



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 ..... / 2023

# MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

---

Présenté et soutenu par :

**BELMEHDI Imane**                      **REZEG Zahrat el amel**

Le: lundi 3 juillet 2023

## L'effet probiotique des bactéries lactiques d'origine humaine

---

### Jury :

M.	BELOUCIF Nacer	MCA	Université de Biskra	Président
M.	BENKADDOUR Bachir	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	DJOUAMAA Manal	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2022 - 2023

# Remerciements

Tout d'abord nous voudrions remercier « **ALLAH** » le Tout-Puissant de nous avoir donné la patience, la volonté et la force pour accomplir ce travail.

**Mr. BENKADDOUR Bachir.** Pour son encadrement attentif et ses conseils éclairés. Sa disponibilité et son expertise nous ont permis d'enrichir grandement notre travail et de bénéficier de ses connaissances.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude aux membres du jury, pour avoir accepté de consacrer leur temps et leurs compétences à l'évaluation de notre mémoire. Leurs commentaires et suggestions ont été d'une aide précieuse pour améliorer la qualité de notre travail.

Notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'atteinte de notre objectif.

# Dédicace

Grâce à Dieu. Je tiens à dédier ce mémoire de Master :

À moi-même, pour avoir persévéré et surmonté les obstacles qui se sont dressés sur mon chemin. Ce mémoire est le fruit de mon travail acharné.

À ma mère "*Ben addi Nacira*", qui a toujours été un soutien inconditionnel tout au long de ce parcours. Son amour, son encouragement et sa compréhension ont été essentiels pour surmonter les défis et atteindre mes objectifs.

À l'âme de ma chère grand-mère "*Oma Chrifa*" qui m'a toujours soutenu.

À ma sœur "*Nour*", mes neveux "*Adam, Dorsaf*" et mon chat "*Mino*".

À mes proches "*Meriem, Zahra, Chaima, Khaoula*" pour leur compréhension et leur encouragement constant, même dans les moments les plus difficiles. Votre soutien moral m'a donné la force de persévérer.

*Iman*

# Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Ma chère Maman « *Ammari Farida* » : pour tous les sacrifices Consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, elle a toujours été un exemple pour une combattante.

Mon cher Papa « *Kamel* » : qui a œuvré pour ma réussite, pour ses précieux conseils et encouragements constants. Aucune dédicace ne saura exprimée l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour toi.

Ils ont toujours été ceux qui m'ont soutenu, je suis fière d'être votre fille et c'est mon idéal objectif de vous rendre fière de moi aussi.

Je tiens également à remercier mes chers amis « *Khaoula, Iman, Meriem et Chaima* », mes collègues et ma famille pour leur soutien inconditionnel et leurs encouragements, leur présence et leur soutien moral ont été essentiels pour surmonter les moments de doute et de stress.

J'adresse mes sincères remerciements à ma cousine « *Karima* » et son bébé « *Ayham* », qu'Allah les protégé.

*Zahrat el amel*

# Table des matières

Liste de tableaux.....	I
Liste des figures .....	II
Liste des abréviations .....	III
Introduction générale.....	1

## **Première partie: Synthèse bibliographique**

### Chapitre 1: Les bactéries lactique

1.1. Définition.....	3
1.2. Classification .....	3
1.3. Habitat .....	3
1.4. Caractéristiques biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques.....	4
1.5. Caractéristiques des principaux genres .....	4

### Chapitre 2: Les probiotique

2.1. Les probiotique .....	6
2.2. Critères de sélection des souches probiotique .....	6
2.3. Principales souches microbiennes à potentiel probiotique .....	7
2.4. Mode d'action.....	8
2.4.1. Interaction avec la barrière intestinale .....	8
2.4.2. Modulation du système immunitaire .....	9
2.4.3. Productionde métabolites bénéfiques .....	9
2.4.4. Action antibactériennes.....	9
2.5. Effet bénéfique des probiotique sur la santé humaine .....	9

## **Deuxième partie: Partie Expérimentale**

### Chapitre 3: Matériel et méthodes

3.1. Lieu de travail .....	11
3.2. L'objectif .....	11
3.3. Echantillonnage.....	11
3.4. Milieux utilisés pour l'isolement .....	11

3.5. Isolement et purification des souches bactérienne.....	11
3.6. Conservation des souches.....	12
3.7. Identification.....	14
3.7.1. Pré-identification des isolats .....	14
3.7.1.1. Etude des caractères morphologique .....	14
3.7.1.2. Etude biochimique .....	14
3.7.2. Identification des souches isolée .....	14
3.7.2.1. Test physiologique .....	14
3.7.2.2. Test biochimique.....	15
3.7.3. Identification du genre par la méthode de la plaque CCM pour les souches lactique en forme bâtonnet.....	15
3.7.4. Identification des espèces par API 50 CHL .....	16
3.8. Études des caractères probiotique des souches.....	17
3.8.1. Tests d'innocuité (non pathogénicité) .....	17
3.8.1.1. Test gélatinase .....	17
3.8.1.2. Test ADNase.....	18
3.8.2. Étude des propriétés fonctionnelles des souches.....	18
3.8.2.1. Test de résistance à l'acidité.....	18
3.8.2.2. Test de résistance en sel biliaire .....	18
3.8.2.3. Test de tolérance au lysozyme .....	19
3.8.3. Activité antibactérienne .....	19

#### Chapitre 4: Résultats et discussion

4.1. Isolement et identification des souches bactériennes.....	21
4.1.1. Aspect macroscopique .....	21
4.1.2. Aspect microscopique.....	22
4.1.3. Test catalase .....	24
4.2. Caractérisation morphologique, biochimique et physiologique .....	24
4.3. Test de sécurité et d'innocuité .....	25
4.3.1. Test de gélatinase et d'ADNase .....	25
4.4. Étude des propriétés fonctionnelles des souches .....	26

4.4.1. La tolérance à l'acidité et aux sels biliaires .....	26
4.4.2. La tolérance au lysozyme.....	28
4.5. Activité antibactérienne.....	28
4.6. Résultats de la CCM.....	30
4.7. Résultats d'identification des isolats par API 50 CHL .....	30
Conclusion .....	32
Bibliographie.....	33
Annexes	
Résumé	

# Liste de tableaux

<b>Tableau 1.</b> Les principaux genres des bactéries lactique.....	5
<b>Tableau 2.</b> Différents critères de sélection des souches probiotiques. -----	7
<b>Tableau 3.</b> Principaux micro-organismes considérés comme probiotiques.-----	8
<b>Tableau 4.</b> Caractéristiques phénotypiques des bactéries isolées à partir des échantillons de lait maternel et des selles de nourrisson. -----	22
<b>Tableau 5.</b> Les caractères morphologique, biochimique et physiologique des bactéries lactique -----	25
<b>Tableau 6.</b> Dénombrement des isolats exposé à différentes valeur de pH pendant 3h d'incubation.-----	27
<b>Tableau7.</b> Dénombrement des isolats exposé à différentes concentrations en sels biliaire pendant 3h d'incubation. -----	27
<b>Tableau 8.</b> Dénombrement des isolats en présence de lysozyme pendant 2h d'incubation. --	28
<b>Tableau 9.</b> Activité antibactérienne des surnageants des isolats avec pH non neutralisé. ----	29



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Effet bénéfique des probiotique sur la santé humaine .....	10
<b>Figure 2.</b> Schéma explicatif des différentes étapes d'isolement des souches lactiques. ....	13
<b>Figure 3.</b> La plaque CCM.....	16
<b>Figure 4.</b> Schéma explicatif des différentes étapes des tests de sélection des probiotique .....	20
<b>Figure 5.</b> Aspect macroscopique des colonies sur milieux de culture. ....	21
<b>Figure 6.</b> Les résultats de purification des isolats.....	21
<b>Figure 7.</b> Observation microscopique de quelques souches isolées (Gx100) .....	23
<b>Figure 8.</b> Résultats du test catalase. ....	24
<b>Figure 9.</b> Résultats des tests (a) croissance à 6,5 de NaCl, (b) production de CO <sub>2</sub> à partir du glucose .....	24
<b>Figure 10.</b> Les résultats de (a) test de gélatinase, (b) test d'adnase.....	26
<b>Figure 11.</b> Résultats de l'activité antibactériennes des surnageants avec (a) pH non ajusté et (b) pH neutralisé.....	29
<b>Figure 12.</b> Résultats de séparation des acides organique (l'acide acétique (A), l'acide lactique (B), l'acide succinique (C) et l'acide citrique (D)) et d'analyse des bouillons des isolâtes bactériennes (BS1 : <i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i> 1, BS15 : <i>Lactobacillus plantarum</i> 1 et BS16). ....	30
<b>Figure 13.</b> Résultats de l'identification par API 50 CHL de deux isolats BS1, BS15.....	31

# Liste des abréviations

**FAO** : Food and Agriculture Organization (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.

**BL** : Bactéries Lactique

**Lb** : *Lactobacillus*

**MRS** : De Man, Rogosa et Sharpe

**M17**: Milieu de Terzaghi

**BFM** : *Bifidobacterium* medium

**GN** : Gélose Nutritif

**Na Cl** : Chlorure de sodium

**Na OH** : Hydroxyde de sodium

**HCl** : Acide chlorhydrique

**AGCC** : Acides Gras à Chaîne Courte

**CMM** : Chromatographie à couche mince

**pH** : potentiel d'Hydrogène

**UFC** : Unité Formant Colonie

**McF** : McFarland

**UV** : Ultraviolet

**t** : temps

**°C** : Degré Celsius

**p /v** : poids /volume

**v /v** : volume /volume

**h** : heures

**TS** : Taux de Survie

**ATCC** : American type culture collection

**Mpb** : Millions paires de bases

# **Introduction générale**

# Introduction générale

Il est bien connu aujourd'hui que le tractus gastro-intestinal humain est colonisé par des micro-organismes, de la cavité buccale au rectum, comprenant près de 800 espèces (Albesharat *et al.*, 2011). En outre, plusieurs études ont révélé que le colostrum et le lait maternel sont des sources continues de bactéries commensales, mutualistes et potentiellement probiotiques pour l'intestin du nourrisson (Martín *et al.*, 2003).

Le concept de probiotique, est défini comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte. Les bactéries lactiques d'origine humaine sont considérées comme des candidats prometteurs en tant que probiotique en raison de leur présence naturelle dans le système digestif humain et de leur capacité à interagir avec l'hôte (Poli, 2020). De plus, elles jouent un rôle crucial la promotion de la santé intestinale (Al-Balawi, 2020).

Ces bactéries, notamment les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, et *Enterococcus*, ont été largement étudiées pour leur potentiel probiotique (George, 2021).

Elles peuvent moduler l'équilibre de la microflore intestinale en inhibant la croissance de pathogènes, en renforçant la barrière intestinale et en favorisant la production de substances bénéfiques telles que les acides organiques et les enzymes digestives. De plus, elles peuvent également stimuler le système immunitaire de l'hôte, réduire l'inflammation et améliorer la digestion et l'absorption des nutriments (Liang *et al.*, 2022).

L'objectif principal de notre travail était d'isoler et d'identifier des souches de bactéries lactiques à partir des selles de nourrissons et du lait maternel, afin d'évaluer leur profil probiotique à l'aide de tests *in vitro*.

Le manuscrit comporte deux parties :

- Une première partie relative à l'étude bibliographique comprenant deux chapitres.

Le premier chapitre aborde les généralités sur les bactéries lactiques (BL), en mettant en lumière leurs caractéristiques, leur classification et les caractéristiques des principaux genres.

Le deuxième chapitre se concentre sur les généralités concernant les probiotique, en explorant leur définition, leur mode d'action, leurs bénéfices pour la santé, ainsi que les critères de sélection et d'évaluation des souches probiotique.

- Une deuxième partie expérimentale comprenant le matériel utilisé et les méthodes suivies .en outre, cette partie de notre mémoire présente les résultats obtenus ainsi que les discussions qui en découlent. Enfin, nous concluons cette partie par une synthèse générale des résultats obtenus et mettons également en avant les perspectives futures pour approfondir cette recherche.

# **Synthèse bibliographique**

# **Chapitre 1**

## **Les bactéries lactiques**

## 1. 1. Définition

Les bactéries lactiques sont un groupe de microorganismes procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes, à gram (+), catalase (-), a sporulant, anaérobie mais aérotoleante et qui produisent l'acide lactique en fermentant les carbohydate (sucres) (Ayivi *et al.*, 2020).

## 1.2. Classification

La taxonomie était basée sur la morphologie, la croissance à différentes températures, fermentation du glucose, aptitude à se développer à une concentration élevée de sel tolérance acide ou alcaline et configuration de l'acide lactique produit (Atya, 2016).

En 1997, Stiles et Holzapfel ont distingué quatre groupes phylogénétiques principaux au sein des bactéries lactiques : Le premier groupe est constitué des genres *Streptococcus* et *Lactococcus*, le deuxième groupe est composé des genres *Oenococcus*, *Leuconostoc*, et le troixième groupe est celui des *Enterococcus*, le quatrième groupe phylogénétique comporte deux genres *Lactobacillus* et *Pediococcus* (Galia, 2011).

Plus récemment, des techniques génétiques, telles que le séquençage de l'ADNr 16S, ont été mises au point et permettent une identification plus cohérente et plus précise des souches individuelles (Khalid, 2011).

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des *Bacillota*, classe des *Bacilli*, ordre de *Lactobacilales*, et à la famille des *Lactobacillaceae*. Leur ADN présente un pourcentage de G+C compris entre 30 et 60% et une taille de génome comprise entre 1,8 et 3,3 Mpb. (Faouzi, 2014). Les *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, et *Weissella* sont les genres les plus connus (George, 2021).

## 1.3. Habitat

Les bactéries lactiques constituent un groupe bactérien ubiquitaire très répandu dans la nature, dans les niches d'origine laitière (fermentée), carnée et végétale, aussi dans le sol et l'eau (Ayivi *et al.*, 2020). Elles sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, elles sont présentent dans différentes niches (Faouzi, 2014).

En outre, il est bien connu que ces bactéries, parmi une grande population des microorganismes habitent dans les écosystèmes intestinaux (en faible concentration), et forme une unité étroitement intégrée avec l'hôte appelé le microbiote intestinal. Quelque espèce on peut les trouver aussi dans les cavités buccales, vaginales (en flore dominante) et



les muqueuses des humains et des animaux (Bouchard, 2013) où certaines espèces peuvent vivre en tant que micro-organismes commensaux (Azevedo, 2013).

#### **1.4. Caractéristiques biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques**

En outre de leurs caractères en commun, les bactéries lactiques peuvent être caractérisées comme des bâtonnets et des coques. Qui sont oxydases négatives, ne réduisent pas les nitrates en nitrites, sont gélatinase négatives (Carr *et al.*, 2002).

Généralement non mobiles. Elles peuvent se développer en présence d'oxygène. Ils sont protégés dessous-produits de l'oxygène (par exemple H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) parce qu'ils possèdent des peroxydases (Khalid, 2011).

Elles ont des besoins nutritionnels complexes tels que les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles. Les bactéries lactiques sont généralement mésophiles, mais certaines sont psychotolérantes et thermotolérantes. Elle tolère un pH de 3,4 à 8 et a un pH optimal de 5,4 à 6,4 pour la croissance (Faouzi, 2014).

Du point de vue du métabolisme, les BL se distinguent en deux groupes en fonction de la voie qu'elles utilisent pour la fermentation des sucres ; groupe des homofermentaires produisent de l'acide lactique comme principal produit de la fermentation du glucose, et groupe des hétérofermentaires produisent un certain nombre de produits en plus de l'acide lactique, notamment du dioxyde de carbone, de l'acide acétique et de l'éthanol (Gopal, 2020).

#### **1.5. Caractéristiques des principaux genres**

Le groupe BL comprend 16 genres, dont les principaux genres sont les suivant :

**Tableau 1.** Les principaux genres des bactéries lactiques

Genre	Cocci	Bacille	Homo	hétéro	produit final	Anaérobie stricte	Anaérobie Aérotoleat	Reference
<i>Lactobacillus</i>	-	+	±	±	a.lactique	-	+	(Al Kassaa, 2014)
<i>Lactococcus</i>	+	-	+	-	a.lactique	-	+	(Isnard, 2017)
<i>Leuconostoc</i>	+	-	-	+	a.lactique acétate	-	+	(Zarour <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pediococcus</i>	+	-	+	-	a.lactique	-	+	(Afzal, 2012)
<i>Streptococcus</i>	+	-	+	-	a.lactique	-	+	(Whiley <i>et al.</i> , 2015)
<i>Enterococcus</i>	+	-	+	-	a.lactique	-	+	(Kavikate <i>et al.</i> , 2023)
<i>Carnobacterium</i>	+	-	-	+	a.formique acétate ethanol a.lactique	-	+	(Lorenzo <i>et al.</i> , 2018)
<i>Oenococcus</i>	+	-	-	+	acétate ethanol a.lactique	+	-	(Lonvaud, 2014)
<i>Tetragenococcus</i>	+	-	+	-	a.lactique	-	+	(Guindo <i>et al.</i> , 2022)
<i>Vagococcus</i>	+	-	+	-	a.lactique	-	+	(Ge <i>et al.</i> , 2020)
<i>Weissella</i>	+	-	-	+	Ethanol acétate a.lactique	-	+	(Fusco <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bifidobacterium</i>	-	forme en Y et V	-	+	a.lactique a.acétique	+	-	(Faouzi, 2014)

a : acide, Homo : homofermentaire, Hétéro : hétérofrmentaire.

# **Chapitre 2**

## **Les probiotiques**

## 2.1. Les probiotiques

Le terme "probiotiques" est presque un nouveau mot qui signifie "pour la vie". Le concept probiotique trouve son origine dans la théorie de la longévité de Metchnikoff en 1907. Il est le premier à donner l'idée d'utiliser des lactobacilles des yaourts pour restaurer le microbiote du système gastro-intestinal (Al Kassaa, 2014). En 1965, Lilly et Stillwell ont décrit les probiotiques comme des micro-organismes capables de sécréter des substances favorisant la croissance d'autres micro-organismes. Par la suite, en 1974, Parker a proposé le terme "probiotique" pour désigner les souches microbiennes utilisées dans l'alimentation animale afin de contrer les effets néfastes des antibiotiques et d'améliorer leur efficacité (Malbezin, 2017).

En 1989 la définition a ensuite évolué, Roy Fuller redéfinissant les probiotique en tant que « Complément alimentaire microbien qui ont un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant l'équilibre microbien intestinal » (Zaylaa, 2018).

Aujourd'hui, selon la définition retenue par le groupe de travail commun créé par l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (ONU) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les probiotiques sont « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités suffisantes, produisent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (Ebel, 2012).

Cette définition est actuelle mais peut évoluer dans le temps en fonction des études futures et des résultats qui pourraient être découverts (Niarquin, 2022).

## 2.2. Critères de sélection des souches probiotique

Qu'est-ce qui fait d'un probiotique un bon probiotique ? Pour répondre à cette question, un probiotique doit respecter la définition de l'OMS (Nectoux, 2022), c'est-à-dire qu'au-delà du choix de la souche, il existe trois catégories des critères de sélection des probiotiques conduisant à une capacité à produire des effets bénéfiques sur la santé. Il s'agit des critères fonctionnels, des critères de sécurité et des critères technologiques (Clement, 2018) qui sont décrits dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Différents critères de sélection des souches probiotiques (Gagnon, 2007).

Critères de Sécurité	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identification taxonomique précise.</li> <li>• Appartenir à la flore commensale et être d'origine humaine.</li> <li>• Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques.</li> <li>• Historique de non-pathogénicité et de non-invasion de l'épithélium intestinal.</li> <li>• Absence de transmission des gènes de résistance aux antibiotiques.</li> </ul>
Critères Fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> <li>• résister à l'acidité gastrique, à la bile et aux enzymes digestives.</li> <li>• Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus intestinal.</li> <li>• Production de substances antimicrobiennes (bactériocines, acides organiques, peroxyde d'hydrogène ou autres composés inhibiteurs) et antagonisme vis-à-vis des pathogènes.</li> <li>• Immunostimulation.</li> <li>• Capacité à produire des effets bénéfiques sur la santé.</li> </ul>
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La survie des probiotiques au cours du processus de préparation du produit et dans le produit fini.</li> <li>• Préservation des propriétés probiotiques après production.</li> <li>• Aucune modification des propriétés organoleptiques du produit fini.</li> </ul>

### 2.3. Principales souches microbiennes à potentiel probiotique

Les probiotiques les plus utilisés sont les bactéries lactiques, c'est-à-dire les bactéries capables de transformer le sucre du lait (lactose) en acide lactique (Malbezin, 2017), parmi les genres bactériens les plus couramment utilisés aujourd'hui on retrouve *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Clement, 2018). D'autres espèces des genres *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Eschericia coli* (Belhamra, 2018), aussi certaines espèces du genre *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus var. toyoi*) et la levure *Saccharomyces boulardii* sont également utilisés comme probiotique (Bouguerra, 2021) (Tableau 3).

**Tableau 3.** Principaux micro-organismes considérés comme probiotique (Villeger, 2014).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres
<i>L.acetotolerans</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L.acidifarinae</i>	<i>B.asteroids</i>	<i>Bacillus clausii</i>
<i>L.acidophilus</i>	<i>B.animalis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>L.agilis</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>L.alimentarius</i>	<i>B. boum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>B.breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L.casei</i>	<i>B.choerium</i>	<i>Escherichiacoli Nissle</i>
<i>L.crispatus</i>	<i>B.coryneforme</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L.curvatus</i>	<i>B.cuniculi</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L.delbrueckii</i>	<i>B.gallicum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L.farciminis</i>	<i>B.gallinarum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae(levure)</i>
<i>L.fermentum</i>	<i>B.indicum</i>	<i>Saccharomyces boulardii(levure)</i>
<i>L.gasseri</i>	<i>B.infantis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>L.johnsonii</i>	<i>B.lactis</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L.paracasei</i>	<i>B.longum</i>	<i>Streptococcus phocae</i>
<i>L.plantarum</i>	<i>B.magnum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L.reuteri</i>	<i>B.merycicum</i>	<i>Stryptomycetes(levure)</i>
<i>L.rhamnosus</i>	<i>B.minimum</i>	
<i>L.zymae</i>	<i>B.psuedocatenulapum</i>	
	<i>B.ruminale</i>	
	<i>B. subtile</i>	
	<i>B.thermaacidophilum</i>	

## 2.4. Mode d'action

Les modes d'action des probiotiques ont multiples et varie en fonction de l'espèce et de la souche spécifique de la bactérie, ainsi que du contexte dans lequel elles sont appliquée (Zaylaa, 2018). Les 4 principaux modes d'action des probiotiques ont énuméré dans ci-dessous.

### 2.4.1. Interaction avec la barrière intestinale

Les bactéries probiotique peuvent interagir avec les cellules épithéliales qui tapissent la paroi intestinale, renforçant ainsi la barrière intestinale. Elles peuvent favoriser la production de mucus protecteur et améliorer la fonction de jonction serrée entre les cellules intestinales, ce qui limite le passage de molécules indésirables dans l'organisme (Belhamra, 2018).

### **2.4.2. Modulation du système immunitaire**

Les bactéries probiotique peuvent interagir avec les cellules immunitaires de l'intestin, telles que les lymphocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, régulant ainsi la réponse immunitaire. Elles peuvent stimuler la production de cytokines anti-inflammatoires, améliorer la réponse immunitaire adaptative et réduire l'inflammation (Yan et Polk, 2012).

### **2.4.3. Production de métabolites bénéfiques**

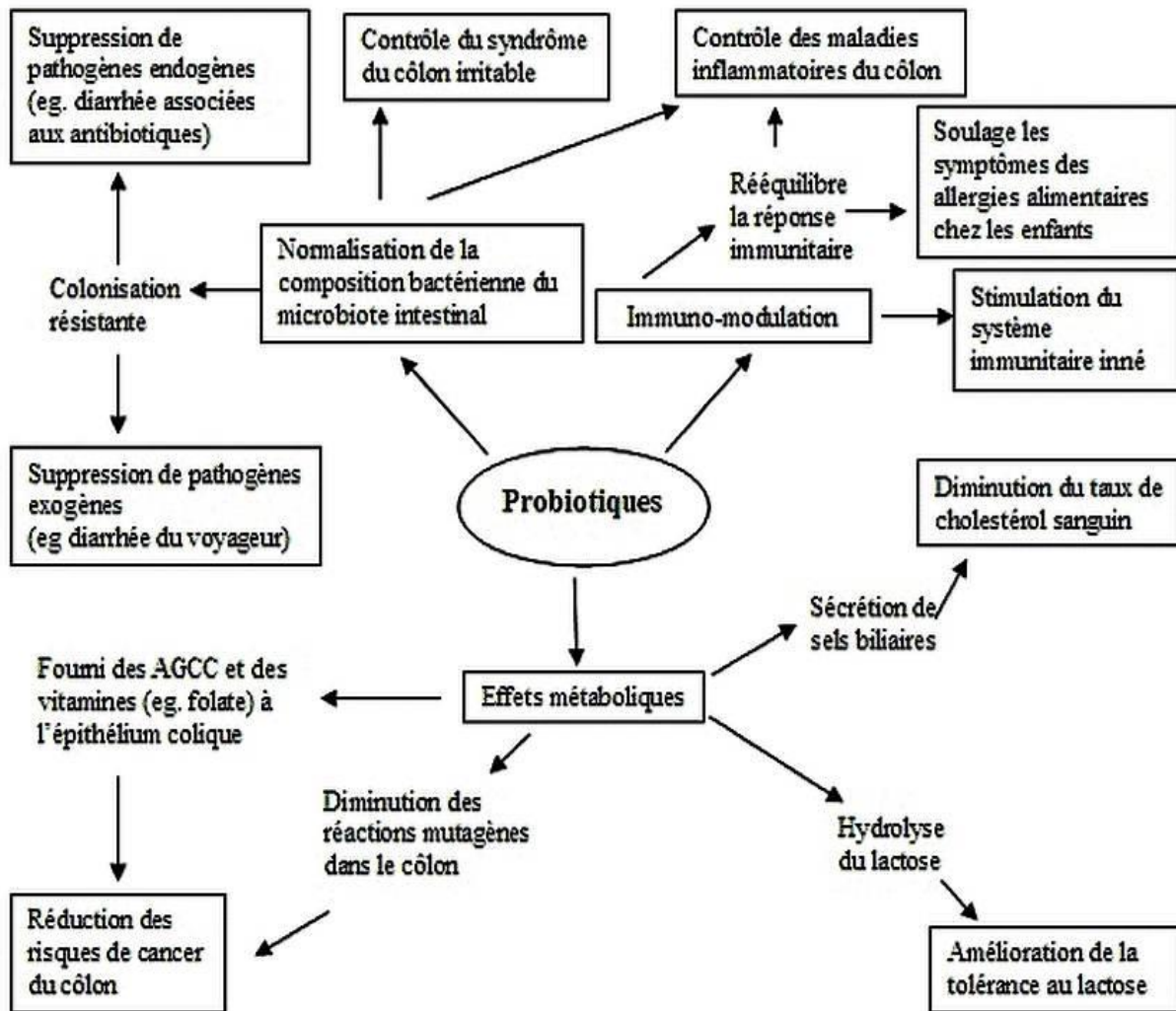
Les probiotiques peuvent produire des métabolites bénéfiques pour la santé intestinale, tels que les acides gras à chaîne courte (AGCC). Les AGCC fournissent de l'énergie aux cellules intestinales, régulent l'inflammation et favorisent la croissance d'autres bactéries bénéfiques (Donohoe *et al.*, 2011).

### **2.4.4. Action antibactériennes**

Certains probiotique produisent des substances antibactériennes, telles que les acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et les bactériocines, qui inhibent la croissance des bactéries pathogène (Samot, 2012).

## **2.5. Effet bénéfique des probiotiques sur la santé humaine**

Aujourd'hui, il existe différents types des produits probiotique disponibles dans le commerce pour améliorer la santé des adultes et des enfants (Raheem *et al.*, 2021). Ces produits peuvent offrir une protection contre les maladies diarrhéiques et les infections nosocomiales et des voies respiratoires, réduction du cholestérol, stimulation du système immunitaire, diminution des troubles immuno-inflammatoire et effets anticancéreux (Figueroa *et al.*, 2011). Certains probiotiques peuvent réduire le risque d'allergies, en particulier l'eczéma (Pelucchi *et al.*, 2012), aussi peuvent avoir un impact positif sur la santé mentale en réduisant les symptômes de l'anxiété et de la dépression (Huang *et al.*, 2016). Et notamment les lactobacilles, peuvent aider à maintenir l'équilibre du pH vaginal et prévenir les infections vaginales telles que la vaginose bactérienne et les infections à levures (Falagas *et al.*, 2006). Ces propriétés de santé sont spécifiques à la souche et sont impactées par les différents mécanismes mentionnés ci-dessus (Voir figure 1).



**Figure 1.** Effet bénéfique des probiotique sur la santé humaine (Poupet, 2020).



# **Chapitre 3**

## **Matériel et méthodes**

### 3.1. Lieu de travail

Notre travail de recherche a été réalisé au niveau du laboratoire microbiologique de Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie, département des sciences de la nature et de la vie de l'université Mohamed Khider de Biskra.

### 3.2. L'objectif

L'objectif de notre travail est d'isoler et d'identifier des souches des bactéries lactiques locales, à partir des selles de nourrissons et du lait maternel. Aussi pour tester leur effet probiotique.

### 3.3. Echantillonnage

Notre étude porte sur l'effet probiotique des bactéries lactiques d'origine humaine. Pour cela, nous avons prélevé des échantillons à partir des selles de nourrisson et du lait maternel, qui sont deux sources riches en bactéries lactiques.

L'isolement des souches a été fait à partir des matières fécales et du lait maternel. Le lait maternel a été collecté auprès d'une femme âgée de 34 ans, tandis qu'un les matières fécales ont été collectées d'un nourrisson de quatre mois en respectant les critères suivants : nourrisson accouché par voie vaginale, allaité exclusivement au lait maternel, sous aucune antibiothérapie au cours des trois derniers mois.

La collecte du lait a été faite par expression manuelle du sein. Ce dernier a été nettoyé à l'eau stérile et les premiers jets du lait ont été éliminés. Quant à l'échantillon de matière fécale, la collecte a été faite à l'aide des écouvillons stériles dans des récipients stériles et par la suite conservés au frais à 4°C. La collecte des échantillons en respectant le maximum les bonnes conditions d'asepsie. L'isolement a été procédé 8 heures après le prélèvement.

### 3.4. Milieux utilisés pour l'isolement

L'isolement des souches a été fait en utilisant des milieux de culture sélectifs qui sont énumérés comme suit :

- Le milieu MRS-cys, pH 6.5 pour l'isolement des *Lactobacillus*.
- Le milieu M17, pH 6.5 pour l'isolement des *Lactococcus*.
- Le milieu BFM pour pH 5,5 pour l'isolement des *Bifidobacterium*.

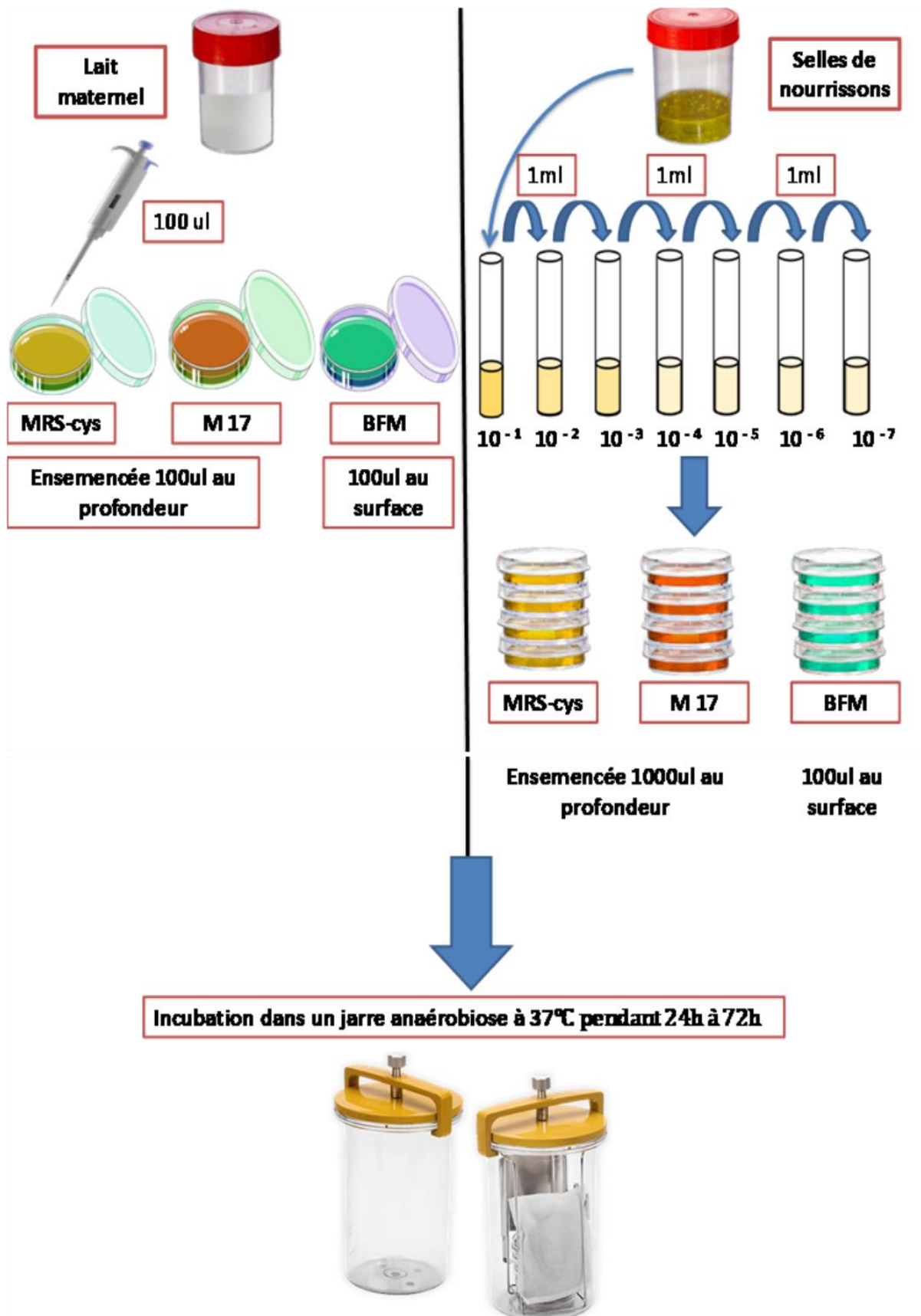
### 3.5. Isolement et purification des souches bactériennes

L'isolement des souches a été réalisé de la manière suivante : 1g/ml de l'échantillon été dilué de façon décimale en cascade jusqu'à  $10^{-7}$  en utilisant des tubes contenant 5 ml d'une solution saline composé (p/v) de (0,1% de peptone, 0,85% de NaCl et 0,05% L-Cys-HCl). Ensuite, des aliquotes de 100  $\mu$ L ou 1 ml de chacune des dilutions réalisées ont été cultivés dans des boîtes de pétri contenant une des géloses d'isolement (MRS, M17, BFM) cité ci-dessus soit en appliquant la technique d'ensemencement en surface ou en profondeur. Les boîtes ont été ensuite incubées en anaérobiose pendant 72h à 37° C.

Après l'incubation les colonies bactériennes obtenues ont été sélectionnées au hasard est vérifiée par observation macroscopique puis purifiés par plusieurs repiquages successifs par la méthode des stries et incubé dans les mêmes conditions d'isolement.

### 3.6. Conservation des souches

Les souches jugées pures ont été conservé à long terme. Les souches ont été d'abord cultivées dans leur milieu approprié pendant 24h à 37° C en anaérobiose. Les cultures ont été ensuite centrifugées à 14000 tr/min pendant 5 min. Après quoi les culots bactériens ont été récupéré et lavés 2 fois par l'eau physiologique-Cys après centrifugation. Les cellules ont été ensuite resuspendues dans leur milieu de culture approprié supplémenté par 30% de glycérol et quelques gouttes d'huile de paraffine stérile. Les souches ont été par la suite conservées à -80 °C.



**Figure 2.** Schéma explicatif des différentes étapes d'isolement des souches lactique (Original, 2023).

### 3.7. Identification

#### 3.7.1. Pré-identification des isolats

##### 3.7.1.1. Étude des caractères morphologiques

L'aspect morphologique des souches a été étudié après coloration de Gram à l'aide d'un microscope optique. Les étapes de la coloration sont citées dans l'annexe 3. Uniquement les souches à gram (+) ont été retenues pour les autres tests suivant.

##### 3.7.1.2. Etude biochimique

###### . Test catalase

Les souches pures et à gram (+) ont été soumises au test de la catalase. Le test de catalase est une méthode couramment utilisée pour détecter la présence de l'enzyme catalase dans les bactéries lactiques. La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène, ce qui produit une effervescence caractéristique lorsqu'elle est présente.

Selon la réaction suivante :  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Pour réaliser le test de catalase, une colonie de bactérie lactique est prélevée et déposée sur une lame de verre propre. Une petite quantité de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) est ensuite ajoutée à la colonie sur la lame. Si la bactérie contient l'enzyme catalase, celle-ci va décomposer le  $\text{H}_2\text{O}_2$ , entraînant la formation de bulles d'oxygène visibles à l'œil nu. Seulement les souches catalase négative ont été retenues pour les tests suivant (Kassas, 2017).

#### 3.7.2. Identification des souches isolée

##### 3.7.2.1. Test physiologique

Dans l'objectif de savoir d'une façon préliminaire à quelle groupe appartient nos souches isolées, il a été important de réaliser le test de croissance en présence de 6.5% de NaCl et le test de production du  $\text{CO}_2$  à partir du glucose.

###### . Test de croissance en présence de 6,5 % NaCl

La tolérance des isolats à concentration de 6,5 % de NaCl a été examinée selon la méthode décrite par Toyosi *et al.* (2017) avec modification. Ce test vise à évaluer la capacité de croissance des bactéries dans un milieu fortement salin, ce qui permet généralement de distinguer les entérocoques et les lactocoques.

Les souches ont été cultivées pendant 24h à 37°C en anaérobioses. Après quoi 100 µl de culture bactérienne dans des tubes eppendorf stériles contenant 900 µl de milieu MRS additionné de 6,5 % de NaCl. Les eppendorf sont ensuite incubés à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Après l'incubation, la croissance bactérienne se manifeste par la formation d'un trouble dans le milieu.

### **3.7.2.2. Test biochimique**

#### **. Test production de CO<sub>2</sub> à partir de glucose**

La production de gaz CO<sub>2</sub> à partir du glucose a été examinée pour déterminer les caractéristiques homofermentaires et hétérofermentaires des isolats BL, comme décrit par la méthode de Makete (2015) avec modification. Les souches récemment cultivées sont prélevées à l'aide d'une micropipette et déposées une quantité de 50µl dans des tubes stériles contenant 7 ml de bouillon MRS sans citrate, avec une cloche de Durham. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 à 48 h. La présence ou l'absence de gaz dans la cloche indique le type de fermentation.

### **3.7.3. Identification du genre par la méthode de la plaque CCM pour les souches lactique en forme bâtonnet**

Pour déterminer si nos souches isolées qui possédant la forme bâtonnet appartiennent au genre *Lactobacillus* ou au genre *Bifidobacterium*, la technique décrite par Lee *et al.* (2001) avec modification a été appliquée. Les étapes de la technique sont mentionnées ci-dessous.

#### **. Préparation des solutions utilisées :**

-Après revivification, les cultures ont été centrifugées à 14000 tours/min pendant 5 minutes, puis garder le surnageant dans tube eppendoref pour l'utiliser.

-L'éluant (solvant) composer de l'acétone-eau-chloroforme-éthanol-hydroxyde d'ammonium (60:2:6:10:22) ml.

-Les acides organiques utilisés comme référence (10%) (v/v)(Acide acétique, Acide lactique, acide citrique, acide succinique).

-Le révélateur c'est une solution composé de 0,125 g de rouge de méthyle et 0,125 g de bleu de bromophénol dans 50 ml de méthanol à (70%).

### . Mode opératoire

Une cuve à chromatographie de 20x20cm a été remplissée par l'éluant à environ 0,5 cm du fond de la cuve. Cette dernière a été refermée afin de permettre la saturation en vapeurs d'éluant. Ensuite, une plaque CCM de 10x20cm a été découpée et à 1 cm du bord inférieur, un trait horizontal a été tracer à l'aide d'un crayon route en s'assurant que le trait est au-dessus du niveau de l'éluant. Sur le trait tracé, 8 emplacements 2 cm de distance ont été tracé correspondant aux échantillons à déposer. Ensuite 4µl de chaque acide organique préparé et 20ul du surnageant des 3 souches sectionnée sont été déposé sur l'emplacement correspondant à l'aide d'une micropipette. Les dépôts ont été ensuite séchera l'aide d'un sèche-cheveux pour bien les fixer sur la plaque. La plaque a été introduite délicatement dans la cuve à la verticale et le couvercle est remis en place. Après une migration de l'éluant pendant 20 minutes à température ambiante, La plaque CCM a ensuite été retirée de la cuve et séchée à l'air .La plaque CCM séchée a été pulvérisée avec le révélateur et le mettre au four chaud et sec à 165 °C pendant 1 à 3 minutes.

Pour visualiser les différentes taches, on débute par placer la plaque sous une lampe UV dans un carton.



**Figure 3.** La plaque CCM (Original, 2023).

#### 3.7.4. Identification des espèces par API 50 CHL

La galerie API 50 CHL est un ensemble de 50 microtubes utilisés pour effectuer une analyse biochimique des bactéries Gram positives, catalase et oxydase négatives,

spécifiquement pour l'identification des lactobacilles et bactéries apparentées (Biomérieux, France).

Les souches pures ont été cultivées sur MRS gélosé pendant 24 h à 37°C en anaérobiose. Des colonies ensuite ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine et dissoute dans 10 ml de MRS-BCP CHL medium jusqu'à obtenir une opacité égale à 2 de Mcfarland (voir annexe 3).

Les tubes de la galerie API 50 CHL content les sucres ont été ensuite remplis avec la suspension bactérienne réalisée à l'aide d'une pipette pasteur stérile et recouverte avec une couche d'huile de paraffine stérile. Après incubation de 48 h en anaérobiose à 37°C, le changement de couleur du violet au jaune a été noté. Pour le test de esculine le virage de couleur de violet au jaune.

Le profil biochimique ainsi obtenu des souches a été identifié à partir de la base de données existante dans le site web <https://lab.upbm.org/identifieur/galerie.php>.

### **3.8. Études des caractères probiotiques des souches**

#### **3.8.1. Tests d'innocuité (non pathogénicité)**

Les souches bactériennes étudiées ne doivent pas avoir un effet secondaires sur la santé humaine, alors afin d'assurer leur innocuité. Dans cet objectif des tests de gélatinase et d'ADNase ont été réalisés, qui visent à détecter la capacité des isolats à dégrader la gélatine et l'ADN quand ils sont introduit en tant que probiotique (Teklay, 2018).

##### **3.8.1.1. Test de gélatinase**

L'activité gélatinase a été examinée selon la technique décrite par Lopes *et al.*(2006). Les souches ont été revivifiées d'abord sur MRS-cys bouillon tel que décrit précédemment, en suite 10 ul de la culture a été strié en surface d'une gélose à la gélatine (voir annexe 2), et coulée en boîte de pétri. Les boîtes ont été ensuite incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24 heures. La production de gélatinase a été révélée après avoir couvrir la gélose à la gélatine par 1 ml d'HCL 1N pendant 5 mn. L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique la dégradation de la gélatine.



### 3.8.1.2. Test d'ADNase

Alors l'activité ADNase a été évaluée en suivant la méthode décrite par Lopes *et al.* (2017) avec modifications, où une goutte de bouillon MRS contenant la souche d'intérêt a été striée sur une gélose à l'ADN.

Après une incubation de 24 heures à 37°C en anaérobiose, la surface de gélose a été submergée par 1ml de sulfate d'ammonium saturée à 55%, un halo clair est observé (après 5 minutes) lorsque les bactéries sont capables de dégrader l'ADN.

Vu le temps limité et les conditions de travail, l'étude des caractères probiotique a été limité sur l'étude de 4 caractères probiotique.

## 3.8.2. Étude des propriétés fonctionnelles des souches

### 3.8.2.1. Test de résistance à l'acidité

Pour savoir si les souches sélectionnées résistent à l'acidité gastrique ce qui assure leur survie durant leur passage par l'estomac, la méthode décrite par Rastogi *et al.* (2019) avec modifications a été suivie. Les souches ont été cultivées sur bouillon MRS-cys en respectant les mêmes conditions décrites précédemment. Les cultures ont été centrifugées (14000 tr/min, programme 3) pendant 5min.

Après récupération du culot cellulaire, ce dernier a été lavé 2 par l'eau physiologique et ensuite les cellules ont été ensuite standardisée à une opacité égale à 4 de McFerland (voir annexe 3) qui correspond à  $1,2 \cdot 10^9$  cellules/ml. 100µl de cette suspension bactérienne a été additionné au 900µl de bouillon MRS ajusté préalablement aux pH 2,5 et 3,5 avec l'HCL 1N. Les cultures réalisées sont été incubés durant 3h à 37°C en anaérobiose. Après incubation, une série de dilution décimale jusqu'à  $10^{-5}$  a été réalisé et 50 µL de chaque dilution ont été ensemencé sur gélose MRS-cys coulée en boîte de pétri. Après incubation des boites pendant 48 heures, en jarre anaérobie, un dénombrement des unités formant colonie a été effectué. Le taux de survie souche a été déterminé selon la formule suivant :

$$TS = (\text{Log UFC N} / \text{LogUFC N0}) \times 100$$

### 3.8.2.2. Test de tolérance en sel biliaire

La méthode décrite par Sirichokchatchawan *et al.* (2018) a été procédé pour évaluer le pouvoir des isolats à toléré des pourcentages de 0,5% et 1% en sel biliaire. Les mêmes étapes que le test précédent ont été suivies.

### 3.8.2.3. Test tolérance au lysozyme

Les souches ont été évaluées pour leur capacité à résister à l'activité enzymatique de lysozyme en suivant la méthode de Sirichokchatchawan *et al.* (2018) avec quelques modifications, brièvement, les mêmes étapes que les tests précédents ont été suivies. Cependant, dans le présent test un bouillon MRS pH 6,5 a été supplémenté par 100g/L de lysozyme a été préparé pour l'ensemencement des souches.

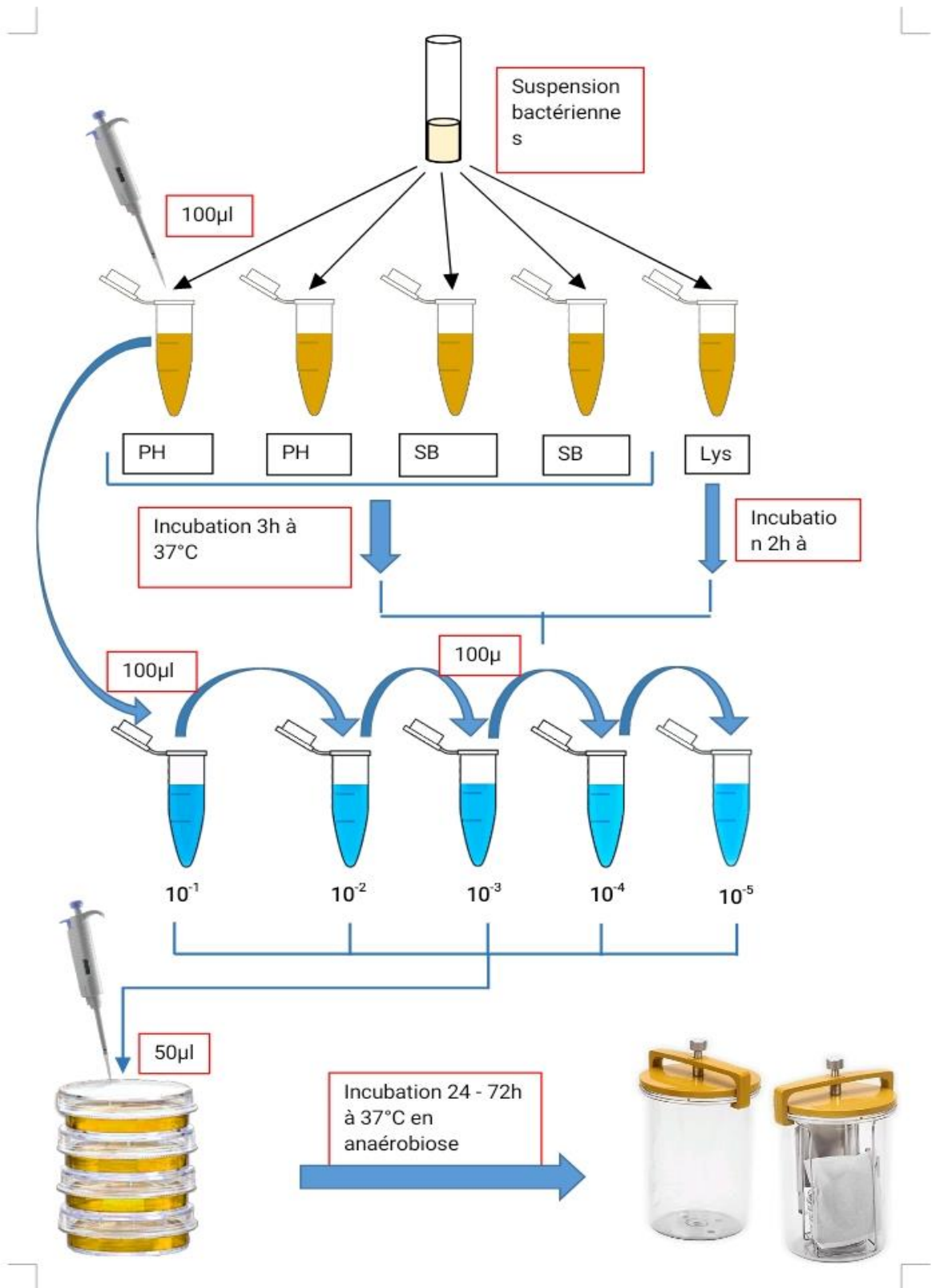
### 3.8.3. Activité antibactérienne

Afin de détecter la capacité des isolats à inhiber la croissance des agents pathogènes intestinaux, aussi de savoir si cette inhibition est due à les acides produit par ces BL ou à d'autres substances comme les bactériocines, peroxyde d'hydrogène (Gopal, 2020).

L'activité antibactérienne des souches sélectionnées vis à vis trois souches pathogènes *Staphylococcus aureus* (ATCC 9632), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) a été évaluée en adoptant la procédure décrite par Albuquerque *et al.* (2017).

Pour le test de diffusion en puits, les 6 souches étudiées ont été cultivées dans un bouillon MRS et les surnageant de culture acellulaires ont été recueillis par centrifugation (14000 tr/min, programme 3 pendant 5min), ensuite divisé en deux alisiers ; l'un est ajusté à pH 7 avec l'NaOH 10N et l'autre est non ajusté.

Une aliquote de 1 ml de chaque bactérie indicatrice a été incorporée avec 20ml de gélose nutritif molle (annexe 2) et coulé dans des boites de pétri, et des aliquotes de 30µL des surnageant de culture acellulaire des souches de BL (neutralisé et non ajusté) ont été ajoutées dans les puits (5 mm de diamètre et 5 mm de profondeur) dans la GN. Les plaques ont été incubées par voie aérienne à 37 °C pendant 48 h. L'activité antagoniste a été enregistrée comme le diamètre (mm) des zones d'inhibition de la croissance autour de chaque puits.



**Figure 4.** Schéma explicatif des différentes étapes des tests de sélection des probiotique (Original, 2023).

# **Chapitre 4**

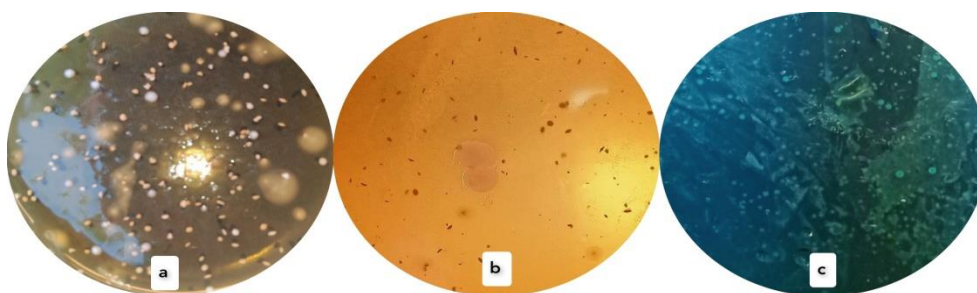
## **Résultats et discussion**

## 4.1. Isolement et identification des souches bactériennes

### 4.1.1. Aspect macroscopique

L'observation macroscopique des colonies bactériennes obtenues à partir des selles de nourrisson et du lait maternel et cultivées sur la gélose MRS, M17 montre des colonies de différentes tailles, bien isolées de couleur blanchâtre, jaunâtre brillante, bombées, à bord régulier, certaines ont des formes lenticulaires (convexe) .

En ce qui concerne la gélose BFM, des colonies de petite taille, de forme ronde et de couleur verte ont été obtenues à partir de matières fécales du nourrisson, tandis qu'aucune colonie n'a s'est développée à partir de lait maternel sur le même milieu.



**Figure 5.** Aspect macroscopique des colonies sur milieux de culture

(a) MRS-cys, (b) M17, (c) BFM (Original, 2023).

Après analyse morphologique et réaction à la coloration de Gram des colonies bactériennes isolées à partir des milieux MRS, M17 et BFM. A partir des milieux de culture, 40 isolats ont été sélectionnés au hasard et purifié en utilisant la méthode d'ensemencement à stries sur la gélose MRS (6 colonies bactériennes à partir de l'échantillon de lait maternel et 34 à partir de l'échantillon des selles de nourrisson).



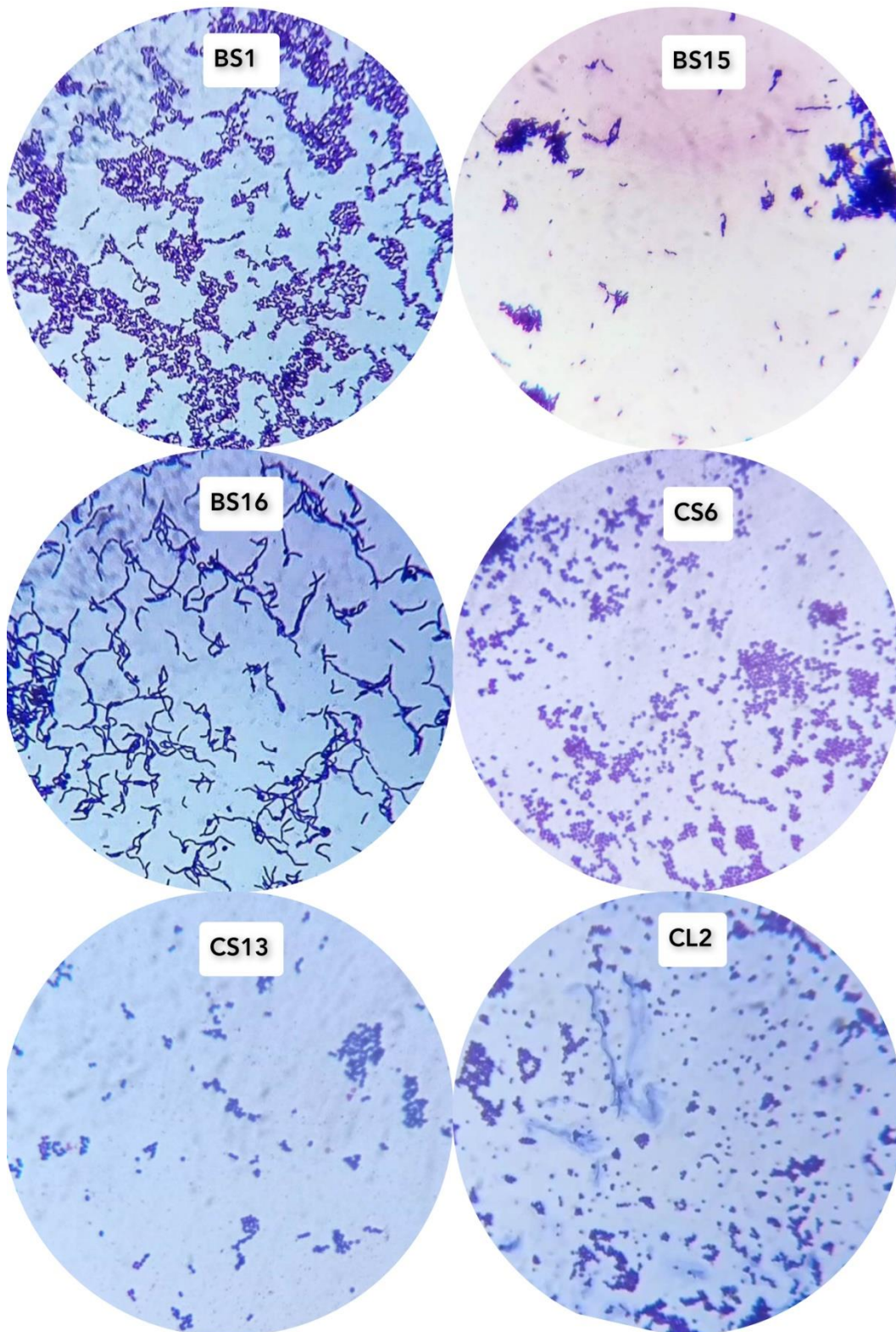
**Figure 6.** Résultats de purification des isolats (Original, 2023).

#### 4.1.2. Aspect microscopique

La morphologie cellulaire des 40 isolats ont été observées au microscope optique et ont montré que 18 et 22 d'entre eux avaient respectivement une forme de bâtonnet et de coques. Tous les isolats ont été trouvés gram positifs et disposés individuellement, par paires et en chaînes courtes ou longues. Les résultats sont illustrés dans le tableau et les figures suivantes :

**Tableau 4.** Caractéristiques phénotypiques des bactéries isolées à partir des échantillons de lait maternel et des selles de nourrisson.

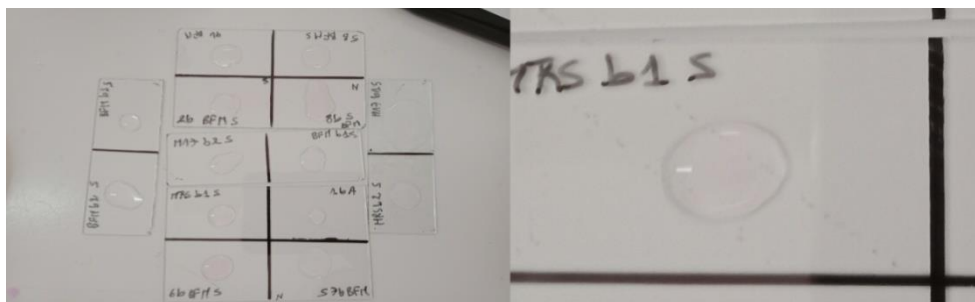
<b>Echantillons</b>	<b>Nombre des isolats</b>	<b>Cocci</b>	<b>Bacille</b>	<b>Gram</b>	<b>Catalase</b>
<b>Lait maternel</b>	(n=6)	6	0	+	-
<b>Selles de nourrissons</b>	(n=34)	16	18	+	-
<b>Total</b>	(n=40)	22	18	40	40



**Figure 7.** Observation microscopique de quelques souches isolées (Gx100)  
BS1 : *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 et BS15 : *Lactobacillus plantarum* 1  
(Original, 2023).

### 4.1.3. Test catalase

Les résultats de ce test ont révélé que toutes les souches isolées sont catalase négative (absence de formation des bulles). Ces caractéristiques spécifiques permettent de les classer parmi le groupe des bactéries lactique.

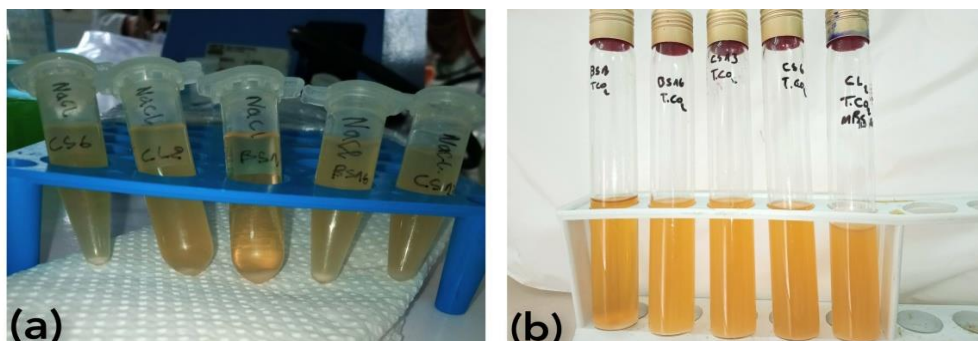


**Figure 8.** Résultats du test catalase (Original, 2023).

## 4.2. Caractérisation morphologique, biochimique et physiologique

Sur les 40 isolats, un total de 6 isolats des BL ont été sélectionnés pour réaliser les autres tests (3 bacille nommée BS1, BS15, BS16 et 2 coques CS6, CS13 à partir des selles de nourrisson et une souche coque à partir de lait maternel CL2).

Les 6 isolats sélectionnés sont également été caractérisés par des tests physiologiques et biochimiques. Comme le montrent les résultats, tous les isolats sélectionnés ont été trouvés capable de se développer en présence de NaCl 6,5 %. En revanche, aucune production de gaz (CO<sub>2</sub>) à partir du glucose n'a été observée chez ces isolats. Les résultats sont présentés dans le tableau et la figure suivants.



**Figure 9.** Résultats des tests (a) croissance à 6,5 de NaCl, (b) production de CO<sub>2</sub> à partir du glucose (Original, 2023).



**Tableau 5.** Les caractères morphologique, biochimique et physiologique des bactéries lactiques.

souche	Origine	Forme	Gram	Catalase	Typefermentative	Croissanceà6,5% NaCl	Production de gaz glucose
<b>BS1</b>	S.N	Bacille	+	-	Homo	+	-
<b>BS15</b>	S.N		+	-	Homo	+	-
<b>BS16</b>	S.N		+	-	Homo	+	-
<b>CS6</b>	S.N	Cocci	+	-	Homo	+	-
<b>CS13</b>	S.N		+	-	Homo	+	-
<b>CL2</b>	L.M		+	-	Homo	+	-
+ : réaction positive ; - : réaction négative ; Homo : Homofermentaire, S.N : Selles de nourrisson ; L.M : Lait maternel.							

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Karam et Karam (2006), où une résistance chez des souches appartenant aux genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Lactobacillus* à 6,5% de NaCl a été détectée. Quant au type fermentaire, les souches sélectionnées ont été trouvées capable de fermenter le glucose sans produire du gaz. Ce présent résultat s'accorde avec les observations Makete (2015).

### 4.3. Test de sécurité et d'innocuité

#### 4.3.1. Test de gelatinase et d'ADNase

Les résultats ont montré l'absence de production d'enzymes gélatinase et ADNase par chez les souches étudiées. Cette absence confirme leur aspects « safe » c'est-à-dire qu'elles n'ont pas un potentiel virulent en tant que facteur de pathogénicité. Cela, ouvre la possibilité qu'elles peuvent être utilisées en tant que probiotique. Des résultats similaires ont été obtenus déclaré par (Lopes *et al.*, 2006 ; Lavilla-Lerma *et al.*, 2013 ; Teklay, 2018).



**Figure 10.** Résultat des tests (a) de gélatinase, (b) de test d'ADNase (Original, 2023).

#### 4.4. Étude des propriétés fonctionnelles des souches

##### 4.4.1. La tolérance à l'acidité et aux sels biliaires

Le temps nécessaire à la digestion d'un seul repas dans l'estomac est de 3 heures. Par conséquent, tous les isolats ont été évalués pour déterminer leur résistance à un pH faible pendant les 3 heures d'incubation (Teklay, 2018).

Les résultats ont indiqué que tous les isolats sélectionnés ont survécu à des pH faibles (tableau 6). En général, à pH 3,5 le pourcentage de cellules survivantes (compris entre 73,9%-77,5%) était plus élevé qu'à pH 2,5 (66,1% - 77,2%) pour toutes les 6 souches de BL testés, où la souche BS15 a présenté le taux de viabilité le plus élevé (77,5% à pH 2,5) et (77,2% à pH 3,5).

Les résultats ont révélé également que toutes les 6 isolats ont pu survivre en présence de 0,5 % et 1% de bile (tableau 7), cependant ils ont démontré une capacité à tolérer les sels biliaire plus élevé en 0,5%(avec une viabilité comprise entre (65,8% et 77,7%) qu'en 1% (65,9% -74,9%). la souche BS1 a présenté le TS le plus élevé (77,7% en concentration de 0,5%) et (74,9% en concentration de 1%), tandis que le taux de viabilité le plus faible appartient aux isolats CS6 (65,8% en 0,5%) et CS13 (65,9% en 1%).

Ces résultats sont proches de ceux de Yerlikaya *et al.* (2020) qui ont rapporté que les souches appartenant au genre *Enterococcus* peut maintenir sa viabilité pendant 3 h à un pH de 2,5 et 3 et aux concentrations de 0,5% et 1% de sels biliaire. Et ce de Verdenelli *et al.* (2009) et Sirichokchatchawan (2018), ce dernier a rapporté que les isolats appartenant au genre *Lactobacillus* ont montraient un pourcentage de survie plus élevé à un pH de 3,5 (82,70% -90,71%) qu'à un pH de 2,5 (66,20% -75,64%) aussi une bonne résistance aux sels biliaire (78,46% -85,96% en 0,5%) et (69,97% -80,94% en 1%). Par exemple les résultats de

Verdenelli *et al.* (2009) ont montré que l'espèce *Lactobacillus paracasei* isolée des fèces d'humains a été résistante au pH faible et aux sels biliaires.

**Tableau 6.** Dénombrement des isolats exposé à différentes valeur de pH pendant 3h d'incubation.

Les souches	pH=2,5			pH=3,5	
	t0	t1 (3h)	Taux de survie(%)	t1 (3h)	Taux de survie(%)
BS 1	8,08	6,05±0,06	74,9	6,26±0,04	77,5
BS 15	8,08	6,24±0,05	77,2	6,26±0,05	77,5
BS 16	8,08	5,89±0,04	72,9	6,03±0,06	74,6
CS 6	8,08	5,39±0,09	66,7	6,14±0,03	76
CS 13	8,08	5,36±0,05	66,3	6,09±0,06	75,4
CL 2	8,08	5,34±0,06	66,1	5,97±0,07	73,9

**Tableau 7.** Dénombrement des isolats exposé à différentes concentrations en sels biliaire pendant 3h d'incubation.

Les souches	Bile 0,5%			Bile 1%	
	t0	t1 (3h)	Taux de survie (%)	t1 (3h)	Taux de survie(%)
BS 1	8,08	6,28±0,02	77,7	6,05±0,06	74,9
BS 15	8,08	6,21±0,05	76,9	5,90±0,08	73
BS 16	8,08	6,04±0,03	74,8	5,90±0,05	73
CS 6	8,08	5,31±0,02	65,8	5,35±0,05	66,3
CS 13	8,08	5,34±0,04	66,1	5,33±0,05	65,9
CL 2	8,08	5,32±0,02	65,9	5,38±0,07	66,6

#### 4.4.2. Tolérance au lysozyme

La résistance des souches BL étudiées au lysozyme à 30 min a été exprimée en pourcentage de survie les résultats sont établis dans le tableau 8. Les six souches sélectionnés ont montré une forte résistance au lysozyme (>80de survie) à part la souche BS16 qui a enregistré une résistante un peu plus faible (87,02%).

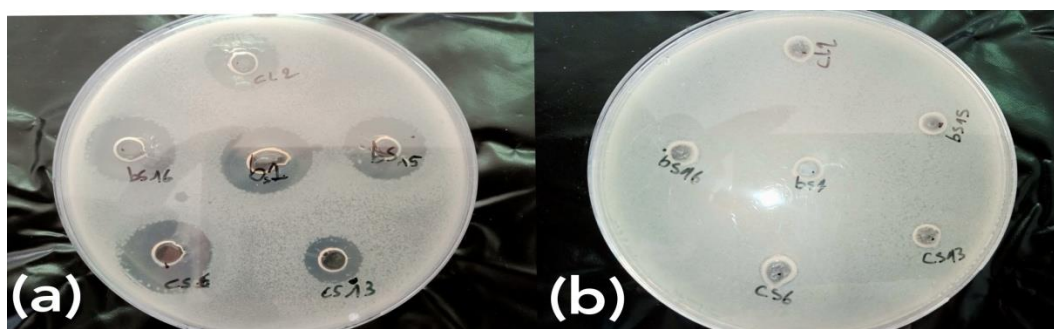
Par exemple les résultats de Sirichokchatchawan (2018) ont montré que l'espece *L. plantarum* isolée à partir de matières fécales de porcs a été résistante à l'activité enzymatique de lysozyme (72,8% - 88,6%).

**Tableau 8.** Dénombrement des isolats en présence de lysozyme pendant 2h d'incubation.

Les souches	Lysozyme		
	t0	t1 (2h)	Taux de survie (%)
BS 1	8,08	7,25±0,05	89,7
BS 15	8,08	7,11±0,06	88
BS 16	8,08	7,03±0,07	87,02
CS 6	8,08	7,03±0,05	87
CS 13	8,08	7,16±0,08	88,6
CL 2	8,08	7,04±0,05	87,1

#### 4.5. Activité antibactérienne

La capacité des souches bactériennes à inhibé la croissance des agents pathogènes a été examiné par le test des puits à partir des surnageant à pH4,3 (original) et d'autres avec pH7 (pour neutralisé les acides organiques), où Les résultats ont révélé que les surnageant (pH4,3) des isolats présentaient une activité inhibitrice contre *E. coli*, suivi par *P. aureginosa* et *S. aureus*. Aucun effet a été observé pour les surnageant avec pH neutralisé. Les diamètres des zones d'inhibition sont établis dans le (tableau 9).



**Figure 11.** Résultats de l'activité antibactériennes des surnageants avec (a) pH non ajusté et (b) pH neutralisé (Original, 2023).

**Tableau 9.** Activité antibactérienne des surnageants des isolats avec pH non neutralisé.

isolats	Souches indicatrice, diamètre d'inhibition (mm)		
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 9632)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
<b>BS1</b>	9	5	7
<b>BS15</b>	12	6	9
<b>BS16</b>	10	6	8
<b>CS6</b>	8	7	9
<b>CS13</b>	7	3	5
<b>CL2</b>	8	5	6

Les présents résultats sont en accord avec ceux de Shahverdi *et al.* (2023) et Sirichokchatchawan *et al.* (2018), qui ont rapporté que les isolats appartenant au genre *Lactobacillus* ont produit une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

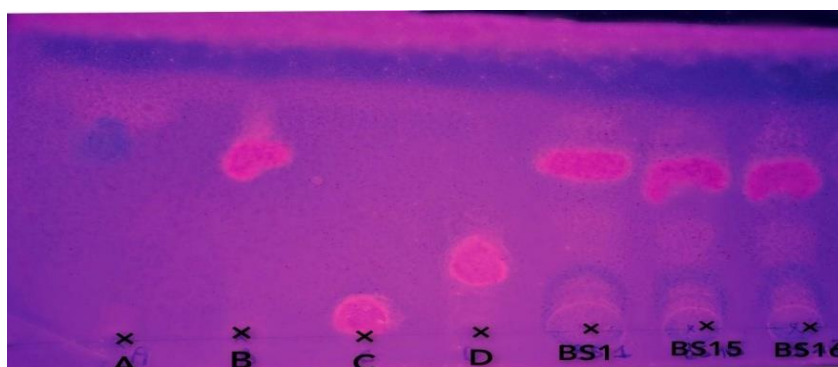
Ainsi que les résultats de Yerlikaya *et al.* (2020) qui ont rapporté que les isolats appartenant au genre *Enterococcus* et qui ont été isolés du lait cru et des produits laitiers traditionnels ont montré que la majorité des souches avaient un effet sur *E. coli*, suivi par *S.aureus* et *P. aereginosa*.

Par conséquent, les résultats de Reuben *et al.* (2019) ont indiqué que la production d'acide a fortement contribué à l'effet inhibiteur de ces isolats BL, et c'est ce que nos études

ont prouvé ; en supposant que les substances responsable à l'inhibition des souches pathogènes sont les acides organiques produits par les souches de BL.

#### 4.6. Résultats de la CCM

Les résultats de la CCM suggèrent que Les chromatogrammes des acides organiques (l'acide acétique (A) ont produit des taches bleues, l'acide lactique (B) des taches rouge, l'acide succinique (C) des taches jaunes et l'acide citrique (D) des taches jaunes foncées). Alors que les autres chromatogrammes des bouillons des isolâtes bactériennes (BS1, BS15, BS16) ne présentaient que de l'acide lactique, 3 taches rouges. (Voir figure12).



**Figure 12.** Résultats de séparation des acides organique (l'acide acétique (A), l'acide lactique (B), l'acide succinique (C) et l'acide citrique (D)) et d'analyse des bouillons des isolâtes bactériennes (BS1 : *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1, BS15 : *Lactobacillus plantarum*1 et BS16). (Original, 2023).

Selon les résultats obtenus les souches bactériennes étudiées est appartient au genre *Lactobacillus*, nous remarquons que sont similaires à ceux obtenus par Lee *et al.* (2001) a montré que les *Lactobacillus* peuvent être facilement distingués par L'apparition des taches rouges sur la plaque CCM. Ce qui était représenté par trois des bactéries (I) *L. casei*, (J) *L. bulgaricus*, (K) *L. acidophilus* ne produisent que de l'acide lactique.

#### 4.7. Résultats d'identification des isolats par API 50 CHL

Après incubation de 48h. Le tableau présent dans l'annexe4 révèle les résultats du profil fermentaire des sucres, évalués à l'aide du système API 50, pour les deux souches étudiées. Cette analyse nous permet d'obtenir une identification approximative de nos souches, dont la répartition est la suivante :

**BS1** : *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 et **BS15** : *Lactobacillus plantarum* 1.



**Figure 13.** Résultats de l'identification par API 50 CHL de deux isolats BS1, BS15 (Original, 2023).

# **Conclusion**



---

## Conclusion

En conclusion, cette analyse approfondie nous a permis de mettre à jour nos connaissances sur certaines des caractéristiques des bactéries lactiques d'origine humaine.

Comme nous avons trouvé plus tôt que les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent des bénéfices pour la santé de l'hôte. Les bactéries lactiques, en particulier, sont largement étudiées en raison de leur capacité à survivre et à coloniser l'environnement intestinal, où elles peuvent exercer des effets bénéfiques sur la santé.

L'objectif de ce travail était d'évaluer le potentiel probiotique des souches de bactéries lactiques isolées à partir des selles de nourrissons et du lait maternel, en utilisant des tests *in vitro*. Grâce à ces tests, nous avons pu confirmer que ces souches présentent la capacité d'inhiber les bactéries pathogènes, de survivre dans des conditions défavorables du tractus gastro-intestinal et de ne pas présenter d'activités potentiellement nocives, telles que l'activité gélatinase ou ADNase.

Nos résultats ont montré que tous les isolats avaient un potentiel probiotique, en particulier les deux souches *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1* (BS1) et *Lactobacillus plantarum 1*(BS15).

Ces résultats constituent une avancée significative dans notre compréhension des bactéries lactiques et ouvrent de nouvelles perspectives pour leur utilisation future dans le développement des produits probiotiques bénéfiques pour la santé humaine. De plus une identification génotypique avec les techniques de biologie moléculaire est importante pour bien comprendre et distinguer les caractères des souches avec potentiel probiotique.

Cependant, il est important de noter que malgré les preuves encourageantes, certaines lacunes persistent dans la compréhension des mécanismes d'action précis des bactéries lactiques d'origine humaine. Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider davantage ces mécanismes et pour évaluer l'efficacité et la sécurité de ces probiotiques spécifiques. Il convient également de développer des formulations et des modes d'administration appropriés pour garantir la viabilité et la stabilité des bactéries lactiques lorsqu'elles sont ingérées.

# **Bibliographie**

---

## Bibliographie

Afzal M. I. 2012. Physiology and technological aspects of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 in food biopreservation. These de doctorat, université de Lorraine, pp. 10-19.

Al-Balawi M. M. F. 2020. *Enterococcus faecalis* Is a Better Competitor Than Other Lactic Acid Bacteria in the Initial Colonization of Colon of Healthy Newborn Babies at First Week of Their Life. *frontiers in microbiology* 11(2017):2.

Albesharat R., Ehrmann M. A., Korakli M., Yazaji S., Vogel R. F. 2011. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology* 34(2):148-155.

Albuquerque D T. M. R., Garcia E. F., de Oliveira A. A., Magnani M., Saarela M., de Souza E. L. 2018. In vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. *Probiotics and antimicrobial proteins* 10 :704-716.

Al Kassaa I. 2014. recherche et caractérisation du potentiel antiviral et probiotique de nouvelles souches de bactéries lactiques d'origine vaginale. Thèse de doctorat, université de Lille1, pp. 19-151.

Atya. A. K. 2016. recherche et caractérisation de nouveaux peptide antimicrobien à partir de bactéries lactiques isolé de méconium. Thèse de doctorat, université de Lille 1- sciences et technologies, France, pp. 12-18.

Ayivi R. D., Gyawali R., Krastanov A., Aljaloud S. O., Worku M., Tahergorabi, R., Ibrahim S. A. 2020. Lactic acid bacteria: Food safety and human health applications. *Dairy* 1(3): 202-232.

Azevedo M. 2013. Engineering of Lactic Acid Bacteria strains modulating immune response for vaccination and delivery of therapeutics. Thèse de doctorat, université Paris Sud, France, pp. 31-41.

Belhamra Z. 2018. Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires. Thèse de doctorat, université Ferhat Abbas Sétif 1, pp. 7-13.

- Bouchard D. 2013. Potentiel probiotique des bactéries lactiques de l'écosystème mammaire bovin contre les mammites à *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat, université de Rennes 1, France, pp. 39-135.
- Bouguerra A. 2021. Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle. Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1, p. 20.
- Carr F. J., Chill, D., Maida N. 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey 28(4): 281–370.
- Clement M. 2018. Les probiotiques: les produits sur le marché français, formulation, mode d'action et procédés. Thèse de doctorat, université Claude Bernard, p. 60.
- Donohoe D. R., Garge N., Zhang X., Sun W., O'Connell T. M., Bunger M. K., Bultman S. J. 2011. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metabolism* 13(5):517-526.
- 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. Thèse de doctorat, université de Bourgogne –AgroSup Dijon Ecole Doctorale Environnement – Santé, p. 9.
- Falagas M. E., Betsi G. I, Athanasiou S. 2006. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(2):266-272.
- Faouzi L. 2014. Utilisation de bactéries lactiques probiotiques pour prémunir les poissons d'élevage contre des vibrions pathogènes. Thèse de doctorat, Université de Bretagne occidentale, Brest; université de Monastir, tunisie, pp. 28 – 39.
- Figueroa G. I., Cruz-Guerrero A., Quijano G. 2011. Les bienfaits des probiotiques sur la santé humaine. *The journal of Microbial Biochem Technol* 1:1948-5948.
- Fusco V., Quero G.M., Cho G.S., Kabisch J., Meske D., Neve H., Bockelmann W., Franz C.M. 2015. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in microbiology* 6:155.

- Gagnon M. 2007. Rôle des probiotiques lors d'infections entériques d'origine bactérienne et virale : analyses in vitro et études in vivo chez des modèles murins. Thèse de doctorat, Québec : université de Laval. Canada, p. 10.
- Galia W. 2011. Caractérisation de la variabilité du système protéolytique de surface de la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus*. Thèse de Doctorat, université de Lorraine, pp. 16 -22.
- Ge Y., Yang J., Lai X.H., Zhang G., Jin D., Lu S., Wang B., Huang Y., Huang Y., Ren Z., Zhang X. 2020. *Vagococcus xieshaowenii* sp. nov., isolated from snow finch (*Montifringilla taczanowskii*) cloacal content. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(4):2493-2498.
- George F. 2021. Utilisation des bactéries alimentaires et intestinales pour la bioremédiation in vivo des contaminants métalliques. Thèse de doctorat, université de Lille, France, pp. 34 -46.
- Gopal P. k. 2020. Lactic Acid Bacteria: An Overview. Reference Module in Food Sciences: 1-2.
- Guindo C. O., Morsli M., Bellali S., Drancourt M., Grine G. 2022. A *Tetragenococcus halophilus* human gut isolate. *Current Research in Microbial Sciences* 3:100112.
- Huang R., Wang K., Hu, J. 2016. Effect of probiotics on depression: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients* 8(8):483.
- Isnard C. 2017. *Enterococcus spp.* : entre pathogènes opportunistes et probiotiques. Thèse de doctorat, université de Caen Normandie, France, pp. 20 - 37.
- Karam H. Z., and Karam N. E. 2006. Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura* 24(3):153-156.
- Kassas Z. 2017. Croissance de souches de bactéries lactiques d'intérêts technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié. Thèse de doctorat, université de Badji Mokhtar–Annaba, p. 158.
- Kavitake D., Devi P. B., Delattre C., Reddy G. B., Shetty P. H. 2023. Exopolysaccharides produced by *Enterococcus* genus: An overview. *International Journal of Biological Macromolecules* 226 : 111-120.

Khalid K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)*:1-13.

Lavilla-Lerma L., Pérez-Pulido R., Martínez-Bueno M., Maqueda M., Valdivia E. (2013). Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses. *International journal of food microbiology* 163(2-3):136-145.

Lee K. Y., So J. S., Heo T. R. 2001. Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level. *Journal of Microbiological Methods* 45(1):1-6.

Liang H., Ze X., Wang S., Wang Y., Peng C., Cheng R., Jiang F., Wu S., He R., He F., Zhang X. 2022. Potential Health-Promoting Effects of Two Candidate Probiotics Isolated from Infant Feces Using an Immune-Based Screening Strategy. *Nutrients* 14(17):365.

Lonvaud-Funel A. 2014. *Leuconostocaceae* family. *Encyclopedia of Food Microbiology*: 455-465.

Lopes M. D. F. S., Simões A. P., Tenreiro R., Marques J. J. F., Crespo M. T. B. 2006. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International Journal of Food Microbiology* 112(3):208–214.

Lorenzo J. M., Munekata P. E., Dominguez R., Pateiro M., Saraiva J. A., Franco D. 2018. Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: general aspects and overall description. In *Innovative technologies for food preservation*: 53-107.

Makete G. 2015. Isolation identification and screening of potential probiotic bacteria in milk from South African Saanen goats. *Mémoire de master, university of Pretoria*, 78 p.

Malbezin C. 2017. Place des probiotiques dans la prise en charge des maladies humaines. *Thèse de doctorat, université de Picardie Jules Verne*, pp. 8-16.

Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín M.L., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of pediatrics* 143(6):754-758.

Nectoux H. 2022. Probiotiques: état des lieux des connaissances, rôles thérapeutiques actuels et à venir . Thèse de doctorat, université de Limoges, p. 43.

Niarquin A. 2022. Le microbiote intestinal: fonctions physiologiques, interactions avec les probiotiques et nouvelles avancées thérapeutiques. Thèse de doctorat, université d'Aix-Marseille, p. 48.

Pelucchi C., Chatenoud L., Turati F., Galeone C., Moja L., Bach J. F., La Vecchia C. 2012. Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis. *Epidemiology*:402-414.

Poli J. 2020. Les probiotiques: leurs mécanismes d'action et leur place dans l'arsenal thérapeutique du conseil officinal associés dans les troubles digestifs. Thèse de doctorat, université d'Aix-Marseille, pp. 52-55.

Poupet C. 2020. Caractérisation in vivo des propriétés antimicrobiennes de la souche probiotique Lcr35® Utilisation du modèle *Caenorh abditis elegans* pour l'étude des interactions hôte-microorganismes .Thèse de doctorat, université Clermont Auvergne (UCA), p. 58.

Raheem A., Liang L., Zhang G., Cui S. 2021. Modulatory effects of probiotics during pathogenic infections with emphasis on immune regulation. *Frontiers in Immunology* 12:616713.

Rastogi S., Mittal V., Singh A. 2020. In vitro evaluation of probiotic potential and safety assessment of *Lactobacillus mucosae* strains isolated from donkey's lactation. *Probiotics and antimicrobial proteins* 12:1045-1056.

Reuben R. C., Roy P. C., Sarkar S. L., Alam R. U., Jahid I. K. 2019. Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC microbiology* 19:1-20.

Samot J. 2012. Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux. Thèse de doctorat, université de Bordeaux Ségalen (Bordeaux 2), p. 26.

Shahverdi S., Barzegari A. A., Vaseghi Bakhshayesh R., Nami Y. 2023. In-vitro and in-vivo antibacterial activity of potential probiotic *Lactobacillus paracasei* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Heliyon* 9(4): 4.

- Sirichokchatchawan W., Pupa P., Praechansri P., Am-In N., Tanasupawat S., Sonthayanon P., Prapasarakul N. 2018. Autochthonous lactic acid bacteria isolated from pig faeces in Thailand show probiotic properties and antibacterial activity against enteric pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis* 119:208-215.
- Teklay A. (2018). Isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract (git) of poultry. Mémoire de master, université de Haramaya, 46 p.
- Toyosi O. M., Olubunmi A., Simeon O. 2017. Screening of Indigenous Bacterial Isolates from Dawadawa (African Locust Beans) in North Central Nigeria. *Biochemistry and Molecular Biology* 2(6):67.
- Verdenelli M. C., Ghelfi F., Silvi S., Orpianesi C., Cecchini C., Cresci A. 2009. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *European journal of nutrition* 48:355-363.
- Villegier R. 2014. Etude in vitro des propriétés probiotiques de bactéries du genre *Bacillus* : Interaction avec l'hôte et effets de l'association avec un prébiotique. Thèse de doctorat, Université de Limoges, p. 24.
- Watterlot L. 2010. Analyse des effets de souches probiotiques anti-inflammatoires. Thèse de doctorat, Agro Paris Tech, pp. 57-184.
- Whiley, R. A. and Hardie J. M. 2015. *Streptococcus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*: 1-86.
- Yan F. and Polk D. B. 2012. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 277(52):50959.
- Yerlikaya O. and Akbulut N. 2020. In vitro characterisation of probiotic properties of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. *International Journal of Dairy Technology* 73(1):98-107.
- Zarour K., Benmechernene Z., Hadadji M., Moussa-Boudjemaa B., Henni J. E., Kihal M. 2013. Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nature & Technology* (8):39.



Zaylaa M. 2018. Probiotique et autophagie: exploration de l'impact possible sur la maladie de Crohn. Thèse de doctorat, L'université de Lille1 Sciences et Technologie, p 71-83.

# **Annexes**

---

# Annexes 1

## Composition des milieux de culture utilisés

### Bouillon MRS- cys

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1mL
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate de sodium	2 g
Sulfate de magnésium	0,2g
Sulfate de manganèse	0,05g
L-cystéinehydrochloride	0.05 g
Eau distillée	1000 mL

PH 6,7.

Autoclaver à 120 °C/20min.

. Pour la gélose **MRS-cyson** a ajoute 16g agarsur le **Bouillon MRS- cys**.

### Gélose à gélatine :

Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Gélatine	30g
Agar	16g
Eau distillée	1000 ml

PH 6,7.

Autoclaver à 120 °C/20min.

## Annexes 2

### Gélose BFM

Extrait de viande	2 g
Extrait de levure	7 g
Amidon	2 g
Chlorhydrate de l- cystéine	0,5 g
Chlorure de sodium	5 g
Peptone	5 g
Tryptone	2 g
Lactulose	5 g
Riboflavine	1 mg
Chlorhydrate de chlorure de thiamine	1 mg
Bleu de méthylène	16 mg
Chlorure de lithium	2 g
Acide propionique (99%)	5 ml
Agar- agar	16 g
Eau distillée	1000 ml

PH a été ajusté à 5,5.

Autoclaver à 120 °C/20min.

### Milieu GN (Gélose nutritif) molle

Peptone	15g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
Agar- agar	10g
Eau distillée	1000ml

PH 7

## Annexes 3

### Coloration de Gram

. Une coloration au cristal violet (violet de gentiane) est ajoutée sur la culture fixée. Après 10 à 60 secondes, la tache est déversée et l'excédent de tache est rincé à l'eau. Le but est de laver la tache sans perdre la culture fixée.

. Une solution d'iode (lugol) est utilisée pour recouvrir le frottis pendant 10 à 60 secondes. Cette étape est connue sous le nom de "fixation du colorant". La solution d'iode est évacuée et la lame est rincée à l'eau courante. L'excès d'eau de la surface est secoué.

. Quelques gouttes de décolorant (éthanol) sont ajoutées à la lame. Cette étape est connue sous le nom de "traitement au solvant". La lame est rincée à l'eau en 5 secondes.

. Le frottis est contre-coloré avec une solution basique (fuchsine) pendant 40 à 60 secondes. La solution de fuchsine est lavée à l'eau et l'excès d'eau est épongé avec le papier absorbant.

. La lame peut également être séchée à l'air après avoir secoué l'excès d'eau.

### MRS-BCP CHL medium

(Ce milieu est préparé à partir d'un bouillon MRS sans glucose, contenant du pourpre de bromocrésol (BCP) de 0,04 g/l, qui sert d'indicateur de pH).

### Préparation de McFarland Standards (Mcf 2, McF 4)

**Tableau.** La charge et Préparation de McFarland Standards

Standard no.	Vol (ml)		No. of bacteria/ml (10 <sup>8</sup> ) represented
	BaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (1.175%)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1%)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

## Annexes 4

**Tableau.** Les résultats d'API 50 CHL des isolats

	Test/Isolates	BS1	BS15
0	<b>Témoin</b>	-	-
1	<b>Glycerol</b>	-	-
2	<b>Erythritol</b>	-	-
3	<b>D-Arabinose</b>	-	-
4	<b>L-Arabinose</b>	-	+
5	<b>D-Ribose</b>	+	+
6	<b>D-Xylose</b>	-	+
7	<b>L-Xylose</b>	-	-
8	<b>D-Adonitol</b>	-	-
9	<b>Méthyl-βD-Xylopyranoside</b>	-	-
10	<b>D-Galactose</b>	+	+
11	<b>D-Glucose</b>	+	+
12	<b>D-Fructose</b>	+	+
13	<b>D-Mannose</b>	+	+
14	<b>L-Sorbose</b>	-	+
15	<b>L-Rhamnose</b>	+	+
16	<b>Dulcitol</b>	-	-
17	<b>Inositol</b>	-	-
18	<b>D-Mannitol</b>	+	+
19	<b>D-Sorbitol</b>	+	+
20	<b>Méthyl-αD-Mannopyranoside</b>	-	-
21	<b>Méthyl-αD-Glucopyranoside</b>	-	+
22	<b>N-Acétyleglucosamine</b>	+	+
23	<b>Amygdaline</b>	±	+
24	<b>Arbutine</b>	+	+
25	<b>Esculinecitratedefer</b>	+	+
26	<b>Salicine</b>	+	+
27	<b>D-Cellobiose</b>	-	+
28	<b>D-Maltose</b>	-	±
29	<b>D-Lactose(originebovine)</b>	+	+
30	<b>D-Melibiose</b>	-	-
31	<b>D-Saccharose</b>	+	+
32	<b>D-Tréhalose</b>	+	+
33	<b>Inuline</b>	-	-
34	<b>D-Mélézitose</b>	+	+
35	<b>D-Raffinose</b>	-	-
36	<b>Amidon</b>	-	±
37	<b>Glycogène</b>	-	±
38	<b>Xylitol</b>	-	-
39	<b>Gentiobiose</b>	-	±
40	<b>D-Turanose</b>	+	+
41	<b>D-Lyxose</b>	-	-
42	<b>D-Tagatose</b>	+	+
43	<b>D-Fucose</b>	-	-
44	<b>L-Fucose</b>	-	-
45	<b>D-Arabitol</b>	-	-
46	<b>L-Arabitol</b>	-	-
47	<b>PotassiumGluconate</b>	-	±
48	<b>Potassium2-Cétogluconate</b>	-	-
49	<b>Potassium5-Cétogluconate</b>	-	-

## Résumé

Les bactéries lactiques sont l'un des principaux microorganismes probiotique qui ont un effet bénéfique sur la santé humaine. Alors, dans le but d'isoler ces BL et de tester leur effet probiotique, 40 souches ont été sélectionnées à partir d'échantillons de selles de nourrissons et de lait maternel. Parmi ces souches, 6 ont été soumises à des tests approfondis, incluant leur caractérisation morphologique, physiologique et biochimique. Ces souches, de forme cocci/bacille, gram(+) et catalase(-), ont démontré une tolérance à l'acidité gastrique, aux sels biliaries, au lysozyme et à une concentration élevée de NaCl (6,5%). Elles ont également montré la capacité d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes, sans présenter d'activités gélatinase ou adnase, et sans produire de gaz CO<sub>2</sub>. Les bacilles ont été identifiés grâce à la technique de CCM et à l'API50CHL, et classés comme appartenant aux espèces *Lb paracasei* ssp *paracasei* 1 et *Lb plantharum*. Les résultats de ces tests ont révélé que toutes les souches étudiées présentaient un potentiel probiotique.

**Mot clés :** bactéries lactiques, probiotique, selles de nourrissons, lait maternel, *Lb paracasei*, *Lb plantharum*.

## Abstract

Lactic acid bacteria are one of the main probiotic microorganisms that have a beneficial effect on human health. Therefore, in order to isolate these LAB and test their probiotic effect, 40 strains were selected from samples of infant feces and breast milk. Among these strains, 6 strains were subjected to comprehensive testing, including morphological, physiological, and biochemical characterization. These cocci/bacilli, gram-positive, and catalase-negative strains, demonstrated tolerance to gastric acidity, bile salts, lysozyme, and a high concentration of NaCl (6.5%). They also showed an ability to inhibit the growth of pathogenic bacteria, without exhibiting gelatinase or adnase activities, and without producing CO<sub>2</sub> gas. The bacilli were identified using the CCM technique and API50CHL, and classified as belonging to the species *Lb paracasei* ssp *paracasei* 1 and *Lb plantharum*. The results of these tests revealed that all the strains studied had probiotic potential.

**Key words:** lactic acid bacteria, probiotic, infant stools, breast milk, *Lb paracasei*, *Lb plantharum*.

## ملخص

تعد بكتيريا حمض اللاكتيك واحدة من الكائنات الحية الدقيقة بروبيوتيك الرئيسية التي لها تأثير مفيد على صحة الإنسان. وبهدف عزل هذه الخلايا واختبار تأثيرها الحيوي، تم اختيار 40 سلالة من عينات براز الرضيع وحليب الثدي. من بين هذه السلالات، تم إخضاع 6 سلالات لاختبارات متعمقة، بما في ذلك توصيفها المورفولوجي والفسولوجي والكيميائي الحيوي. أظهرت هذه السلالات، أنها ذات شكل الكروي / العصوي ، موجبة الغرام (+) وسالبة الكاتالاز (-) ، تحمل حموضة المعدة والأملاح الصفراوية والليزوزيم وارتفاع تركيز كلوريد الصوديوم (6.5%). لقد أظهروا أيضًا القدرة على تثبيط نمو البكتيريا المسببة للأمراض، دون إظهار أنشطة gélatinase أو ADNase، ودون إنتاج غاز ثاني أكسيد الكربون. تم التعرف على العصيات باستخدام تقنية CCM وAPI50CHL، وتم تصنيفها على أنها تنتمي إلى نوعين *Lb paracasei* ssp *paracasei* 1 و *Lb plantharum*. أظهرت نتائج هذه الاختبارات أن جميع السلالات المدروسة أظهرت إمكانات بروبيوتيك.

**الكلمات المفتاحية:** البكتيريا اللاكتيكية، البروبيوتيك، براز الرضيع، حليب الثدي، *Lb paracasei*, *Lb plantharum*.