



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

Référence..... / .....

# MÉMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

---

Présentées et soutenues par:

**SALMI Marwa et CHEKKAL Rahima**

Le: lundi 03 juillet 2023

## **Evaluation *in vitro* du pouvoir probiotique des *Bifidobacterium* isolés localement**

---

### **Jury:**

Mme. Achour Hanane	Université de Biskra	Président
M. Benkaddour bachir	Université de Biskra	Rapporteur
M. TITAOUINE Mouhame	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire: 2022 - 2023

## Remerciements

*Tout d'abord, nous exprimons nos remerciements à Allah, le tout puissant, de nous avoir donné de la force, la patience, le courage et la volonté à surmonter toutes les difficultés afin d'accomplir ce modeste travail.*

*Notre première pensée va tout naturellement à notre encadreur, Mr. Benkaddour Bachir non seulement d'accepté l'encadrement de ce travail, mais aussi pour sa confiance, ses conseils et sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*On tient particulièrement à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Nous exprimons aussi notre gratitude à tous les enseignants rencontrés lors de notre cycle universitaire.*

*A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents, pour leur soutien inconditionnel dans tout ce que J'ai pu entreprendre dans ma vie, leurs prières, encouragements et leurs conseils au cours de ma carrière universitaire vers le chemin du succès « Mon père, ma mère, je te remercie pour tout et j'espère avoir réalisé ne serait-ce qu'un peu ce que tu veux bien » ;*

*Ma merveilleuse sœur : «**Nada** » et mes chers frères : « **Issam eldin** » et « **Alaa Eddine** »*

*Et certainement à mon Mari et mon compagnon de route, « **Noureddine** » je vous remercie d'avoir été à mes côtés durant mon travail.*

*A vous tous famille, Mes amies «**Férial, Hadil, Nariman, Sohaila** » merci de m'avoir encouragé durant toutes ces années.*

## Dédicace

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

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

*À ma source de bonheur, **mon père**, qui est toujours disponible pour nous, et prêt à nous aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.*

*À chères sœurs **Afaf** et **Safa**, mes chers frères **Zaki**, **Anwar** et **Mohammed**.*

*A mon petit chéri d'amour **Wathik**.*

*À toute les membres de ma famille, petits et grands.*

*À mes chères amies **Fahima**, **Hiba**, **Hanane**, **Maram**, **Oum Anas**, **Nada** et **Wissam** qui m'apportées de l'aides avec ses précieux conseils. À ceux qui m'ont encouragée et soutenu dans les moments difficiles.*

♥ Je vous aime ♥

# Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Dédicace	
Table des matières	
Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	III
Liste des abréviations .....	III
Introduction générale .....	1

## Partie I

### Synthèse bibliographique

#### Chapitre 1 :Les bifidobactéries

1.1. Historique, taxonomie et caractéristiques générales .....	4
1.2. Caractérisation des bifidobactéries .....	5
1.2.1. Propriétés phénotypiques .....	5
1.2.1.1 Morphologie .....	5
1.2.2. Propriétés physiologique .....	5
1.2.2.1. Température optimal.....	5
1.2.2.2. Résistance et sensibilité au pH .....	6
1.2.2.3. Sensibilité à l'oxygène.....	6
1.3. Besoins nutritionnels.....	6
1.3.1. Besoins en composés azotés.....	6
1.3.2. Besoins en vitamines et sels minéraux .....	6
1.4. Métabolisme.....	7

#### Chapitre 2 :Les probiotiques

2.1. Historique .....	9
2.2. Définition .....	9
2.3. Critères de sélection d'un probiotique.....	10
2.4. Mécanismes d'action des probiotiques .....	11
2.5. Les fonctions des probiotiques .....	12
2.6. Les principaux micro-organismes probiotiques à usage humain .....	13
2.7. Les bifidobactéries comme probiotiques.....	13

## Partie II

## La partie expérimentale

## Chapitre 3: Matériels et methodes

3.1. Echantillonnage.....	16
3.2. Isolement des bifidobactéries.....	16
3.3. Purification des souches.....	17
3.4. Identification des souches.....	17
3.4.1. Pré-identification des bifidobactéries.....	17
3.4.1.1. Étude macroscopique.....	18
3.4.1.2. Étude microscopique.....	18
3.5. Conservation des souches.....	18
3.6. Identification du genre.....	18
3.6.1. Test NaCl :.....	18
3.6.2. Test de la catalase.....	18
3.6.3. Production de CO <sub>2</sub> à partir du glucose :.....	18
3.7. Mise en évidence in vitro de quelques propriétés probiotiques.....	18
3.7.1. Tolérance à l'acidité :.....	19
3.7.2. Résistance aux sels biliaires :.....	20
3.7.3. Tolérance au lysozyme.....	21
3.8. Évaluation de la pathogénicité et de la sécurité.....	21
3.8.1. Activité antibactérienne.....	21
3.8.2. Test de la gélatinasse.....	22
3.8.3. Test de DNase.....	22
3.9. Identification du genre par la méthode de la plaque CCM pour les souches lactique en forme bâtonnet.....	22
3.10. Profil de fermentation des sucres.....	23
3.10.1. Préparation des cultures des bactéries lactiques.....	23
3.10.2. Ensemencement, incubation et lecture.....	23
Chapitre 4: résultats et discussion	
4.2. Pré-identification des bifidobactéries.....	26
4.2.1. Aspect macroscopique.....	26
4.2.2. Aspect microscopique.....	27
4.3. Identification du genre.....	28
4.3.1. Test du Nacl.....	28
4.3.2. Test de la catalase.....	28

---

4.3.3. Production de CO <sub>2</sub> à partir du glucose : .....	29
4.3.4. Détermination des acides organiques par CCM.....	29
4.4. Évaluation de la pathogénicité et de la sécurité .....	31
4.4.1. L'activité de la gélatinasse et de la DNase.....	31
4.4.2. Activité antibactérienne.....	31
4.5. Etude du potentiel probiotique : .....	33
4.5.1. Tolérance à l'acidité .....	33
4.5.2. Résistance aux sels biliaires .....	34
4.5.3. Résistance au lysozyme.....	35
4.6. Profil fermentaire des sucres .....	36
Conclusion.....	38
Bibliographie	
Annexes	
Résumé	

---

## Liste des Tableaux

Tableau 1: Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques (FAO/OMS, 2002; Benkaddour, 2013; Bahri, 2014). .....	10
Tableau 2: Micro-organismes probiotiques les plus importants à usage humain (Benjamin, 2016). .....	13
Tableau 3: Activités de la gélatinase et la DNase des souches de bifidobactéries. ....	31
Tableau 4: Activité antibactérienne des souches pures sur les germes indicatrices (mm). ....	32
Tableau 5: Les résultats obtenus pour les isolats concernant la tolérance aux conditions acides de l'estomac. ....	34
Tableau 6: Résultats de la tolérance aux sels biliaires des souches identifiées. ....	35
Tableau 7: Les résultats obtenus pour les isolats concernant la résistance aux lysozymes. ....	35

---

## Liste des Figures

Figure 1: observation au microscope électronique des cellules de <i>Bifidobacterium sp</i> (Biavti, <i>et al.</i> , 2000) .....	5
Figure 2: Mécanismes d'action des probiotiques selon (Bermudez-Brito <i>et al.</i> , 2012). .....	12
Figure 3: Protocole d'isolement des bifidobactéries.....	17
Figure 4: Protocole d'étude de la tolérance de la souche des bactéries bifidobactéries à l'acidité gastrique. ....	20
Figure 5: Aspect macroscopique des bifidobactéries isolées sur gélose MRS-Cys.....	26
Figure 6: Observation microscopique (X100) après coloration au méthylène bleu des différentes formes cellulaires des souches de bifidobactéries isolées.....	27
Figure 7: résultat du test de NaCl (test négatif). ....	28
Figure 8: Résultat du test de la recherche de catalase pour les souches isolées.....	29
Figure 9: Résultat de type fermentaire des isolats.....	29
Figure 10: Séparation d'acides organiques standards sur la plaque CCM. (A) acide acétique, (B) acide lactique, (C) acide citrique et (D) acide succinique. ....	30
Figure 11: Analyse CCM des acides organiques dans des bouillons de culture de bifidobactéries respectivement Ab1, Ab2, S11, S12, Pg1. ....	30
Figure 12: Résultat de l'activité antibactérienne des souches isolées contre trois espèces pathogènes. ....	32

## Liste des abréviations

**B:** *Bifidobacterium*

**F6PPK:** fructose-6-phosphokétolase

**MRS:** milieu de Man, Rogosa and Sharpe

**MRS-Cys :** milieu de Man, Rogosa and Sharpe cystéiné

**Eau physiologique-Cys :** eau physiologique peptonée cystéinée

**NaCl :** Chlorure de sodium

**CO<sub>2</sub> :** Dioxyde de carbone

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé

**pH :** potentiel d'hydrogène

**P/v:** poids/volume

**v/v :** volume/volume

**UFC :** Unité formant colonie

**% :** pourcent

**°C:** degré Celsius

**GIT :** tractus gastro-intestinal

**G :** guanine

**C :** cytosine

**CCM :** chromatographie sur couche mince

**OMS :** Organisation mondial de la santé.

**GALT :** Tissu lymphoïde associé au tube digestif.

**FAO :** Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

# **Introduction générale**

## Introduction générale

L'homme et les animaux vit continuellement avec une population de microorganismes vivantes diversifiées et complexe (bactéries, levures, virus) habitant son tractus gastro-intestinal (TGI) appelée microbiote (Bahri., 2014). Tandis que le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans le maintien de la santé humaine et animale tout au long de la vie, il contribue à la résistance aux agents pathogènes et interagit avec le système immunitaire (Folie, *et al.*,2018).

Les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium* sont considérés comme la principale microflore commensale qui habite le tractus gastro-intestinal de l'homme et d'autres animaux. Certaines souches sont fréquemment utilisées comme bactéries probiotiques. Le terme "probiotique" est défini comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont fournis en quantités adéquates, contribuent à un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (Benkaddour, *et al.*,2022).

Les bénéfices des probiotiques sont importants dès le plus jeune âge. Depuis quelques années, les tests sûrs des bactéries probiotiques portent sur le groupe des bifidobactéries (Pancrasia, *et al.*,2017). En fait, le genre *Bifidobacterium* est l'un des genres contenant des souches probiotiques les plus bénéfiques en dehors des bactéries lactiques et est parmi les genres les plus prédominants dans le côlon humain et les nourrissons allaités.

les espèces du genre *Bifidobacterium* ont été isolées pour la première fois à partir d'excréments de nourrissons nourris au sein, mais jusqu'à présent, elle a été découverte dans diverses niches écologiques, notamment les eaux usées, le lait fermenté et les installations de digestion anaérobie ; néanmoins, les isolats les plus fréquents sont associés au tractus gastro-intestinal des humains et des animaux (Chen, *et al.*,2021 (Brown, *et al.*, 2019). Ceci explique la nécessité d'une recherche continue de nouvelles souches à potentiel probiotique, qui pourraient être utiles pour étudier leur effet sur différents troubles (Hossain, *et al.*, 2018 ).

L'objectif principal de notre étude c'était l'isolement et l'identification des souches de bifidobactéries isolées localement à partir des selles de nourrissons, les intestins des abeilles et les intestins d'un pigeon et l'étude de leurs potentiel probiotique *in vitro*.

Notre manuscrit est structuré en trois parties, la première est consacrée à une synthèse bibliographique articulée qui contient des généralités sur les bifidobactéries et les probiotiques. Partie pratique : contient la méthodologie de travail adoptée, les résultats obtenus et leurs discussions. Enfin, une conclusion générale qui achève ce travail.

# **Partie I**

## **Synthèse bibliographique**

# **Chapitre 1 :**

# **Les bifidobactéries**

## 1. Les bifidobactéries

### 1.1. Historique, taxonomie et caractéristiques générales

La première mention dans les annales de la science du nom; bifidus; appliqué à une cellule remonte à 1900, lorsque Tissier (1900) a découvert dans les fèces de nourrissons allaités une bactérie anaérobie en forme de bâtonnet, à Gram positif, non productrice de gaz et à morphologie bifide; il a appelée *Bacillus bifidus* (Sgorbati *et al.*,2003) . En (1917) Winslow a proposé de classer *Bacillus bifidus* dans la famille des *Lactobacillaceae*, et Holland (1920) a renommé cette souche *Lactobacillus bifidus*. Le nom du genre *Bifidobacterium* est proposé par Orla-Jensen en (1924) mais étant donné ses similitudes avec le genre *Lactobacillus* et les bifidobactéries resteront assimilées au genre *Lactobacillus*. En 1957, Dehnert décrit l'existence des plusieurs biotypes de *Bifidobacterium*. En (1963) Reuter a identifié et nommé sept autres espèces de *Bifidobacterium*, en plus de *Bifidobacterium bifidum* (Delcenserie, *et al.*,2002).

Actuellement, le genre *Bifidobacterium* comprend plus de 90 espèces, à l'exclusion des espèces non classées (Chen, *et al.*,2021). plus de 80 espèces et sous-espèces de *Bifidobacterium* ont été identifiées dans plusieurs hôtes animaux, avec environ 2400 assemblages de génomes disponibles via la base de données NCBI Génome. Cependant, la majorité de ces séquences proviennent d'espèces associées à l'homme, à savoir ; *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum* et *B. pseudocatenulatum*. (Kujawska, *et al.*,2022).

Les bifidobactéries sont des anaérobies obligatoires appartenant à la branche des bactéries Gram-positives dont l'ADN est à haut pourcentage de G +C ; Leur contenu génomique du GC varie entre 42 et 67 % (Biavati et Mattarelli,2001). qui comprend également les corynébactéries, les mycobactéries et les streptomycètes (Schell, *et al.*, 2002).

Elles résident dans différentes niches écologiques, telles que le tractus gastro-intestinal (GIT) humain et animal, la cavité buccale et les intestines des insectes. Mais on peut également les trouver dans le sang et les eaux usées, peut-être en raison d'une contamination de l'environnement (Iugli, *et al.*,2017). Les espèces du genre *Bifidobacterium* sont la communauté bactérienne la plus répandue, formant 40 à 90 % du microbiote intestinal total à différents âges du cycle de vie (Sadeghpour , *et al.*,2023).

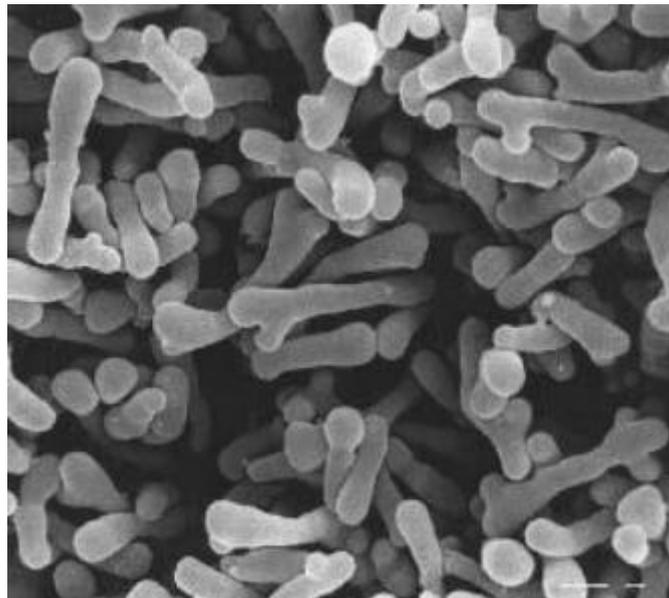
## 1.2. Caractérisation des bifidobactéries

### 1.2.1. Propriétés phénotypiques

#### 1.2.1.1 Morphologie

Les bifidobactéries sont des bactéries Gram-positives, non mobiles et non sporulées. forme incurvée et en massue, souvent ramifiée avec des formes en Y et en V (Pino, *et al.*,2022). Leur morphologie cellulaire est celle de bâtonnets courts et courbés, certains avec une extrémité bifide tandis que d'autres ont une forme caractéristique en Y ou en V, appelée forme bifide, les bifidobactéries étaient considérées comme appartenant au genre *Lactobacillus* en raison de caractéristiques morphologiques et culturaux très similaires (Nambundunga.,2020).

Les *bifidobacterium* peuvent prendre différentes morphologies cellulaire selon les conditions de culture .Par exemple, la disposition en «V» ou en palissade est caractéristique chez *B. angulatum*, l'alignement d'éléments globulaires chez *B. catenulatum*, de longues chaînes de cellules régulières chez *B. pullorum*, ... ( Delcenserie, *et al.*,2002).



**Figure 1:** observation au microscope électronique des cellules de *Bifidobacterium sp* (Biavti, *et al.*,2000)

### 1.2.2. Propriétés physiologique

#### 1.2.2.1. Température optimal

Les propriétés des souches appartenant au genre *Bifidobacterium* sont dépendantes de l'hôte. La température optimale rapportée pour la croissance des souches bifidobactéries

humaines est entre 36 °C et 38 °C ; pour les espèces d'origine animale, elle est légèrement supérieure (41–43 °C) et peut être même jusqu'à 49,5 °C.

Respectivement, bien que *B. thermacidophilum* soit capable de se développer à 49°C et pour *B. thermacidophilum*, il n'y a généralement pas de croissance en dessous 20° C à l'exception de *B. psychroaerophilum*, dont la croissance a été signalée à des températures aussi basses comme 8° C (Matejcková, et al., 2019).

### **1.2.2.2.Résistance et sensibilité au pH**

Le pH optimal pour la croissance des bifidobactéries se situe entre 6,5-7,0. Par conséquent les souches *B. animalis* et *B. thermacidophilum* s'avèrent également métaboliquement actives à un pH de 3,5-4,0 (Chen, et al.,2021).

### **1.2.2.3.Sensibilité à l'oxygène**

Généralement, les bifidobactéries sont des microorganismes strictement anaérobies, bien que certaines souches puissent tolérer l'oxygène en présence de dioxyde de carbone (gaz carbonique) (Tannock., 1999), tandis que, certaines souches sont moins sévères que autres et peuvent supporter une tension oxygène de 10 cm de mercure (Delcenserie,2002).

D'une manière générale, les espèces du genre *Bifidobacterium* ne peuvent pas se développer en présence d'oxygène, mais survivent cependant (Beerens, et al., 2000).

## **1.3. Besoins nutritionnels**

### **1.3.1. Besoins en composés azotés**

Les bifidobactéries sont capables d'utiliser les sels d'ammonium comme seule source d'azote par contre d'autres espèces comme *B.mangnum*, *B.coniculi* et *B.choerinum* exigent la présence d'azote organique (Hassinen, et al., 1951), Ces espèces, lorsqu'elles croissent sans source d'azote organique, rejettent des taux considérables d'acides aminés dans le milieu. Généralement, les bifidobactéries sont incapables de réduire les nitrates en nitrites (Delcenserie, et al., 2002).

### **1.3.2. Besoins en vitamines et sels minéraux**

Aussi la croissance des bifidobactéries est stimulée par la présence d'ions et vitamines, Comme les micro-organismes contenaient, outre le fer, de grandes quantités de magnésium et de manganèse et le zinc, il est probable que ces métalloéléments soient essentiels à la croissance normale d'organisme (Delcenserie, et al., 2002).

Certaines espèces de bifidobactéries sont censées convertir un certain nombre de composés alimentaires en molécules bioactives bénéfiques pour la santé, telles que certaines vitamines conjuguées. Il a été démontré que certaines souches de bifidobactéries produisent des vitamines dans le milieu. Cette capacité est variable selon les espèces (LeBlanc, *et al.*, 2013).

#### 1.4. Métabolisme

Les bifidobactéries sont les organismes saccharolytiques qui peuvent fermenté le glucose, le galactose et le fructose d'une manière spécifique. Elles sont connues pour métaboliser un grand nombre de glycanes présents dans l'intestin.

Ces glycanes sont métabolisés par une voie unique de fermentation des hydrates de carbone, appelée voie de la fructose-6-phosphocétolase (F6PPK) ou Bifid Shunt (dérivation bifide) (de Vries et Stouthamer, 1967). L'enzyme clé de ce mécanisme est la Fructose-6-phosphate phosphokétolase (F6PPK) qui scinde l'hexose-P en érythrose-4-P et acétylphosphate (Delcenserie, *et al.*, 2002).

Le contenu en gènes d'un génome bifidobactérienne semble refléter son adaptation à L'environnement gastro-intestinal de l'homme. la présence de gènes codant pour une variété 'enzymes modifiant les enzymes modifiant les hydrates de carbone, telles que les glycosyl hydrolases, les transporteurs ABC (transporteurs à cassettes liant l'ATP) de sucres et le PEP-PTS (PEP- phosphoénolpyruvate ; PTS-système de phosphotransférase) qui sont tous nécessaires au métabolisme de la plante et de l'hôte (Pokusaeva, *et al.*, 2011).

La présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson, *et al.*, 2004 ; Pilet, *et al.*, 2005 ; Ho, *et al.*, 2007).

La majorité des bifidobactéries utilisent le lactose, le glucose, le sucrose et le galactose comme source de carbone (Hadadji., 2007). Les caractéristiques fermentatives distinguant les espèces du genre *Bifidobacterium* (Mattarelli & Biavati, 2018) sont cité dans l'annexe VII.

# **Chapitre 2 :**

# **Les probiotiques**

## 2.1. Historique

Le terme probiotiques est dérivé du mot grec-'Pro'- (signifie 'pour') et 'bios' (signifie-'vie') c'est-à-dire 'pour la vie', le antonyme du terme antibiotiques. Ce mandat était le 1<sup>er</sup> introduit par Kollath (1953).

L'utilisation de micro-organismes pour promouvoir la santé est très concept ancien et remonte au classique Littérature romaine. Les probiotiques ont été introduits en 1900 par Bactériologiste ukrainien et lauréat du prix Nobel Ilya Metchnikoff. Étamine Grigoroff (1898) isolé bactérie *Lactobacillus Bulgaricus*, du yaourt et rapporta à Metchnikoff qu'il y avait de nombreux centenaires vivant en Bulgarie qui ont attribué leur longévité à leur habitude quotidienne de manger du yogourt maison.

Metchnikoff a commencé à étudier *Lactobacillus Bulgaricus* et pensait pouvoir s'implanter avec succès dans le tractus intestinal et empêcher la multiplication et même diminuer le nombre de bactéries putréfactives. Il a rapporté que les Bulgares avaient une durée de vie moyenne exceptionnellement longue au début des années 1900 et que quatre sur mille les gens ont vécu plus de 100 ans.

En 1907, Henry Tissier a observé que les enfants avec la diarrhée avaient dans leurs selles un faible nombre de « bifides » bactéries par rapport aux enfants en bonne santé. Ces bactéries déplacerait les bactéries protéolytiques qui causent la diarrhée et a recommandé l'administration de bifidobactéries à nourrissons souffrant de ce symptôme.

Roy Fuller a souligné l'exigence de viabilité pour probiotiques et introduit l'idée qu'ils ont un effet bénéfique sur l'hôte (Dash TR et al.,2015).

## 2.2.Difinition

D'après la définition consensuelle de l'OMS , un probiotique est un micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité suffisante, produit un avantage sanitaire pour l'hôte. Ces micro-organismes sont constitués par des bactéries ou des levures qui doivent être compatibles avec une liste de critères pour se prétendre probiotiques. Il s'agit de trois types de critères (de sécurité, fonctionnels et technologiques) :

– les principaux critères de sécurité sont un historique de non pathogénicité et aucun risque de transmission de gènes résistants à antibiotiques ;

- fonctionnellement, un probiotique doit pouvoir résister à l'acidité gastrique et à la bile ainsi qu'aux enzymes digestives, être capable d'adhérer à cellules intestinales et persistent

dans le tube digestif, pour prouver des capacités d'immunostimulation et de production de substances antimicrobiennes par rapport aux pathogènes :

– afin de pouvoir être administré vivant au sujet, un probiotique doit être stable pendant les procédés de production et conserver ses propriétés probiotiques dans le produit fini. (Jradi-Hocine .,2018).

### 2.3. Critères de sélection d'un probiotique

En plus de devoir identifier les souches probiotiques par séquençage de l'ARN 16S, Certaines de ses propriétés physiologiques de base doivent être prises en compte pour s'assurer que son efficacité et le respect des règles de sécurité liées à son utilisation (selon l'organisation Monde des Gastroentérologie, 2008) :

**Tableau 1:**Principaux critères utilisées pour la sélection des souches probiotiques( FAO/OMS,2002; Benkaddour,2013; Bahri,2014).

<b>Critères de sécurité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Origine humaine ou animale.</li> <li>o Souche non-pathogène et non toxique et reconnue comme sûres (GRAS).</li> <li>o Identification diagnostique précise (souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques).</li> <li>o Souche déposée dans une collection de cultures internationale.</li> <li>o Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques.</li> </ul>
<b>Critères fonctionnels</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Tolérance à l'acidité, la bile et aux enzymes digestifs.</li> <li>o Adhérence et colonisation de l'épithélium/des tissus intestinaux.</li> <li>o Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes (Bactériocines, acides organiques, les acides gras, le peroxyde d'hydrogène et le diacétyl ou autres composés inhibiteurs).</li> <li>o Modulation du système immunitaire</li> <li>o Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé.</li> </ul>

<b>Critères technologiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Facilité la production de quantités élevées de biomasse et productivité élevée des cultures</li> <li>o Capacité à survivre et à conserver leurs propriétés tout au long des processus de stockage et de distribution, et même après production.</li> <li>o Génétiquement stable.</li> <li>o Rentable.</li> <li>o Résistance aux phages.</li> <li>o Caractéristiques sensorielles appropriées.</li> </ul>
--------------------------------	---

#### 2.4. Mécanismes d'action des probiotiques

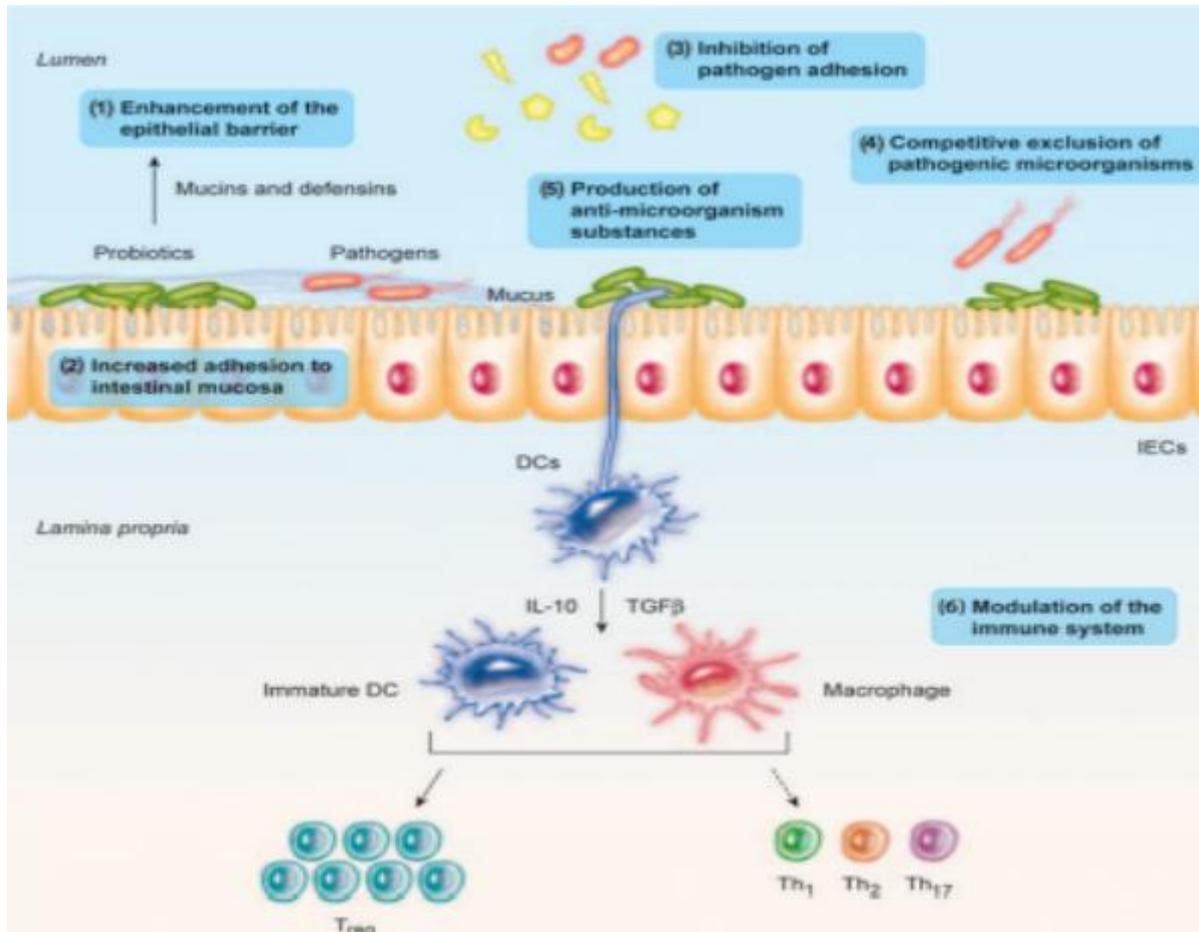
Les bienfaits des probiotiques peuvent se produire directement ou indirectement par un nombre de mécanismes. Ces mécanismes potentiels tournent autour de la modulation de l'écosystème intestinal, amélioration de la résistance à la colonisation et modulation de la résistance immunitaire.

La consommation de probiotiques et la colonisation transitoire qui se produit peuvent influencer la composition et activité du microbiote intestinal naturel et contribuent à maintenir un équilibre bénéfique en augmentant la population de bactéries bénéfiques et en diminuant la population de micro-organismes nuisibles. Ceci peut être réalisé par la production d'acides organiques ou d'acides gras à chaîne courte, qui abaissent le pH intestinal et la production d'agents antimicrobiens tels que les bactériocines, rendant ainsi le intestinale plus favorable aux bactéries bénéfiques telles que les lactobacilles et les bifidobactéries et, par conséquent, moins favorable aux micro-organismes pathogènes.

La croissance et le métabolisme des micro-organismes probiotiques peuvent modifier l'environnement intestinal de sorte que la résistance à la colonisation est améliorée. Cela peut résulter de l'adhésion aux cellules épithéliales par les probiotiques, bloquant ainsi l'adhésion des agents pathogènes (c'est-à-dire l'exclusion compétitive), ainsi que la stimulation de la production de mucine, qui améliore la fonction de barrière intestinale.

Les probiotiques peuvent stimuler l'immunité muqueuse et moduler les réponses immunitaires par leur interaction avec le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT). GALT est le plus grand tissu lymphoïde du corps humain et contient diverses cellules du système immunitaire, qui interagissent avec micro-organismes intestinaux. Les métabolites, les composants de la paroi cellulaire et l'ADN des micro-organismes probiotiques sont reconnus

par les cellules hôtes qui y sont sensibles, par exemple les récepteurs Toll-like, et l'activation de ces récepteurs conduit à la modulation des cytokines pro- et anti-inflammatoires l'expression, c'est-à-dire la régulation à la baisse des réponses inflammatoires et allergique (Amund.,2016).



**Figure 2:** Mécanismes d'action des probiotiques selon (Bermudez-Brito *et al.*,2012).

### 2.5. Les fonctions des probiotiques

Il existe plusieurs types :

Tout d'abord, il joue un rôle dans le renforcement de la barrière intestinale. Par exemple, production de mucus ou augmentation due à la compétition animale. -a un effet antibactérien Par la production de bactériocines, molécules capables d'induire cela -Tuer certaines bactéries Gram-positives et leur capacité à abaisser leur pH et Il protège les intestins et inhibe le développement de certaines bactéries Gram négatif.

Enfin, ils ont des capacités immunomodulatrices stimulent l'immunité innée par la production de cytokines de type TH1, et l'immunité adaptative par la production d'IgA sécrétoires pendant la période d'immunisation (Jradi-Hocine, 2018).

### 2.6. Les principaux micro-organismes probiotiques à usage humain

Selon la FAO et l'OMS, les probiotiques sont des "micro-organismes vivants". Lorsqu'il est administré en quantités suffisantes, il offre des avantages pour la santé de l'hôte.

Certains médicaments, aliments (principalement des produits laitiers fermentés) ou les compléments alimentaires contiennent des micro-organismes vivants représentés par les bactéries ou levures. Les micro-organismes probiotiques les plus importants chez les humains sont divisés en trois groupes :

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

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

### 2.7. Les bifidobactéries comme probiotiques

Certaines espèces de *Bifidobacterium* à activité probiotique sont économiquement importantes et elles sont ajoutées en grande quantité sous forme de bactéries vivantes de nombreuses préparations alimentaires (Turroni, *et al.*, 2010). Effets des probiotiques *Bifidobacterium* abaisse le taux de cholestérol, améliore l'intolérance au lactose, Déliantage des acides biliaires et stimulation du système immunitaire. Mais toute capacité des bifidobactéries à protéger contre les infections, similaire aux probiotiques courants Enteric est toujours l'effet probiotique le mieux étudié dans ce genre bactérien (Mahmoudi., 2014).

# **Partie II**

## **La partie expérimentale**

# **Chapitre 3 :**

## **Matériels et méthodes**

### 3.1. Echantillonnage

Le but de cette étude était la isoler des souches de *Bifidobacterium* à partir des échantillons d'origine humaines et animales et d'évaluer leur potentiel probiotique. Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Mohamed KHIDER Biskra.

L'isolement des souches a été fait à partir de trois échantillons qui sont à savoir : les selles d'un nourrisson ; les intestins d'un pigeons et l'intestin des abeilles.

Les matières fécales ont été collectées auprès d'un nourrisson âgé de six mois, naît par accouchement vaginal, allaité exclusivement au sein, en bonne santé et qui n'a été sous aucune antibiothérapie avant 1 mois de l'échantillonnage. Les selles ont été dans des pots stériles et maintenues en anaérobiose à basse température lors de leur transport au laboratoire.

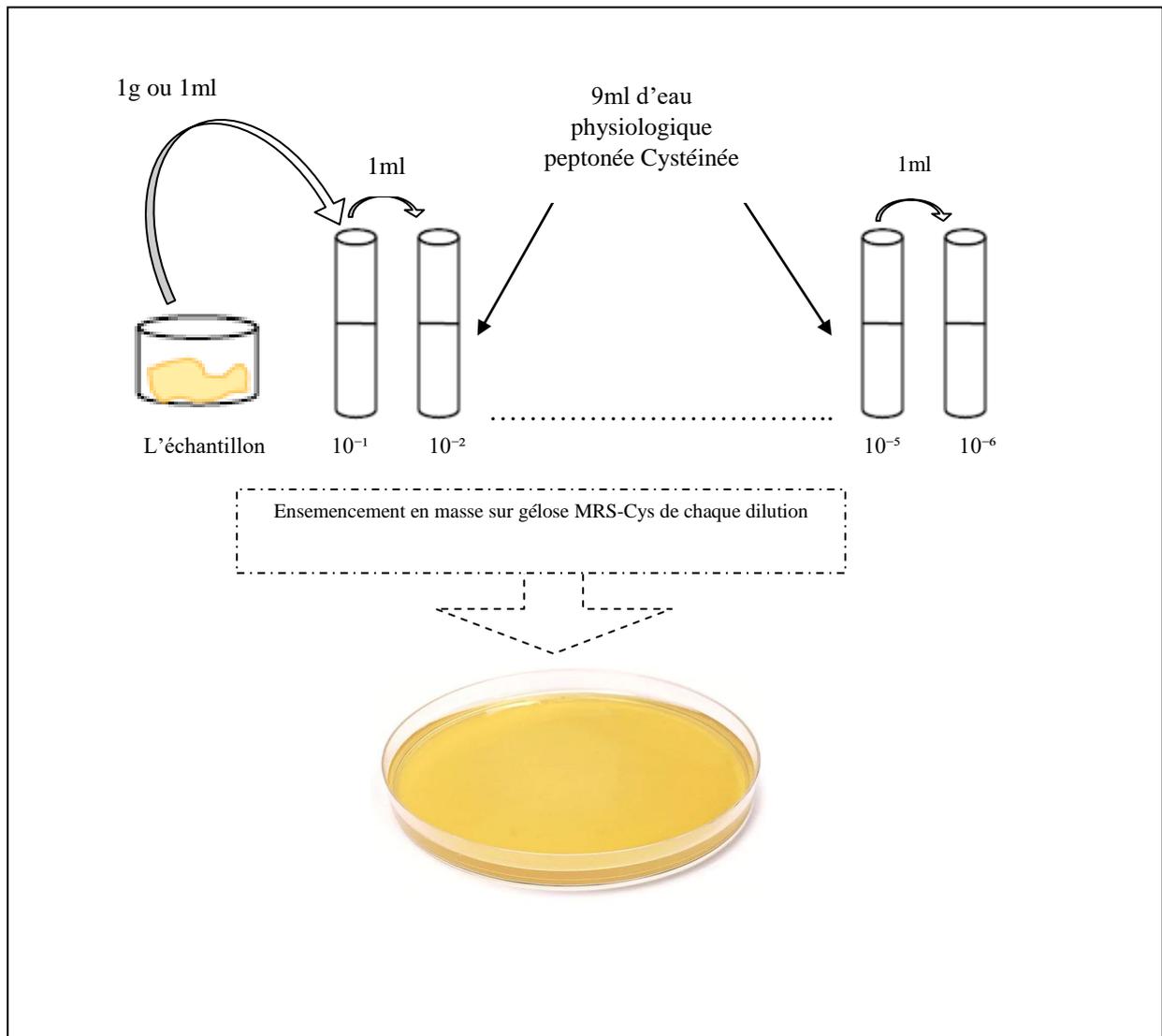
Quant aux intestins de pigeon, ils ont été prélevés après son sacrifice où ont été collectés immédiatement dans des botes stérile contenant l'eau physiologiques-cystéinée. Les échantillons de les intestins ont été conservés à 4°C jusqu'au moment d'utilisation.

En ce qui concerne les abeilles, après décapitation, la partie abdominale a été broyée à l'aide d'une pipette pasteur et pince et remis en suspension dans un tube contenant de physiologique-cystiénée.

### 3.2. Isolement des bifidobactéries

L'isolement des souches a été fait à partir de la solution mère préparée de chaque échantillon Après la réalisation d'une série de dilution décimale par le transfert d'un volume de 1ml dans des tubes contenant 9 ml d'eau physiologique peptonée cystéinée. Chaque suspension a été homogénéisée pendant plus ou moins de 30 secondes à l'aide d'un vortex.

L'isolement a été fait en profondeur où 1 ml de chaque dilution a été déposés dans une boite de pétri en coulant sur le volume déposé 15ml de gélose MRS-cystéine en surfissions maintenu à température de 45°C. L'inoculum ensuite a été mélangé avec le milieu en effectuant des mouvements circulaires et va-et-vient. Après solidification de milieu, les boites ont été incubées en anaérobie (dans une jarre avec une bougie) à 37°C pendant 48 à 72h.



**Figure 3:** Protocole d'isolement des bifidobactéries.

### 3.3. Purification des souches

Après l'incubation, les colonies isolées sont repiquées de façon alternée sur gélose MRS-Cys. L'opération est renouvelée en prenant chaque fois une colonie isolée (bien distinctes et bien développées), jusqu'à purification dans des conditions anaérobies à 37°C pendant 24h.

### 3.4. Identification des souches

#### 3.4.1. Pré-identification des bifidobactéries

La pré-identification basée sur des aspects macroscopique et microscopique.

#### **3.4.1.1. Étude macroscopique**

La pureté des bactéries isolées est confirmée par étude macroscopique (forme, couleur, taille).

#### **3.4.1.2. Étude microscopique**

Les isolats ont été soumis à la coloration au bleu de méthylène et la coloration de Gram, puis ont été observés au microscope à l'objectif  $\times 100$  à immersion.

### **3.5. Conservation des souches**

Pour une conservation de longue durée, les isolats purs sont congelées dans des eppendorfs stériles de 1ml de bouillon MRS-Cys contenant de glycérol stérile, Une couche de l'huile de vaseline a été ajoutée et conserve à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.6. Identification du genre**

#### **3.6.1. Test NaCl :**

L'objectif de ce test est mettre en évidence la présence des entérocoques. Le test consiste en l'inoculation des souches bactériennes dans des tubes contenant le bouillon MRS-Cys additionnés 65% De NaCl, puis incubé à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h sous conditions d'anaérobiose. L'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble.

#### **3.6.2. Test de la catalase**

Une boucle de la colonie unique a été étalée sur une lame en verre. Puis, déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Un résultat positif a été interprété comme la formation de bulles de gaz (Pancrasia, et al., 2017).

#### **3.6.3. Production de $\text{CO}_2$ à partir du glucose :**

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homo de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz ( $\text{CO}_2$ ).

Pour se faire, les souches bactériennes sont repiquées sur le bouillon MRS sans citrate contenant une cloche de Durham. Après incubé à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h en anaérobiose.

La production d'un gaz indique que la souche est hétérofermentaire et son absence indique qu'elle est homofermentaire.

### **3.7. Mise en évidence in vitro de quelques propriétés probiotiques**

Pour pouvoir exercer un rôle bénéfique sur la santé humaine, les bactéries probiotiques doivent conserver une viabilité lors du passage dans le tractus gastro-intestinal (Shehata, et al., 2016).

### 3.7.1. Tolérance à l'acidité :

L'aptitude des souches pures à résister à l'acidité gastrique, a été déterminée selon la technique décrite par Sirichokchatchawan *et al.*, (2018). Les cultures bactériennes d'une nuit ont été récoltées par centrifugation, lavées et remises en suspension dans solution saline stérile (0,85 % de NaCl, p/v). Après standardisation des cellules bactérienne à une opacité égale à 4 McFarland= $1,2 \cdot 10^9$  cellule/ml, 100  $\mu$ l de la suspension bactérienne ont été mélangé avec 900  $\mu$ l du MRS ajusté à pH=2.5 et à pH=3.5. Les cultures ont été ensuite incubées durant 3h à 37°C en anaérobiose et compte viable a été déterminé après une série de dilutions allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  dans l'eau physiologique-Cys. le compte viable des souches a été fait sur MRS-cys par encemecemaent dans la masse et incubation de 37° C pendant 48h en condition d'anaérobie. La formule suivante a été appliquée pour énumérer le compte viable des souches :

$$N_{ufc} = \frac{\Sigma C}{(n_1 \cdot 1) + (n_2 \cdot 0,1) + (n_3 \cdot 0,01) dV}$$

Où :

$\Sigma C$  : somme des colonies comptées sur toutes les boites retenues,

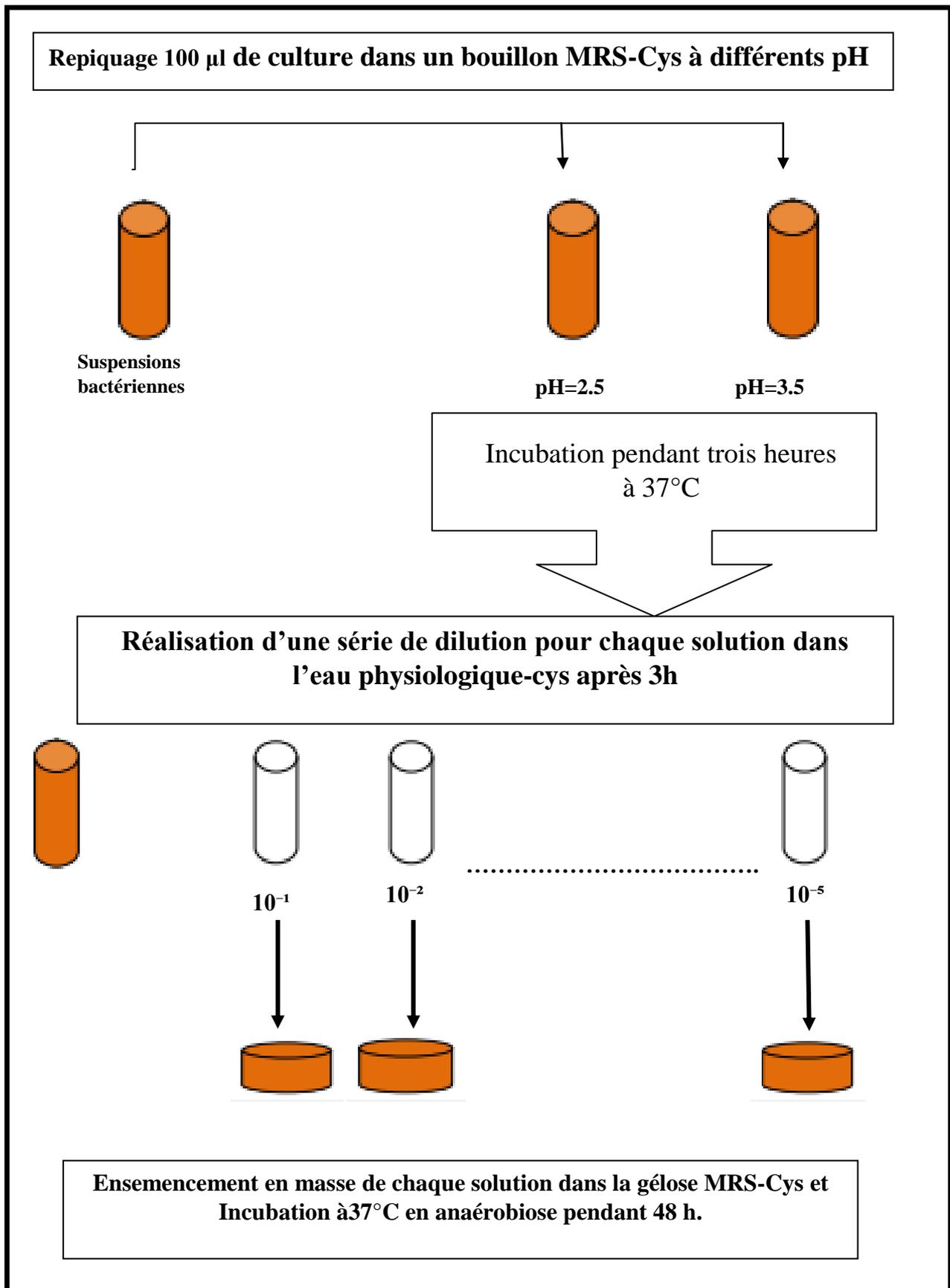
$V$  : le volumeensemencé dans la boîte de Pétri,

$n_1$  : nombre de boites retenues à la première dilution,

$n_2$  : nombre de boites retenues à la deuxième dilution,

$d$  : taux de dilution de la première dilution.

$V$  : volume déposer dans la boîte de Pétri



**Figure 4:** Protocole d'étude de la tolérance de la souche des bactéries bifidobactéries à l'acidité gastrique.

### 3.7.2. Tolérance aux sels biliaires

La tolérance des isolats aux sels biliaires a été déterminée selon la méthode décrite par Sirichokchatchawan *et al.*(2018) , avec quelques modifications. 100 µl des suspensions bactériennes préparées tel que décrit en le test de la tolérance d'acidité ont été inoculé avec 900 µl de bouillon MRS additionné de 0,5 % ou 1 % (p/v) sels biliaires. Les suspensions ont ensuite été incubées pendant 180 min .Après réalisé une série de dilutions décimales allant de ( $10^{-1}$ ... $10^{-5}$ ) dans l'eau physiologique-Cys et ensementer en masse de chaque dilution sur gélose MRS-Cys, puis incubé à 37°C pendant 48h sous conditions d'anaérobiose. Le dénombrement est effectuée après 48h.

### 3.7.3. Tolérance au lysozyme

La résistance au lysozyme des souches sélectionnées a été effectuée selon la méthode décrite par Benkaddour, *et al.*, (2022). 100 µl des suspensions bactériennes préparées tel que mentionné précédemment été inoculé dans 900µL de bouillon MRS contenant 100 mg/L de lysozyme. Elles ont ensuite été incubées pendant 120 minutes, puis effectuée des dilutions décimales allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  dans l'eau physiologique-Cys et ensementer en masse de chaque dilution sur gélose MRS-Cys, après incubation à 37°C en anaérobiose pendant 48 h les cellules viables ont été dénombrées.

## 3.8. Évaluation de la pathogénicité et de la sécurité

### 3.8.1. Activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne de souches sélectionnées contre *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus*( ATCC 9632) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) a été évalué à l'aide d'un test ponctuel sur gélose comme décrit par Stropfová et Lauková., (2014). Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, le test a été réalisé selon les étapes suivantes:

- Des cultures d'une nuit ont été préparées sur bouillon MRS-Cys frais pour les isolats.
- Un surnageant isolé a été préparé par centrifugation de la culture Traiter les bactéries à 14000 g pendant 5 min à et retirer le culot (cellules). Le surnageant acellulaire a été divisé en deux aliquotes, l'une ajustée à pH 6,8 et l'autre non ajusté.
- D'autre part, un inoculum initial d'environ 500 µl de la souche d'agent pathogène a été incorporé tube a essai avec 20 ml du milieu approprié pour les souches cibles (gélose nutritif) et on l'a vidé dans les boites pétriés.

• 50 µl de surnageant acellulaire ont été transférés dans des puits Oxford de surface de gélose.

Les boîtes ont ensuite été incubées à 4 ° C pendant 4h, ensuite celle incubées à 37° C pendant 48h.

### 3.8.2. Test de la gélatinase

L'activité gélatinase phénotypique a été réalisé comme décrit par veljovic *et al.*,(2009). Un échantillon (10ul) de nuit culture (16 h) a été déposée sur une plaque de gélose de gélatinase (pH7), après incubation à 37 C pendant 48 h, le plaques ont été recouvertes d'une solution saturée d'ammonium sulfate .Les producteurs de gélatinasse étaient détecté en formant un halo transparent autour de la souche cultivée.

### 3.8.3. Test de DNase

En détail, l'activité DNase a été déterminée selon la méthode décrite par (Pino, A et al.2020) :5 µL d'une culture liquide ont été déposés sur une boîte petri contenant à gélose DNase. Ensuite à été incubée à 37 °C pendant 48 h. après l'incubation les plaques ont été recouvertes de HCl 5 N pendant 5 minutes.

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

La méthode de chromatographie sur couche mince (CCM) a été explorée afin de déterminer si la voie bifidus, qui est caractéristique forme de l'acide lactique et de l'acide acétique, existe dans bactéries lactiques. L'identification de *Bifidobacterium* au niveau du genre a été réalisé selon les techniques décrites par Lee et al.,(2000).

Les cultures de bouillons de 1 ml ont été centrifugées pendant 5 minutes à 140000 tours, les surnageants obtenus ont ensuite été transférés dans un tube Eppendorf pour effectuer l'identification des souches de *Bifidobacterium*.

Les développements chromatographiques ont été effectués dans une chambre rectangulaire de 10x24x24 cm. Des plaques CCM ont été coupées à 10x20 cm. Cinq souches ont été sélectionnées pour les tests ; 30 µl de chaque échantillon a été taché à 5 mm d'une extrémité avec une série de 10 % (w/v ou v/v) des solutions d'acides organiques standard ; 4 µl de (l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide succinique et l'acide citrique). Un sèche-cheveux manuel a été utilisé pour sécher les taches. La plaque CCM a ensuite été placée au fond de la chambre chromatographique afin d'assurer un apport suffisant de vapeur de solvant (annexe III) et la chambre a été fermée (pendant 20 min à température ambiante).

On a ensuite retiré les plaques CCM et qu'elle sèche à l'air, les plaques séchées ont été arrosées avec la solution d'indicateur (annexe IV), et la couleur a été développée par un bref chauffage 1-3 min dans un four chaud et sec à 165 °C. Ensuite, il a été exposé aux rayons ultraviolets(UV).

### **3.10. Profil de fermentation des sucres**

Une étude du profil fermentaire des sucres des souches isolées sur la galerie API 50 CH (Biomerieux, France).

Galerie API 50 CHL est un système d'une combinaison standardisée de 50 tests biochimiques pour identifier les bactéries lactiques.

La galerie est constituée de 50 micro tubes qui permettent la fermentation des hydrates carbone et dérivés. Le test se déroule selon les étapes suivantes :

#### **3.10.1. Préparation des cultures des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques ont été cultivées pendant une nuit sur gélose MRS-Cys et La pureté de chaque souche a été confirmée. Pour préparer l'inoculum, des colonies ont été récoltées par écouvillonnage et ensemencées sur le milieu CHL 50(annexe V) afin d'obtenir une suspension bactérienne d'une densité de 2 Macfarlane (McF) standard.

#### **3.10.2. Ensemencement, incubation et lecture**

Cinquante microtubes de la galerie API 50 CH ont été ensemencés avec la suspension et recueillir les bactéries de chaque souche à l'aide d'une pipette stérile en évitant la formation de bulles d'air, et ensuite une couche de paraffine stérile a été ajouté. L'incubation a été réalisée pendant 48 heures à 37°C dans des conditions anaérobies. La fermentation fait la différence couleur à l'intérieur d'un microtube due à la formation d'acide dans un environnement anaérobie révélée par l'indicateur de pH pour les milieux sélectionnés. Le premier tube sans principe actif sert de témoin négatif. La lecture a été réalisée après 24h et 48h (Bahri., 2014). La lecture des resultat a été faite à l'aide des bases de données existantes dans [https://www.tgw1916.net/bacteria\\_abis.html](https://www.tgw1916.net/bacteria_abis.html), <https://lab.upbm.org/identifieur/> et les références bibliographiques.

# **Chapitre 4: résultats et discussion**

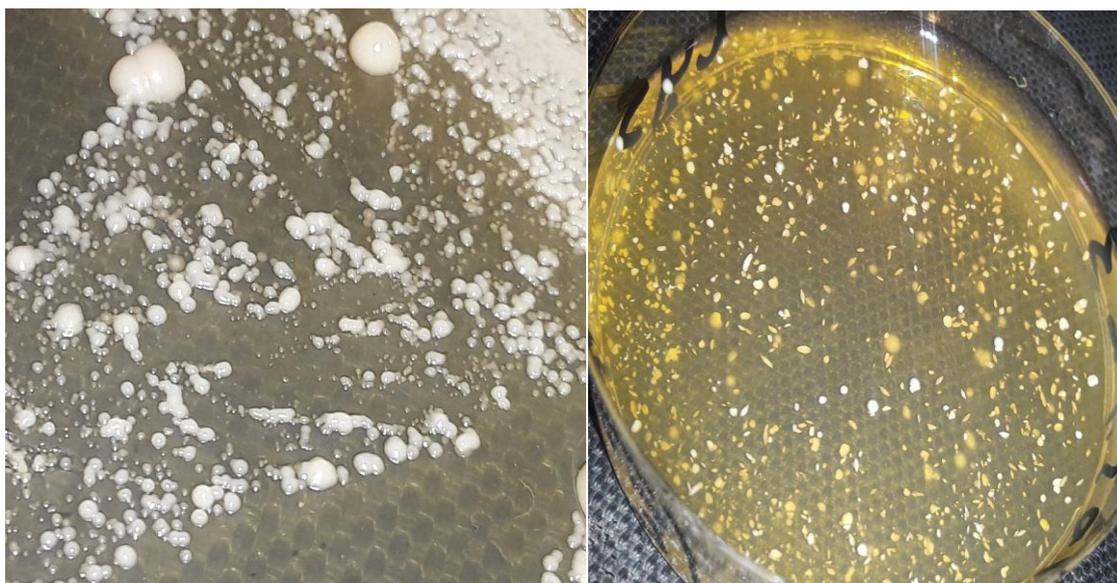
#### 4.1. Isolement et l'identification

Un total de dix-neuf souches ont été isolées et purifiées à partir des selles d'un nourrisson ; du l'intestin de pigeon et du l'intestin des abeilles, sur milieu MRS-Cys. Leur isolement nécessite des conditions assez spécifiques, qui mettent en jeu d'incubation pendant 48 heures à 37°C dans systèmes d'anaérobiose pour minimiser la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui n'est pas éliminé efficacement par ces bactéries car elles ne synthétisent pas la catalase et des milieux de cultures très riches tels que le milieu MRS-Cys modifié selon Beerens (1990).

#### 4.2. Pré-identification des bifidobactéries

##### 4.2.1. Aspect macroscopique

L'observation macroscopique des colonies de bifidobactéries, obtenues sur gélose MRS-Cys Après les séries de purification sur milieu solide et liquide, les isolats sont apparus de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, à pourtour régulier et d'un aspect lisse, luisant et caractérisées par une couleur blanchâtre à crème.



(A)

(B)

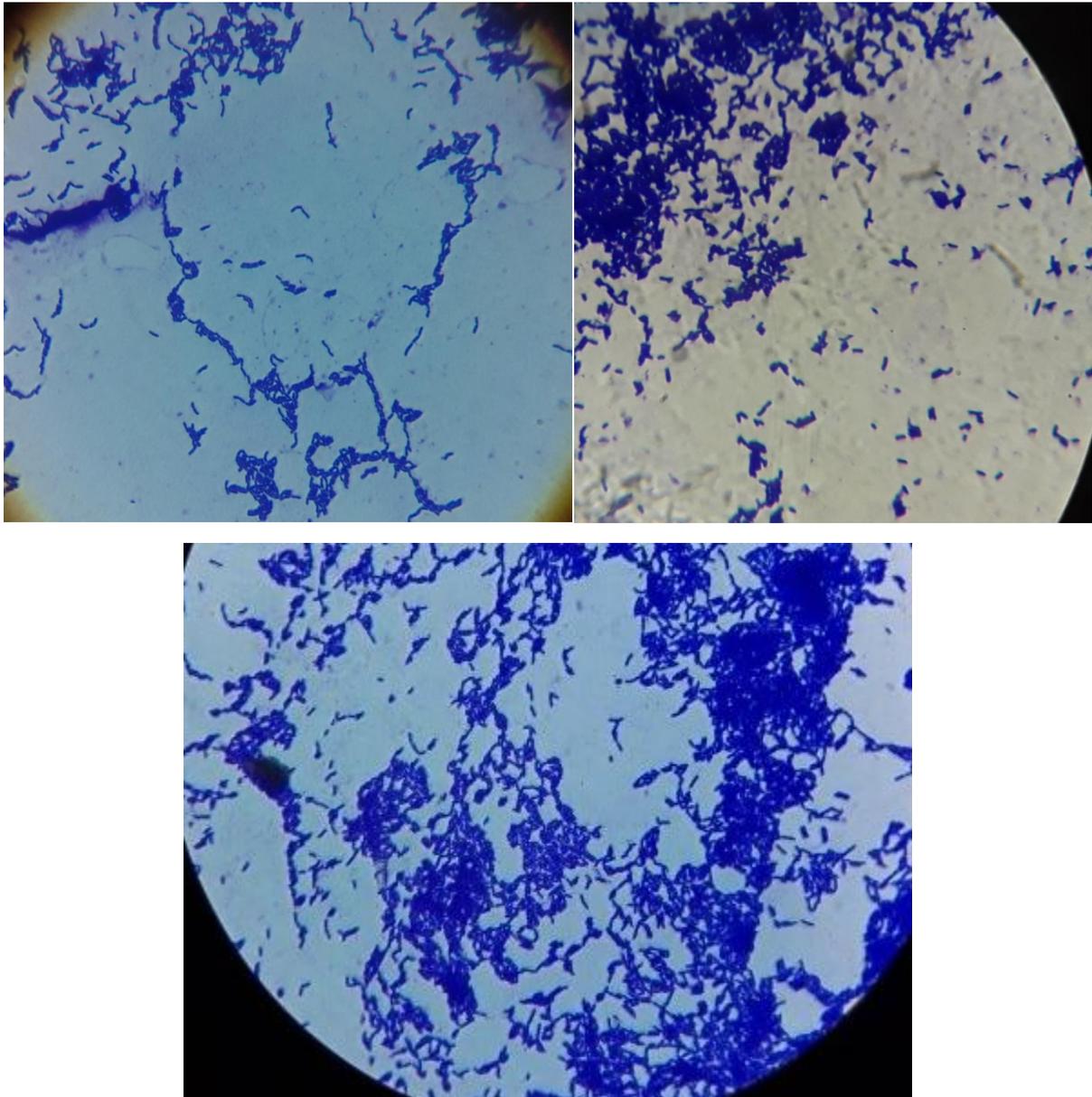
**Figure 5:** Aspect macroscopique des bifidobactéries isolées sur gélose MRS-Cys.

(A) : Aspect macroscopique des bifidobactéries a été ensemencé en profondeur sur boîte de pétri.

(B) : Aspect macroscopique des bifidobactéries après le repiquage.

#### 4.2.2. Aspect microscopique

L'aspect microscopique après une coloration simple au bleu de méthylène et la coloration de Gram réalisé à partir des colonies apparues a montré que ce sont Gram positif, caractérisées par des formes variables : forme bifide (Y, V), court bâtonnets à extrémité arrondis et souvent forme spatulées parfois sous forme de petits bacilles réguliers. Ce polymorphisme cellulaire est typique aux bifidobactéries.



**Figure 6:** Observation microscopique (X100) après coloration au méthylène bleu des différentes formes cellulaires des souches de bifidobactéries isolées.

### 4.3. Identification du genre

#### 4.3.1. Test du NaCl

Absence croissante détectait des cinq souches (Ab1, Ab2, SI1, SI2, Pg1) de bifidobactéries en milieu MRS-Cys à 6,5% de NaCl, qui indique l'absence des entérocoques ou une contamination.



**Figure 7:** résultat du test de NaCl (test négatif).

#### 4.3.2. Test de la catalase

Sur les 19 isolats, 5 souches, seulement, ont été retenues pour la recherche de la catalase, et les tests restants. Elles étaient négatives à la réaction de la catalase. Ce caractères concordent avec les rapporté par Pancrasia *et al.* (2017) ; Mahmoudi *et al.* (2013).



**Figure 8:** Résultat du test de la recherche de catalase pour les souches isolées.

#### 4.3.3. Production de CO<sub>2</sub> à partir du glucose :

Ce test nous a permis de distinguer que les souches homofermentaires des souches Hétérofermentation en bouillon MRS-Cys avec une cloche de Durham.

Les résultats obtenus ont montré une bonne croissance de l'isolat au fond du tube, ils sont considérés car le gaz à l'intérieur de la cloche n'est pas libéré (homofermentaires). Cette propriété se retrouve chez les bifidobactéries.

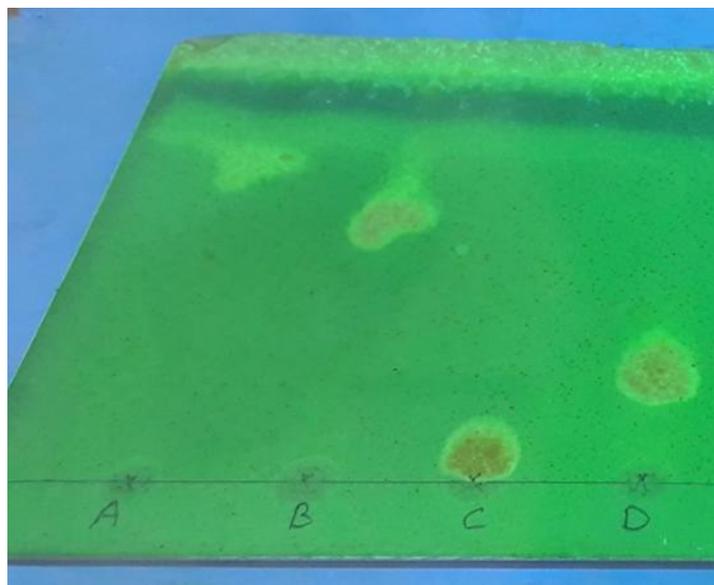


**Figure 9:** Résultat de type fermentaire des isolats.

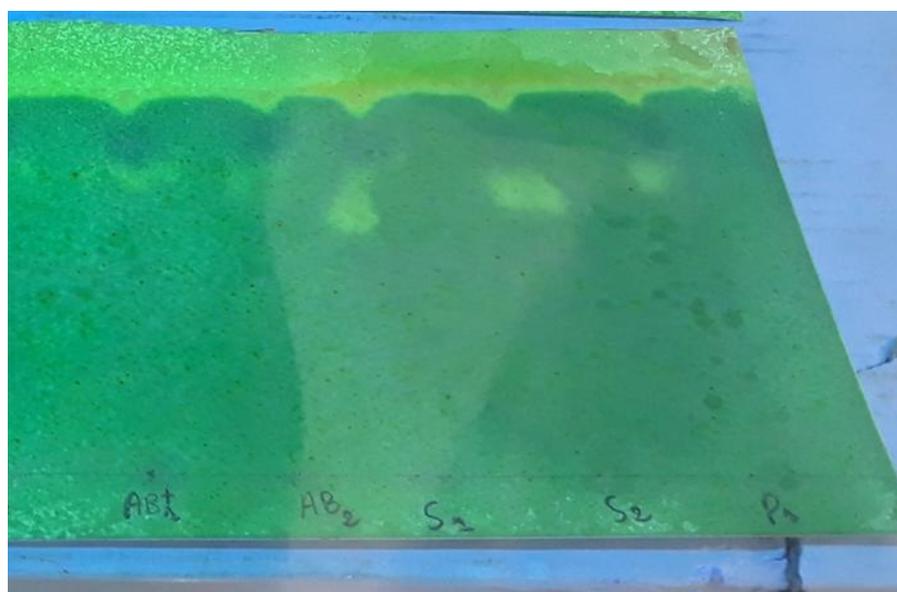
#### 4.3.4. Détermination des acides organiques par CCM

Les bifidobactéries peuvent être facilement distinguées avec dosage CCM, La voie bifidus forme de manière caractéristique de l'acide lactique et de l'acide acétique. Nous remarquons que les deux taches d'acide lactique et d'acide acétique ont été détectées sur toutes

les plaques CCM des cinq bouillons de culture de *bifidobacterium*. Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par Lee *et al.* (2001) qui ont montré que l'acide lactique et les acides acétiques ont été détectés sous la forme de deux chromatogrammes rouges et d'un chromatogramme bleu, respectivement, sur les plaques CCM de tous les bouillons de culture bifidobactéries.



**Figure 10:** Séparation d'acides organiques standards sur la plaque CCM. (A) acide acétique, (B) acide lactique, (C) acide citrique et (D) acide succinique.



**Figure 11:** Analyse CCM des acides organiques dans des bouillons de culture de bifidobactéries respectivement Ab1, Ab2, S11, S12, Pg1.

#### 4.4. Évaluation de la pathogénicité et de la sécurité

##### 4.4.1. L'activité de la gélatinase et de la DNase

Les souches S11, S12, Pg1, Ab1 et Ab2 ont été testées pour leur l'activité de la gélatinase et la DNase .Nous remarquons que tous les isolats se sont révélés négatifs Les résultats sont représentés dans le tableau3. Aucune halo n'a été observée autour des colonies des cinq souches bactérienne cultivées respectivement sur gélose gélatinase et gélose DNase.

**Tableau 3:** Activités de la gélatinase et la DNase des souches de bifidobactéries.

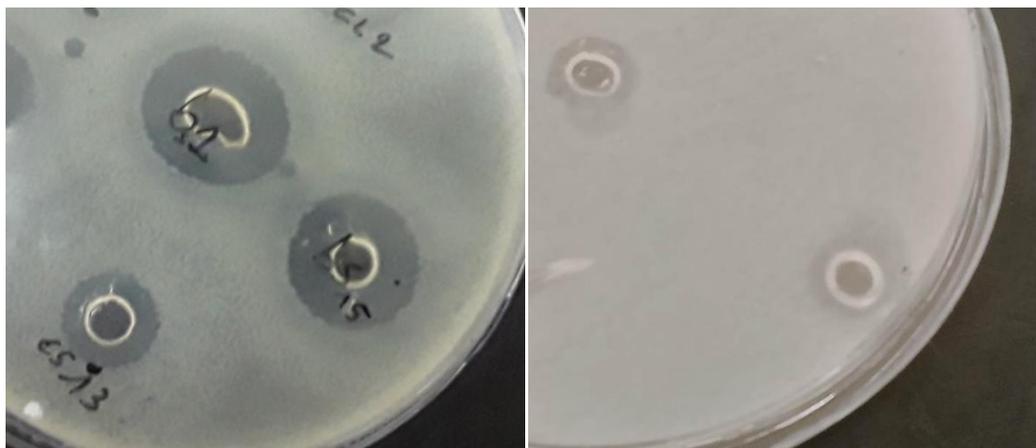
Les souches	activité de la gélatinase	Activité de la DNase
S11	-	-
S12	-	-
Pg1	-	-
Ab1	-	-
Ab2	-	-

Les résultats obtenus sont similaires à ceux précédemment signalés par Pino *et al.* (2022) où, toutes les souches de *Bifidobacterium* testées n'ont pas montré la capacité de produire de la DNase et de la gélatinase.

##### 4.4.2. Activité antibactérienne

Pour déterminer l'activité antagoniste des bifidobactéries, plusieurs méthodes peuvent être utilisées. Dans cette étude, le test des spots sur agar a été employé car il est simple et donne l'effet antibactérien total des souches sans exclure l'influence d'un facteur.

L'activité antibactérienne des souches pures contre trois souches pathogènes a été évaluée afin de mettre en évidence un éventuel pouvoir antagonistique.



**Figure 12:** Résultat de l'activité antibactérienne des souches isolées contre trois espèces pathogènes.

Les résultats de l'activité antibactérienne vis-à-vis les agents pathogènes indicateurs sont indiqués dans le tableau 4.

**Tableau 4:** Activité antibactérienne des souches pures sur les germes indicatrices (mm)

Diamètres de zones d'inhibition	pH=07			pH non ajustée		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ab1	00	00	17	00	01	00
Ab2	00	00	00	00	12	00
S11	00	00	00	00	14	00
S12	00	00	09	08	13	00
Pg1	00	00	11	00	11	00

D'après ces résultats, la souche S12 présente une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée, sur les bactéries pathogènes avec des diamètres des zones d'inhibition de 8 à 13mm, par rapport à les autres souches. Elles ont présenté des spectres d'activité actifs sur la plus par des souches indicatrices testées, avec des zones d'inhibition de 6mm et plus, traduisant un bon ou fort potentiel antagoniste.

Cependant, aucune inhibition n'a été observée où les surnageant ont subi une neutralisation du pH contre *E. coli* et *S. aureus* et contre *P.aeruginosa* et *E. coli* (pH n'est pas modifié) sauf chez la souche S12 avec un diamètre de zone d'inhibition de 08 mm. Respectivement. La propriété inhibitrice observée des isolats pourrait être attribuée en raison de la production de composés antimicrobiens. par contre les résultats selon (Pancrasia, *et al*

.,2017). La formation d'une zone claire indique la capacité du métabolite de *Bifidobacterium* avec *E. coli* à l'inhiber.

Iqra *et al.* (2020) ont rapporté une bonne activité inhibitrice des bifidobactéries contre les bactéries pathogènes (*E. coli* et *Staphylococcus aureus*).

Toutes Selon les résultats de Sirichokchatchawan *et al.*(2018).

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

L'effet antibactérien de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* sur les germes pathogènes a été associé à plusieurs métabolites. Ces métabolites comprennent des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, de l'éthanol, du diacétyle, de l'acétaldéhyde, de l'acétoïne, des aldéhydes, des bactériocines ou des composés de type bactériocine et d'autres composés (Benkaddour *et al.*,2022).

#### **4.5. Etude du potentiel probiotique :**

##### **4.5.1. Tolérance à l'acidité**

Les déformations satisfont à l'une des principales conditions définies par "Probiotique" signifie qu'il doit être actif pendant le transit dans le tractus gastro-intestinal, avant les probiotiques doivent pouvoir adhérer et coloniser l'intestin survivre au passage dans l'estomac. Pour déterminer la viabilité de ce Souches S11, S12, Ab1, Ab2, Pg1, les effets de l'exposition aux milieux acides sur ces bactéries ont été examinés. Ces derniers ont été exposés à pH acide (2.5 et 3.5) et 3 heures, puis évaluer la proportion de cellules viables.

**Tableau 5:** Les résultats obtenus pour les isolats concernant la tolérance aux conditions acide de l'estomac.

L'espèce	Nombre de cellules viables au temps 3h			
	pH=2.5		pH=3.5	
	3h	Taux de survie (%)	3h	Taux de survie (%)
S11	6.26±0.01	72%	6.79±0.06	84%
S12	4.34±0.05	66%	6.47±0.06	92%
Ab1	3.30±0	56%	6.32±0.02	66%
Ab2	4.35±0.08	66%	5.34±0.04	78%
Pg1	4.19±0.11	63%	4.93±0.03	68%

Il apparaît que la résistance des souches étudiées à l'acidité varie d'une souche à l'autre, Pour pH 2 nous enregistrons l'apparition de quelques colonies parmi les cinq souches étudiées (S11, S12, Ab1 Ab2, Pg1) après 3h. Les résultats obtenus sont discordent contrairement par rapport résultats trouvés par Djellid (2015) .

Des souches naturelles de bifidobactéries ont montré une résistance significative aux médicaments dans des conditions acides, ils ont pu maintenir un taux de survie de près de 67% la valeur du pH est de 2.

Lors de l'exposition à pH 3, on a remarqué que la souche S12 a résisté bien par rapport aux autres souches S11, Ab1, Ab2, Pg1 .Cependant, on a enregistré une résistance moindre des autres souches (Ab1 et Pg1).

Les résultats obtenus montrent une diminution du nombre de cellules viables comparez toutes les souches exposées aux le pH acides 2.5 au pH 3.5.

Tandis qu'à pH 3.5 le taux de viabilité de les souches S12, S11 et Ab2 est élevé par rapport au taux de viabilité chez les souches Ab1 et Pg1 .Ces résultats concordent avec d'autres travaux réalisés par Djellid (2015).

#### 4.5.2. Résistance aux sels biliaries

Les résultats obtenus montre que les pourcentages de survie après exposition pendant 3h au jus biliaire étaient plus à 1 % se mettre ente 65% à 88 % pour toutes les souches testées.

Pg1 a montré le taux de survie le plus élevé avec 88% alors que la souche a le taux de survie le plus bas Ab2 65 %, .Les résultats obtenus sont discordent contrairement par rapport

résultats trouvés par Arboleya et al. (2011) montre que les pourcentages de survie après exposition pendant 180 min au jus biliaire étaient inférieurs à 1 % pour les souches testées.

**Tableau 6:** Résultats de la tolérance aux sels biliaire des souches identifiées.

L'espèce	Bile 1%		Bile 0.5%	
	SI1	5.34±0.03	66%	3.79±0.01
SI2	4.56±0.04	68%	4.67±0.14	69%
Ab1	5.06±0.19	73%	4.67±0.14	69%
Ab2	5.32±0.12	77%	4.27±0.03	65%
Pg1	5.57±0.01	88%	5.54±0.01	81%

#### 4.5.3. Résistance au lysozyme

La résistance au lysozyme est une autre caractéristique importante recommandée pour un probiotique potentiel.

Les isolats testés ont montré une résistance au lysozyme (100 mg/L) après traitement pendant 120 min.

La résistance globale des isolats au lysozyme était exprimée en pourcentage du taux de survie allant du minimum 79 % au maximum 88%. Ce résultat est étroitement lié à ceux rapportés par ( Benkaddour *et al.*,2022).

Une autre étude réalisée par Pancrasia *et al.* ,(2017) ont montré que la *Bifidobacterium* est plus résistante au lysozyme du tube digestif que les autres bactéries, même à la concentration de 300µg/ ml qui est plus élevée que celle du lysozyme intestinal.

Le tableau 7 mentionne le taux de survie des bactéries après traitement au lysozyme après 120 minutes d'exposition.

**Tableau 7:** Les résultats obtenus pour les isolats concernant la résistance aux lysozymes.

L'espèce	lysozyme	
SI1	7.01±0.03	87%
SI2	6.19±0.18	87%
Ab1	5.38±0.05	79%
Ab2	5.68±0.05	83%
Pg1	7.01±0.01	88%

#### **4.6. Profil fermentaire des sucres**

Les résultats de l'étude fermentaire des sucres par système API sont mentionnés dans le tableau indiqué dans l'annexe VI. La fermentation des hydrates de carbone et dérivés dans la galerie, il est désormais possible d'identifier les types de *bifidobacteruim* dans leur aire de répartition et sont : *B.bifidum* (Pg1) et *B.bréve* (S12).

# **Conclusion**

## Conclusion

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

L'objectif de cette étude était d'évaluer les principales aptitudes probiotiques de quelques souches indigènes de bifidobactéries isolées des selles de nourrisson; de l'intestin d'un pigeon et de l'intestin des abeilles. L'utilisation des milieu MRS-Cys très riche et des conditions de cultures (anaérobiose) qui répond aux exigences de ces bactéries (spécifiquement les bifidobactéries), nous ont permis de les bien isolés et purifiés.

L'identification des souches a été réalisée par la détermination des caractéristiques morphologiques par l'étude macroscopique et microscopique, et identification physiologiques et biochimiques, par les tests suivant: test catalase, test production de gaz et aussi test de stress salin (NaCl 6,5%), utilisation de la galerie Api 50CH pour l'identification des espèces.

Les souches ont été mises à une évaluation de leurs propriétés probiotiques dont nous citons: la résistance aux conditions gastro-intestinales simulées (pH acide et sels biliaries), résistance aux lysozyme, critères de sécurité et l'activité antimicrobienne.

Le profil fermentaire nous a permis de confirmer que les souches probiotiques isolées sont *B.bifidum* (Pg1) et *B.bréve* (S12).

Toutes les souches ont présentées qu'elles possèdent des caractères probiotique et fonctionnel et un aspect sécuritaire, cependant la souche S11 a montré une meilleur tolérance aux pH bas. Plusieurs études montrent l'activité anti-microbienne de différentes souches probiotique contre plusieurs pathogènes. Cependant il est impossible d'extrapoler des résultats obtenus chez une souche à une autre.

L'ensemble des résultats de cette étude permet de conclure que les espèces *B.bifidum* (Pg1) et *B. breve* (S12) isolées à partir de matière fécale de nourrisson et l'intestin d'un pigeon sont dotées de propriétés probiotiques souhaitables en termes de résistance à l'acidité et la présence d'activité antimicrobienne.

# **Bibliographie**

1. Amund, O. D. 2016. Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(9) : 715-725.
2. Arboleya S., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Solís G., Salminen S., Clara G., Gueimonde M. 2011. Caractérisation et propriétés in vitro de souches de *Bifidobacterium* potentiellement probiotiques isolées du lait maternel. *Journal international de microbiologie alimentaire*, 149 (1) :28-36
3. Axelsson L., 2004. Classification and physiology. *In* : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. 3e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 1-66.
4. Bahri F.2014. Isolement et caractérisation des souches de lactobacilles à caractères probiotiques à partir de selles. Thèse de doctorat en, Université Constantine I, 124 pages.
5. Beerens H., Gavini F., Neut C. 2000. Effect of exposure to air on 84 strains of *Bifidobacteria*. *Anaerobe*, , 6, 65- 67.
6. Benkaddour B. 2013. Caractérisation des bifidobactéries isolées des selles des nourrissons et leur viabilité dans le lait de chèvre stérile :microbiologie fondamentale et appliquée. Mémoire de magister, université d'Oran Es Senia. P.33.
7. Benkaddour.B., Heddadji.M et Kihal.M. 2022. Characterization, probiotic assessment and viability of *Bifidobacterium asteroides* Bif21 and *Lactobacillus paracasei*. subsp. *paracasei* Lb49 strains, isolated from Algerian honeybee's gut and infant faeces, in fermented camel milk. *South Asian J Exp Biol*; 12 (6): 950-961.
8. Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160-174.
9. Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. 2000. *Bifidobacteria*: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol*, 50:117-131.
10. Biavati, B. & Mattarelli, P. (2001) in *The Prokaryotes*, eds. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. & Stackebrandt, E. (Springer, New York), pp. 1–70.
11. Brown, C. J., Mtui, D., Oswald, B. P., Van Leuven, J. T., Vallender, E. J., Schultz-Darken, N., ... & Forney, L. J. 2019. Comparative genomics of *Bifidobacterium* species isolated from marmosets and humans. *American Journal of Primatology*, 81(10-11), e983.
12. Boulahrouf, A., & Bahri, F. (2017). Isolement et caractérisation des souches de lactobacilles à caractères probiotiques à partir de selles d'enfants.
13. Carmona, B. (2016). Les probiotiques (bactéries et levures): où en est-on aujourd'hui? (Doctoral dissertation, université de Montpellier) ,116p.
14. Chen, J., Chen, X., & Ho, C. L. 2021. Recent development of probiotic *Bifidobacteria* for treating human diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 1371.
15. Dash, T. R., Verma, T., Suvarna, M., Singh, N., & Pradhan, A. (2015). Probiotics and Oral Health. *Int J Oral Health Med Res*, 2(2) : 123-25.
16. Delcenserie V., China B., Gavini F., Beerens H., Daube G. 2002. Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments: le genre *Bifidobacterium*. *Ann Méd Vét*, 146 :279-293.

17. Djellid Y. 2015. Etude comparative des propriétés technologiques et probiotiques des souches de bifidobactéries indigènes et celles utilisées en industries laitière. Thèse de magistère , Université d'Oran, 117 p.
18. Eshaghi M., Bibalan M.H., Rohani M., Esghaei M., Douraghi M., Talebi, M. et Pourshafie M.R. 2017. *Bifidobacterium* obtained from mother's milk and their infant stool; a comparative genotyping and antibacterial analysis. *Microbial pathogenesis*, 111, pp.94-98
19. FAO–WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group, London, Ontario.
20. Folie, B. D., Haber, J. B., Refaely-Abramson, S., Neaton, J. B., & Ginsberg, N. S. 2018. Long-lived correlated triplet pairs in a  $\pi$ -stacked crystalline pentacene derivative. *Journal of the American Chemical Society*, 140(6), 2326-2335.
21. Hadadji M. 2007. Caractérisation technologique des bifidobactéries à thérapeutiques. Thèse de doctorat d'état. Université d'Oran. Algérie. 173p.
22. Hamilton-Miller, J. M. T., Gibson, G. R., & Bruck, W. (2003). Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic'. *British Journal of Nutrition*, 90(4), 845-845.
23. Hassinen, J. B., Durbin, G. T., Tomarelli, R. M., & Bernhart, F. W. 1951. The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. *Journal of bacteriology*, 62(6), 771-777.
24. Ho T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. et Caubet R., 2007. Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*. 134-142.
25. Hossain, N. et al., 2018. Probiotic properties of *Bifidobacterium* species isolated from mother's milk and infant feces. *Asian Australas. J. Biosci. Biotechnol.*, 3(2), pp. 122-135.
26. Iqra, Y. et al., 2020. In vitro probiotic potential and safety evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of *Bifidobacterium* strains isolated from aaw camel milk. *Microorganisms.*, 8(3), p.354.
27. Jradi-Hocine, S. (2018). Probiotiques en 2017: indications thérapeutiques et preuves scientifiques. *Médecine*, 14(1) :7-10.
28. Kujawska, M., Rauilo, A., Millar, M., Warren, F., Baltrūnaitė, L., Knowles, S. C., & Hall, L. J. 2022. *Bifidobacterium castoris* strains isolated from wild mice show evidence of frequent host switching and diverse carbohydrate metabolism potential. *ISME Communications*, 2(1), 20.
29. LeBlanc, J. G., Milani, C., De Giori, G. S., Sesma, F., Van Sinderen, D., & Ventura, M. 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current opinion in biotechnology*, 24(2), 160-168.
30. 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.
31. Lugli, G. A., Milani, C., Turrone, F., Duranti, S., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Ventura, M. 2017. Comparative genomic and phylogenomic analyses of the *Bifidobacteriaceae* family. *BMC genomics*, 18(1), 1-15.

32. Mahmoudi F .2014. Les substances antimicrobiennes produites par les Bifidobactérium et leurs effets sur les bactéries entéropathogènes.Thèse de doctorat d'état. Université d'Oran, 135p.
33. Mahmoudi F., Hadadji M., Guessas B. et Kihal M., 2013. Evaluation of in vitro antagonism and protection against enteropathogenic experimental challenge of different strains of Bifidobacterium. *African Journal of Microbiology Research*. 7 (29) pp. 3816-3823.
34. Matejčeková, Z., Vlková, E., Liptáková, D., & Valík, L. 2019. Preliminary screening of growth and viability of 10 strains of Bifidobacterium spp.: effect of media composition. *Fermentation*, 5(2), 38.
35. Nambundunga, A. M. (2020). *Isolation and characterisation of bifidobacteria populations in infants in the Khomas region, Namibia* (Doctoral dissertation, University of Namibia).
36. pancrasia .m, kusharyati.d, ryandini.d, oedjijono.2017. Characterization of Bifidobacteria from infant feces with different mode of birthat Purwokerto, Indonesia.BIODIVERSITAS 18 : 1265-1269
37. Pilet M.F., Magras C., Federighi M., 2005. Bactéries lactiques. *In : bactériologie alimentaire* (Federighi M.). 2e Ed., *Economica*. Paris. 219-240.
38. Pino, A.; Benkaddour, B.; Inturri, R.; Amico, P.; Vaccaro, S.C.; Russo, N.; Vaccalluzzo, A.; Agolino, G.; Caggia, C.; Miloud, H.; et al. Characterization of Bifidobacterium asteroides Isolates. *Microorganisms* 2022, 10, 655.
39. Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & nutrition*, 6, 285-306.
40. Sadeghpour Heravi, F., & Hu, H. (2023). Bifidobacterium: host–microbiome interaction and mechanism of action in preventing common gut-microbiota associated complications in preterm infants: a narrative review. *Nutrients*, 15(3), 709.
41. Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., ... & Arigoni, F. 2002. The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14422-14427.
42. Sgorbati B., Biavati B et Palenzona D. 2003.The genus *Bifidobacterium* pp 279–306.
43. Shehata, M., El Sohaimy, S., El-Sahn, M. & Youssef, M., 2016. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), p. 65–75
44. 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.
45. Turroni F., Sinderen D V., Ventura M. 2010. Genomics and ecological overview of the genus Bifidobacterium. *International Journal of Food Microbiology* 149 37–44.
46. Veljovic, K., Fira, D., Terzic-Vidojevic, A., Abriouel, H., Galvez, A., & Topisirovic, L. (2009). Evaluation of antimicrobial and proteolytic activity of enterococci isolated from fermented products. *European Food Research and Technology*, 230, 63-

# **Annexes**

**Annexe I : Milieu MRS-Cystéine (De Man Rogosa et Sharpe) (Bouillon et gélose)**

Extrait de levure.....	5g	
Extrait de viande.....		10g
Peptone.....	10g	
Acétate de sodium.....	5g	
Citrate d'ammonium .....		2g
Glucose.....	20g	
Phosphate disodique .....		2g
Polysorbate 80.....	1g	
Sulfate de magnésium .....	0,10g	
Sulfate de manganèse .....		0,05g
Agar-agar (dans le cas de la gélose) .....	15g	
Cystéine-HCL .....	0,5g	
Eau distillée.....	1000ml	

pH=6,8 Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

**Eau physiologique-Cystéinée**

Chlorure de sodium.....		8,5g
Peptone.....	0,5g	
Cystéine-HCL.....	0,5g	
Eau distillée .....	1000ml	

pH=7 Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes.

**Annexe II : Coloration de Gram**

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;

Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ; β Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;

Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;

Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;

Laver à l'eau ;

Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

**Annexe III : Le système de solvants de CCM :**

Acétone.....	60ml
Eau.....	2ml
Chloroforme.....	6g
Ethanol.....	10ml
Hydroxyde d'ammonium.....	22g

**Annexe IV : solution indicatrice de la plaque CCM :**

Rouge de méthyle.....	0.25g
Bleu de bromophénol .....	0.25g
Méthanol 70% .....	100ml

**Standards McFarland 2 :**

BaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O (1.175%) .....	2ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1%).....	98ml

**Standards McFarland 4 :**

BaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O (1.175%) .....	4ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1%).....	96ml

**Annexe V : Milieu API® 50 CHL :**

Polypeptone (origine bovine/porcine) .....	10 g
Extrait de levure.....	5 g
Tween 80 .....	1 ml
Phosphate dipotassique .....	2 g
Acétate de sodium .....	5 g
Citrate diammonique .....	2 g
Sulfate de magnésium.....	0,20 g
Sulfate de manganèse .....	0,05 g
Pourpre de bromocrésol .....	0,17 g
Eau déminéralisée.....	1000 ml

pH : 6,7-7,2.

**Annexe VI:** Profil biochimique présenté par les souches Pg1 et S12.

Fermentation des sucres :	Souches	
	S12	Pg1
Arabinose	-	-
Lactose	+	+
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Sorbitol	+	+
Galactose	+	+
Glucose	+	+
Xylose	-	+
Amidon	-	+
Tréhalose	-	+
Fructose	+	+
Mannose	+	+
Ribose	+	+
Mannitol	+	+
Gluconate	-	-
Mannitol	+	+

**Annexe VII :** Les caractéristiques fermentatives distinguant les espèces du genre *Bifidobacterium* (Mattarelli & Biavati, 2018).

Substrates	1. <i>B. actinocolo- niforme</i>	2. <i>B. aquiferfiri</i>	3. <i>B. adollescentis</i>	4. <i>B. aerophilum</i>	5. <i>B. aesculapii</i>	6. <i>B. angulatum</i>	7. <i>B. animalis</i>	subsp. <i>animalis</i>	subsp. <i>lactis</i>	8. <i>B. asteroides</i>	9. <i>B. avesanti</i>	10. <i>B. biavatii</i>	11. <i>B. bohemianum</i>
$\alpha$ -L-Fucose	nd	nd	L <sup>d</sup>	nd	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	
Amylopectin	nd	nd	+ <sup>b</sup>	nd	nd	+ <sup>b</sup>	v	v	- <sup>d</sup>	nd	nd	nd	
Amylose	nd	nd	v	nd	nd	-	-	-	- <sup>d</sup>	nd	nd	nd	
Arabic gum	nd	nd	v	nd	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	
Arabinogalactan	nd	nd	-	nd	nd	-	-	-	- <sup>d</sup>	nd	nd	nd	
L-Arabinose	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
D-Cellobiose	+ <sup>s</sup>	-	+	v	+	-	v	-	+	-	+ <sup>s</sup>	-	
D-Fructose	-	+	+	+ <sup>s</sup>	-	+	+	-	+	+	nd	+ <sup>s</sup>	
D-Galactosamine	nd	nd	-	nd	nd	v	+ <sup>b</sup>	+ <sup>b</sup>	d	nd	nd	nd	
D-galactose	+	+	+	-	-	+	+	-	v	+ <sup>s</sup>	-	+	
Ghatti gum	nd	nd	-	nd	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	
Glucanate	nd	nd	+	nd	nd	v	-	-	+	nd	nd	nd	
D-Glucosamine	nd	nd	-	nd	nd	v	v	v	- <sup>d</sup>	nd	nd	nd	
D-Glucuronate	nd	nd	-	nd	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	
Guar gum	nd	nd	-	nd	nd	-	- <sup>d</sup>	-	-	nd	nd	nd	
Inulin	nd	nd	v	-	+	+	-	-	-	-	-	nd	
D-Lactose	nd	-	+	+ <sup>s</sup>	nd	+	+	+	-	-	nd	nd	
Locust bean gum	nd	nd	-	nd	nd	-	v	v	-	nd	nd	nd	
D-Maltose	-	+	+	+	+	+	+	+	v	-	-	-	
D-Mannitol	nd	+ <sup>s</sup>	v	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
D-Mannose	-	+	v	+	+	-	v	-	- <sup>d</sup>	+	+ <sup>s</sup>	+	
D-Melezitose	-	-	+	-	+	-	v	-	-	-	-	-	
Melibiose	+ <sup>s</sup>	+	+	v	+ <sup>s</sup>	+	+	+	+		+	+	
Pectin	nd	nd	-	nd	nd	-	v	v	- <sup>d</sup>	nd	nd	nd	
Porcine gastric mucin	nd	nd	-	nd	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	
D-Raffinose	-	+	+	+ <sup>s</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-Ribose	nd	+	+	v	+	+	+	+	+	-	-	-	
Salicin	nd	-	+	v	+	+	+	-	+	-	-	-	
D-Sorbitol	nd	nd	v	-	-	v	-	-	-	-	+	-	
Starch	nd	nd	+	nd	nd	+	+	-	-	nd	nd	nd	
D-Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Tragacanth gum	nd	nd	-	nd	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	
D-Trehalose	+	nd	v	-	+	-	v	-	-	-	-	-	
Xylan	nd	nd	-	nd	nd	-	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	nd	nd	nd	
D-Xylose	+	-	+	-	+	+	+	+	+ <sup>1</sup>	+	-	+	

12. <i>B. bifidum</i>	13. <i>B. bombi</i>	14. <i>B. boum</i>	15. <i>B. breve</i>	16. <i>B. callitrichos</i>	17. <i>B. catenulatum</i>	18. <i>B. choerinum</i>	19. <i>B. commune</i>	20. <i>B. corymbiforme</i>	21. <i>B. cradilactis</i>	22. <i>B. cuniculi</i>	23. <i>B. dentium</i>	24. <i>B. eulemuris</i>	25. <i>B. faecale</i>	26. <i>B. gallicum</i>	27. <i>B. gallinarum</i>	28. <i>B. hapati</i>	29. <i>B. indicum</i> <sup>k</sup>
-	nd	-	+	nd	-	-	nd	-	nd	-	-	nd	nd	-	-	nd	-
v	nd	+	v	nd	- <sup>d</sup>	+	nd	- <sup>d</sup>	nd	+	+	nd	nd	+	-	nd	-
v	nd	+ <sup>b</sup>	v	nd	v	+	nd	- <sup>d</sup>	nd	+ <sup>b</sup>	+	nd	nd	+	-	nd	- <sup>d</sup>
-	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	-	nd	nd	-	-	nd	-
-	nd	-	-	nd	-	-	nd	- <sup>d</sup>	nd	-	-	nd	nd	-	-	nd	v
-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+ <sup>s</sup>	+	+	+	+	-
-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	v	+ <sup>s</sup>	+
+ <sup>b</sup>	+	+	+	nd	+	-	+	+	+	-	+	+ <sup>s</sup>		+	+	+	+
-	nd	+	v	nd	v	+ <sup>b</sup>	nd	+		v	- <sup>d</sup>			-	-		+
+	-	+ <sup>i</sup>	+		+	+		nd		+	+	-		+	+	-	v
-		-	-		-	-		-		-	- <sup>d</sup>			-	-		-
-		-	-		v	-		+		-	+		+ <sup>s</sup>	-	nd	-	+
v		+	v		v	- <sup>d</sup>		+		+ <sup>b</sup>	v			+	-		+
-		-	-		-	-		-		-	-			-	-		-
-		- <sup>d</sup>	-		-	v		-		-	+			-	-		-
-		+	v	-	v	-		nd		-	-		+ <sup>s</sup>	-	+		-
+		v	+		+	+		-	+	-	+	+ <sup>s</sup>		-	+	+ <sup>s</sup>	-
-		-	-		-	v		-		-	+			-	-		-
- <sup>d</sup>	-	+	+	+	+	+		+		+	+			+	+		v
-		-	v	+	v	-		-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+			-	v	v	v
-	-	-	-	+	-	-		-	-	-	+	-	-	-	v	v	-
v	+	+	+		+	+		+	+	+	+			-	+	-	+
- <sup>d</sup>		-	v		v	-		- <sup>d</sup>		-	v			-	-		v
+	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	-	nd	nd	-	-	nd	-
-	+	+	+	+	+	+		+		-	+			-	+	+	+
-		-	+	-	+	-		+		-	+			+	+	-	+
-		-	+	+	+	-		+	-	-	+		+ <sup>s</sup>	+	+ <sup>s</sup>	+	+
-		-	v	+	+	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
-		+	-	-	-	+	-	-		+	+			+	-	-	-
v <sup>c</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+		+	+	nd	+	+	+	+ <sup>s</sup>	+
-	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	-	nd	nd	-	-	nd	v
-	-	-	v	+	v	-	nd	-	nd	-	+	+	+	-	+	-	-
- <sup>d</sup>	nd	-	-	nd	v	-	nd	-	nd	-	v	nd	nd	-	-		-
-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+ <sup>s</sup>	-

Substrates	30. <i>B. kashivavohense</i>	31. <i>B. lenurum</i>	32. <i>B. longum</i>	subsp. <i>longum</i>	subsp. <i>infantis</i>	subsp. <i>suis</i>	subsp. <i>suillum</i>	33. <i>B. magnum</i>	34. <i>B. merycicum</i>	35. <i>B. minimum</i>	36. <i>B. myosotis</i>	37. <i>B. mongoliense</i>	38. <i>B. moukalabense</i>	39. <i>B. pseudocatenu- latum</i>	40. <i>B. pseudolongum</i>
$\alpha$ -L-Fucose	nd	nd		-	+ <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	v	
Amylopectin	nd	nd		-	-	d	d	- <sup>d</sup>	v	+	nd	-	nd	+ <sup>b</sup>	
Amylose	nd	nd		-	-	d	d	- <sup>d</sup>	v	+	nd	nd	nd	+ <sup>b</sup>	
Arabic gum	nd	nd		v	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	
Arabinogalactan	nd	nd		+ <sup>b</sup>	-	d	d	-	-	-	nd	nd	nd	-	
L-Arabinose		-		+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	
D-Cellobiose	+	+		-	v	-	-	-	v	-	v	+	-	v	
D-Fructose	+	+ <sup>8</sup>		+	+	v <sup>j</sup>		+	+ <sup>i</sup>	+	v	+ <sup>b</sup>		+	
D-Galactosamine				v	-	- <sup>d</sup>		v	+ <sup>b</sup>	-		-		-	
D-galactose				+	+	+		+	+	-	v	nd		+	
Ghatti gum				v	-	-		-	-	-		+		v	
Gluconate				-	-	-		-	-	-	-	nd		v	
D-Glucosamine				v	v	- <sup>d</sup>		+	-	-		+ <sup>b</sup>		- <sup>d</sup>	
D-Glucuronate				-	+	-		-	-	-		-		-	
Guar gum				-	-	-		-	-	-		nd		-	
Inulin	-			-	v	-	-	-	-	-		nd		-	
D-Lactose				+	+	+		+	+	-	+	-		+	
Locust bean gum				- <sup>d</sup>	-	-		-	-	-		+		-	
D-Maltose				+	+	+		+	+	+		nd		+	
D-Mannitol	-	+ <sup>8</sup>		-	-	-		-	-	-	v	+	-	-	
D-Mannose	+	+		v	v	v <sup>j</sup>	+	-	-	-	+ <sup>8</sup>	-		+	
D-Melezitose	-	+		+	v	-	-	-	-	-	v	-	+	-	
Melibiose				+	+	+		+	+	-	v	-		+	
Pectin				- <sup>d</sup>	-	-		-	-	-		+		-	
Porcine gastric mucin	nd	nd		-	-	-	nd	-	-	-	nd	nd	nd	-	
D-Raffinose				+	+	+		+	+	-	v	nd		+	
D-Ribose		+		+	+	-		+	+	-	-	+		+	
Salicin				-	-	-	-	-	+ <sup>i</sup>	-	+	+ <sup>b</sup>		+	
D-Sorbitol	+			-	-	-	+	-	-	-	-	+ <sup>b</sup>	-	v	
Starch	-			-	-	-		-	+	+	-	-		+	
D-Sucrose				+	+	+		+	+	+	+	+		+	
Tragacanth gum	nd	nd		v	-	-	nd	-	-	-	nd	+	nd	-	
D-Trehalose	-	+ <sup>8</sup>		-	-	-	-	-	-	-	v	nd	nd	v	
Xylan	nd	nd		-	-	-	nd	-	-	-	nd	-	nd	v	
D-Xylose		+		v	v	+	+	+	+	-	+	nd	nd	+	

subsp. <i>pseudolongum</i>	subsp. <i>globosum</i>	41. <i>B. psychraerophilum</i>	42. <i>B. pullorum</i>	43. <i>B. ramosum</i>	44. <i>B. reuteri</i>	45. <i>B. ruminantium</i>	46. <i>B. saguini</i>	47. <i>B. saeculare</i>	48. <i>B. scardovii</i>	49. <i>B. stellenboschense</i>	50. <i>B. subtile</i>	51. <i>B. thermacidophilum</i>	subsp. <i>porcinum</i>	subsp. <i>thermacidophilum</i> <sup>d</sup>	52. <i>B. thermophilum</i>	53. <i>B. tissieri</i>	54. <i>B. tsurumiense</i>
-	-	nd	-	nd	nd	-	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	nd
+	+	nd	-	nd	nd	- <sup>d</sup>	nd	-	nd	nd	+ <sup>b</sup>	nd	nd	nd	+ <sup>b</sup>	nd	nd
+	v	nd	-	nd	nd	- <sup>d</sup>	nd	-	nd	nd	+ <sup>b</sup>	nd	nd	nd	+ <sup>b</sup>	nd	nd
-	-	nd	-	nd	nd	-	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	nd
-	- <sup>d</sup>	nd	-	nd	nd	-	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	- <sup>d</sup>	nd	nd	nd
+	v	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
v	-	+	-	-	+ <sup>g</sup>	-	+	-	-	-	-	-	+	nd	v	+	+
+	+ <sup>e</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+ <sup>b</sup>	+	+
+	+	+ <sup>g</sup>	-	-	-	+	+	+ <sup>g</sup>	+	+	+	+	+	+	+ <sup>g</sup>	+	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	+	-	-	-	nd	-	-	nd
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
v	v	+	+	+	+	+ <sup>b</sup>	+	+	nd	+	+	+	+	nd	v	+	nd
-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	-	-	nd
-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	- <sup>d</sup>	-	nd
-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	v	-	-	-	v	-	-
v	+	-	-	+	-	+	+	+ <sup>g</sup>	+	+	-	-	-	- <sup>d</sup>	v	+	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	- <sup>d</sup>	-	nd
+	+	+	+	-	+	+	+	+ <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	nd	+	+	+
-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+ <sup>g</sup>	+
+ <sup>g</sup>	-	-	+	-	-	-	-	+ <sup>b</sup>	+	-	-	-	-	-	- <sup>h</sup>	+ <sup>g</sup>	+
v	-	+	-	-	+ <sup>g</sup>	-	-	+	v	+	+	+	+	v	v	+ <sup>g</sup>	-
+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	v	-	-	nd	v	-	nd
-	-	nd	-	nd	nd	-	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	nd	-	nd	nd
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	- <sup>f</sup>	+	-	+	+ <sup>i</sup>	+	+	v	-	+	v	-	-	- <sup>d</sup>	v	+	+
-	-	-	-	-	-	-	-	- <sup>d</sup>	-	+	+	+	+	+	-	-	-
+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	v	+	+	-	+
+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	-	-	nd
-	-	+	-	+ <sup>g</sup>	-	-	-	+	+	-	v	+	+	-	v	+	+
-	- <sup>d</sup>	+	-	-	-	-	-	+	nd	-	-	-	+	nd	v	-	nd
+	v	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	- <sup>d</sup>	-	+ <sup>g</sup>	+

<sup>a</sup>Symbols: +, 90% or more strains positive; -, 90% or more strains negative; v, 11–89% of strains positive; nd, not determined. All the strains tested ferment glucose, but not alginate, bovine submaxillary mucin, chondroitin sulfate, dextran, α-D-fucose, D-galacturonate, glycerol, gum karaya, heparin, hyaluronate, lactate, laminarin, ovomucoid, polygalacturonate, or L-rhamnose.

<sup>b</sup>A few strains do not ferment this sugar.

<sup>c</sup>When positive it is fermented slowly.

<sup>d</sup>Some strains ferment this sugar.

<sup>e</sup>but some are negative, especially those from rabbit and rat feces.

<sup>f</sup>Some strains can ferment it weakly.

<sup>g</sup>Generally delayed or slight fermentation.

<sup>h</sup>Some strains from sewage ferment this sugar.

<sup>i</sup>Some strains are weak fermenters.

<sup>j</sup>Reported as "sometimes not fermented" (Matteuzzi et al., 1971).

<sup>k</sup>Sugars indicated "v" mainly give erratic results.

<sup>l</sup>A few strains do not ferment pentoses.

All fermentative data derive from original publication describing the species for the first time. All data relating to the degradation of complex carbohydrates are from Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M.M., Biavati, B., 1994. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 199–210.

## المخلص

تهدف دراستنا إلى تقييم القدرات الحيوية الرئيسية لبعض السلالات المحلية من البيفيدوباكثيريا ، معزولة من ثلاث عينات وهي: براز الرضيع ، وأمعاء الحمام ، وأمعاء النحل. تم دراسة خمس سلالات هي (Pg1 ؛ Ab2 ؛ Ab1 ؛ S12 ؛ S11). يُظهر تحديد النمط الظاهري والكيماوي الحيوي لهذه السلالات الخمس وجود أشكال نموذجية للجنس *Bifidobacterium* ، إيجابية الجرام ولا تحتوي على الكاتالاز أو الجيلاتيناز. أظهرت نتائج اختبارات التعرف على نوعين من البيفيدوباكثيريا أنهما ينتميان إلى بكتيريا *B.bifidum* ممثلة بسلالة Pg1 وسلالة *B.breve* ممثلة بسلالة S12. صمدت السلالات من الظروف الحمضية فوق درجة الحموضة 3.5 ؛ بينما صمدت سلالة *B.breve* (S12) بشكل جيد مقارنة بالسلالات الأخرى. بشكل عام ، أظهرت السلالات الخمس أنها تمتلك خصائص بروبيوتيك حيث أظهرت السلالتان (*B. bifidum* (Pg1) و (*B. breve* (S12) بشكل خاص أفضل النتائج.

## الكلمات المفتاحية:

، البروبيوتيك ، القدرات ، التقييم ، التحديد *Bifidobacterium*

**Résumé :** Notre étude a pour but d'évaluer les principales aptitudes probiotiques de certaines souches indigènes de bifidobactéries, isolé à partir de trois échantillons qui sont à savoir : les selles d'un nourrisson, les intestins d'un pigeon et l'intestin des abeilles. Dont cinq souches ( S11 ;S12 ;Ab1 ;Ab2 ;Pg1) ont été étudiée. Identification phénotypique et biochimique de ces cinq souches montre la présence des formes typiques au genre *Bifidobacterium*, de Gram Positif et ne possèdent pas de catalase, ni gélatinase. Les résultats de tests d'identification de deux espèces de bifidobactéries ont révélé leur appartenance à *B.bifidum* représenté par la souche Pg1 et *B.brève* représenté par la souche S12. Les souches ont survécu à des conditions acides supérieures à pH 3.5 ; tandis que la souche B. brève qui représenté S12 a résisté bien par rapport aux autres souches. D'une façon générale les cinq souches ont déclaré qu'elles possèdent des caractères probiotique où les deux souches *B. bifidum* (Pg1), *B.brève* (S12) particulièrement ont montré les meilleurs résultats.

**Mots clé :** *Bifidobacterium*, probiotiques, aptitudes, évaluation, identification.

**Abstract:** Our study aims to evaluate the main probiotic capacities of certain indigenous strains of bifidobacteria, isolated from three samples which are namely: the stool of an infant, the intestines of a pigeon and the intestine of bees. Of which five strains (S11;S12;Ab1;Ab2;Pg1) were studied. Phenotypic and biochemical identification of these four strains shows the presence of forms typical of the genus *Bifidobacterium*, of Gram Positive and do not possess catalase or gelatinase. The results of identification tests of two species of bifidobacteria revealed that they belonged to *B.bifidum* represented by the Pg1 strain and *B.breve* represented by the S12 strain. The strains survived acidic conditions above pH 3.5; while the *B.breve* strain which represented S12 held up well compared to the other strains. In general, the five strains declared that they possess probiotic characters where the two strains *B. bifidum* (Pg1), *B.breve* (S12) particularly showed the best results.

**Keywords:** *Bifidobacterium*, probiotics, aptitudes, evaluation, identification.