
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire BELHADJ BOUCHAIB – Ain Témouchent



Institut des Sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de Master

Option : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

GHORZI Imane

MILOUDI Asmaa

Isolement des souches de *Bacillus sp.* à partir du tube digestif des poulets de chair.

Encadrant

M. CHERIF Nadjib

Maitre de conférences "B" au C.U.B.B.A.T

Soutenu en 2018

Devant le jury composé de :

Président : Mr. BENNABI Farid	M.C.B	C.U.B.B.A.T
Examinatrice : Mme. MHAMED Imen	M.C.B	C.U.B.B.A.T
Encadrant : Mr. CHERIF Nadjib	M.C.B	C.U.B.B.A.T

Année universitaire 2017/2018

Remerciement

*On tient tout d'abord à remercier **ALLAH** de nous avoir aidé à réaliser cette étude.*

*Merci en tout premier à notre promoteur monsieur **CHERIF Nadjib**, Maitre De Conférences B au centre universitaire Ain Témouchent, pour avoir accepté de nous encadrer et aussi pour ses capacités, ses efforts et ses conseils. Merci d'avoir nous supporter, et merci à sa qualité intellectuelle, son rigueur et sa générosité.*

*Nous tenons à remercier monsieur **BENNABI Farid**, Maitre De Conférences B au centre universitaire Ain Témouchent de nous fait l'honneur de présider le jury de notre mémoire.*

*Nous tenons aussi à remercier madame **MHAMEDI Imen**, Maitre De Conférences B au centre universitaire Ain Témouchent pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Merci à tous nos enseignants de C.U.B.B.A.T pour la qualité de leur formation.

Merci à tout le personnel du laboratoire de microbiologie pour leur accueil, leur soutien et leur aide.

Merci à tous mes camarades de promotion du SNV microbiologie master 2 pour tous les bons moments partagés ensemble.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

Aux personnes les plus chères de ma vie : ma mère et mon père qui n'ont jamais cessés de me soutenir et de m'encourager de terminer mes études.

A Mes chers frères : Mohammed et Oussama.

A Ma belle sœur Sihem et son fils Khalil.

A toutes les familles : Ghorzi et Bendahmane.

A celle qui a partagé avec moi ce travail : Asma.

A tous mes amis et particulièrement : Hanane, Sarah, Ahlem et Nadia.

A tous ceux ou celles qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Imane

Je dédie ce travail :

*A ma familles et tous particulièrement à **mes parents**, pour tous ses sacrifices pour mes études et qui ont cru en moi et m'ont supporté lors de mes moments de doute, que dieu vous donne la santé et longévité.*

A mes frères pour leur soutien ; je vous aime.

*A mes amies **Ahlem, Hanane, Nadia, Sarah** et tout particulièrement a mon binôme d'étude **Imane**, qui m'ont supporté dans les moments difficiles, que dieu nous garde toujours unis dans l'amitié et l'amour.*

Asma

Résumé

Les inquiétudes concernant l'usage abusive d'antibiotiques et l'émergence des bactéries multirésistantes a conduit à la réduction de l'utilisation de ces antibiotiques en tant que promoteurs de croissance. Les probiotiques sont l'une des alternatives qui suscitent beaucoup d'intérêt. Les bactéries du genre *Bacillus* ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur capacité extraordinaire à former des endospores hautement résistantes aux conditions hostiles des milieux, à produire différentes enzymes extracellulaires, et des composés antimicrobiens.

L'objectif de cette étude était l'isolement et la sélection des souches de *Bacillus* à partir du tube digestif de poulets de chair, en se basant sur leur capacité à produire des enzymes extracellulaires, leur pouvoir à inhiber la croissance d'*E.coli*, et à résister aux conditions hostiles du tractus gastro-intestinal. Trente-deux isolats ont été sélectionnés pour déterminer leur pouvoir à produire de différentes enzymes (amylase, protéase, cellulase, lécithénase, et lipase) en utilisant des milieux sélectifs pour chaque enzyme. Cette étude nous a permis de sélectionner quatre isolats, à fort potentiel enzymatique, qui ont été soumis à d'autre test pour déterminer leur sensibilité aux antibiotiques. Ces isolats choisis ont été également étudiés pour évaluer leur capacité à inhiber la croissance d'*E.coli*. Cinq souches montrent une activité antimicrobienne contre *E.coli*. Les cinq isolats ont été ensuite évalués pour montrer leur capacité à tolérer les conditions du tube digestif. Une croissance normale a été enregistrée à différentes concentrations en sels biliaires, et à des valeurs de pH allant jusqu'à 3.5. Cependant, à pH 2, uniquement quatre isolats ont été montrés une faible croissance. A la fin, les cinq isolats à effet probiotique ont été caractérisés par des études morphologiques et biochimiques.

Mots clés : *Bacillus spp*, poulets de chair, probiotiques, enzymes, activité antimicrobienne.

Abstract

Concerns about the misuse of antibiotics and the emergence of multidrug-resistant bacteria have led to a reduction in the use of these antibiotics as growth promoters. Probiotics are one of the alternatives that are of great interest. Bacteria of the genus *Bacillus* have been the subject of numerous studies because of their extraordinary ability to form endospores highly resistant to hostile environments, to produce different extracellular enzymes, as well as to synthesize antimicrobial compounds.

The objective of our study was to isolate and select *Bacillus* strains from the digestive tract of broilers, based on their ability to produce extracellular enzymes, to inhibit the growth of *Escherichia coli*, and to resist the hostile conditions of the gastrointestinal tract. Thirty-two isolates were selected for their ability to produce different enzymes (amylase, protease, cellulase, lecithinase, and lipase) using selective media for each enzyme. This study allowed us to select four isolates, with high enzymatic potential, which were subjected to another test to determine their susceptibility to antibiotics. These isolates selected isolates were also studied to evaluate their ability to inhibit the growth of *E.coli*. Five strains show antimicrobial activity against *E.coli*. The five isolates were then evaluated for their ability to tolerate digestive tract conditions. Normal growth was recorded at different bile salt concentrations and at pH values up to 3.5. However, at pH 2, only four isolates were shown to have low growth. In the end, the five probiotic isolates were characterized by morphological and biochemical studies.

Key words: *Bacillus spp*, broilers, probiotics, enzymes, antimicrobial activity.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des Abréviations

Introduction.....1

Chapitre I : Etude bibliographique

I. Ecosystème gastro-intestinal de poulet de chair.....3

I.1. Description du tube digestif du poulet.....3

I.2. Rappel sur l'alimentation de poulet de chair.....4

I.3. Sécrétions digestives du poulet.....6

II. Microbiote intestinal chez le poulet.....6

II.1. Généralité.....6

II.2. Colonisation du tractus gastro-intestinal du poulet.....7

II.3. Composition de la flore du tractus digestif du poulet.....7

II.4. Rôle du microbiote intestinal.....8

II.4.1. Rôle dans le développement de la structure du tube digestif.....8

II.4.2. Rôle métabolique.....9

II.4.3. Rôle nutritionnel.....9

II.4.4. Rôle sur la santé de l'hôte.....10

III. Les probiotiques.....11

III.1. Définition.....11

III.2. Critères de sélection des probiotiques.....12

III.3. Probiotiques en aviculture.....13

III.4. Avantages de l'application de probiotiques dans l'industrie de la volaille.....13

III.4.1. Effet des probiotiques contre les infestations aviaires.....13

III.4.2. Effet des probiotiques sur les réponses immunitaires.....14

III.4.3. Effet des probiotiques sur les performances de croissance.....14

IV. Le probiotique du genre *Bacillus*.....15

IV.1. Description du genre *Bacillus*.....15

IV.1.1. Caractéristiques bactériologiques.....15

IV.1.2. Caractéristiques physiologiques.....15

IV.1.3. Ecologie.....16

IV.1.4. Taxonomie.....16

IV.2. <i>Bacillus</i> en tant que probiotique en aviculture.....	19
IV.2.1. <i>Bacillus subtilis</i>	20
IV.2.2. <i>Bacillus licheniformis</i>	20
IV.2.3. <i>Bacillus coagulans</i>	21

Chapitre II : Matériels et méthode

I. Prélèvement et échantillonnage.....	23
II. Isolement des bactéries du genre <i>Bacillus</i>	23
III. Purification des isolats.....	23
IV. Conservation des isolats.....	24
V. Criblage des souches à effet probiotique.....	24
V.1. Etude de l'activité enzymatique des isolats.....	25
V.1.1. Activité amylolytique.....	25
V.1.2. Activité protéolytique.....	25
V.1.3. Activité cellulolytique.....	25
V.1.4. Activité lipolytique.....	26
V.2. Etude de l'activité antimicrobienne des isolats Contre <i>Escherichia coli</i>	26
V.3. Etude de sensibilité aux antibiotiques.....	27
V.4. Tolérance aux conditions du tractus gastro-intestinal.....	27
V.4.1. Tolérance à l'acidité.....	27
V.4.2. Tolérance aux sels biliaires.....	28
VI. Identification des isolats à caractères probiotiques.....	28
VI.1. Etude des caractères morphologiques.....	28
VI.2. Etude des caractères biochimiques.....	28
VI.2.1. Test de catalase.....	28
VI.2.2. Test de tolérance à la salinité.....	29
VI.2.3. Test d'hémolyse.....	29
VI.2.4. Identification des isolats par la galerie API 20E.....	29

Chapitre III : Résultats

I. Isolement des souches de <i>Bacillus</i>	31
II. Purification des isolats.....	34
III. Criblage des souches à effet probiotique.....	34
III.1. L'étude de l'activité enzymatique des isolats.....	34
III.2. L'étude de l'activité antimicrobienne contre <i>Escherichia coli</i>	37

III.3. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques.....	38
III.4. Tolérance aux conditions du tractus gastro-intestinal.....	39
IV. Identification des isolats à caractères probiotiques.....	40
IV.1. L'étude des caractères morphologiques.....	41
IV.2. L'étude des caractères biochimiques.....	42
IV.2.1. Tests de catalase, de tolérance à la salinité et d'hémolyse.....	42
IV.2.2. Résultats de l'API 20E.....	43
Chapitre IV : Discussion.....	45
Conclusion.....	48
Références bibliographiques.....	50
Annexe.....	56

Liste des tableaux

Tableau 1	Forme et composition de l'aliment destinée au poulet de chair selon les phases d'élevage.	5
Tableau 2	Composition du microbiote digestif du poulet déterminée par méthodes moléculaire	8
Tableau 3	Principaux critères de sélection des probiotiques.	12
Tableau 4	Classification morphologique du genre <i>Bacillus</i> .	17
Tableau 5	Liste des antibiotiques testés.	27
Tableau 6	Résultats de l'aspect macroscopique des souches isolées à partir des poulets de chair malades	31
Tableau 7	Résultats de l'aspect macroscopique des souches isolées à partir des poulets de chair domestiques	32
Tableau 8	Résultats de l'aspect macroscopique des souches isolées à partir des poulets de chair saines	32
Tableau 9	Résultat de l'activité enzymatique des 32 isolats étudiés.	35
Tableau 10	Résultat de l'activité antimicrobienne, contre <i>Escherichia coli</i> , des isolats étudiés.	37
Tableau 11	Résultats de la sensibilité des isolats aux antibiotiques.	39
Tableau 12	Résultats de la tolérance des isolats à l'acidité.	40
Tableau 13	Croissance des isolats en présence de sels biliaires.	40
Tableau 14	Les résultats des tests de catalase, de tolérance à la salinité et de test d'hémolyse.	42
Tableau 15	Résultats des plaques API20E inoculées par les cinq souches sélectionnées.	43

Liste des figures

Figure 1	L'anatomie du tractus digestif chez le poulet.	4
Figure 2	L'évolution du nombre d'espèces de <i>Bacillus</i> à travers les années.	17
Figure 3	protocole d'isolement des souches de bacillus à partir du tube digestif de poulet.	24
Figure 4	L'aspect de la galerie API20E avant l'inoculation de la souche bactérienne.	30
Figure 5	Aspect macroscopique de quelques colonies après 48h d'incubation à 37°C sur gélose nutritive.	33
Figure 6	Résultat de l'observation microscopique après coloration de Gram (Gx1000 à l'immersion).	34
Figure 7	Aspect macroscopique des isolats purs sur gélose nutritive après 24h d'incubation à 37°C.	34
Figure 8	Activité enzymatique de quelques isolats.	36
Figure 9	L'activité antimicrobienne des souches testées.	38
Figure 10	L'antibiogramme de la souche S15.	39
Figure 11	Aspect macroscopique des colonies après 24h d'incubation à 37°C sur GN.	41
Figure 12	Aspect microscopique des souches après coloration de Gram (grossissement x 1000).	41
Figure 13	Test de catalase positif.	42
Figure 14	Hémolyse β de la souche S11.	42
Figure 15	Résultat de la tolérance des souches S15 et S25 à la salinité.	43
Figure 16	Résultats des plaques API 20E des cinq souches à potentiel probiotique.	44

Liste des abréviations

ATB : Antibiotiques

AMX: Amoxicilline

ARN: Acide ribonucléique

B: *Bacillus*

C: *Clostridium*

Ca: Calcium

DOX: Doxycycline

E: *Escherichia*

EM : Energie métabolisable

ENR: Enrofloxacin

ERY: Erythromycine

FAO : Organisation de l'alimentation et l'agriculture

FLOR: Florfénicol

GN : Gélose nutritive

HCl : Acide chlorhydrique

Kcal : kilocalories

Kg : Kilogrammes

NaCl : chlorure de sodium

OMS : Organisation mondiale de la santé

OTC: Oxytétracycline

P : Phosphore

pH : Potentiel d'hydrogène

SUL : Sulfamide

TYL: Tylosine

UFC : Unité Formant Colonie

µm : micromètre

Introduction

La volaille constitue une source de protéines animales appréciable et économique, notamment pour les pays en voie de développement, ce qui a justifié son développement très rapide sur l'ensemble du globe depuis une trentaine d'année.

L'élevage intensif de poulet de chair en Algérie occupe le grand pourcentage de l'ensemble de production animale. L'estimation de la production annuelle des viandes blanches en Algérie est comprise entre 300 et 342 milles de tonnes soit environ 240 millions de poulets par an (**Ayed, 2015**). Le citoyen algérien consomme en moyenne durant l'année 10 kg de viande blanche, loin de la moyenne des pays développés qui est de 40 kg/an/habitant.

Le mauvais contrôle des conditions d'élevage tel que la mauvaise gestion de l'aération dans les poulaillers, l'absence de la biosécurité, conduise à l'apparition des maladies infectieuses, ce qui est considérée comme un facteur limité de la production.

L'antibiothérapie reste la solution la plus préconisés pour la lutte contre ces infections. L'utilisation excessive des antibiotiques en tant que promoteurs de croissances a conduit à une augmentation de la résistance à ces molécules et à l'émergence de bactéries pathogènes multirésistantes.

L'utilisation sous-thérapeutique d'antibiotiques comme facteurs de croissance constitue un enjeu de santé publique en raison de la transmission de micro-organismes antibiorésistants, dont la plupart se retrouvent généralement dans les déjections des volailles. La pratique courante qui, dans l'industrie avicole, consiste à supprimer les antibiotiques ou à les remplacer par d'autres médicaments ne fait qu'aggraver le problème, entraînant l'émergence de bactéries multirésistantes, des solutions naturelles comme l'utilisation des probiotiques ont été conçues pour renforcer la santé intestinale et augmenter la résistance des volailles aux infections pathogènes. (**Ribeiro F; 2014**)

De nombreuses espèces microbiennes sont utilisées comme probiotiques dans l'industrie de la volaille, tels les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aspergillus*, *Candida* et *Saccharomyces* (**Martin Král et al, 2012**).

Ces dernières années, les chercheurs commencent à s'intéresser plus aux espèces appartenant au genre *Bacillus*, ces bactéries à Gram positif présentent un intérêt probiotiques

grâce à leur capacité de produire de nombreuses molécules antimicrobiennes comme les surfactines, et enzymatiques tels que les protéases, les lipases, les cellulases, les xylanases et les phytases, et des capacités de résistance à des conditions environnementales extrêmes.

Dans ce contexte, ce présent travail a été basé sur :

- L'isolement du genre *Bacillus* à partir du tractus intestinal des poulets de chair.
- Criblage des souches productrices des enzymes tels que les lipases, protéases, cellulase et amylase.
- Etude de la sensibilité de ces souches aux conditions défavorables comme l'acidité, la salinité et les sels biliaries.
- Test de la sensibilité des isolats aux différents antibiotiques vétérinaires.
- Effet antibiotique des souches criblées sur des souches pathogènes.

Chapitre I : Etude bibliographique

I. Ecosystème gastro-intestinal de poulet de chair

I.1. Description du tube digestif du poulet

L'appareil digestif des poulets présente des caractéristiques anatomiques particulières, elle est constituée de différents compartiments :

I.1.1. La cavité buccale : Ne comprend ni lèvres, ni dents, mais un bec corné qui permet la préhension et une certaine fragmentation des aliments. Les glandes salivaires, peu développées, sécrètent de la ptyaline. Il n'y a ni voile du palais, ni épiglotte, si bien que la déglutition est un phénomène uniquement mécanique par redressement de la tête (**Laurent, 2012**).

I.1.2. L'œsophage : Contient le jabot, qui est un renflement dont l'épithélium est riche en glandes à mucus, Il permet le stockage des aliments avant la digestion. Le jabot assure une première digestion chimique grâce à l'action de la salive qui se mélange à l'aliment (**Florian, 2013**).

I.1.3. L'estomac : Comprend deux parties :

- ✓ Une partie chimique, **le proventricule**, dont la muqueuse est riche en glandes sécrétant à la fois l'acide chlorhydrique et le pepsinogène précurseur de la pepsine (**Laurent, 2012**).
- ✓ Une partie mécanique, **le gésier**, caractérisé par une couche superficielle très dure entourée de muscles puissants. Le pH est très bas (2 à 3,5) et il peut contenir de petits graviers, nécessaires aux animaux consommant des grains intacts (**Laurent, 2012**). Le gésier est séparé du proventricule et du duodénum respectivement par l'isthme et le pylore. Ces deux zones sont impliquées dans la régulation des processus de digestion (**Rougière, 2010**).

I.1.4. L'intestin grêle qui commence par le pylore et divisé en trois parties :

- Le duodénum (du pylore jusqu'à la portion distale de l'anse duodénale).
- Le jéjunum (de la portion distale de l'anse duodénale jusqu'au diverticule de Meckel).
- L'iléon (du diverticule de Meckel à la jonction iléo-caecale) (**Rougière, 2010**).

I.1.5. Le gros intestin, ou rectum est très court chez le poulet. Il débouche sur le cloaque, compartiment commun où se terminent les tractus gastro-intestinal, urinaire et reproducteur.

A la jonction entre l'intestin grêle et le rectum se trouvent **les cæca**. Le passage dans les cæca est sélective, seule la fraction liquide ou les particules très fines, provenant du chyme ou de l'urine par rétro-péristaltisme entrent dans les cæca (**Rougière, 2010**).

I.1.6. Le pancréas et le foie sont considérés comme des glandes annexes de l'appareil digestif. Le pancréas est situé dans l'anse du duodénum, et le foie entourant anatomiquement le gésier (**Rougière, 2010**).

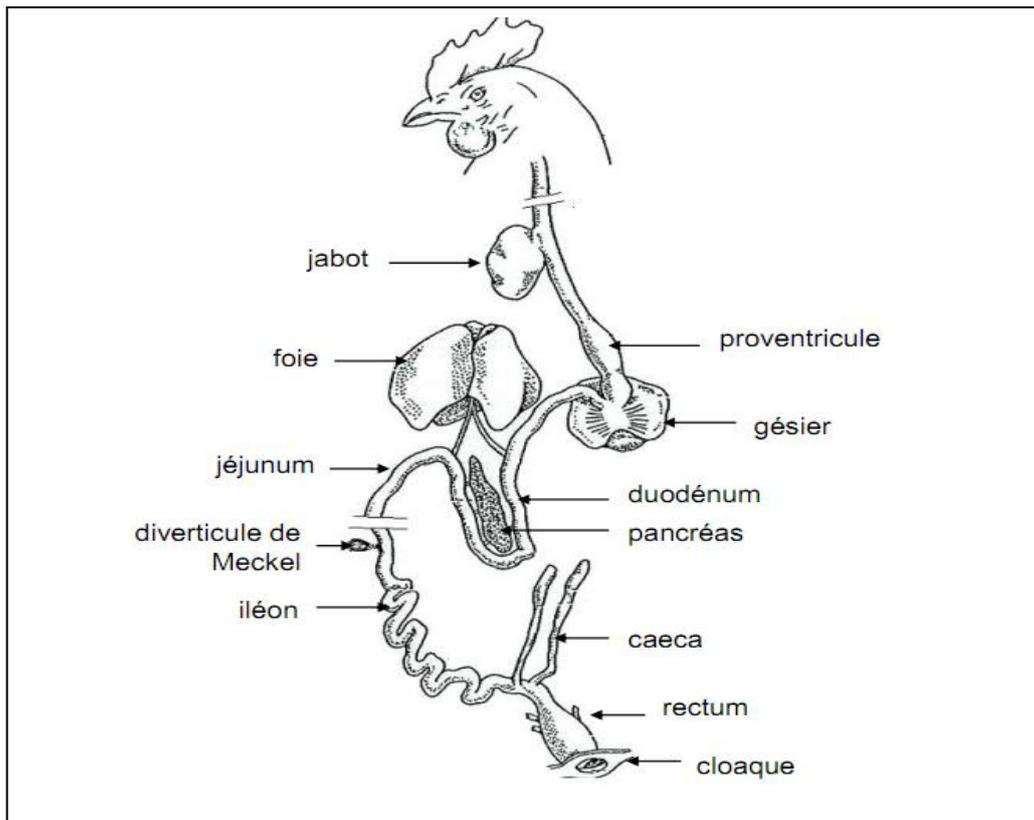


Figure 1 : l'anatomie du tractus digestif chez le poulet (**Rougière, 2010**).

I.2. Rappel sur l'alimentation de poulet de chair

L'aliment est le facteur le plus important de tout élevage. Dans l'élevage de poulet de chair, les aliments sont variés selon leurs particularités, c'est-à-dire ceux qui fournissent de l'énergie, des sources de protéines, de calcium et de phosphore et enfin, ceux qui apportent d'autres minéraux, et des vitamines (**Ouarest, 2008**).

Les matières premières, entrant dans la ration du poulet, sont classés en deux grandes catégories (**Ouarest, 2008**) :

Les matières premières énergétiques

- ✓ Le maïs, c'est la céréale la plus énergétique, pauvre en protéines et calcium.
- ✓ Le blé, il est très énergétique, le plus appétant avec une teneur de 12-13% en protéines.
- ✓ L'orge, énergétique, carencé en protéines, en calcium et en manganèse.
- ✓ Les huiles végétales et les graisses animales, qui constituent une source d'énergie pratiquement pure et sont utilisées dans les régimes hautement énergétiques.

Les matières premières protéiques

- ✓ Tourteau de soja, qui présente un taux protéique très élevé (surtout en lysine et tryptophane), il est également riche en phosphore.
- ✓ Tourteau de colza, peu énergétique, il est riche en cellulose, et pauvre en protéine.
- ✓ Tourteau d'arachide, ses protéines ont une valeur biologique inférieure à celle des protéines du tourteau de soja du fait d'une faible teneur en lysine, méthionine et tryptophane.

L'alimentation des poulets de chair, elle est réalisée en trois phases : phase de démarrage, phase de croissance, et phase de finition.

Tableau 1 : Forme et composition de l'aliment destinée au poulet de chair selon les phases d'élevage (Mahma *et al*, 2016).

Phase d'élevage	Forme d'aliment	Composition de l'aliment			
		Energie EM Kcal/Kg	Protéines brutes (%)	Ca (%)	P (%)
Démarrage	Farine ou miette	2800- 2900	22	1.10	0.45
Croissance	Granulé	2900- 3000	20	0.90	0.38
Finition	Granulé	3000- 3200	18		

I.3. Sécrétions digestives du poulet

- Au niveau de la cavité buccale, le volume de salive sécrété est de 7 à 30 ml par jours. Il facilite le transit du bol alimentaire à travers le bucco-pharynx et la partie proximale de l'œsophage.
- Dans l'œsophage et dans le jabot, du mucus est sécrété par les cellules caliciformes. Celui-ci a pour rôle principal de lubrifier et humidifier l'aliment (**Guardia, 2011**).
- Au niveau du proventricule, les cellules oxyntico-peptiques sécrètent à la fois de l'HCl et du pepsinogène. Celui-ci est converti en pepsine sous l'effet de l'acide présent. Ces sécrétions permettent de débiter l'hydrolyse des nutriments (**Rougière, 2010**).
- Le foie produit et sécrète la bile. Celle-ci, est composée d'acides biliaires (sels biliaires). Les acides biliaires composés principalement de l'acide cholique et de l'acide chénodéoxycholique, sont conjugués avec de la taurine pour donner de la cholytaurine et de la chénodéoxycholytaurine. Les sels biliaires sont impliqués dans la digestion des lipides (**Guardia, 2011**).
- Le pancréas sécrète de nombreuses enzymes dont des lipases, de l' α -amylase, et des protéases, ainsi que du bicarbonate de sodium, ce dernier neutralise le chyme acide provenant de l'estomac (**Guardia, 2011**).
- Au niveau de la lumière intestinale les enzymes pancréatiques et d'autres enzymes sont activés tel des disaccharidases, l'amylase, peptidases, des phosphatases alcalines et acides, des lipases et de l'entérokinase (**Rougière, 2010**).

II. Microbiote intestinal chez le poulet

II.1. Généralité

Le microbiote intestinal normal est un consortium complexe de microorganismes qui habitent le tractus gastro-intestinal et qui ont un rôle dans la nutrition, la physiologie et le fonctionnement du système immunitaire de l'hôte.

La composition de ce microbiote est en équilibre relativement stable dans le tube digestif. Cet équilibre peut être rompu avec l'âge, les conditions d'hygiène, le stress ou à la suite d'une agression extérieure comme lors de l'utilisation d'antibiotiques et par l'alimentation. Outre ces conditions, la présence de parasites intestinaux comme les coccidies, peut entraîner la dégradation de la muqueuse intestinale et la production de nouveaux substrats pour la microflore, modifiant ainsi sa composition (**Ben Abdallah, 2010 ; Deng et al, 2014**).

Les bactéries représentent une large gamme de types métaboliques et morphologiques. Leur nombre total est plus important que le nombre de cellules eucaryotes constituant le corps de l'hôte. On distingue les bactéries dominantes ($>10^6$ UFC /g contenu), sous-dominantes (10^3 à 10^5 UFC / g contenu), et résiduelles ($<10^3$ UFC / g contenu). Chez le poulet, les sites principaux d'activité bactérienne sont le jabot, les caeca et, dans une moindre mesure, l'intestin grêle (**Gabriel et al, 2005**).

II.2. Colonisation du tractus gastro-intestinal du poulet

Le développement du microbiote intestinal du poulet de chair commence au moment de l'éclosion. Les poussins sont d'abord exposés aux microbes qui proviennent de la surface des coquilles d'œufs, qui sont peuplées par des bactéries de l'intestin de la mère et de l'environnement. Par conséquent, l'inoculum microbien obtenu au début de la période post-éclosion est critique pour l'établissement de la communauté microbienne intestinale (**Rinttilä et al, 2013**).

Une communauté bactérienne relativement abondante est rapportée dès les premières heures suivant l'éclosion dans le jabot, l'intestin grêle et les caeca, dans les jours suivants l'éclosion, la population bactérienne augmente en abondance. Le microbiote digestif passe par plusieurs phases de colonisation durant la période d'élevage (**Guardia, 2011**).

II.3. Composition de la flore du tractus digestif du poulet

Chaque segment digestif est caractérisé par un environnement particulier auquel des populations microbiennes s'adaptent pour survivre et se multiplier. Ainsi, le microbiote digestif se distingue d'un compartiment à l'autre comme ont pu l'indiquer les études de **Van der Wielen et al, (2002)** en comparant la composition des microbiotes du jabot, du duodénum, de l'iléon et des caeca. Il a été montré que les microbiotes de duodénum et de l'iléon sont plus similaires entre eux qu'avec le microbiote du jabot, et le microbiote des caeca est celui qui distingue le plus des autres (**Guardia, 2011**).

Tableau 2 : Composition du microbiote digestif du poulet déterminée par méthodes moléculaire (**Gabriel et al, 2005**) (1).

Groupe	Familles bactériennes	% des familles	
		Intestin grêle (Jéjunum + iléon)	Caeca
Gram⁺, faible G+C Iléon : 94.2%, Caeca : 76.9%	Lactobacillaceae	68.7	8.2
	Clostridiaceae (3)	10.8	65.6
	Bacillaceae	0.7	1.4
	Staphylococcaceae	1.0	0
	Streptococcaceae	6.6	0.7
	Enterococcaceae	6.4	1.0
Gram⁺, fort G+C Iléon : 0.9%, Caeca : 13.9%	Fusobacteriaceae	0.7	13.9
	Bifidobacteriaceae	0.2	0
Gram⁻, Protéobactéries (2) Iléon : 2.3%, Caeca : 2.8%		2.3	2.8
Autres bactéries Gram⁻ Iléon : 0.6%, Caeca : 5.2%	Flavobacteriaceae	0	0.2
	Bacteroidaceae	0.6	5.0

(1): Poulets de chair à croissance rapide élevés en conditions commerciales, consommant un régime composé de maïs et de soja, sans antibiotiques.

(2): *Echerichia*, *Campylobacter*, *Ochrobacterium*, *Alcaligenes*.

(3): *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*.

II.4. Rôle du microbiote intestinal

L'hôte, par ses caractéristiques physiologiques et génétique et son alimentation, a un effet sur l'équilibre du microbiote intestinal. Aussi que le microbiote intestinal joue un rôle important pour la croissance, la physiologie, la santé, et l'immunité de l'hôte.

II.4.1. Rôle dans le développement de la structure du tube digestif

Le microbiote peut modifier la structure du tube digestif, en effet, chez les animaux axéniques plusieurs différences physiologiques ont été observées, notamment une *lamina propria* (tissu conjonctif situé sous les épithéliums qui tapissent les muqueuses digestives) plus fine, peu développée et quasiment dépourvue de lymphocytes. Une hypertrophie de certains segments de l'intestin notamment les Caeca a été également observée. La

vascularisation de l'intestin est régulée par les microorganismes qui transmettent des signaux permettant une augmentation du nombre de capillaires (**Florian, 2013**).

II.4.2. Rôle métabolique

La flore digestive est capable de produire de nombreux composés bénéfiques pour l'hôte. Les bactéries sont capables de produire des vitamines B, K et E et différentes substances antimicrobiennes, tels que l'acide lactique et les bactériocines produites par les bactéries lactiques et qui ont un large spectre d'action (**Gabriel et al, 2005**). Le microbiote digestif produit également des acides gras à chaînes courtes (tels que l'acétate, le butyrate, et le propionate) qui pratiquent un effet trophique sur l'hôte (**Manuel, 2013**). Des composés oxygénés sont aussi produits comme le peroxyde d'hydrogène et les radicaux libres (**Gabriel et al, 2005**).

II.4.3. Rôle nutritionnel

Le microbiote digestif optimise la disponibilité des nutriments et des minéraux essentiels ingérés en modulant leur absorption par l'épithélium intestinal. Les bactéries contribuent par l'intermédiaire de leurs enzymes au catabolisme des constituants alimentaires peu digestibles par l'hôte (**Manuel, 2013**).

a. Digestion des glucides

Les bactéries du tractus digestif sont capables d'utiliser des glucides digestibles par l'hôte (les oligosaccharides ou les disaccharides), non digestibles par l'hôte (cellulose, hémicellulose, pectine), ou nécessitant une interaction hôte micro-organisme (amidon) (**Guardia, 2011**).

Chez le poulet, les lactobacilles sont essentiels pour la digestion de l'amidon, qui ne peut pas s'effectuer sous la seule action de l'amylase endogène de l'animal. De plus, la salive sécrétée dans le jabot des poulets ne contient pas d'enzymes digestives. En revanche, les populations bactériennes qui constituent le microbiote de cet organe sont capables de sécréter des amylases et d'initier la digestion de l'amidon dès le jabot. Concernant les glucides complexes non digestibles, ils sont fermentés par la microflore principalement au niveau des caeca (**Guardia, 2011**). La présence de ces bactéries fibrolytiques, cellulolytiques et amylolytiques (*Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus amylophilus*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *Streptococcus bovis*, ...) permet de garantir un apport en énergie et une production de substrats disponibles (**Florian, 2013**).

b. Digestion des lipides

La microflore digestive a un effet négatif sur la digestibilité des lipides. Chez le jeune poulet de moins de trois semaines, la flore diminue la digestibilité des lipides d'origine végétale et animale. Cette réduction de digestibilité provient principalement de la déconjugaison des sels biliaires par certaines espèces bactériennes en particulier les lactobacilles. Puisque les sels biliaires conjugués servent à la formation des micelles, leur faible concentration réduit la solubilisation des lipides et donc leur absorption (**Gabriel et al, 2005**).

c. Digestion des protéines

L'effet de la microflore sur la digestibilité des protéines est variable, probablement en raison de différences de composition des régimes alimentaires. Le microbiote digestif a un effet positif sur la digestion des protéines dans le cas des protéines de mauvaise qualité qui sont mal hydrolysées par l'hôte. Cependant dans le cas de protéines très altérées par la chaleur, même la microflore ne peut les hydrolyser. Globalement, dans le cas d'une alimentation constituée de protéines très digestibles, la microflore a peu d'effet (**Gabriel et al, 2005**).

II.4.4. Rôle sur la santé de l'hôte

a. Microbiote intestinal et le système immunitaire

Le microbiote joue un rôle actif dans le développement et l'homéostasie du système immunitaire (**Manuel, 2013**). Il peut agir en activant le tissu lymphoïde et les précurseurs de l'immunité cellulaire tels que les lymphocytes, macrophages ou immunoglobulines (IgA) subissant une activité antigénique (**Florian, 2013**). En effet, les signaux des bactéries intestinales sont importants pour le développement et la maturation des lymphocytes T régulateurs et T auxiliaires. Certaines espèces bactériennes telles que *Bacteroides fragilis* et *Bifidobacterium infantis* promeuvent la maturation des lymphocytes T régulateurs et renforcent ainsi la barrière intestinale. Les lactobacilles activent différemment les cellules dendritiques les incitant à produire différentes gammes de cytokines anti inflammatoires. Les acides gras à chaîne courte, comme le butyrate, peuvent aussi exercer un effet immunomodulateur (**Manuel, 2013**).

b. Protection contre les agents pathogènes

Le principal bénéfice que l'hôte acquiert de sa flore indigène intestinale est la résistance à la colonisation du tube digestif par les agents pathogènes (**Mathieu, 2008**). En effet, la première flore implantée empêche l'installation de bactéries exogènes et donc potentiellement pathogènes. Ce phénomène appelé « effet barrière ». Des travaux ont été montrés que la colonisation des caeca par les salmonelles est limitée par le traitement des poussins juste après éclosion avec une flore caecale de poulets adultes sains (**Gabriel et al, 2005**).

Le phénomène d'effet barrière pourrait s'expliquer par une compétition entre les bactéries pour les sites spécifiques d'attachement de la muqueuse intestinale. Cette compétition mucosale est basée sur la capacité de la microflore indigène d'occuper les sites d'attachement de la muqueuse réduisant ainsi l'adhésion des agents pathogènes et la colonisation par ceux-ci. Il est démontré que certaines espèces de lactobacilles possèdent une plus grande affinité pour les glycoprotéines de la muqueuse en comparaison à des sérovars de *Salmonella* et *E. coli*. Il est également montré que l'inoculation de spores de *Bacillus subtilis* est efficace pour réprimer la colonisation de *Salmonella enteritidis* et *C. perfringens* chez les poulets (**Mathieu, 2008**).

En plus d'occuper les sites d'attachement de la muqueuse, la microflore intestinale s'oppose à l'implantation de bactéries pathogènes par la compétition pour les nutriments essentiels, la libération de composés antimicrobiens dans l'écosystème intestinal comme des acides gras à chaînes courtes et des bactériocines, et la stimulation du système immunitaire (**Gabriel et al, 2005**).

III. Les probiotiques

III.1. Définition

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs "pros" et "bios" qui signifient "pour la vie". Tissier (1906) et Metchnikoff (1907) furent les premiers à proposer l'utilisation probiotique des bactéries, même lorsque le mot "probiotique" n'a pas été inventé jusqu'en 1960. Fuller (1989) étant le premier à souligner la nature microbienne des probiotiques en définissant le mot "probiotique" comme étant "un supplément alimentaire microbien vivant qui affecte positivement la santé de l'animal hôte en améliorant son équilibre intestinal" (**Geert et al, 2013**). Cette définition a été révisée plusieurs fois, notamment par FAO (Organisation de l'Alimentation et l'Agriculture) et OMS (Organisation Mondiale de la Santé). En 2001, leur nouvelle définition s'énonce comme suit : « Les probiotiques sont des

microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, produisent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte » (Larouci, 2013).

III.2. Critères de sélection des probiotiques

Afin de répondre à la définition des probiotiques, les micro-organismes doivent présenter diverses propriétés de survie, d'activité et de persistance dans le tractus digestif. Ces propriétés leur permettront d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte. Plusieurs critères majeurs de sélection *in vitro* et *in vivo* ont été établis et retenus par différents auteurs (Gagnon, 2007). Ces critères sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Principaux critères de sélection des probiotiques (Gagnon, 2007).

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> • Identification taxonomique précise • Origine humaine pour utilisation chez l'humain • Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques • Historique de non pathogénicité et non-invasion de l'épithélium intestinal • Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> • Tolérance à l'acidité, à la bile et aux enzymes digestives • Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus intestinal • Production de substances antimicrobiennes (bactériocines, acides organiques, peroxyde d'hydrogène ou autres composés inhibiteurs) et antagonisme envers les pathogènes • Immunomodulation • Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé
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 • Non modification des propriétés organoleptiques du produit fini

III.3. Probiotiques en aviculture

L'utilisation des probiotiques comme alternative aux promoteurs de croissance antibiotiques a suscité un intérêt considérable en raison de ses effets bénéfiques sur la santé, la performance et la productivité des poulets.

De nombreuses espèces probiotiques appartenant au genre *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Aspergillus*, *Candida* et *Saccharomyces* ont un effet bénéfique sur la performance des poulets de chair (**Martin Král et al, 2012**). L'utilisation commerciale de probiotiques en élevages industriels des volailles est relativement nouvelle. Comme pour les autres animaux, l'utilisation des probiotiques s'est développée à la suite des recherches effectuées sur le tractus gastro-intestinal qui ont permis une meilleure compréhension du rôle de la microflore et de son importance sur la santé et l'hygiène digestive des animaux. Les différentes études réalisées sur des volailles ont montré que les probiotiques exercent des activités antibactériennes contre diverses bactéries pathogènes notamment celles responsables d'infection chez les poulets dont *Salmonella sp*, *Campylobacter* et *Escherichia coli* (**Ben Abdallah, 2010**). Ainsi que, dans le secteur de la volaille, l'emploi des probiotiques est toujours basé sur les observations originales de Nurmi et Rantala (1973) qui ont observés que l'administration d'une suspension de contenu caecal provenant de poules adultes peut protéger les poussins contre une infection à *Salmonella*. Ce concept de Nurmi est basé sur l'exclusion des bactéries pathogènes par ce que l'on appelle une flore compétitive (**Van Immerssel et al, 2003**).

III.4. Avantages de l'application des probiotiques dans l'industrie de la volaille

III.4.1. Effet des probiotiques contre les infections aviaires

La colonisation des probiotiques est essentielle pour la fonction immunorégulatrice et l'inhibition des bactéries pathogènes dans le tractus gastro-intestinal. Cette dernière est réalisée par la compétition sur le site d'adhésion à travers la paroi intestinale ainsi que par la production de composés antimicrobiens (**Patterson et al, 2003**). L'adhésion des probiotiques, qui sont composés de *Lactobacillus acidophilus* et de *Streptococcus faecium*, à la muqueuse intestinale est capable de réduire la colonisation de *Campylobacter jejuni* dans le tractus intestinal du poulet (**Yong et al, 2016**).

De nombreuses études ont été montrées que les probiotiques peuvent exercer un effet antimicrobien contre les bactéries pathogènes via la production de métabolites tels que les acides gras à chaîne courte (AGCC) et les bactériocines. Il a été démontré que la concentration accrue d'acide butyrique réduit l'infection à *Salmonella* chez les volailles alors

que la concentration élevée d'AGCC du genre *Bacillus subtilis* réduit efficacement la population des coliformes et augmente celle de *Lactobacillus* chez les poulets de chair (Yong et al, 2016). D'autre part, les bactériocines qui sont des peptides ou des protéines synthétisés par voie ribosomique ayant des propriétés antimicrobiennes ont montré une grande capacité inhibitrice contre la croissance des bactéries pathogènes intestinales. Les bactériocines dérivées de *Lactobacillus salivarius* présentent une forte activité antagoniste contre les bactéries à Gram positive (Pilasombut et al, 2006).

III.4.2. Effets des probiotiques sur les réponses immunitaires

La dynamique des probiotiques liée aux réponses immunitaires évaluée par Kabir et al (2009) a démontré que la production d'anticorps était élevée chez les poulets nourris avec des probiotiques *Lactobacillus* comparativement aux poulets témoins. La modulation des réponses immunitaires par les probiotiques est également observée chez les poulets de chair exposés à des conditions de stress. L'administration de probiotiques à base de lactobacilles permet de traiter les problèmes liés au stress thermique chez les poulets de chair, ce qui s'accompagnait d'une production améliorée d'anticorps (Yong et al, 2016). En outre, l'addition de *Lactobacillus* dans le régime alimentaire des poulets de chair a révélé que les probiotiques pourraient renforcer l'immunité intestinale contre les infections entériques en augmentant la population des lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) (Dalloul et al, 2003). L'utilisation des probiotiques augmente la signalisation des récepteurs Toll-like (TLR) où TLR jouent un rôle crucial pour l'activation des cellules T dans le système immunitaire intestinal (Bai et al, 2013).

III.4.3. Effets des probiotiques sur les performances de croissance

Les effets des suppléments alimentaires probiotiques sur les performances de croissance des volailles ont été largement étudiés. La plupart des études ont indiqué que les probiotiques montraient une grande efficacité dans la promotion de la croissance des animaux. L'inclusion des lactobacilles dans la nutrition des poulets de chair entraîne une augmentation de l'indice de productivité des poulets, qui est mesurée en fonction du gain de poids quotidien, de l'efficacité alimentaire et de la mortalité (Yong et al, 2016).

IV. Le probiotique du genre *Bacillus*

IV.1. Description générale du genre *Bacillus*

IV.1.1. Caractéristiques bactériologiques

Les espèces du genre *Bacillus* sont des cellules en forme de bâtonnets à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 à 1,2 µm de diamètre et une longueur de 2,5 à 10 µm), droites ou légèrement incurvées qui peuvent être rencontrées sous forme isolée, en paires, en chaînes (qui peuvent être de grande longueur), et parfois en longs filaments. Elles sont capables de former des endospores (une seule par cellule); ces spores sont très résistantes à de nombreuses conditions défavorables (**Paul Vos et al, 2011**).

Ce sont des bacilles à coloration de Gram positive, ou à coloration de Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que pour les très jeunes cultures), mobiles grâce à une ciliature péritriche (sauf *B. anthracis* et *B. mycoides* qui sont immobiles), parfois capsulés (*B. anthracis*, *licheniformis*, *megaterium* et *subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique, et *B. megaterium* peut également former une capsule comprenant à la fois un polysaccharide et un polypeptide), aérobies ou anaérobies facultatives, mais quelques espèces sont anaérobies strictes; catalase positive pour la plupart des espèces, donnant une réponse variable au test de l'oxydase (**Paul Vos et al, 2011**).

Les espèces du genre de *Bacillus* possèdent une diversité physiologique et métabolique importante et des capacités étonnantes qui leur permettent de survivre dans des habitats extrêmes, elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalophiles, halotolérants ou halophiles. Elles sont chimio-organotrophes ou chimio-lithotrophes, certaines espèces sont prototrophes et d'autres auxotrophes exigent des facteurs de croissance (**Ben Abdallah, 2014**).

La morphologie des colonies est très variable, au sein et entre les espèces de *Bacillus*, et la composition de milieu de culture et d'autres conditions d'incubation ont une forte influence sur cette morphologie. Malgré cette diversité, cependant, les colonies de *Bacillus* sur les milieux de culture ne sont généralement pas difficiles à reconnaître (**Paul Vos et al, 2011**).

IV.1.2. Caractéristiques physiologiques

Les espèces de *Bacillus* ont une large gamme de caractères physiologiques impressionnants. Elles peuvent dégrader la plupart des substrats organiques d'origine animales ou végétales, y compris la cellulose, l'amidon, les protéines, l'agar, les hydrocarbures et autres. Elles sont des producteurs d'antibiotiques, des nitrifiantes

hétérotrophes, des dénitrifiantes, des fixateurs d'azote, des précipitateurs de fer, des oxydants de sélénium, des oxydants et réducteurs de manganèse. Ces microorganismes sont des chimiolithotrophes facultatifs, acidophiles, alcalophiles, psychrophiles, thermophiles, halotolérants, ou halophiles. A cause de cette diversité physiologique, nos connaissances sur l'écologie du *Bacillus* sont très insignifiantes (Stanley et al, 2006).

IV.1.3. Ecologie

La plupart des espèces de *Bacillus* sont saprophytes largement distribués dans le milieu naturel, mais certaines espèces sont des pathogènes opportunistes ou obligatoires pour les animaux, y compris l'homme, les autres mammifères et les insectes (telle que *B. anthracis* qui est un pathogène obligatoire pour l'homme et les animaux) (Paul Vos et al, 2011).

L'habitat principal de la plupart des espèces de *Bacillus* est le sol, mais les poussières et les aérosols de cet environnement naturel permettant la distribution de leurs endospores à une grande variété d'autres habitats ; où certaines espèces semblent être des contaminants ubiquitaires de l'homme, d'autres animaux, de leurs denrées alimentaires, de l'eau et des milieux naturels, domestiques, industriels et hospitaliers. Leur large distribution est due à la longévité extraordinaire de leurs endospores, qui montrent une grande résistance aux agents physiques et chimiques, tels que la chaleur, le froid, la dessiccation, les désinfectants, les antibiotiques et autres agents toxiques (Paul Vos et al, 2011).

IV.1.4. Taxonomie

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*, ordre des *Bacillales*, classe des *Bacilli*, et phylum des *Firmicutes*.

Ce genre occupe une place importante dans l'histoire de la bactériologie. Ehrenberg a décrit *Vibrio subtilis* en 1835, et « subtilis » est l'une des premières espèces bactériennes toujours en cours d'utilisation. En 1872, Cohn l'a renommé *Bacillus subtilis*, et à côté de laquelle il a établi deux autres espèces « *Bacillus anthracis* et *Bacillus ulna* » (Paul Vos et al, 2011).

Depuis la création du genre *Bacillus*, le nombre d'espèces n'a pas cessé de varier. De nombreuses espèces initialement décrites comme *Bacillus* ont été transférées à des genres apparents. Néanmoins, le genre *Bacillus* est toujours considéré comme l'un des plus grands genres et comprend plus de 200 espèces (figure 2) (Ben Abdallah, 2014).

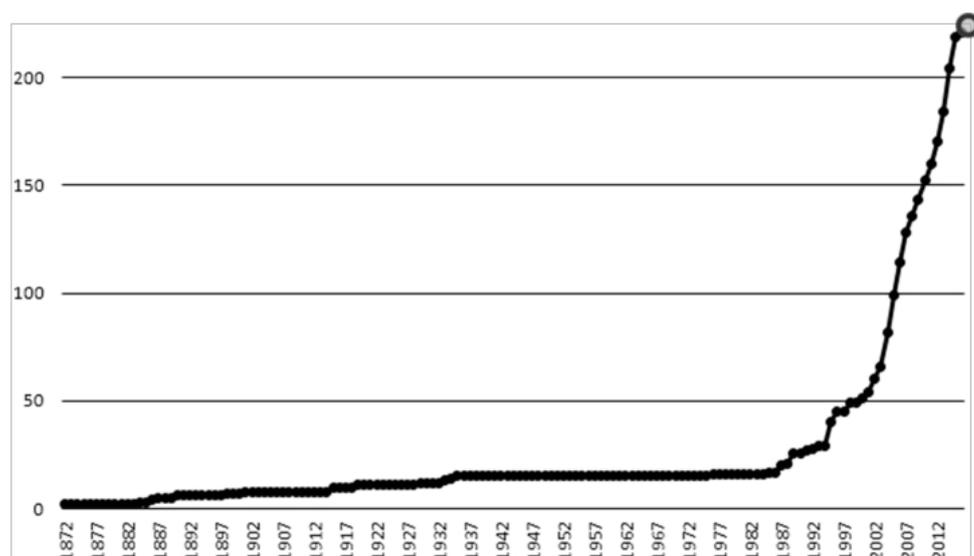


Figure 2 : L'évolution du nombre d'espèces de *Bacillus* à travers les années (Cadoret et al, 2017).

Le genre *Bacillus* est un genre bactérien particulièrement hétérogène. L'hétérogénéité extrême du genre est reflétée par la grande variété de places écologiques que les nombreuses espèces occupent, et par l'extrême diversité de leurs statuts taxonomiques (Dromigny, 2008).

La classification taxonomique des bactéries du genre *Bacillus* a été auparavant basée sur leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques ainsi que leur capacité à sporuler alors qu'aujourd'hui la classification se base sur l'analyse comparative des séquences de base de L'ARNr 16S (Ben Abdallah, 2014).

Anciennement, le genre *Bacillus* était divisé en trois grands groupes, selon la morphologie de la spore et du sporange comme le montre le tableau 4 (Dromigny, 2008).

Tableau 4 : Classification morphologique du genre *Bacillus*.

Groupes		Espèces	Caractéristiques
Groupe I	➤ Sous-groupe A	<i>B.anthraxis</i> , <i>B.cereus</i> , <i>B.myoides</i> , <i>B.megaterium</i> , et <i>B.thuringiensis</i> .	Bactéries à grandes cellules avec une largeur supérieure ou égale à 1µm. Bacilles à coloration de Gram positif. Production des spores ellipsoïdes ou cylindriques. Spores centrales ou terminales, qui ne dilatent

			pas les sporanges.
	➤ Sous-groupe B	<i>B.subtilis</i> , <i>B.pumilis</i> , <i>B.licheniformis</i> , <i>B.coagulans</i> , et <i>B.firmus</i> .	Bactéries à petites cellules (diamètre inférieur à 1µm)
Groupe II		<i>B.alvei</i> , <i>B.brevis</i> , <i>B.circulans</i> , <i>B.larvae</i> , <i>B.lentimorbus</i> , <i>B.macerans</i> , <i>B.polymyxa</i> , <i>B.popillae</i> et <i>B.stearothermophilus</i> .	Elles sont à coloration de Gram variable, et ont des sporanges gonflés avec des spores ellipsoïdes centrales ou terminales.
Groupe III		<i>B.sphaericus</i> , <i>B.globisporus</i> et <i>B.insolitus</i> .	Elles sont des espèces hétérogènes à coloration de Gram variable. Les sporanges sont gonflés, avec des spores sphériques terminales ou subterminales.

Au cours des dernières années, il y a eu un développement taxonomique où le genre *Bacillus* était divisé en deux groupes d'organismes usuellement appelés le groupe *B. subtilis* et le groupe *B. cereus* :

- ✓ Le groupe *Bacillus cereus* comprend *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* et *B. weihenstephanensis*. Ce groupe se distingue facilement des autres membres des bactéries aérobies formant des endospores, mais il est difficile de les distinguer les uns des autres. Les cellules de ces organismes sont plus larges que 1µm, les sporanges ne sont pas gonflés et les spores sont ellipsoïdales. Généralement, ils sont mésophiles et neutrophiles.
- ✓ Le groupe *Bacillus subtilis* qui comprend *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. clausii*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. sonorensis*, *B. firmus*, *B. lentus* et *B. sporothermodurans*.

Le groupe *B. subtilis* est étroitement apparenté et ne se distingue pas facilement. Les cellules de ces organismes ont une largeur inférieure à 1µm, les sporanges ne sont pas gonflés et les spores sont ellipsoïdales. Ils sont en général mésophiles et neutrophiles, alors que souvent tolérants à des niveaux de pH plus élevés (**UK Standards for Microbiology Investigations, 2015**).

IV.2. *Bacillus* en tant que probiotique en aviculture

La valeur des bactéries lactiques pour le maintien de la santé humaine et animale a été reconnu à la fois scientifiquement en termes de données de recherche publiées et commercialement sous la forme de produits probiotiques. Mais, en comparaison avec ces bactéries lactiques, les bactéries sporulées n'ont pas acquis une grande popularité, en particulier en termes d'intérêt pour la recherche (Elshagabee et al, 2017). Actuellement, les spores de *Bacillus* sont largement utilisées comme probiotiques chez l'homme et les animaux. L'administration de spores en tant qu'additifs alimentaires par opposition aux cellules végétatives offre un certain nombre d'avantages évidents. Ceux-ci incluent le faible coût de production, la facilité de préparation, la résistance aux processus de production et la durée de conservation prolongée sur une large gamme de températures (Teresa et al, 2005).

L'utilisation des souches de *Bacillus* probiotiques dans l'industrie de la volaille a été largement décrite dans la prévention de plusieurs maladies causées par différents pathogènes aviaires. Des études ont montré que les spores d'une souche de *Bacillus subtilis* de laboratoire, administrées à des poussins d'un jour, ont entraîné une réduction significative de la colonisation par *E. coli* O78: K80 du cæcum et des organes profonds (La Ragione et al, 2001). Cependant certains chercheurs ont pensé que les probiotiques animaux devraient préférentiellement provenir de la microflore animale cible, car leur utilisation serait éthiquement plus acceptable et potentiellement plus efficace que les souches exogènes (Teresa et al, 2005). L'inclusion des spores de *Bacillus* dans les régimes alimentaires de volailles provoque la réduction de la prolifération de *Salmonella Typhimurium*, *Clostridium perfringens* et *Campylobacter jejuni* dans le tractus gastro-intestinal grâce à la production de composés antimicrobiens ou par l'exclusion compétitive.

Outre la capacité antimicrobienne contre les agents pathogènes, les spores de *Bacillus* ont la capacité de germer dans le tractus gastro-intestinal de différentes espèces animales, y compris les poulets, ces spores deviennent métaboliquement actives *in vivo*, conférant de nombreux avantages nutritionnels, y compris la production d'enzymes extracellulaires, telles que l'amylase, la protéase, la lipase, la cellulase, la xylanase, la phytase et la kératinase, qui peuvent aider à dégrader les facteurs antinutritionnels complexes dans les régimes avicoles et améliorer l'absorption des nutriments (Latorre et al, 2016).

L'administration de probiotique *B.coagulans* NJ0516 dans des aliments avec une certaine concentration présente un effet favorisant la croissance et augmente les activités de la protéase et de l'amylase (Wang et al, 2010).

Toutes les caractéristiques mentionnées précédemment soutiennent l'utilisation de spores de *Bacillus spp* comme une alternative possible aux antibiotiques promoteurs de croissance, en améliorant les performances de croissance par la production d'enzymes et en maintenant un état de santé optimal par la synthèse de composés antimicrobiens (**Latorre et al, 2016**).

IV.2.1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est une bactérie probiotique largement utilisée dans les régimes alimentaires des animaux. L'administration orale de *B. subtilis* peut exercer une gamme d'effets bénéfiques, y compris l'amélioration de la croissance, l'optimisation de l'équilibre du microbiote intestinal, la prévention et le traitement de certaines maladies diarrhéiques et l'amélioration des caractéristiques de la viande. Pour ces raisons, *B. subtilis* a attiré une attention considérable en tant que complément alimentaire potentiellement bénéfique pour la santé animale (**Jiajun Yang et al, 2016**). Il a été rapporté que *B. subtilis* réduisait les signes cliniques des maladies entériques, telles que la salmonellose ou l'entérite nécrotique, en augmentant l'immunité innée chez les poulets de chair. De nombreuses études ont été montrées que les régimes alimentaires supplémentés de *B. subtilis*, destinés aux volailles, conduisent à une réduction du *Clostridium* et des coliformes dans le tractus digestif de l'hôte (**Mengjiao et al, 2017**).

De plus, les spores de *B. subtilis* sont capables de créer un environnement anaérobie dans l'intestin après leur germination, ce qui favorise la croissance et la prolifération des lactobacilles, et par conséquent entraîne une inhibition de la prolifération des bactéries pathogènes par une exclusion compétitive ou par la production d'acide lactique (**Jeong et al, 2014**). Ainsi que, *B. subtilis* est capable de produire des bactériocines, telles que subtilin et subtilosin (**Indu et al, 2016**).

IV.2.2. *Bacillus licheniformis*

Ce microorganisme est considéré comme l'une des bactéries les plus bénéfiques pour la santé car elle a démontré un effet positif sur la digestion et l'absorption des nutriments dans le corps de l'hôte. Cette bactérie a été largement utilisée chez les animaux d'élevage en tant que promoteur de croissance et agent d'exclusion compétitif. *B. licheniformis* et *B. subtilis* sont souvent utilisés ensemble dans deux produits, Biosporin et BioPlus 2B. BioPlus 2B est utilisé dans l'alimentation animale tandis que Biosporin est autorisé comme médicament.

BioPlus 2B a été étudié par de nombreux chercheurs concernant son efficacité dans la suppression des pathogènes gastro-intestinaux (**Xiaolu et al, 2012**).

Des études ont montrés que le supplément de *B. licheniformis* pourrait améliorer l'état de santé des poulets souffrant de l'entérite nécrotique. La raison de ceci peut être que le *B. licheniformis* peut améliorer la capacité de la barrière intestinale, ce qui peut empêcher les endotoxines et les agents pathogènes de passer à travers la muqueuse intestinale dans le sang. Cela peut améliorer la croissance des organes immunitaires, activer les lymphocytes, augmenter le niveau d'immunoglobuline, et améliorer l'immunité cellulaire et l'immunité humorale (**Shuai Xu et al, 2018**). De plus, Les autres recherches ont montré que l'ajout de *B. licheniformis* à l'eau de boisson pouvait améliorer les performances de croissance des poulets (**Xiaolu et al, 2012**). Ceci peut être expliqué par la capacité de *B. licheniformis* de produire différentes enzymes, telles que la lipase, la protéase et l'amylase, ce qui pourrait augmenter la capacité de digestion et d'absorption des nutriments chez poulets (**Shuai Xu et al, 2018**).

IV.2.3. *Bacillus coagulans*

Bacillus coagulans montre à la fois les caractéristiques des *Bacillaceae* et des *Lactobacillaceae*. Ceci avec l'hétérogénéité phénotypique de cette espèce, a rendu difficile de définir sa position taxonomique vis-à-vis de ces deux familles. La souche I4 de *Bacillus coagulans* produit la coagulin plasmidique et la lactosporin qui ont une activité antimicrobienne contre les micro-organismes pathogènes (**Indu et al, 2016**).

B. coagulans permet de modifier l'écologie microbienne du tractus gastro-intestinal en augmentant la quantité de microorganismes bénéfiques et en réduisant les agents pathogènes ; elle favorise la croissance en augmentant la digestibilité des aliments par la production des enzymes comme la protéase, l' α -amylase, xylanase, et lipase, et elle est capable aussi de produire des acides aminés et des vitamines. De plus, l'administration de *B. coagulans* renforce les réponses immunitaires et réduit l'inflammation intestinale. Des études in vivo indiquent également que *B. coagulans* présente une activité antimicrobienne, antivirale et antioxydante en modulant les cytokines, en inhibant les espèces réactives de l'oxygène et en améliorant la phagocytose. Des études in vitro ont aussi montrés que *B. coagulans* est capable de produire de la bactériocine, des substances analogues à la bactériocine (coagulin) et des acides L-lactiques avec une large activité contre diverses souches de *Salmonella*, de coliformes, de *Listeria monocytogenes* et de *Clostridium* (**Yuanyuan et al, 2018**). L'administration des aliments supplémentés de *B. coagulans* est efficace pour prévenir

l'apparition de l'entérite nécrotique et réduire la sévérité de cette maladie induite par *C. perfringens* chez les poulets de chair (Yuanyuan et al 2018).

Chapitre II : Matériels et méthodes

I. Prélèvement et échantillonnage :

Les prélèvements ont été effectués à partir de huit poulets de chair de différents sexes et races:

- ✓ Quatre poulets sains, et deux poulets malades de race Cobb 500 âgées de 40 jours et élevés dans différents bâtiments de la région d'Ain Temouchent
- ✓ Deux poulets d'élevage domestique, qui n'ont jamais été alimentés par un aliment supplémenté de facteurs de croissance (antibiotiques), et ayant jamais subi un traitement par des médicaments vétérinaires.

Les étapes de prélèvement ont été réalisées avec un matériel stérile et dans un endroit propre. Après l'abattage, la peau des poulets a été nettoyée par le produit désinfectant Mefisto® pour limiter la contamination par les microorganismes de la peau et des plumes. Après passage par l'autopsie, l'appareil digestif de chaque poulet a été ensuite isolé aseptiquement.

Les différents segments de l'appareil digestif (le jabot, le proventricule, le gésier, le duodénum, le jéjunum, l'iléon, et les caeca) ont été incisés longitudinalement par un ciseau stérile entièrement métallique pour prélever leur contenu en mucus, et mis directement dans des tubes contenant 9ml d'eau physiologique. Une série de dilutions jusqu'à 10^{-3} a été ensuite effectuée à partir des solutions mères de chaque segment de l'appareil digestif.

II. Isolement des bactéries du genre *Bacillus* :

Cette étude a pour but d'isoler les espèces bactériennes appartenant au genre *Bacillus*, pour cela, les échantillons préparés ont été soumis à un traitement thermique sélectif dans un bain marie à 80°C pendant 10min, ce qui permet de tuer les formes végétatives et l'isolement sélectif des formes sporulées.

0.1ml de chaque échantillon a été ensemencé sur la surface d'une gélose nutritive à l'aide d'un râteau en verre stérile. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24 à 48h.

III. Purification des isolats:

Après 48h d'incubation, différentes formes de colonies ont été obtenues, la purification des souches se base sur l'observation macroscopique des colonies (forme, taille, couleur) et l'examen microscopique des colonies (coloration de Gram).

32 grosses colonies qui ont présenté une forme bacillaire et une coloration de Gram positive sont retenues et repiquées sur gélose nutritive. L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

IV. Conservation des isolats :

La conservation des souches pures a été effectuée sur gélose nutritive inclinée. Après un repiquage et une incubation de 24h à 37°C, les tubes ont été conservés à +4°C.

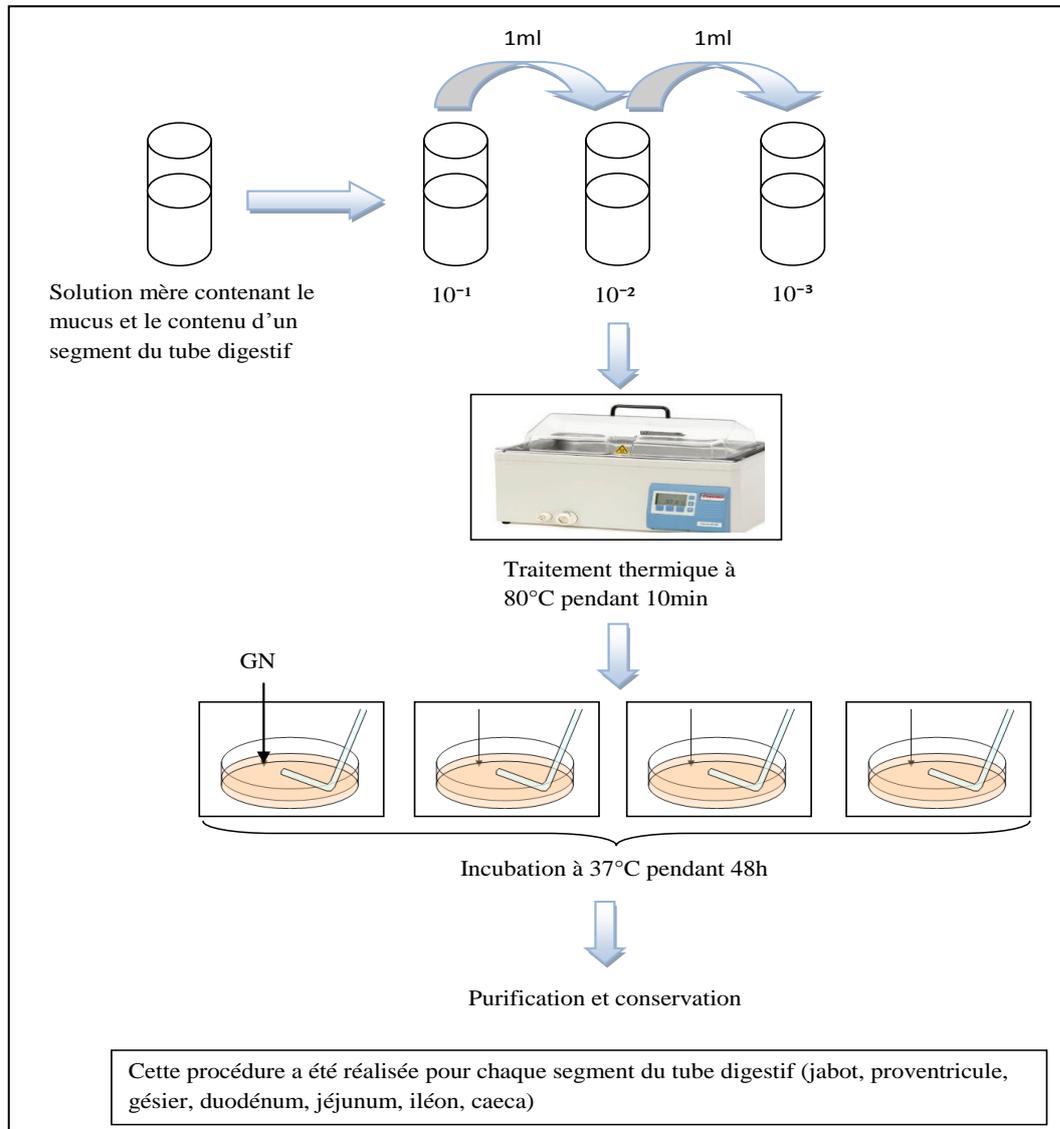


Figure 3 : Protocole d'isolement des souches de *Bacillus* à partir du tube digestif de poulet.

V. Criblage des souches à effet probiotique :

Afin de sélectionner des souches à caractères probiotiques, plusieurs critères de sélection ont été étudiés sur les 32 isolats:

- ✓ L'activité enzymatique
- ✓ La sensibilité aux antibiotiques
- ✓ La capacité à inhiber des agents potentiellement pathogènes isolés du tube digestif de poulets de chair malades (*Escherichia coli*)

- ✓ La tolérance aux conditions du tractus gastro-intestinal (la tolérance à l'acidité et aux sels biliaires).

V.1. Etude de l'activité enzymatique des isolats :

V.1.1. Activité amylolytique :

La mise en évidence de la présence des amylases a été réalisée sur gélose nutritive additionnée de 1% d'amidon (annexe 1).

Sur la gélose à l'amidon, des spots de différentes souches ont été déposées, la boîte est incubée pendant 24h à 37°C.

La présence d'une zone claire autour la colonie sur un fond bleu foncé après inondation de la boîte de pétri par le Lugol (solution iodo-iodurée) pendant 5 minutes puis rinçage avec de l'eau physiologique ; indique l'hydrolyse de l'amidon par les enzymes amylases (**Delarras, 2014**).

V.1.2. Activité protéolytique :

L'évaluation de l'activité protéolytique a été réalisée sur gélose au lait à 5% (annexe 1). Les souches ont été ensemencées en une seule strie puis incubées à 37°C pendant 24 à 72h. Les zones claires autour les stries indiquent la dégradation de la protéine du lait (caséine), ce qui classe les souches comme protéase positive (**Cheriet et al, 2016**).

V.1.3. Activité cellulolytique:

La mise en évidence de l'enzyme cellulase a été effectuée sur deux milieux additionnés de cellulose.

- Une gélose à la cellulose qui a été ensemencée avec le même protocole que la gélose à l'amidon. Après 24 à 48h d'incubation à 37°C, la lecture des résultats a été effectuée en inondant la surface de la gélose avec du Lugol (solution iodo-iodurée). La présence d'une zone claire autour la colonie indique la dégradation de la cellulose (cellulase⁺), alors que les zones contenant la cellulose se colorent en bleue (cellulase⁻).
- Un bouillon contenant la cellulose a été également ensemencée et incubé à 37°C pendant 24 à 48h, l'apparition d'un précipité rouge brique après l'ajout de liqueur de Fehling puis un chauffage, indique la présence du glucose résultant de la dégradation de la cellulose et l'intervention des trois enzymes cellulolytiques, Endo et Exo cellulase et le Cellobiase (β -galactosidase).

V.1.4. Activité lipolytique :

➤ Recherche des lipases:

La recherche des lipases a été réalisée sur un milieu gélosé contenant Tween 80 (annexe 1). Les souches ont été ensemencées en spot puis incubées à 37°C pendant 24 à 72h. Un résultat lipase positif se traduit par l'apparition des précipitations blanches de cristaux de sel calcique autour les colonies provenant de l'acide laurique libéré par l'enzyme lipase révélant la dégradation du monolaurate de sorbitane (Tween-80) (Rihani, 2012).

➤ Recherche de lécithinases et des lipo-protéinases:

Ces enzymes ont été recherchées sur la gélose au jaune d'œuf à 10% (annexe 1). Les souches sélectionnées comme des probiotiques ont été ensemencées en spot sur le milieu et incubées à 37°C pendant 24 à 72h. L'apparition d'un halo opaque blanc, à bord net, autour de la colonie indique une activité lécithinase positive, alors que l'halo transparent provient des enzymes lipo-protéinases (Delarras, 2014).

V.2. Etude de l'activité antimicrobienne des isolats Contre *Escherichia coli* :

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne est basée sur la diffusion des molécules antimicrobiennes sur un milieu de culture gélosé en inhibant la croissance des souches indicatrices sensibles. Huit souches choisies ont été testées pour leur pouvoir antimicrobien contre *Escherichia coli*. Ce test a été réalisé selon deux méthodes :

- Une suspension bactérienne d'*Escherichia coli*, préparée par ajustement de la densité optique à 0,08 - 0,1 par un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 625 Nm, a été ensemencée en surface sur une gélose Mueller-Hinton.

Les pré-cultures des souches probiotiques ont été ensemencées en spots sur la gélose Mueller-Hinton préparée. Après 24h d'incubation à 37°C, la présence des zones claires autour les colonies probiotiques indique l'inhibition de la souche d'*Escherichia coli*.

- Une centrifugation à 10000tr/min pendant 15 mn des cultures des souches sélectionnées comme probiotiques a été réalisée,

L'activité antimicrobienne du surnageant ainsi que de la culture complet a été testée par cette méthode de diffusion dans les puits.

Des puits de 5mm de diamètre ont été creusés aseptiquement par le bout d'une pipette Pasteur stérile sur une gélose Muller-Hinton inoculée par la souche d'*Escherichia coli*. 50µL du surnageant ou de la culture complet a été déposée dans les puits. Après 24h

d'incubation à 37°C, l'apparition des zones claires autour les puits indique l'inhibition de la souche d'*Escherichia coli*.

V.3. Etude de sensibilité aux antibiotiques :

Huit antibiotiques vétérinaires commerciaux ont été testés par la méthode de diffusion sur gélose. 50µl de chaque antibiotique a été préparées à des concentrations similaires à celles contenues sur les disques, les résultats sont mentionnés sur le tableau 5,

Les souches à tester ont été cultivées pendant 18h dans un bouillon nutritif. La densité optique de chaque culture a été ajustée entre 0,08 et 0,1. Les souches ont été ensuiteensemencées par écouvillonnage sur gélose Muller-Hinton. Des puits de 5mm de diamètre ont été creusés aseptiquement à l'aide de pipette Pasteur. Les puits ont été ensuite remplis par 50µL de chaque solution d'antibiotiques préparés précédemment. Après 24h d'incubation à 37°C, les diamètres d'inhibition autour les puits ont été observés et mesurés

Tableau 5 : Liste des antibiotiques testés.

Produits vétérinaires commerciaux	Molécule antibiotique	Abréviation	Concentration par 50µl
BIOAMOXI 50%	Amoxicilline	AMX	25µg
DOXYVETo 50%	Doxycycline	DOX	34 µg
AVITRYL 10%	Enrofloxacin	ENR	30 µg
Erythromycin 20%	Erythromycine	ERY	15 µg
FLORUM 10%	Florfenicol	FLOR	5 µg
Oxytetracycline Injection 200 mg/ml	Oxytétracycline	OTC	30 µg
AVÉMIX n° 150	Sulfamide	SUL	30 µg
TYLOSINA	Tylosine	TYL	200µg

V.4. Tolérance aux conditions du tractus gastro-intestinal :

V.4.1. Tolérance à l'acidité :

La tolérance des isolats à l'acidité du tractus digestif a été évaluée sur des milieux gélosés à différents pH : pH 2, pH 3,5, pH 5, et pH 6.

Des géloses nutritives ajustées à **pH 5** et à **pH 6** ont étéensemencées en surface par les bactéries sélectionnées comme des probiotiques,

Les tests aux **pH 2** et **3.5** ont été effectués dans des bouillons nutritifs pour éviter la dénaturation de l'agar par l'acidité. Ces bouillons de différents pH ont étéensemencés par 100µL des pré-cultures bactériennes préparées précédemment. L'incubation des boites et des tubes a été effectuée à 37°C pendant 24h.

V.4.2. Tolérance aux sels biliaires :

Parmi les contraintes que les probiotiques doivent surmonter, c'est la résistance à la bile. Pour tester cette caractéristique, des géloses nutritives contenant différentes concentrations de la bile (**0.5, 1.5, 2.5, 4 et 5%**) ont étéensemencées en surface par des cultures bactériennes de 18h. les boites ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

VI. Identification des isolats à caractères probiotiques :

Les critères de sélection, préalablement étudiées, nous ont permis de sélectionner 5 isolats à caractères probiotiques qui ont été soumis à d'autres tests afin de les identifier.

VI.1. Etude des caractères morphologiques :

VI.1.1. Etude macroscopique :

L'aspect macroscopique des colonies (taille, forme, couleur) a été déterminé après 24h d'incubation à 37°C sur gélose nutritive.

VI.1.2. Etude microscopique :

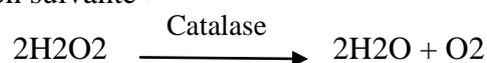
➤ Coloration de Gram :

Cette coloration permet de différencier deux groupes de bactéries (Gram⁺ et Gram⁻) selon la structure chimique des parois cellulaires bactériennes.

VI.2. Etude des caractères biochimiques :

VI.2.1. Test de catalase :

La catalase est une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



La présence de la catalase a été mise en évidence en dissociant à l'aide d'une pipette pasteur une colonie de la culture sur une lame contenant une goutte d'eau oxygénée. La présence

d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène moléculaire (Delarras, 2014).

VI.2.2. Test de tolérance à la salinité :

L'évaluation de la tolérance des souches à la salinité a été effectuée sur gélose nutritive contenant différentes concentrations en NaCl (2, 3.5, 5 et 7.5%). Ces milieux ont étéensemencés en surface par des cultures bactériennes de 18h. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24 heures.

VI.2.3. Test d'hémolyse :

L'effet hémolytique des souches isolées a été étudié sur gélose nutritive additionnée de 5% de sang frais. L'ensemencement de la gélose au sang a été effectué par spots, et la lecture des résultats est réalisée après 48 heures d'incubation à 37°C. Les résultats ont été interprétés comme suit:

- ✓ **Hémolyse β ou complète** : les colonies sont entourées d'une zone claire et incolore (les globules rouges sont lysés et l'hémoglobine dégradée en un composé incolore).
- ✓ **Hémolyse α ou partielle** : l'hémoglobine est réduite en méthémoglobine et il y a alors une apparition des colonies verdâtres.
- ✓ **Hémolyse γ** : absence d'hémolyse.

VI.2.4. Identification des isolats par la galerie API 20E :

La galerie API 20E composée de 20 microtubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratées a été utilisée selon les recommandations décrite par Biomerieux, France (Annexe 2). Les microtubes de la galerie API 20E ont été inoculés avec une suspension bactérienne, puis incubées à 37°C pendant 24 h. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions a été réalisée à l'aide du Tableau de Lecture (Annexe 2).



Figure 4 : L'aspect de la galerie API20E avant l'inoculation de la souche bactérienne.

Chapitre III: Résultats

I. Isolement des souches de *Bacillus* :

Les souches étudiées dans ce travail sont d'origine de l'appareil digestif des poulets, dont le but est de rechercher des microorganismes du genre *Bacillus* à effet probiotique à partir de Trois types de poulets : poulets de chair sains et malades, et poulets domestiques.

Une sélection thermique à 80°C pendant 10min des différents prélèvements a permis d'isoler 66 souches à différents caractères, les solutions mères et les dilutions décimales ont étéensemencées sur une gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 48 heures. Des colonies à différents aspect macroscopique sont apparues (**Tableau 6, Tableau 7 et Tableau 8**), et coloration de Gram a permis de sélectionner et purifier que les bacilles à Gram positive.

Tableau 6 : L'aspect macroscopique des souches isolées à partir des poulets de chair malades

Organes	Souches	Aspect des colonies					
		Taille	Forme	Relief	Surface	Opacité	Couleur
Jabot	S1	3mm	Ronde	Bombé	Lisse	Opaque	Blanche
	S2	2mm	Ronde	Convexe	Lisse	Opaque avec un centre translucide	Blanche avec un centre clair
Proventricule	S3	1cm	Irrégulier (dentelé)	plate	lisse	Opaque	Blanche
	S4	6mm	Ronde	Convexe avec un creux	Lisse	Opaque	Blanche
	S5	2mm	Ronde	Convexe	Lisse	Transparente	
Gésier	S6	1mm	Ronde	Convexe	Lisse	Opaque	Blanche
	S7	2mm	Ronde	Convexe	Lisse	Opaque	Beige
	S8	6mm	Ronde	Plate	Lisse	Opaque	Beige
Duodénum	S9	5mm	Irrégulier	Plate	Rugueuse	Opaque	Jaune
	S10	4mm	Ovoïde	Bombé	Lisse	Opaque	Blanche
Jéjunum	S11	3mm	Irrégulier	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S12	2mm	Ronde	Convexe	Rugueuse	Transparente	
	S13	1cm	Ronde	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S14	2mm	Ronde	Plate	Lisse	Transparente	
Iléon	S15	5mm	Irrégulier	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S16	3mm	Ronde	Convexe	Rugueuse	Opaque	Blanche
	S17	8mm	Irrégulier	Plate	Lisse	Translucide avec un centre opaque	Blanche
	S18	3mm	Ronde	Convexe	Lisse	Translucide	Blanche
Caeca	S19	<1mm	Ronde	Bombé	Lisse	Translucide	Jaune
	S20	2mm	Ronde	Bombé	Lisse	Opaque	Blanche

Tableau 7 : L'aspect macroscopique des souches isolées à partir des poulets de chair domestiques

Organes	Souches	Aspect des colonies					
		Taille	Forme	Relief	Surface	Opacité	Couleur
Jabot	S1	13mm	Irrégulier	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S2	2mm	Ronde	Bombé	Lisse	Opaque	Blanche
Proventricule	S3	5mm	Ronde	Plate	Lisse	Opaque	Beige
	S4	2mm	Ronde	Bombé	Lisse	translucide	Blanche
Gésier	S5	1mm	Ronde	Bombé	Lisse	Opaque	Beige
	S6	6mm	Ronde	Plate	Lisse	Opaque	Beige
Duodénum	S7	2mm	Ronde	Bombé	Lisse	Opaque	Blanche
	S8	2mm	Ronde	Convexe	Lisse	Opaque	Beige
Jéjunum	S9	4mm	Ronde	Plate	Lisse	Opaque	Beige
Iléon	S10	1mm	Irrégulier	convexe	Rugueuse	Opaque	Jaune
	S11		Envahissante	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S12	6mm	Régulier	Plate	Lisse	Opaque	Beige
Caeca	S13	6mm	Irrégulier	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S14		Envahissante	Plate	Lisse	Opaque avec une périphérie translucide	Blanche
	S15	3mm	Ronde	Plate	Lisse	Transparente	
	S16	4mm	Ronde	Plate	Lisse	Opaque	Beige
	S17	2mm	Ronde	Convexe	Lisse	Opaque	Beige

Tableau 8 : L'aspect macroscopique des souches isolées à partir des poulets de chair sains

Organes	Souches	Aspect des colonies					
		Taille	Forme	Relief	Surface	Opacité	Couleur
Jabot	S1		Filamenteuse	Plate avec un centre bombé	Rugueuse	Opaque	Blanche
	S2	5mm	Ronde	Convexe	Lisse	Opaque	Blanche
	S3	3mm	Ronde	Plate	Lisse	Transparente	
	S4	8mm	Irrégulier	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S5	1mm	Ronde	Bombé	Lisse	Opaque	Blanche
Proventricule	S6		Filamenteuse	Plate avec un centre bombé	Rugueuse	Opaque	Blanche
	S7	15mm	Irrégulier	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S8	2mm	Ronde	Convexe	Lisse	Opaque	Blanche
	S9	<1mm	Ronde	Plate	Lisse	Transparente	
Gésier	S10		Filamenteuse	Plate	Rugueuse	Opaque	Blanche
	S11	1cm	Irrégulier	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S12		Envahissante	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S13	2mm	Ronde	Convexe	Lisse	Translucide	Blanche
	S14	6mm	Ronde	Plate	Lisse	Opaque	Blanche

	S15	3mm	Ronde	Convexe	Lisse	Opaque	Beige
	S16	14mm	Irrégulier	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S17	2mm	Ronde	Bombé	Lisse	Opaque	Jaune
Duodénum	S18	1cm	Irrégulier	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S19		Filamenteuse	Plate avec un centre bombé	Rugueuse	Opaque	Blanche
	S20	3mm	Ronde	Plate	Lisse	Translucide	Beige
	S21	6mm	Ronde	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S22	6mm	Irrégulier	Convexe	Rugueuse	Opaque	Blanche
Jéjunum	S23	2mm	Ronde	Convexe	Lisse	Translucide	Beige
	S24		Envahissante	Plate	Lisse	Opaque	Blanche
	S25		Filamenteuse	Plate	Rugueuse	Opaque	Blanche
Iléon	S26	2mm	Ronde	Bombé	Lisse	Opaque	Blanche
Caeca	S27	2mm	Ronde	Plate	Lisse	Translucide	Beige
	S28		Filamenteuse	Plate avec un centre bombé	Rugueuse	Opaque	Blanche
	S29	2cm	Ronde	Plate	Lisse	Transparente	

NB : les souches en couleur rouge sont les souches qui ont été purifiées

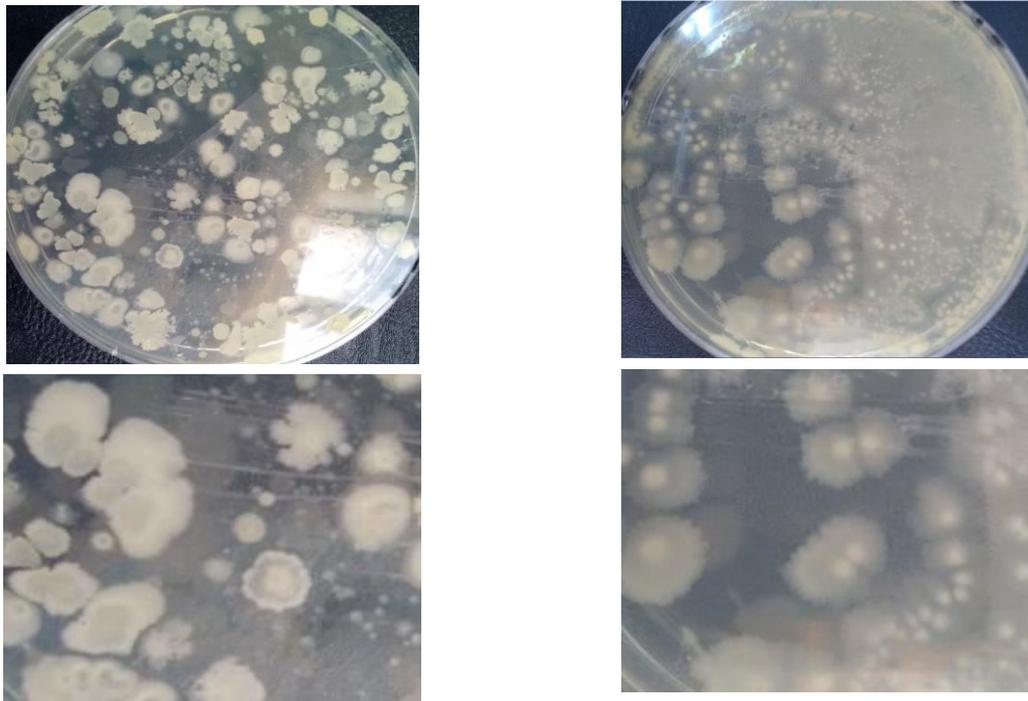


Figure 5 : Aspect macroscopique de quelques colonies après 48h d'incubation à 37°C sur gélose nutritive.

II. Purification des isolats :

Après l'observation macroscopique des colonies, une coloration de Gram a été effectuée pour sélectionner et purifier les bactéries qui ont une forme bâtonnet Gram positif (**Figure 6**). Sur 66 souches isolées, 32 ont présenté ces deux caractéristiques microscopiques, et qui ont subi ensuite un criblage pour sélectionner les souches probiotiques les plus performantes.

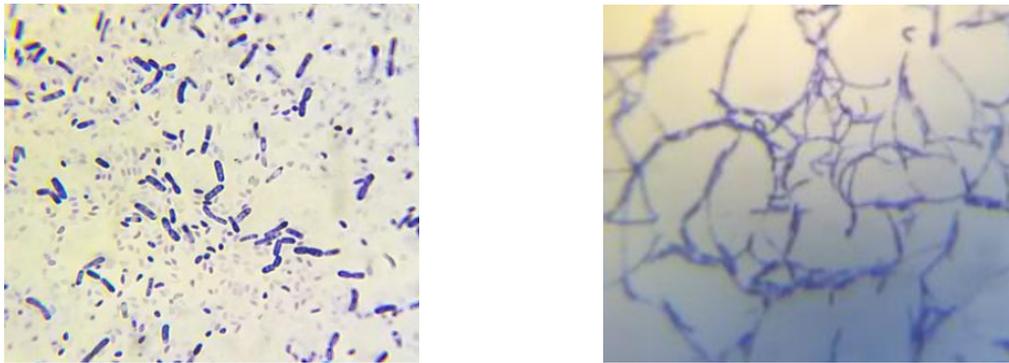


Figure 6 : Aspect microscopique après coloration de Gram (Gx1000).

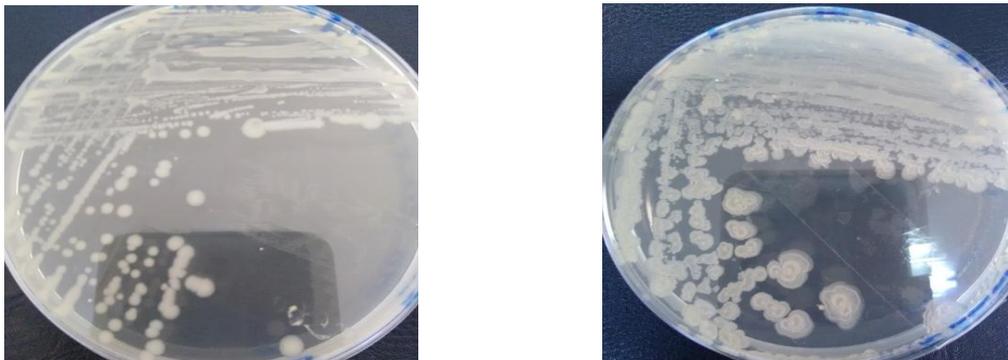


Figure 7 : Aspect macroscopique des isolats purs sur gélose nutritive après 24h d'incubation à 37°C.

III. Criblage des souches à caractères probiotiques :

III.1. Etude de l'activité enzymatique:

L'activité enzymatique extracellulaire a été détectée chez tous les isolats étudiés (**Tableau 9**) (**Figure 8**), avec un fort potentiel chez les souches S1, S3, S15, et S25 qui sont capables de produire toutes les enzymes hydrolytiques à l'exception de lipase. Ce dernier a été observé uniquement chez 7 souches sur 32.

Tableau 9 : Résultat de l'activité enzymatique des 32 isolats étudiés.

Souches	Amylase	Protéase	Lipase	Cellulase		Lécithénase	Lipoprotéinase
				Bouillon	Gélose		
S1	+ (7mm)	+	-	+	+ (16mm)	+	+ forte potentiel
S2	+ (10mm)	+	-	-	-	+	+ forte potentiel
S3	+ (5mm)	+	-	+	+ (7mm)	+	+ forte potentiel
S4	+ (11mm)	+	-	-	-	+	+ forte potentiel
S5	-	+	-	+	+ (8mm)	+	-
S6	-	+	-	+	+ (10mm)	+	-
S7	-	+	+	-	-	+	-
S8	-	+	-	+	+ (9mm)	+	-
S9	-	+	-	+	+ (7mm)	+	-
S10	+ (7mm)	+	-	+	+ (7mm)	-	-
S11	+ (6mm)	+	-	+	+ (4mm)	-	-
S12	+ (5mm)	+	-	+	+ (15mm)	+	-
S13	-	+	+	-	-	-	-
S14	-	+	-	-	-	+	-
S15	+ (8mm)	+	-	+	+ (14mm)	+	+ faible potentiel
S16	+ (14mm)	+	+	+	+ (14mm)	+	-
S17	-	+	-	-	-	+	-
S18	-	+	-	-	-	-	-
S19	-	+	-	-	-	+	+ forte potentiel
S20	-	+	-	-	-	-	-
S21	-	-	-	-	-	-	-
S22	-	+	-	-	-	-	-
S23	-	+	-	-	-	-	-
S24	-	-	-	-	-	-	-
S25	+ (3mm)	+	-	+	+ (7mm)	+	+ forte potentiel
S26	-	+	-	-	-	+	-
S27	-	+	+	-	-	-	-
S28	-	+	+	-	-	-	-
S29	-	+	-	+	+ (9mm)	+	+ forte potentiel
S30	+ (4mm)	+	-	-	-	+	+ faible potentiel
S31	+ (4mm)	+	+	-	-	+	-
S32	-	-	+	-	-	+	-

S : Souche + : Résultat positif - : Résultat négatif mm : Diamètre des zones
d'hydrolyse mesurée en mm

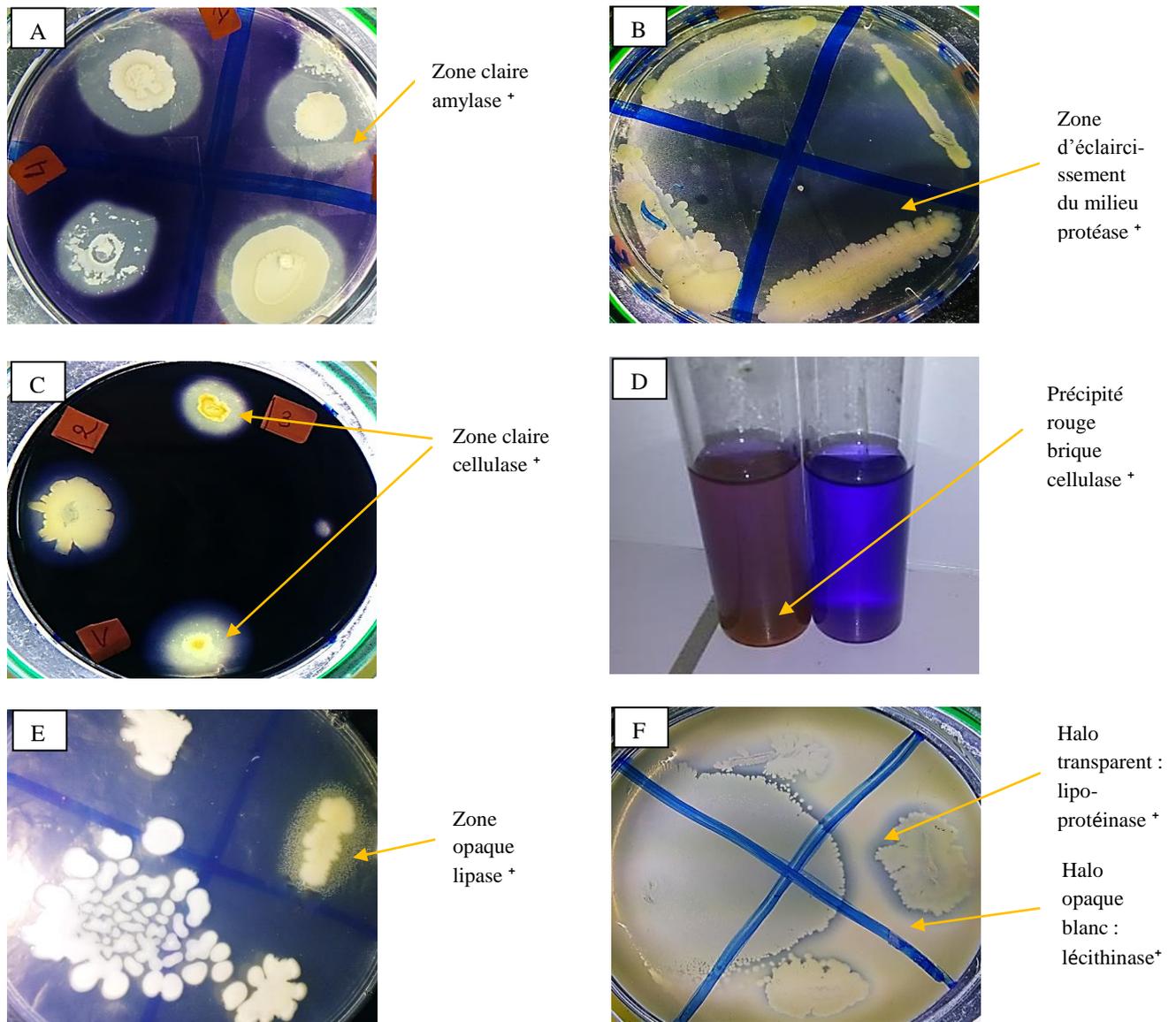


Figure 8 : Activité enzymatique de quelques isolats.

A : Activité amylolytique

B : Activité protéolytique

C : Activité cellulolytique détectée sur gélose à la cellulose

D : Activité cellulolytique sur bouillon à la cellulose

E : Activité lipolytique

F : Détection de lécithinase et lipo-protéinase

Les résultats du premier criblage ont permis de sélectionner 08 souches qui ont présenté un profil enzymatique à fort potentiel.

Un deuxième criblage qui se base sur l'étude de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées vis-à-vis des souches pathogènes a été mis en évidence.

III.2. Etude de l'activité antimicrobienne des isolats Contre *Escherichia coli* :

L'activité antimicrobienne contre *Escherichia coli* a été testée sur huit isolats. Cette étude a été réalisée par la méthode de spot, et la méthode de diffusion sur gélose. La formation d'une zone claire d'inhibition autour les souches ensemencées en spot ou les puits remplis soit par la culture ou par le surnageant indique l'existence d'une activité antimicrobienne.

Les résultats mentionnés dans le **Tableau 10** montrent que la croissance d'*Escherichia coli* a été inhibée par cinq souches parmi les huit isolats étudiés.

- ✓ Pour la méthode de spot, l'effet antibactérien contre *Escherichia coli* a été détecté chez quatre souches, S1, S3, S11 et S25, avec un fort potentiel chez la souche S11 (**Figure 9, B**).
- ✓ Les cultures des souches de *Bacillus* S1 et S15 déposées en puits ont inhibée la croissance d'*Escherichia coli* (**Figure 9, A**).
- ✓ Les puits remplis par le surnageant de culture de souche S15 (**Figure 9, A**), ont montré une zone claire indiquant son effet antibactérien.

Tableau 10 : Résultat de l'activité antimicrobienne, contre *Escherichia coli*, des isolats étudiés.

Méthodes souches	Méthode de spot	Méthode de puits (culture complète)	Méthode de puits (surnageant)
S1	+	+	-
S3	+	-	-
S6	-	-	-
S10	-	-	-
S11	+	-	-
S15	-	+	+
S19	-	-	-
S25	+	-	-

+ : Résultat positif - : Résultat négatif

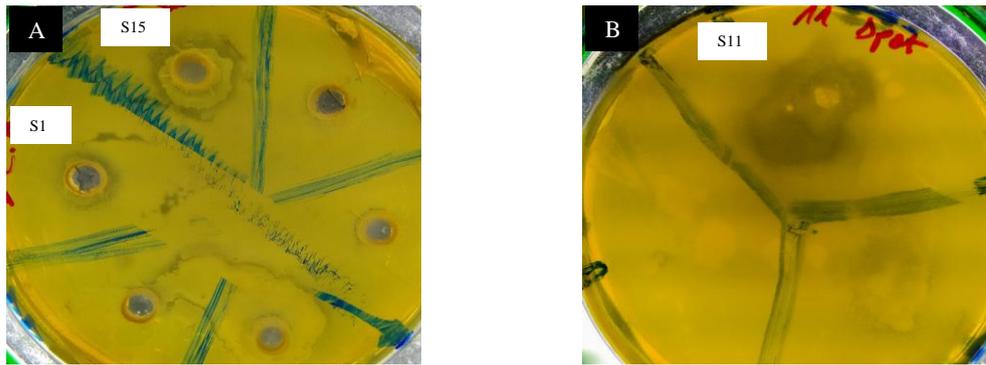


Figure 9 : L'activité antimicrobienne des souches testées.

- ✓ **A** : L'effet inhibiteur du surnageant de la souche S15 et de la culture complète de la souche S1.
- ✓ **B** : L'effet inhibiteur de la souche S11 ensemencée en spot.

III.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques :

La sensibilité des isolats aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose. Pour les espèces de *Bacillus*, il n'existe pas de recommandations spécifiques dans la Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie pour l'interprétation de l'antibiogramme ni de diamètres critiques spécifiques. Les souches ont été considérées comme résistantes si le diamètre d'inhibition est inférieur ou égale à 15mm, par contre les sont considérées comme sensibles si ce diamètre dépasse 15mm.

Les résultats indiquent que tous les isolats étudiés sont sensibles aux antibiotiques suivants : Doxycycline, Enrofloxacin, Erythromycine, Sulfamide et Tylosine.

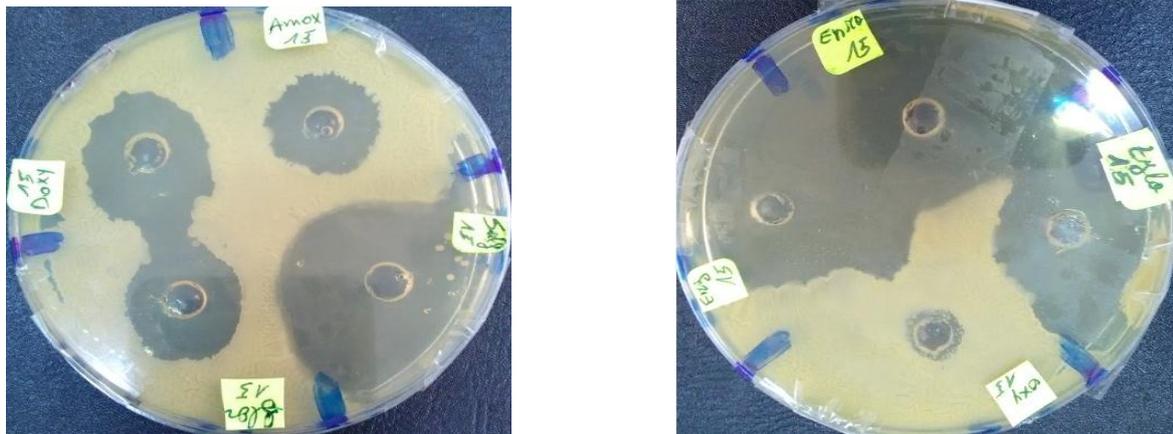
La souche S15 montre une résistance à l'Amoxicilline, le Florfénicol et à l'Oxytétracycline (**Figure 10**).

Les souches S1 et S3 sont les deux résistantes à l'Oxytétracycline.

Tableau 11 : Résultats de la sensibilité des isolats aux antibiotiques.

Antibiotiques	Abréviation	Souches testées			
		S1	S3	S15	S25
Amoxicilline	AMX	S	S	R	S
Doxycycline	DOX	S	S	S	S
Enrofloxacin	ENR	S	S	S	S
Erythromycine	ERY	S	S	S	S
Florfenicol	FLOR	S	S	R	S
Oxytétracycline	OTC	R	R	R	S
Sulfamide	SUL	S	S	S	S
Tylosine	TYL	S	S	S	S

R : Résistante S : Sensible

**Figure 10** : L'antibiogramme de la souche S15

III.4. Tolérance aux conditions du tractus gastro-intestinal :

III.4.1. Tolérance à l'acidité :

La tolérance des isolats à l'acidité a été évaluée par la présence ou l'absence de croissance sur des géloses nutritives ajustées à des pH 5 et pH 6.

Pour les pH les plus bas, la tolérance a été déterminée par l'apparition d'un trouble dans des bouillons nutritifs ajustés au pH 2 et pH 3.5.

Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 12**.

Au pH 3.5, pH 5 et au pH 6, les cinq isolats étudiés ont présenté une activité. Alors qu'au pH2, une faible croissance a été observée chez quatre souches (S1, S3, S15 et S25).

Tableau 12 : Résultats de la tolérance des isolats à l'acidité.

pH \ Souches	BN à pH 2	BN à pH 3.5	GN à pH 5	GN à pH 6
S1	Faible trouble	Fort trouble	+	+
S3	Faible trouble	Fort trouble	+	+
S11	-	Fort trouble	+	+
S15	Faible trouble	Fort trouble	+	+
S25	Faible trouble	Fort trouble	+	+

+ : Présence de croissance

- : Pas de croissance

BN : Bouillon nutritif

GN : Gélose nutritive

III.4.2. Tolérance aux sels biliaires :

La tolérance aux sels biliaires a été évaluée par la capacité des isolats à croître sur des géloses nutritives contenant différentes concentrations de la bile (**0.5, 1.5, 2.5, 4 et 5%**). Les résultats (**Tableau 13**) montrent que toutes les souches étudiées ont montré une croissance en présence de différentes concentrations en sels biliaires.

Tableau 13 : croissance des isolats en présence de sels biliaires.

Souches \ Concentration de la bile	0.5%	1.5%	2.5%	4%	5%
S1	+	+	+	+	+
S3	+	+	+	+	+
S11	+	+	+	+	+
S15	+	+	+	+	+
S25	+	+	+	+	+

+ : présence de croissance

IV. Identification des isolats à caractères probiotiques :

Les tests de sélection des souches probiotiques, préalablement étudiés (l'étude de l'activité enzymatique, de l'activité antimicrobienne contre l'*Escherichia coli*, de la sensibilité aux antibiotiques, ainsi que l'évaluation de la tolérance aux conditions du tube digestif), nous ont

permis de sélectionner cinq isolats à potentiel probiotique élevé et qui ont été soumis à d'autres tests afin de les identifier.

IV.1. Etude des caractères morphologiques :

IV.1.1. Examen macroscopique :

L'observation macroscopique (**Figure 11**) des cultures pures en gélose nutritive montre des colonies de grandes tailles, régulières ou irrégulières, plates, de couleur blanche ou légèrement beige, opaque et parfois la zone périphérique de certaines colonies est plus claire.

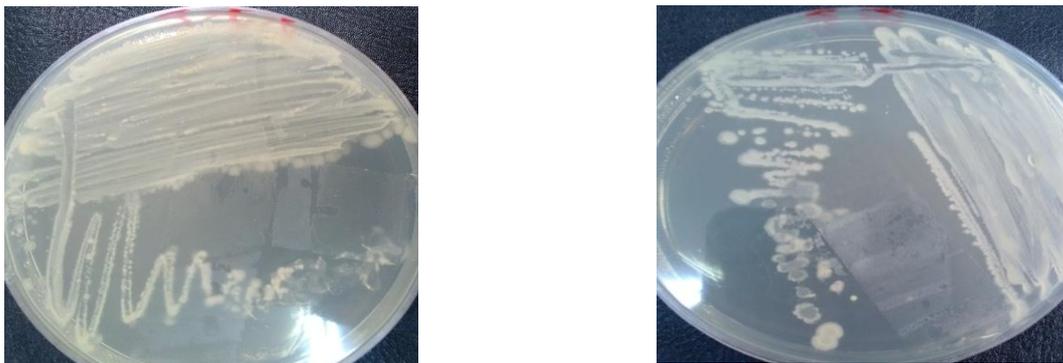


Figure 11 : Aspect macroscopique des colonies après 24h d'incubation à 37°C sur GN.

IV.1.2. Examen microscopique :

L'examen microscopique (**Figure 12**) révèle des petites cellules de forme bâtonnet, à extrémités rondes, isolées ou regroupées en paires et à coloration de Gram positif. Toutes les souches possèdent des spores ovalaires centrales ou subterminales.

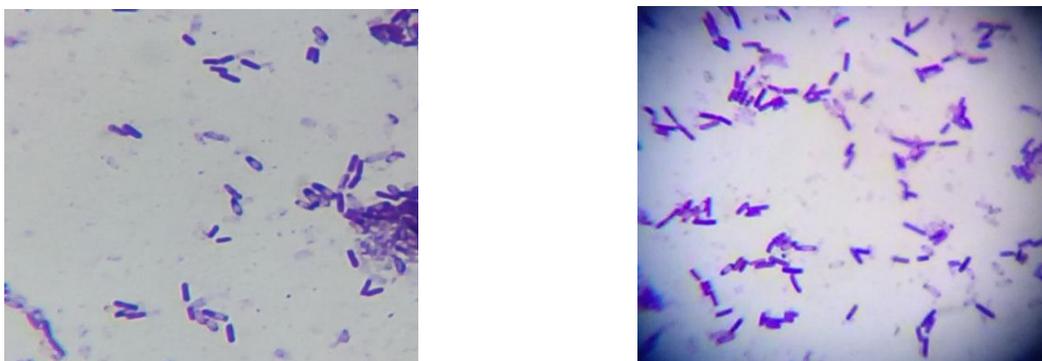


Figure 12 : Aspect microscopique des souches après coloration de Gram (grossissement x 1000).

IV.2. Etude des caractères biochimiques :

IV.2.1. Tests de catalase, de tolérance à la salinité et d'hémolyse :

Toutes les souches étudiées sont catalase positif (**Figure 13**). Elles donnent des réponses variables pour le test de tolérance à la salinité (**Figure 15**). L'activité hémolytique est absente chez toutes les souches sauf S11 qui présente une hémolyse β (**Figure 14**). Les résultats sont résumés dans le **Tableau 14**.

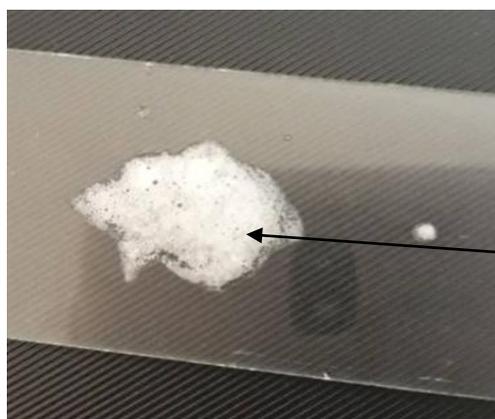
Tableau 14 : Les résultats des tests de catalase, de tolérance à la salinité et de test d'hémolyse.

Tests Souches	Catalase	Salinité				Hémolyse
		2%	3.5%	5%	7.5%	
S1	+	+	+	+	-	γ
S3	+	+	+	+	-	γ
S11	+	+	+	+	+ f	β
S15	+	-	+	+	+ f	γ
S25	+	-	+	+	+ f	γ

+ : Présence de croissance

- : Pas de croissance

f : faible croissance



Zone claire

Formation
de bulles
d'O₂

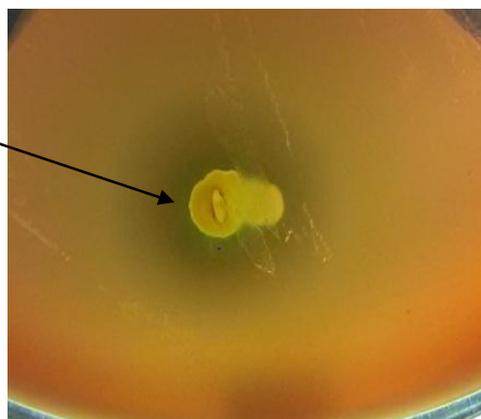


Figure 13 : Test de catalase positif

Figure 14 : Hémolyse β de la souche S11

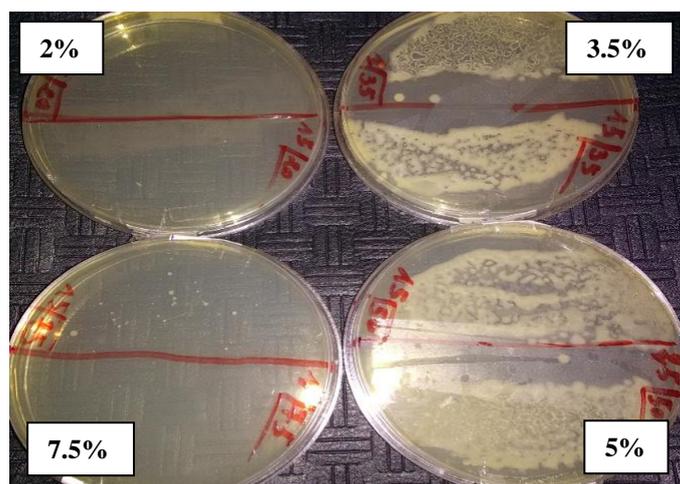


Figure 15 : Résultat de la tolérance des souches S15 et S25 à la salinité

IV.2.2. Résultat de l'API 20E :

La plaque API20E a été utilisée juste pour apprécier les 20 tests biochimiques présents sur cette plaque puisque normalement l'identification biochimique des bactéries du genre *Bacillus* se fait sur la galerie API 50CHB. Les résultats du profil biochimique des cinq souches (S1, S3, S11, S15 et S25) (**Tableau 15**) (**Figure 16**), inoculées sur les galeries API20E, sont exprimés en (+ ou -) en se référant au tableau de lecture de la galerie API20E (**Annexe 2**).

Tableau 15 : Résultats des plaques API20E inoculées par les cinq souches sélectionnées.

Tests	Résultats				
	S1	S3	S11	S15	S25
ONPG	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	-	-
LDC	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+	+
CIT	-	-	+	-	-
H2S	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+
VP	ND	ND	ND	ND	ND

GEL	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-
SOR	+	+	+	+	+
RHA	+	-	+	+	+
SAC	-	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+	-
AMY	-	-	+	-	-
ARA	+	+	+	+	+

+ : résultat positif - : résultat négatif ND : non déterminé

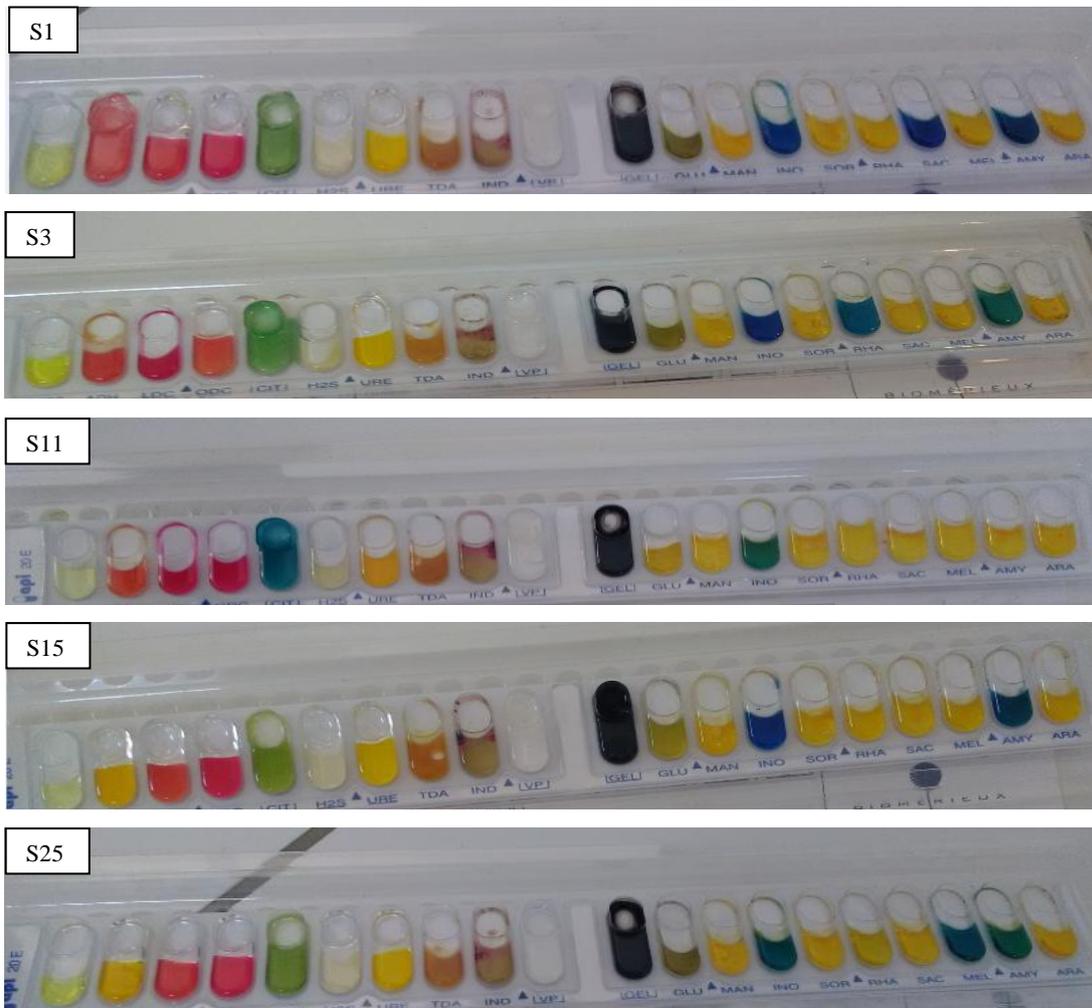


Figure 16 : Résultats des plaques API 20E des cinq souches à potentiel probiotique

Chapitre IV : Discussion

Actuellement, les régimes alimentaires de la volaille incluent une variété d'ingrédients de différentes sources végétales et animales. Cependant, ces aliments peuvent contenir des facteurs antinutritionnels (**Latorre et al, 2016**), tels que les polysaccharides non amylacés qui sont indigestibles chez les poulets en raison du manque d'enzymes spécifiques. Par conséquent, de nombreux chercheurs ont évalués l'inclusion de différentes enzymes alimentaires exogènes comme l'amylase, xylanase, cellulase et phytase pour améliorer la disponibilité des nutriments et réduire les facteurs antinutritionnels (**Avila, et al, 2012**). Néanmoins, certaines de ces enzymes sont dénaturées à pH acide du proventricule ou ne résistent pas aux températures élevées couramment utilisées lors de la granulation des aliments. Les bactéries du genre *Bacillus* sont connues par leur capacité à produire d'une large gamme d'enzymes extracellulaires (**Latorre et al, 2016**). Pour cette raison dans notre étude, trente deux souches de *Bacillus*, isolées à partir du tube digestif de poulets de chair, ont été étudiés pour évaluer leur potentiel à produire de différentes enzymes. Cet étude a permis de sélectionner quatre isolats qui ont capables de produire toutes les enzymes recherchées (amylase, protéase, cellulase et lécithinase) à l'exception de lipase qui a été détecté uniquement chez sept souches. Des études ont été montrées que l'inclusion des souches de *Bacillus*, productrices d'enzymes exogènes, dans les régimes alimentaires des volailles a permis d'améliorer significativement les performances de croissance (le poids corporel, l'apport alimentaire et le taux de conversion alimentaire), de diminuer la viscosité intestinale et d'améliorer la minéralisation osseuse (**Juan. D, 2014**).

Dans notre étude, l'activité antimicrobienne des isolats contre l'*Escherichia coli* a été également évaluée. La croissance d'*E.coli* a été inhibée par cinq souches parmi les huit isolats étudiés. Cette inhibition peut être due à la capacité de certaines espèces de *Bacillus* à synthétiser des composés antimicrobiens tels que les biosurfactants comme les surfactines, des bactériocines et d'autres molécules, elle peut également due à la forte compétition avec les pathogènes (**Latorre et al, 2016**). Par exemple, *B. subtilis* est capable de produire des bactériocines, telles que subtilin et subtilosin. Ainsi que, La souche I4 de *Bacillus coagulans* produit la coagulin plasmidique et la lactosporin qui ont une activité antimicrobienne contre les micro-organismes pathogènes (**Indu et al, 2016**).

Jusqu'à présent, la plupart des études sur la résistance bactérienne aux antibiotiques se sont concentrées principalement sur les micro-organismes pathogènes et les bactéries lactiques, alors que les informations sur les profils de sensibilité aux antibiotiques pour les espèces de *Bacillus* sont très limitées (**David. B et al, 2012**). Dans notre étude, les résultats montrent que les isolats étudiés sont sensibles aux cinq antibiotiques testés (Doxycycline, Enrofloxacin, Erythromycine, Sulfamide et

Tylosine), et les souches S1, S3 et S15 sont résistantes à l'Oxytétracycline. La souche S15 a été également montrée une résistance à l'Amoxicilline et au Florfénicol. Cette résistance peut poser un problème en ce qui concerne la capacité de ces souches résistantes à transférer des gènes de résistance aux antibiotiques à d'autres bactéries. Pour cette raison, les profils de résistance aux antibiotiques de chaque souche probiotique doivent être clairement définis et il faut démontrer que cette résistance n'est pas transférable (**Huynh, 2005**).

La résistance aux faibles valeurs du pH est l'un des critères préalables pour la sélection des souches probiotiques, car avant d'atteindre le tractus intestinal, les bactéries probiotiques doivent d'abord survivre au transit dans l'estomac où le pH peut être aussi bas que 1,5 à 2 (**Chemlal, 2013**). Les résultats de notre étude montrent que les isolats étudiés ont la capacité à croître à des valeurs de pH allant jusqu'à 3.5, mais à pH 2, une faible croissance a été détectée chez quatre souches. Chez les bactéries, cette résistance au stress acide est attribuée à un ensemble de trois protéines GroES, GroEL et DnaK. Ces trois protéines appartiennent à la famille des protéines induites en réponse à des conditions de stress variées, notamment le stress acide, et cela a été décrit chez de nombreuses espèces bactériennes telles que *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis* et *Listeria monocytogenes* (**Chemlal, 2013**).

En ce qui concerne la tolérance aux sels biliaries, tous les isolats ont pu croître à des concentrations en sels biliaries allant jusqu'à 5%. Sachant que la concentration des sels biliaries chez le poulet est en moyenne de 0.3% et peut dépasser 3% aux premières heures de la digestion (**Bakari et al, 2011**). Ce phénomène de résistance aux sels biliaries peut être expliqué par deux hypothèses. La première indique qu'il y a des espèces bactériennes qui ont la capacité à déconjuguer les sels biliaries, à l'aide des enzymes hydrolases (BSH ou Bile Salt Hydrolase), afin d'utiliser la taurine comme accepteur final d'électrons. Sachant que la taurine est un acide aminé entrant dans la composition des sels biliaries. La deuxième hypothèse suppose que les BSH permettent la déconjugaison des sels biliaries et par conséquent ils permettent de protéger les bactéries contre la toxicité des sels biliaries conjuguées (**Moser et al, 2001**).

Les tests de sélection des souches probiotiques, nous ont permis de sélectionner cinq isolats à potentiel probiotique élevé et qui ont été soumis à d'autres tests afin de les identifier. Ces tests comprennent une étude des caractères morphologiques et une étude des caractères biochimiques avec l'inoculation de la galerie API 20E. Cette dernière a été utilisée juste pour apprécier les 20 tests présents sur cette plaque puisque normalement l'identification biochimique des bactéries du genre *Bacillus* se fait sur les plaques API 50CHB. Selon cette caractérisation morphologique et

biochimique, nous pouvons suggérer que les cinq souches sélectionnées appartiennent généralement aux espèces *B. subtilis* et *B. licheniformis*.

Conclusion

L'usage abusif des antibiotiques en tant que promoteurs de croissance en alimentation animale a conduit à l'émergence de bactéries pathogènes multirésistantes. Cette situation a incité les chercheurs à l'échelle mondiale de trouver de nouvelles alternatives. Parmi les choix, les probiotiques ont suscités une attention accrue en tant qu'alternative rentable à la lutte contre les maladies animales et à l'amélioration des performances de croissance.

Ces dernières années les chercheurs commencent à s'intéresser plus intensément sur l'utilisation probiotique des espèces appartenant au genre *Bacillus*. Ces bactéries présentent un intérêt en tant que probiotiques grâce à leur capacité à produire de nombreuses substances antimicrobiennes, et de différents types d'enzymes extracellulaires, ainsi que leur capacité à survivre dans des conditions environnementales extrêmes sous forme de spores.

Le but de notre étude était l'isolement des souches de *Bacillus* à partir du tube digestif de poulets de chair, et d'étudier leur potentiel probiotique.

Les isolats ont été préalablement sélectionnés en se basant sur les caractères morphologiques du genre *Bacillus* qui nous ont permis de retenir trente-deux isolats. Un deuxième criblage conduit à sélectionner des souches avec un fort potentiel probiotique. Les critères de sélection incluent l'activité enzymatique, la sensibilité aux antibiotiques, l'activité antimicrobienne contre l'*E.coli*, et la tolérance aux conditions du tube digestif.

A la lumière des résultats que nous avons obtenus, il semble que :

- Le tube digestif des poulets de chair constitue une niche écologique pour la croissance des bactéries du genre *Bacillus*.
- Les bactéries de ce genre peuvent constituer des candidats probiotiques intéressants qui méritent d'être mieux étudiées pour ses capacités à:
 - ✓ Produire d'une large gamme d'enzymes extracellulaires,
 - ✓ Résister aux conditions hostiles du tractus gastro-intestinal,
 - ✓ Leur potentiel à inhiber des agents pathogènes par la production des composés antimicrobiens ou par la compétition sur les nutriments ou sur les sites d'adhésion à la muqueuse intestinale.

En perspective, les souches isolées doivent être soumises à des études moléculaires afin de les identifier précisément. Il faut démontrer également que les gènes de résistance aux antibiotiques ne sont pas transférables à d'autres bactéries pathogènes ou commensales du tube digestif.

Enfin, des études in vivo doivent être également réalisées pour confirmer l'efficacité de ces souches probiotiques dans la lutte contre les bactéries pathogènes ou dans l'amélioration des performances de croissance.

Références bibliographiques

- **Avila.E., Arce.J., Soto.C., Rosas.F., Ceccantini.M., mcintyre.D. R. (2012).** Evaluation of an Enzyme Complex Containing Non starch Polysaccharide Enzymes and Phytase on the Performance of Broilers Fed a Sorghum and Soybean Meal Diet. *Applied Poultry Research*. 279–286.
- **AYED Hamida., SOLTANI Fatiha. (2015).** Atténuation Des Effets De La Chaleur En Production Avicole Type Chair. Université Djilali Bounaama Khemis Miliana.
- **Bai S. P., Wu A. M., Ding X. M., Lei Y., Bai J., Zhang K. Y., Chio J. S. (2013).** Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poultry Science*. 663–670.
- **BAKARI Daoudou., TATSADJIEU Ngonne Leopold., MBAWALA Augustin., MBOFUNG Carl Moses. (2011).** Assessment of physiological properties of some lactic acid bacteria isolated from the intestine of chickens use as probiotics and antimicrobial agents against enteropathogenic bacteria. *Innovative Romanian Food Biotechnology*.
- **BEN ABDALLAH Nour. (2010).** Isolement et caractérisation de bactéries à fort potentiel probiotique à partir du tractus gastro-intestinal de volaille. Université Laval.
- **Chemlal-Kherraz Djazia. (2013).** Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques isolées du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et mise en évidence de leur potentiel probiotique. Université d'Oran.
- **CHERIET Meriem., AMARI Sihem., BENMAMMAR Yasmine. (2016).** Étude de quelques activités enzymatiques d'une collection d'actinomycète. Université des Frères Mentouri Constantine.
- **Dalloul R. A., Lillehoj H. S., Shellem T. A., Doerr J. A. (2003).** Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a *Lactobacillus*-based probiotic. *Poultry Science*.
- **Deng Pan et Zhongtang Yu. (2014).** Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*. 108–119.

- **Delarras Camille. (2014).** *Pratique En Microbiologie de Laboratoire? Recherche de Bactéries et de Levures-Moisissures.* Lavoisier.
- **David B. Adimpong., Kim I. Sørensen., Line Thorsen., Birgitte Stuer-Lauridsen., Warda S. Abdelgadir., Dennis S. Nielsen., Patrick M. F. Derkx., et Lene Jespersen. (2012).** Antimicrobial Susceptibility of Bacillus Strains Isolated from Primary Starters for African Traditional Bread Production and Characterization of the Bacitracin Operon and Bacitracin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology.* 7903–7914.
- **DROMIGNY Eric. (2008).** *Bacillus Cereus.* Lavoisier. 400 PAGES.
- **Elshaghabee FMF., Namita Rokana., Rohini D. Gulhane., Chetan Sharma., et Harsh Panwar. (2017).** Bacillus As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in microbiology.*
- **Florian Vasai. (2013).** Etude de La Composition Du Microbiote Intestinal Des Canards. Impact Du Gavage, de l’ajout d’un Probiotique (*Lactobacillus sakei*) et d’un Composé Organométallique (Cadmium). Université de Pau et des pays de l’Adour.
- **GABRIEL. I., MALLET. S., SIBILLE. P. (2005).** La microflore digestive des volailles : Facteurs de variation et conséquences pour l’animal. 309–22.
- **Gagnon Mélanie. (2007).** Rôle des probiotiques lors d’infections entériques d’origine bactérienne et virale : analyses in vitro et études in vivo chez des modèles murins. Université Laval Québec.
- **Geert Huys., Nadine Botteldoorn., Frank Delvigne., Luc De Vuyst., Marc Heyndrickx., Bruno Pot., Jean-Jacques Dubois., et Georges Daube. (2013).** Microbial Characterization of Probiotics—Advisory Report of the Working Group “8651 Probiotics” of the Belgian Superior Health Council (SHC). 1479–1504.
- **GUARDIA Sarah. (2011).** Effets de phytobiotiques sur les performances de croissance et l’équilibre du microbiote digestif du poulet de chair. Université François – Rabelais.

- **Huynh A. Hong., Le Hong Du.c, Simon M. Cutting. (2005).** The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*. 813–835.
- **Indu Khatri., Shailza Sharma., T. N. C. Ramya., et Srikrishna Subramanian. (2016).** Complete genomes of *Bacillus coagulans* S-Lac and *Bacillus subtilis* TO-A JPC, two phylogenetically distinct probiotics. *Plos ONE*.
- **Jeanne Brugère-Picoux. (2017).** Mes poules en bonne santé: comment reconnaître, prévenir et traiter leurs maladies. Aurélie Mercier.
- **Jeong JS., Kim IH. (2014).** Effect of *Bacillus subtilis* c-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. *Poultry science*.
- **Jiajun Yang., Kun Qian., Wei Zhang., Yayuan Xu., et Yijing Wu. (2016).** Effects of chromium-enriched *Bacillus subtilis* kt260179 supplementation on chicken growth performance, plasma lipid parameters, tissue chromium levels, cecal bacterial composition and breast meat quality. *Lipids in Health and Disease*.
- **Juan. D. Latorre., Xochitl Hernandez-Velasco., Michael. H. Kogut., Jose. L. Vicente., Ross Wolfenden., Amanda Wolfenden., Billy. M. Hargis., Vivek. A. Kuttappan., et Guillermo Tellez. (2014).** Role of a *Bacillus Subtilis* Direct-Fed Microbial on Digesta Viscosity, Bacterial Translocation, and Bone Mineralization in Turkey Poult Fed with a Rye-Based Diet. *Frontiers in Veterinary Science*.
- **La Ragione. RM., Casula. G., Cutting. SM., Woodward. MJ., et Simon. M. Cuttingb., Martin. J. Woodwarda. (2001).** *Bacillus Subtilis* Spores Competitively Exclude *Escherichia Coli* O78:K80 in Poultry. *Veterinary Microbiology*. 133–42.
- **LAROUCI Saliha. (2013).** Contribution à l'étude des probiotiques et prébiotiques comme alternatives aux antibiotiques en aviculture. Université d'Oran.

- **Laurent Delteil. (2012).** Nutrition et Alimentation Des Animaux d'élevage. Volume 1. Educagri Editions.
- **Latorre JD., Hernandez-Velasco X., et others. (2016).** Evaluation and Selection of Bacillus Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry. *Frontiers in Veterinary Science*.
- **MAHMA Hassen., BERGHOUTI Farouk. (2016).** La filière avicole (poulet de chair) dans la wilaya d'Ouargla : autopsie de dysfonctionnement. Cas de la région d'Ouargla. Université Kasdi Merbah, Ouargla.
- **Manuel Saint-Cyr. (2013).** Impact des mycotoxines sur le microbiote intestinal humain, cas particulier du déoxynivalénol. Université De Rennes 1.
- **Mathieu Bélanger. (2008).** Mise au point d'un modèle d'infection expérimentale d'entérite nécrotique clinique chez le poulet de chair par des facteurs prédisposants. Université de Montréal.
- **Martin Král., Mária Angelovičová., Eubica Mrázová. (2012).** Application of probiotics in poultry production. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*.
- **Mengjiao Guo., Fahao Wu., Guangen Hao., Qin Qi., Rong Li., Ning Li., Liangmeng Wei., et Tongjie Chai. (2017).** Bacillus subtilis improves immunity and disease resistance in rabbits. *Frontiers in Immunology*.
- **Moser Scott A., et Dwayne C. Savage. (2001).** Bile Salt Hydrolase Activity and Resistance to Toxicity of Conjugated Bile Salts Are Unrelated Properties in Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*. 3476–3480.
- **OUAREST ABDELOUAHAB. (2008).** Le Soja dans l'alimentation du Poulet de Chair, aspects qualitatif et quantitatif. Université Mentouri De Constantine.
- **Patterson. J. A et Burkholder. K. M. (2003).** Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production. *Poultry Science*. 627–631.

- **Paul Vos., George Garrity., Dorothy Jones., Noel R. Krieg., Wolfgang Ludwig., Fred A. Rainey., Karl-Heinz Schleifer., William B. Whitman. (2011).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. 2, illustrée edn. Volume 3. Springer Science & Business Media.
- **Pilasombut K., Sakpuaram T., Wajjwalku W., Nitisinprasert S., Swetwivathana A., Zendo T., Fujita K., Nakayama J., Sonomoto K. (2006).** Purification and amino acid sequence of a bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine. *Sci Technol.* 121–131.
- **RIHANI Alima. (2012).** Screening de microorganismes producteurs de lipases : application dans la biodécontamination de surface. Université Badji Mokhtar-Annaba.
- **Rinttilä T., Apajalahti J. (2013).** Intestinal microbiota and metabolites-implications for broiler chicken health and performance. 647–658.
- **Rougière Nathalie. (2010).** Etude comparée des paramètres digestifs des poulets issus des lignées génétiques D+ et D- sélectionnées pour une efficacité digestive divergent. Université François - Rabelais De Tours.
- **Shuai Xu., Yicen Lin., Dong Zeng., Mengjia Zhou., Yan Zeng., Hesong Wang., Yi Zhou., Hui Zhu., Kangcheng Pan., Bo Jing., et Xueqin Ni. (2018).** *Bacillus* licheniformis normalize the ileum microbiota of chickens infected with necrotic enteritis. *Scientific Reports.*
- **Stanley Falkow., Eugene Rosenberg., Karl-Heinz Schleifer., Erko Stackebrandt. (2006).** The Prokaryotes: Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Illustrée edn. Volume 4. Springer Science & Business Media.
- **Teresa M. Barbosa., Cláudia R. Serra., Roberto M. La Ragione., Martin J. Woodward., et Adriano O. Henriques. (2005).** Screening for *Bacillus* Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology.* 968–978.

- **UK Standards for Microbiology Investigations. (2015).** Identification of *Bacillus* Species. <<http://www.sfam.org.uk/download.cfm?Docid=A8649AF0-52D3-4098A5FF68A2D1A0978B.>>.
- **Van Immerssel Filip., De Buck Jereon., Pasmans Frank., Haesebrouck Freddy., Ducatelle Richard. (2003).** Stratégies nutritionnelles pour réduire les agents pathogènes chez la volaille. Université de Gand, Salisburyaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgique.
- **Wang. Y., Gu. Q. (2010).** Effect of Probiotic on Growth Performance and Digestive Enzyme Activity of Arbor Acres Broilers. *Poultry Science*. 588–93.
- **Xiaolu Liu., Hai Yan., Le Lv., Qianqian Xu., Chunhua Yin., Keyi Zhang., Pei Wang., et Jiye Hu. (2012).** Growth performance and meat quality of broiler chickens supplemented with *Bacillus licheniformis* in drinking water. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 682–689.
- **Yong Ha Park., Farizal Hamidon., Chandraprasad Rajangan., Kim Pong Soh., Chee Yuen Gan., Theam Soon Lim., Wan Nadiyah Wan Abdullah., et Min Tze Liong. (2016).** Application of probiotics for the production of safe and high-quality poultry meat. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 567–576.
- **Yuanyuan Wu., Yujing Shao, Bochen Song., Wenrui Zhen., Zhong Wang., Yuming Guo., Muhammad Suhaib Shahid., et Wei Nie. (2018).** Effects of *Bacillus coagulans* supplementation on the growth performance and gut health of broiler chickens with *Clostridium perfringens*-Induced Necrotic Enteritis. *Journal of Animal Science and Biotechnology*.

Annexes

Annexe 1 : Les milieux de culture**Bouillon nutritif**

Peptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Eau distillée.....	1000ml
pH = 7.4	

Bouillon à la cellulose

KH ₂ PO ₄	0.5g
MgSO ₄	0.25g
Cellulose.....	2g
Gélatine.....	2g
Eau distillée.....	1000ml
pH = 7	

Gélose nutritive

Peptone.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Extrait de viande.....	1.5g
Extrait de levure.....	1.5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH = 7.4	

Gélose à amidon

Gélose nutritive.....100ml

Amidon.....1g

pH = 7

Gélose au lait

Gélose nutritive.....100ml

Lait écrémé stérile.....5ml

pH = 7

Gélose à la celluloseKH₂PO₄.....0.5gMgSO₄.....0.25g

Cellulose.....2g

Gélatine.....2g

Agar.....18g

Eau distillée.....1000ml

pH = 7

Gélose au jaune d'œuf

Gélose nutritive.....100ml

Emulsion de jaune d'œuf.....10ml

pH = 7

Après avoir flamber la coquille d'œuf avec de l'alcool pendant 30 secondes, 5ml du jaune d'œuf a été récupéré et additionné avec 5ml d'eau distillé stérile, puis mélangé rigoureusement. L'émulsion de jaune d'œuf a été ensuite mélangée avec 100ml de gélose nutritive en surfusion (45°C).

Gélose au Tween 80

Peptone.....	10g
NaCl.....	5g
CaCl ₂	0.1g
Agar.....	18g
Tween 80.....	10ml
Eau distillée.....	1000ml
pH = 7.4	

Gélose au sang

Gélose nutritive.....	100ml
Sang humain.....	5ml
pH = 7	

Annexe 2 : La galerie API 20E**Principe :**

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Mode opératoire :

- **Préparation de la galerie :** Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, ensuite déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- **Préparation de l'inoculum :** Faire une suspension bactérienne dans 5ml d'eau physiologique stérile avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

- **Inoculation de la galerie :**
 - ✓ Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
 - ✓ Remplir uniquement les tubes des autres tests.
 - ✓ Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
 - ✓ Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.
- **Lecture :** Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

Tableau de lecture de la galerie API 20 E :

Tests	Composants actifs	Réactions /Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- βD-galactopyranoside	β-galactosidase (Ortho Nitro Phényl-βD-Galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
ADH	L -arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge
LDC	L -lysine	Lysine Décarboxylase	Jaune	Orange/rouge
ODC	L-Ornithine	Ornithine Décarboxylase	Jaune	Orange/rouge
CIT	Trisodium citrate	Utilisation du Citrate	Vert pâle - jaune	Bleu-vert-bleu
H₂S	Sodium thiosulfate	Production d' H ₂ S	Incolore-grisâtre	Dépôt noir-fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rouge
TDA	L-tryptophane	Tryptophane Désaminase	TDA immédiat	
			Jaune	Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'Indole	JAMES immédiat	
			Incolore-vert pâle-jaune	Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne	VP1+VP2/10min	
			Incolore-rose pâle	Rose-rouge
GEL	Gélatine (origine bovine)	Hydrolyse (protéase) (Gélatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment
GLU	D-glucose	Fermentation-oxydation (Glucose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
MAN	D-mannitol	Fermentation -	Bleu-	Jaune-jaune

		oxydation (Mannitol)		bleu vert	gris
INO	Inositol	Fermentation oxydation (Inositol)	-	Bleu- bleu vert	Jaune-jaune gris
SOR	D-sorbitol	Fermentation oxydation (Sorbitol)	-	Bleu- bleu vert	Jaune-jaune gris
RHA	L-rhamnose	Fermentation oxydation (Rhamnose)	-	Bleu- bleu vert	Jaune-jaune gris
SAC	D-saccharose	Fermentation oxydation (Saccharose)	-	Bleu- bleu vert	Jaune-jaune gris
MEL	D-melibiose	Fermentation oxydation (Melibiose)	-	Bleu- bleu vert	Jaune-jaune gris
AMY	Amygdaline	Fermentation oxydation (Amygdaline)	-	Bleu- bleu vert	Jaune-jaune gris
ARA	L-arabinose	Fermentation oxydation (Arabinose)	-	Bleu- bleu vert	Jaune-jaune gris