



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 :
Ferial BOUKHALFI

Le :

Contribution à l'évaluation de quelques caractères probiotiques et technologique du Bifidobactéries isolées à partir des selles de nourrissons et lait maternel.

Jury :

M.	TITAOUINE Mouhamed	MCA	Université de Biskra	Président
M.	BENKADDOUR Bachir	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	GHITTI Hassina	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019 - 2020

Remerciements

Je remercie, en premier lieu, ALLAH pour m'avoir donnée la force et la résolution pour réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements à:

Mr. BENKADDOUR Bachir. Pour m'avoir encadrée, en me faisant bénéficier de ses connaissances, de son aide et de ses conseils.

Je vous remercie très sincèrement pour votre patience.

Mes remerciements vont aussi aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Tous les mots de merci à toute et à tous les enseignants de biologie d'université de Biskra pour leurs disponibilité et conseils.

Dédicaces

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 encouragements, leurs sacrifices. Eux qui m'ont guidé durant toutes mes années d'étude vers chemin de la réussite « Papa, Mama merci pour tout » ;

Mes adorables sœurs : « Israà », « Zineb » ;

Mes chers frères : « Younes » et « Yaakoub » ;

A vous tous, famille, amis, collègues, merci de m'avoir encouragé durant toutes ces années.

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Table des matières	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
Partie 1: Synthèse bibliographique	
Chapitre 1	
1.1. Le microbiote intestinal	5
1.1.1. Le développement de la flore intestinale chez le nouveau-né	5
1.1.2. Les facteurs influençant sur la flore	5
1.1.3. Fonction de microbiote intestinal	6
1.2. Le lait maternel	6
1.2.1. La flore du lait maternel	6
1.2.2. Origine des bactéries dans le lait maternel	7
Chapitre 2:	
Les probiotiques	8
2.1. Les probiotiques.....	9
2.2. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques.....	9
2.3. Microorganismes probiotiques.....	11
2.3.1. Genre Bifidobacterium	11
2.4. Effets bénéfiques des probiotiques	12
Partie II : la partie expérimentale	
Chapitre 3	
Matériels et méthodes	
3.1. Echantillonnage.....	16
3.2. Isolement et purification	16
3.3. Conservation des souches	16
3.4. Identification génotypique des isolats.....	17
3.5. Critères de la sécurité.....	17

3.5.1.	Sensibilité aux antibiotiques Résistance aux antibiotiques	17
3.6.	Mise en évidence <i>in vitro</i> de quelques propriétés probiotiques	18
3.6.1.	Tolérance aux conditions acides de l'estomac	18
3.6.2.	La tolérance à la bile.....	18
3.6.3.	Test d'hydrolyse du sel biliaire	19
3.6.4.	L'autoagrégation	19
3.6.5.	Coagrégation.....	19
3.6.6.	Hydrophobicité de la surface cellulaire	20
3.6.7.	Adhésion <i>in vitro</i> , aux cellules HT-29 et Caco-2	20
3.6.8.	Activité antibactérien.....	21
 Chapitre 4		
Résultats et discussion		
4.1.	Isolement.....	23
4.2.	Critères de sécurité.....	25
4.2.1.	La résistance aux antibiotiques.....	25
4.3.	Étude des caractères probiotiques.....	26
4.3.1.	La tolérance aux conditions acides de l'estomac et aux sucs gastriques	26
4.3.1.	Test d'hydrolyse des sels biliaires.....	28
4.3.1.	L'autoagrégation.....	28
4.3.1.	Coagrégation.....	29
4.3.2.	Hydrophobicité	30
4.3.3.	Adhésion aux cellules épithéliales intestinales.....	31
4.3.4.	L'Activité antimicrobienne.....	31
Conclusion.....		34
Bibliographie.....		37
 Annexes		
Annexe 1 les articles inclus dans la partie expérimentale		
Résumé		

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection

B.: *Bifidobacterium*

BHI: brain heart infusion

BSH: hydrolase de sel biliaire

DO: Densité Optique

FAO: Food and Agriculture Organization.

G+C : Guanine + Cytosine (coefficient de Chargaff)

GRAS: Generally Recognized As Safe

h: heure

HCl: acide chlorhydrique

MRS: milieu de Man, Rogosa et Sharpe

MRS_c : milieu de Man, Rogosa and Sharpe cystéiné

NaCl : Chlorure de sodium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

NCBI : National Center for Biotechnology Information

PBS : Phosphate Buffer salin

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : potentiel d'hydrogène

RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA

Rpm : Rotation par minute

p/v: poids/volume

UFC : Unité Formant Colonie

v/v : volume /volume

WHO : World Health Organization = (OMS) Organisation Mondiale de la Santé

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents critères de sélection des probiotiques (FAO/WHO, 2002).....	10
Tableau 2: critères de sélections utilisés aux laboratoires pour le screening des probiotiques (Nousiainen J., 2004).....	10
Tableau 3 Principaux effets bénéfiques associés à la prise de probiotiques et mécanismes supposés d'après (Nagpal, et al., 2012)	12
Tableau 4 Les souches utilisées dans l'étude de (Zuo, et al., 2015).....	23
Tableau 5 : les résultats de test de sensibilités des bifidobactéries aux différents antibiotiques (Zuo, et al., 2015).....	26
Tableau 6. Les résultats de : autoagrégation, coagrégation avec <i>Listeria monocytogenes</i> , hydrophobicité et capacité d'adhésion des souches bifidobactéries (Zuo, et al., 2015).....	30
Tableau 7. Inhibition in vitro des agents pathogènes par les souches bifidobactériennes (Zuo, et al., 2015).....	32

Liste des figures

Figure 1 Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant la distance de jonction voisine et 1000 échantillons bootstrap du logiciel MEGA4 basés sur des séquences de gène d'ARNr 16S partielles (a) et des séquences de gène de transaldolase partielles (b). *Escherichia coli* K-12 MG1655 a été utilisé comme groupe externe (Zuo, et al., 2015) 24

Introduction

La flore, ou microbiote, est l'ensemble des micro-organismes non pathogènes dits commensaux, vivant dans un environnement spécifique appelé microbiome, chez un hôte qui peut être animal ou végétal ou une matière pouvant être elle-même d'origine animale ou végétale (Burcelin, et al., 2016). Notre organisme est composé de plusieurs microbiotes, notamment au niveau de la peau, de la bouche et du vagin, mais le microbiote intestinal est le plus important d'entre eux (Dolié, 2018).

La découverte de la relation symbiotique entre l'homme et les bactéries a conduit à une nouvelle façon de voir les bactéries comme potentiellement bénéfiques, plutôt que pathogènes. Littéralement le mot probiotique signifie «pour la vie» (Tripathi & Giri, 2014).

Le lait maternel contient des micro-organismes qui, avec d'autres composants du lait, jouent un rôle central dans la colonisation précoce de l'intestin du nourrisson (Fernández, et al., 2013) donc il est considéré comme le régime alimentaire optimal pour les nouveau-nés en raison de sa capacité à fournir une nutrition complète et de nombreux facteurs de santé bioactifs.

Les bifidobactéries sont parmi les premiers colonisateurs du tractus gastro-intestinal stérile des nouveau-nés et constituent l'un des groupes prédominants de la microflore colique des nourrissons allaités (Kurokawa, et al., 2007). La capacité des bifidobactéries à exercer des effets bénéfiques sur la santé humaine est une caractéristique propre à l'espèce et à la souche (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).

Le lait maternel contient tous les éléments nécessaires pour assurer la croissance et le développement du nourrisson, il est une source potentielle de bactéries qui favorise le bon développement des bactéries de la flore intestinale, intervenant dans la protection contre les maladies et augmentant l'efficacité du système digestif (Fitzstevens, et al., 2017). Dans ce contexte cette étude était supposé que son objectif visé être :

- L'isolement et l'identification phénotypiques des bactéries lactiques isolées à partir des selles du nourrisson et le lait maternel.
- L'étude des propriétés technologiques des bifidobactéries.
- L'étude du potentiel probiotique des souches de bifidobactéries.

Cependant en raison de l'épidémie de corona nous avons arrêté le travail après avoir isolé et conserver des bactéries à partir 2 échantillons des selles de nourrissons.

Nous avons continué à essayer d'isoler des bifidobactéries à partir le lait maternel malgré qu'aucune croissance bactérienne n'ait été observée dans 4 échantillons du lait maternel.

Donc ce travail est divisé en 4 chapitres :

Le premier chapitre comprend une synthèse bibliographique sur le microbiote intestinal et le microbiote du lait maternel.

Le second chapitre contient des généralités sur les probiotiques et ses propriétés, y compris aussi une description des bifidobactéries.

Le troisième chapitre consacré au matériel et méthode présente une analyse d'article de (Zuo, et al., 2015).

Le quatrième chapitre regroupe les résultats et leur discussion.

Enfin, le manuscrit s'achève par la présentation de la conclusion et des perspectives et par les références bibliographiques et les annexes.

Partie 1:
Partie Bibliographique

Chapitre 1

1.1. Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal, connu aussi sous le nom de flore intestinale, est un écosystème complexe qui comprend l'ensemble des micro-organismes vivants (des bactéries, des archées, des virus et des champignons). Le microbiote se localise entre la lumière du tube digestif et le mucus présent à la surface de l'épithélium intestinal, il est présent tout au long du tube digestif mais sa concentration est maximale au niveau de l'intestin grêle et du côlon. Au total, un individu abrite dans son tractus intestinal 10^{14} micro-organismes (Dolié, 2018).

1.1.1. Le développement de la flore intestinale chez le nouveau-né

D'après Campeotto *et al.* (2007) le nouveau-né est stérile dans l'utérus et la colonisation bactérienne débute dès l'accouchement avec une flore simple à partir des flores de sa mère et de l'environnement proche.

Sa mise en place va commencer selon l'exposition aux micro-organismes d'origine maternelle, avec un contact beaucoup plus élevé lors d'un accouchement par voie basse que lors d'une césarienne, ainsi que d'origine environnementale selon le lieu de naissance et le contact avec l'équipe médicale (Campeotto, et al., 2007; Jost, et al., 2012). Chez l'enfant à terme, les premières bactéries implantées sont des organismes aérobies-anaérobies facultatifs : les entérobactéries (principalement l'espèce *E. coli*), les entérocoques et les *staphylocoques*. Ces premières bactéries vont rapidement consommer l'oxygène contenu dans la lumière intestinale, permettant l'implantation des genres anaérobies stricts (*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*) ainsi que celle des Lactobacilles microaérophiles (Bergström, et al., 2014).

Par la suite, le nouveau-né est continuellement exposé à de nouvelles bactéries provenant de l'environnement, de la nourriture et des bactéries cutanées des adultes. Une flore complexe et stable, qui se rapproche de celle de l'adulte, propre à chaque individu, semble être obtenue entre les âges de 2 à 4 ans (Burcelin, et al., 2016).

1.1.2. Les facteurs influençant sur la flore

La mise en place du microbiote intestinal est progressive et variable d'un individu à l'autre. Le déroulement de la grossesse, le mode d'accouchement, le terme de naissance, ainsi que les conditions d'hygiène entourant le nourrisson et sa mère lors de l'accouchement, y compris aussi l'administration d'antibiotiques au nourrisson ou à la mère sont autant des paramètres influençant la colonisation du tube digestif du nouveau-né (Noémie, 2016).

1.1.3. Fonction de microbiote intestinal

Le microbiote intestinal possède deux fonctions essentielles : d'une part, il permet une meilleure efficacité digestive et porte des activités de synthèse, en particulier celles de vitamines. D'autre part, il constitue une barrière physique, microbiologique et immunologique sélective vis à vis d'agents potentiellement néfastes pour l'organisme (Qin, et al., 2010).

1.2. Le lait maternel

Le lait maternel humain est un liquide physiologique complexe et spécifique universellement connu comme la source optimale de nutrition postnatale pour les nourrissons (Fernandez, et al., 2013). Il se compose non seulement de nutriments essentiels (vitamines, minéraux, protéines), de cellules, d'hormones, de facteurs immunologiques et immunomodulateurs (cytokines, immunoglobulines A), mais également de biomolécules non nutritives (glycoconjugués, oligosaccharides) (Aakko, et al., 2017) et une vaste gamme de microbes (bactéries, archées, virus, protozoaires et champignons anaérobies) connus sous le nom de microbiote du lait maternel (Hunt, et al., 2011; Boix-Amorós, 2017).

1.2.1. La flore du lait maternel

Avant l'ère 2000, le lait maternel était considéré comme stérile et dépourvu de micro-organismes. Cependant, en 2003, Martin *et al.* ont décrit la présence de bactéries commensales et probiotiques dans le lait maternel. L'étude a utilisé des techniques dépendantes de la culture et a trouvé, dans tous les échantillons, une prédominance des bactéries lactiques *Lactobacillus gasseri* et *Lactobacillus fermentum* (Martin, et al., 2003).

Il a été estimé qu'un nouveau-né consommant environ 800 ml de lait maternel par jour ingère environ 10^5 à 10^7 de bactéries, ce qui représente une source potentielle de bactéries commensales pour la colonisation de l'intestin du nouveau-né (Martin, et al., 2003; Scholtens, et al., 2012). Les nourrissons allaités présentent une prédominance de bifidobactéries et de lactobacilles, tandis que les nourrissons nourris au lait maternisé développent un microbiote mixte avec un nombre inférieur de bifidobactéries (Martín, et al., 2007).

Hunt et ses collègues (2011) ont suggéré qu'il existe un bactériome du lait maternel de base de neuf genres bactériens, dont *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* et *Bradyrhizobium*.

1.2.2. Origine des bactéries dans le lait maternel

Les mécanismes exacts par lesquels les bactéries atteignent les glandes mammaires ont fait l'objet de beaucoup de débats pendant plusieurs années.

Traditionnellement, on a considéré que les bactéries présentes dans le lait maternel étaient acquises par contamination cutanée ou orale. Cela concorde avec l'observation selon laquelle des *streptocoques*, des *corynebactéries* et des *propionibactéries* (qui se trouvent généralement sur la peau des adultes) ont été identifiés dans le lait (Martín, et al., 2012; Ruiz, et al., 2019). À l'inverse, un examen détaillé du lait maternel et de la peau maternelle a révélé que les bifidobactéries et lactobacilles identifiés dans le lait maternel ne sont pas présents sur la peau aréolaire maternelle (Martin, et al., 2009). Considérant également que les *bifidobactéries* sont des bactéries strictement anaérobies, il est très peu probable qu'elles vivent sur la peau (Rodríguez, 2014). Ces résultats suggèrent que les bactéries vivantes de l'intestin maternel voyagent par une voie endogène vers la glande mammaire via la présence d'une voie entéro-mammaire. Cette translocation des bactéries de l'intestin maternel à la glande mammaire implique des interactions complexes entre les cellules épithéliales, les cellules immunitaires et les bactéries (Rodríguez, 2014). Les preuves à l'appui de cette voie incluent la présence de communautés bactériennes dans le colostrum recueillies avant la première tétée du nourrisson (Damaceno, et al., 2017).

Le mécanisme de translocation physiologique implique des cellules immunitaires, des cellules dendritiques et des cellules CD₁₈ qui délivrent des bactéries non pathogènes de la lumière intestinale à la glande mammaire en lactation. Les cellules dendritiques sont capables de pénétrer dans l'épithélium intestinal en ouvrant les jonctions serrées entre les cellules épithéliales intestinales et en absorbant les bactéries de la lumière intestinale (Ruiz, et al., 2019). Les bactéries sont ensuite transportées par les macrophages vers les ganglions lymphatiques mésentériques et finalement vers la glande mammaire (Fernández, et al., 2013; de Andres, et al., 2018). En fin de grossesse et d'allaitement, la translocation se produirait plus fréquemment en raison d'une modification de la régulation des jonctions serrées dans le tractus intestinal, entraînant un efflux de cellules immunitaires vers la glande mammaire (Fernández, et al., 2013).

Chapitre 2:

Les probiotiques

2.1. Les probiotiques

Le terme probiotique a vu le jour en 1965 par opposition aux antibiotiques. Il a été défini par Lilly et Stillwell comme des facteurs dérivés des micro-organismes et stimulant la croissance des autres micro-organismes (Dolié, 2018).

Selon la définition adoptée par l’OMS et la FAO en 2002, un probiotique est un micro-organisme vivant qui, lorsqu’il est ingéré en quantité suffisante, exerce un effet bénéfique sur la santé de l’hôte. Ce sont principalement des bactéries et des levures présentes dans l’alimentation ou encore dans les compléments alimentaires sous forme lyophilisée. Une souche probiotique d’après (Guarner, 2011) est identifiée par son genre, son espèce, et par des caractères alphanumériques. Dans la communauté scientifique, il existe une nomenclature reconnue et acceptée pour les micro-organismes.

Parmi les genres bactériens couramment utilisés, on retrouve *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* et *Enterococcus*, ainsi que des levures telles que *Saccharomyces boulardii*. (FAO/WHO, 2002).

2.2. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques

Pour être sélectionnées en tant que probiotiques chez l’Homme, les souches microbiennes doivent posséder certaines propriétés fonctionnelles, sécuritaires et technologiques (FAO/WHO, 2002). Ces propriétés sont propres à chaque souche et ne peuvent pas être extrapolées d’une souche à l’autre même au sein d’une seule espèce (Dunne C., 2001). Les différents critères de sélection sont résumés dans le tableau 1.

Le critère de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques qui doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l’intestin, et donc résister aux différents mécanismes de défense de l’hôte étant donné que les bactéries sont administrées par voie orale (Millette, 2008).

Ainsi, pour garantir leur survie pendant le passage du tractus digestif, les probiotiques sont premièrement criblés pour leur tolérance au pH acide et à la bile. L’adhésion des bactéries probiotiques aux tractus digestif leur permet de produire durablement des molécules bénéfiques pour l’hôte, mais permet également l’exclusion des pathogènes et une immuno-stimulation (Servin, 2004).

Les microorganismes potentiellement probiotiques doivent donc être sélectionnés selon différents critères qui sont décrits dans le tableau 2.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents critères de sélection des probiotiques (FAO/WHO, 2002)

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> • Historique de non pathogénicité (GRAS) • Souche d'origine humaine ou alimentaire • Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques • Souche déposée dans une collection de culture internationale • Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques • Pas de deshydroxylation des sels biliaires
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> • Tolérance à l'acidité • Tolérance à la bile • Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes • Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus • Stimulation du système immunitaire
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini • Conservation des propriétés probiotiques après production

Tableau 2: critères de sélections utilisés aux laboratoires pour le screening des probiotiques (Nousiainen J., 2004)

Critères	But recherché
Résistance à l'acidité	Survie pendant le passage par l'estomac et le duodénum
Résistance aux sels biliaires	Survie pendant le passage par l'intestin grêle
Production d'acide (à partir du glucose et de lactose)	Production de barrière acide efficace dans l'intestin
Adhésion au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines	Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface
Production de substances antimicrobiennes	Inhibition du développement des germes pathogènes
Résistance à la chaleur	Survie pendant le processus de transformation
Bonnes propriétés technologiques	Stabilité, croissance sur une large échelle, survie dans le produit, résistance aux bactériophages.

2.3. Microorganismes probiotiques

La majorité des microorganismes probiotiques appartiennent principalement aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Rubio, et al., 2014). Cependant, d'autres microorganismes peuvent avoir des propriétés probiotiques. Ils comprennent des bactéries des genres *Escherichia*, *Enterococcus* ou encore *Bacillus*, ainsi que des levures comme *Saccharomyces boulardii* (Rolfe 2000; Holzapfel et Schillinger 2002).

2.3.1. Genre *Bifidobacterium*

Les bifidobactéries sont décrit à l'origine par Henry Tissier en 1900, présent dans les selles des nourrissons allaités, qu'il a appelé *Bacillus bifidu* (Tissier). Depuis lors, il a été proposé que les bifidobactéries jouent un rôle important dans la nutrition et la résistance aux infections chez les nourrissons allaités, et certaines souches de bifidobactéries possèdent le statut GRAS (Ventura, et al., 2007; Milani, et al., 2017).

Dans la classe des *Actinobactéries*, Stackebrandt et al. (1997) ont proposé le nouvel ordre des *Bifidobacteriales* avec la famille des *Bifidobacteriaceae* comme famille type de l'ordre. A cette époque, seuls deux genres ont été décrits comme étant des membres des *Bifidobacteriaceae* (c'est-à-dire le genre *Bifidobacterium* en tant que genre type et le genre *Gardnerella*) (Biavati & Mattarelli, 2018). La description de 45 espèces a été reconnue par le Manuel de bactériologie systématique de Bergey (deuxième édition) en 2012, et le nombre d'espèces n'a cessé d'augmenter jusqu'à présent (août 2016); actuellement 54 espèces et 10 sous-espèces sont décrites avec un total de 60 taxons (Mattarelli & Biavati, 2018).

Ces bactéries sont réparties dans sept niches écologiques différentes, englobant le tractus gastro-intestinal de l'homme, mammifères non humains, oiseaux et insectes sociaux ; eaux usées ; et la cavité buccale

Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière en forme V ou Y mais pouvant être coccoïdes. Ce sont des bactéries strictement anaérobies immobiles. Elles font partie de la flore intestinale normale et possèdent une bonne résistance aux sucs gastriques. Dominantes au niveau du microbiote de l'enfant, elles laissent très rapidement place à d'autres micro-organismes pour ne représenter avec l'âge que 5 à 10% de la flore intestinale de l'adulte (Milliot-Stoclin, 2015).

La température de croissance optimale est de 37 à 41°C, le pH optimal pour la croissance initiale est de 6,5 à 7; ne pousse pas à pH 4,5–5 (sauf pour *Bifidobacterium thermacidophilum*, qui peut croître à pH 4,5) ou pH 8,0–8,5 (Biavati & Mattarelli, 2015).

La propriété la plus directe et la plus fiable pour attribuer un organisme au genre *Bifidobacterium* est la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase F6PPK qui est l'enzyme clé caractéristique du «shunt bifide». Cette activité enzymatique, testée avec le fructose 6-phosphate comme substrat (Biavati & Mattarelli, 2015).

Certains genres de *Bifidobacterium* sont utilisés dans le commerce des produits probiotiques qui confèrent des effets bénéfiques à l'hôte en amélioration de l'équilibre microbien intestinal (Eshaghi, et al., 2017).

2.4. Effets bénéfiques des probiotiques

Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé de l'hôte sont, en théorie nombreux, mais les preuves scientifiques confirmant ces allégations nécessitent des investigations supplémentaires (Kechagia, et al., 2013). Les principaux effets avérés ont été établis à la suite d'études cliniques réalisées en double aveugle. D'autres sont seulement supposés, étant donné qu'ils reposent sur la base d'essais *in vitro* qui nécessitent des transpositions au niveau *in vivo* pour être validés (Nagpal, et al., 2012)

Les principaux effets bénéfiques des probiotiques et les mécanismes associés sont présentés dans le Tableau

Tableau 3 Principaux effets bénéfiques associés à la prise de probiotiques et mécanismes supposés d'après (Nagpal, et al., 2012)

Effets sur la santé	Mécanismes supposés
Protection contre les pathogènes entériques	<ul style="list-style-type: none"> • Activité antagoniste (compétition pour les nutriments et les récepteurs, production de composés antimicrobiens) • Stimulation du système immunitaire systémique • Résistance à la colonisation et diminution de l'accès aux pathogènes (modification du pH, production de bactériocines, de peptides anti-microbiens et de métabolites toxiques)
Aide à la digestion du lactose	<ul style="list-style-type: none"> • Les lactases bactériennes permettent le clivage du lactose en glucose et galactose assimilables
Effet anti-cancéreux	<ul style="list-style-type: none"> • Activité antimutagène • Altération de l'activité enzymatique pro-cancéreuse de microorganismes du côlon • Neutralisation de carcinogènes alimentaires
Lutte contre l'hypercholestérolémie	<ul style="list-style-type: none"> • Assimilation du cholestérol par les enzymes bactériennes • Diminution de l'activité des hydrolases de sels biliaires

	<ul style="list-style-type: none"> • Effet antioxydant
Lutte contre l'hypertension	<ul style="list-style-type: none"> • L'action de peptidases bactériennes sur les protéines du lait engendre des tripeptides anti-hypertensifs • Des composants de l'enveloppe bactérienne agissent comme inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
Lutte contre les infections à <i>Helicobacter pylori</i>	<ul style="list-style-type: none"> • l'Inhibition compétitive pour les sites de colonisation
Amélioration des rendements nutritionnels	<ul style="list-style-type: none"> • Production de vitamines et absorption de minéraux
Modulation du système immunitaire	<ul style="list-style-type: none"> • Renforcement de l'immunité spécifique et non-spécifique contre les infections et tumeurs par l'immunomodulation des tissus lymphoïdes associés au tractus • Modulation de l'activité des macrophages et lymphocytes • Stimulation de la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires • Augmentation de la production d'anticorps

Partie II : la partie expérimentale

Chapitre 3

Matériels et méthodes

3.1. Echantillonnage

La niche écologique utilisée, pour l'isolement des bactéries, est les selles d'enfants.

Les volontaires ont été recrutés selon les critères suivants : (1) nourrissons en bonne santé allaités âgés de un à six mois et mères en bonne santé sans aucune complication de santé ; (2) les nourrissons et les mères ne s'étaient pas vu prescrire d'antibiotiques pendant au moins trois mois avant l'étude ou avaient pris des probiotiques; (3) grossesse normale à terme; et (4) l'absence de problèmes périnataux chez le nourrisson et / ou la mère (Peirotén, et al., 2018).

Dans l'étude de Zue *et al.*(2015) où il y avait trois échantillons à partir de matières fécales fraîches de nourrissons allaités au sein, en bonne santé (accouchés par voie vaginale) ont été recueillis, deux d'un nourrisson de 4 mois dans la zone rurale de la région autonome ouïgoure du Xinjiang et un à partir d'un nourrisson de 4 mois dans la zone rurale de la province du Shandong, Chine.

3.2. Isolement et purification

Les échantillons ont été dilués etensemencés à la surface de milieu MRS agar supplémenté avec 0,05% (p / v) de chlorhydrate de L-cystéine, 3 g / L de chlorure de lithium et 5 mL / L d'acide propionique (MRScPL).

Les boîtes de petri ont été incubées pendant 48 h à 37 °C dans des conditions anaérobies (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂).

Les colonies isolées sont repiquées de façon alternée sur milieu solide jusqu'à purification. La pureté des souches est vérifiée par l'observation macroscopique (forme, couleur, taille). Seulement les bactéries à Gram positif et catalase-négatives sont maintenues dans un bouillon MRSc (Zuo, et al., 2015).

3.3. Conservation des souches

Pour une conservation de longue durée, les isolats purs sont congelées dans de l'azote liquide. Après centrifugation, les cellules ont été mises en suspension dans du lait écrémé reconstitué stérile à 10% (p/v) puis conservées à -80 °C jusqu'à l'utilisation ultérieure.

Pour caractériser les propriétés des isolats bifidobactéries, les souches probiotiques *B. lactis Bb12* et *B. longum BBMN68*, cultivés dans les mêmes conditions, ont été utilisés comme des souches de référence.

Les cultures ont été activées avant chaque expérience par sous-culture deux fois dans le bouillon MRSc.

Les isolats ont été activés deux fois dans le bouillon MRSc avant chaque expérience.

3.4. Identification génotypique des isolats

Pour l'identification moléculaire des isolats, l'ADN total a été extrait. Puis une PCR spécifique au genre a été réalisée pour confirmer l'attribution de souches au genre *Bifidobacterium* en utilisant les amorces :

rpoB-F: 5'-AACATCGGTCTGATCGGCTC-3 et

rpoB-R: 5'-GCTGCATGTTGGTACCCATC-3 (pour détecter le gène rpoB).

L'identification des espèces a été réalisée par amplification PCR du gène de l'ARNr 16S partiel en utilisant les amorces :

- Bif164-F: 5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3';

- Bif662: 5'CCACCGTTACACCGGGAA-3' ;

Pour le gène de la transaldolase partielle en utilisant des amorces :

- ForTal: 5'CGTCGCCTTCTTCTTCGTCTC-3' ;

- RevTal: 5'CTTCTCCGGCATGGTGTGAC-3'.

Le produit PCR a été partiellement séquencé et comparé à une base de données entièrement nucléotidique à l'aide de Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Un arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode de distance de jonction voisine du programme MEGA version 4.0.

Critères d'identification d'après (Drancourt, et al., 2000) :

L'identification du genre ou de l'espèce est effectuée selon les critères suivants:

- Si la comparaison de la séquence obtenue avec une séquence d'une espèce de référence classifiée a rapporté des pourcentages de similitude $\geq 99\%$, l'isolat inconnu sera assigné à cette espèce.

- Si les pourcentages sont entre 97% et 99% l'isolat inconnu sera assigné au genre correspondant.

- Si les pourcentages sont $< 97\%$, l'isolat inconnu sera assigné à une famille (Drancourt, et al., 2000).

3.5. Critères de la sécurité

3.5.1. Sensibilité aux antibiotiques Résistance aux antibiotiques

La sensibilité des bifidobactéries aux antibiotiques a été analysée par la méthode de concentration minimale inhibitrice (CMI) faite par (Zuo, et al., 2015).

A partir de ces cultures pures, des colonies ont été prélevées afin de préparer des suspensions inoculum sur bouillon MRS équivalent au standard McFarland 0,5 (10^8 cellules.ml⁻¹).

Les différentes souches bifidobactéries ont été ensemencé dans des bouillons MRSc supplémenté avec diverses concentrations (0,125 à 1024 µg/mL) d'antibiotiques, à savoir l'ampicilline, le chloramphénicol, la kanamycine, la streptomycine, la tétracycline, l'érythromycine, la rifampicine, la vancomycine. La croissance été examiné dans un lecteur de micoplaque à une DO de 600 nm après l'incubation de 24 h à 37 °C.

Le test a été répété trois fois.

3.6. Mise en évidence in vitro de quelques propriétés probiotiques

3.6.1. Tolérance aux conditions acides de l'estomac

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. Elles devraient en effet, survivre à l'acidité et au stress biliaire (Shehata, et al., 2016). L'évaluation de la tolérance au pH de l'estomac de l'homme est réalisée de la manière suivante :

Des cultures jaunes de (16h) sont centrifugées à 6000rpm/10min à 4° C puis lavée deux fois avec de NaCl 0,85% et remise en suspension dans 500 µL du même tampon.

Une aliquote de 100 µL de la suspension bactérienne a été ajoutée à 900 µL de suc gastrique simulé qui a été préparé comme suit : 3 g / L de pepsine sont ajoutés à 125 mM de NaCl, 7 mM de KCl, 45 mM de NaHCO₃.

La solution a été ajustée à pH 2,5 avec HCl, cette valeur correspond à la valeur moyenne quotidienne du pH gastrique (Damaceno, et al., 2017). L'incubation a été à 37° C pendant une heure.

Après exposition à pH acide à t=0 et t=1h, des dilutions en cascades jusqu'à 10^{-7} ont été réalisées. Ces dilutions sont ensuite ensemencées en masse sur la gélose MRS et incubées à 37° C pendant 24 à 48 h. Le compte viable a été déterminé à T_{0H} et après T_{1h} et les résultats sont présentés comme le pourcentage de survie.

3.6.2. La tolérance à la bile

La capacité des souches à survivre dans des conditions similaires du l'intestin grêle de l'homme (stress intestinal simulé) est l'un des caractères important de sélection des proiotiques (Ren, et al., 2014).

Pour cela, un jus intestinal simulé a été préparé contenant : 45 mM NaCl, 1 g / L de pancréatine (Sigma) et 3 g / L Ox-gal, (Sigma), ajusté à pH 8 avec NaOH).

Des cultures de (16h) sont centrifugées à 4°C à 6000rpm/10min ensuite lavée deux fois avec tampon (NaCl, 0,85%) et remise en suspension dans 500 µL du même tampon.

Par la suite, 100 µl ont été pris et ajoutés à 900 µl du jus intestinal simulé et incubé en anaérobiose à 37° C pendant 1h.

Pour le dénombrement des bactéries viables, il a été effectué par prélèvement de 0,1 ml de chaque préparation à 0h et 1h d'exposition puisensemencés par étalement sur gélose MRS et incubé pendant 24 à 48h en anaérobiose à 37° C.

3.6.3. Test d'hydrolyse du sel biliaire

Des cultures bactériennes fraîches ont été déposées sur gélose MRS contenant 0,5% (p/v) d'acide taurodésoxycholique (Sigma), puis incubées en anaérobiose à 37 °C pendant 48h. Les souches ayant une activité hydrolase de sel biliaire étaient entourées d'un halo de précipité de sels biliaires déconjugués.

3.6.4. L'autoagrégation

Le test d'autoagrégation a été effectué selon la méthode décrite par (Zuo, et al., 2015). Les cellules d'une culture jeune des isolats sont récupérées par centrifugation à 6000 g pendant 10 min, ensuite le culot bactérien est lavé deux fois avec du tampon PBS (pH 7,4) et remis en suspension dans la même solution. Les cellules sont ensuite ajustées à une densité optique de 0,6 à 600 nm.

Après 2 h d'incubation à 37° C, un volume de 0,1 ml de la partie supérieure de la suspension a été transféré dans un autre tube contenant 1,9 ml de PBS puis la densité optique est mesurée une autre fois à 600 nm.

Le pourcentage d'auto-agrégation a été calculé comme suit :

$$\% \text{Autoagrégation} = 1 - (A_{2h} / A_{0h}) * 100.$$

3.6.5. Coagrégation

Dans le test de coagrégation, les suspensions bactériennes ont été préparées comme décrit dans le test d'autoagrégation. Des volumes égaux (1 ml) des suspensions cellulaires des souches isolées et de la souche pathogène *Listeria monocytogenes* ont été mélangés dans une cuvette puis la densité optique est immédiatement mesurée à 600 nm (désignée A₀).

Après incubation du mélange à 37° C pendant 2h, l'OD₆₀₀ a été à nouveau mesurée (A_t).

Le pourcentage de coagrégation a été calculé en utilisant cette équation :

$$\% \text{Coagrégation} = (A_0 - A_t) / A_0 * 100.$$

3.6.6. Hydrophobicité de la surface cellulaire

Le test d'hydrophobicité des bifidobactéries a été déterminé par extraction au xylène (Zuo, et al., 2015). Les isolats ont été cultivés en anaérobie pendant 48 heures et récoltés par centrifugation à 6000 g pendant 15 min et le culot a été lavé avec du PBS et remis en suspension dans le même tampon. Les cellules sont ensuite ajustées à une densité optique de 0,6 à 600 nm.

Puis 0,6 ml de xylène a été ajouté à 3 ml de suspension bactérienne et vortexé pendant 180 s. après 1 heures d'incubation à température ambiante, La phase aqueuse a été prélevée et son DO₆₀₀ a été mesuré une fois.

L'affinité pour les hydrocarbures a été rapportée en pourcentage d'hydrophobicité qui est calculé selon l'équation suivante :

$H\% = [(A_0 - A) / A_0] * 100$, où A_0 et A sont les valeurs d'absorbance avant et après extraction avec les solvants organiques, respectivement.

3.6.7. Adhésion *in vitro*, aux cellules HT-29 et Caco-2

L'activité adhésive des souches bifidobactéries a été évaluée en utilisant des cellules épithéliales humaines de la lignée HT-29 et Caco-2 comme modèle de cellules épithéliales intestinales. Le test a été réalisé selon les étapes suivantes réalisé par (Zuo, et al., 2015):

- Préparation des cellules HT-29 et Caco-2 :

Les cellules HT-29 et Caco-2 ont étéensemencées dans des plaques de culture cellulaire à 24 puits à une concentration de 5×10^5 cellules par puits.

Les plaques ont été cultivées à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée de 5% et 95% de CO₂. Après environ 24 h d'incubation, une monocouche confluenta été obtenue.

- Préparation des cultures bactériennes :

Les souches bifidobactéries cultivées pendant la nuit ont été récoltées par centrifugation à 6000 g pendant 5 min à 4 ° C et lavées deux fois avec du PBS (pH 7,4), puis remises en suspension dans le milieu Eagle modifié de Dulbecco (sans antibiotique, sérum bovin fœtal sans sérum).

- Adhésion des bactéries aux cellules HT-29 et Caco-2 :

Pour le test d'adhésion, les monocouches de cellules HT-29 et Caco-2 (sur les plaques à 24 puits) ont été lavées deux fois avec du PBS (pH 7,4).

Une suspension bactérienne (1 ml de 1×10^8 UFC/ml) a été ajoutée aux plaques à 24 puits et incubée pendant une heure à 37 ° C dans une atmosphère à 5% de CO₂.

Après incubation, chaque puits a été lavé six fois avec PBS (pH 7,4) pour éliminer les cellules bactériennes libres et non attachées. Les monocouches ont été fixées dans le méthanol, colorées à Gram et examinées au microscope sous une lentille à immersion dans l'huile. L'adhésion a été évaluée dans 20 champs microscopiques aléatoires et l'écart moyen \pm écart type des bactéries adhérentes pour 100 cellules épithéliales a été déterminé.

3.6.8. Activité antibactérien

La technique de diffusion en puits, décrite par Zuo *et al.* (2015) a été utilisée pour étudier la capacité des isolats à inhiber des agents pathogènes intestinaux à savoir : *Escherichia coli* ATCC 8099, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Salmonella enterica* ATCC13076.

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 MRSc frais pour les isolats.
- Les surnageants des isolats ont été préparés par centrifugation des cultures bactériennes à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 ° C puis éliminer le culot (cellules). Le surnageant acellulaire a été divisé en deux aliquotes, l'une ajustée à pH 6,5 et l'autre non ajustée.
- D'autre part, un inoculum initial d'environ 10^6 UFC/mL de la souche d'agent pathogène a été incorporé dans des géloses mou (1%, p/v) avec le milieu approprié pour la souche cible (milieu d'agar BHI pour *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ; milieu gélose nutritif pour *Salmonella enterica* ATCC13076 ; Milieu LB pour *E. coli* ATCC 8099).
- 100 μ l de surnageant acellulaire a été transféré dans une cupule Oxford à la surface de la gélose.
- Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 ° C pendant 12 h.
- La tétracycline (10 μ g / mL) a été utilisée comme contrôle positif.
- L'activité antimicrobienne a été enregistrée sous forme de zones d'inhibition sans croissance (diamètre) autour du puits. Ensuite le diamètre de la zone d'inhibition a été mesuré.

Chapitre 4

Résultats et discussion

4.1. Isolement

Près de 200 colonies ont été isolées de trois échantillons de matières fécales prélevés à partir des nourrissons allaités. 13 isolats ont été suggérés être des bifidobactéries en basant sur la morphologie cellulaire, coloration de Gram et l'amplification du gène rpoB.

Le séquençage partiel des gènes codant l'ARNr 16s et la transaldolase a permis d'identifier 5 espèces différentes qui avaient une homologie de 99% et plus avec les espèces

B. adolescentis, *B. longum*, *B. breve*, *B. catenulatum*/*B. pseudocatenulatum* et *B. bifidum* respectivement.

Les souches IF1-03, IF1-04, IF1-11 et IF1-12 étaient considérées comme appartenant à l'espèce *B. adolescentis*, les souches IF3-31, IF3-53 et IF3-111 comme appartenant à l'espèce

B. longum, les souches IF2-141, IF2-191 et IF3-131 comme appartenant au roupee d'espèce *B. catenulatum*/*B. pseudocatenulatum*, les souches IF2-173, IF2-174 comme appartenant à l'espèce *B. breve*, et la souche IF3-211 comme appartenant à l'espèce *B. bifidum* (tableau 4).

Tableau 4 Les souches utilisées dans l'étude de (Zuo, et al., 2015)

Souche	Description	Source
<i>Bifidobacterium longum</i> BBMN68	Isolé du tractus intestinal d'un centenaire	Hao <i>et al.</i> 2011
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12	Probiotique commercial	Chr. Hansen Ltd. (Hørsholm, Denmark)
<i>B.adolescentis</i> IF1-03	Isolat de matières fécales	Cette étude
<i>B.adolescentis</i> IF1-04	Isolat de matières fécales	Cette étude
<i>B.adolescentis</i> IF1-11	Isolat de matières fécales	Cette étude
<i>B.adolescentis</i> IF1-12	Isolat de matières fécales	Cette étude
<i>B. longum</i> IF3-31	Isolat de matières fécales	Cette étude
<i>B. longum</i> IF3-53	Isolat de matières fécales	Cette étude
<i>B. longum</i> IF3-111	Isolat de matières fécales	Cette étude
<i>B. breve</i> IF2-173	Isolat de matières fécales	Cette étude
<i>B. breve</i> IF2-174	Isolat de matières fécales	Cette étude
<i>B.catenulatum</i> / <i>B.pseudocatenulatum</i> IF2-141	Isolat de matières fécales	Cette étude
<i>B.catenulatum</i> / <i>B.pseudocatenulatum</i> IF2-191	Isolat de matières fécales	Cette étude
<i>B.catenulatum</i> / <i>B.pseudocatenulatum</i> IF3-131	Isolat de matières fécales	Cette étude
<i>B. bifidum</i> IF3-211	Isolat de matières fécales	Cette étude

L'arbre phylogénétique des bactéries identifiées basé sur les séquences partielles de gène d'ARNr 16S et de gène de la transaldolase a fourni les positions relatives des isolats (Figure 1).

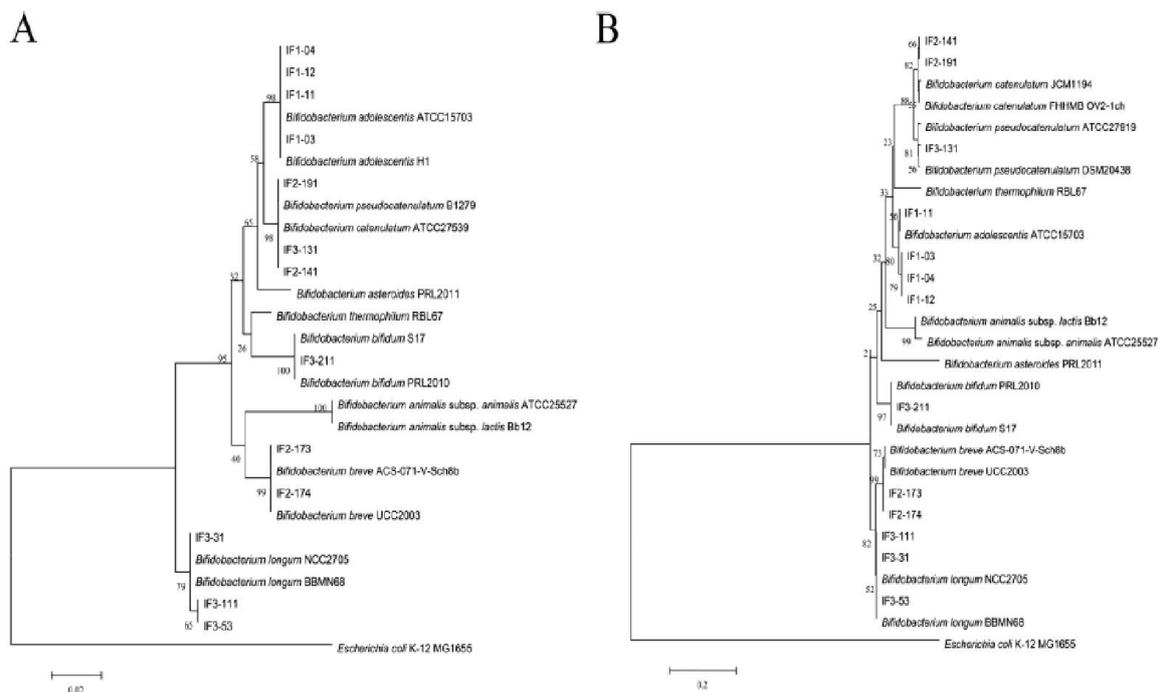


Figure 1 Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant la distance de jonction voisine et 1000 échantillons bootstrap du logiciel MEGA4 basés sur des séquences de gène d'ARNr 16S partielles (a) et des séquences de gène de transaldolase partielles (b). *Escherichia coli* K-12 MG1655 a été utilisé comme groupe externe (Zuo, et al., 2015)

Les séquences partielles d'ARNr 16S et de transaldolase de bifidobactéries obtenues ont été déposées au GenBank avec les numéros d'accès KP256207 à KP256219 et KP256220 à KP256232, respectivement.

Plusieurs auteurs ont confirmé la présence de *Bifidobacterium* dans les selles des nourrissons allaités au lait maternel et dans le lait maternel humain.

L'étude menée par Eshaghi *et al.* (2017) en étudiant par (RAPD PCR le génotype des isolats obtenus à partir de lait maternel des mamans et les matières fécales de leurs nourrissons a démontré que parmi les 56 isolats, 41 isolats ont été identifiés comme appartenant aux bifidobactéries dont 12 appartiennent à l'espèce *Bifidobacterium*, dont 12 *B. breve*, 14 *B. longum* et 15 *B. bifidum*, ont été isolées. Parmi eux, 12 isolats dont *B. longum* (6), *B. breve* (4) et *B. bifidum* (2) ont été partagés entre six paires mère-enfant.

Une autre étude réalisée par Peirotén *et al.* (2018) en identifiant par RAPD PCR 47 souches isolées a démontré la présence des bifidobactéries dans 7 des échantillons du lait maternel et 10 à partir des selles de nourrissons.

Les niveaux inférieurs de bifidobactéries décrits sur le lait maternel conduisent généralement à un nombre réduit d'échantillons positifs. Donc seulement *B. breve*, *B. longum subsp. longum* et *B. longum subsp. infantis* étaient les espèces détectées dans le lait maternel mais on observe que les souches partagées trouvées appartenaient aux espèces *B. breve*, *B. longum subsp. longum* et *B. longum subsp. infantis* (Peirotén, et al., 2018).

4.2. Critères de sécurité

4.2.1. La résistance aux antibiotiques

La sensibilité ou la résistance aux antibiotiques des bactéries est un critère qui contribue d'une part pour leur sélection et d'autre part pour leur classification. Le tableau 5 montre les résultats du CMI des bifidobactéries testées vis-à-vis différentes classes d'antibiotiques, à savoir inhibiteur de la synthèse d'ARN (rifampicine), inhibiteurs de la paroi cellulaire (ampicilline et vancomycine) et inhibiteurs de la synthèse des protéines (kanamycine, streptomycine, tétracycline, érythromycine et chloramphénicol).

Les souches étaient considérées comme résistantes lorsqu'elles présentaient des valeurs de CMI supérieures à la concentration critique (break point) établis par l'European Food Autorité de sécurité (EFSA, 2008).

Selon les résultats obtenus, toutes les souches de bifidobactéries isolées ont exprimé une sensibilité envers l'ampicilline et au chloramphénicol. Toutefois, toutes les souches identifiées ainsi que la souche de référence *B. lactis Bb12* ont démontré une résistance à la kanamycine, à la streptomycine et à la vancomycine (Zuo, et al., 2015) (tableau 5).

Les résultats obtenus sont similaires à ceux précédemment signalés par Arboleya *et al.* (2011) où ont rapporté que les bifidobactéries sont normalement résistantes aux principaux types d'antibiotiques, tels que la kanamycine et à la streptomycine.

De la même façon le même auteur a trouvé que la souche *B. longum (IPLA 20001)* était résistante à l'érythromycine (4 µg/mL par rapport au la concentration critique (break point) de 0,5 µg / mL) et la clindamycine (16 µg / mL par rapport à la concentration critique de 0,25 µg / mL). La même espèce *B. longum (IPLA 20001)* a présenté une résistance à l'érythromycine (4 µg / mL par rapport la concentration critique (brek point) de 0,5 µg / mL) et la clindamycine (16 µg / mL par rapport au seuil (break point) de 0,25 µg / mL). La présence d'une résistance à deux antibiotiques dans la même souche a déjà été rapportée et suggère un mécanisme de résistance commun aux deux antibiotiques.

Nous remarquons que la souche *B. longum IPLA 20001* a montré une résistance à l'érythromycine (4 µg / mL) et à la clindamycine (16 µg / mL), les souches *B. longum* ont

montré des niveaux de résistance plus élevés que *B. breve*, bien qu'une variabilité spécifique à la souche été trouvée (Arboleya, et al., 2011).

Tableau 5 : les résultats de test de sensibilités des bifidobactéries aux différents antibiotiques (Zuo, et al., 2015)

Souches	MIC (µg/mL)							
	Ampicillin	Chloramphenicol	Kanamycin	Streptomycin	Tetracycline	Erythromycin	Rifampicin	Vancomycin
<i>B.adolescentis IF1-03</i>	0.125	2	>1024	128	8	>128	16	128
<i>B.adolescentis IF1-04</i>	0.125	2	>1024	256	16	>128	16	>128
<i>B.adolescentis IF1-11</i>	0.125	1	1024	256	2	>128	16	128
<i>B.adolescentis IF1-12</i>	0.125	2	>1024	256	2	>128	32	128
<i>B. longum IF3-31</i>	1	1	>1024	128	16	32	8	128
<i>B. longum IF3-53</i>	1	1	>1024	128	32	8	8	128
<i>B. longum IF3-111</i>	1	1	>1024	256	16	64	8	128
<i>B. breve IF2-173</i>	1	2	1024	128	32	>128	>128	>128
<i>B. breve IF2-174</i>	1	1	512	128	32	>128	8	>128
<i>B.catenulatum/ B.pseudocatenulatum IF2-141</i>	1	1	>1024	512	32	16	16	128
<i>B.catenulatum/ B.pseudocatenulatum IF2-191</i>	0.5	1	>1024	512	4	32	64	128
<i>B.catenulatum/B.pseudocatenulatum IF3-131</i>	2	1	>1024	512	4	8	>256	256
<i>B. bifidum IF3-211</i>	0.25	1	1024	32	32	>256	16	256

4.3. Étude des caractères probiotiques

4.3.1. La tolérance aux conditions acides de l'estomac et aux sucs gastriques

Le critère essentiel dans la sélection d'un microorganisme à potentiel probiotique est sa capacité d'atteindre, de survivre dans le tractus digestif et notamment aux pH acides et aux sels biliaries (Kusharyati, et al., 2020).

Dans les conditions acides de l'estomac et au jus gastrique simulé, les souches isolées des nourrissons allaités ont montré une résistance variable aux acides et aux sels biliaries.

La tolérance au pH bas était très variable entre les souches, mais toutes les souches ont montré une survie faible dans le suc gastrique simulé après 1 h d'exposition que les deux souches de référence, *B. lactis Bb12* et *B. longum BBMN68* (Zuo, et al., 2015) (tableau 6).

B. adolescentis IF1-12 a affiché la survie la plus élevée, tandis que le groupe *B. catenulatum* / *B. pseudocatenulatum* et les souches de *B. breve* étaient plus sensibles au pH bas (tableau 5). Cependant, les souches de bifidobactéries isolées étaient extrêmement sensibles la bile. Les taux de survie après exposition pendant une heure à la bile étaient inférieurs à 0,0001% pour tous les isolats, tandis que la souche de référence *B. lactis* Bb12 a montré une survie de 0,46% après contact à la bile.

La souche probiotique largement utilisée *B. lactis* Bb12 a été incluse à des fins de référence et de comparaison. La tolérance à un pH bas était très variable. *B. lactis* Bb12 a montré la stabilité la plus élevée dans le suc gastrique simulé avec une survie de 74,5% après 90 minutes d'exposition (tableau 6).

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion d'un repas gras (Leahy, et al., 2005).

Dans cette étude de (Zuo, et al., 2015), toutes les souches isolées ont montré une sensibilité élevée aux sels biliaires, bien que généralement une sensibilité inférieure à celle rapportée dans une étude précédente d' (Andriantsoanirina, et al., 2013) où 24 souches ont montré une tolérance modérée (13 souches) ou faible (11 souches) à la bile. Cependant, les autres souches étaient intolérantes à la bile car il n'y avait pas de survie des bactéries après 5 h d'exposition à la bile. Les espèces *B. breve* et *B. adolescentis* présentaient le plus grand nombre de souches modérément tolérantes à la bile (respectivement 28,6% et 21%).

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les pH bas. Le temps de passage peut-être d'une à trois heures selon l'individu et le régime. Par conséquent, des auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2,5 dans un milieu de cultures pendant quatre heures (Damaceno, et al., 2017).

On remarque dans les résultats d' (Andriantsoanirina, et al., 2013) une tolérance modérée à un pH bas après 60 minutes d'exposition pour les souches de *B. longum*, *B. breve* ou *B. dentium*. Les souches de *B. adolescentis*, *B. bifidum* et *B. pseudocatenulatum* n'ont montré qu'une tolérance de courte durée à l'acidité. Aucune souche n'a montré une tolérance élevée à une exposition prolongée à un pH acide.

En fait, la viabilité des bifidobactéries aux valeurs de pH des sucs gastriques est considérée comme généralement faible.

Cela suggère que la tolérance à la bile et à l'acide variait d'une espèce à l'autre et est souche-dépendant au sein de la même espèce (Iqra, et al., 2020).

4.3.1. Test d'hydrolyse des sels biliaires

Pour survivre aux effets altérants de la bile, les bactéries lactiques possèdent des hydrolases de sels biliaires (BSH) qui aide à hydrolyser la bile conjuguée et lesquels ont par ailleurs été suggérées comme étant des marqueurs spécifiques témoignant d'une adaptation à la niche intestinale (Awasti, et al., 2016).

Les BSH sont généralement des enzymes intracellulaires, insensibles à l'oxygène qui catalysent l'hydrolyse des sels biliaires. Un certain nombre de BSH ont été identifiés et caractérisés chez des bactéries probiotiques, la capacité des souches probiotiques à produire des BSH a été souvent considérée comme critère de sélection des souches probiotiques (Shehata, et al., 2016).

Tous les isolats de (Zuo, et al., 2015) aient montré une activité d'hydrolase des sels biliaires. La présence des acides biliaires précipités autour des colonies (halo opaque blanc) a été considérée comme un résultat positif.

Dans l'étude de Rodriguez *et al.* (2012), l'activité de BSH a été examinée dans tous les isolats intestinaux de *Bifidobacterium* (données non montrées) et la capacité de déconjuguer les acides taurocholiques et/ou glycocholiques a été observée dans les souches commerciales *B. longum* BB 536 et *B. breve* M16V.

D'après les résultats de Awasti, et.,al (2016), une activité BSH élevée à modérée a été observée pour tous les isolats de bifidobactéries testés. Il ressort clairement des données que 5 des 12 isolats présentaient un niveau intense d'activité BSH, comme indiqué par une précipitation dense du taurocholate de sodium et du tauroglycholate de sodium tandis que le reste des huit isolats ont montré un niveau modéré d'activité BSH.

4.3.1. L'autoagrégation

Les résultats de l'autoagrégation de toutes les bifidobactéries isolées ont présenté une autoagrégation après 2 h d'incubation à 37 ° C (tableau 6).

La souche *B. adolescentis* IF1-11 a montré l'activité d'auto-agrégation la plus élevée, bien supérieure aux deux souches de référence (*B. lactis* Bb12 et *B. longum* BBMN68; tableau 6).

Après 16 h de culture statique dans du MRSc à 37 ° C, les cellules de *B. adolescentis* IF1-11 et *B. bifidum* IF3- 211 se sont agrégées et ont coulé au fond du tube (Zuo, et al., 2015).

L'auto-agrégation détermine la capacité d'une souche bactérienne à interagir avec elle-même, de manière non spécifique, ce que l'on appelle une condition préalable à la

colonisation et à l'infection du tractus gastro-intestinal par des agents pathogènes grâce à la capacité d'adhésion (Del Re, et al., 2000).

Le résultat de l'hydrophobicité de Huidron et Sharma (2018) a montré que la souche Dbs18 avait la plus forte capacité d'hydrophobicité de 56,8% vis-à-vis du xylène (un solvant polaire) tandis que d'autres isolats ont révélé un faible pourcentage. La raison probable d'un faible pourcentage pourrait être la faible affinité des isolats pour le solvant polaire.

L'Agrégation bactérienne entre les micro-organismes de la même souche (autoagrégation) ou entre les souches génétiquement séparées (coaggrégation) est d'une importance considérable dans plusieurs niches écologiques, en particulier dans l'intestin humain (Tulumoglu, et al., 2013).

4.3.1. Coagrégation

Les rapports de coagrégation entre les bifidobactéries et *L. monocytogenes* sont présentés dans le tableau 6.

On remarque que la souche de *B. adolescentis* a montré la capacité de coagrégation la plus élevée avec *L. monocytogenes*. Les quatre souches de *B. adolescentis*, les trois souches de *B. longum* et l'isolat de *B. bifidum* ont montré une capacité de coagrégation significativement plus élevée que celles des deux souches de référence (Zuo, et al., 2015).

La coagrégation des bactéries avec des micro-organismes nocifs a été considérée comme un mécanisme de protection contre l'infection (Collado, et al., 2008), et elle a été décrit par Del Re *et al.*, (2000) dans *Bifidobacterium* d'origine humaine.

Rodriguez *et al.*, 2012 a testé la capacité des isolats sélectionnés à coagrérer avec *Escherichia coli* O₁₅₇: H7 ATCC 43894, *Salmonella Typhimurium* CECT 443 et *Listeria monocytogenes*. Il a trouvé parmi les isolats *B. breve* INIA P18, *B. breve* INIA P360 et *B. pseudocatenulatum* INIA P435 coagrégeait avec *L. monocytogenes*. Cependant, *B. pseudolongum* INIA P2 coagrégeait avec *E. coli* O₁₅₇: H7.

Une coagrégation avec plus d'une souche cible a également été observée pour certaines isolats comme *L. rhamnosus* INIA P426 et *B. breve* INIA P18 coagrégées avec les trois souches pathogènes testées.

Tableau 6. Les résultats de : autoagrégation, coagrégation avec *Listeria monocytogenes*, hydrophobicité et capacité d'adhésion des souches bifidobactéries (Zuo, et al., 2015)

Souches	Autoagrégation (%)	Coagrégation (%)	Hydrophobicité (%)	Indice d'adhérence ^a	
				HT-29	Caco-2
<i>B. adolescentis</i> IF1-03	25.58 ± 4.24	32.67 ± 2.83	6.05 ± 0.75	3633 ± 497	1348 ± 219
<i>B. adolescentis</i> IF1-04	14.60 ± 6.72	26.36 ± 0.95	8.06 ± 2.97	3647 ± 166	578 ± 56
<i>B. adolescentis</i> IF1-11	82.52 ± 0.24	45.59 ± 4.16	18.62 ± 5.08	937 ± 144	1834 ± 244
<i>B. adolescentis</i> IF1-12	40.02 ± 2.72	27.30 ± 5.22	4.98 ± 2.35	1409 ± 280	696 ± 58
<i>B. longum</i> IF3-31	43.48 ± 2.51	28.23 ± 2.91	7.80 ± 2.93	256 ± 4	999 ± 132
<i>B. longum</i> IF3-53	42.22 ± 2.93	28.42 ± 1.71	46.07 ± 1.56	138 ± 18	852 ± 78
<i>B. longum</i> IF3-111	33.85 ± 1.33	24.93 ± 1.64	14.22 ± 0.44	79 ± 4	1242 ± 44
<i>B. breve</i> IF2-173	19.74 ± 1.86	16.10 ± 1.20	35.84 ± 1.52	3849 ± 376	822 ± 18
<i>B. breve</i> IF2-174	17.95 ± 0.00	7.69 ± 1.11	56.14 ± 5.82	604 ± 46	822 ± 52
<i>B. catenulatum</i> / <i>B. pseudo catenulatum</i> IF2-141	28.38 ± 1.91	13.39 ± 3.79	18.71 ± 1.30	304 ± 22	673 ± 19
<i>B. catenulatum</i> / <i>B. pseudo catenulatum</i> IF2-191	27.44 ± 4.41	14.17 ± 1.18	22.26 ± 2.92	416 ± 21	283 ± 23
<i>B. catenulatum</i> / <i>B. pseudo catenulatum</i> IF3-131	21.45 ± 1.61	6.82 ± 1.93	76.69 ± 0.85	670 ± 37	960 ± 161
<i>B. bifidum</i> IF3-211	34.62 ± 8.88	19.39 ± 2.04	96.82 ± 2.27	8273 ± 247	18009 ± 1476
<i>B. lactis</i> Bb12	22.97 ± 1.91	13.77 ± 2.10	98.84 ± 0.87	3467 ± 7	3038 ± 745
<i>B. longum</i> BBMN68	32.16 ± 2.73	17.30 ± 1.24	10.65 ± 3.84	234 ± 19	1102 ± 370

Les valeurs sont des moyennes de trois répliques ± SD

^a La valeur présente les nombres moyens ± ET des bactéries adhérentes pour 100 cellules épithéliales

4.3.2. Hydrophobicité

L'hydrophobicité de la surface cellulaire a montré de grandes différences, mesurées par extraction au xylène, entre les souches de bifidobactéries (tableau 6) (Zuo, et al., 2015).

Toutes les souches isolées ont montré une hydrophobicité inférieure à celle de *B. lactis* Bb12. Cependant, la plupart des souches ont montré une hydrophobicité significativement plus élevée que *B. longum* BBMN68 (tableau 6), en particulier *B. bifidum* IF3-211, qui présentait une hydrophobicité approchant celle de *B. lactis* Bb12.

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est l'une des propriétés physico-chimiques qui facilitent le premier contact entre le microorganisme et les cellules hôtes (Ren, et al., 2014).

Huidron et Sharma (2018) ont constaté que l'hydrophobicité d'une souche bifidobactérie codé par Dbs18 avait la plus forte capacité d'hydrophobicité de 56,8% vis-à-vis le xylène (un solvant polaire) tandis que d'autres isolats ont révélé un faible pourcentage. La raison probable d'un faible pourcentage pourrait être la faible affinité des isolats pour le solvant polaire (Huidron & Sharma, 2018).

4.3.3. Adhésion aux cellules épithéliales intestinales

L'adhésion des bifidobactéries aux cellules humaines de la lignée HT-29 et Caco-2 a été évaluée et les résultats sont indiqués dans le tableau 6.

En effet, les souches ne présentent pas de capacités d'adhésion similaires, bien qu'elles appartiennent au même genre (Zuo, et al., 2015).

En général, *B. longum* et *B. catenulatum* / *B. les souches du groupe pseudocatenulatum* avaient une faible capacité adhésive. En fait, les propriétés d'adhérence de ces deux bifidobactéries sont généralement plus pauvres que celles d'autres.

Il apparaît que *B. bifidum IF3-211* a montré les niveaux d'adhésion les plus élevés aux cellules HT-29 et Caco-2, dépassant de loin ceux de *B. lactis Bb12* et *B. longum BBMN68*; cela correspond à la forte hydrophobicité de *B. bifidum IF3-211*, par comparaison à celle de *B. adolescentis IF1-11* a montré une capacité d'adhésion plus faible aux cellules HT-29 et une capacité d'adhésion plus élevée aux cellules Caco-2 que les autres souches de *B. adolescentis*. *B. breve IF2-173* a montré une capacité d'adhésion bien plus élevée aux cellules HT-29 que *B. breve IF2-174*.

D'autre part, Arboleya *et al.* (2011) ont constaté que toutes les souches de *B. breve* et *B. longum IPLA 20001* adhéraient significativement mieux aux cellules HT29 que la souche de référence *B. lactis Bb12*, considérée comme une souche hautement adhésive.

D'après les travaux de Rodriguez *et al.* (2012) les souches *B. pseudolongum INIA P2*, *B. breve INIA P18*, ont présenté une faible capacité d'adhésion aux cellules Caco-2, avec des numérations de bactéries adhérentes proches du témoin négatif.

L'adhésion de bactéries probiotiques sur les cellules épithéliales humaines a été suggérée comme un mécanisme important pour empêcher la colonisation par des entéropathogènes, et constitue une propriété spécifique de la souche (Rodriguez, et al., 2012).

4.3.4. L'Activité antimicrobienne

La production de composés antimicrobiens contre des agents pathogènes par des souches bifidobactériennes a été déterminée par l'essai de diffusion en gélose. Les résultats de l'activité antibactérienne vis-à-vis les agents pathogènes indicateurs sont indiqués dans le tableau 7 (Zuo, et al., 2015).

Les surnageants de toutes les souches de *Bifidobacterium* sélectionnées ont pu inhiber la souche pathogène d'origine alimentaire *Salmonella enterica ATCC13076* alors que les surnageants de *B. adolescentis* et *B. breve* ont faiblement inhibé *E. coli* et *Staphylococcus aureus ATCC25923*.

Cependant, aucune inhibition n'a été observée où les surnageant ont subi une neutralisation du pH (données non présentées).

L'activité antibactérienne d'un probiotique est primordiale pour la colonisation réussie des muqueuses intestinales. Elle lui assure un effet de barrière et de défense contre les pathogènes (Eshaghi, et al., 2017).

Iqra *et al.* (2020) ont rapporté une bonne activité inhibitrice des bifidobactéries contre les bactéries pathogènes (*E. coli*, *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus*). La plupart des isolats inhibaient les bactéries pathogènes indicatrices et la zone d'inhibition était supérieure à 6 mm. Par ailleurs, les isolats *B-19* et *B-28* n'ont présenté aucune inhibition contre *E. coli* et *S. typhimurium*, respectivement. La propriété inhibitrice observée des isolats pourrait être attribuée en raison de la production de composés antimicrobiens. Selon les résultats de (Iqra, et al., 2020), *E. coli* et *S.typhimurium* était la plus sensibles et *S. aureus* était la bactérie indicatrice la plus résistante aux surnageants des isolats testés.

Tableau 7. Inhibition in vitro des agents pathogènes par les souches bifidobactériennes (Zuo, et al., 2015)

Souches	Diameter (mm) of inhibition zones		
	<i>Salmonella enteric ATCC13076</i>	<i>Staphylococcus aureus ATCC25923</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B.adolescentis IF1-03</i>	8.21	7.74	9.85
<i>B.adolescentis IF1-04</i>	7.39	7.74	12.36
<i>B.adolescentis IF1-11</i>	7.11	7.74	11
<i>B.adolescentis IF1-12</i>	8.91	7.74	7.74
<i>B. longum IF3-31</i>	15.83	0	10.95
<i>B. longum IF3-53</i>	12.31	0	7.74
<i>B. longum IF3-111</i>	7.74	0	7.74
<i>B. breve IF2-173</i>	7.74	7.74	7.74
<i>B. breve IF2-174</i>	7.74	0	9
<i>B.catenulatum/B.pseudocatenulatum IF2-141</i>	7.74	0	7.74
<i>B.catenulatum/ B.pseudocatenulatum IF2-191</i>	7.74	0	8.24
<i>B.catenulatum/B.pseudocatenulatum IF3-131</i>	12.04	0	0
<i>B. bifidum IF3-211</i>	7.74	0	0

En outre, Arboleya *et al.* (2011) ont été signalé précédemment que l'inhibition a été obtenu avec des surnageant non neutralisés de certains des souches de bifidobactéries, alors qu'aucune inhibition n'a été observée pour aucun des surnageant dans lesquels le pH avait été neutralisé. Cela indique que l'inhibition était très probablement due à la production d'acides organiques. De plus, les surnageants prélevés à partir des cultures en phase stationnaire de

croissance étaient plus inhibiteurs que les surnageants prélevés à partir de la phase de croissance exponentielle.

L'inhibition élevée du surnageant de la phase stationnaire est probablement due à l'accumulation des acides organiques.

Conclusion

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

L'objectif principal de l'étude de (Zuo, et al., 2015) était de trouver de nouveaux candidats probiotiques à utiliser dans les aliments fermentés fonctionnels, tels que les préparations pour nourrissons.

En résumé Zuo *et al.* (2015) a caractérisé phénotypiquement et génotypiquement 13 souches de bifidobactéries isolées à partir des selles des nourrissons allaités au sein selon les directives internationales pour la sélection de nouveaux probiotiques. Les tests *in vitro* comprenaient l'étude de leur aspect sécuritaire par la résistance aux antibiotiques, leur profil probiotique, par la survie aux conditions gastro-intestinales simulées, l'agrégation, l'hydrophobicité, l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales, l'activité antimicrobienne. Leurs résultats suggèrent que certaines des souches isolées dans les matières fécales des nourrissons allaités au sein, notamment *B. bifidum* IF3-211 et *B. adolescentis* IF1-11, pourraient avoir un potentiel probiotique précieux dans les produits alimentaires fonctionnels, bien que d'autres évaluations de sécurité et des études humaines seraient nécessaires.

La capacité des bifidobactéries à exercer des effets bénéfiques sur la santé humaine est une caractéristique propre à l'espèce et à la souche (Kusharyati, et al., 2020). Les bifidobactéries ont une grande importance industrielle et médicale et il y a eu un intérêt accru pour l'utilisation des bifidobactéries comme compléments alimentaires (Aakko, et al., 2017).

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 (Brown, et al., 2019).

Les souches les plus efficaces doivent être suffisamment robustes pour survivre aux dures conditions physico-chimiques du tractus gastro-intestinal. Cela comprend l'acide gastrique, la sécrétion de bile et la compétition avec les bactéries résidentes du microbiote intestinal (Iqra, et al., 2020). Il est néanmoins important de confirmer la sécurité de toutes les souches probiotiques nouvellement identifiées (Hossain, et al., 2018). À titre d'exigence de sécurité, l'origine des souches, leur non pathogénicité et l'absence de gènes de résistance aux antibiotiques transférables doivent également être évaluées (Awasti, et al., 2016).

Bibliographie

Bibliographie

- Aakko, J. et al., 2017. Human milk. *Benef. Microbes*, Volume 8, p. 563–567.
- Andriantsoanirina, V., Allano, S., Butel, M. & Aires, J., 2013. Tolerance of Bifidobacterium human isolates to bile, acid and oxygen. *Anaerobe*, Volume 21, p. 39e42.
- Arboleya, S. et al., 2011. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 149, p. 28–36.
- Atassi, F. & Servin, A. L., 2010. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic & vaginosis-associated pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 304, p. 29–38.
- Awasti, N. et al., 2016. Probiotic and functional characterization of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 120, pp. 1021--1032.
- Bergström, A. et al., 2014. Establishment of Intestinal Microbiota during Early Life : a Longitudinal, Explorative Study of a Large Cohort of Danish Infants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2889–2900., 80(9), p. 2889–2900.
- Biavati, B. & Mattarelli, P., 2015. Bifidobacterium. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, p. 1–57.
- Biavati, B. & Mattarelli, P., 2018. Related Genera Within the Family Bifidobacteriaceae. *The Bifidobacteria and Related Organisms.*, Issue <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805060-6.00003-X>, p. 49–66.
- Boix-Amorós, A. M.-C. C. Q. A. C. M. M. A., 2017. Multiple approaches detect the presence of fungi in human breastmilk samples from healthy mothers. *Sci. Rep.*, Issue 7, p. 13016.
- Brown, C. et al., 2019. Comparative genomics of Bifidobacterium species isolated from marmosets and humans. *American Journal of Primatology*, p. 1–12.
- Burcelin, R., Nicolas, S. & Blasco-Baque, V., 2016. Microbiotes et maladies métaboliques - De nouveaux concepts pour de nouvelles stratégies thérapeutiques. *médecine/sciences*, 32(11), pp. 952-960.
- Campeotto, F. et al., 2007. Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 5(31), p. 533-542.
- Collado, M., Meriluoto, J. & Salminen, S., 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains.. *European Food Research and Technology*, ,, Volume 226, p. 1065–1073.

- Colombo, M., Nero, L. & Svetoslav Dimitrov Todorov, S., 2020. Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. *Braz. J. Microbiol*, 51(2), pp. 787-795.
- Damaceno, Q. et al., 2017. Evaluation of potential probiotics isolated from human milk and colostrum. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, Volume 9, p. 371–379.
- de Andres, J. et al., 2018. Physiological Translocation of Lactic Acid Bacteria during Pregnancy Contributes to the Composition of the Milk Microbiota in Mice. *Nutrients*, Volume 10, p. 14.
- De Vos, P. et al., 2009. Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*.. In : « *Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes* », Volume 3, pp. 19-511.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. & Palenzona, D., 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(6), p. 438–442.
- Dolié, E., 2018. Toulouse(UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES): s.n.
- Drancourt, M. et al., 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of clinical microbiology* , Volume 38, pp. 3623-3630.
- Dunne C., O. L. L. G. D. S. M. F. F. G. C. K. B. G. F. ., C. J., 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr*, pp. 386-392.
- Eshaghi, M. et al., 2017. *Bifidobacterium* obtained from mother's milk and their infant stool; a comparative genotyping and antibacterial analysis. *Microbial Pathogenesis* , Volume 111, p. 94e98.
- FAO/WHO, 2002. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario: s.n.
- Felis, G. & Dellaglio, F., 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbio*, 8(2), pp. 44-61.
- Fernandez, L. et al., 2013. The microbiota of human milk. *Cell Mol. Biol*, 59(), p. 31–42.
- Fernández, L. et al., 2013. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease.. *Pharmacol. Res.*, Volume 69, p. 1–10.
- Fitzstevens, J. et al., 2017. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, Volume 32, pp. 354-364.
- Guarner, F. A. G. K. J. G. R. E. A. G. A. T. J. K. T. L. e. J.-J. G., 2011. *Probiotiques et Prébiotiques*, s.l.: s.n.

- Hendrati, P., Kusharyati, D., Ryandini, D. & Oedjijono., 2017. Characterization of Bifidobacteria from infant feces with different mode of birth at Purwokerto, Indonesia. *BIODIVERSITAS*, 18(18), pp. 2085-4722.
- He, T. et al., 2008. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), pp. 595-604.
- 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.
- Huidron, S. & Sharma, N., 2018. Isolation and Screening of Novel Isolates of Bifidobacteria from Human Milk as Potential Probiotic with Antidiarrheal Activity.. *Ann Appl Microbiol Biotechnol J.*, 2(1), p. 1007.
- Hunt, K., Foster, J. A. & Larry J Forney, U. M. E. S. D. L. B. Z. A. L. K. F. J. E. W. M. K. M. M. A. M., 2011. Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in. *PLoS One*, 17 juin, 6(6), p. e21313.
- 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.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. & Chassard, C., 2012. New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates. *PLoS One*, 7(8), p. e44595.
- Kechagia, M. et al., 2013. Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, Volume 2013, p. 1-7.
- Kurokawa, K., Takehiko, I. & Tomomi Kuwahara, K. O. H. T. A. T. H. T. H. M. V. K. S. T. P. S. T. D. T. H. N. H. M. Y. O. D. S. E. K. I., 2007. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res*, 14(1), pp. 169-181.
- Kusharyati, D. et al., 2020. Bifidobacterium from infant stool: the diversity and potential screening. *BIODIVERSITAS*, 21(6), pp. 2506-2513.
- Leahy, S., Higgins, D., Fitzgerald, G. & Van Sinderen, D., 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 98, pp. 1303-1315.
- Martín, R. et al., 2007. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol*, 158(1), pp. 31-37.
- Martin, R. et al., 2009. Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), pp. 965-9.
- Martin, R. et al., 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of pediatrics*, Volume 143, pp. 754-758.

- Martín, V. et al., 2012. Sharing of Bacterial Strains. *Journal of Human Lactation*, 28(1), pp. 36-44.
- Mattarelli, P. & Biavati, B., 2018. Species in the Genus *Bifidobacterium* (C H A P T E R 2). *The Bifidobacteria and Related Organisms*, Issue <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805060-6.00002-8>, p. 9–48.
- Medjaoui, I., 2018. *Contribution à la caractérisation moléculaire de la flore du lait maternel et.* (Université d'Oran): s.n.
- Milani, C. et al., 2017. Unveiling bifidobacterial biogeography across the mammalian branch of the tree of life. *ISME Journal*, Volume 8, p. 2834–2847.
- Millette, M., 2008. *Étude de bactéries lactiques à potentiel probiotique et de leurs métabolites.* (Université du Québec): s.n.
- Milliot-Stoclin, R., 2015. *LES PROBIOTIQUES : VENI VIDI MICI.* Université de Lille 2, Faculté des Sciences Pharmaceutiques: s.n.
- Nagpal, R. et al., 2012. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review.. *FEMS microbiology letters*, 334(1), pp. 1-15.
- Noémie, B., 2016. *Le microbiote intestinal, les probiotiques et leur place dans les pathologies digestives.* UNIVERSITE DE LORRAINE FACULTE DE PHARMACIE: s.n.
- Nousiainen J., J. P. S. J. e. W. A., 2004. Lactic acid bacteria as animal probiotics. In :Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. *Marcel Dekker, Inc.* , Issue 3e, pp. 547-560.
- Pascual, L. M. et al., 2008. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina.. *Journal of General and Applied Microbiology*, Volume 54,, p. 141–148..
- Peirotén, A., Arqués, J., Medina, M. & Rodríguez-Mínguez, E., 2018. Bifidobacterial strains shared by mother and child as source of probiotics. *Beneficial Microbes*, 9(2), pp. 231-238.
- Pot, B., Feli, G. E. & D., B. K., 2014. The genus *Lactobacillus*. . Dans: W. B. J. Holzapfel W H, éd. In: *Lactic Acid Bacteria; Biodiversity and Taxonomy*.. s.l.:John Wiley & Sons., pp. 249-353..
- Qin, J. et al., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, Volume 464, p. 59–65.
- Rada, V. et al., 2010. Susceptibility of bifidobacteria to lysozyme as a possible selection criterion for probiotic bifidobacterial strains. *Biotechnol Lett*, Volume 32, p. 451–455.
- Ren, D. et al., 2014. In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*, Volume 30, pp. 1-10.

- Rodriguez, E. et al., 2012. Antimicrobial properties of probiotic strains isolated. *JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS*, Volume 4, p. 542–551.
- Rodríguez, J. M., 2014. The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Enteromammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation?. *Advances in Nutrition*, 5(6), pp. 779-784.
- Rothe M., B. M., 2013. Evolution of the gut microbiota and the influence of diet. *Benef Microbes*, 4(1), pp. 31-37.
- Rubio, R., A., J., Martín, B. A. T. & Garriga, M., 2014. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food microbiology*, Volume 38, pp. 303-311.
- Ruiz, L., Garcia-Carral, C. & Rodriguez, J., 2019. Unfolding the Human Milk Microbiome Landscape in the Omics Era. *Frontiers in Microbiology*, Volume 10, p. 1378.
- Scholtens, P. et al., 2012. The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annu Rev Food Sci Technol*, Volume 3, pp. 425-447.
- Servin, A., 2004. Antagonistic activities of Lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.*, Volume 28, pp. 405-440.
- 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. .
- Tripathi, M. K. & Giri, S. K., 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods.*, Volume 9, pp. 225-241.
- Tulumoglu, S. et al., 2013. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's. *Anaerobe*, Volume 24, pp. 36-42.
- Ventura, M. et al., 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Volume 71, p. 495–548.
- Vlkova', E., Rada, V., Smehilova', M. & Killer, J., 2008. Autoaggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiologica*, Volume 53, p. 263–269.
- Zuo, F. et al., 2015. Characterization and in vitro properties of potential probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-fed infant feces. *Annals of Microbiology*, 66(3), p. 1027–1037.

Annexes

Annexes

Annexe 1 les articles inclus dans la partie expérimentale

- Zuo, F. et al., 2015. Characterization and in vitro properties of potential probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-fed infant feces.. *Annals of Microbiology* , 66(3), p. 1027–1037.
- Peirotén, A., Arqués, J., Medina, M. & Rodríguez-Mínguez, E., 2018. Bifidobacterial strains shared by mother and child as source of probiotics. *Beneficial Microbes*, 9(2), pp. 231-238.
- Eshaghi, M. et al., 2017. Bifidobacterium obtained from mother's milk and their infant stool; a comparative genotyping and antibacterial analysis. *Microbial Pathogenesis* , Volume 111, p. 94e98.
- Andriantsoanirina, V., Allano, S., Butel, M. & Aires, J., 2013. Tolerance of Bifidobacterium human isolates to bile, acid and oxygen. *Anaerobe* , Volume 21 , p. 39e42.
- Arboleya, S. et al., 2011. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 149, p. 28–36.
- Awasti, N. et al., 2016. Probiotic and functional characterization of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 120, pp. 1021--1032.
- Rodriguez, E. et al., 2012. Antimicrobial properties of probiotic strains isolated. *J O U R N A L O F F U N C T I O N A L F O O D S*, Volume 4, p. 542 –551.
- Colombo, M., Nero, L. & Svetoslav Dimitrov Todorov, S., 2020. Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. *Braz. J. Microbiol*, 51(2), pp. 787-795.
- Damaceno, Q. et al., 2017. Evaluation of potential probiotics isolated from human milk and colostrum. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, Volume 9, p. 371–379.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. & Palenzona, D., 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum. *Lett Appl Microbiol.*, Volume 31, pp. 438-442.
- Tulumoglu, S. et al., 2013. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's. *Anaerobe*, Volume 24, pp. 36-42.
- 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.
- Huidron, S. & Sharma, N., 2018. Isolation and Screening of Novel Isolates of Bifidobacteria from Human Milk as Potential Probiotic with Antidiarrheal Activity.. *Ann Appl Microbiol Biotechnol J.*, 2(1), p. 1007.

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.

Kusharyati, D. et al., 2020. Bifidobacterium from infant stool: the diversity and potential screening. *BIODIVERSITAS*, 21(6), pp. 2506-2513.

Ren, D. et al., 2014. In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of Lactobacillus strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*, Volume 30, pp. 1-10.

Résumé

Les bifidobactéries sont l'un des principaux probiotiques qui ont un grand impact bénéfique sur la santé. D'après l'étude de Zuo *et al.* (2015), 13 souches de *Bifidobacterium* ont été isolées à partir de trois échantillons de selles de nourrissons allaités. Les isolats ont été identifiés phénotypiquement et génotypiquement et des tests *in vitro* ont été effectués pour évaluer le potentiel probiotique de ces souches conformément aux directives internationales pour les probiotiques.

Les résultats suggèrent que *B. bifidum*, *B. adolescentis* et *B. breve* avaient une capacité d'adhésion élevée par rapport à *B. longum* et *B. catenulatum* / *B. souches du groupe pseudocatenulatum*. En particulier, *B. bifidum* IF3-211 a un indice d'adhésion le plus élevé aux cellules HT-29 et Caco-2, bien supérieur aux deux souches de référence, *B. lactis* Bb12 et *B. longum* BBMN68. La souche *B. adolescentis* IF1-11 a montré une autoagrégation de 82,52 % \pm 0,24 et une coagrégation (45,59 \pm 4,16%) avec *L. monocytogenes* les plus élevées parmi les isolats.

En conclusion, *B. bifidum* IF3-211 et *B. adolescentis* IF1-11 ont montré des caractéristiques prometteuses en tant que candidats probiotiques qui ont un bon potentiel d'application dans l'industrie alimentaire.

Mots clé : *Bifidobacterium*, probiotiques, microbiote intestinal, lait maternel, selles de nourrissons.

Bifidobacteria are one of the main probiotics that have a great beneficial impact on health. According to the study by Zuo *et al.* (2015), 13 strains of *Bifidobacterium* were isolated from three stool samples of breastfed infants. The isolates were identified phenotypically and genotypically and *in vitro* tests were performed to assess the probiotic potential of these strains in accordance with international guidelines for probiotics.

The results suggest that *B. bifidum*, *B. adolescentis*, and *B. breve* had high adhesive ability compared with *B. longum* and *B. catenulatum*/*B. pseudocatenulatum* group strains. In particular, *B. bifidum* IF3-211 has a highest adhesion index to HT-29 and Caco-2 cells, far higher than the two reference strains, *B. lactis* Bb12 and *B. longum* BBMN68. *B. adolescentis* IF1-11 showed highest autoaggregation (82.52 \pm 0.24 %) and coaggregation (45.59 \pm 4.16 %) with *L. monocytogenes* among isolates.

In conclusion, *B. bifidum* IF3-211 and *B. adolescentis* IF1-11 showed promising characteristics as probiotic candidates that have good potential for application in food industry.

Key words: *Bifidobacterium*, probiotics, gut microbiota, breast milk, infant stools.

بيفيدوباكثيريا هي واحدة من البروبيوتيك الرئيسية التي لها تأثير مفيد على الصحة. وفقاً للدراسة التي أجراها (Zuo *et al.* (2015)، تم عزل 13 سلالة من *Bifidobacterium* من ثلاث عينات من البراز للرضع الذين يرضعون من الثدي. تم التعرف على العزلات من خلال الاختبار المظهري والوراثي مع الدلائل الإرشادية الدولية للبروبيوتيك.

أشارت النتائج إلى أن بكتيريا *B. bifidum* و *B. adolescentis* و *B. breve* تتمتع بقدر لاصقة عالية مقارنة بسلالات *B. longum* و *B. catenulatum* / *B. pseudocatenulatum* مجموعة على وجه الخصوص، يحتوي *B. bifidum* IF3-211 على أعلى مؤشر التصاق لكل HT-29 و Caco-2، أعلى بكثير من السلالتين المرجعيتين و *B. lactis* Bb12 و *B. longum* BBMN68. أظهرت *B. adolescentis* IF1-11 أعلى تجمع ذاتي (82.52 \pm 0.24 %) وتجمع (45.59 \pm 4.16 %) مع *L. monocytogenes* بين العزلات.

في الختام، *B. bifidum* IF3-211 و *B. adolescentis* IF1-11 أظهرت خصائص واعدة كمرشحين بروبوتيك التي لديها إمكانية تطبيق جيدة في صناعة الأغذية.

الكلمات الرئيسية : *Bifidobacterium*, البروبيوتيك, ميكروبيوتا الأمعاء, حليب الثدي, البراز الرضع.