



Université Mohamed Khider de Biskra

Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de
la vie

Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :

Rahal Khaoula

Ben mabrouk Chaima

Le :lundi 3 juillet 2023

Thème

L'effet probiotique des bactéries lactiques d'origines animales

Jury :

Mme.	Djouamaa Manal	MCB	Université de Biskra	Président
M.	Benkaddour Bachir	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
M.	Amairi Toufik	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord le Dieu le tout puissant qui nous a procuré du courage et de la volonté pour avoir terminé ce travail.

Nous tenons à remercier notre promotrice Mme : Benkaddour Bachir pour ses conseils, son soutien et son encadrement afin de réaliser ce travail

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 d'université de biologie de Biskra pour leurs disponibilité et conseils.

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

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Ma chère mère : Zahia Massaoudi qui a inséré le gout de ma vie et

La source de mes efforts et mon bonheur, que Dieu le garde pour moi .

Mon cher père Mr: Jomi qui a été le sens de responsabilité

Et de courage, que Dieu te donne

La santé et une longue vie

À mes yeux, Maïssa, Isra pour leurs encouragements et pour leurs aides

et leur amour .Que Dieu la garde pour moi

À mes frères : Arbi, Hatam, Mirag,

Ma chère tante : Zina pour ses conseils et son amour

À mes chères amies: Mariem, Khaoula, Zahra, Uman pour tous les

bons moments partagés ensemble,

À mon cher binôme Khaoula pour le travail que nous avons fourni

Chaima

Dédicace

Avec l'aide d'Allah

J'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :

**À mon père "Yahai" et ma mère "Geurra Hakima", je suis ici
grâce à eux, grâce
à leurs prières, leurs conseils et leurs soins, qui ont fait preuve de
beaucoup d'encouragement.**

**À ma famille, A mes chères sœurs et frères. Pour leur soutien,
leurs conseils et leur amour, merci d'avoir toujours soutenue.**

**À mes défunts frères Djaber et Yazid, que dieu fasse miséricorde,
que ont été une source de soutien pour moi 'Allah yarhamhoum'.**

**À mon cher binôme chaima pour le temps qu'on a passé ensemble
pendant la réalisation de ce travail ,et mes copines Meriem,
zahrat-el amal , iman, pour tous les bons moments que nous avons
passés ensemble.**

**A ceux qui m'ont aidé, Encouragé et soutenu dans les moments les
plus difficiles et ceux à qui je distant, je vous dis merci.**

Khaoula

Table des matières

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

Chapitre 1les bactéries lactiques

1.1.Définition les bactéries lactiques.....	4
1.2. Origine et habitat des bactéries lactiques	5
1.2.1. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement.....	5
1.2.2.Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte.....	5
1.3. Classification des Bactéries Lactiques	5
1.3.1. Classification classique.....	5
1.3.2. Classification moléculaire.....	6
1.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques.....	7

Chapitre 2Les probiotiques

2.1.Historiques et définition	8
2.2.Microorganisme utilisé en tant que probiotiques	8
2.3.Mécanisme d'action des probiotiques	9
2.3.1.Exclusion et compétition avec les pathogène pour les sites d'adhésion.....	9
2.3.2.Production des substances à activité antimicrobienne.....	9
2.3.3.Compétition ou niveau de l'utilisation des nutriments	10
2.3.4.Immunomodulation.....	10
2.4.Critères de sélection des probiotiques	101
2.5.Rôle des probiotiques sur la santé de l'hôte	112

Chapitre 3Matériel et méthodes

3.1.Échantillonnage.....	13
3.2.Les milieux de cultures utilisées pour l'isolement des souches	13

3.3. Isolement des souches	13
3.4. Pré-identification des isolats.....	14
3.4.1. Test de catalase	14
3.5. Conservation des souches.....	14
3.6. Identification des souches sélectionnées	15
3.6.1. physiologie et biochimique.....	15
3.6.1.a. Test de croissance en présence de NaCl.....	15
3.6.1.b. Test de production de co2.....	15
3.6.2. Chromatographie sur couche mince.....	15
3.7. Identification de souches à l'échelle de l'espèce.....	17
3.7.1. galerie API50.....	17
3.8. teste d'innocuité des souches.....	18
3.8.1. Test de la gélatinase.....	18
3.8.2. Test de la DNase.....	18
3.9. Mise en évidence in vitro de quelque propriété probiotique	18
3.9.1. Résistance à l'acidité	18
3.9.2. Résistance aux sels biliaires.....	19
3.9.3. Test de lysozyme	19
3.10. La recherche d'Activité antimicrobienne	19
3.10.1. Préparation de l'inoculation.....	19
3.10.2. Préparation du surnageant de l'isolat lactique	20
3.10.3. Réalisation du test d'inhibition.....	20

Chapitre 4 Résultat et discussion

4.1. Isolement des bactéries lactiques.....	22
4.2. Purification des bactéries lactiques	22
4.3. Pré-identification des souches	23
4.3.1. Examen macroscopique	23
4.3.2. Examen microscopique.....	23
4.3.3. Teste catalase	24
4.4. Innocuité des souches sélectionnées.....	25

4.4.1. Production de DNase	26
4.4.2. Test gélatinase.....	26
4.5. Identification des bactéries lactiques.....	27
4.5.1. physiologie et biochimique	27
4.5.1.a. Test de croissance en présence de NaCl	27
4.5.1.b. Test de Production de co2.....	28
4.5.2. Chromatographie.....	28
4.6. Identification au stade d'espèce.....	29
4.7. recherche de l'activités antibactériennes	33
4.8. Sélection des LAB avec des propriétés probiotiques.....	31
4.8.1. Résistance à l'acidité	33
4.8.2. Résistance à sels biliaires.....	34
4.8.3. Résistance au lysozyme	35
Conclusion.....	37
Bibliographie.....	39
Annexes	46
Résumé	55

Liste de tableaux

Tableau 1.les caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques.....	7
Tableau 2. Micro-organismes considérés comme probiotiques.....	9
Tableau 3. se dessus représente les Principaux critères de sélection des souches probiotiques	11
Tableau 4. les codes souches pathogènes.....	21
Tableau 5. Caractères morphologiques des bactéries lactiques isolées sur MRS et M17 et BFM	25
Tableau 6. les résultats d'isolement et purification des souches de bactéries lactiques	25
Tableau 7. Diamètres des zones d'inhibition	32
Tableau 8. Effet du pH acide sur la viabilité des souches lactiques (log UFC/ml).....	33
Tableau 9. Rapporte les comptes viables de nos souches en présence de 0,5 % et 1 % sels biliaires.....	34
Tableau 10. Effet de lysozyme sur la viabilité des souches lactiques (log UFC/ml).....	35

Liste des figures

Figure 1. Aspect microscopique des bactéries lactiques observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x10000) : (A), <i>Lactobacillus Rosell-11</i> ; (B), <i>Leuconostoc lactis</i> (http://www.institut-rosell-lallemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus-R52_big.jpg).....	4
Figure 2. Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques, incluant quelques genres aérobie et anaérobie facultatif de <i>Firmicutes</i>	6
Figure 3. les échantillon prelevé	12
Figure 4. la technique suivie pour l'isolement des bactéries lactique.....	13
Figure 5. Conservation à long terme	15
Figure 6. cuve de chromatographie sur couche mince (d), et les acides organiques que utilisé (e)	17
Figure 7. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des puits.....	21
Figure 8. repiquage sur milieu solide.....	22
Figure 9. repiquage dans un milieu liquide.....	23
Figure 10. aspect macroscopique sur milieu MRS et M17 solide des souches lactiques isolées	23
Figure 11. observation microscopique des souches lactiques après coloration de Gram (Gx100)	24
Figure 12. résultat après la mise en évidence du test de catalase.....	24
Figure 13. Détection de DNase chez certaines souches	26
Figure 14. Détection de la gélatinase chez certaines souches présumées probiotiques.....	27
Figure 15. résultats de test NaCl.....	27
Figure 16. Résultats de test de production de CO ₂	28
Figure 17. témoin	29
Figure 18. Chromatographie sur couche mince,	29
Figure 19. profil fermentaire de la souche B3(<i>Lactobacillus brevis</i>).	30

Liste des abréviations

FAO	Food and Agriculture Organization
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
<i>Bf</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>E</i>	<i>Escherichia</i>
<i>B</i>	<i>Bacillus</i>
<i>S</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Sc</i>	<i>Sacharomyces</i>
<i>St</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>P</i>	<i>Pseudomonas</i>
PR	<i>Propionibacterium</i>
IL	Interleukine
CD	cellule dendritique
LB	lymphocytes B
LT	lymphocytes T
Cys-HCL	L-cystéine hydrochloride
LGA	Immunoglobulin A
MRS	Man, Rogosa et sharp
ADN	Acide désoxyribonucléique
t	Temps
°C	Degrés Celsius
pH	Potentiel Hydrogène
%	Pour cent
HCL	Chlorure d'hydrogène
h	Heur

API 50 CH	Carbohydrate fermentation Strips
BAL	Lactic Acid Bacteria
CO2	dioxyde de carbone
G	gramme
Gram+	Gramme positive
MI	Microlitre
GRAS	Generally Regarded As Safe
QPS	Qualified Presumption of Safety
IFN-	γ interféron- γ
Log	Logarithme décimal
ml	millilitre
mm	millimètre
NaOH	hydroxyde de sodium
CCM	La chromatographie sur couche mince
pd	pendant
UFC	unité formant colonie
CMH II	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
T	Température
NaCl	Chlorure de Sodium

Introduction générale

Introduction générale

Le microbiote intestinal correspond à communauté des micro-organismes (bactéries mais aussi des virus, des champignons dans l'intestin qui exerce un interaction symbiotique ou commensal entre elles. ils sont responsables de trois fonctions principales et essentielles : métaboliques, trophiques et de défense(Maresch *et al.*,2018)

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes très courants dans la nature, ils jouent un rôle important dans notre santé car ils constituent une fraction importante de notre flore intestinale et recouvrent les muqueuses nasales, buccales et vaginales. Certains membres de ce groupe bactérien sont utilisés comme probiotiques. C'est-à-dire comme une préparation microbienne vivante ayant une action bénéfique sur l'hôte après ingestion.

Plusieurs caractéristiques sont essentielles lors de la sélection des souches probiotiquespotentielles ; le micro-organisme doit être non pathogène, pourrait survivre dans le tractus gastro-intestinale ; tolérer le pH faible dans l'estomac et les concentrations physiologiques de la bile, devraient présenter une bonne hydrophobie de surface pour la colonisation et doit présenter une activité antagoniste contre les agents pathogènes intestinaux (Mishra et Prasad, 2005).

Les résultats d'analyses fondées sur des preuves issues d'études humaines et de modèles animaux ont montré (Bermudez-Brito *etal* .,2012) l'efficacité de certains probiotiques dans le traitement de maladies systémiques et infectieuses telles que la diarrhée aiguë et la maladie de Crohn . D'autres études ont suggéré une application potentielle pour le traitement des maladies cardiovasculaires, d'infections urogénitales, d'infections oropharyngées et de cancers (Bonifait *et al.*,2009).

L'intégration des probiotiques au régime de l'animale favorise la santé animale en créant un équilibre entre la microflore bénéfique et les germes pathogènes qui amélioré l'équilibre de la flore intestinale aurait alors, des conséquences positives sur le rendement animal (Guillot, 1998).

L'objectif de ce modeste travail consiste à caractériser des souches lactiques isolées à partir du tractus gastro-intestinal de 2 animales et évaluer leur aspect probiotique.

Ce travail débute par une synthèse bibliographique qui résume dans un premier chapitre des généralités sur les bactéries lactiques, puis dans un deuxième chapitre, des généralités sur les probiotiques. Il se poursuit par la description des matériels et méthodes utilisés. Dans un troisième chapitre nous présentons nos résultats et leur discussion. Notre travail se termine par la conclusion résume les différents résultats obtenus les perspectives de ce travail.

Chapitre 1

les bactéries lactiques

1.1. Définition les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène constitué de *cocci* et de *bacilli* (figure1) (Pringsulaka et al., 2011). Qui regroupent 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Pediococcus*. Ce sont des bactéries à Gram positif et généralement sont immobiles (Lairini, 2014), asporulées, aéro-anaérobies facultative, dépourvues la catalase et la nitrate réductase (Mermouri, 2018)

Caractérisé par la production de l'acide lactique comme produit majeur du métabolisme. Certaines sont dites homofermentaire car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites hétérofermentaires et produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate ou éthanol et CO₂)(Pringsulaka et al., 2011).

Elles sont, généralement, non pathogènes et considérées comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe) (Pringsulaka et al., 2011).

Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles(Mermouri, 2018).

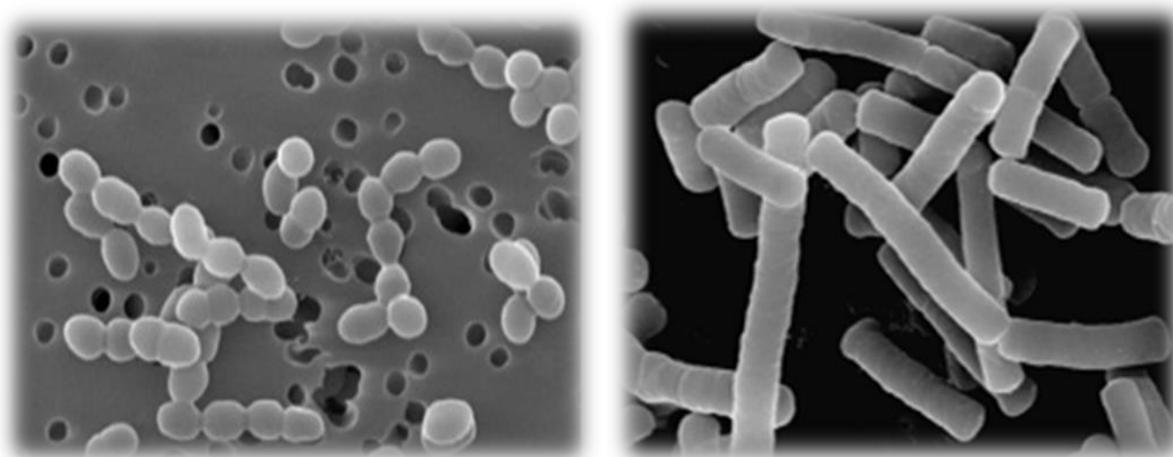


Figure 1.Aspect microscopique des bactéries lactiques observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x10000) : (A), *Lactobacillus Rosell-11*; (B), *Leuconostoc lactis* (http://www.institut-rosell-lallemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus-R52_big.jpg).

1.2. Origine et habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont retrouvées à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte (Makhloufi, 2011).

1.2.1. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement

Les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, etc.). Aussi, peuvent vivre dans les plantes et les fruits, légumes conservés, les viandes et les poissons fermentés, l'eau et les eaux usées, le sol (Gálvez et al., 2011).

1.2.2. Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte

Les bactéries lactiques peuvent vivre avec un hôte tel que l'homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme les muqueuses membranaires : orales, respiratoires, gastro-intestinales, fèces et l'appareil génital chez la femme (Makhloufi, 2011).

1.3. Classification des Bactéries Lactiques

La classification et l'identification des bactéries lactiques. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques et des caractéristiques moléculaires (Belyagoubi, 2014).

1.3.1. Classification classique

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6.5%, 18%), la tolérance aux pH acides, alcalin et à l'éthanol, la configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétone, aussi les marqueurs chimio-taxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire (Bouguerra, 2021).

L'identification des espèces de LAB peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API50CHL (Bouguerra, 2021).

1.3.2. Classification moléculaire

Les critères moléculaires ont permis de classer les espèces est basées selon les critères suivants

- La détermination de la composition des peptidoglycanes (PTG) permet d'observer le type d'espèce selon la nature de la liaison peptidique.
- la composition de l'ADN mesurée par hybridation permet de différencier les genres et les espèces entre eux.

Les BL ont généralement une faible teneur en GC (< 50 mol %), tandis que certaines lactobacilles atteindraient jusqu'à 57 mol % (Saidi, 2020). Cependant, les espèces des genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* dont le G-C % de l'ADN est inférieur à 50 %, peuvent être regroupées dans la branche des *Clostridium* avec *Bacillus*, et séparées de la branche des *Actinomycetales* au G-C % supérieur à 50 %, comprenant *Propionibacterium* et *Bifidobacterium* (Bekhouch, 2006).

Les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des *Firmicutes*, Classe : *Bacilli*, Ordre : *Lactobacillales* qui comprend 6 familles : *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Aerococcaceae*. Ces familles comprennent 38 genres dont 10 considérés comme les plus associés aux aliments : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* et *Weissella* (Bouguerra, 2021).

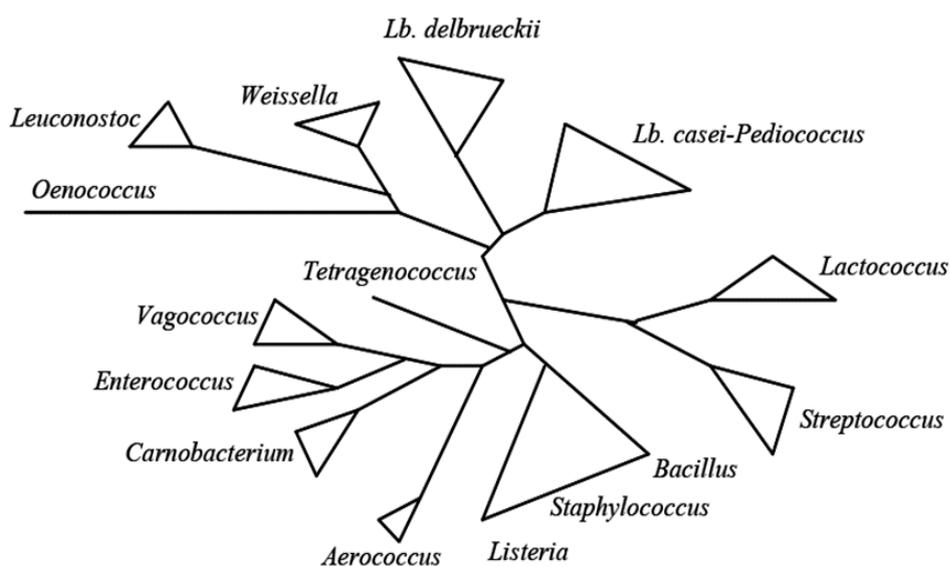


Figure 2. Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques, incluant quelques genres aérobie et anaérobie facultatif de *Firmicutes* (Lahtinen et al., 2012).

1.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

Les principales caractéristiques des bactéries lactiques sont résumées dans le tableau (1).

Tableau (1) : les caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques (Mullan, 2014 ; Badis, Kihal et 2005 ; Boumidiene, 2013).

	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
Morphologies	Bacilles	Bacilles	Coques ovales	Petits bacilles	Coques	Coques	Coques	Coques
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
Type de fermentation	Homo-F/ Hè-F	Hè-F	Hè-F	Hè-F	Homo-F	Homo-F	Homo-F	Homo-F
Type d'acide produit	Lact/ Acetate/	Lact/ Acetate	Lact/Acetate	Lac	Lact	Lact	Lact	Lact
Croissance à 10°C	+/-	-	+	+/-	+	+	+/-	-
45°C	+/-	+	-	+/-	+	-	+/-	+
Ph 4.4	+/-	?	+/-	+/-	+	+/-	+	-
Ph 9.6	-	-	-	+/-	+	-	-	-
NaCl 6.5%	+/-	-	+/-	+/-	+	-	+/-	-
NaCl 18%	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaz à partir de glucose	+/-	-	+	+	-	-	-	-
Isomère d'acide lactique	D,L,/DL	?	D	D,L, DL	L	L	D,L, DL	L
Hydrolyse d'arginine	+/-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-
+ : Positif, - : Négatif, +/-: Réponse varie selon les espèces Production de D-, L- ou DL- acide lactique varie selon les espèces.								

Chapitre2

Les probiotiques

2.1. Historiques et définition

L'attention portée aux bienfaits pour la santé associés à la consommation d'aliments probiotiques a commencé il y a environ un siècle lorsque des observations intrigantes ont été faites parmi certaines populations; Plus précisément, il a été signalé que les Bulgares et les Russes des steppes vivaient plus longtemps que les autres résidents, peut-être en raison de la consommation de lait aigre contenant des bactéries bénéfiques. On pense que les bactéries présentes dans le lait modifient la composition de l'intestin microflore et ainsi favoriser la santé (Byakika, 2019).

De plus des années, Lilly et Stilwell(1965) décrivent les probiotiques comme des micro-organismes stimulant la croissance d'autres micro-organismes (Yasukawa *et al.*, 2008).En 1989, Fuller a redéfini le mot probiotiques comme un complément alimentaire microbien vivant, qui affecte positivement l'animal hôte, en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale (Atia, 2016).

Après avoir passé en revue ces efforts, un groupe d'experts réunis par la FAO et l'OMS en 2001 a proposé la forme actuelle du terme probiotiques : ce sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités appropriées, peuvent fournir des avantages pour la santé (Schneider,2011).

2.2. Microorganisme utilisé en tant que probiotiques

Par définition, les espèces utilisées comme probiotiques doivent avoir la preuve que leur impact est positif sur la santé. Parmi les types de probiotiques, les plus courants sont les lactobacilles et les bifidobactéries. Ils sont présents dans les produits fermentés depuis des décennies, tout comme d'autres telles que *Streptococcus* et *Propionibacterium*, et des levures comme *Saccharomyces cerevisiae* et Certains *Bacillus* et *E. coli* sont également utilisés (Kimmel, 2018).

Tableau 2.Micro-organismes considérés comme probiotiques(Ait belgnaoui, 2006).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobactérium</i>	Autre microorganisme lactiques	Autre microorganisme
<i>Lb.acidophilus, Lb.amylovirus</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>E.feacalis, E.faecium</i>	<i>Bacillus spp,</i>
<i>Lb.brevis, Lb.casei</i>	<i>B.animalis</i>	<i>Lc. Lactis, leu. mesenteroides</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb.cellobius, Lb.crispatus</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>strainNissle</i>
<i>Lb.curvatus, Lb.delbrueckii</i>	<i>B.breve</i>	<i>Sporolactobacillusinulinus</i>	<i>Pr. freudenreichii</i>
<i>Lb.farciminis, Lb.fermentum</i>	<i>B.infantis</i>	<i>St. thermophilus,St.diacetylacti,</i>	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
<i>Lb.gallinarum,Lb.gasseriiL.</i>	<i>B.lactis</i>	<i>St.intermedius</i>	<i>Saccharomyces bournardii</i>
<i>johnsonii, Lb.paracasei</i>	<i>B.longumB.thermop</i>		
<i>Lb.plantarum, L.</i>	<i>hilus</i>		
<i>reuteriLb.rhamnosus</i>			

2.3. Mécanisme d'action des probiotiques

Les mécanismes d'action des probiotiques impliqués dans les effets bénéfiques exercés sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et varient selon les souches. En effet, ces bactéries participent au maintien de l'homéostasie intestinale par quatre grands modes d'action (kechaou,2012).

2.3.1. Exclusion et compétition avec les pathogène pour les sites d'adhésion

Piquepaille,(2013) a rapporté que les bactéries possédants un effet probiotiques sont capable d'exclure les pathogènes en diminuant leur adhésion et leur toxines aux cellules épithéliales en se fixant sur les mêmes sites récepteurs. Ainsi, plusieurs souches de lactobacilles et de bifidobactéries sont en mesure de rivaliser avec des bactéries pathogènes *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*. La compétition de l'adhésion se fait en deux façons :

Compétition non spécifiques : en impliquant des interactions électrostatiques ou hydrophobes qui permettent un rapprochement des bactéries vers leur cible

Compétition spécifiques : est initiés par des facteurs associés à la paroi bactérienne (adhésines) et des récepteurs complémentaires présents sur les cibles. (Lamari, 2014)

2.3.2. Production des substances à activité antimicrobienne

Les probiotiques libèrent des substances antimicrobiennes, notamment peroxyde d'hydrogène, les bactériocines et les acides organiques lactique et acétique (Bouguerra, 2021). Ces acides peuvent diffuser passivement à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée. Ils acidifient le cytoplasme après dissociation et inhibent l'activité enzymatique cellulaire des pathogènes acidosensibles, suite par à une diminution du pH qui affecté la viabilité de pathogènes (Gagnon, 2007).

2.3.3. Compétition ou niveau de l'utilisation des nutriments

Les probiotiques pourraient exploiter de manière compétitive les nutriments essentiels au détriment d'autres bactéries et agents indésirable dans une niche spécifique par la sécrétion d'enzymes extracellulaires dégradant les nutriments (Ishnaiwer, 2003).

2.3.4. Immunomodulation

Les probiotiques peuvent exercer leurs effets sur différents types cellulaires impliqués dans les réponses immunitaires adaptative par (LT, LB) et innée par les cellules dendritiques et les macrophages.

Les CD interagissent directement avec les bactéries probiotiques présentes dans la lumière intestinale, en passant leur dendrites entre les jonctions serrées épithéliales, et indirectement avec des bactéries ayant traversé l'épithélium via les cellules M (Villéger, 2014), Après l'endocyter et de phagocyter l'antigène par CD .elle est présenté par une faible expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II(CMH II) aux lymphocytes T natifs .Leur permettant ainsi de moduler la balance Th1/Th2 et les LT régulateurs FOXP3+producteurs de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) (Grimoud, 2010) essentiels pour la sécrétion des IgA par les lymphocytes B dans la lumière intestinale et contrôlant la réponse immunitaire afin d'éviter une réaction exacerbée(Grimoud,2010 ; Alard, (2017).

2.4. Critères de sélection des probiotiques

L'exploitation de nouvelles souches, espèces, voir même genres bactériens ayant potentiellement de nouvelles propriétés technologiques ou probiotiques à récemment connue un intérêt croissant. Cet intérêt envers des souches nouvelles à inciter à mettre en place des critères rationnels pour le criblage et la sélection des micro-organismes candidats, sans oublier d'évaluer l'efficacité des souches sélectionnées chez l'homme avec des essais

cliniques contrôlés. Ainsi, en 2002, la FAO et l'OMS ont établi les lignes directrices à suivre pour commercialiser un produit contenant des probiotiques (Carmona, 2016).

Tableau 3. se dessus représente les Principaux critères de sélection des souches probiotiques (Cordonnier, 2015)

Critères de Sécurité	<ul style="list-style-type: none"> -Identification taxonomique exacte -Non toxique, non pathogène, GRAS et/ou QPS -Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques
Critères Technologiques	<ul style="list-style-type: none"> -Viabilité et stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini (10⁶ à 10⁸UFC/g) -Conservation des propriétés probiotiques après la production -Qualités organoleptiques souhaitables (ou pas de qualités indésirables) lorsqu'ils sont inclus dans des aliments ou des procédés de fermentation
Compétitivité	<ul style="list-style-type: none"> -Survie et activité métabolique au niveau du site cible in vivo -Tolérance à l'acidité, aux sels biliaires et aux enzymes digestives -Capable de rivaliser avec le microbiote résident et les métabolites fermentaires -Adhésion et colonisation potentielle
Performances Et Fonctionnalités	<ul style="list-style-type: none"> -Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé (efficacité documentée et prouvée dans des études in vitro et in vivo contrôlées chez l'Homme)-Action antagoniste vis-à-vis de bactéries pathogènes -Production de substances anti-microbiennes et/ou bioactives (enzymes, peptides, bactériocines, peroxyde d'hydrogène, acides organiques ou autres composés inhibiteurs) - Propriétés immunostimulantes

GRAS: « Generally Recognized As Safe »; QPS: « Qualified Presumption of Safety »

2.5. Rôle des probiotiques sur la santé de l'hôte

L'efficacité des probiotiques

pour la santé humaine et animale a été démontré par plusieurs auteurs Où ils ont prouvé que certaines souches ont porté des améliorations de la qualité de vie de patient souffrent de diverses maladies bénignes, voire malignes (Mermouri,2018). *Ci-dessous une liste mentionnant quelques rôles essentiels des probiotiques (Millette, 2007).*

- Protection contre les ulcères gastriques par l'action anti-*Helicobacter pylori*
- Détoxification des aflatoxines produite par les *Aspergillus flavus* et *A.parasiticus*
- Interférence, exclusion et antagonisme
- Diminution de l'incidence et la durée des diarrhées
- Modulation de microbiote intestinal
- Soulagement des symptômes associant aux maladies inflammatoires de l'intestin
- Soulagement des symptômes associant à l'intolérance au lactose
- Activité anti-cancérogènes et antimutagènes
- Prévention des vaginoses, vaginites et infections urinaires
- Immunomodulation (allergies /eczéma /inflammation).

Chapitre 3

Matériel et méthodes

3.1.Échantillonnage

Deux sources ont été utilisées afin d'isoler les souches, qui sont à savoir les intestins d'un lapin et abeilles. Les intestin du lapin ont été ensuite mélangé avec de l'eau physiologique cystéinée puis broyer à l'aide d'un mixeur afin d'obtenir un homogénat .Les intestin des abeilles ont été prélevés à l'aide d'une pince à partir de la partie abdomen et mis en suspension dans l'eau physiologique-cystéinée.

L'isolement a été procédé le jour même été le jour même dès procédé la collecte des intestins.

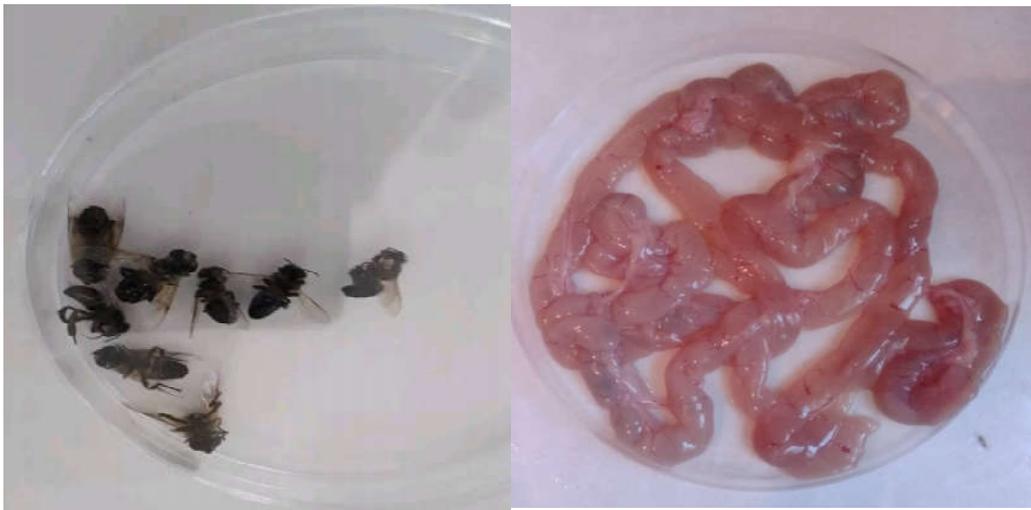


Figure 3. les échantillon prelevé (originale)

3.2. Les milieux de cultures utilisées pour l'isolement des souches

L'isolement des souches a été fait en utilisant des milieux de cultures sélectives pour chaque groupe bactérien. Les Lactobacillus ont été isolés sur milieu MRS additionné par 0.05% de Cys-HCl. Pour les Lactococcus le milieu M17 a été utilisé comme milieu d'isolement. En ce qui concerne les Bifidobacterium, le milieu BFM a été utilisé afin de les isolés.

La composition et la préparation de ces milieux sont indiquées dans l'Annexe (1).

3.3. Isolement des souches

L'isolement des souches lactiques a été fait à partir des homogénats obtenus, Un gramme de chaque échantillon a été prélevé et homogénéisé avec 9 ml d'une eau péptoné stérile (0,85% NaCl) et d'eau peptone cystéine à l'aide d'un vortex.

Une dilution en série a été effectuée (10^{-1} à 10^{-7}) en ajoutant 1 ml de chaque échantillon homogénéisé à 9 ml de solution saline. Ensuite, 1 ml de dernies cinq dilutions premières a été ensemencé dans les boîtes de Pétri en profondeur et versé l'agar MRS et M17 puis 0.1ml a été étalé sur surface de agar BFM et incubé les biotes de Pétri en anaérobiose à l'aide d'une bougie pendant 5 jours à 37°C .

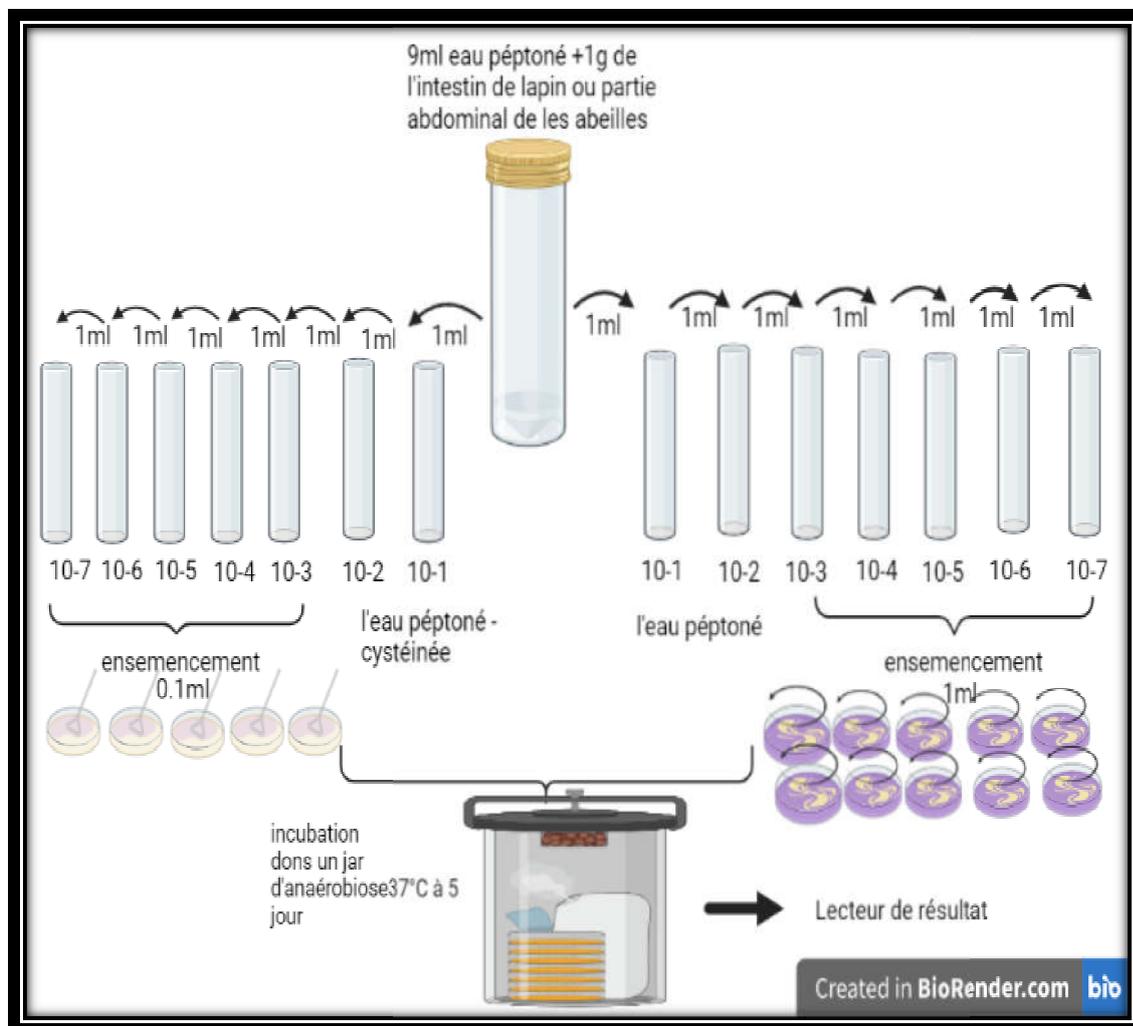


Figure 4. La technique suivie pour l'isolement des bactéries lactiques (originale)

3.4. Pré-identification des isolats

Les isolats obtenus ont été ensuite purifiés par un repiquage successif solide-solide sur les milieux gélosés utilisés pour l'isolement. Cette technique a été refaite à chaque fois en prenant une colonie isolée et la striée dans le but de obtenir des colonies pure et bien définie possédant le même aspect, forme et couleur. La pureté des souches a été vérifiée à l'aide d'un microscope après coloration de Gram. Les étapes de cette technique sont détaillées dans l'annexe (2) Seulement les souches gram + positif ont été retenues pour les tests suivants.

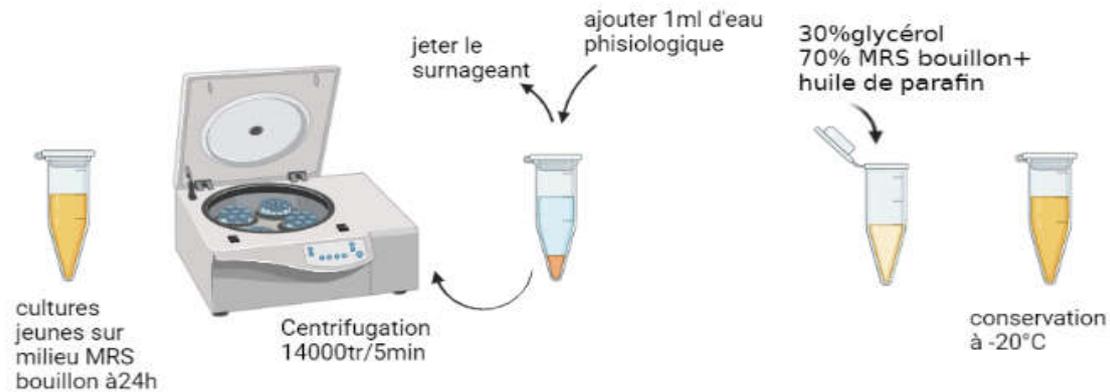
3.4.1. Test de catalase

Les souches gram + retenues ont été ensuite soumises au test de la catalase. Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie d'une colonie bien isolée a été prélevée et diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase. Seulement les colonies catalase négatives ont été retenues.

3.5. Conservation des souches

Les souches pure G+ catalase négatives ont été soumises à une conservation à long terme. Après revivification des souches à 37 °C pendant 24h sur leur bouillon d'isolement liquide.

Les cultures obtenues ont été centrifugées à 14000tr pendant 5min, le culot cellulaire a été retenu et mélangé dans 1 ml du milieu MRS additionné de 30% de glycérol. En fin, 3 gouttes de huile de paraffine à l'aide d'une micropipette. Les souches ont été ensuite conservées à -20°C. La technique est schématisée dans la (figure5).



Created in BioRender.com bto

Figure 5. Conservation à long terme (originale)

3.6. Identification des souches sélectionnées

3.6.1. Physiologique et biochimique

3.6.1. a . Test de croissance en présence de NaCl

Ce test a été réalisé spécifiquement pour les souches en forme cocci et a pour but de déterminer si les souches appartiennent au genre *Enterococcus* ou *Lactococcus*. Après revivification des souches pendant 24h à 37°, 100 µL de chaque culture souche ont été inoculées sur MRS bouillon contenant 6.5% de NaCl. Après l'incubation, dans les mêmes conditions précédentes, la présence d'un trouble bactérien a été examinée. (Nassib, 2013)

3.6.1.b. Test de production de CO₂

La détection de production de CO₂ a été examinée selon (Belhamra, 2017) sur MRS exempt de citrate. 100 µL de culture jeune des souches isolées ont été inoculés dans MRS bouillon sans citrate dans des tubes à essai munis avec une cloche de Durham. Les tubes ont été ensuite incubés à 37°C pendant 24h et ensuite examinés pour la présence de gaz emprisonné dans la cloche.

3.6.2. Chromatographie sur couche mince

Afin de déterminer les souches qui possédant la forme bâtonnet si appartiennent au genre *Lactobacillus* ou au genre *Bifidobacterium*, la technique décrite par Ki-Yong Lee (2001) avec modification a été appliquée. La technique repose sur la chromatographie sur couche mince (CCM). Les étapes de la technique sont décrites ci-dessous.

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorptions ; la phase des solvants (phase mobile), qui progressent sur la long de la plaque CCM (phase stationnaire). Les chromatographiques ont été réalisés dans une chambre rectangulaire de 10x24x24 cm.

Des plaques TLC en gel de silice de 20 cm ont été utilisées dans toutes les expériences. La composition de solvant était acétone– eau –chloroforme– éthanol– hydroxyde d'ammonium.

Les 3 souches cultivées choisies dans ce teste ont été centrifugées à 1400tr/min pendant 5 min, Les surnageant résultants ensuite ont été transférés dans un tube Eppendorf . Pour ce faire des spots de 20 µL de surnagent de chaque souche et 20µL d'une série de solution standard de l'acide lactique, d'acide acétique acide succinique et acide citrique, ont été déposés sur la même ligne de la même plaque (ligne de dépôt).Les chromatogrammes d'acide organique ont été pulvérisés avec une solution indicatrice de rouge de méthyle et bleu de bromophénol dans le méthanol. Chaque échantillon a été taché à 5 mm d'une extrémité avec les surnagent et solutions standard d'acide organique. Un sèche-cheveux de type à main a été utilisé pour sécher les taches. La plaque CCM tachée a ensuite été placée au fond de la chambre chromatographique pour assurer une suffisante en vapeur de solvant et la chambre a été fermée. On a laissé le développement du chromatogramme se poursuivre jusqu'à ce que le solvant ait parcouru 6 à 7 cm au-delà de la ligne de départ 20 min à température ambiante. Les plaques TLC ont ensuite été retirées de la chambre et laissées sécher à l'air. Les plaques de CCM séchées ont été pulvérisées avec la solution indicatrice et la couleur a été développée par un bref chauffage de 1 à 3 min dans un four chaud et sec (165°) (Ki-Yong et al., 2001).

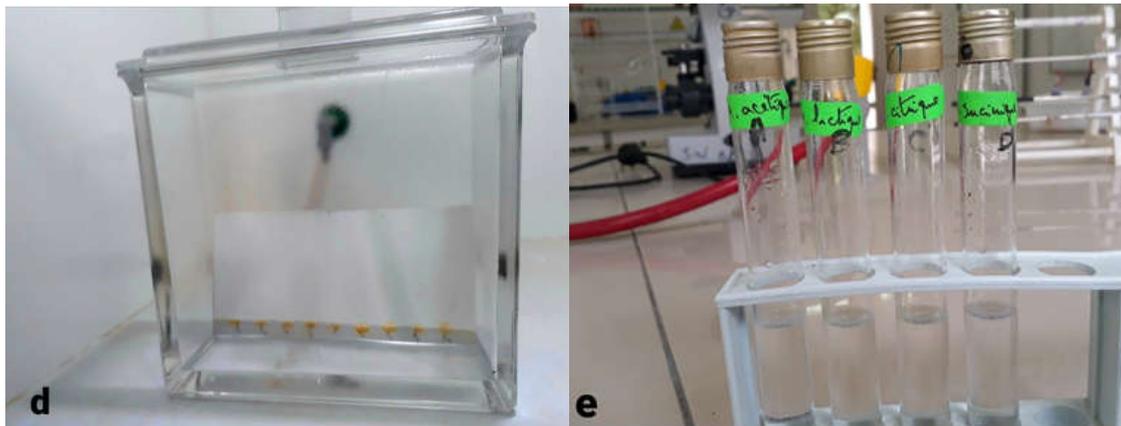


Figure 6. Cuve la chromatographie de couche mince (d), les acides organique que utilisé (e).
(Originale)

3.7. Identification de souches à l'échelle de l'espèce

3.7.1. a . Galerie API50

L'identification des souches à l'échelle de l'espèce a été faite à l'aide de l'API 50 CHL, la galerie API 50 pour à identifier 2 souches à l'échelle de l'espèce en suivant les instructions de fabricant. Les étapes de préparation et l'inoculation sont comme suit :

Les souches à identifier ont été cultivées dans un milieu MRS gélose et incubées à 37°C pendant 48h en conditions anaérobies. Ensuite , des colonies ont été prélevées et inoculées dans 5 ml de milieu API 50 CHL, et homogénéisé, jusqu'à obtenu approximativement l'opacité du tube N°2 de Macfarlane .La suspension bactérienne a été répartir à l'aide d'une pipette pasteur stérile dans 50 tubes de la galerie en respectant les conditions stérile (Djelloul-daouadji , 2021).

Le pouvoir fermentatif a été recherché en anaérobiose selon la recommandation du fabricant en rajoutant de l'huile de vaseline dans chaque cupule, puits les alvéoles du fond de la boîte sont remplies par l'eau distillée ; Pour crier une atmosphère humide.

La lecture a été réalisée après 48h d'incubation à 37°C. La fermentation des différents substrats contenus dans les puits a été révélée par un virage de couleur (du violet au jaune) dû à l'acidification causée par la croissance bactérienne (Djelloul-daouadji , 2021).Le profil biochimique ainsi obtenu des souches a été identifié à partir de la base de données existence dans le site web <https://lab.upbm.org/identifieur/galerie.php>.

3.8. Teste d'innocuité des souches

3.8.1. Test de la gélatinas

La méthode décrite par (Veljovic *et al.* , 2009) a été procédé pour déterminer l'activité gélatine de nos souches. Succinctement. Les souches ont été cultivé pendant 24h à 37° C en anaérobiose. Ensuite une goutte été strié en surface dans une boîte de pétri contenant une gélose nutritive contenant la gélatine (30g/L). Après incubation pendant 24h à 37°C. La surface de gélose ont été inondé par 1ml d'une solution de sulfate d'ammonium saturée à 55%. Apré 5 min, les colonies présentant un halo clair ont été considérées comme

Gélatinas +.

3.8.2. Test de la DNase

La capacité de souche de produire l'enzyme DNase a été évalué en suivant la techniques décrite par (Simões *et al.*, 2022) .Nos souches ont été cultivées pendant 24 h et ont été étalées 1ml en strie sur milieu gélosé à la ADN. L'incubation a été faite à 24h à 37°C en anaérobiose. Ensuite, Une solution de HCl a été ajoutée suffisamment pour inonder les boîtes de Pétri. Après 5min la confirmation de la production d'enzymes à DNase a été déterminée par une zone claire autour des colonies.

3.9. Mise en évidence in vitro de quelque propriété probiotique

3.9.1. Résistance à l'acidité

Les souches ont été scanner pour leur potentiel à résister à deux ph acide (2.5) et (3.5) selon la méthode décrit par (Teklay, 2018) avec un légères modification. Les souches cultivées à 37°C pendant 24h ont été centrifugée à (14000tr/5min) à 4°C).le culot bactérien obtenu a été lavé une fois puis remis en suspension dans l'eau physiologique. Après standardisation des souches à une opacité égale à 4McFarland = $1,2 \cdot 10^9$ cellules/ml, 100 µl de chaque suspension bactérienne préparées ont été mélangé avec 900µL de MRS bouillon ajusté à ph 2.5 et 3.5 respectivement et à l'aide de HCl (5N). Les cultures ont été ensuite incubées à 37 ° C pendant 3h. Après l'incubation, les cultures ont été diluées jusqu'à 10⁻⁵ dans l'eau physiologique. 50 µL de chaque dilution ont été ensemencé en profondeur en utilisant la gélose MRS avec incubation de 24h à 37°C à dans en condition d'anaérobiose. Les comptes viables ont été

exprimé en unité formant colonie par millilitre (log ufc/ml). Le pourcentage de cellules survivantes a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{pourcentage de survie (\%)} = \text{Log UFC N1} / \text{Log UFC N0} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

N0: représente le nombre total des cellules viables au temps 0 h

N1: représente le nombre total des cellules viables après 3 h

3.9.2. Résistance aux sels biliaries

Les souches sélectionné sont été testé leur pouvoir de toléré déférent concentration de bile selon la techniques de (Teklay, 2018), avec certaines modifications, d'une culture fraîche de 24 h a été centrifugé à 14000/5min , le culot bactérien obtenu a été lavé un fois puis , mélangé avec 900µL de MRS bouillon contenant une concentration de bile 0,5 % et 1% respectivement . Les cultures ont été incubées à 37 ° C pendant 3h. Après l'incubation le pourcentage de cellules survivantes a été calculé selon l'équation précédente (1).

3.9.3. Test de lysozyme

La capacité de nos souches à résister de lysozyme a été évaluée selon la méthodologie décrite par (Sirichokchatchawana *etal* .,2018).un culture de nuit a été centrifugé à 14000/5min puis le culot a été lavé une fois, mélangé avec 900µL de MRS bouillon additionné une concentration de lysozyme 0.5 g. Les cultures ont été incubées à 37 ° C pendant 2h. Après l'incubation le pourcentage de cellules survivantes a été calculé selon l'équation précédente (1).

3.10. La recherche d'Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne dans les surnageant des souches des bactéries lactiques est testée par la méthode des puits décrit par Cintas *et al* ., (1995). Cette méthode consiste à mettre le surnageant de la souche de BL en contact avec la souche cible pathogène.

3.10.1. Préparation de l'inoculation

On transfère 0.1 ml (\approx 105 UFC/ml) de suspension les trois bactéries pathogènes jeunes (16h) cultivées sur bouillon nutritif stérile à des tubes contenant 7 ml de gélose nutritive molle (0.75% (m/v) Agar) fondue (45°C), après une agitation légère des tubes, les milieux inoculés sont versés prudemment sur les boites pétris (Bouricha, 2022).

3.10.2. Préparation du surnageant de l'isolat lactique

Des cultures fraîches (24h) des bactéries lactiques sont préparées dans un bouillon MRS.

Ces dernières sont par la suite centrifugées à 4000tour /10 min à 4°C. Afin d'obtenir le surnageant, Les valeurs de pH de ces derniers est entre (4,32 et 4,56). On a divisé le surnageant obtenu en deux volumes, le premier on l'a laissé à pH initial, Et le deuxième a été neutralisé par NaOH (1N) de façon à obtenir un pH de 6.50, pour éliminer l'effet de pH, notamment Cinq (5) souches de bactéries lactiques isolées sont testées pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion par des puits. La méthode permet de tester l'activité antibactérienne des surnageant de culture des souches lactiques à l'égard des trois souches pathogènes ciblées (*Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli* et *Pseudomonas*). (Dunne *et al.* , 2001 ; Labioui *et al.*, 2005).

3.10.3. Réalisation du test d'inhibition

-Creuser des puits (5puits) de 6 mm de diamètre dans la gélose en utilisant des embouts stériles d'une micropipette de 1 ml ou emporte-pièce. La base de chaque trou est scellé avec une goutte (0,05 ml) de liquide fondu gélose nutritive.

- Charger les puits avec 50µl du surnageant initial et neutralisé de l'isolat lactique.
- Un puits est effectué pour chaque isolat dans trois boites de Pétri différentes (pour chaque souche test).
- Laisser diffuser à la paillasse durant 1h en s'assurent que celle-ci est en niveau afin d'éviter les résultats faussés (solution d'isolat déborde sur la gélose).
- Les boites de pétri sont mises au réfrigérateur à une température de +4°C pendant 4 heures pour permettre la bonne diffusion de la ou les surnageant ; puis incubées à 37°C pendant 24 h.
- la lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones inhibition formées autours des puits. Les résultats sont considérée positifs si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 2mm (Boumidiene, 2013).

Tableau 4. Les codes des souches pathogènes

La souche	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas</i>
code	ATCC25922	ATCC9632	ATTC27853

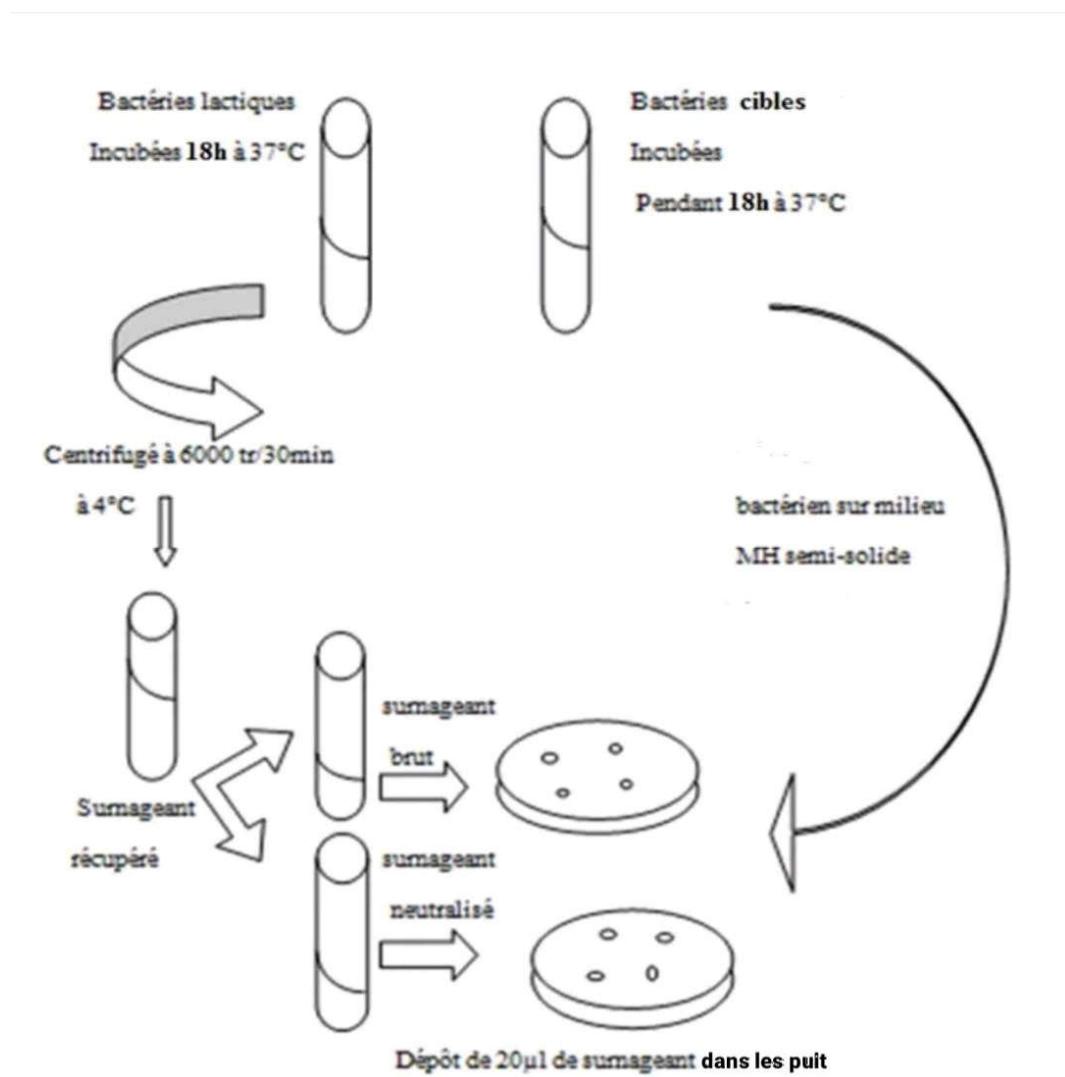


Figure 7. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des puits.

Chapitre 4

Résultat et discussion

4.1. Isolement des bactéries lactiques

L'isolement des souches lactiques sur différents milieux de culture sélectifs (MRS, M17 et BFM) a été effectué sur 2 échantillons différents et a conduit à une collection de 46 souches. La culture sur M17 a permis d'avoir 25 isolats, les autres ont été obtenus sur milieu MRS 14 et BFM 7. Ils sont désignés par un code constitué un lettres et d'un chiffre.

4.2. Purification des bactéries lactiques

Les repiquages successifs sur MRS gélose ont permis d'obtenir 35 souches pures. L'apparition de trouble dans les Eppendorfensemencés de BL signifie la croissance des souches sur le bouillon MRS, dont le fond des tubes est plus dense en raison de recherche des conditions d'anaérobiose, et cela confirme la viabilité des bactéries en comparaison avec le tube témoin (absence de croissance), jusque obtenir toutes les souches utilisées sont pures et, ne présentent pas de contaminations



Figure 8.repiquage sur milieu solide. (Originale)

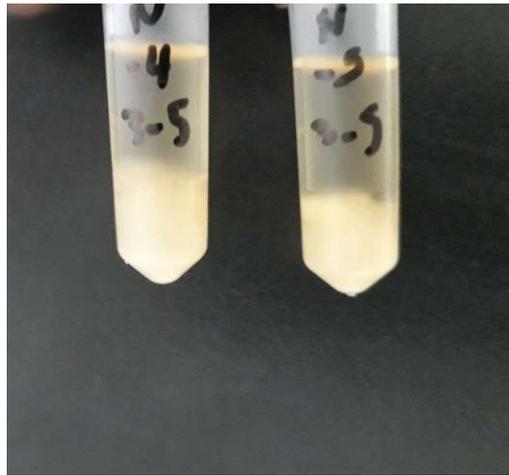


Figure 9. Repiquage dans un milieu liquide. (Originale)

4.3. Pré-identification des souches

La Pré-identification des 35 isolats a été étudiée selon les caractéristiques morphologiques et biochimiques.

4.3.1. Examen macroscopique

L'étude de leur aspect macroscopique a montré différents aspects de colonies : arrondies, lenticulaires, bombées, de couleur blanchâtre, crème ou translucide à bord régulier (**Figure 10**). En milieu liquide, les cultures apparaissent troubles dans la partie profonde du tube, la partie supérieure restant claire.

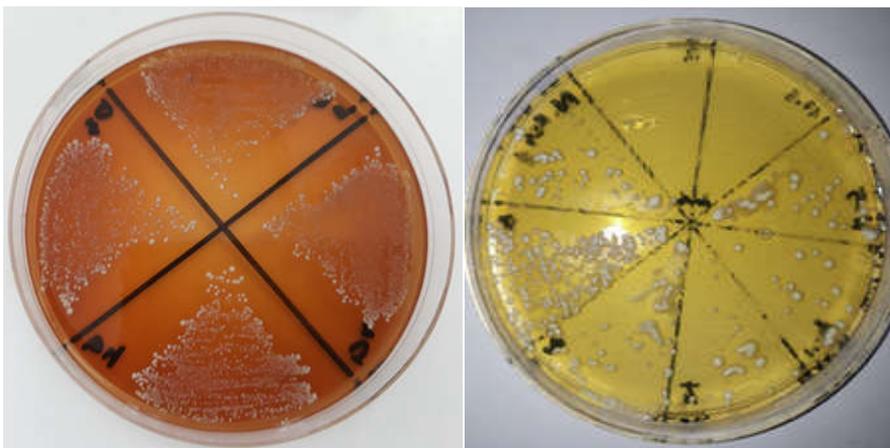


Figure 10. aspect macroscopique sur milieu MRS et M17 solide des souches lactiques isolées. (Originale)

4.3.2. Examen microscopique

L'étude de l'aspect microscopique a révélé les souches à gram positive, et deux types de forme cellulaire : Cocci : petites cellules arrondies regroupées en amas la souche C1, cellules ovoïdes en diplocoques associées en amas ou en petites chainettes souche C2.

Bâtonnets : de forme longue ou courte, regroupés en chainette ou en palissade souche la souche B1 , B2 , B3 . Le résultat dans la **figure** (11).

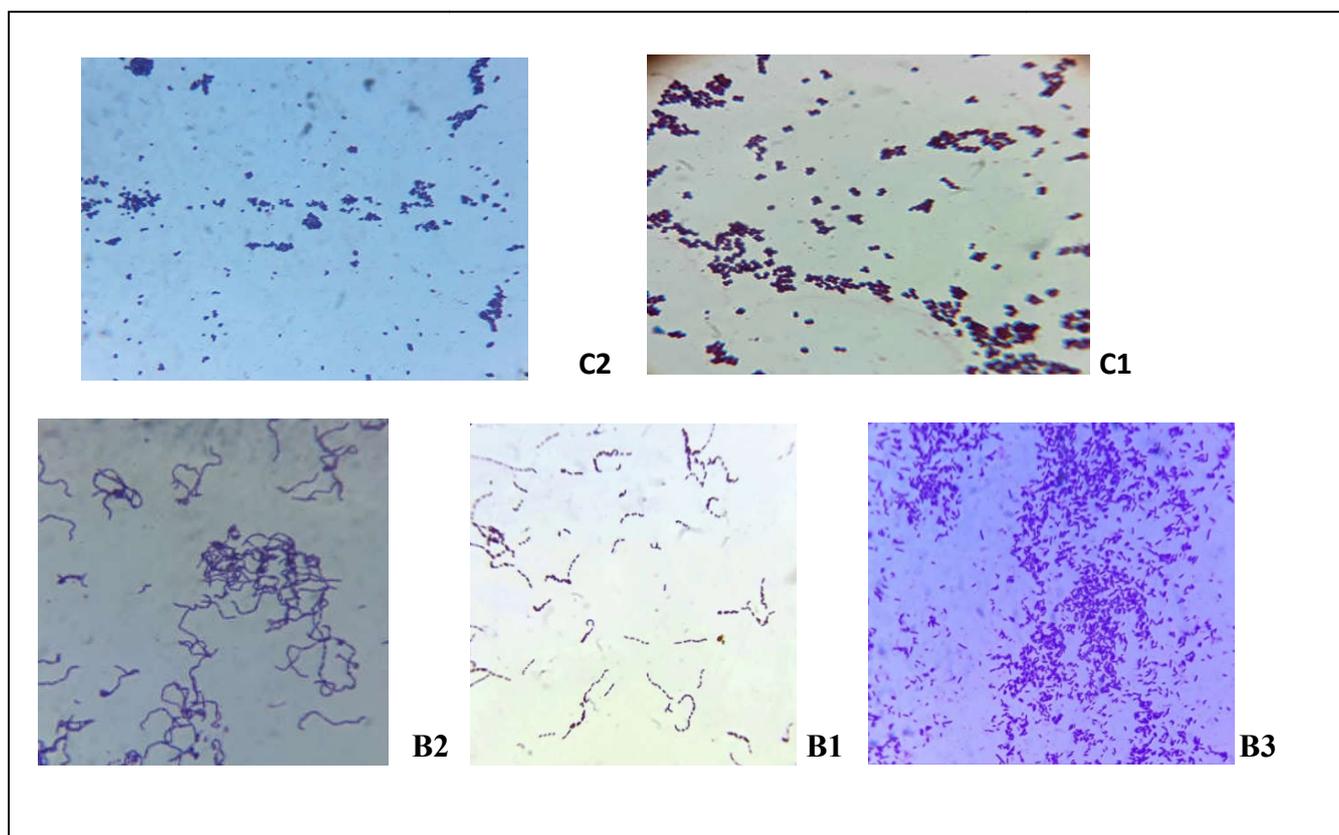


Figure 11. Observation microscopique des souches lactiques après coloration de Gram (Gx100). (Originale)

4.3.3. Teste catalase

Le résultat du test de catalase s'est révélé négatif pour toutes les souches (Pas des dégagements gazeux), ce qui laisse suggérer que ces bactéries sont des souches lactiques.



Figure 12. Résultat après la mise en évidence du test de catalase. (Originale)

Tableau 5. Caractères morphologiques des bactéries lactiques isolées sur MRS et M17 et BFM

L'origine	Aspect des colonies	Micromorphologie des cellules bactériennes	Nombre des souches	Nombre des souches
Lapin	- Arrondies - Transparentes - Très petites	- Cocci ou ovales - Disposés en Chaînette	12	12
abeilles	- Arrondies ou lenticulaires - Blanchâtre ou jaunâtre - Tailles variables - Rugueuses ou lisses	- Bacilles - Coccobacilles - Isolés ou en Chaînettes	15	23
	- Arrondies - Transparentes - Très petites	- Cocci ou ovales - Disposés en Chaînette	8	

Tableau 6. Les résultats d'isolement et purification des souches de bactéries lactiques

Origine des échantillons	Souche	Catalase	Gram	Forme
Lapin	B3,B4,B5,B9,B10,B22, B13,B17,	-	+	Bacille
	C1,C3,C4,C5			Coque
abeilles	B1,B2,B6,B7,B8,B11,B12, B14,B15,B16,B18,B19,B20, B21,B23	-	+	Bacille
	C2 ,C6,C7,C8, C9, C10, C11, C12.	-	+	Coque

Suite au temps limité et les conditions de travail, il été obligé de sélectionner 5 souches et continuer le travail. (B1, B2, B3, C1, C2).

4.4. Innocuité des souches sélectionnées

4.4.1. Production de DNase

Les souches lactiques sont développées sur une gélose à l'ADN. Après inondation des boîtes de Pétri avec HCl, aucune souche lactique n'a montré une dégradation l'ADN. Le résultat obtenu concorde avec celui obtenu par (Bouguerra, 2021).

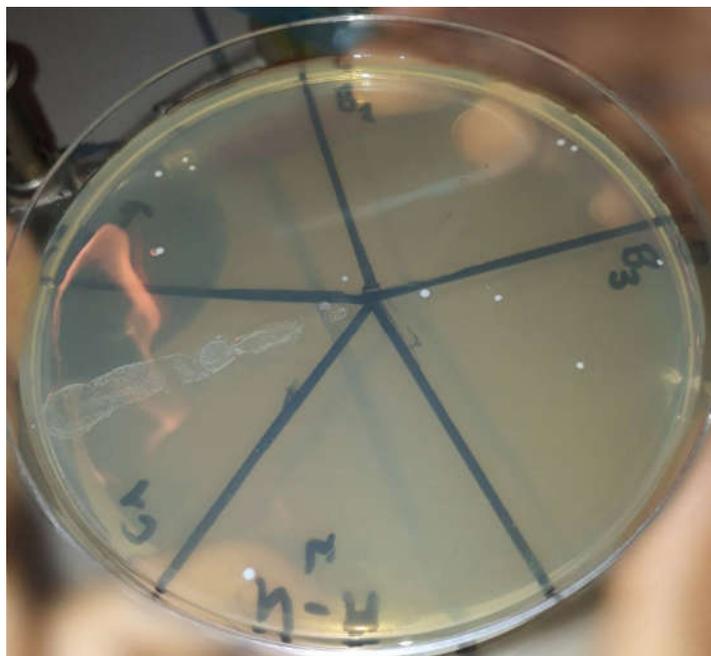


Figure 13. Détection de DNase chez certaines souches. (Originale)

4.4.2. Test gélatinas

Cette enzyme joue également un rôle important dans la pathogénicité car c'est une protéase impliquée dans l'hydrolyse de la gélatine, de la caséine, du collagène et de l'hémoglobine, etc. Bouguerra (2021).Après développement des souches lactiques sur la gélose contenant la gélatine, puis révélation par une solution saturée de sulfate d'ammonium les résultats ont montré qu'aucune souche n'est capable de dégrader. La gélatine , Ceci concorde avec le résultat obtenu par Bouguerra (2021).

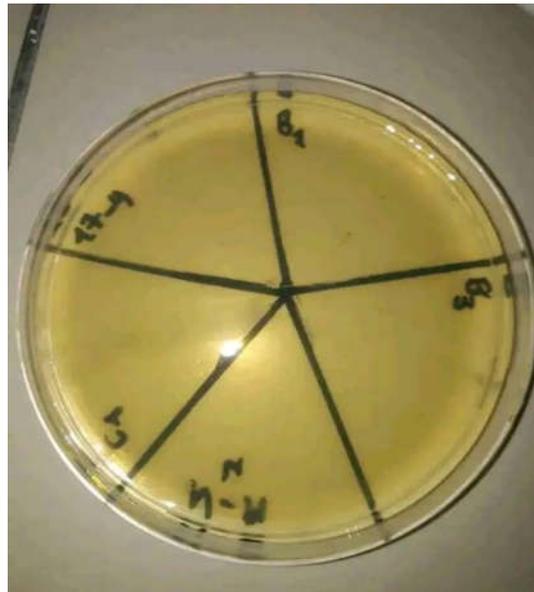


Figure 14. Détection de la gélatinase chez certaines souches présumées probiotiques.
(Originale)

4.5. Identification des bactéries lactiques

4.5.1. Physiologique et biochimique

4.5.1. a . Test de croissance en présence de NaCl :

Tous les souches se forme cocci sont capables de croitre sur le bouillon MRS avec de concentrations de 6,5% de NaCl, leur croissance sont traduisant par l'apparition d'un trouble.

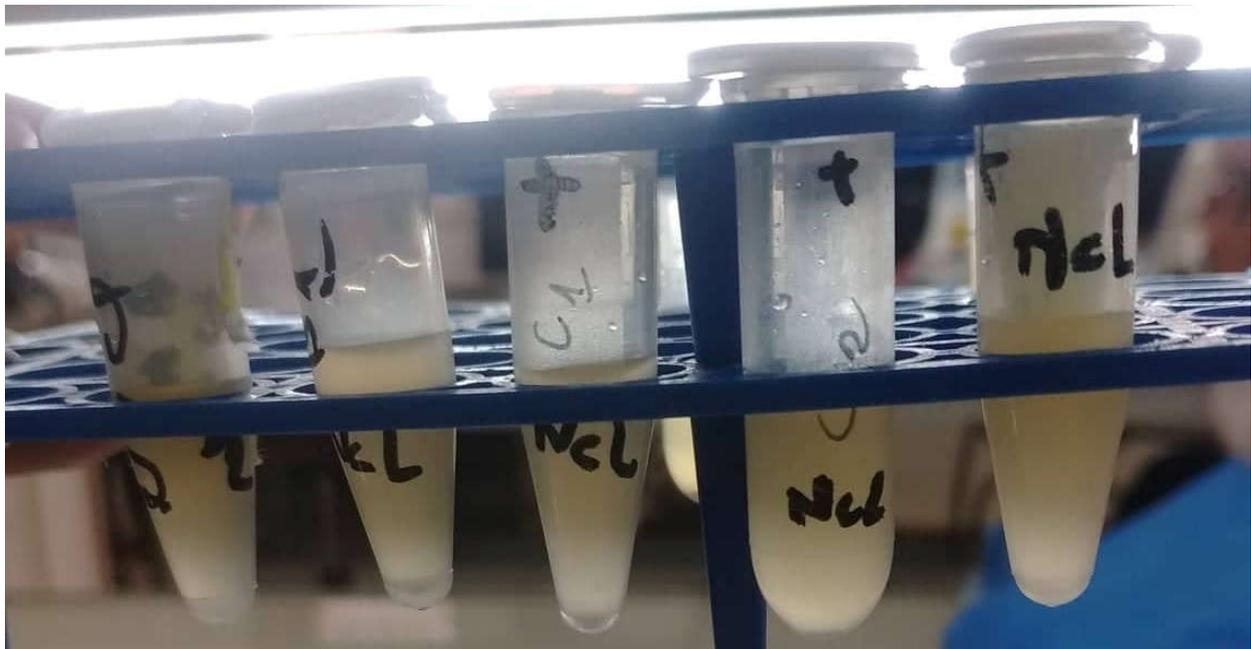


Figure 15. résultats de te NaCl. (Originale)

Le résultat obtenu de la croissance des souches à 6,5% à une similarité concernant les lactococcus et Enterococcus, Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par (Bekhouche et Boulahrouf, 2005) et par la suite les lactobacilles sont aussi capable de développer à 6.5 % de NaCl (El issaoui *et al*, 2022).

4.5.1. b Test de Production de co2

Le type fermentaire des cinq bactéries lactiques isolées a été déterminé sur bouillon MRS sans citrate, les résultats montrent que les isolats Lactobacillus (B1 ,B2 ,B3) sont développent par la production de gaz ce qui confirme leur caractère hétérofermentaire , mais les souche se forme coque (C1 ,C2) n'ont produit pas le CO2 qui confirme leur caractère homofermentaire .ces résultats accord avec ce trouvé par (Bernardino,2014) et (Aguilar-Galvez *et al*, 2012).



Figure 16. Résultats de test de production de CO2. (Originale)

4.5.2_Chromatographie

Approuvent Les résultats d'identification à l'échelle du genre pour les souches bâtonnets sont montré dans la (figure 18).Le surnageant des isolats bactériens B1, B2, B3 a montré spot rouge en comparant avec les acides organiques témoins (figure17). Les résultats se concorde plus ou moine avec ceux de Ki-Yong Lee et al (2001) où des lactobacillus un seul spot rouge

indiquant la production de l'acide lactique uniquement. Par conséquent les souches B1, B2, B3 ont été assignées au genre *Lactobacillus*.

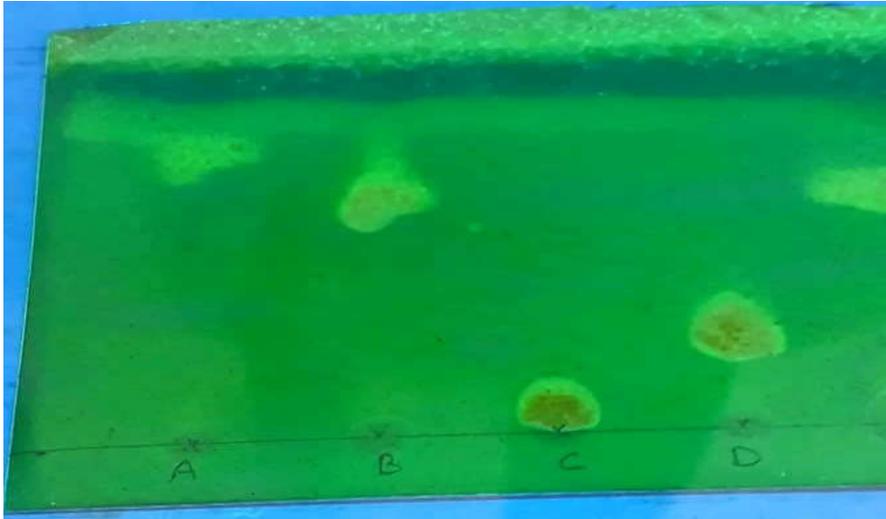


Figure 17. Témoin (Originale)

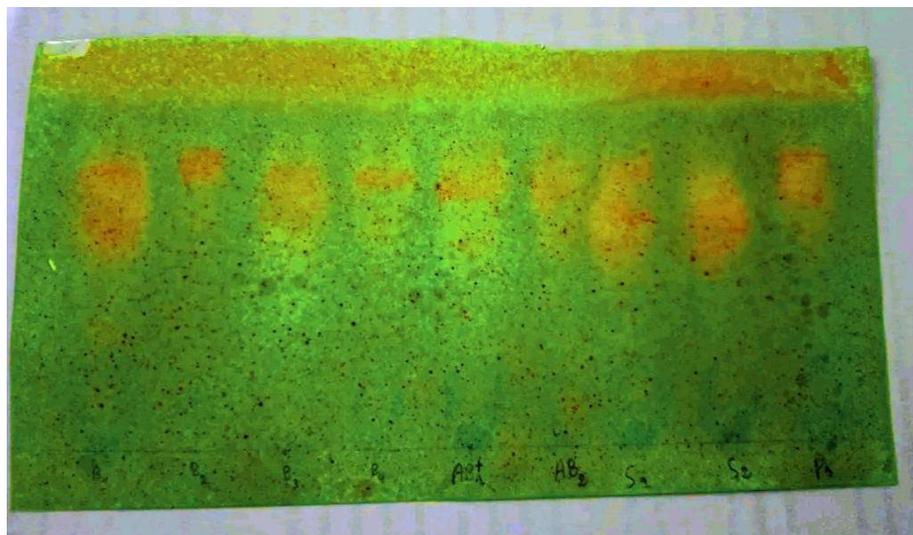


Figure 18. Chromatographie sur couche mince. (Originale)

4.6. Identification au stade d'espèce

4.6.1. a - galerie API 50

Parmi les 5 isolats, deux ont été sélectionnées pour une identification approfondie avec la galerie API 50 CHL. Le résultat d'identification est rapporté dans le tableau (annexe 3)

Donc ce test d'identification effectué nous permettent de confirmer qu'elles appartiennent à l'espèce B3 de *Lactobacillus brevis* avec un pourcentage de fiabilité 100% et *B2Lactobacillus plantarum* avec un pourcentage de fiabilité de 95% . Les résultats d'API 50 sont présentés dans l'annexe 3.



Figure 19. Profil fermentaire de la souche B3 (*Lactobacillus brevis*). (Originale)

4.7.. Recherche de l'activité antibactérienne

Les cinq souches qui nous avons testées selon leurs activités antibactériennes à partir la méthode de diffusion par des puits à l'égard de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, Leur résultats obtenus ont été enregistré par des zones d'inhibition notée par un halo clair autour du puits. (Figure6).

Figure 20 : Résultats de l'activité antibactériennes des Surnageant des souches lactiques à l'égard de *S.aureus*, *E. coli*, *P.aeruginosa*. (originale)

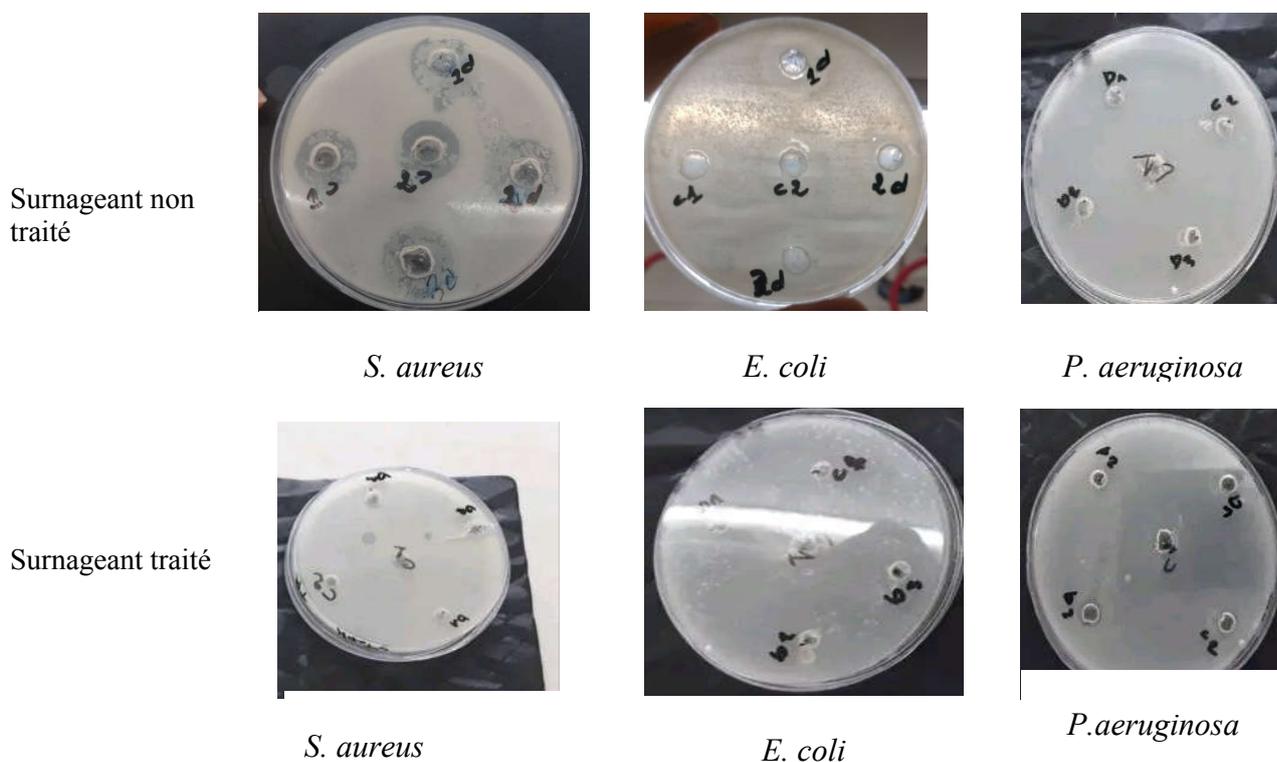


Tableau 7. **Diamètres des zones d'inhibition**

Souche pathogène	Diamètres des zones d'inhibition (mm)									
	Surnageant natif					Surnageant neutralisé				
	B1	B2	B3	C1	C2	B1	B2	B3	C1	C2
<i>E. coli</i>	7	6	7	4	4	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	10	7	6	6	6	-	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : absence de zone

✓ cas du surnageant natif

Staphylococcus aureus : Nous avons constatés que la meilleure activité inhibitrice a été observée par la souche B1 (10mm) et suivi par B2 qui a été révélé une bonne activité Antimicrobienne (7mm) ces résultats obtenus se confirment avec les résultats obtenus avec (Mami *et al.* , 2010), lorsque la souche B3 possède un zones d'inhibition égale (6mm) (Silva *et al.* , 2019) . C1 et C2 présentent les mêmes diamètres des zones d'inhibition 6 mm (Eldar *et al.* , 1996).

Escherichia coli : les souches B1 et B3 sont actives contre les souches pathogènes cibles avec de diamètre d'inhibition (7mm). Ces résultats similaires selon (Grosu-Tudor & Zamfir, 2012) et par la suite B2 possèdent un zone d'inhibition égale (6mm), aussi C1 et C2 ont enregistré la même activité antimicrobienne (4mm) (Eldar *et al.* , 1996)

Pseudomonas aeruginosa : la faible activité inhibitrice a été observée avec tous les souches qui semblent inactives vis-à-vis de cette souche pathogène. Ce résultat peut être dû à la production des acides organiques (acide acétique, acide lactique) (Hadadji *et al.* , 2005).

✓ Cas de surnageant neutralisé

L'activité antibactérienne a été significativement absente par rapport aux résultats obtenus avec les surnageants natifs. Cela peut être dû à l'élimination de la capacité acidifiante de ces souches, suggérant la présence d'autres substances antimicrobiennes. Ce qui confirme avec les résultats obtenus par (Akkouche et Aazzouz , 2019).

4.8. Sélection des LAB avec des propriétés probiotiques

4.8.1. Résistance à l'acidité

La propriété de la tolérance à l'acidité joue un rôle important pour assurer la survie des probiotiques lors de leur passage dans le milieu acide de l'estomac de l'hôte. Toutefois, les bactéries lactiques sélectionné pour sa propriété probiotique doit être capable de résister à la forte acidité qui existe dans l'estomac afin de coloniser et d'exercer un effet positif (Ghatani *et al.*, 2017).

L'étude d'analyse de la résistance à l'acide a été réalisée dans des conditions acides similaires à celles de l'estomac en exposant nos souches à différent pH : 2.5 et 3.5 pendant 3 heures. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau :

Tableau 8. Effet du pH acide sur la viabilité des souches lactiques (log UFC/ml).

Souche	T° initiale	Ph=3.5		Ph=2.5	
		2h	Taux de Survie %	2h	Taux de Survie %
B1	8.07	4,88 ±0.09	73,96	-	-
B2	8.07	6.37 ±0.19	86,38	-	-
B3	8.07	6.64 ± 0.08	84,49	-	-
C1	8.07	5.64 ±0.08	84,72	5,05 ± 0.08	77,37
C2	8.07	5,66 ±0.09	82,38	-	-

À la lumière de ces résultats, le comportement des isolats vis-à-vis un pH de 2.5, les souches lactiques testées (B1_B2_B3) n'ont pas pu se développer à un pH 2.5 sauf la souche c1 avec un taux de survie (77.37%).Alor le pH 2.5 était létal pour toutes les souches. Des résultats similaires ont été obtenus par (Benyoucef *et al.*, 2017), sauf la souche c1 avec un taux de survie (77.37%).

Par ailleurs, selon le tableau, elles ont montré une résistance significative au pH 3.5 après 3 h d'incubation avec un taux de survie variant entre (73,96%_86,38%).

La souche qui a marqué une résistance remarquable avec un taux de survie égale à 86.83% s'agit de **B2** est compatible avec résultats par (Lacerda *et al.*, 2014)

C1 a marqué un taux de survie (84.72%) les résultats similaires par les résultats similaires ont été obtenus de (Daniel *et al.*, 2017).

Les isolats **B3** enregistré un taux de survie (84.49%) est similaire avec (Seda Hacıoglu, et Buket Kunduhoglu, 2021).

C2 n'ont pas pu se développer à un pH 2.5 ; par (Kimoto-nira *et al.*, 2009), Il y a eu peu d'étude sur l'activité probiotique, puisqu'on la généralement suppose que les lactocoques ne survivant pas lors du passage à travers l'appareil digestif, cela est dû au pH faible de l'estomac, cependant plusieurs travaux récents ont suggéré que les lactocoques puissent survivre pour atteindre l'appareil gastro-intestinal humain ou animal ; Ça peut être la souche C2 lactocoque.

Et le dernier isolat **B1** a enregistré le moindre taux de survie. (73.96) est similaires par (Ramos *et al.*, 2014).

4.8.3. Résistance à sels biliaires

La résistance à la bile est une propriété essentielle pour la sélection des bactéries probiotiques qui permet aux souches de coloniser puis d'assurer des activités métaboliques dans l'intestin grêle de l'hôte. (Banwo *et al.*, 2021).

Tableau 9. Rapporte les comptes viables de nos souches en présence de 0,5 % et 1 % sels biliaires.

Souche	T° initiale	Bile=0.5%		Bile=1%	
		2h	SR%	2h	SR%
B1	8.07	4,33±0.21	69,08	4.66 ±0.28	71,00
B2	8.07	5,95 ±0,07	82,87	5.33±0.08	80,72
B3	8.07	5,95±0.08	86,23	5,72 ±0.09	85,12
C1	8.07	5,49± 0.09	82,87	5,43±0.09	83,20
C2	8.07	2,95±0.49	52,72	-	-

--	--	--	--	--	--

La souche B3 était la meilleure souche tolérante à la bile, avec taux de survie (86,23 % et 85,12 % de) respectivement et la souche B2 qui a marqué une résistance remarquable avec (82.87 et 80.72) respectivement après une exposition de ces souches à 0,5 % et 1 % des sels biliaires pendant 3h . Nos résultats sont concordent avec ceux obtenu selon (Grosu-Tudor et Zamfir, 2012). C1 isolé a partir les intestin de lapin révèle une taux de survie égale à 82,87% et 83,20% après une exposition à 0,5 % et 1 % de sels biliaires pendant 3h, respectivement, ces résultats cohérent à résultats contenu selon (Daniel *et al* ,2017) . Alors que, B1, isolés d'après les intestin des abeilles présent un taux de survie 69.08 % et 71%, respectivement. Tandis que le faible pourcentage de 52.72 % 0% a été enregistré correspondant au taux de survie de l'isolat C2 prélevé à partir l'intestin des abeilles, ces résultats obtenus se confirment avec les résultats obtenus par (Yerlikaya, 2018).

4.8.4. Résistance au lysozyme

La résistance au lysozyme est un autre facteur important caractéristique recommandée pour un potentiel probiotique (Ayyash *et al* ., 2018). Résistance aux lysozymes les résultats des souches isolées sont rapportés dans le tableau

Tableau 10. Effet de lysozyme sur la viabilité des souches lactiques (log UFC/ml).

Souche	T° initiale	lys	
		2h	SR%
B1	8.07	6,03± 0.09	90,48
B2	8.07	6,06±0.03	87.38
B3	8.07	7,03±0.08	86,41
C1	8.07	5,66 ±0.07	86,14
C2	8.07	6,52± 0.07	92,67

Les résultats obtenir selon le tableau, les souches identifiées présentaient des résistances au lysozyme après 2h. Elles ont montré une résistance significative au lysozyme après 2h d'incubation avec un taux de survie variant entre (86.14%_92.67%).

La souche **C2** a montré la tolérance la plus élevée avec taux de survivre (92.67%), Ce résultat est étroitement lié à celles rapportées par (Laurent *et al.*, 2007) dans quel article.

La souche **B1** a marqué un taux de survie (90.84%) les résultats ont été obtenus similaires par (Samedi et Linton Charles, 2019). En suit enregistré la souche **B2** un taux de survie (87.41%) ces résultats a été rapportée par d'autres auteurs (Sirichokchatchawana *et al.*, 2018). L'isolat **B3** a marqué un taux de survie (86.72) les résultats similaires par les résultats. En fin la souche **C1** a révélé une tolérance au lysozyme, les résultats SR obtenus étaient de (86.14%) Ces résultats sont en accord avec (Aoki *et al.*, 2011).

Les souches (B1, B2, B3, C1, C2) ont été trouvés être capable de bien se développer au niveau d'un lysozyme après 2h d'incubation (James et Singh, 2015).

Conclusion

Conclusion

L'objectif capital de cette étude était d'isoler des souches des bactéries lactiques à caractères probiotiques, à partir de deux animaux différents lapins et les abeilles.

36 souches ont été isolées et purifiées, parmi lesquelles cinq souches seulement (B1, B2, B3, C1, C2). En conclusion de notre travail, l'identification phénotypique de ces isolats assurée, en utilisant des méthodes classiques (étude de la morphologie, de la physiologie et de la biochimie des différents isolats) et par la méthode de chromatographie sur couche mince respectivement, a permis de déterminer le genre entérocoque, lactococcus et lactobacillus.

L'identification biochimique des isolats au stade espèce utilisant la galerie API 50 CHL a montré qu'il s'agit pour la souche B3 *Lactobacillus brevis* et pour B2 *Lactobacillus plantarum*.

L'innocuité des souches sélectionnées a été vérifiée après réalisation de certains tests. L'évaluation de leur sécurité a montré l'absence d'une activité, gélatinas, DNase.

La résistance aux conditions gastro - intestinales simulées (pH acide et sels biliaires et lysozyme).

Les résultats fournis par l'étude in vitro des aptitudes probiotiques des souches de son notamment intéressants. Les souches indigènes ont montré une résistance remarquable vis - à - vis les conditions acides où elles ont pu préserver un taux de survie important. Encore une excellente viabilité des souches indigènes a été notée en contact avec les différentes concentrations (0,5 % et 1 %) de sels biliaires et différentes concentrations (2.5 ; 3.5) de ph.

La détermination de leur capacité à produire des substances inhibitrices contre leurs souches cibles (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) a été démontrée par contact indirect entre la souche productrice et la souche indicatrice.

D'après les résultats obtenus, dans le cas de surnageant initial à montrer qu'elles sont toutes dotées un pouvoir inhibiteur dirigé contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* à l'exception sur *Pseudomonas aeruginosa* qui n'avait aucun effet.

Cette activité est probablement due à la synthèse de substances inhibitrices telles que les acides organiques principalement l'acide lactique

A la suite de ces résultats obtenus on déduit que les souches indigènes isolées ouvrent les horizons prometteurs pour les considérer comme des souches à caractère probiotique.

Déterminer Finalement l'étude de l'activité antibactérienne envers quelques souches pathogènes où nous avons essayé de mettre en évidence la nature de l'agent responsable de l'inhibition. Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne envers les souches pathogènes ont montré l'existence d'une bonne activité inhibitrice contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Qui est due à l'acidité du milieu, la production d'acide acétique et lactique ou bien à une bactériocine.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives sur l'utilisation de L'avenir des bactéries lactiques dans le développement de produits probiotiques pour la santé humaine et animal. De plus une identification génotypique pour étudier les caractères probiotiques des souches .

Bibliographie

Bibliographie

Djelloul-Daouadji Soumia. (2021). Isolement et identification des bactéries antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes multirésistantes. *these doctorat*. faculte des sciences de la nature et de la vie departement de biologie, sidi bel abbes.

Labioui H., Elmoualdi L., El-yachioui M., et Ouhssine M. ((2005). Sélection de souches de bactéries la. cartiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 144. pp. 237-250.

Adams, M.R., Moss, M.O. (2008). *Microbiology, Importance of Selected Genera*.

Aguilar-Galvez, A., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Campos, D., & Thonart, P. (2012). Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *16(1)*, pp. 67-76.

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. *thèse de doctorat*, 16. l'institut national polytechnique de toulouse.

Akkouche, Y., & Azzouz, S. (2019). Evaluation de l'effet anti-adhesif de quelques bactéries lactiques. 22. Université A. MIRA, Bejaia.

Alard, J. (2017). Sélection in vitro et in vivo de souches probiotiques ayant des propriétés bénéfiques contre l'inflammation, les infections et l'obésité. *thèse de doctorat*, 34;37. Université du Droit et de la Santé - Lille II.

Anais, A. (2010). *biologie végétale*. Paris: DUNOD.

Asma, B. (2012). Caractérisation des bactéries lactiques du lait de chameau. *mémoire magister*. université Ferhat Abbas, Sétif.

Bouguerra , Asma B. (2021). Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle. *thèse doctorat*. Université Ferhat Abbas, Sétif 1, Sétif.

Atia, Abdelbasset. (2016). Développement d'une matrice prébiotique pour l'encapsulation des probiotiques bactériocinogènes,. 21. Québec, l'Université Laval, Canada.

Badis Abdelmalik, Kihal Mebrouk. (2005). caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabie et kabyle". p. 1.

Banwo, K., Alonge, Z., & Sanni, A. I. (2021). Binding capacities and antioxidant activities of *Lactobacillus plantarum* and *Pichia kudriavzevii* against cadmium and lead toxicities. *119*, pp. 779-791.

- Bekhouch Farida. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. *these de doctorat*. universite de mentouri constantin, costantine.
- Bekhouch, f., & Boulahrouf, A. (2005). etudes quantitative et qualitative des bacteries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant a six stations d'elevage de CONSTANTINE. (23), pp. 38-45.
- Belhamra, Z. (2017). Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires. *thèse de doctocat*, 35. Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- Beltitene, N., & Mériche, H. (2010). La pharmacocinétique des probiotiques d'origine animale et activité hypolipémiant. *mémioire*, 1. Université de Jijel.
- Belyagoubi, L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. *thèse de doctorat*. Université Aboubakr Belkaïd Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, tlemcen.
- Benyoucef, A., Hansal, N., Said, L., Lhadj Said, M. A., Bentabet, H., Kihal, M., Benmechernene, Z. (2017). Evaluation of technological properties of *Leuconostoc mesenteroides*(V1) strain isolated from Algerian goat's milk. *Advances in Enviromental Biology*. pp. 26–38.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *61*, p. 161.
- Bonifait, L., Chandad, F., & Grenier, D. (2009). Les probiotiques en santé buccale : mythe ou réalité? *75*(8), pp. 585-586.
- Boucheфра, A. (2012). Yaourts probiotiques algériens et ferments commerciaux utilisés dans leur fabrication : contrôle de qualité et de l'étiquetage. *mémioire de Magistère*, 15. Université Mentouri de Constantine.
- BOUGUERRA, A. (2021). Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle. *thèse de doctorat*, 25. Université Ferhat Abbas, Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sétif.
- Boumidiene Karima. (2013). Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien. *Thèse de doctorat*. Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.
- Bouricha-M'hamed. (2022). Potentiel technologique des souches *Leuconostoc* isolées à partir de différents produits laitiers de la Sciences Biologiques Option : Microbiologie Appliquée. *thèse doctorat*. université Kasdi merbah, OUARGLA.
- Byakika, S., Muzira Mukisa, I., Byenkya Byaruhanga, Y., & Muyanja, C. (2019). A Review of Criteria and Methods for Evaluating the Probiotic Potential of Microorganisms. p. 2.

- Carmona, B. (2016). les probiotiques (bactéries et levures) : OU EN est-on aujourd'hui ? *thèse de doctorat*, 36. université de montpellier.
- Cintia lacerda ramos, line thorsen , mia ryssel, dennis S.Nielsen, henrik Siegyfeldt, rosane Freitas Schwan, Lene Jespersen. (2014). effect of the gastrointestinal environment on ph homeostasis of lactobacillus plantarum and lactobacillus brevis cells as measured by real-time fluorescence ratio-imaging microscopy. pp. 215-225.
- Cordonnier, C. (2015). Survie et pathogénicité des EHEC dans l'environnement digestif :interaction avec le microbiote et l'épithélium intestinal.Influence de l'administration de levures probiotiques. *thèse de doctorat*, 105. l'Université d'Auvergne, Auvergne.
- Daniel M, Amaral ,Luana F ,Sabrina N , Silva, Casarotti, Laine Caroline Sousa Nascimento, And Ana Lucia B. (2017). enterococcus faecium and enterococcus durans isolated from cheese: survival in the presence of medication under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. pp. 933-949.
- Delavenne, E. (2019). Propriétés antifongiques de bactéries lactiques isolées de laits crus. *Thèse doctorat*. Université de Bretagne occidentale, Brest.
- Dunne C, OMahony L, Murphy L, Thomson G. (2001). In vitro selection criteria for criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings.Am J Clin Nutr. 73:386s-392s.
- Ebel, B. (2012). Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la. *thèse de doctorat*, 9. Université de Bourgogne – AgroSup Dijon, France.
- EBEL, Bruno. (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*, 9. Université de Bourgogne– AgroSup Dijon, Bourgogne.
- El Issaoui, k., Senhaji, N., Wieme, A., Abrini, J., & Khay, E. (2022). Probiotic Properties and Physicochemical Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Moroccan Table Olives. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 9(2022), 173.
- Fathia, B. (s.d.).isolment et caractérisation des souches de lactobacilles a caractéres probiotiques a partir de selles d'enfants. *thèse de doctorat*. 2014, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Microbiologie, Constantine.
- 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*, 20-21. département des sciences des aliments et de nutrition faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université laval, québec.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., and Lucas, R. . (2011). Food Applications .
- Grimoud, J. (2010). *Probiotiques, prébiotiques, synbiotiques et prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : proposition d'un crible de sélection in vitro*. université Toulouse.

- Grosu-Tudor, S. S., & Zamfir, M. (2012). probiotic potential of some lactic acid bacteria isolated from romanian fermented vegetables. *17*(1), pp. 234-239.
- 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. Identification of cultivable Bifidobacterium species isolated from breast-fed infants feces in West-Algeria. African*, *4*(5), pp. 422-430.
- Hammi_Ikram. (2016). isolement et caractérisation de bactériocines produites par les souches de bactéries lactiques isolés a partir de produit fermentes marocaines et différents variétés de fromages. *Thèse doctorat*. Université de Stras, français .
- Hiromi Kimoto-Nira, Reiji Aoki, Keisuke Sasaki, Chise Suzuki and Koko Mizumachi. (2012). Oral intake of heat-killed cells of Lactococcus lactis strain H61 promotes skin health in women , nutritional science. pp. 305-0901.
- Ishnaiwer, M. (2003). Multimodal treatment of intestinal carriage of multi-drug resistant bacteria with probiotics and prebiotics. *thèse de doctorat*, 36. Université Nantes.
- jaing, m. (2016, mar). eavaluation of probiotic properties of lactobacillus plantarum WLPL04 isolated from human breast milk. p. 4.
- Jehanno, D. (1990). Sélection de bactéries lactiques produisant uniquement l'isomère L (+) de l'acide lactique: application à l'amélioration de la qualité nutritionnelle de produits végétaux fermentés. *thèse de doctorat*.
- K.h.chen, R.F.McFEETERS, H.P. FLEMING. (1983). Stability of mannitol to lactobacillus plantarum degradation in Green Beans fermented with lactobacillus cellobiosus. pp. 972-974.
- KECHAOU, N. (2012). Identification de nouvelles souches probiotiques à propriétés immuno-modulatrices et anti-oxydantes. *thèse de doctorat*, 51. L'Université Paris Sud.
- Kimmel, R. (2018). Intérêt des probioiques dans le traitement de l'infection à Helicobacter pylori. *Revue de la littérature. thèse de doctorat*, 66. université de LORRAINE, NANCY.
- Kimoto-nira H ., kobayashi m., nomura m., sasaki k .et suzuki c . (2009). bileresistance in lactococcus lactic strains varies with cellular fatty acid composition : nqnqlysis by using different growth media. *J. Food Microbiol* 131. pp. 183-188.
- Ki-Yong Lee, Jae-Seong So, Tae-Ryeon Heo. (2001). Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level. pp. 2-5.
- Lahtinen S, Ouwehand A C, Salminen S, von Wright A. (2012). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 4th Ed. CRC Press.
- lamai, m. (2018). Étude de l'Effet de Souches Probiotiques de Bactéries Lactiques (Lactobacillus spp.), Isolées de Produits Fermentés, sur la Valeur Nutritive de Fourrages Conservés par Ensilage. *Thèse de doctorat*. universite des sciences et techniques d'oran mohamed boudiaf, oran.

- Lamari, F. (2014). Utilisation de bactéries lactiques probiotiques pour prémunir les poissons d'élevage contre des vibriions pathogènes. *thèse de doctorat*, 37-38. Université de Monastir, Tunisie.
- Landman, C., & Quévrain, E. (2016). Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique Gut microbiota: Description, role and pathophysiological implications. *37*, pp. 418-423.
- Laurent helbert, pascal courtin, riccardo torelli, maurizio sanguinetti, marie-pierre chapot-chartier, yanick auffray, abdellah benchour. (2007). enterococcus foecalis constitutes an unusual bacterial model in lysozyme resistance. pp. 5390-5398.
- Lettat A., M. C. (2012). Analyse quantitative de l'effet des bactéries probiotiques sur les fermentations dans le rumen et les performances des bovins en production. *INRA Prod. Anim.*, 25, 4. pp. 351-360.
- Makhloufi, K. M. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. *Thèse doctorat*. l'universite PIERRE ET MARIE CURIE.
- Mami, A., Hamedi, A. Z., Henni, J. E., Kerfouf, A., & Kihal, M. (2010). Activité Anti-Bactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis à vis de *Staphylococcus aureus* Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *5(21)*, p. 31.
- Mareschal, j., Schrenzel, J., Lazarevic, V., & Genton, L. (2018). Microbiote et dénutrition : état des lieux. *14(610)*, p. 1194.
- MERMOURI, L. (2018). Étude de l'Effet de Souches Probiotiques de Bactéries Lactiques (*Lactobacillus* spp.), Isolées de Produits Fermentés, sur la Valeur Nutritive de Fourrages Conservés par Ensilage. *thèse de doctorat*, 21. universite des sciences et de la technologie-mohammed boudiaf d'oran.
- millette, M. (2007). Etude de bactéries lactique à potentiel probiotique et de leurs métabolites -Mathieu millette -Thèse doctorat -2007-INRS-Institut armand-frappier pour l'obtention du grade de philosophiae . *Thèse doctorat*. Institut armand-frappier pour l'obtention du grade de philosophiae .
- Millette, M. (2007). Étude de bactéries lactiques à potentiel probiotique et de leurs métabolites. *thèse de doctorat*, 32. Université du Québec.
- Morabito, D. (1994). Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* sur lactoserum : études cinétiques, modélisation et simulation de procédé intégré. *thèse doctorat*. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, FRANCE.
- Mullan, W. (2014). Importance of Selected Genera. pp. 517-518.
- Nassib, T. A., El-Sharoud, W., & Shalabi, O. (2013). Prevalence of *Enterococcus* in Egyptian dairy products. *4(10)*, p. 489.

- Nebra, Y., & Blanch, A. R. (1999). A New Selective Medium for Bifidobacterium spp. *65*(11), p. 5175.
- Ninane, V., Mukandayambaje, R., & Berben, G. (2009). Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir: le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *13*(3), 460.
- PIQUEPAILLE, C. (2013). Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales. *thèse de doctorat*, 105. UNIVERSITE DE LIMOGE Faculté de Pharmacie, LIMOGE.
- Pringsulaka O., Thongnam N., Suwannasai N., Atthakor W., Pothivejkul K., Rangsiruji. (2011). Partial characterization of bacteriocin produced by lactic acid Regulation In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. pp. 253-390.
- R, Barfoot S F. et Klaenhammer T. (1983). Detection and Activity of Lactacin B, a Bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus*. pp. 1808-1815.
- S. LAIRINI, N. B. (2014). Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels.
- Saidi yasmin. (2020). Biodiversité de la microflore lactique du lait cru de dromadaire et évaluation de ses caractères technologiques. *Thèse doctorat*. Université Oran1 Ahmed Ben Bella, Oran.
- Samedi, L., & Linton Charles, A. (2019). Isolation and characterization of potential probiotic *Lactobacilli* from leaves of food plants for possible additives in pellet feeding. *64*(2019), p. 58.
- Schneider, S. M. (2011). Quels probiotiques utiliser en hépato-gastroentérologie, quand et comment? *La Lettre de l'Hépatogastroentérologue*, *14*(4), p. 171.
- Seda Hacıoglu, and Buket Kunduhoglu. (2021). Probiotic Characteristics of *Lactobacillus brevis* KT38-3 Isolated from an Artisanal Tulum Cheese. pp. 2636-0772.
- Silva, J. G., Castro, R. D., Sant'Anna, F. M., Barquete, R. M., Oliveira, L. G., Acurcio, L. B., & Souza, M. R. (2019). In vitro assessment of the probiotic potential of *lactobacilli* isolated from Minas artisanal cheese produced in the Araxá region, Minas Gerais state, Brazil. *71*(2), p. 652.
- Sirichokchatchawana, W., Pupaa, P., Praechansria, P., Am-in, N., Tanasupawat, S., Sonthayanonc, P., & Prapasarakul, N. (2018). *119*(2018), 209.
- Sophie DROUULT, G. C. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. pp. 101–117.
- Teklay, A. (2018). isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract (git) of poultry. *thèse de doctorat*, 19. haramaya university, haramaya.

Villéger, 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*, 43-44. l'université de LIMOGES.

Yasukawa, k., Casamajor, P., Cohen-Hadria, A., & Descroix, V. (2008). Probiotiques et santé orale. *36*, pp. 2019-2022.

Yerlikaya, O. (2018). Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *102*, pp. 5-6.

Annexes

Annexes1

Milieu MRS (g/l)

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Phosphate dipotassique.....	2 g
Acétate de sodium	5 g
Tween 80 (polysorbate 80)	1 g
Citrate d'ammonium.....	2 g
Sulfate de magnésium.....	0,2 g
Sulfate de manganèse.....	0,1 g
Agar	16g

PH 5, 7 ± 0,1. Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

MilieuM17 (g/l)

Tryptone.....	2,5g
Peptone papaïnique de soja	5,0 g
Peptone pepsique de viande.....	2,5 g
Extrait de viande.....	5,0 g
Extrait autolytique de levure	2,5 g

Béta-Glycérophosphate de sodium.....	19,0 g
Lactose.....	5,0 g
Acide ascorbique	0,5g
Agar-agar bactériologique	15,0 g
Béta-Glycérophosphate de sodium	19,0 g
Sulfate de magnésium	0,25g

Autoclavage à 121 °C pendant 15 min

Milieu BFM (g/l) (Nebra et Blanch, 1999)

Extrait de viande	2 g
Extrait de levure.....	7 g
Amidon	2g
L-cystéine hydrochloride.....	0.5g
Chloridede sodium.....	5g
Peptone.....	5 g
Tryptone.....	2 g
Lactulose.....	5 g
Riboflavin.....	1g
Peptone	5 g
Tryptone.....	2 mg
Thiamine chloridehydrochloride	1 mg
Blue de méthylène.....	16 mg
Lithium chloride.....	2 g
acidepropionique(99%).....	5ml

Stérilisation à 121°C pendant 15minutes , après ajouter l' acide propionique et ajusté le ph à 5.5

Gélatine agar

Gélatine.....30

Peptones.....5

Extrait de levure.....3

Agar.....15

Eau distillée.....1L

Ajustement du pH à 6,5 Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes

Gélose nutritive :

Extrait de viande 1,0 g/L

Extrait de levure 2,5 g/L

Peptone5,0 g/L

Chlorure de sodium5,0 g/L

Agar-agar10g/L

pH = 7,0Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes

MRS sans citrate

Peptones.....	10
Extrait de viande.....	8,0
Extrait de levure.....	4,0
D(+)-Glucose.....	20
Di potassium hydrogène phosphate.....	2,0
Acétate de sodium tri hydraté.....	5,0
Sulfate de magnésium heptahydraté.....	0,2
Sulfate de manganèse tetrahydraté.....	0,05
Eau distillée	1L

pH final : 6,2 Autoclavage à 121 °C pendant 15min

Milieu API 50 CHL

Poly peptone	10g
Extrait de leueur	50g
Tween 80	1 ml
K ₂ HPO ₄	29g
Acétate de sodium	5g
Citrate diamoniaque	2 g
Sulfate de magnésium	0.20 g
Sulfate de magenèse	0.05 g
Bromocrésol Pourpre	0.17 g

Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes

Bouillon Nutritif (Diagnostic Liofilchem, Italie)

Extrait de viande.....	1 g/l
Extrait de levure.....	2 g/l
Peptone.....	5 g/l
Chloride de sodium.....	5 g/l
Eau distillé	1L

pH du milieu : $6,8 \pm 0,2$ Stériliser par autoclavage à 120°C pendant 15 min

MRS –Bouillon

Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Acétate de sodium trihydraté	5,0 g
Citrate d'ammonium	2,0 g
Tween 80	1,0 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2,0 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05 g

Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes , pH = 6.2

McFarland standard N° 4

BaCl ₂ (1.175%)	4ml
H ₂ SO ₄ (1%)	96ml

McFarland standard N°2

BaCl ₂ (1.175%)	2ml
H ₂ SO ₄ (1%).....	98ml

Solution de sulfate d'ammonium saturé

Sulfate d'ammonium27.5g
Eau distillé.....50ml

Eau physiologique

Peptone0.5g/L
Chlorure de sodium.....8.5g/l
Cysteine HCL.....0.5g/l

Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes

Seles billiaires

MRS.....1000ml
Seles biliaries50g
Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes

Milieu NaCl (6.5%)

MRS1000ml
NaCl.....65g
Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes

Milieu Lysozyme

MRS.....100ml
Lysozyme0.005g
Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes

Annex 2

Les étapes de coloration de gram :

- Préparation des frottis : étalement de colonie bactérienne sur lame et fixer par une flamme
- Ajouter violet de Gentiane pendant une 1 minute.
- Rinçage à l'eau distillée environ 5 secondes.
- Ajouter du Lugol pendant une 1 minute.
- Rinçage à l'eau distillée environ 5 secondes
- Décoloration avec de l'alcool pendant 15secondes.
- Lavage à l'eau distillé.
- Ajouter colorant de fuchsine pendant 1 minute.
- Rinçage à l'eau distillée puis séchée

Annexe3

Les Résultats API 50 CHL

Tableau : La souche **B3** appartient à l'espèce *Lactobacillus brevis*

	B3
Glycérol	-
Erythritol	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	+
Ribose	+
D-Xylose	+
L-Xylose	-
D-Adonitol	-
MDX	-
D-Galactose	+
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	-
L-Sorbose	-
L-Rhamnose	-
Dulcitol	+

Inositol	+
D-Manitol	+
D-Sorbitol	+
MDM	-
MDG	-
NAG	+
Amygdaline	-
Arbutin	+
ESC	+
Salicine	+
D-Celiobiose	+
D-Maltose	-
D-Lactose	+
D-Melibiose	-
Sucrose	-
D-Trehalose	+
Inuline	-
D-Mélézitose	-
Raffinose	-
Amidon	-
Glycogène	-
Xylitol	-
Gentiobiose	+
D-Turanose	+
D-Lyxose	-
D-Tagatose	+
D-Fucose	-
L-Fucose	-
D-Arabitol	-
L- Arabitol	-
Gluconate	+
2, Keto-gluconate	-
5, Keto-gluconate	-
	<i>Lactobacillus brevis</i> (100%)

Tableau: La souche **B2** appartient à l'espèce *Lactobacillus plantarum*.

	B2
Glycérol	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	+
Ribose	+
D-Xylose	+
L-Xylose	-
Galactose	+
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	+
L-Sorbose	-
L-Rhamnose	-

Inositol	-
D-Mannitol	+
D-Sorbitol	+
NAG	+
Amygdaline	+
ESC	+
Salicine	+
Celiobiose	+
D-Maltose	+
Lactose	+
D-Melibiose	+
Sucrose	+
D-Trehalose	+
Inuline	-
D-Mélézitose	+
Raffinose	-
Amidon	-
Glycogène	-
D-Turanose	+
Gluconate	+
	<i>Lactobacillus plantarum (95%)</i>

Résumé

L'objectif de notre travail était d'isoler et de caractériser les souches de bactéries lactiques du tractus gastro-intestinal de lapin et des abeilles. Après isolement, 36 souches ont été caractérisées et identifiées par des méthodes physiologiques et biochimiques. Sur la base des 5 souches sélectionnées, le développement des bactéries C1 et C2 à 6,5 NaCl nous a permis d'identifier ces souches respectivement comme *Enterococcus* et *Lactococcus*. Les autres souches (B1, B2, B3) ont été identifiées par chromatographie sur couche mince indiquant que ces souches appartenaient au genre *Lactobacillus*, et les souches identifiées biochimiquement à l'aide de la galerie API50 CHL de *Lactobacillus plantarum* (B2) et *Lactobacillus brevis* (B3) comme espèces. De plus, trois autres tests ont été développés pour confirmer l'activité probiotique des cinq souches sélectionnées : la tolérance au pH gastrique et la tolérance aux sels biliaires intestinaux et au lysozyme. Les résultats de ces tests ont été positifs, ce qui a démontré le potentiel probiotique de l'isolat. En effet, ces souches étaient capables d'inhiber la croissance d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Cependant, ces souches n'ont eu aucun effet inhibiteur sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Mots clé : probiotiques, *Lactobacillus*, les bactéries lactiques, *Lactococcus*.

Abstract

The objective of our work was to isolate and characterize strains of lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract of rabbits and bees. After isolation, 36 strains were characterized and identified by physiological and biochemical methods. Based on the 5 selected strains, the development of C1 and C2 bacteria at 6.5 NaCl allowed us to identify these strains as *Enterococcus* and *Lactococcus* respectively. The other strains (B1, B2, B3) were identified by thin layer chromatography indicating that these strains belonged to the genus *Lactobacillus*, and the strains identified biochemically using the API50 CHL gallery of *Lactobacillus plantarum* (B2) and *Lactobacillus brevis* (B3) as species. In addition, three other tests have been developed to confirm the probiotic activity of the five selected strains: tolerance to gastric pH and tolerance to intestinal bile salts and lysozyme. The results of these tests were positive, demonstrating the probiotic potential of the isolate. Indeed, these strains were able to inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. However, these strains had no inhibitory effect on *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words : probiotic, *Lactobacillus*, les bactéries lactiques, *Lactococcus*

ملخص

كان الهدف من عملنا هو عزل وتوصيف سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك من القناة الهضمية للآرانب والنحل. بعد العزل، تم توصيف وتحديد 36 سلالة بالطرق الفسيولوجية والكيميائية الحيوية. بناءً على السلالات الخمس المحدد، سمح لنا بتطوير بكتيريا C1 و C2 عند 6.5 NaCl بتحديد هذه السلالات على أنها *Enterococcus* و *Lactococcus* على التوالي. تم التعرف على السلالات الأخرى (B3، B2، B1) بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التنتيشير إلى أن هذه السلالات تنتمي إلى الجنس *Lactobacillus*، والسلالات التي تم تحديدها كيميائياً باستخدام معرض API50 CHL من *Lactobacillus plantarum* (B2) و *Lactobacillus brevis* (B3) كأصناف. بالإضافة إلى ذلك، تم تطوير ثلاثة اختبارات أخرى لتأكيد نشاط البروبيوتيك للسلالات الخمس المختارة: تحمل درجة الحموضة المعوية وتحمل أملاح الصفراء المعوية و الليزوزيم. كانت نتائج هذه الاختبارات إيجابية، مما يدل على إمكانات البروبيوتيك للعزلة. في الواقع، كانت هذه السلالات قادرة على منع نمو الإشريكية القولونية، المكورات العنقودية الذهبية. ومع ذلك، لم يكن لهذه السلالات تأثير مثبط على *Pseudomonas aeruginosa*.

الكلمات المفتاحية: البروبيوتيك، اللاكتوباسيلوس، بكتيريا حمض اللاكتيك، المكورات اللبنية.