G+C: le ratio guanine + cytosine
DPPH: diphényl-picryl hydrazyl
DMEM: Dulbecco's Modified Eagles Medium
D’NTP : Désoxyribonucléotides triphosphate
E : *Enterococcus*
EPS : Exopolysaccharide
F6PPK: fructose-6-phosphokétolase
FAO: Food and Agriculture Organization
G+C : le ratio guanine + cytosine
h: heure
HPLC: high performance liquid chromatography
K: *Kocuria*
L : *Lactobacillus*
Lt: *Lactococcus*

Log : logarithme
MRS : milieu de Man, Rogosa et Sharpe
MRS_c : milieu de Man, Rogosa and Sharpe cystéiné
NaCl : Chlorure de sodium
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
pH : potentiel d'hydrogène
PBS : Phosphate Buffer salin
P/v: poids/volume
PCR: Polymerase Chain Reaction
Rep-PCR: Repetitive Element Palindromic PCR
RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA
Sp: Espèce
St: Streptococcus
S: Saccharomyces
Subsp : sous espèce
TE : Tris EDTA
tr/ mn : tour par minute
TC : taurocholate de sodium
TGC : tauroglycolique de sodium
TGI : tractus gastro-intestinal
TDCA : acide taurodésoxycholique
UFC : Unités Formant Colonie

Introduction

Introduction

L'Homme et animaux vit continuellement avec une population des microorganismes complexe et diversifiée habitant son tractus gastro-intestinal (TGI) appelée microbiote (Eckburg *et al.*, 2005). Notre organismes héberges en générale de nombreux micro-organismes vivants (bactéries, levures, virus) que l'on retrouve au niveau de la peau, de la bouche, du tractus digestif, et de l'appareil uro-génital (Dolié, 2018). Tandis que le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans le maintien de la santé humaine tout au long de la vie il contribue à la résistance aux agents pathogènes et interagit avec le système immunitaire.

Il existe de nombreux facteurs internes et externes de l'hôte qui affectent l'implantation du microbiote intestinal à la naissance. Par conséquent, le microbiote maternel, en particulier le microbiote vaginal et fécal est la principale source de bactéries (Scholtens *et al.*, 2012).

Différents micro-organismes sont actuellement utilisés comme probiotiques humains ; parmi eux *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* constituent les plus genres fréquemment utilisés.

En fait, l'espèce *Bifidobacterium* est l'un des organismes probiotiques les plus bénéfiques en dehors des bactéries lactiques et est l'une des cultures les plus prédominantes dans le côlon humain et les nourrissons allaités et certaines souches de bifidobactéries possèdent le statut GRAS.

D'une manière générale, les probiotiques sont considérés comme des agents protecteurs vis-à-vis des risques d'apparitions de pathologies digestives. Parmi les effets les mieux documentés figurent l'effet antidiarrhéique dans le cadre d'une antibiothérapie ou encore l'amélioration des troubles intestinaux associés à l'intolérance au lactose.

L'objectif principal de notre étude c'était : L'isolement et l'identification des souches de bifidobactéries isolées à partir des selles du nourrisson et l'étude de leurs potentiel probiotique *in vitro*. Cependant suite aux conditions dues l'épidémie le travail pratique est suspendue et on a opté pour l'analyse d'articles. Dans Cette dernière alternative, un article en relation avec la thématique de mémoire est analysé et çà partie expérimentale est pris comme notre partie pratique.

Ainsi les résultats obtenus ont été comparées avec d'autres articles dans le même domaine. En ce qui concerne les parties du manuscrit, ce dernier est divisé en 4 chapitres :

- Le premier chapitre comprend une synthèse bibliographique sur la description des bifidobactéries et le microbiote intestinal.
- Le second chapitre contient des généralités sur les probiotiques.
- Le troisième chapitre consacré au matériel et méthode présente une analyse d'article de (Achi et Halami, 2019).
- Le quatrième chapitre regroupe les résultats et leur discussion.
- Enfin, le manuscrit s'achève par une conclusion.

Partie I

Synthèse bibliographiques

Chapitre 1

Les bifidobactéries

1 Les bifidobactéries

1.1 Historique et Taxonomie

Les bifidobactéries ont été isolé pour la première fois par Tissier (1899) dans les matières fécales de nourrissons allaités qu'il nomme *Bacillus bifidus communis* (Pokusaeva *et al.*, 2011). En (1917) Winslow a proposé de classer *Bacillus bifidus* dans la famille des *Lactobacillaceae*, et Holland (1920) a nommé la souche *Lactobacillus bifidus*. Le nom du genre *Bifidobacterium* est proposé par Orla-Jensen en (1924) mais étant donné ses similitudes avec le genre *Lactobacillus*, les bifidobactéries resteront assimilées au genre *Lactobacillus*. Dehnert (1957) décrit l'existence des plusieurs biotypes de *Bifidobacterium*. Reuter en (1963) a identifié et nommé sept autres espèces de *Bifidobacterium*, en plus de *Bifidobacterium bifidum* (Delcenserie *et al.*, 2002).

Dans la 8^{ème} édition du Bergey's Manual of determinative Bacteriology, le genre *Bifidobacterium* comprenait 8 espèces et il a été inclus dans la famille des *Actinomycetaceae* dans l'ordre des *Actinomycetales* (Biavati et Mattarelli, 2015).

Dans l'arbre phylogénétique des bactéries, le genre *Bifidobacterium* est placé avec les bactéries Gram positives (avec un pourcentage élevé de G + C) et d'autres genres (tels que *Streptomyces*, *Actinomyces* et *Propionibacterium*). Toutes les espèces appartenant à ce genre ont une similitude de 93% dans la séquence d'ADN 16S (Hadadji, 2007). Le genre *Bifidobacterium* a été classé dans la famille *Bifidobacteriaceae* de l'ordre *Bifidobacteriales*, dans la classe *Actinobacteria*, phylum *Firmicutes* de domaine *Bacteria* (Biavati et Mattarelli, 2015).

Actuellement, la famille des *Bifidobacteriaceae* comprend 55 sous-espèces du genre *Bifidobacterium* et membres de huit genres supplémentaires : *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Bombiscardovia*, *Gardnerella*, *Neoscardovia*, *Parascardovia*, *Pseudoscardovia* et *Scardovia*, qui ensemble englobent 12 espèces (Lugli *et al.*, 2017).

1.2 La microflore intestinale

Le tractus gastro-intestinal humain est composée : l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (possède du duodénum, du jéjunum et de l'iléon) et le gros intestin ou côlon (Dunne *et al.*, 2001).

Selon la définition de Isolauri *et al.* (2002), La flore intestinale normale est un ensemble complexe et équilibré de micro-organismes qui habitent généralement dans le tractus gastro-intestinal et jouent un rôle dans la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire

de l'hôte. Après une colonisation complète, la microflore intestinale est considérée comme un organe acquis après la naissance (Bjorksten, 2004).

La microflore du colon est très complexe et dominée par des bactéries strictement anaérobies (*Bacteroides spp*, *Clostridium spp*, *Bifidobacterium spp*). Tandis que les bactéries anaérobies facultatives sont moins nombreuses et représentées par les lactobacilles, les entérocoques, et les streptocoques, Les levures (ex. *Candida albicans*) sont relativement faiblement représentées (Ouwehand et Vesterlund, 2003 ; Isolauri *et al.*, 2004).

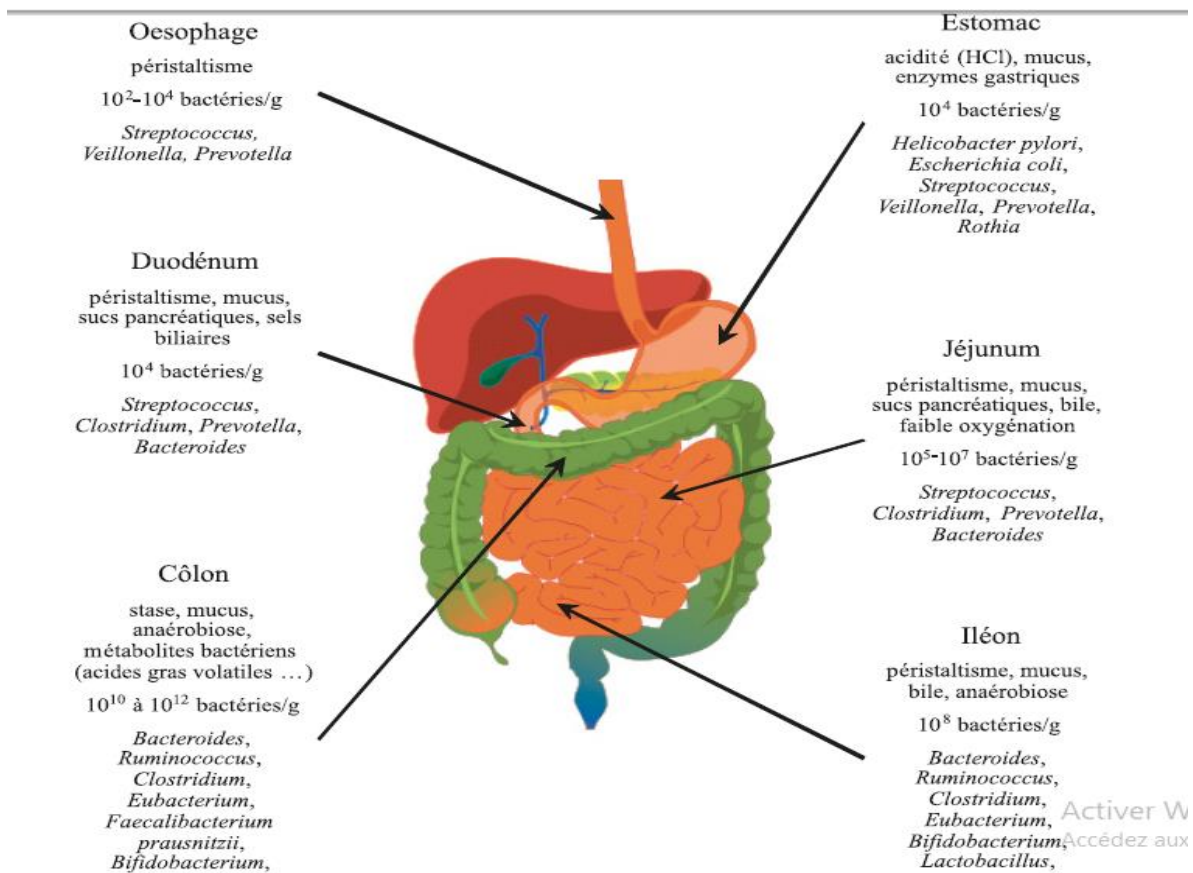


Figure 1: Schéma du tractus gastro-intestinal et répartition de son microbiote pour chaque partie du tractus digestif (Caudeyras et frostier, 2010).

1.2.1 L'implantation du microbiote chez les nourissons

A sa naissance, le nouveau-né n'héberge en général aucune bactérie. L'implantation du microbiote intestinal diffère entre les nouveau-nés prématurés et à terme. Ceci est liée aux particularités physiologiques du nouveau-né prématuré et aux multiples facteurs externes produits par le milieu hospitalier : mode de naissance, type d'allaitement (maternel ou artificiel), antibiothérapies, réanimation (Filleron et Jumas-Bilak, 2015).

La colonisation bactérienne de son tube digestif est un phénomène très rapide puisque 48 h après sa naissance, la flore fécale du nourrisson est constituée essentiellement de Bifidobactéries, de Lactobacilles, d'Entérobactéries, Streptocoques (essentiellement du type D) et de bactéroïdes (Guediche, 1990).

1.3 Propriétés phénotypiques

1.3.1 Morphologie

Les bifidobactéries sont des bactéries à Gram positif, immobiles, non sporulées, non capsulés. Elles sont des microorganismes anaérobies non productrices de gaz, certaines souches peuvent tolérer l'oxygène (Biavati et Mattarelli, 2015), elles sont souvent retrouvées sous forme bifide (Y, V) (figure 2), court bâtonnets à extrémité arrondis et ou en forme spatulées et parfois sous forme de petits bacilles réguliers ou sous forme coccoïde (Hadadji, 2007). Cependant, leur polymorphisme dépend principalement du milieu de culture et des conditions de croissance (Zerrouki, 2012). Les colonies des bifidobactéries sont lisses, convexe, luisante de coloration blanchâtre et crème, de contour régulier et de diamètre variable (Mahdi, 2016).

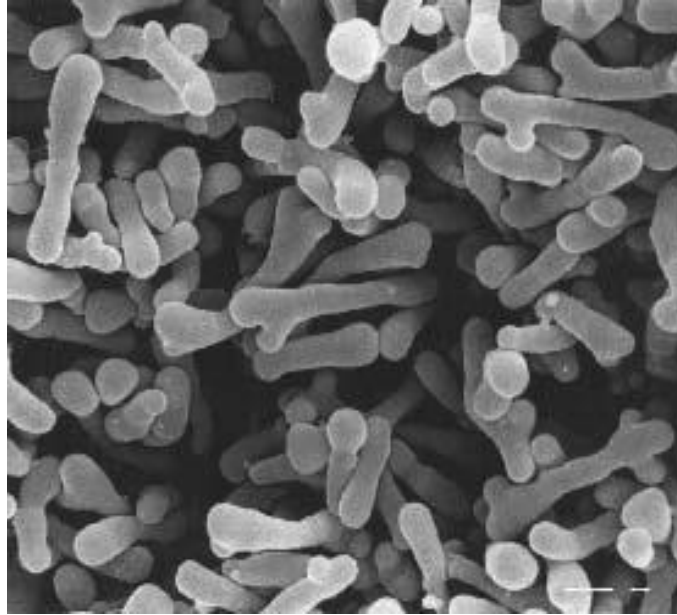


Figure 2: Observation au microscope électronique des cellules de *Bifidobacterium sp* (Biavati *et al.*, 2000).

1.4 Propriétés physiologique

1.4.1 Température optimal, pH et sensibilité à l'oxygène

La température optimale pour la croissance des bifidobactéries est de 37 à 41 ° C, le minimum est de 25 à 28 ° C et le maximum de 43 à 45 ° C. La plupart des souches de *Bifidobacterium* d'origine humaine à une température optimale entre 36 à 38 ° C, alors que les souches animales se développent de manière optimale à 41–43 ° C (Prasanna *et al.*, 2014). Le pH optimal pour la croissance des bifidobactéries se situe entre 6.5 et 7. Par conséquent, *Bifidobacterium lactis* et *Bifidobacterium animalis* peuvent survivre à un pH de 3,5 (Djellid, 2015). Les bifidobactéries sont anaérobies, bien que certaines souches tolèrent l'oxygène, mais uniquement en présence de dioxyde de carbone, et les espèces plus récemment décrites, telles que *B. psychraerophilum*, *B. scardovi*, *B. suerumiense*, peuvent se développer dans des conditions aérobies (Biavati et Mattarelli, 2015).

1.5 Ecologie des bifidobactéries

Les bifidobactéries ont été isolées et attribuées à partir de six niches écologiques : la cavité orale, l'environnement intestinal humain et animal, les eaux usées, sang et alimentation (Angelo, 2015). Ces bactéries représentent 85-99 % de la microflore intestinale de nourrisson (Bahloul, 2019). Tableau 1 mentionnées les différentes espèces de *Bifidobacterium* et leurs origines (Ait Abdeslam, 2008).

Tableau 1: Les différents espèces de *Bifidobacterium* et leurs origines (Ait Abdeslam, 2008)

Espèce	Source et Référence
<i>B. adolescentis</i>	Selles des adultes Reuter (1963)
<i>B. animalis</i>	Selles des rats, poulet, lapins Scardovi et Trovatelli (1974)
<i>B. bifidum</i>	Selles des adultes et des enfants Orla-Jensen en (1924)
<i>B. breve</i>	Selles des enfants Reuter (1963)
<i>B. catenulatum,</i>	Selles des enfants et des adultes Scardovi et Crociani (1974)
<i>B. dentium</i>	Caries dentaire humaine Scardovi et Crociani (1974)
<i>B. longum</i>	Selles des enfants et des adultes Reuter (1963)
<i>B. infantis</i>	Selles des enfants Reuter (1963)

1.6 Métabolisme

Les bifidobactéries sont les organismes saccharolytiques qui peuvent fermenté le glucose, le galactose et le fructose d'une manière spécifique. Elles utilisent la voie du fructose 6-phosphate phosphocétolase (F6PPK) ou encore appelée « shunt » du fructose 6-phosphate (Angelo, 2015). La voie métabolique du fructose 6-phosphate phosphocétolase produit de l'acide lactique et l'acide acétique comme métabolites primaires (figure 3) (Mahmoudi, 2014). Il existe également une voie partielle de la glycolyse ainsi qu'une voie partielle du cycle d'acide tricarboxylique. Des différences existent entre les espèces dans leur capacité à fermenter d'autres glucides ou des alcools (Bruno, 2012).

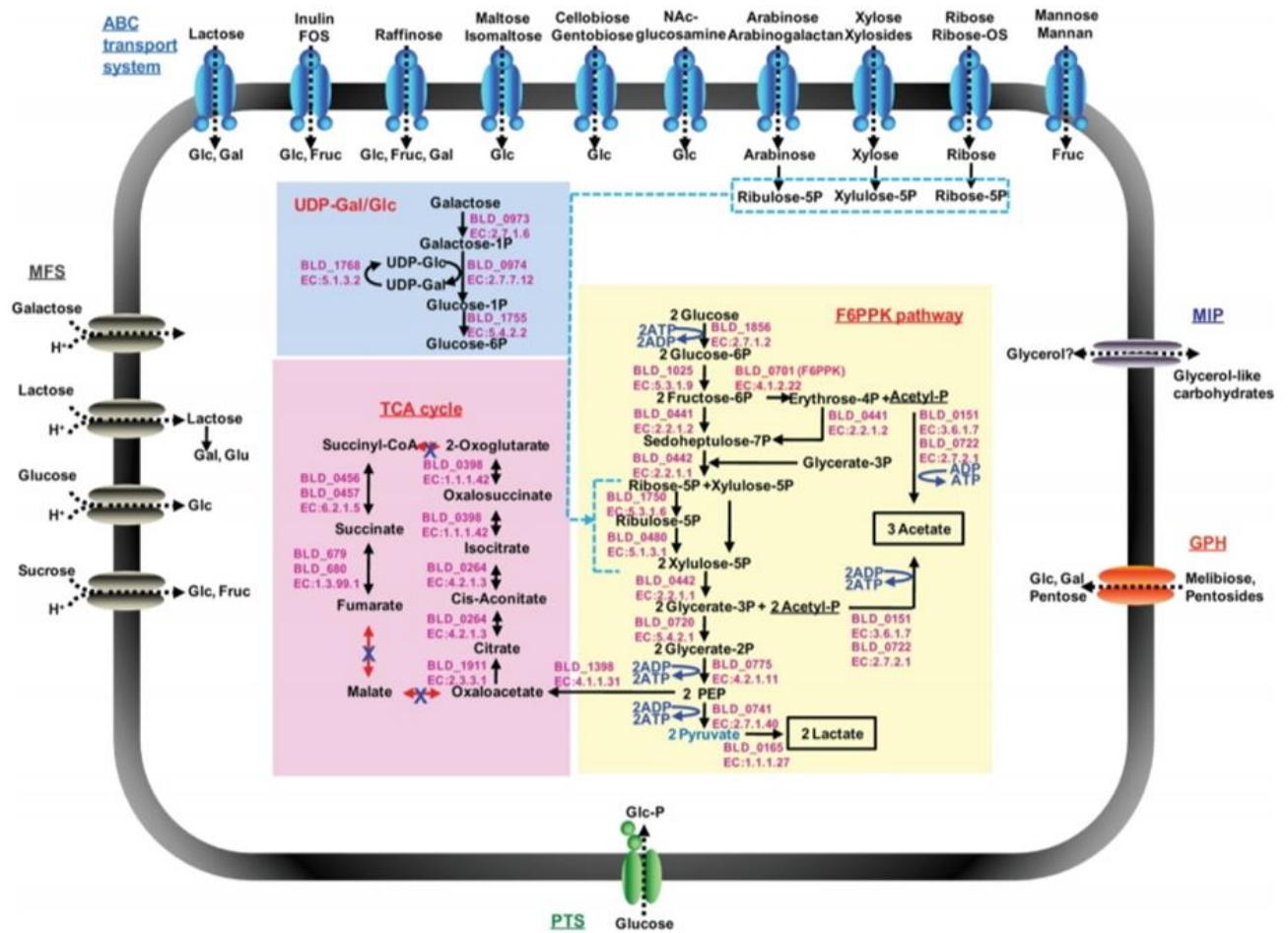


Figure 3 : Schéma général de la voie bifide F6PPK (Lee *et al.*, 2010).

1.7 Sensibilité aux antibiotiques

Les bifidobactéries sont sensibles aux pénicillines comme l'ampicilline ou la pénicilline G, les céphalosporines de première génération, les tétracyclines, les macrolides comme l'érythromycine, les lincosamides comme la clindamycine et enfin le chloramphénicol (Bahloul, 2010). La sensibilité des bifidobactéries au tétracycline est variable selon les espèces (Masco *et al.*, 2006 ; Ammor *et al.*, 2007).

D'autre part, les bifidobactéries sont résistantes aux aminosides tels que la néomycine, la kanamycine, la gentamicine et la streptomycine. Une résistance aux polymyxines (telle que la polymyxine B) a également été observée ainsi que pour le thiméthoprime et le Metronidazole (Kouame, 2013).

Chapitre 2

Les probiotiques

2 Les probiotiques

Le terme probiotique dérive des 2 mots grecs " pros" et " bios" qui signifient littéralement "pour la vie" ou « en faveur de la vie », contrairement au terme antibiotique signifiant "contre la vie".

A partir de 1965, la définition de probiotique change radicalement sous l'impulsion de Lilly et Stillwell qui décrivent un probiotique comme une substance produite par un microorganisme stimulant la croissance d'un autre microorganisme (Caudeyras et Frostier, 2010).

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a défini probiotiques en tant que «micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates sont bénéfiques pour la santé de l'hôte (Berkes *et al.*2019).

D'après Camile (2014) les probiotiques peuvent être intégrés dans différents types de produits comme les aliments ou les compléments alimentaires sous forme lyophilisée.

Tous les probiotiques n'ont pas les mêmes modes d'action et n'ont pas le même potentiel pour faire un bon probiotique. Leur efficacité est souche et dose dépendante. Il existe 4 grands groupes de probiotiques :

- A) Les ferments lactiques regroupés en 2 catégories, en fonction de leur morphologie :
 - ✓ les Lactobacilles (*Lactobacillus bulgaris*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei*)
 - ✓ les coques (Entérocoques et Streptocoques).
- B) Les bifidobactéries.
- C) Les différentes levures de type *Saccharomyces cerevisiae*.
- D) Les autres bactéries sporulées, dont *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*.

2.1 Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique

Les principaux micro-organismes considérés comme probiotiques peuvent être introduits dans les aliments, des compléments alimentaires ou des médicaments. La plupart sont issus du microbiote intestinal humain.

Les plupart des souches, commercialisés pour la consommation humaine sous forme de produits alimentaires et considérées en tant que probiotiques appartiennent au genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les principaux genres. Toutefois, il existe également d'autres espèces bactériennes. Le tableau 2 présente les souches les plus importantes utilisées comme probiotique à usage humain (Debeyer, 2020).

Tableau 2: Micro-organismes probiotiques les plus importants à usage humain (Benjamin,2016).

Groupe	Bactéries lactiques			Bactéries non lactiques	Levures
Genre	<i>Bifidobactérium</i>	<i>Lactobacillus</i>	Autre		<i>Saccharomyces</i>
Espèces	<i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. lactis</i> <i>B. longum</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. casei</i> <i>L. crispus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. lactis</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. lactis</i> <i>S. thermophilus</i> <i>L. lactis</i>	<i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Esherichia Coli Nissle 1917</i>	<i>S. soulardii</i> <i>S. cervisiae</i>

2.2 Critères de sélection des propiotiques

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Le choix des probiotiques dépend de ces propriétés et du type d'utilisation.

Selon le rapport de la FAO/OMS (2002), 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, 2001).

Tableau 3: Principaux critères utilisées pour la sélection des souches probiotiques (FAO/OMS, 2002 ; Benkaddour, 2013 ; Bahri,2014).

Critères fonctionnelles	<ul style="list-style-type: none"> - Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastro- intestinal. - production de substances antimicrobiennes et antagonisme vis-à-vis des pathogènes. - tolérance à la bile et aux enzymes digestives. - tolérance à l'acidité et aux enzymes gastriques. - Immunomodulation - Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé - Effets sur la santé documentés et cliniquement validés
	- Identification taxonomique précise

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> - Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques. - Souche pour l'usage humain (isolée du tractus intestinal d'un Homme sain) ou alimentaire (utilisée dans les produits fermentés). - Souche déposée dans une collection de cultures reconnue internationalement. - Historique de non pathogénicité. - Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques.
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> - stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini. - conservation des propriétés probiotiques après production.

2.3 Effets bénéfiques des probiotiques

Le schéma résume les effets bénéfiques pour la santé qui ont été attribués aux probiotiques :

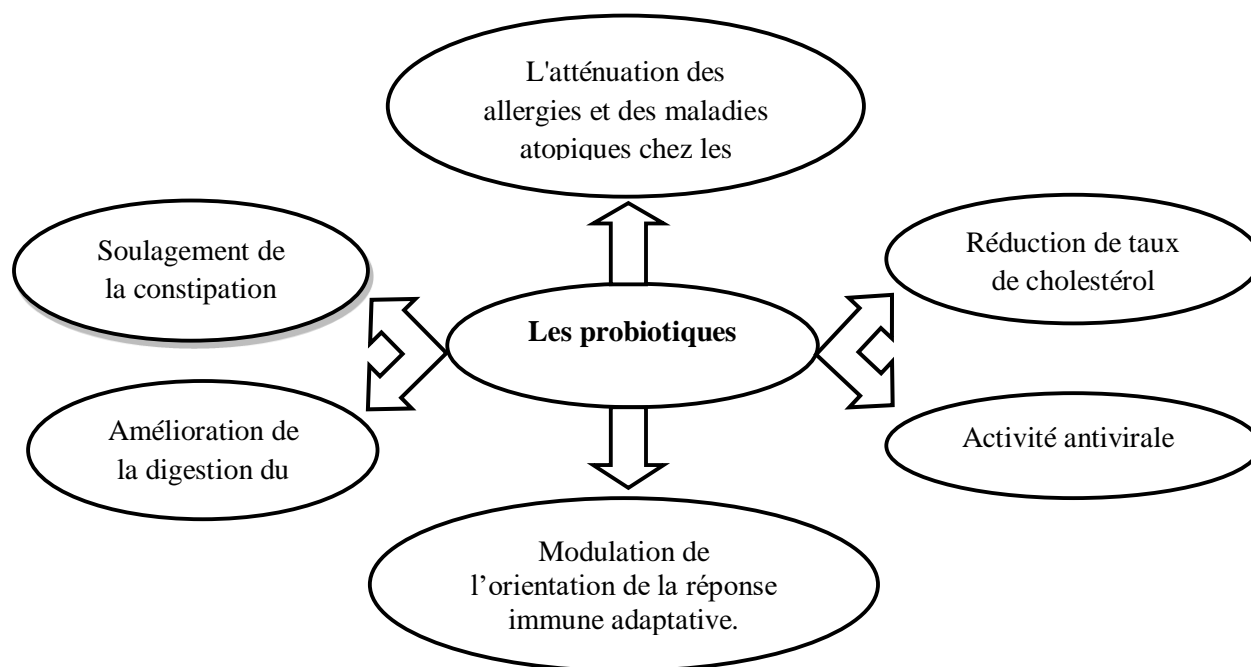


Figure 4: Schéma récapitulatif des effets bénéfiques des probiotiques adopté par (Matib *et al.*, 2020).

2.4 Mode d'action

Les mécanismes d'action des probiotiques sont complexes, souvent multiples et dépendent de la souche bactérienne considérée figure 4 résume quelques mécanismes.

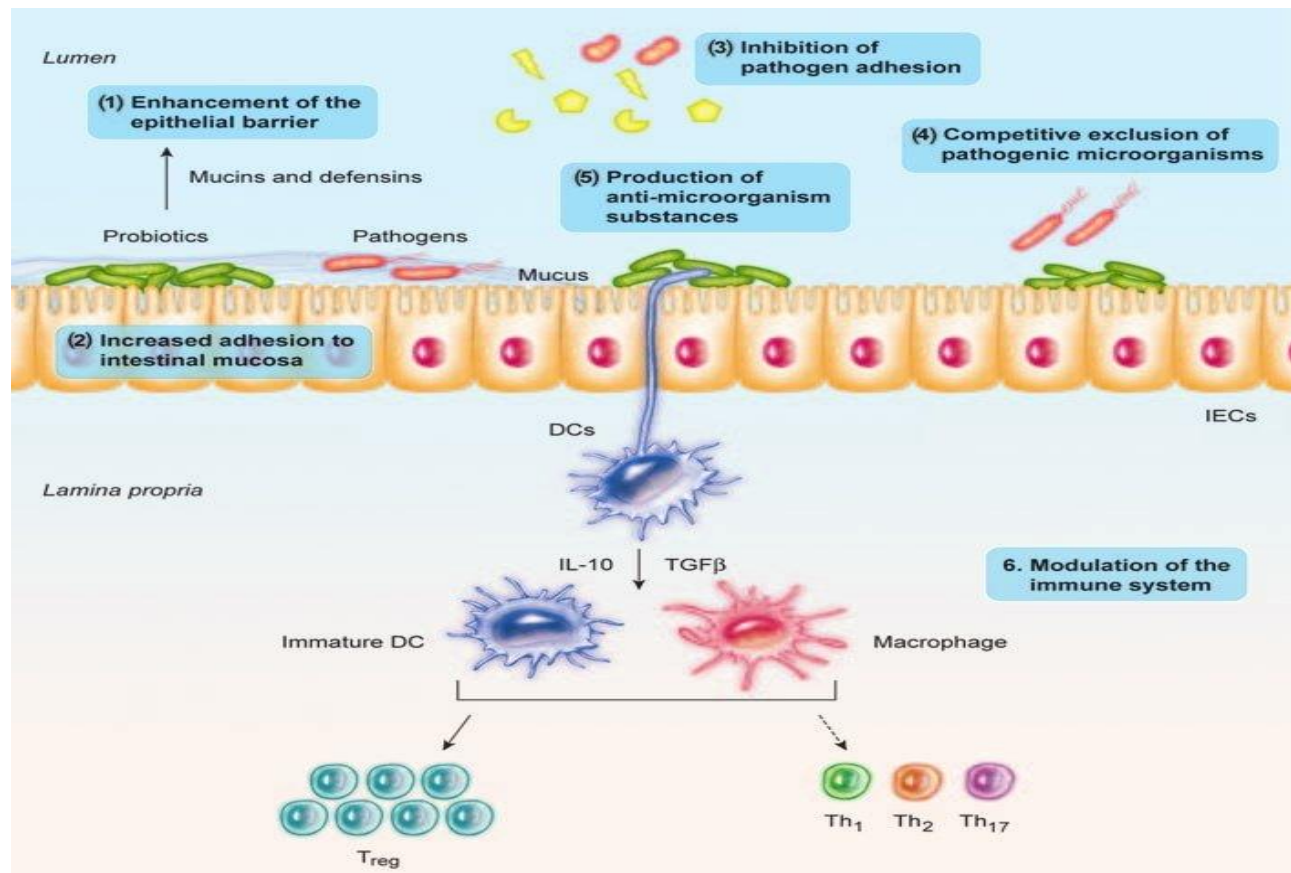


Figure 5: Mécanismes d'action des probiotiques selon (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

2.5 Les bifidobactéries comme probiotiques :

Certaines espèces de bifidobactérie ayant des activités probiotiques sont économiquement importantes et elles sont ajoutées en grand nombre sous forme des bactéries vivantes à des nombreuses préparations alimentaires (Turroni *et al.*, 2010). Des effets probiotiques de bifidobactéries comme la réduction du cholestérol, l'amélioration de l'intolérance au lactose, la déconjugation des acides biliaires et la stimulation du système immunitaire. Cependant, tout comme les probiotiques en général, la capacité des bifidobactéries à protéger contre les infections entériques demeure l'effet probiotique le plus étudié chez ce genre bactérien (Mahmoudi, 2014).

Partie II

La partie expérimentale

Chapitre 3

Matériels et méthodes

3 Matériels et méthodes

Les travaux menés par Achi et Halami. (2019) ont été pris comme partie matériels et méthodes pour notre travail ainsi les résultats obtenus sont considéré comme nos résultats obtenus et comparer avec d'autres recherche en relation avec l'intitulé de mémoire.

3.1 Isolement des bifidobactéries

Les souches ont été isolées à partir des matières fécales de nouveau nés.

Les matières fécales ont été conservées dans des sacs stériles contenant de l'eau peptone (0,1%) supplémenté avec 0.25 % de L-cystéine. Les échantillons ont été ensuite homogénéisés et dilué dans la même solution. Les dilutions décimales appropriées ont étéensemencés en surface de boites de pétri contenant de la gélose MRS supplémenté avec 0,25% de L-cystéine, ensuite les boites ont été incubées à 37°C pendant 48h dans une atmosphère anaérobie contenant 85% N, 10 % H et 5 % CO₂ (Zinedine et Faid, 2007).

3.2 Identification des isolats

Chaque souche isolée est ensemencé sur gélose MRS-cys supplémenté avec 0.25% de L-cystéine. Les boites sont incubées à 37 pendant 24 à 48. Les formes des souches ont été examinées sous microscope après coloration au bleu de méthylène. Seulement les souches présentant la forme phénotypique en V ou Y sont sélectionnées pour une identification à l'échelle du genre en suivant les étapes citées par (Zinedine et Faid, 2007).

Identification à l'échelle du genre des souches isolées a été faite par le test F6PPK selon le protocole décrit par Zinedine et Faid, (2007). Le principe de ce test reposait sur la capacité des souches étudiées à transformer le fructose-6-phosphate en érythrose-phosphate par l'enzyme fructose 6-phosphate phosphocétolase (F6PPK).

Les souches étudiées sont cultivées en MRS bouillon pendant 24 h à 37°C, la culture est centrifugée à 6000 t /5 min et les cellules sont lavées deux fois avec une solution tampon phosphate 0,05 % ajusté à pH 6,5 et additionné de 0,25 % de L-cystéine. Les cellules ont ensuite été mises en suspension dans 2 ml d'une solution de lysozyme et incubées à 37 ° C pendant 3 h. Après incubation 1,5 ml d'une solution d'hydroxylamine- HCl a été ajouté et laissé incubé à température ambiante pendant 10 min.

3 ml d'une solution d'acide trichloracétique, 1 ml de HCl 4N et 1 ml de chlorure ferrique ont été ajoutés et incubés à température ambiante pendant 10 min. Une couleur rouge-violet se

développe immédiatement avec l'ajout de chlorure ferrique si la culture contient une activité phosphocétolase.

3.3 Extraction d'ADN à partir de cultures pures

L'extraction de l'ADN a été faite selon Le protocole décrit par Baffoni *et al.* (2013). Brièvement, 10 ml de culture ont été récoltés et lavés deux fois avec du tampon TE, puis remise en suspension dans 1 ml de TE contenant 15 mg de lysozyme et incubés à 37°C pendant une nuit. Les cellules ont été lysées avec 3 ml de tampon de lyse contenant 220 µl de SDS 10 % (p/v) et 150 µl de protéinase K (> 600 mAU/ml) et incubée 2 heures au bain-marie à 60°C.

1 ml de solution saturée de NaCl a été ajouté et la suspension a été doucement inversée deux fois. Les culots ont été récoltés par centrifugation (5000 x g) à température ambiante pendant 15 minutes.

Après transfert des surnageants propres dans des tubes neufs, l'ADN a été précipité avec 2,5 volumes d'éthanol froid (95 %) et remis en suspension dans 300 µl de tampon TE .

3.4 La caractérisation moléculaire des isolats

D'après Achi et Halami (2019) L'identification moléculaire des isolats a été faite par séquençage de gènes l'ADNr 16S, le gene *xfp* et le gene *hsp60*, par typage microbien par la méthode RAPD et Rep-PCR.

Les conditions de l'amplification de l'ADN extrait par méthode sont comme Tableau 4.

Tableau 4: Les étapes des méthodes RAPD et Rep-PCR .

Les méthodes	RAPD	Rep-PCR
Les étapes		
Dénaturation Initiale	95 ° C pendant 3 min	94 ° C pendant 3 min
Dénaturation	40 cycles à 94 ° C pendant 1 min	40 cycles à 94 ° C pendant 1 min
Elongation	36 ° C pour 1,45 min suivi de 72 ° C à 2 min	50 ° C pendant 1 min suivi de 72 ° C à 2 min
Extension	72 ° C pendant 7 min	72 ° C pendant 9 min

Les amplifiats ont été séquencés chez Amnion Biosciences Pvt, Bengaluru, Inde. Les amorces utilisées dans la présente étude et les conditions de réaction sont répertoriées dans le tableau 5.

3.5 Les propriétés probiotiques fonctionnelles

3.5.1 Tolérance aux acides et à la bile

La tolérance des isolats aux conditions acides ainsi que la tolérance aux sels biliaires a été déterminée selon la méthode décrite par Archer et Halami (2015). Des bouillons MRS-C ajusté à différents pH 2, 3, 4 et 5 ou contenant des concentrations en sels biliaires de 0,3% ont été cultivé par des cultures fraîches de bifidobactéries à raison de 10%.

Des aliquotes ont été prélevée à temps 0 h, 1.5 h et après 3 h puis des dilutions décimale en série sont effectuées etensemencées sur la gélose MRS-C .après incubation à 37° C pendant 24 à 48 h les cellules viables ont été dénombrées.

3.5.2 Évaluation de la pathogénicité et de la sécurité

3.5.2.1 Confirmation de la formation d'amines biogènes

Les isolats ont été testés pour la production d'amine biogènes selon la méthode décrite par Bover-Cid et Holzapfel (1999). Les souches, préalablement cultivées dans le bouillon MRS, sontensemencées à raison de 0,1% dans le bouillon décarboxylase formulé en tant qu'un milieu de criblage, contenant 0,5% de tyrosine, 0,25% d'histidine, ornithine et lysine.

Après incubation à 37°C pendant 4 jours en conditions aérobies et anaérobies, 2 ml du bouillon de fermentation ont été centrifugés à 12 000 rpm/5 min. Ensuite, 1 ml du surnageant est mélangé avec 1 ml de HCl 0,1 N puis centrifugé à nouveau à 12 000 rpm/5 min) et filtré à travers un filtre 0,45 μ m. Le filtrat est stocké à - 20°C jusqu'à l'analyse BA. Les échantillons ont été analysés pour la présence de BA par HPLC (Bover-Cid et Holzapfel, 1999).

3.5.2.2 L'activité hémolytique

Pour évaluer l'activité hémolytique, les souches sélectionnées ont étéensemencé en surface de boites de gélose au sang de mouton défibriné à 7%. Après incubation à 37°C pendant 48h. les boites de gélose ont été observées pour la formation d'une zone claire (β -hémolyse), verdâtre (α -hémolyse) ou aucune zone (γ -hémolyse) autour des colonies (Devi *et al.*, 2015).

3.5.2.3 La Sensibilité aux antibiotiques

Le test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé selon la méthode décrite par (Devi *et al.*, 2015), en utilisation de la méthode de diffusion d'antibiotiques en milieu gélosé Mueller-Hinton. Les disques d'antibiotiques utilisés et la charge sont comme suit : La Ciprofloxacine (5µg), Ofloxacine (5µg), Sparfloxacine (5µg), Gatifloxacine (5µg), Aztréonam (30µg), Vancomycine (30µg), Doxycycline (30µg), Céfotaxime (30µg), Amoxicilline (30µg), Céfépime (30µg), Chloramphénicol (30µg), Isepamicine (30µg), Ampicilline (10µg), Céphalothine (30µg), Clindamycine (2µg), Gentamycine (10µg), oxacilline (1µg), acide fusidique (10µg), méthicilline, novobiocine (5µg), pénicilline (1 µg), streptomycine (10µg) et tétracycline (25µg) .

3.5.3 Test d'adhésion *In Vitro*

La capacité d'adhésion des isolats a été analysée à l'aide des lignées cellulaires Caco-2 achetées auprès de National Center for Cell Science, Inde. La lignée cellulaire a été maintenue dans le milieu essentiel minimal Eagles modifié de Dulbecco (DMEM) additionné de 10% de sérum bovin fœtal inactivé par la chaleur et solution d'antibiotique et d'antifongique. La lignée cellulaire a été incubée à 37 ° C dans un incubateur à CO₂ .

Le milieu de culture cellulaire a été changé après 2 jours, et trypsinisation a été effectuée en utilisant une solution contenant 0,25% de trypsine – EDTA.

Le test a été réalisé selon les étapes suivantes :

Des cellules Caco-2 (10^5) ont étéensemencées dans des plaques de culture tissulaire à six puits et incubées jusqu'à confluence. Le test a été effectué 20 jours après la confluence.

Des cellules de *Bifidobacterium* 10^8 à 10^9 ont été mises en suspension dans du DMEM sans sérum et sans antibiotiques. Les monocouches de Caco-2 ont été lavées deux fois avec du PBS avant d'ajouter les cellules bactériennes pour éliminer les antibiotiques.

Les cellules bactériennes ont été incubées avec des cellules Caco-2 à 37 ° C pendant 2 h. Après avoir lavé la monocouche avec du PBS stérile pour éliminer les bactéries non attachées, elle a été trypsinisée et le nombre de bactéries ont été réalisées sur gélose MRS-C pour déterminer le nombre de bactéries adhérant aux cellules.

Le pourcentage d'adhésion a été calculé comme le nombre de bactéries adhérentes par rapport au nombre de bactéries ajoutées. Les dosages ont été effectués en trois expériences indépendantes.

Tableau 5 : Des Amorces oligonucléotidiques utilisées dans l'étude.

Purpose	Target gene	Primer pair	Specificity	Primer sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon size (bp)	
Taxonomy	16S	16SRF	<i>Bifidobacterium</i> sp.	CCAATCACGAGTCTCACCTTA	61	1419	
		16SRR		GAGTAATGCGTGACCGACCT			
	<i>xfp</i>	F6PPKF F6PPKR	<i>Bifidobacterium</i> sp.	GCGACATCATCAAGAACAAC ACGTTGAAGTTGTCGTGGTT	59	915	
	<i>hsp60</i>	HSPF HSPR	<i>Bifidobacterium</i> sp.	TCAGTAGCCCATGTCGGC TGAGGAAGCTCGTCAGGG	58	1600	
Molecular characterization	RAPD	M13	–	GAGGGTGCCGGTTCT	36	Multiple	
	Rep	GTG5	–	GTGGTGGTGGTGGTG	50	Multiple	
Probiotic marker genes	<i>fimA</i>	fimalonF fimalonR	<i>B. longum</i>	MBGCCTACCAGATGTTWCWCC GACTTGCGGTTGGACTTSAC	61	1405	
		AbifF AbifR	<i>B. bifidum, B. breve</i>	GATTGCCACCGTATTTGGAT GTTCTTGCGCTTGAGAGTCC	58	1546	
		<i>fimP</i>	pbif F pbif R	<i>B. bifidum</i>	AGAAGCTTTTCGCGGGTGT GGACTTGACGTTGGTCACCT	58	1470
			panim F panim R	<i>B. animalis</i>	ATCAATGAGGCATTGGAAGG GCTGCTGCTTCAGGCTGT	58	1552
	Major pili 1	qbreF qbreR	<i>B. breve</i>	ATAACGGTGCTTCCGTCAAY TGTCGTGACSTTCCAGCTC	60	1500	
		Major pili 2	pil2bre F pil2bre R	<i>B. breve</i>	GAGCACGAACAACRATGAGA GTGGTCGTGGTGATGATCTG	60	1540
	Serpins		Ser F Ser R	<i>Bifidobacterium</i> sp	CGCACCGATGAATAATGGTA TGATGGAACAGTACCGGTTG	58	1349

Symboles nucléotidiques dégénérés : B = G + T; M = A + C; R = A + G; S = G + C; W = A + T; Y = C + T

3.5.4 La caractérisation moléculaire des gènes marqueurs probiotiques

D'après Achi et Halami (2019) des amorces spécifiques à l'espèce sont utilisées pour détecter la présence des gènes responsables d'adhésion supposés avoir des effets immuno-modulateurs ont été détecté en utilisant les amorces spécifique citées dans le tableau 5.

3.5.5 Évaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des isolats à l'encontre des souches pathogènes a été évaluée en modifiant le test de diffusion en puits décrit par Archer et Halami (2015).

Les isolats ont été cultivés pendant une nuit puis centrifugés à 8 000 tr / min pendant 10 min. le surnageant est écarté. Ensuite, 10µl du culot cellulaire sont déposés dans des puits creusés dans la gélose MRS. Les puits sont ensuite scellé avec de la gélose MRS molle.

Après incubation à 37 ° C pendant 24 h dans des conditions anaérobies, les boîtes de gélose MRS ont été recouvertes avec de la gélose BHIensemencée d'agents pathogènes. Après une autre incubation en conditions aérobies à 37°C pendant 24 heures, les boîtes sont examinées pour la présence de zone d'inhibition.

Pour évaluer la nature protéique de la substance antimicrobienne, les surnageant d'isolats, cultivés dans le bouillon MRS-C pendant 24 h, ont été concentrés sous vide. Une partie du surnageant a été neutralisée à pH 6,5. Les surnageant neutralisés et non neutralisés ont ensuite été déposé dans des puits séparés creusés dans des plaques de gélose molle BHIensemencées avec *K. rhizophila* ATCC 9341. La zone d'inhibition a été observée après 24 heures d'incubation à 37 °C.

3.5.6 L'activité de l'hydrolase des sels biliaires

L'activité de l'hydrolase des sels biliaires a été évaluée comme décrit par Archer et Halami. (2015). Les souches bactériennes ont étéensemencée sur Gélose MRS contenant 0,5 % d'acide taurodésoxycholique et 0,37 g/L de CaCl₂. L'activité d'hydrolase des sels biliaires est révélée par la formation des zones de précipitations après 72 h d'incubation.

3.5.7 La production d'exopolysaccharides

La capacité des isolats à utiliser différents sucres et polyols a été testés en utilisant des disques de sucre selon les instructions du fabricant. La capacité de production d'exopolysaccharides (EPS) des isolats a été évaluée par stries sur une boîte de gélose au rouge de ruthénium (Hong-pattarakere *et al.*, 2012).

Chapitre 4

Résultats et discussion

4 Résultats et discussion

4.1 Isolement et l'identification

Les huit isolats en forme bifide V ou Y et qui ont montré la présence de l'enzyme fructose 6 phosphocétolase (F6PPK) confirmant ainsi leur appartenance au genre *Bifidobacterium*, ont été identifiées à l'échelle de l'espèce par séquençage partiel de leur gène ; ADNr 16S, le gène *xfp* et le gène *hsp60*. Les séquences obtenues ont été analysées par BLAST et leur identité est confirmée.

Le séquençage a permis à identifier les 8 souches bactérienne comme *B. brève* 142, *B. longum* 20, *B. longum* 24, *B. longum* 50, *B. longum* 56, *B. longum* 815j, *B. longum* 815 000 et *B.bifidum* 96b. Les souches ont été déposées au sein du centre « National Collection of Industrial Microorganisms » sous les numéros *B. breve* NCIM5671, *B. longum* NCIM5700, *B. longum* NCIM5684, *B. longum* NCIM5685, *B. longum* NCIM5686, *B. longum* NCIM5672, *B. longum* NCIM5687 and *B. bifidum* NCIM5697, respectivement.

Les techniques moléculaires, RAPD et Rep-PCR ont été utilisé pour différencier entre les trois espèces identifiées et les souches de référence.

Les espèces de *B. longum*, ont montré un profil moléculaire similaire en utilisant la technique RADP toutefois, la technique Rep-PCR a permis de différencier entre toutes les souches de *B. longum* (figure 6).

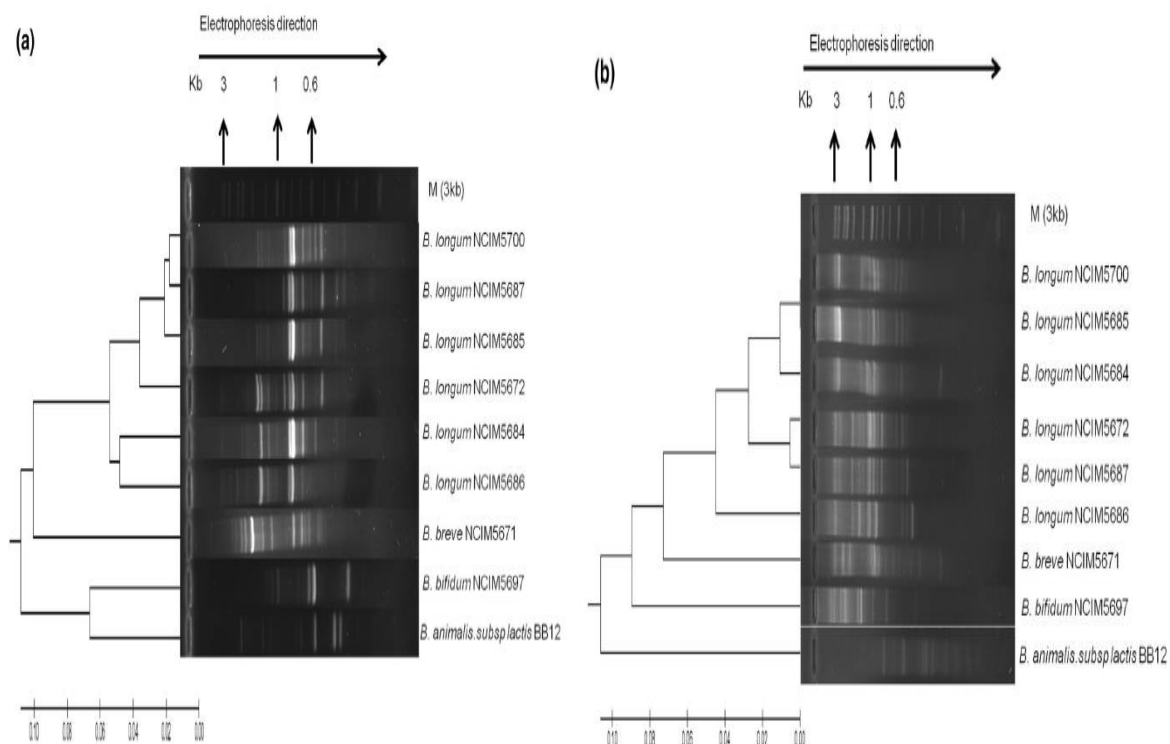


Figure 6 : Dendrogramme construit à l'aide du logiciel méga 5 utilisé le modèle UPMG A pour les scores binaires obtenus à partir de : **a-** Rep-PCR (GTG) 5 profil ; **b-** profil RAPD M13.

Les outils de typage moléculaire étaient performantes dans la différenciation entre les souches où la technique (GTG)5Rep-PCR a montré un pouvoir discriminatif mieux que la technique RADP tout en corroborant les résultats rapportés par (Křížová *et al.*, 2008 ; Jarocki *et al.*, 2016).

D'autre part peiroténe *et al.* (2017), ont été détectées des bifidobactéries cultivables dans 7 des échantillons du lait maternel et 10 à partir des selles des bébés, ont été obtenus 17 à partir du lait maternel et 30 dans les selles des nourrissons, donc seulement *B. breve*, *B. longum subsp. longum* et *B. longum subsp. infantis* étaient les espèces détectées dans le lait maternel mais on observe que les souches partagées trouvées appartenaient aux espèces *B. breve*, *B. longum subsp. longum* et *B. longum subsp. infantis*.

Awasti *et al.* (2016), Dans cette étude 12 isolats de *Bifidobacterium*, faisant partie du microbiote dominant du lait maternel et des fèces du nourrisson et de l'adulte.

Une étude menée par Zuo *et al.* (2015) sur les selles de nourrissons à permis d'identifier 5 espèces différentes qui avaient une homologie de 99% et plus avec les espèces *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. catenulatum* *B. pseudocatenulatum* et *B. bifidum* respectivement.

Nous remarquons plusieurs auteurs ont confirmé la présence de *Bifidobacterium* dans les selles des nourrissons allaités au lait maternel.

4.2 Les propriétés probiotiques fonctionnelle

Les 8 isolats identifiés de *bifidobacterium* sont caractérisés pour leur potentiel probiotique, à savoir la tolérance aux conditions du tractus gastro-intestinal (GIT), l'aspect sécuritaire et le pouvoir d'adhésion.

4.2.1 Tolérance aux acides et à la bile

Dans cette étude d'Achi et Halami (2019), les isolats se sont révélés sensibles aux conditions d'acides élevés (pH 2).

Parmi les isolats, les souches *B. breve* NCIM5671 a montré la haute résistance avec une réduction de 0.8 log seulement à pH 3 après 3 heures d'incubation. A pH 4 toutes les souches ont présentées une viabilité appréciable avec une diminution de viabilité de 0,7 -1,1 log au bout de 3 h. Il n'y avait qu'une perte marginale de viabilité à pH 5 après 3 h d'incubation.

Les résultats obtenus par Zuo *et al.* (2015) sont similaires à ceux précédemment signalés que la tolérance à un pH bas (2,5) était très variable entre les souches, mais toutes les souches ont montré une survie faible dans le suc gastrique simulé. Le groupe *B. catenulatum* *B. pseudocatenulatum* et les souches *B. breve* étaient plus sensibles aux pH bas après 1 h d'incubation.

Par contre, Mahmoudi *et al.* (2013) ont trouvé que la croissance des souches a été complètement inhibée à pH 4. La croissance optimale est obtenue dans le milieu à pH 6,5.

Hadadji *et al.* (2005) trouvé que dans le pH 5 les souches B3, B2 et B6 ont une phase de latence de croissance après 2h d'incubation, absente dans B1 et Bif5. Le maximum de croissance est obtenu après 8 h d'incubation.

On remarque dans les résultats de Kim *et al.* (2020) toutes les souches des bifidobactéries isolées ont montré une survie faible aux pH 3 et 4 après 3 h d'incubation avec une perte de 5.6 à 6.4 log.

Les conditions gastro-intestinales sont considérés comme l'un des principaux critères de sélection des probiotiques. Les bifidobactéries sont généralement considérées comme faiblement tolérantes aux acides (Munoz-Quezada *et al.*, 2013 ; Toscano *et al.*, 2015).

D'après nos résultats, les isolats se sont avérés moins sensibles aux sels biliaires par rapport aux conditions acides avec une diminution mineure de viabilité après 3 h d'exposition. *B. longum* NCIM5672 a montré une meilleure tolérance avec une réduction de 0,02 log seulement de viabilité.

Cependant, les espèces de bifidobactéries isolées par Zuo *et al.*, (2015), ont montré une sensibilité élevée aux sels biliaires. Les taux de survie après incubation pendant une heure en présence de la bile étaient inférieurs à 0,0001% pour tous les isolats. Cette divergence de résultat du probablement aux différentes techniques utilisées pour étudier la tolérance à la bile.

Les résultats de Arboleya *et al.* (2011) montre que les pourcentages de survie après exposition pendant 180 min au jus biliaire étaient inférieurs à 1 % pour toutes les souches testées. *B. longum* IPLA20003 a montré le taux de survie le plus élevé avec 0,84% alors que la souche de référence *B. lactis* Bb12 n'a survécu qu'à 0,0004% après provocation par le jus biliaire.

Une autre étude réalisée par Alp et Aslim, (2010) ont indiqué que toutes les concentrations de sels biliaires (0,15 et 0,3 %) ont affecté *Bifidobacterium spp.* Mais les sels biliaires à la concentration (0,15 %) plus faiblement touché que les autres concentrations (0,15 et 0,3 %).

Donc les propriétés principale des probiotiques en tant que compléments fonctionnels est leur tolérance au stress digestif. Les bactéries probiotiques doivent survivre et s'installer à l'épithélium du tractus intestinal (kim *et al.*, 2020).

4.2.1 Évaluation de la pathogénicité et de la sécurité

4.2.1.1 L'activité hémolytique et la production d'amine biogène

Nous remarquons que tous les isolats se sont révélés négatifs pour l'activité hémolytique et la production d'amine biogène à partir de la lysine, de l'histidine et de l'ornithine.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux précédemment signalés par Kim *et al.* (2018), où la souche *B. bifidum* BGN4 et *B. longum* BORI n'ont montré aucune activité hémolytique.

Toutefois, ces deux dernières souches pour la production d'amine biogène n'ont pas produit la cadavérine, histamine ou tyramine. Cependant, ils produisaient respectivement de la putrescine.

Les résultats obtenus par Kim *et al.* (2018) sont similaires à ceux mentionnés précédemment dans lesquels ont trouvé que les souches *B. bifidum* BGN4 et *B. longum* BORI n'ont montré aucune hémolyse, et pour la production d'amine biogène ils produisaient seulement la putrescine.

Par contre le résultat de Kim *et al.* (2020) a indiqué que quatre souches probiotiques ont présenté une γ -hémolyse après 48 h d'incubation sur gélose au sang. Donc l'hémolyse reste le principal facteur de virulence de bactéries pathogènes.

4.2.1.2 La résistance aux antibiotiques

En étudiant la résistance des isolats à l'encontre de 23 antibiotiques différents, tous les isolats se sont révélés sensibles aux antibiotiques testés, à l'exception de l'isépamicine où également les 2 souches probiotiques *B. animalis* subsp. *B. Lactis* Bb12 ont présentait une résistance .

Les souches de bifidobactéries isolées par Zuo, *et al.*, (2015) à partir de fèces de nourrissons ont été trouvées sensibilise envers l'ampicilline et au chloramphénicol. Toutefois, toutes les souches identifiées ainsi que la souche de référence *B. lactis* Bb12 ont montré une résistance à la kanamycine, à la streptomycine et à la vancomycine

Kim *et al.* (2020) testant l'antibioristance de 3 souches de référence à savoir *B. breve* MG729 et *B. animalis* subsp. *B. lactis* MG741, ont montré que toutes les souches sont sensibles à l'ampicilline, l'érythromycine et à la clindamycine. Néanmoins, *B. breve* MG729 était résistante à la tétracycline et *B. animalis* subsp. *B. lactis* MG741 étaient résistantes à la gentamicine et à la streptomycine.

4.2.2 Adhésion aux cellules Caco-2

Dans notre étude tous les isolats se sont avérés capable d'adhérer aux lignées cellulaires Caco-2 et le pourcentage d'adhésion variait parmi les isolats avec un maximum de 77% pour *B. bifidum* NCIM5697 suivi de *B. longum* NCIM5672 (Figure 7).

D'autre part, Zuo *et al.* (2015) ont constaté que les souches ne présentent pas des capacités d'adhésion similaires à ceux trouvé par nos résultats bien que les souches appartiennent au même genre. La souche *B. bifidum* IF3-211 a montré une adhésion significativement plus élevée aux cellules Caco-2.

L'adhésion des bactéries probiotiques aux cellules épithéliales intestinales est importante car elle contribue à la colonisation, aux interactions hôte-microbe, à l'immun-modulation, à l'inhibition de l'adhésion des agents pathogènes par compétition de site et au maintien de l'homéostasie intestinale (Serafini *et al.*, 2013; Papadimitriou *et al.*, 2015).

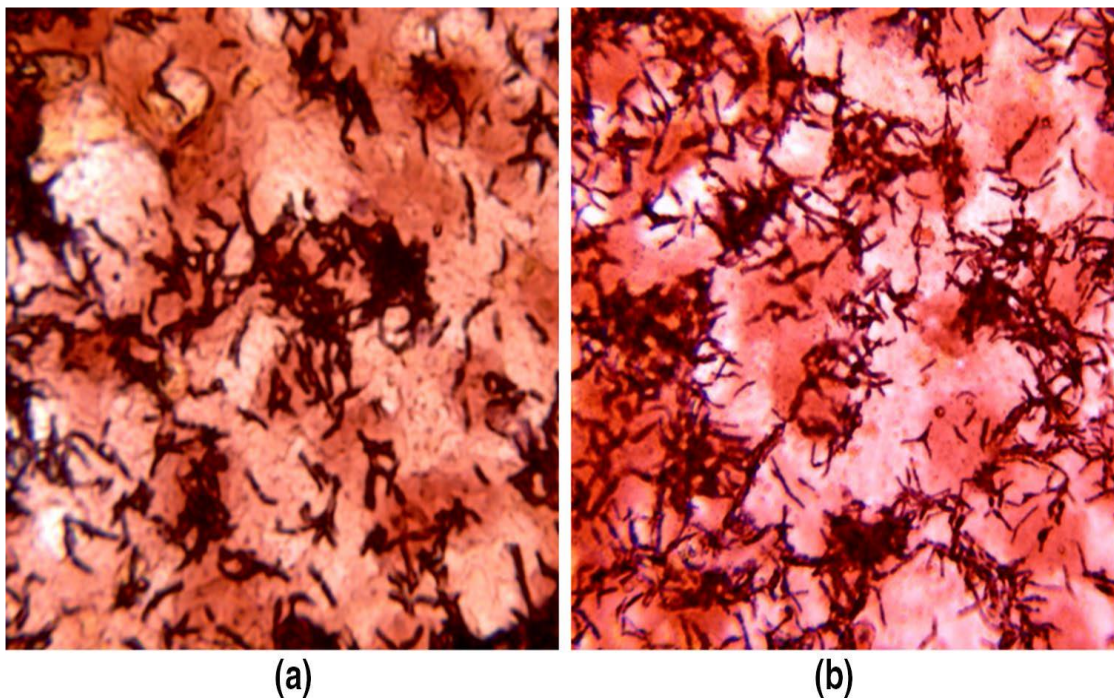


Figure 7: Image représentative de l'adhésion bifidobactérienne à la lignée cellulaire Caco2 : (a) *B. longum* NCIM5672, (b) *B. bifidum* NCIM5697.

4.2.3 Caractérisation moléculaire des gènes marqueurs probiotiques

La présence de gènes marqueurs associés à l'adhésion a été vérifiée parmi les isolats. En conséquence, dans le cas de *fimA*, tous les isolats de *B. longum* se sont avérés avoir la taille d'amplicon souhaitée de 1405 pb, à l'exception de *B. longum* NCIM5686.

De même, *B. breve* NCIM5671 et *B. bifidum* NCIM5697 ont également confirmé la présence du gène *fimA* avec une taille d'amplicon de 1546 pb. L'amplification par PCR du gène *fimP* dans le cas de *B. bifidum* NCIM5697 a donné une taille de produit de 1470 pb révélant la présence de *fimP* dans l'isolat.

Cependant, la présence de la sous-unité majeure du pili 2 a également été détectée dans le cas de *B. longum* NCIM5684 et *B. longum* NCIM5686.

Ces isolats ont également été vérifiés pour la présence du gène de la serpine. Tous les isolats ont été testés positifs, comme en témoigne l'amplicon PCR de 1349 pb, à l'exception de *B. bifidum* NCIM5697.

Des amorces spécifiques ciblant les gènes serpine ont confirmées leurs présences dans tous les isolats de *bifidobacterium*, à l'exception de *B. bifidum* NCIM5697. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Turrone *et al.*, 2010).

On remarque dans les résultats de Foroni *et al.* (2011) diverses souches bifidobactériennes appartenant à *B. bifidum*, *B. longum subsp. longum*, *B. dentium*, *B. adolescentis* et *B. animalis subsp. lactis* a révélé l'existence d'appendices ressemblant à des structures en forme de pilus. Fait intéressant, ces micro-organismes abritent deux à six groupes de gènes pilus prédits dans leur génome, chacun étant organisé en un opéron englobant le gène codant pour la sous-unité principale de la piline (désigné fimA ou fimP) avec un ou deux gènes mineurs codant pour la sous-unité piline (appelés fimB et/ou fimQ) .

Une étude génomique comparative de Bottacini *et al.* (2014) a révélé une variation du nombre de SDP dans *B. breve*. Cependant, la variation de ces gènes et leur profusion peuvent déterminer la composition du microbiote intestinal (Chaplin *et al.*, 2015).

4.2.4 L'activité antibactérienne

Les résultats ont montré que tous les isolats possèdent une activité contre les bactéries pathogène (*K. rhizophila* ATCC 9341, *L. monocytogenes* ScottA, *S. aureus* FRI1722, *Y. enterocolitica* MTCC 859 et *B. cereus* F4433). L'Activité contre *E. coli* MTCC118 était variable avec *B. breve* NCIM5671 et *B. longum* NCIM5700 ne montrant aucune activité. Les surnageants étaient dépourvus d'activité après la neutralisation indiquant que l'activité pourrait être due à la production d'acides organiques (Achim et Halami., 2019).

Zuo *et al.* (2015) ont rapporté que les surnageants de toutes les souches de *Bifidobacterium* sélectionnées ont inhibé la souche pathogène d'origine alimentaire *Salmonella enterica* ATCC13076 alors que les surnageants de *B. adolescentis* et *B. breve* ont faiblement inhibé *E. coli* et *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

Une autre étude réalisée par Eshaghi *et al.* (2017) ont montré que tous les isolats portaient des activités antipathogènes. Aucune différence significative dans l'activité des isolats n'a été trouvée indépendamment de l'origine de l'isolement et des espèces de bifidobactéries. La

neutralisation des surnageants après traitement avec la protéinase K a entraîné l'élimination des zones d'inhibition, suggérant, en partie, la nature protéique de l'activité antibactérienne.

4.2.5 L'activité d'hydrolase des sels biliaires

Dans cette étude tous les isolats aient montré une activité d'hydrolase des sels biliaires, en présentant des zones de précipitation à l'exception de *B. bifidum* NCIM5697 et *B. longum* NCIM5700.

Zuo *et al.* (2015) ont également enregistré des résultats similaires, où les souches ont montré une activité hydrolase de sel biliaire présenté par un halo de précipitation des sels biliaires déconjugés.

D'après les travaux d'Awasti *et al.* (2016), Il est évident les données que seuls 5 des 12 isolats ont montré une forte d'activité BSH, comme indiqué par une précipitation dense de taurocholate de sodium et de tauroglycolique de sodium, tandis que les 8 autres isolats ont montré des niveaux modérés d'activité BSH. Selon les résultats obtenus l'activité BSH élevée à modérée a été observée pour tous les isolats de bifidobactéries testés.

4.2.6 Production d'exopolysaccharides

Les résultats ont révélé que la souche *B. breve* NCIM5671 utiliser le sucre mieux que les autres isolats et *B. bifidum* NCIM5697 s'est avéré pauvre en sucre .

kusharyati *et al.* 2020 ont rapporté que le groupe de bactéries qui produit des EPS, par exemple les bifidobactéries spp, possédant le potentiel d'être un agent probiotique.

Ont montré que le rendement le plus élevé en EPS a été réalisé par les isolats Bb1A, tandis que les plus faibles étaient les isolats Bb1F et Bb2C.

L'étude menée par Alp et Aslim (2010) trouvés certaines souches de de *B. breve* A28 et *B. breve* S4 a une production élevées d'EPS et des niveaux faible de production d'EPS ont été trouvés dans *B. bifidum* A10 et *B. breve* S9 ont été déterminés parmi 31 *Bifidobacterium* spp.

Conclusion

Conclusion

En conclusion, *Bifidobacterium* est un habitant naturel du système gastro-intestinal humain et certaines espèces ayant des activités probiotiques. Dans cette étude nous avons réalisé une évaluation du potentiel probiotique de *bifidobactérium* isolés à partir des selles de nourrisson.

L'objectif du travail s'est porté sur l'isolement et la comparaison des propriétés probiotiques et fonctionnelles des isolats de bifidobactéries afin de comprendre leur potentielle d'utilisation comme probiotique. Le travail étudie également la présence et la diversité de gènes liés à l'adhésion et à l'immunomodulation pour la sélection de bifidobactéries probiotiques.

L'identification génotypique des 8 isolats a montré qu'elles appartiennent à les espèces : *B. longume* (NCIM5672, NCIM5684, NCIM5685, NCIM5686, NCI M5687 et NCIM5700), *B. breve* NCIM5671 et *B. bifidum* NCIM5697.

Toutes les 8 souches ont présentées qu'elles possèdent des caractères probiotique et fonctionnel et un aspect sécuritaire, cependant *B. breve* NCIM5671 a montré une meilleur tolérance aux pH bas et produisant des exopolysaccharides. *B. bifidum* NCIM5697 et *B. longum* NCIM5672 ont démontré une grande capacité d'adhésion aux cellules Caco-2. Egalement, *B. bifidum* NCIM5697 a annoncé une capacité de produire des EPS tandis que la souche *B. longum* NCIM5672 possède la meilleure activité antibactérienne.

Ces présent résultats ont montrés des attributs promoteur et par conséquent peuvent être considérer dans la formulation des aliments fonctionnel.

Bibliographie

Bibliographie

Achi S.C., Halami P.M. 2019. In vitro comparative analysis of probiotic and functional attributes of indigenous isolates of bifidobacteria. *Current microbiology*, 76(3), 304-311.

Ait Abdeslam A. 2008. Etude de croissance de *Bifidobacterium sp.* Dans le de brebis. Mémoire de magister, Université d'Oran, Es-Sénia, p.7.

Ait Belgnaoui A. 2006. Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress: rôle de la barrière épithéliale colique. thèse de doctorat, Ecole doctorale :Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, 153 p.

Alp G., Aslim B. 2010. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium spp.* isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 16(2), 101-105.

Ammor M. S., Flórez A. B., Mayo B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food microbiology*, 24(6), 559-570.

Amrouche T. 2005. Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries: analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires. Thèse de doctorat, l'Université Laval, 155p.

Angelo S. 2015. Contribution à l'étude des agrégats bifides : sélection, caractérisation, mécanisme et prévention du diabète de type 1. These de doctorat, Université Lille de France, pp.29-37.

Arboleya S., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Solís G., Salminen S., Clara G., Gueimonde M. 2011. Caractérisation et propriétés in vitro de souches de *Bifidobacterium* potentiellement

probiotiques isolées du lait maternel. *Journal international de microbiologie alimentaire*, 149 (1), 28-36.

Archer A. C., Halami P. M 2015. Probiotic attributes of *Lactobacillus fermentum* isolated from human feces and dairy products. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:8113–8123.

Awasti N., Tomar S. K., Pophaly S. D., Lule, V. K., Singh T. P., Anand S. 2016. Probiotic and functional characterization of bifidobacteria of Indian human origin. *Journal of applied microbiology*, 120(4), 1021

Baffoni L., Stenico V., Strahsburger E., Gaggia F., Di Gioia D., Modesto M., Mattarelli P., Biavati B. 2013. Identification d'espèces appartenant au genre *Bifidobacterium* par analyse PCR-RFLP d'un fragment de gène hsp60. *Microbiologie BMC*, 13 (1), 1-9

Bahri F. 2014. Isolment et caractérisation des souches de lactobacilles à caractères probiotiques à partir de selles d'enfants. Thèse de doctorat. Université Constantine I, p24.

Bahloul H. A. 2010. Caractérisation technologique des bifidobactéries à intérêt thérapeutique. Thèse de magister. Université d'Oran, Es-Senia, 16-29.

Bahloul H. A. 2019. Caractérisation technologique des bifidobactéries isolées de différents écosystèmes. Thèse de doctorat d'état. Université d'Oran p.25.

Beaugerie L, Sokol H 2014. *Les fondamentaux de la pathologie digestive*, CDU-HGE edn. France: Elsevier-Masson.

Benkaddour B. 2013. Caractérisation des bifidobactéries isolées des selles des nourrissons et leur viabilité dans le lait de chèvre stérile : microbiologie fondamentale et appliquée. Mémoire de magister, université d'Oran Es Senia. P.33.

Berkes E., Liao Y. H., Neef D., Grandalski M., Monsul N. 2019. Potentiated *In Vitro* Probiotic Activities of *Lactobacillus fermentum* LfQ16 Biofilm Biomass Versus Planktonic Culture. 12:1097–1114 p.

Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol*, 50:117-131.

Biavati B., Mattarelli P. 2015. *Bifidobacterium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–57.

Bottacini F., Motherway MOC., Kuczynski J., O'Connell K.J., Serafini F., Duranti S., Milani C., Turrone F., Lugli G.A, Zomer A. 2014. Comparative genomics of the *Bifidobacterium breve* taxon. *BMC Genomics* 15:170.

Bover-Cid S., Holzapfel W. H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 53:33–41.

Bruno E. 2012. Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la Fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne, France, pp. 33-34 .

Camile R. 2014. Interets du microbiote intestinale et probiotiques. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Toulouse III paul sabatier. Faculte des sciences pharmaceutiques. 77p.

Carmona B. 2016. Les probiotiques (bactéries et levures): où en est-on aujourd'hui? (Doctoral dissertation, Université de Montpellier). Thèse de doctorat. Université DE Montpellier, 89p.

Chaplin A. V., Efimov B. A., Smeianov V. V., Kafarskaia L. I., Pikina A. P., Shkoporov A. N. 2015. Intraspecies genomic diversity and long-term persistence of *Bifidobacterium longum*. *PloS one*, 10(8), e0135658.

Coudeyras S., Forstier C., 2010. Microbiote et probiotiques : impact en santé humaine. *Microbiol.56* : pp.611-650.

Debeyer C., 2020. Les probiotiques dans la prise en charge d'affections gastro-intestinales et vaginales .Thèse de doctorat. Université de Lille, 89 p.

Delcenserie V., China B., Gavini F., Beerens H., Daube G. 2002. Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments: le genre *Bifidobacterium*. *Ann Méd Vét*, 146 :279-293.

Devi S. M., Archer A.C., Halami P. M. 2015. Screening, characterization and *in vitro* evaluation of probiotic properties among lactic acid bacteria through comparative analysis. *Probiotics Antimicrob Proteins* 7:181–192.

Djellid Y. 2015. Etude comparative des propriétés technologiques et probiotiques des souches de bifidobactéries indigènes et celles utilisées en industrie laitière. Mémoire de magister. Université d'Oran1, p. 31.

Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Charles D., Kiely B., O'Sullivan G. C., Shanahan F., Collins J. K. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr* (73): 392 p.

Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. 2005. Diversity of the human microbial flora. *Science*.308:1635-1638

Eshaghi M., Bibalan M.H., Rohani M., Esghaei M., Douraghi M., Talebi, M. et Pourshafie M.R. 2017. *Bifidobacterium* obtained from mother's milk and their infant stool; a comparative genotyping and antibacterial analysis. *Microbial pathogenesis*,111, pp.94-98.

FAO–WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group, London, Ontario.

Filleron A., Jumas-Bilak E. 2015. Implantation du microbiote intestinal chez l'enfant: ontogenèse d'une niche écologique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2015(469), 27-35.

Foroni E., Serafini F., Amidani D., Turrone F., He F, Bottacini F., Motherway M.O.C., Viappiani A., Zhang Z., Rivetti C. 2011. Genetic analysis and morphological identification of pilus-like Fact. Structures in members of the genus *Bifidobacterium*. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 10, No. 1, pp. 1-13). BioMed Central.

Guediche M. N. 1990. Colonisation bactérienne du nouveau-né et infection. *Médecine du Maghreb* : n°22, pp.25-27.

Hadadji M., Benama R., Saidi N., Henni D. E., Kihal M. 2005. Identification of cultivable *Bifidobacterium* species isolated from breast-fed infants feces in West-Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 4(5), 422-430.

Hadadji M. 2007. Caractérisation technologique des bifidobactéries à thérapeutiques. Thèse de doctorat d'état. Université d'Oran. Algérie. 173p.

Holzappel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J. H. J., 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85-101.

Hopkins M. J., Sharp R., Macfarlane G. T., 2002. Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and Liver Diseases*, 34, 12-18.

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

Isolauri E., Salminen S., Ouwehand A. C., 2004. Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18, 299-313.

Jarocki P., Podleśny M., Komoń-Janczara E., Kucharska J., Glibowska A., Targoński Z. 2016. Comparison of various molecular methods for rapid differentiation of intestinal bifidobacteria at the species, subspecies and strain level. *BMC microbiology*, 16(1), 1-11.

Kim H., Kim J. S., Kim Y., Jeong Y., Kim J. E., Paek N. S., Kang C. H. 2020. Antioxidant and Probiotic Properties of Lactobacilli and Bifidobacteria of Human Origins. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 25(3), 421-430.

- Kouame –Sina S. M. 2013. Contribution a la gestion des risques de contamination microbienne et diversité géotypique des espèces du genre *Bifidobacterium* isolées de la chaîne de production du lait local à Abidjan. Thèse de doctorat, Université Nangui Abrogoua, pp 36-37.
- Křížová, J., Španová, A., & Rittich, B. 2008. RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species. *Folia microbiologica*, 53(2), 99.
- Lebeer S., Vanderleyden J., Keersmaecker S.C.J. 2008 . Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action . *Microbiol Mol Biol Rev* 72 : 728-764.
- Kusharyati D. F., Pramono, H., Ryandini D., Manshur T. A., Dewi M.A., Khatimah, K., Rovik A. 2020. *Bifidobacterium* from infant stool: the diversity and potential screening. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(6).
- Lee J. H., O'Sullivan D.J. 2010. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 74(3), 378-416.
- Lilly D. M., Stillwell R.H. 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748.
- Lugli G. A., Milani C., Turrone F., Duranti S., Mancabelli L., Mangifesta M., Ferrario C., Modesto M., Mattarelli P., Jiří K., Sinderen D., Ventura M. 2017. Comparative genomic and phylogenomic analyses of the *Bifidobacteriaceae* family. *BMC genomics*, 18(1), 1-15.
- Mahmoudi F., Miloud, H., Bettache G., Mebrouk K. 2013. Identification and physiological properties of *Bifidobacterium* strains isolated from different origin. *Journal of Food Science and Engineering*, 3(4), 196.
- Mahmoudi F. 2014. Les substances antimicrobiennes produites par les *Bifidobactérium* et leurs effets sur les bactéries entéropathogènes. Thèse de doctorat d'état. Université d'Oran, 135p.
- Masco L., Van Hoorde K., De Brandt E., Swings J., Huys G. 2006. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(1), 85-94.

Medjaoui I., 2018. Contribution à la caractérisation moléculaire de la flore du lait maternel et selles des nouveau-nés de la population de l'ouest algérien : biologie, génétique moléculaire et cellulaire. Thèse de doctorat, université mohamed boudiaf. Oran, pp. 5-16

Mehdi Kh .2016. Sélection des bifidobactéries à caractères probiotique pour la fermentation du lait en culture mixte et évaluation de leurs viabilités. Thèse de doctorat d'état. Université d'Oran, p 76.

Muñoz-Quezada S., Chenoll E., Vieites J.M., Bermúdez-Brito SM., Gomez-Llorente C., Matencio E., Bernal MJ., Romero F., Suárez A., Ramón D., Gil A. 2013. Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCMI-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *British journal of nutrition*, 109(S2), S51-S62.

Ouwehand A. C., Vesterlund S., 2003. Health aspects of probiotics. *Drugs*, 6, 573-580.

Papadimitriou K., Zoumpopoulou G., Foligné B., Alexandraki V., Kazou M., Pot B., Tsakalidou, E. 2015. Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Frontiers in microbiology*, 6, 58.

Peirotén, A., Arqués, J. L., Medina, M., & Rodríguez-Mínguez, E. 2018. Bifidobacterial strains shared by mother and child as source of probiotics. *Beneficial microbes*, 9(2), 231-238.

Pokusaeva K., Fitzgerald G.F., Van Sinderen., D. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr.* 6, 285–306.

Prasanna P. H. P., Grandison A.S., Charalampopoulos., D. 2014. Bifidobacteria in Milk Products: An Overview of Physiological and Biochemical Properties, Exopolysaccharide Production, Selection Criteria of Milk Products and Health Benefits. *Food Research International*, 55, 247–262.

- Rodríguez, E., Arqués, J. L., Rodríguez, R., Peirotén, Á., Landete, J. M., Medina, M. 2012. Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 542-551.
- Serafini F, Strati F, Ruas-Madiedo P, Turróni F, Foroni E, Duranti S, Milano F, Perotti A, Viappiani A, Guglielmetti S. 2013. Evaluation of adhesion properties and antibacterial activities of the infant gut commensal *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. *Anaerobe* 21:9–17.
- Scholtens P. A., Oozeer R., Martin R., Amor K. B., Knol J. 2012. The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annual review of food science and technology*, 3, 425-447.
- Toscano M., De Vecchi E., Gabrieli A., Zuccotti G. V., Drago L. 2015. Probiotic characteristics and *in vitro* compatibility of a combination of *Bifidobacterium breve* M-16 V, *Bifidobacterium longum subsp. infantis* M-63 and *Bifidobacterium longum subsp. longum* BB536. *Annals of microbiology*, 65(2), 1079-1086.
- Turróni F., Sinderen D V., Ventura M. 2010. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* 149 37–44.
- Zhang D., Zhang S., Guidesi E., Zonenschain D., Sagheddu V., Lee S., Yoon Lim Ch., Elli M. 2018. Isolation and characterization of new probiotic strains from Chinese babies. *Journal of clinical gastroenterology*, 52, S27-S34.
- Zerrouki M H. 2012. Effets des Antibiotiques Commercialisés en Algérie sur la Croissance des Bifidobactéries. Mémoire de magistère. Université d’Oran1, pp. 16-18.
- Zinedine A., Faïd M. 2007. Isolation and characterization of strains of bifidobacteria with probiotic proprieties *in vitro*. *World J Dairy Food Sci* 2(1):28–34.
- Zuo F., Yu R., Feng X., Chen L., Zeng Z., Khaskheli G.B., Ma H., Chen S. 2015. Characterization and *in vitro* properties of potential probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-fed infant feces. *Annals of Microbiology*, 66(3), p. 1027–1037.

Annexe

Annexe

Annexe 1 les articles inclus dans la partie expérimentale

Achi S. C., Halami P. M. 2019. *In vitro* comparative analysis of probiotic and functional attributes of indigenous isolates of bifidobacteria. *Current microbiology*, 76(3), 304-311.

Alp G., Aslim B. 2010. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium spp.* isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 16(2), 101-105.

Arboleya S., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Solís G., Salminen S., Clara, G., Gueimonde, M. 2011. Caractérisation et propriétés *in vitro* de souches de *Bifidobacterium* potentiellement probiotiques isolées du lait maternel. *Journal international de microbiologie alimentaire*, 149 (1), 28-36.

Awasti N., Tomar S. K., Pophaly S. D., Lule, V. K., Singh T. P., Anand S. 2016. Probiotic and functional characterization of bifidobacteria of Indian human origin. *Journal of applied microbiology*, 120(4), 1021.

Bottacini F., Motherway MOC., Kuczynski J., O'Connell K.J., Serafini F., Duranti S., Milani C., Turrone F., Lugli G.A, Zomer A. 2014. Comparative genomics of the *Bifidobacterium breve* taxon. *BMC Genomics* 15:170.

Chaplin A. V., Efimov B. A., Smeianov V. V., Kafarskaia L. I., Pikina A. P., Shkoporov A. N. 2015. Intraspecies genomic diversity and long-term persistence of *Bifidobacterium longum*. *PloS one*, 10(8), e0135658.

Eshaghi M., Bibalan M.H., Rohani M., Esghaei M., Douraghi M., Talebi, M. et Pourshafie M.R. 2017. *Bifidobacterium* obtained from mother's milk and their infant stool; a comparative genotyping and antibacterial analysis. *Microbial pathogenesis*, 111, pp.94-98.

Froni E., Serafini F., Amidani D., Turrone F., He F, Bottacini F., Motherway M.O.C., Viappiani A., Zhang Z., Rivetti C. 2011. Genetic analysis and morphological identification of pilus like

structures in members of the genus *Bifidobacterium*. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 10, No. 1, pp. 1-13). BioMed Central.

Jarocki P., Podleśny M., Komoń-Janczara E., Kucharska J., Glibowska A., Targoński Z. 2016. Comparison of various molecular methods for rapid differentiation of intestinal bifidobacteria at the species, subspecies and strain level. *BMC microbiology*, 16(1), 1-11.

Hadadji M., Benama R., Saidi N., Henni D. E., Kihal, M. 2005. Identification of cultivable *Bifidobacterium* species isolated from breast-fed infants feces in West-Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 4(5), 422-430.

Křížová J., Španová A., Rittich B. 2008. RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species. *Folia microbiologica*, 53(2), 99.

Kusharyati D. F., Pramono H., Ryandini D., Manshur T. A., Dewi M.A., Khatimah K., Rovik A. 2020. *Bifidobacterium* from infant stool: the diversity and potential screening. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(6).

Kim H., Kim J. S., Kim Y., Jeong Y., Kim J. E., Paek N. S., Kang, C. H. 2020. Antioxidant and Probiotic Properties of Lactobacilli and Bifidobacteria of Human Origins. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 25(3), 421-430.

Kim M.J., Ku S., Kim S.Y., Lee H.H., Jin H., Kang S., Li R., Johnston T.V., Park M.S., Ji, G. E. 2018. Safety evaluations of *Bifidobacterium bifidum* BGN4 and *Bifidobacterium longum* BORI. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1422.

Mahmoudi F., Miloud, H., Bettache G., Mebrouk K. 2013. Identification and physiological properties of *Bifidobacterium* strains isolated from different origin. *Journal of Food Science and Engineering*, 3(4), 196.

Muñoz-Quezada S., Chenoll E., Vieites J.M., Bermúdez-Brito SM., Gomez-Llorente C., Matencio E., Bernal MJ., Romero F., Suárez A., Ramón D., Gil A. 2013. Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCMI-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *British journal of nutrition*, 109(S2), S51-S62.

Papadimitriou K., Zoumpopoulou G., Foligné B., Alexandraki V., Kazou M., Pot B., Tsakalidou, E. 2015. Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Frontiers in microbiology*, 6, 58.

Peirotén A., Arqués, J. L., Medina M., Rodríguez-Mínguez, E. 2018. Bifidobacterial strains shared by mother and child as source of probiotics. *Beneficial microbes*, 9(2), 231-238.

Serafini F, Strati F, Ruas-Madiedo P, Turróni F, Foroni E, Duranti S, Milano F, Perotti A, Viappiani A, Guglielmetti S. 2013. Evaluation of adhesion properties and antibacterial activities of the infant gut commensal *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. *Anaerobe* 21:9–17.

Toscano M., De Vecchi E., Gabrieli A., Zuccotti G. V., Drago L. 2015. Probiotic characteristics and *in vitro* compatibility of a combination of *Bifidobacterium breve* M-16 V, *Bifidobacterium longum subsp. infantis* M-63 and *Bifidobacterium longum subsp. longum* BB536. *Annals of microbiology*, 65(2), 1079-1086.

Turróni F., Sinderen D V., Ventura M. 2010. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* 149 37–44.

Zuo F., Yu R., Feng X., Chen L., Zeng Z., Khaskheli G.B., Ma H., Chen S. 2015. Characterization and *in vitro* properties of potential probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-fed infant feces. *Annals of Microbiology*, 66(3), p. 1027–1037.

Résumés

Dans cadre d'étudier les caractères probiotiques de souches de bifidobactéries. Huit souches de *Bifidobacterium* ont été isolées puis identifiées à partir des selles de nourrissons. Les caractéristiques probiotiques et fonctionnelles ainsi leur aspect sécuritaire est étudié.

L'identification a montré que les souches de bifidobactéries isolées appartiennent aux espèces suivantes : *B. longum*, *B. bifidum* et *B. breve*. Les souches ont survécu à des conditions acides supérieures à pH 3 et présence de la bile 0,3%. Egalement les souches ont montré une bonne adhésion qui a varié parmi les isolats avec un maximum de 77% pour *B. bifidum* NCIM5697 suivi de *B. longum* NCIM5672. La souche *B. bifidum* NCIM5697 a annoncé une capacité de produire des EPS tandis que la souche *B. longum* NCIM5672 a déclaré la melliuer activité antibactérienne.

D'une façon générale les huit souches ont déclaré qu'elles possèdent des caractères probiotique où les trois souches *B. breve* NCIM5671, *B. longum* NCIM5672 et *B. bifidum* NCIM5697 particulièrement ont montré les meilleurs résultats.

Mots lé : *Bifidobacterium*, microbiote intestinale, probiotiques, selles de nourrissons, Caractérisation.

As part of studying the probiotic characteristics of strains of bifidobacteria. Eight strains of *Bifidobacterium* were isolated and then identified from the stools of infants. The probiotic and functional characteristics and their safety aspect is studied.

Identification showed that the isolated bifidobacteria strains belong to the following species: *B. longum*, *B. bifidum* and *B. breve*. The strains survived acidic conditions above pH 3 and presence of 0.3% bile. In addition, the strains showed good adhesion which varied among the isolates with a maximum of 77% for *B. bifidum* NCIM5697 followed by *B. longum* NCIM5672. The *B. bifidum* NCIM5697 strain reported an ability to produce EPS while the *B. longum* NCIM5672 strain reported improved antibacterial activity.

Overall, the eight strains stated that they possess probiotic traits where the three strains *B. breve* NCIM5671, *B. longum* NCIM5672 and *B. bifidum* NCIM5697 in particular showed the best results.

Keywords: *Bifidobacterium*, intestinal microbiota, probiotics, infant stools, Characterization.

كجزء من دراسة خصائص الكائنات الحية المجهرية لسلاسل البيفيدوباكتريريا تم عزل ثماني سلالات من *Bifidobacterium* من براز الرضع ثم تم التعرف عليها. تمت دراسة الخصائص البروبيوتيك والخصائص الوظيفية وجانب سلامتها. أظهر التعرف على أن سلالات البيفيدوباكتريريا المعزولة انها تنتمي إلى الأنواع التالية: *B. longum* و *B. bifidum* و *B. breve*. نجت السلالات من الظروف الحمضية فوق الرقم الهيدروجيني 3 وظروف الصفراء 0.3%. كما أظهرت السلالات نسبة التصاق جيدة ومختلفة بين العزلات بحد أقصى 77% ل *B. bifidum* NCIM5697 تليها *B. longum* NCIM5672. أبلغت سلالة *B. bifidum* NCIM5697 عن قدرتها على إنتاج متعدد السكر الخارجي، بينما أبلغت سلالة *B. longum* NCIM5672 عن تحسن في النشاط المضاد للبكتيريا. بشكل عام، ذكرت السلالات الثمانية أنها تمتلك سمات بروبيوتيك حيث أظهرت السلالات الثلاثة *B. longum* و *B. breve* NCIM5671 و *B. bifidum* NCIM5697 أفضل النتائج على وجه الخصوص. الكلمات المفتاحية: *Bifidobacterium*, التهاب الجراثيم المعوي، البروبيوتيك، براز الأطفال، Caractérisation.