

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain-Temouchent



Département de la Science de la nature et la vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en biologie
Option : Microbiologie appliquée

Présenté par :

Mlle. Adla Khaoula Nihad

Mr. Errouane Chams Eddine M'hamed

Evaluation du potentiel probiotique des bactéries lactiques
isolées à partir du lait de vache cru

Encadrant:

Mr. MOUADDEN. N

Maitre-Assistant "A" à C.U.B.B.A.T.

Soutenu en 2019

Devant le jury composé de :

| | |
|----------------------------------|--------------|
| Président: Mr. BOUAMRA.M (M.C.B) | C.U.B.B.A.T. |
| Examineurs: | |
| Mr. BENNABI. F (M.C.B) | C.U.B.B.A.T. |
| Mlle. CHIBANI (M.A.B) | C.U.B.B.A.T. |
| Encadrant: Mr MOUADDEN.N (M.A.A) | C.U.B.B.A.T. |

Remerciements

Pendant la période de notre recherche, nous avons eu le soutien de plusieurs personnes, qui directement ou indirectement ont contribué afin qu'aujourd'hui, nous pouvons terminer l'élaboration du présent travail.

Nous tenons à remercier Dieu qui avec son pouvoir nous a aidé à vaincre ce défi.

Nous remercions nos parents qui étaient présent par leur soutien psychologiques et affectifs, que dieu vous garde pour nous.

Par la suite, nous tenons à exprimé notre sincère gratitude à notre Encadreur Mr MOUADDEN.N

Pour son appui, sa disponibilité, sa patience, son orientation et pour la confiance qu'il nous a accordés en encadrant ce travail.

Nos remerciements vont aussi à tous les membres de jury qui ont accepté de lire, d'évaluer et critiquer ce travail et plus particulièrement :

Mr Bouamra M. d'avoir accepté la présidence de notre jury de mémoire, pour sa disponibilité, pour le temps qu'il nous a consacré et pour son aide à la compréhension du monde animal, on vous remercie chaleureusement

Mr Bennabi F. qui a accepté sans hésitation d'examiner ce travail, pour sa disponibilité, son soutien et son sourire permanent plein d'optimisme, on vous remercie chaleureusement.

Mlle Chibani d'avoir accepté d'évaluer et critiquer ce modeste travail , on vous remercie infiniment.

On tient également à remercier Dr Tihami B. responsable de service d'anatomie de l'établissement hospitalier Dr Benzarjeb -Ain Témouchent – qui nous as permis de bénéficier de toute sa compétence en acceptant de nous aider avec toute gentillesse dans l'étude histologique malgré ces lourdes charges.

Nos remerciements pour tous les enseignants du département de biologie de l'université d'Ain Témouchent pour leur soutien constant et leurs encouragements.

Finalement, nous remercions nos amis de classe avec qui nous avons passés des moments uniques dans notre vie et qui d'une manière ou d'une autre nous ont soutenus tout au long de cette modeste recherche.

A tous ceux qui nous ont aidés, nous vous remercions profondément.

Dédicace :

On dédie ce travail à nos chers parents et aucune dédicace ne serait exprimer notre respect, notre amour éternel et notre considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour notre instruction et le bien être

On vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous nous portez depuis notre enfance et nous espérons que votre bénédiction nous accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que nous ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

Merci à ma chère petite fifi pour avoir accouru à mon secours à chaque fois que mon camera rencontrait un problème, merci de m'avoir supportée toutes les fois où je n'étais tout simplement pas de bonne humeur. Pour tous les Week ends passés à la maison parce qu'il faut bien quelqu'un pour s'occuper des hamsters. Tous simplement tu es la plus belle sœur au monde.

Résumé

L'identification de nouvelles souches notamment des lactobacilles aux propriétés probiotiques est l'objectif principal de notre travail. Au cours de cette étude, 15 souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir de lait de vache cru récolté dans la région de Ain Témouchent. Leur identification phénotypique, a conduit à dix souches appartenant au genre *Lactobacillus*. Le pouvoir probiotique des souches était évalué de deux manières :

In vitro : On s'est intéressés à l'étude de leur habilité à survivre dans les conditions gastriques et intestinales simulées, le temps d'auto-agrégation et co-aggrégation, le pourcentage d'hydrophobicité et leur activité antibactérienne ainsi que leur aspect sécuritaire était examiné par l'activité hémolytique et la résistance aux antibiotiques.

A la fin, deux souches (*L. plantarum*, *L. acidophilus*) ont franchi les barrières de sélection et qui sont considérés comme des bactéries potentiellement probiotique.

In vivo : Les souches sélectionnées au premier criblage étaient ensuite testées sur un modèle animal, afin de confirmer le potentiel anti-inflammatoire de ces souches.

Abstract

The identification of new strains including lactobacilli with probiotic properties is the main objective of our work. In this study, 15 strains of lactic acid bacteria were isolated from three different samples of raw cow's milk harvested in the region of Ain Témouchent.

The phenotypic identification showed that ten strains belonged to the genus *Lactobacillus*. The probiotic profile of lactobacilli strains was examined in two ways:

In vitro: we were interested to evaluate their ability to survive in gastric and intestinal simulated conditions, time to self-aggregation and co-aggregation and pathogenic bacteria, the percentage of hydrophobicity and the antibacterial activity. Their safety aspect was also examined by hemolytic activity and antibiotic resistance.

At the end two strains (*L. plantarum*, *L. acidophilus*) was crossed the barriers of selection and are colonised potentially probiotic bacteria.

In vivo: The strains selected after the first screening were then tested in animal model, to confirm anti-inflammatory potential of this stains

المخلص

البروبيوتيك عبارة عن كائنات حية دقيقة لها تأثير إيجابي على الصحة ولديها دور مهم للغاية في تحسين عملية الهضم والانتقال المعوي، وكذلك في الحفاظ على توازن النباتات المعوية. تحديد سلالات جديدة من العصيات اللبنية مع خصائص بروبوتيك هو الهدف الرئيسي لعملنا.

في هذه الدراسة، تم عزل 15 سلالة من بكتيريا حمض اللبنيك من حليب البقر الخام الذي تم حصاده في منطقة عين تموشنت. التعرف على النمط الظاهري، أدى إلى عشر سلالات تنتمي إلى جنس لاكتوباسيلوس. تم تقييم قوة البروبيوتيك للسلالات بطريقتين

في المختبر: درسنا القدرة على البقاء على قيد الحياة في الحالات المعوية والأمعاء المحاكاة، ووقت التجميع الذاتي والتجميع المشترك، والنسبة المئوية للماء المسعور ونشاطها المضاد للبكتيريا، وكذلك تم فحص الجانب الأمني من قبل نشاط الانحلال والمقاومة للمضادات الحيوية. في النهاية عبرت سلالتان حواجز الاختيار وتعتبر البكتيريا بروبوتيك.

في الجسم الحي: تم اختبار السلالات التي تم اختيارها عند الفحص الأول على نموذج حيواني لتأكيد القدرة المضادة للالتهابات لهذه السلالات.

Abréviation

A : Absorbance

AGCC : Acides Gras à Chaîne Courte

ATB : Antibiotique

BSH : Biles Salts Hydrolase

DO: Densité optique

DSS: Dextran sulfate sodium

FAO: Food and Agriculture Organization

h : heure

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IL : interleukine

L: *Lactobacillus*

LB: Lactobacille

LPS: lipopolysaccharide

MDR: Multidrug Resistance

MH: Muller Hinton

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MRS : De Man, Rogosa et Sharpe

O₂ : Oxygène

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : Phosphate buffered saline (tampon salin phosphaté)

pH : potentiel d'Hydrogène

rpm: rotation par minute (Vitesse de rotation)

SNG : surnageant

sp : espèce non précisée

UFC : Unité formant colonie

Liste des tableaux

Tableau (1): micro-organismes considérés comme des probiotiques (Hozalpfel et al. 1998)

Tableau (2): Effet bénéfique des lactobacilles probiotiques sur la santé humaine

(Source : FAO/OMS, 2001 ; WGO, 2008).

Tableau (3): Principaux critères de sélection des probiotiques (Klaenhammer et Kullen (1999); Saarela et al. (2000); Ouwehand et al. (2002); Gueimonde et Salminen (2006).

Tableau (4): bactéries indicatrices utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques.

Tableau (5): Les ATB utilisés dans le test de résistance aux antibiotiques.

Tableau (6): Habilité des souches de lactobacilles à survivre dans les conditions gastriques simulées.

Tableau (7): Habilité des souches de lactobacilles à survivre dans les conditions gastriques simulées.

Tableau (8): Activité antibactérienne des lactobacilles contre des bactéries pathogènes indicatrices.

Tableau (9): Pourcentage de Co-aggrégation des isolats de lactobacilles avec les différentes souches pathogènes (PA, BC, EC, SE).

Tableau (10): Résistance des souches de lactobacilles aux antibiotiques.

Liste des figures

Figure (1): Composition de la microflore intestinale humaine (Holzapfel *et al.* 1998).

Figure (2): Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le traitement des infections entériques. Adapté de Calder et Kew (2002); Kaur et al. (2002).

Figure (3): le Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des dût à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques.

Figure (4): Activité antibactérienne d'une souche de *L. fermentum* contre *Staphylococcus aureus* Et *Listeria monocytogenes* (Klayraung et Okonongi, 2009).

Figure (5): Schéma explicatif des différentes étapes d'isolement des souches lactiques.

Figure (6): Diagramme de sélection, *in vitro*, des souches microbiennes à usage probiotique (Havenaar *et al.* 1992 ; FAO/OMS, 2002).

Figure (7): Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'habilité des bactéries lactiques à survivre dans les conditions gastriques simulées.

Figure (8): Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'habilité des bactéries lactiques à survivre dans les conditions intestinales simulées.

Figure (9): Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'activité antibactérienne des lactobacilles.

Figure (10): Schéma illustrant la sensibilité des souches aux différents antibiotiques.

Figure (11): Protocole de la colite induite au DSS.

Figure (12): Les étapes de dessiccation d'un hamster et le prélèvement du colon.

Figure (13): Les étapes d'une étude histologique du colon.

Figure (14): Aspect macroscopique de différentes colonies de bactéries lactiques.

Figure (15): Aspect macroscopique de différentes colonies de *Lactobacillus* pures.

Figure (16): Observation microscopique après coloration de Gram au G x100.

Figure (17): Résultats de test catalase chez les isolats lactiques.

Figure (18): La croissance à différentes températures.

Figure (19): Figure : Exemple de profil fermentaire des bactéries lactique (a), (b).

Figure (20): L'activité antibactérienne de culture de souches de lactobacilles à l'égard de souches pathogènes.

Figure (21): Auto-agrégations des isolats.

Figure (22): Pourcentage d'auto-agrégations des isolats.

Figure (23): Pourcentage de Co-aggrégation des isolats de lactobacilles avec les différentes souches pathogènes (PA, BC, EC, SE).

Figure (24): Pourcentage d'hydrophobicité des isolats.

Figure (25): Pourcentage d'hydrophobicité des isolats.

Figure (26): Activité hémolytique des isolats.

Figure (27): Le profil de la résistance aux antibiotiques des isolats.

Figure (28): Evaluation de la consommation journalière moyenne en nourriture.

Figure (29): Variation du poids des hamsters en fonction des jours de traitement.

Figure (30): Aspect des selles normal chez les hamsters.

Figure (31): La longueur des colons après un traitement probiotique.

Figure (32): Coupe histologique des colons enflammée (c, d) et non avec du DSS (a, b).

SOMMAIRE

| | |
|--|----------|
| Résumé | |
| Abréviation | |
| Liste des tableaux | |
| Listes des figures | |
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| Partie I : Synthèse bibliographique | |
| I) -Microflore intestinale et probiotiques | 3 |
| I.1. La microflore intestinale saine | 3 |
| I.1.1. Composition de la microflore intestinale humaine | 3 |
| I.1.2. Fonctions de la microflore colique | 4 |
| I.2. Les probiotiques | 5 |
| I.2.1. Définition et historique des probiotiques | 5 |
| I.2.2. Les micro-organismes probiotiques | |
| I.2.3. Les Lactobacilles autant que probiotiques | |
| I.2.4. Propriétés et critères de sélection des probiotiques | |
| I.2.4.a. Critères de sécurité | |
| - Origine de la souche | |
| - Pathogénicité | |
| I.2.4.b. Critères fonctionnels | |
| - Résistances aux conditions gastriques | |
| - Résistance aux conditions intestinales | |
| - Adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte | |
| - Activité antimicrobienne | |
| I.2.4.c. Critères technologiques | |
| - Aptitude à la production industrielle | |
| - Résistance aux conditions de stockage | |

- Activité acidifiante et protéolytique.....

I.2.5. Mécanismes d'action des Lactobacilles probiotiques

- Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion.....

- Production de substances antimicrobienne.....

- Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments.....

- Immun stimulation.....

II)-Effets bénéfiques des probiotiques.....

Utilisation des probiotiques en santé humaine

Probiotiques et inflammation intestinale

Partie II : Matériel et méthodes.....

I. Provenance des souches

I.1 Prélèvement et collection des échantillons

I.2 Isolement des bactéries lactiques.....

I.3 Purification des bactéries lactiques.....

I.4 Conservation des souches

I.5 Identification des isolats.....

I.5.1 Critères morphologiques

I.5.1.1 Examen macroscopique.....

I.5.1.2 Examen microscopique

A. État frais.....

B. Coloration de Gram

I.5.2 Critères physiologiques et biochimiques

I.5.2.1 Recherche de la catalase.....

I.5.2.2 Croissance à différentes températures

I.5.2.3 Profil de fermentation des sucres

- Galerie API 50

II)-Evaluation des aptitudes probiotiques *in vitro*

- 1-Habilité à survivre dans les conditions gastriques simulées
- 2-Habilité à survire dans les conditions intestinales simulées
- 3-Activité antibactérienne
- 4-L'auto- agrégation des isolats
- 5-Co- agrégation des entre les isolats et les souches pathogènes.....
- 6-Pourcentage d'hydrophobicité des isolats
- 7-Activité hémolytique
- 8-Résistance aux antibiotiques

III)- Evaluation des aptitudes probiotiques *in vivo*

Modèle *in vivo* d'étude des propriétés anti-inflammatoires de BL dans le cadre d'une inflammation intestinale induite à l'acide acétique

- 1.1 Inflammation intestinale chez les souris
- 1.2 Préparation de l'inoculum bactérien.....
- 1.3 Suivi des paramètres de l'inflammation intestinale
- 1.4 L'étude anatomique des fragments coliques
- Préparation des lames histologiques
- Lecture des résultats

Partie III : Résultats et discussion.....

I)-Provenance des souches

- 1 Isolement et purification.....
- 2 Identification des lactobacilles.....
- 2.1 Etude des caractères morphologiques.....
- L'aspect macro et microscopique
- 2.2 Etude des caractères biochimiques
- Recherche de la catalase.....
- Croissance à différentes températures et thermorésistance

| | |
|--|--|
| - Résultats de l'API 50..... | |
| II)-Evaluation des aptitudes probiotiques <i>in vitro</i> | |
| 1-Habilité à survivre dans les conditions gastriques simulées | |
| 2-Habilité à survivre dans les conditions intestinales simulées | |
| 3-Activité antibactérienne | |
| 4-L'auto- agrégation des isolats | |
| 5-Co- agrégation des entre les isolats et les souches pathogènes..... | |
| 6-Pourcentage d'hydrophobicité des isolats | |
| 7-Activité hémolytique | |
| 8-Résistance aux antibiotiques | |
| | |
| III)-Evaluation des aptitudes probiotiques <i>in vivo</i> | |
| -Contexte de l'étude | |
| -Suivi des paramètres de l'inflammation intestinale | |
| -Lames histologiques | |
| | |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | |
| | |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | |
| | |
| ANNEXE..... | |

Introduction

Les probiotiques sont des micro-organismes qui, en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé **(Corthier, 2006)**. Ils ont un rôle très important dans l'amélioration de la digestion et du transit intestinal, également dans le maintien de l'équilibre de la flore intestinale et de l'équilibre acido-basique au niveau du côlon.

Actuellement les bactéries lactiques forment un groupe d'organismes utilisés pour l'enrichissement de certains yaourts et laits **(Klaenhammer et al., 2007)**. Cette utilisation est due aux effets nutritionnels et thérapeutiques de ces bactéries car elles enrichissent leur milieu en vitamines (k et b), composés organiques (acides lactique et acétique), acides aminés, enzymes (lactase) et des bactériocines responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes **(Soomro et al., 2002)**. Les bactéries les plus fréquemment utilisées comme probiotiques sont des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* **(Khan et Ansari, 2007)**.

Les lactobacilles ont été incorporés dans des laits fermentés **(Heller, 2001 ; Oliveira et al., 2001)**, des fromages **(Gomes et Malcata, 1998 ; Nayra et al., 2002)** et des glaces **(Christiansen et al., 1996)**.

Par ailleurs, toutes les souches bactériennes isolées et qui ont un effet probiotique, devrait résister aux différentes conditions telles l'exposition aux enzymes gastrique, au pH bas de l'estomac, à la teneur réduite de l'O₂ dans l'intestin, ... En effet, le lait contient les bifides et les lactobacilles (*Lactobacillus casei* ou *Lactobacillus acidophilus*) qui transitent avec l'aliment, mais la plupart meurent en chemin. Les plus fortes mortalités sont observées dans l'estomac à cause de la très forte acidité, au début de l'intestin grêle dont les cellules produisent des substances défensives, et dans le gros intestin sous l'action de la microflore autochtone. De plus, pour qu'elles soient efficaces, ces bactéries doivent être administrées vivantes et en nombre très important, avec 10⁹ d'unités formant colonies (UFC) par gramme. **(Charteris et al., 1998)**.

Après l'analyse de la valeur hygiénique du lait, cette étude vise à isoler et identifier les bactéries lactiques à partir du lait cru.

La résistance des souches isolées à différentes conditions de température, de salinité, d'acidité ainsi que leurs effets en présence de souches pathogènes sont également étudiées. Afin de prouver une potentielle activité probiotique, ce qui amènerait à leur utilisation à l'échelle industrielle.

Synthèse bibliographique

I) Microflore intestinale et probiotiques

I) .1. La microflore intestinale saine

I) .1. 1 : Composition de la microflore intestinale

La flore normale est définie par la présence constante de certaines espèces dans l'intestin. Chez un individu, il existe des variations quantitatives et qualitatives en fonction de la région intestinale (**Drasar, 1974**). Si l'on exclut la bouche, directement en contact avec le milieu extérieur, les populations bactériennes présentes dans la lumière du tube digestif augmentent progressivement de l'estomac jusqu'aux selles **Figure (1)**.

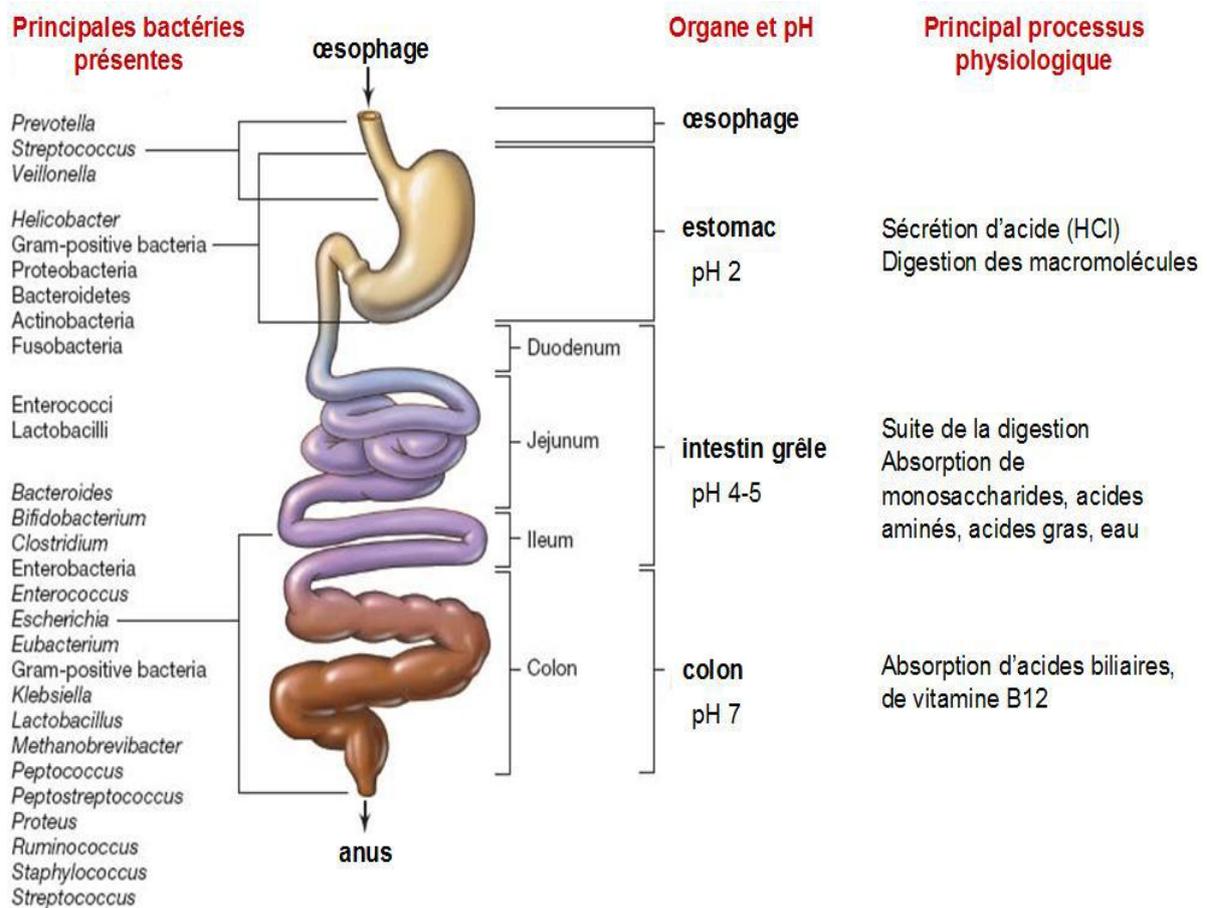


Figure (1) : Composition de la microflore intestinale humaine (Holzapfel *et al.* 1998)

L'estomac toujours contient une flore plus faible puisque le pH est très acide chez l'homme. En fait, seuls les micro-organismes à Gram positif aérobies ou anaérobies facultatives acidotolérantes sont capables d'y survivre.

Cependant, l'intestin grêle ce n'est pas un milieu favorable pour la multiplication des bactéries chez un sujet sain, et constitue une région de transit. Si les bactéries y prolifèrent,

parce qu'elles possèdent des facteurs leur permettant d'adhérer à la muqueuse, il s'agit toujours d'un phénomène pathologique. En effet, la croissance bactérienne dans l'intestin grêle est limitée par le transit rapide, les bactériocines des cellules de Paneth (**Porter et al. 2002**) et les sécrétions biliaires et pancréatiques (**Salminen et al. 1998**).

Les espèces anaérobies strictes augmentent d'une manière progressive, le long du tractus digestif. Ainsi, au niveau du côlon, leurs nombres deviennent 100 à 1000 fois plus abondants que les espèces anaérobies facultatives. Le côlon est la partie la plus peuplée (10^{10} à 10^{12} bactéries/g de contenu). Les bactéries représentent environ 50 % du poids sec des selles (**Finegold et al. 1983**). La microflore fécale constituée d'un ensemble de micro-organismes qui provient des différents biotopes du tube digestif. Du fait de la facilité de prélèvement, l'écosystème fécal est le plus étudié chez l'homme (**Marteau et al. 2001**).

I) .1. 2 : Fonctions de la microflore colique :

La stabilité de l'écosystème intestinal due à la présence de mécanismes de défense propres à l'hôte ou à la microflore résidente.

Également, il apparaît la notion de synergie, de symbiose et de commensalisme entre l'hôte et sa propre microflore.

L'utilisation de modèles animaux axéniques ou génotoxiques (animaux axéniques inoculés avec des souches bactériennes connues) a permis de réaliser des progrès considérables dans l'étude des fonctions de la flore du tube digestif (**Ducluzeau et Raibaud, 1980; Raibaud et al. 1980; Romond et al. 1990**).

Les populations microbiennes peuvent affecter les fonctions digestives et la physiologie de l'épithélium intestinal par leur activité métabolique (**Roberfroid et al. 1995**). En effet, les bactéries intestinales participent à la décomposition de substances non digérées, en particulier les glucides alimentaires (fibres, amidons résistants, sucres non absorbés) (**Gibson et Roberfroid, 1995**). Par exemple, les sucres sont essentiellement transformés en acides organiques et acides gras à chaîne courte (acétate, propionate et butyrate) (**Rumney et Rowland, 1992**).

Une autre fonction importante exercée par la flore intestinale est la maturation et la stimulation du système immunitaire de l'hôte. Le système immunitaire local associé à la muqueuse digestive ainsi que le système immunitaire général, sont fortement stimulés ou parfois inhibés, par certaines bactéries de la flore du tube digestif. Plusieurs études ont montré que la flore intestinale stimule l'activité phagocytaire (**Nicaise et al. 1993**).

I.2. Les probiotiques

I).2.1. Définition et historique des probiotiques :

La notion de probiotiques a été développée grâce aux recherches de Metchnikoff en 1907 (**Metchnikoff, 1907**). Ce prix Nobel supposait que la bonne santé des paysans bulgares était due à leur consommation des produits laitiers fermentés. Et la consommation de *Lactobacillus* influençait d'une manière positive la microflore intestinale, d'un côté diminuait la « putréfaction » et d'autre coté inhibent les activités toxiques microbiennes. Il a ainsi proposé l'ingestion de lactobacilles pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter la durée de vie.

Le terme probiotique a été introduit pour la première fois par Lilly et Stillwell en 1965 (**Lilly et Stillwell, 1965**) pour décrire les substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes. En 1991, Fuller définit les probiotiques comme étant ce sont des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale (**Fuller, 1991**). Aujourd'hui, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) (**Rapport FAO/OMS, 2002**), les probiotiques sont « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte ».

Ces microorganismes, généralement ce sont des bactéries qui influencent la santé humaine et animale et protègent de certaines infections intestinales, participent au premier lieu à la digestion et influencent le système immunitaire.

La consommation régulière de ces derniers permet d'aider à l'action des 600 espèces bactériennes (représentant environ 10^{14} bactéries) présentes dans l'intestin humain.

Actuellement, les probiotiques disponible aux marchés sous forme de différents types de produits. Ils peuvent être consommés sous la forme de suppléments alimentaires en capsules contenant des cultures viables lyophilisées ou sous la forme de produits alimentaires fermentés tels que les yogourts, qui demeurent un véhicule par excellence pour leur consommation (**Sanders, 2003 ; Parvez et al. 2006**). Ces produits contiennent une ou plusieurs souches probiotiques de genres et d'espèces différents (**Fooks et Gibson, 2002**).

I).2.2 Les micro-organismes probiotiques :

Les principaux micro-organismes connus à ce jour sont souvent des bactéries (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*) et des levures (*Saccharomyces cervicae*, *S. Boulardii*).

Ces micro-organismes sélectionnés comme des probiotiques selon leur effet bénéfique sur la santé humaine et animale puisqu'ils protègent par exemple de certaines infections intestinales, et participent aussi à la digestion et influencent le système immunitaire.

Le **tableau (1)** résume les espèces microbiennes considéré comme probiotique. Parmi ces bactéries, les lactobacilles et les Bifidobactéries sont les deux probiotiques les plus étudiés et les plus couramment utilisés en nutrition humaine.

Tableau (1) : micro-organismes considérés comme des probiotiques (Hozalpfel et al. 1998)

| <i>Lactobacillus</i> | <i>Bifidobacterium</i> | Autres bactéries lactiques | Autres micro-organismes |
|----------------------|------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>L.acidophilus</i> | <i>B. adolescentis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Bacillus spp</i> |
| <i>L.amylovirus</i> | <i>B. animalis</i> | <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>L.brevis</i> | <i>B. bifidum</i> | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | <i>Propionibacterium freudenreic</i> |
| <i>L.casei</i> | <i>B. breve</i> | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Saccharomyces cervicae</i> |
| <i>L.cellobius</i> | <i>B. infantis</i> | <i>Pedicoccus acidilactici</i> | <i>Saccharomyces boulardii</i> |
| <i>L.crispatus</i> | <i>B. lactis</i> | <i>Sporolactobacillus inulinus</i> | |
| <i>L.curvatus</i> | <i>B. longum</i> | <i>Streptococcus thermofillus</i> | |
| <i>L.delbrueckii</i> | <i>B. thermophilum</i> | <i>Streptococcus diacetylactis</i> | |
| <i>L.farciminis</i> | | <i>Streptococcus intermedius</i> | |
| <i>L.fermentum</i> | | | |
| <i>L.gallinarum</i> | | | |
| <i>L.gasseri</i> | | | |
| <i>L.johnsonii</i> | | | |
| <i>L.paracasei</i> | | | |
| <i>L.plantarum</i> | | | |
| <i>L.reuteri</i> | | | |
| <i>L.rhamnosus</i> | | | |

I) 2.3. Les Lactobacilles autant que probiotiques :

Les lactobacilles occupent la majorité des espèces à intérêt probiotiques puisqu'elles ont une grande variété des effets bénéfique sur la santé humaine et animale.

Le **tableau (2)** résume les effets bénéfiques des lactobacilles probiotiques sur la santé humaine selon la (FAO/OMS, 2001 et WGO, 2008).

Tableau (2). Effet bénéfique des lactobacilles probiotiques sur la santé humaine
(Source : FAO/OMS, 2001 ; WGO, 2008).

| Effets probiotiques | Mode d'activité propose |
|--|--|
| Réduction des risques des diarrhées | <ul style="list-style-type: none">- Résistance à la colonisation des pathogènes.- Stimulation du système immunitaire. |
| Diminution des allergies alimentaires | <ul style="list-style-type: none">- Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité membranaire intestinale.- Stimulation du système immunitaire. |
| Amélioration de la digestion du lactose | <ul style="list-style-type: none">- Action de la β galactosidase dans l'intestin grêle. |
| Traitement des maladies inflammatoires | <ul style="list-style-type: none">- Modulation de la flore intestinale.- Stimulation du système immunitaire. |
| Réduction du cholestérol | <ul style="list-style-type: none">- Assimilation du cholestérol.- Déconjugaison des sels biliaires. |
| Prévention du cancer du côlon | <ul style="list-style-type: none">- Stimulation du système immunitaire.- Production de composés antimutagéniques.-Modulation des enzymes fécales carcinogéniques.- Dégradation des carcinogènes.- Elimination des bactéries impliquées dans la production de carcinogènes. |

I) 2.4. Propriétés et critères de sélection des probiotiques :

Le tableau (3) résume les principaux critères pour sélectionner de souche a intérêt probiotique.

**Tableau (3) : Principaux critères de sélection des probiotiques
(Klaenhammer et Kullen (1999); Saarela et al. (2000); Ouwehand et al. (2002);
Gueimonde et Salminen (2006).**

| | |
|--------------------------------|---|
| 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.- Immuno-modulation- 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 et organoleptiques du produit fini. |

I) 2-4-a- critères de sécurité

○ Origine de la souche

Les probiotiques sont généralement composés par des souches bactériennes d'origine humaine retrouvées dans la flore intestinale de l'homme.

Les souches lactiques non humaines généralement leur croissance optimale comprise entre 30 et 42°C, ne résistent pas au passage dans l'estomac, sont éliminées souvent par les sels biliaires, et sont incapables de s'établir dans le tube digestif.

En revanche, les souches d'origine humaines poussent à une température de 37°C, résistantes aux conditions hostiles du tube digestif et habituellement peuvent coloniser au moins transitoirement l'intestin humain.

La muqueuse intestinale et sa microflore partagent des épitopes antigéniques communs, sans doute responsables de la tolérance immunologique de l'hôte vis-à-vis de ses bactéries résidentes (**Salminen et al. 1998 ; Mattila-Sandholm et al. 1999 ; Sarrela et al. 2000**).

- **Pathogénicité**

Les souches probiotiques doivent être sans aucun effet négatif et être sécuritaires pour la santé humaine. Pour cela les souches à effets probiotiques seront évaluées pour qu'aucun des effets secondaires suivants ne soient détectés : infections systémiques, activité métabolique nuisible, stimulation immunitaire excessive chez des individus susceptibles et transfert de gènes (par exemple de résistance aux antibiotiques) (**FAO/WHO, 2002**).

Il est important de vérifier ce critère surtout si le choix de la bactérie administrée n'appartient pas à la microflore normale de l'hôte. Depuis longtemps les bactéries lactiques (Lactobacilles et Bifidobactéries) sont utilisées pour la conservation des aliments, et cela confirme leur parfaite innocuité. Donc Ils peuvent être utilisés en industrie alimentaire. Ce qui n'est pas le cas pour les germes du genre *Enterococcus* qui peuvent posséder des caractéristiques de virulence (**Moreno et al. 2006 ; Ruiz-Moyano et al. 2008**).

I) 2-4-b critères fonctionnels

Pour qu'un probiotique soit conforme, les microorganismes doivent être capables de survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte (**Vasiljevic et Shah, 2008**).

- **Résistance aux conditions gastriques**

Les souches probiotiques, afin d'être efficaces, doivent persister et rester vivantes jusqu'à arriver à leurs sites d'action, et donc résister au cours de leur passage aux conditions défavorables de l'estomac telles que l'acidité et l'action de la pepsine.

Les lactobacilles sont naturellement bien adaptés à des pH acides (**Van de Guchte et al. 2002**).

Lors de la fermentation lactique, ils produisent et accumulent dans leur environnement des composés acides qui rendent le milieu acide et défavorable à la croissance des autres bactéries (**Adams, 2000 ; Servin, 2004**).

Les méthodes utilisées dans les études *in vitro*, de la résistance des probiotiques aux conditions stomacales reposent généralement sur la survie des bactéries mesurée au premier lieu par dénombrement sur des milieux de culture gélosés après exposition à des conditions similaires au jus gastrique.

○ **Résistance aux conditions intestinales**

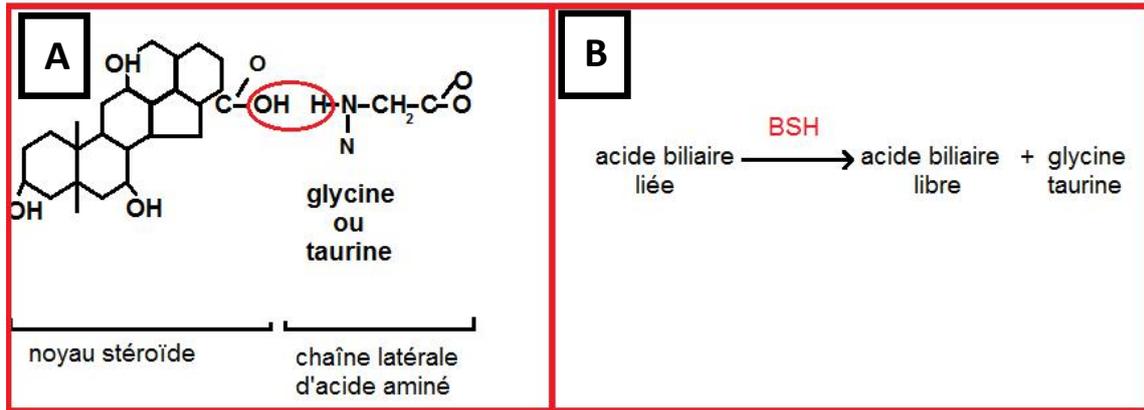
Les acides biliaries sont formés par des dérivés du cholestérol et par des stéroïdes acides sécrétés par le foie stocké dans la vésicule biliaire et injectés dans le duodénum après l'alimentation, son principal rôle est la fragmentation des gros globules de lipides alimentaires conduisant aussi à la formation de microgouttelettes. Cette émulsion permet la digestion des lipides par la lipase pancréatique.

Le deuxième rôle des acides biliaries est d'inhiber la prolifération des bactéries de la flore intestinale dans la partie haute de l'appareil digestif par désassemblage des membranes biologiques (**Begley et al. 2006**).

Les tests de résistance à la bile reposent sur la survie et le comptage des bactéries après exposition à l'oxgall (**Huang et Adams, 2004**). Le temps d'exposition est généralement de quatre heures, il correspond au temps de passage du digeste au niveau intestinal (**Parasad et al. 1998 ; Huang et Adams, 2004**).

Plusieurs études ont montré que les souches probiotiques d'origine intestinale notamment les lactobacilles ont développé des résistances à l'action détergente des sels biliaries. L'un des mécanismes de cette résistance est la dé-conjugaison des sels biliaries grâce à l'action de « Bile Salt Hydrolase » (BSH) qui est appelée aussi cholyglycine hydrolase.

Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des sels biliaries conjugués avec la glycine ou la taurine en résidus d'acides aminés et en sels biliaries libres ce qui a pour effet de diminuer la solubilité de la bile et de réduire son activité détergente (**Begley et al. 2006 ; Hamon et al. 2011**).



**Figure (7) : (A) La structure chimique des acides biliaires.
(B) La réaction catalysée par l'enzyme BSH**

- **Adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte**

Afin d'exercer l'effet bénéfiques des probiotiques, ces derniers doivent être capables d'adhérer au mucus intestinal ou aux cellules épithéliales et persister dans l'intestin (Collado *et al.* 2005 ; Xiaodong *et al.*, 2009). Ce critère empêche leur évacuation rapide par la contraction intestinale et après écoulement du digeste. Vu que l'étude d'adhérence des probiotiques *in vivo* est difficile, différentes méthodes ont utilisé des lignés cellulaires intestinales d'origine humaine, *in vitro* en culture comme modèles mimant l'épithélium intestinal (Vesterlund *et al.* 2005 ; Gueimonde *et al.* 2006). La lignée Caco-2 est l'un des meilleurs modèles pour étudier l'adhésion bactérienne (Servin, 2003). Elle a été isolée à l'origine d'un adénocarcinome du colon humain (Fogh *et al.*, 1977).

Les mécanismes d'adhésion des lactobacilles nécessitent plusieurs protéines de leurs structures de surface. Parmi ces structures, les adhésines ce sont des protéines ou des sous unités de glycoprotéines de la couche S (S layer). Elles possèdent au même temps une extrémité N-terminale (ayant un peptide signal qui cible le transport de la protéine vers la membrane plasmique), une extrémité C-terminale (qui contient un motif LPxTG reconnu par une famille de protéines appelées sortases et qui va permettre l'ancrage de la protéine au peptidoglycane de la paroi bactérienne) et un domaine MUB (pour Mucus Binding protein) (Ton-That *et al.* 2004, Marraffini *et al.*, 2006).

Dans une étude (**Antikainen et al. (2002)**) a démontré qu'il y a une autre protéine CbsA de *L. crispatus* JCM 5810 pouvait adhérer aux collagènes, à la laminine et aux acides lipotéichoïques. Il a démontré aussi que la protéine SlpA de *L. brevis* ATCC 8287 adhérait à des lignées cellulaires épithéliales humaines et à la fibronectine (**Hynonen et al. 2002**).

- **Activité antimicrobienne**

Un bon probiotique doit être capable d'inhiber localement le développement des germes indésirables (**Hudault et al. 1997**) donc l'activité antimicrobienne contre les germes pathogènes est un critère important pour la sélection des souches probiotiques.

La méthode la plus utilisée est la Co-incubation généralement sur un milieu gélosé permettant la croissance du probiotique et de la gamme de souches pathogènes indicatrices (**Dunne et al. 2001**).

I) 2-4-c critères technologique

- **Aptitude à la production industrielle**

Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les souches probiotiques doivent posséder plusieurs critères de qualités telles que la facilité à être cultivée à de hautes densités cellulaires tout en conservant leurs propriétés biologiques et leur stabilité au cours des procédés de production et d'entreposage (**Champagne et al., 2005**). À ce titre, de nouvelles technologies permettant de produire des souches probiotiques à haute viabilité et fonctionnalité sont actuellement disponibles (**Lacroix et Yildirim, 2007**).

- **Aptitude du probiotique aux conditions de stockage**

Les souches probiotiques doivent rester stables lors le stockage. Sous forme de préparations concentrées, le médicament ou l'additif alimentaire doivent pouvoir se conserver au moins pendant une année (**Bell, 2001 ; Siuta-Cruce et Goulet, 2001**).

- **Activité acidifiante et protéolytique**

La fermentation du glucose conduit à la production des produits acides. Cette production entraîne une baisse de pH, par la suite va jouer sur les goûts et les odeurs sans oublier que l'acidification limite les risques de développement des flores pathogène dans les produits.

La protéolyse joue un rôle important dans plusieurs fonctions biologiques chez les bactéries lactiques tel que l'activation et la dégradation de protéines. La machinerie protéolytique des bactéries lactiques est constituée d'un ensemble d'enzymes qui hydrolysent des oligopeptides et de ce fait, produisent les substances responsables de la flaveur et de la Texture des produits fermentés (**Ammor et al. 2005**).

I) 2-5 Mécanisme d'action des lactobacilles probiotiques

Les modes d'action par lesquels les probiotiques exercent certain effets protecteurs ou thérapeutiques ne sont pas totalement élucidés, mais en parallèle plusieurs mécanismes ont été proposés.

La Figure (2) représente les mécanismes d'action significatifs associés aux bactéries probiotiques pour la prévention contre la colonisation et la croissance des bactéries pathogènes lors une infection entérique.

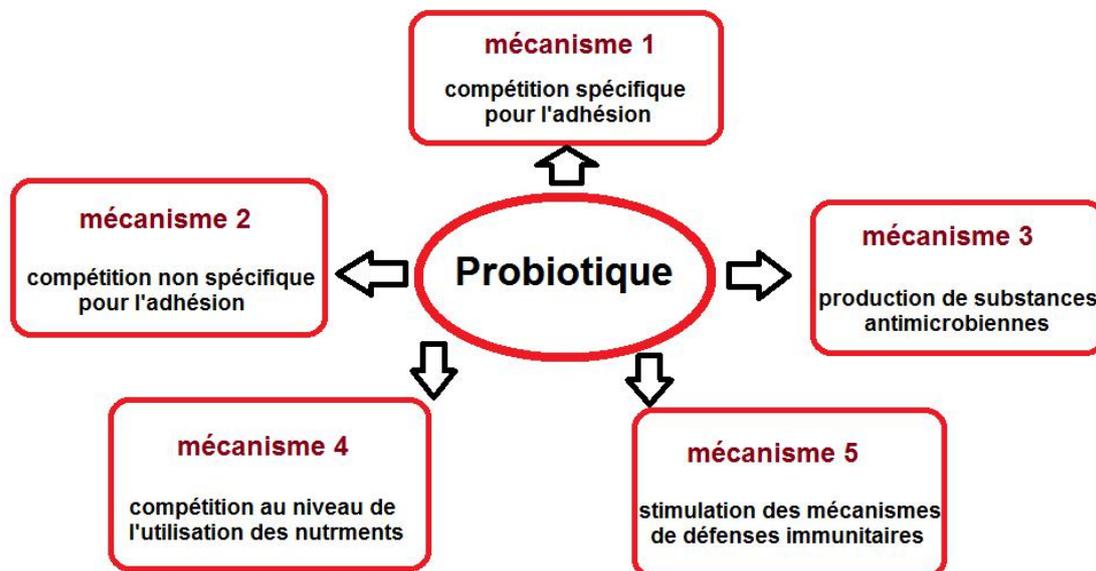


Figure (2) : Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le traitement des infections entériques. Adapté de Calder et Kew (2002); Kaur et al. (2002).

Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion

La plupart des infections intestinales sont initiées par l'adhésion des pathogènes aux cellules entérocytaires de l'hôte. Certaines Bifidobactéries et lactobacilles probiotiques auraient la capacité de bloquer physiquement l'accès aux entérocytes (Gill, 2003 ; Servin et Coconnier, 2003 ; Servin, 2004 ; Picard et al. 2005). Ce mécanisme d'action serait similaire à celui exercé par le microbiote intestinal résident face aux infections microbiennes (Liévin-Le Moal et Servin, 2006).

Les mécanismes de compétition de l'adhésion se font fréquemment de deux façons, Ils peuvent survenir soit de façon spécifique par l'intermédiaire des adhésines ou de façon non spécifique en impliquant des interactions électrostatiques ou hydrophobes, des forces passives et stériques (Servin et Coconnier, 2003). Les Deux exemples de ces modes de compétition sont présentés à la Figure (3).

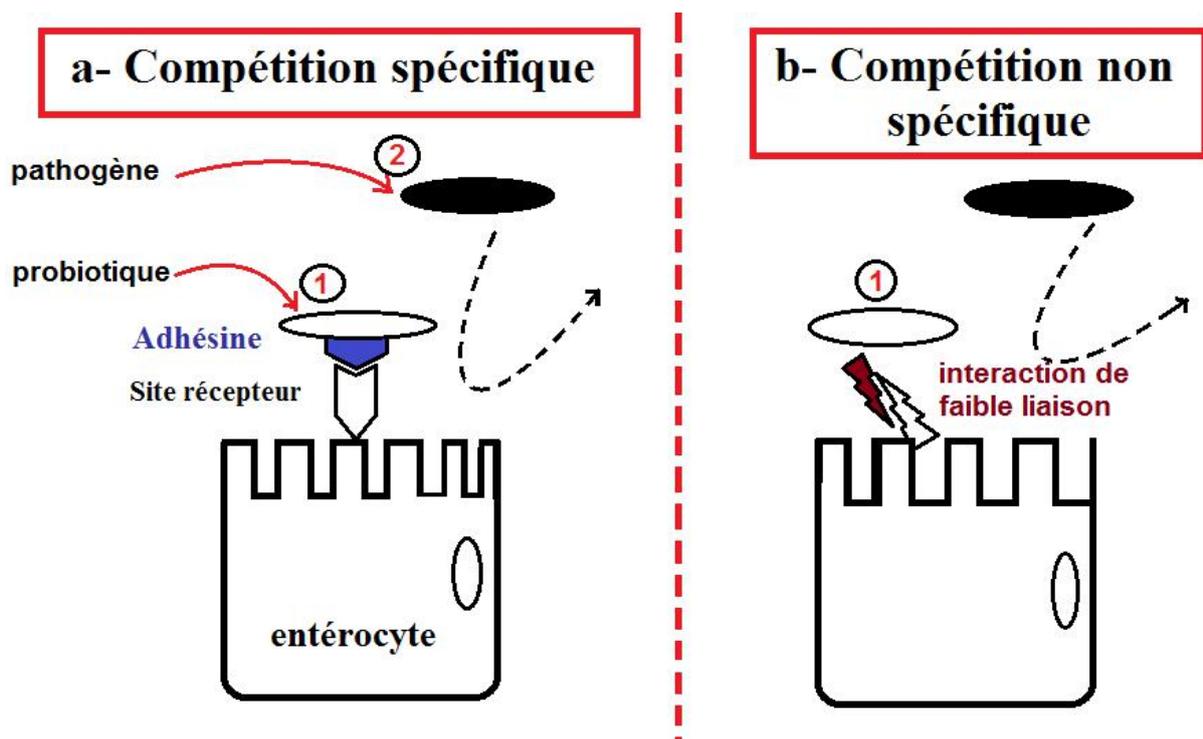


Figure (3) : le Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des dû à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques.

Les études *in vitro* identifiant le mécanisme de compétition de l'adhésion utilisent pour la plupart les lignées cellulaires intestinales Caco-2 et HT-29. Ces cellules sont généralement appropriées à ce type d'expérience car elles présentent une structure similaire aux entérocytes que l'on retrouve *in vivo* (Pinto et al. 1983 ; Zweibaum et al., 1991).

Production des substances antimicrobienne

Ce mécanisme d'action des probiotiques est spécifiquement pour l'inhibition de la croissance des pathogènes grâce à leur capacité des produire des substances antimicrobienne actives *in vitro* et *in vivo* sur ces derniers. Ces substances sont les acides organiques (acide lactique, acétique et le diacetyl, le peroxyde d'hydrogène et des substances de nature protéiques appelées bactériocines (Servin, 2004).

Les acides lactique et acétique sont produits au cours de la fermentation lactique. Leurs activités antibactériennes s'expriment par deux manières contre les germes pathogènes :

- Une action directe où les acides organiques diffusent passivement à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée. Ils acidifient le cytoplasme après dissociation et inhibent l'activité enzymatique cellulaire des pathogènes acidosensibles, cette diminution du pH peut donc affecter la viabilité des pathogènes bactériens (Aiba *et al.*, 1998 ; Alakomi *et al.*, 2000 ; Lavermicocca *et al.*, 2008).
- Une action indirecte due à la tolérance de l'acidité par les lactobacilles et par conséquent, dans un milieu acide leur compétitivité bactérienne est avantagée par rapport aux autres bactéries (Servin, 2004 ; Tejero-Sarinena *et al.* 2012).

Les souches des lactobacilles sont catalase négative et certaines souches capables d'accumuler du peroxyde d'hydrogène H₂O₂. La formation du peroxyde d'hydrogène serait due à la l'action d'oxydase et d'une superoxyde-dismutase (Condon, 1987). Le peroxyde d'hydrogène capable d'inhiber une grande variété des pathogènes. Cette capacité a été démontrée avec les surnageant de culture de *L. johnsonii* NCC533 et *L. gasseri* CRL1421, deux souches capables d'inhiber la croissance de pathogènes alors que les surnageant traités à la catalase ne le permettaient pas (Otero et Nader-Macias, 2006 ; Pridmore *et al.*, 2008).

La figure (4) montre l'activité antibactérienne d'une souche de *Lactobacillus fermentum* contre *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*. Les images, observées par microscopie électronique, montrent la désorganisation et la détérioration des cellules des germes pathogènes (Klayraung et Okonongi, 2009).

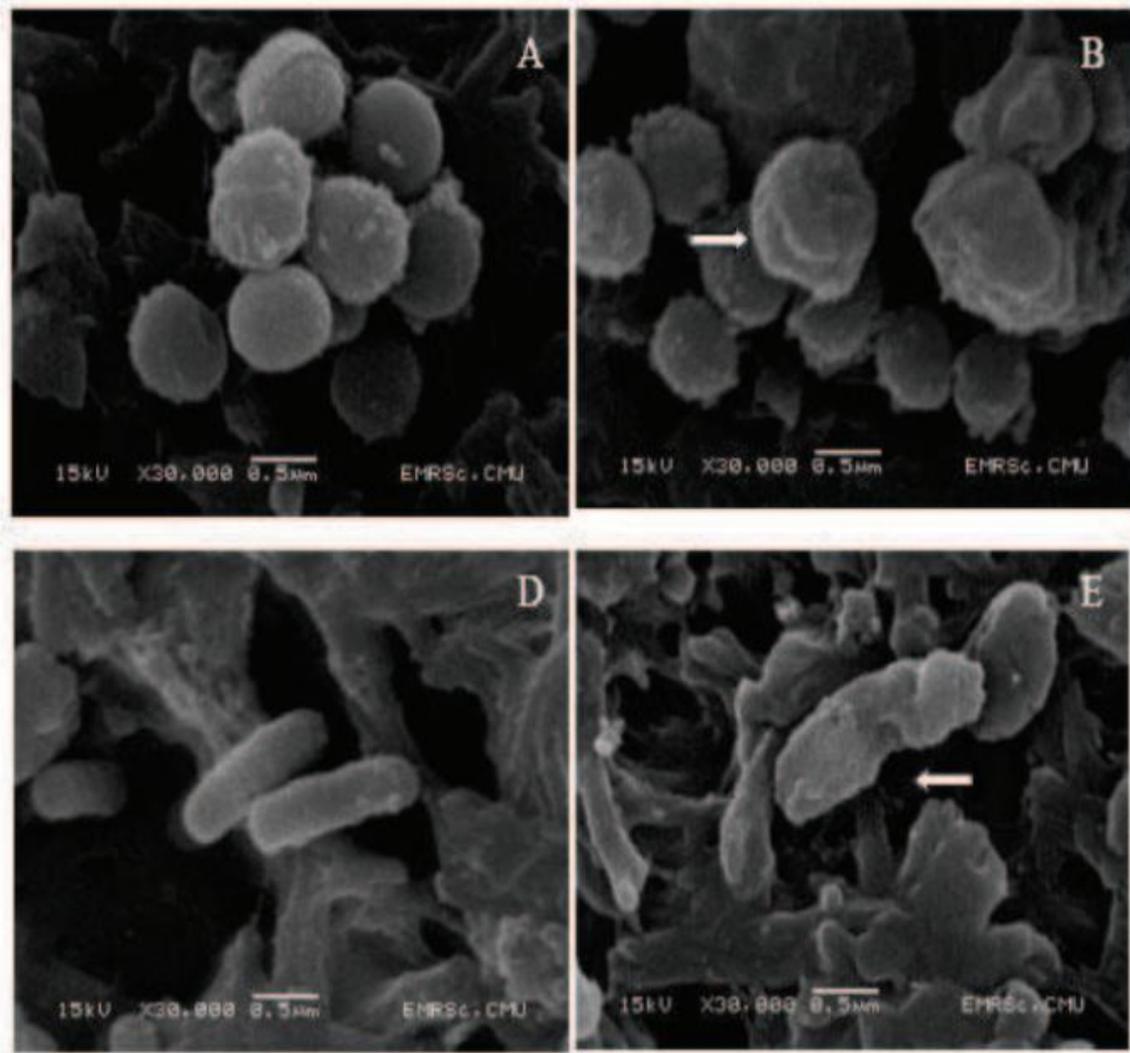


Figure (4). Activité antibactérienne d'une souche de *L. fermentum* contre *Staphylococcus aureus* Et *Listeria monocytogenes*. Les images (B) et (E) montrent des cellules détériorées de *S. aureus* et *L. monocytogenes* respectivement. Les images A et D correspondent à leurs cultures sans *Lactobacillus* (Microscopie électronique à balayage) (Klayraung et Okonongi, 2009).

Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments

L'inhibition de la croissance des pathogènes peut s'effectuer également par un processus de restriction des nutriments. Il est évident que la capacité des microorganismes à entrer en compétition pour limiter les nutriments disponibles est un facteur non négligeable **(Fuller, 1991)**. Ce dernier détermine la composition du microbiote intestinal. Ainsi, l'augmentation du nombre de lactobacille obtenue lors de la consommation de probiotique permettrait de diminuer les substrats disponibles pour l'implantation des germes pathogènes **(Oelschlaeger, 2010)**.

Immune-Stimulation

Ce mécanisme stimulé par l'interaction des lactobacilles avec le système immunitaire pour déclenche la réponse immune de l'hôte contre les pathogènes. Quelques auteurs soulignent une stimulation de l'immunité adaptative (IgA, IgG) et innée (macrophages, basophiles, monocytes) **(Lee et Mazmanian , 2010)**.

D'autres modes d'action de probiotiques ont été également proposés , par :

- Co-aggrégation : l'isolement des pathogènes dans des agrégats (formés par l'adhésion des cellules de Lactobacilles entre elles qui empêche leur implantation dans les intestins) **(Pagnini et al., 2010)**.
- L'activation des cellules de la muqueuse et du système immunitaire par les micro-organismes peut entraîner la production de molécules antibactériennes (défensines et lysozymes) ou d'antitoxines (la phosphatase alcaline) par les cellules de l'hôte **(Madsen et al., 2001)**.
- Le contact des probiotiques avec les cellules humaines peut augmenter la solidité des jonctions serrées, ce qui limite les dommages causés par l'inflammation et les macrophages qui apparaissent au site d'infection tout en compliquant la translocation des pathogènes **(Oelschlaeger, 2010)**.

Ces mécanismes d'action exposés dans cette partie présentent les connaissances actuelles sur l'action des lactobacilles probiotiques contre des pathogènes entériques.

Plusieurs recherches se développent pour identifier les mécanismes d'action des probiotiques contre les germes pathogènes.

II. Effets bénéfiques des probiotiques

1. Utilisation des probiotiques en santé humaine

Plusieurs allégations santé ont été associées à l'utilisation des lactobacilles probiotiques comme étant médicaments ou alicaments chez l'Homme. Les principaux effets bénéfiques selon (**Reid *et al.*, 2003, Hsieh et Versalovic, 2008 ; Vasiljevic et Shah, 2008**) sont :

- Atténuation de l'intolérance au lactose.
- Prévention et traitement des diarrhées.
- Prévention des allergies atopiques.
- Diminution du risque de réapparition des infections urinaires.
- Prévention et retardement de l'apparition de certains cancers.
- Prévention et thérapie des vaginoses bactériennes.
- Réduction du taux de cholestérol et prévention de certaines maladies cardiovasculaires.
- Modulation et stimulation de la fonction immunitaire.
- Prophylaxie et thérapie des maladies intestinales inflammatoire : maladie de Crohn et le syndrome du côlon irritable.
- Prévention et traitement de l'infection par *Helicobacter pylori*

Le principal objectif de la consommation des probiotiques est d'améliorer la flore microbienne naturelle intestinale et par conséquent, leur plus grande évidence, sur la santé humaine, concerne leur rôle sur l'intestin par l'inhibition des germes pathogènes et la prévention et/ou le traitement des diarrhées infectieuses (**FAO/OMS, 2002**).

2. Probiotiques et inflammation intestinale

Comme leur nom l'indique, les inflammations intestinales touchent l'intestin et causent différentes pathologies chez l'homme. Du fait de leur caractère chronique, ces maladies se caractérisent par des périodes de poussées inflammatoires durant lesquelles les patients sont pris de diarrhées abondantes, douloureuses et parfois mêmes sanglantes.

Les causes de ces maladies ne sont pas encore bien connues, mais elles peuvent être d'origine génétique, immunitaire ou environnementale. Des études précédentes ont montré que l'apport de certaines bactéries pouvait diminuer l'effet inflammatoire mais ne guérit pas la maladie.

Les bactéries probiotiques protègent la barrière intestinale en empêchant la réduction de l'expression des protéines des jonctions serrées et en évitant l'apoptose des cellules épithéliales **(Mennigen, Nolte et al. 2009)**. Outre leur capacité à agir directement sur l'épithélium intestinal possédant des propriétés anti-inflammatoires ont démontré leurs efficacités sur les inflammations intestinales. Ces bactéries vont activer les cellules immunitaires qui vont initier une cascade de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β et freiner la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, l'IL-10 et le TNF- α **(Preidis and Versalovic 2009)**.

Matériels
et
méthodes

L'objectif de ce travail est d'isoler des souches de lactobacilles à caractères probiotique à partir de lait de vache cru. Notre travail est réalisé au Laboratoire de Microbiologie du centre universitaire Belhadj Bouchaib/ Ain Témouchent.

I : Isolement

1. Prélèvement et collection des échantillons

- Les prélèvements étaient effectuées à partir des fermes dans des zones rurales de la région de Ain Témouchent, on a choisi trois fermes de la région : Hammam Bouhdjar, Ain l'araba, Chabat el lehm. De chaque ferme on a colleté de trois vaches différentes.

- La traite avait lieu le matin avant la sortie du troupeau au pâturage, la quantité prélevée est de 50 ml dans des conditions aseptiques afin d'éviter toutes sorte de contamination.

- Les échantillons collectés dans des pots stériles et acheminés, dans des glacières directement au laboratoire pour être analysés le jour même.

2. Isolement des bactéries lactiques

✓ Préparation des dilutions décimales et ensemencement :

- Après enrichissement en incubant le lait cru à 37°C pendant 24h ,1 ml de chaque échantillon est pipeté aseptiquement dans 9 ml d'eau physiologique stérile c'est la solution mère. Après homogénéisation, 1ml de cette solution mère est transféré dans 9 ml d'eau physiologique ; c'est la dilution 10^{-1} . De la même manière, les dilutions suivantes sont préparées jusqu'à la dilution 10^{-7}
- Un ml de chaque dilution est ensemencé sur gélose MRS à raison de 3 boites par dilution et incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24 à 72 h.

3. Purification des bactéries lactiques

- La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS (pH 5,4) en incubant pendant 48h à 72h (**Badis et al., 2005**).Le prélèvement et la remise en suspension sont réalisés, uniquement, pour des colonies bien distinctes, homogènes et bien développées. La pureté de la souche est vérifiée par examen macroscopique et microscopique.

4. Conservation des souches

- Les souches sont ensemencées sur gélose MRS inclinés en tube et placés à 4°C et le renouvellement des cultures se fait toutes les deux semaines. (**Saidi et al.,2002**).

5. Identification des isolats

5.1. Critères morphologiques

5.1.1. Examen Macroscopique

- Il s'agit d'une observation visuelle de la culture des isolats sur gélose MRS qui permet de décrire l'aspect des colonies (la forme, la taille, la pigmentation, le contour ...)
(Badis et al., 2005).

5.1.2. Examen microscopique

- **Etat frais**

- Une colonie bien distincte est prélevée et inoculée dans un tube contenant 5 ml de bouillon MRS et incubée pendant 24h à 48h jusqu'à l'apparition d'un trouble, une goutte de la suspension bactérienne est mise entre lame et lamelle et observée au microscope au G×40 afin de mettre en évidence la mobilité et mode de groupement des bactéries.

- **Coloration de Gram**

- Les isolats sont soumis à la coloration de Gram (**Annexe I**), qui permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et de nous renseigner sur le mode d'association (**Singleton, 1999**).

5.2. Critères physiologiques et biochimiques

5.2.1. Recherche de la catalase

- La catalase a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. Son action directe est mise en évidence dans la masse bactérienne (**Guiraud, 1998**).

- La méthode de recherche de la catalase consiste à prélever une colonie sur gélose MRS et la dissocier dans une goutte d'eau oxygénée. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz (**Marchal et al., 1982**).

5.2.2. Croissance à différentes températures

- Ces tests permettent d'évaluer l'aptitude d'une espèce bactérienne à se croître dans une large gamme de température, selon (**Badis et al., 2005**) :

- Des tubes contenant du bouillon MRS sont inoculés par les souches isolées.
- Les tubes sont incubés à 15°C, 30°C et à 45°C pendant 24h à 48h.
- La croissance est appréciée par examen des milieux.
- Pour la thermorésistance, on fait déposer des tubes inoculés des souches précédentes dans un bain marie à 63,5°C pendant 10 min, suivis d'un refroidissement brusque, et incubées à 37°C pendant 48 à 72 h. Un résultat positif se traduit par un trouble.

5.2.3. Profil de fermentation des sucres

- L'étude du profil fermentaire des sucres des souches isolées est réalisée par galerie API 50 CHL qui est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone et ses dérivés pour l'identification des lactobacilles, Le test est réalisé selon les étapes suivantes :

- **Préparation de l'inoculum**

- A partir d'une culture pure d'une nuit sur gélose MRS, des colonies sont prélevées par écouvillonnage et ensemencées sur milieu CHL 50 afin d'obtenir une suspension bactérienne d'une densité de 2 McFarland (McF) standard.

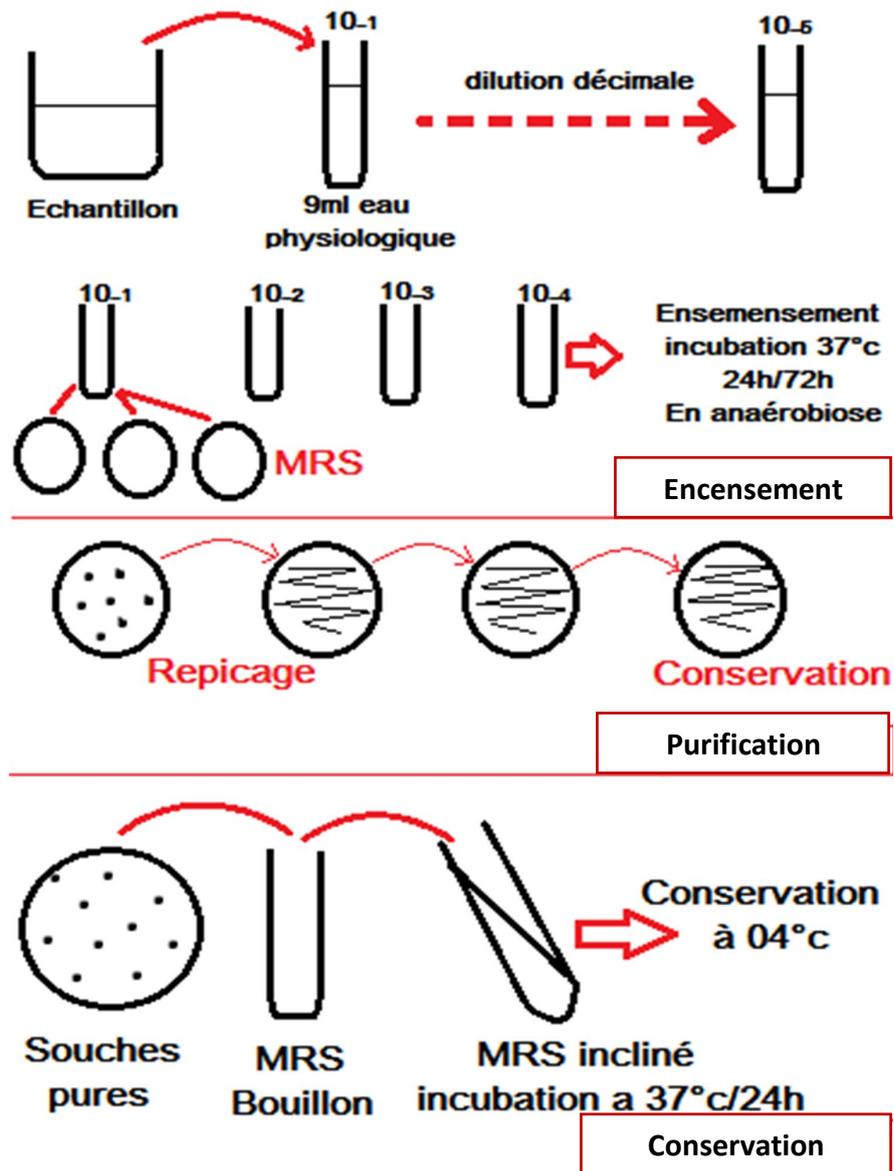
- **Ensemencement, incubation et lecture**

- Les 50 microtubes de la galerie API 50 CHL sont inoculés par la suspension bactérienne de chaque souche avec une pipette stérile en évitant la formation de bulles d'air en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule et ensuite une couche de paraffine stérile est ajoutée.

- L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 à 48 h en anaérobiose.

- La fermentation se traduit par un changement de couleur dans les microtubes, dû à une production d'acides en anaérobiose révélée par l'indicateur du pH du milieu choisi (premier tube sans principe actif sert de témoin négatif).

- La lecture des résultats peut se faire par le logiciel Api web (Biomerieux) via le site <https://apiweb.biomerieux.com> pour le traitement des résultats et l'identification des espèces.



Figure(5) : Schéma explicatif des différentes étapes d'isolement des souches lactiques

II : Évaluation des aptitudes probiotiques in vitro

- L'étude des caractères probiotiques a été réalisée selon le diagramme de sélection des souches probiotiques (Havenaar et al. 1992 ; FAO/OMS, 2002). Figure (6)

- Dix souches ont été sélectionnées pour notre étude : LB1, LB2, LB3, LB4, LB9, LB11, 6904, LBK 2, KB1, CK1, respectivement (*L. Plantarum* ; *L.paracasei* ; *Fermentum* ; *Acidophilus* ; *L.brevis* ; *L.acidophilus* ; *L.plantarum* ; *L.lactis* ; 2 *lactobacillus sp*) qui ont subi des traitements qui résument à peu près le stress que peut suivre un micro-organisme probiotique durant son passage dans le tube digestif.

1)- Habilité à survivre dans les conditions gastriques simulées

- Plusieurs études ont utilisées l'acidité pour évaluer la survie des probiotiques lors du passage de l'estomac. Dans notre étude, nous avons tester nos souches vis-à-vis de l'effet du pH bas accompagné de la pepsine.

- La tolérance des LB au stress acide a été effectuée selon la technique décrite par **(Huang et Adams, (2004). Figure (7)**

- Au premier lieu, un jus gastrique simulé est préparé comme suit :

- 3g/l de pepsines ont ajoutés à une solution de NaCl à 0.5% (P/V)
- La préparation est ajustée à pH 2.5.

- Un millilitre de chaque culture (10^9 cellules.ml⁻¹/DO620nm entre 0,5 et 0,7) sont inoculé dans 9 ml du suc gastrique simulé.

- 0,1 ml du suc gastrique sont prélevé à 0 h et 2 h d'exposition etensemencés par étalement sur gélose MRS.

- Le nombre des bactéries viables est déterminé après 48 à 72 h d'incubation à 37°C en anaérobiose par la méthode de dénombrement selon la formule suivante :

$$N = \Sigma c / (V \times 1,1 d)$$

Avec :

N = concentration en nombre d'UFC par millilitres

Σc = somme des colonies comptées sur les deux boites retenues.

V = volume de l'inoculum appliqué à chaque boite en millilitres.

d = dilution correspondant à la première boite retenue ; avec l'inoculum le moins dilué.

- L'expérience est répétée trois fois.

- Les isolats résistants à l'acidité sont conservés pour le test de la résistance aux sels biliaries.

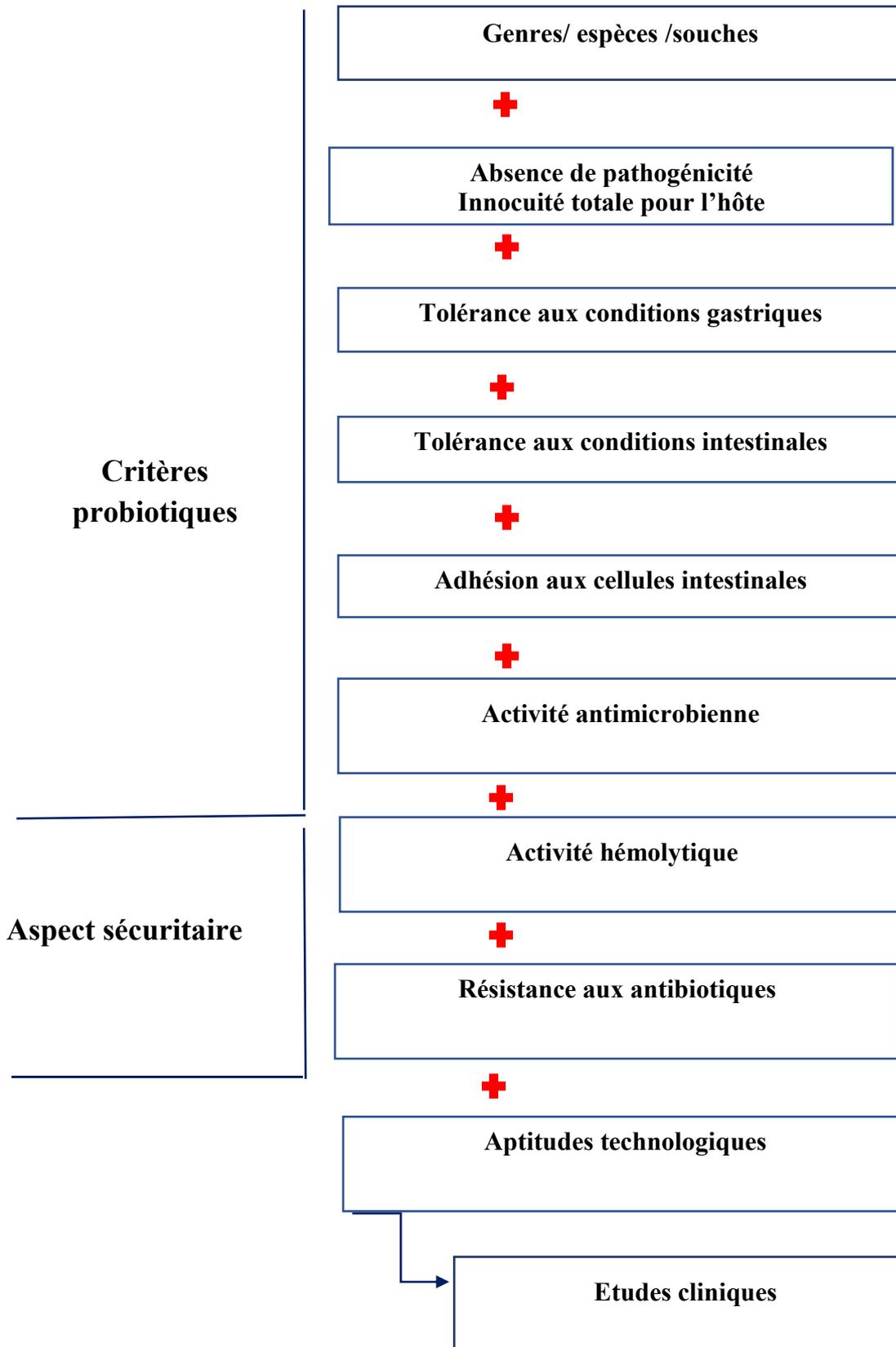


Figure (6): Diagramme de sélection, in vitro, des souches microbiennes à usage probiotique (Havenaar et al. 1992 ; FAO/OMS, 2002).

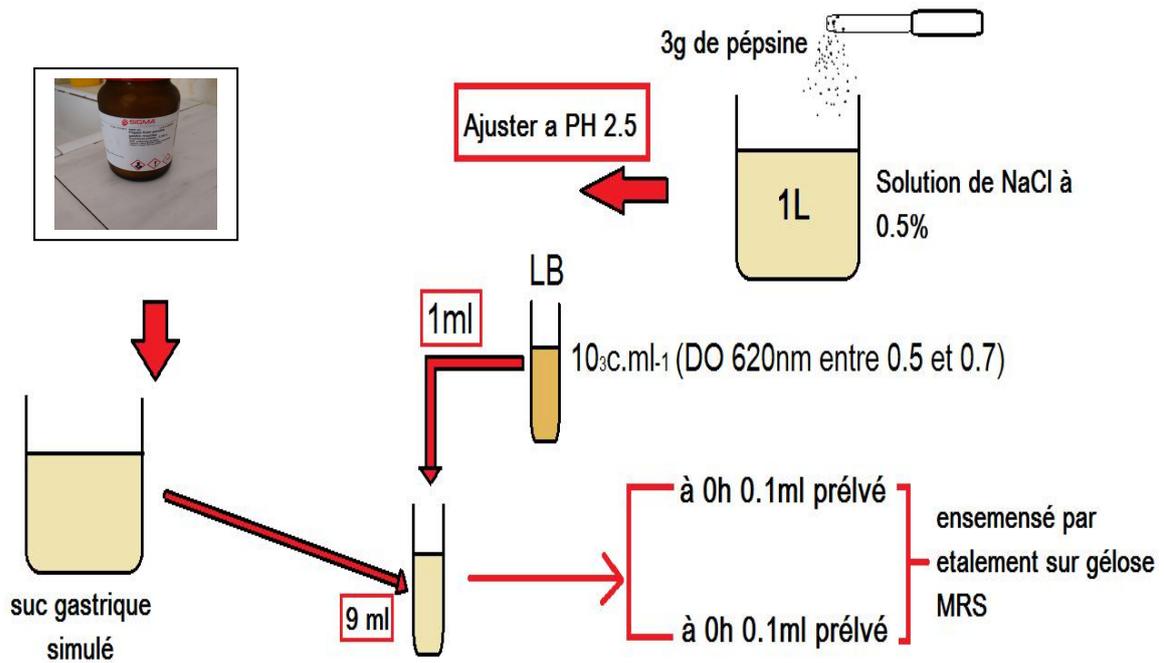


Figure (7) : Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'habilité des bactéries lactiques à survivre dans les conditions gastriques simulées.

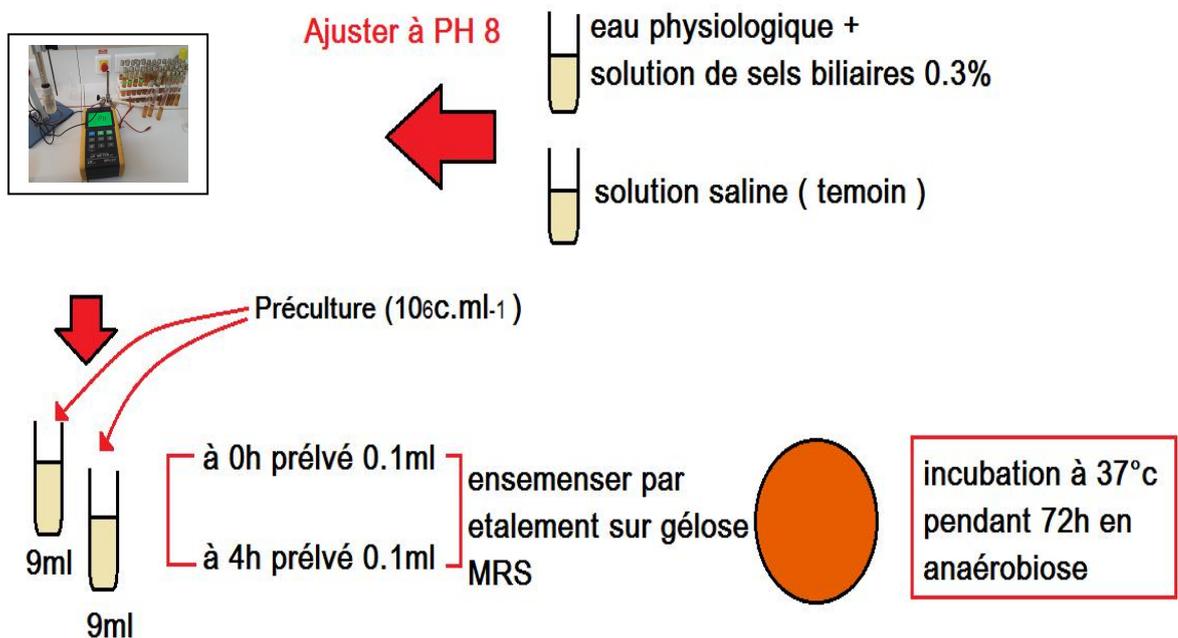


Figure (8) : Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'habilité des bactéries lactiques à survivre dans les conditions intestinales simulées.

2)- Habilité à survivre dans les conditions intestinales simulées

- Le test de résistance des isolats aux sels biliaires est effectué selon la méthode décrite par **(Both et al, 2010)** avec quelques modifications. **Figure (8)**

- Deux solutions sont préparées :

Une solution de sels biliaires à 0.3 % est ajoutée dans l'eau physiologique.

Une solution saline sans sels biliaires est utilisée comme témoin.

- Les deux préparations sont ajustées à pH 8.

- Une pré-culture bactérienne (10^9 cellules.ml⁻¹) est inoculée dans 9 ml des deux préparations.

- 0,1 ml de chaque préparation est prélevé à 0 h et 4 h d'exposition etensemencés par étalement sur gélose MRS et les bactéries viables sont dénombrées après 24 à 72 h d'incubation en anaérobiose.

3)- Activité antibactérienne

- Pour détecter l'activité antimicrobienne des isolats, nous avons suit la technique de diffusion en puits, décrite par **(Hechard et al., (1990). Figure (9)**

- Le principe de cette méthode, consiste en un contact direct entre les souches de bactéries lactiques déposé sous forme de spots avec des souches pathogènes indicatrices.

- Pour les bactéries indicatrices : *Escherichia coli*O55, *Pseudomonas aerogenosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteridis*, notre choix a été porté sur des souches locales sensibles aux antibiotiques ; **Tableau (4)**

Tableau (4) : bactéries indicatrices utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques

| Souche | Origine | Milieu de culture | T° | Temps et mode d'incubation |
|--------------------------------------|---|-------------------|------|----------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 | Isolée de laboratoire de microbiologie alimentaire de l'université Ahmed Ben Bella (1) Oran | Bouillon nutritif | 37°C | 24h en aérobie |
| <i>S.aureus</i> ATCC25923 | | | | |
| <i>P.aerogenosa</i> ATCC27853 | | | | |
| <i>S. enteridis</i> | | | | |

- Le test a été réalisé selon les étapes suivantes. **Figure (9)**

- Des cultures jeunes d'une nuit des bactéries lactiques sont préparées sur bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 18 h à 24h.
- En parallèle, des cultures d'une nuit sont préparées, également, sur bouillon nutritif pour les souches indicatrices.
- Vingt millilitres de gélose MRS fondue à 45 ° C sont mélangés avec 200 µl de chaque souche indicatrice en suspension ($\sim 10^9$ cellules. ml⁻¹). Le mélange est versé dans des boîtes de Pétri et laissés refroidir.
- Des puits de 6 mm sont creusés dans la gélose MRS mélangée avec la souche indicatrice, 50 µl d'une suspension de LB (10^9 cellules.ml⁻¹) est placé dans les puits.
- Les boites sont incubées à 37°C pendant 24 à 72h, les essais sont réalisés en triple.
- L'apparition d'une zone claire au tour des puits et ayant un diamètre supérieur à 2mm est considéré comme un résultat positif

- Afin d'éliminer l'effet antimicrobien lié au pH acide des acides organiques et au peroxyde d'Hydrogène, nous avons suivi la méthode décrite par (**Barfoot et Klaenhammer.,1983**) qui permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique avec la souche pathogène **Figure (9) :**

- Une culture fraîche de 18h est centrifugée (8000rpm/10min), réfrigérée et le surnageant est conservé.
- Les surnageant sont stérilisés par filtration à travers une membrane à 0,22 µm de pores.
- Une solution stérile de catalase (1000 U.ml⁻¹, Sigma) est ajoutée à chaque surnageant filtré (1ml de catalase pour 10 ml de surnageant) afin d'éliminer les effets possibles d'inhibition par le peroxyde d'hydrogène ensuite les surnageant sont neutralisés à pH 6,5 avec du NaOH.
- Des boites Pétri contenant du MH etensemencées par la souche pathogène (10^6 à 10^7 UFC/ml), des puits sont réalisés.
- Ces derniers seront remplis de 100µl de surnagent de la souche lactique et incubé à 4°C pendant 2h pour permettre une meilleure diffusion de la substance active puis incubé à 37°C/24h.
- L'inhibition de la croissance de l'agent pathogène est déterminée par la mesure des zones d'inhibition.

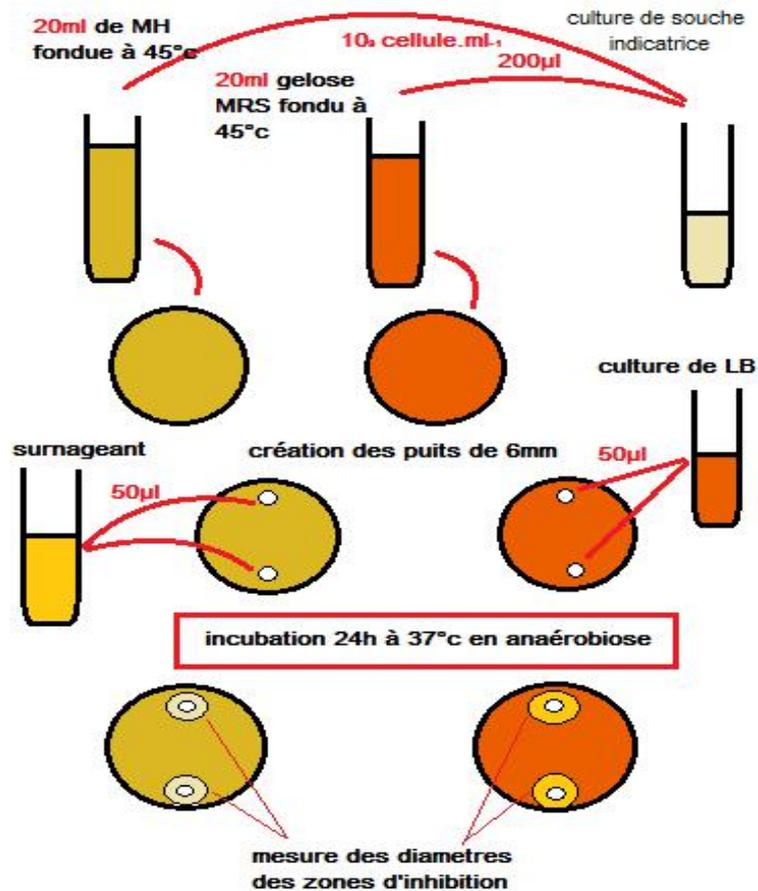


Figure (9): Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'activité antibactérienne des lactobacilles

4)- Test d'auto-agrégation

- Les tests d'auto-agrégation sont effectués suivant deux méthodes qualitative et quantitative.

- Selon la méthode de (Reniero *et al.*, 1992) :

- Une culture de 24h de croissance de l'isolat a testé est centrifugée (8000 rotations par minutes (rpm) pendant 10 minutes), puis on passe 2 ml de surnageant à travers d'un filtre de 0.45 µm.
- On ajoute 0.1 ml de ce surnageant stérile à 5 ml d'une suspension du même isolat et on vortex le mélange.
- Les tubes sont incubés à température ambiante pendant 2h.
- L'auto-agrégation est notée positive quand on observe une sédimentation au fond des tubes et un surnageant clair.
- Les tubes sont examinés toutes les quinze minutes pendant deux heures.

- Selon la méthode de **(Del Re et al, (2000))** :

- Une culture de 24h de croissance de l'isolat a testé est centrifugées (15 min, 4500 rpm), lavées deux fois dans du PBS (**ANNEXE II**) et re-suspendues dans du PBS à une DO de 1.
- 4 ml de suspension cellulaire sont ensuite vortexés pendant 10 secondes et l'auto-agrégation est déterminée pendant 5 h d'incubation à 37 °C.
- Chaque heure, 0,1 ml est prélevé de la suspension et une mesure d'absorbance est effectuée.
- Le pourcentage de l'auto-agrégation est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ auto-aggregation} = (1 - A_t / A_0) \times 100$$

5)- Test de Co-aggrégation

- Ce test est effectué selon la méthode de **(Jin et al, 1996)** :

- Une suspension de chaque isolat de LB et des suspensions de bactéries pathogènes de références sont ajoutées dans un tampon phosphate (pH =7).
- 0.5 ml de chaque isolat de LB et une quantité similaire des suspensions bactériennes précédentes sont mis dans des tubes à essai et homogénéisés par agitation.
- En parallèle, 1 ml de chaque suspension et 1 ml de la suspension de chaque isolat sont mis chacun dans des tubes à essai.
- Après 4h d'incubation à 37°C, la densité optique (DO 600) de chaque tube est mesurée.
- Le pourcentage de Co-aggrégation est exprimé de la façon suivante :

$$\% \text{Co-aggrégation} = [(PC + LC) / 2 - (P + L) / (PC + LC) / 2] \times 100$$

PC : représente la DO du tube témoin contenant la suspension de la bactérie pathogène.

PL : représente la DO du tube témoin contenant la suspension de lactobacille.

P+L : représente la DO de la culture mixte de la bactérie pathogène et lactobacille.

6)- Mesure de % hydrophobicité

L'adhésion aux cellules épithéliales est évaluée par hydrophobicité de la surface cellulaire suivant la méthode de (**Drakseleret *al*, 2004**) avec quelques modifications :

- Après 18h de croissance, Les bactéries sont lavées deux fois et re-suspendues dans 5 ml de PBS (concentration cellulaire finale de 10^8 UFC/ml).
- 1 ml de xylène est ajouté aux tubes à essai contenant 3 ml de la solution précédente.
- Les tubes sont vortexés pendant 90 s puis laissés au repos pendant 15 min pour la séparation de deux phases.
- La densité optique de la phase aqueuse est ensuite mesurée.
- L'hydrophobicité est présentée par le pourcentage de la diminution de l'absorbance de la suspension bactérienne calculée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'hydrophobicité} = [(\text{Absorbance avant homogénéisation} - \text{absorbance après homogénéisation}) / \text{Absorbance avant homogénéisation}] \times 100$$

7)- Activité hémolytique

- L'activité hémolytique des isolats est vérifiée par la méthode de (**Maragkoudakis et *al*.2006**).

- Des géloses à base de sang frais sont préparées,ensemencées en stries par des cultures d'une nuit des LB et incubées pendant 48 h à 37°C.

- Après incubation, les boîtes sont examinées pour des signes de β -hémolyse (zones claires autour des colonies), α -hémolyse (zones avec reflets verdâtres autour des colonies).

8)- Résistance aux antibiotiques

- La résistance des LB aux antibiotiques est évaluée par la méthode de diffusion en disques selon (**Charteris et *al*. 1998**). **Figure 10**.

- Des boîtes Pétri de gélose MRS préalablement coulées et solidifiées sontensemencées en stries avec des cultures fraîches (18h) de LB à l'aide des écouvillons.

- Les disques d'antibiotiques (**Tableau 5**) sont déposés à la surface à l'aide d'une pince stérile et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24h.

- Après incubation, les zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques sont mesurées.

- La souche *E. coli* ATCCC25922 est utilisée comme contrôle de qualité(ANNEXE IV)

Tableau (5) : Les ATB utilisés dans le test de résistance aux antibiotiques

| | ATB | La charge |
|--|-------------------|-----------|
| les inhibiteurs de la paroi bactérienne | pénicilline | (10 U/I) |
| | ampicilline | 10µg |
| | oxacilline | 1 µg |
| | céfoxitine | 30µg |
| les inhibiteurs de la synthèse protéique | gentamicine | 10 µg |
| les inhibiteurs des acides nucléiques | acide nalidixique | 30µg |

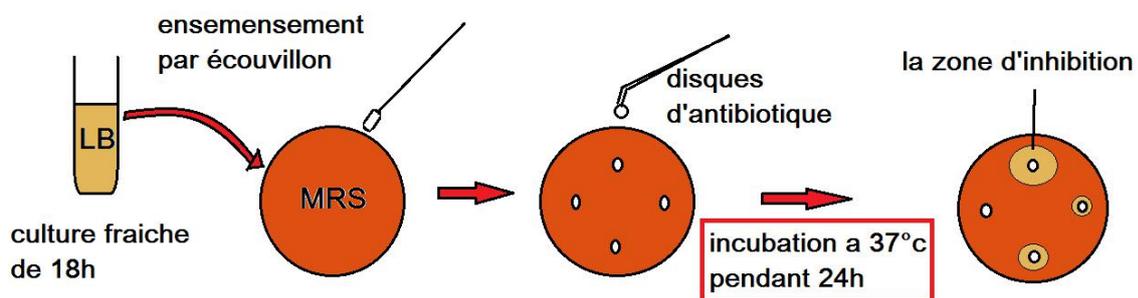


Figure (10) : Schéma illustrant la sensibilité des souches aux différents antibiotiques

III / Evaluation des aptitudes probiotiques *in vivo* :

Modèle d'étude *in vivo* des propriétés anti-inflammatoires de LB dans le cadre d'une inflammation intestinale induite au DSS

Dans le cadre de cette étude, nous avons testé chez la souris les propriétés anti-inflammatoires de 2 souches bactériennes que nous avons identifiées grâce au criblage *in vitro*. Nous avons choisi pour cela un modèle largement utilisé : le modèle d'inflammation au DSS.

1)- Inflammation chimio-induite au DSS :

Il existe plusieurs manières de simuler les maladies inflammatoires intestinales chez l'animal. En effet, plusieurs produits peuvent entraîner des lésions plus ou moins importantes au niveau du tube digestif des souris.

Le modèle d'inflammation intestinale provoqué par DSS est jugé fiable pour ce genre d'études (**Rochat et al., 2007 ; Watterlot et al., 2010**).

L'ajout de DSS dans l'eau de boisson des souris pendant 7 jours reproduit les symptômes d'une colite :

Perte de poids rapide accompagné de diarrhées sanglantes ou non, la rupture de l'épithélium intestinal, un raccourcissement de la longueur du colon ainsi qu'épaississement de sa paroi, selon la concentration de DSS utilisée.

Nous avons réalisé les essais avec 3% de DSS.

2)- L'inflammation intestinale

2.1- Les animaux

Des hamsters (*Cricetinae*) mâles, âgés de 6 à 8 semaines ont été utilisés pour l'expérience. Ils sont répartis en 4 lots (4 hamsters/cage). Les expérimentations ont commencé après une semaine d'acclimatation des hamsters avec un accès illimité à la nourriture et à l'eau de boisson (elle permet aux animaux de retrouver un état d'homéostasie alimentaire et hormonal qui aurait pu être compromis par le stress du transport).

Ils ont été maintenus dans des conditions contrôlées de température et de lumière (lumière/ noirceur de 12h/12h).

Les 4 lots sont répartis comme suivant :

Lot 1 : Témoin (4 hamsters sains/ ne reçoivent aucun traitement).

Lot 2 : 4 Hamsters sains / traitement probiotique.

Lot 3 : 4 Hamsters sous traitement DSS.

Lot 4 : 4 Hamsters sous traitement DSS / traitement probiotique.

2.2- Nourriture et boisson

Nos hamsters étaient nourris 3 fois par jour, à 9h, 13h et 18h. les portions alimentaires sont composées d'un mélange de céréales, maïs et des fruits.

L'eau était présentée également 3 fois par jour de façon égale et à heure fixe.

Les consommations en eau et en aliment des hamsters sont pesées quotidiennement pour contrôler l'alimentation de ces derniers selon la formule :

Nourriture consommée(g) = Nourriture présentée(g) – Nourriture résiduelle (g).

2.3- Le mode opératoire

Le protocole que nous avons utilisé est adapté avec (**Rosique et al.,2012**) montré dans **la Figure (11)**

La solution de DSS est préparée et renouvelée tous les deux jours dans l'eau de boisson des hamsters.

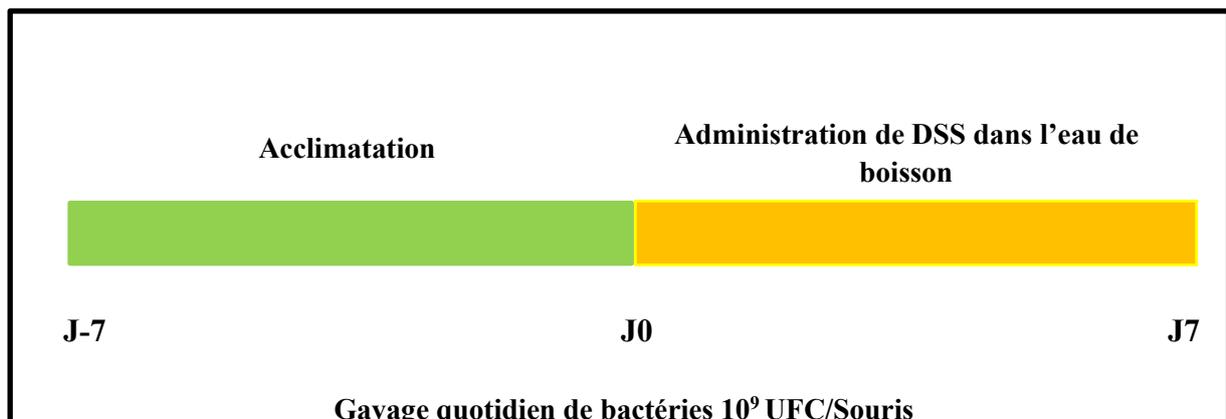


Figure (11): Protocole de la colite induite au DSS

2.4- Préparation des bactéries

Des cultures jeunes de bactéries lactique sélectionnées précédemment *in vitro* comme probiotique [*L. plantarum* (6904), *L. acidophilus* (Lb4)] étaient centrifugées à 3000 rpm pendant 10 minutes puis les culots sont lavés dans du PBS stérile.

Le culot est resuspendu ensuite dans le PBS pour avoir une concentration finale de 10⁹bactérie/ ml, Les hamsters reçoivent quotidiennement par voie orale 2ml de chaque dose bactérienne pendant 7 jours.

Un hamster de chaque lot est sacrifié à jour 7 par dislocation cervicale sous anesthésie par voie intra-péritonéale à la Kétamine (10 mg) puisque les hamsters ayant un système veineux périphérique difficile d'accès. **Figure (12)**

3)- Suivi des paramètres de l'inflammation intestinale

3.1. Avant abattage

Les animaux sont surveillés tous les jours pour vérifier les paramètres suivants :

- Les pertes de poids par rapport au poids à J0.
- L'aspect des selles (consistance normale, molles collantes, diarrhée liquide).
- La présence de sang dans les selles.

3.2. Après abattage

Les colons étaient récupérés pour vérifier les paramètres suivants :

- La longueur du côlon (non ouvert).
- Le contenu colique (présence du sang, la consistance)
- L'état de la muqueuse (recherche d'ulcérations, l'épaississement de la muqueuse...)

Ensuite, un échantillon du colon prélevé de chaque hamster est mis rapidement dans du formol et envoyés à l'établissement hospitalier Dr Benzarjeb, service d'Anatomie et cytologie pathologique pour l'étude histologique de ces derniers.

4)- L'étude histologique des échantillons

4.1. L'étude macroscopique

La taille de l'échantillon est mesurée (les quatre colons) et mentionnés ainsi qu'une observation visuelle pour repérer la différence entre les échantillons a analysés.

4.2. L'étude microscopique

Afin de réaliser des lames histologiques, nous avons suit les étapes suivantes :

4.2.1. La fixation

Elle s'est effectuée par immersion des fragments de colon a analysés dans le formol pour la conservation des structures et le durcissement du tissu.

4.2.2. La déshydratation

Les échantillons sont immergés dans des bains d'alcools de concentrations croissantes afin d'éliminer l'eau contenu dans le tissu vu que la paraffine est hydrophobe.

4.2.3. Inclusion

Après l'élimination des traces de l'alcool, de la paraffine fondue est coulée dans les cassettes qui porte le prélèvement. Après refroidissement, on obtient un bloc de paraffine dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

4.2.4. Les coupes

On passe le bloc de paraffine dans un microtome qui permet de réaliser des petites tranches disposées en séries régulières sous forme de rubans. Ensuite les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

4.2.5. La coloration

Tous d'abord, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation après un déparaffinage par la chaleur et des bains de toluène en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée. Ensuite on fait immerger les lames dans des bains de colorants (Hématoxyline, Eosine, Trichrome de Masson, safran) qui colore les noyaux en violet et l'éosine les cytoplasmes en rose

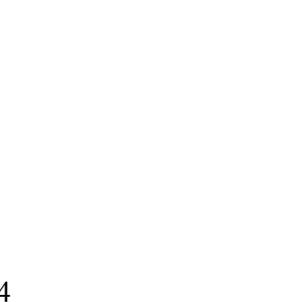
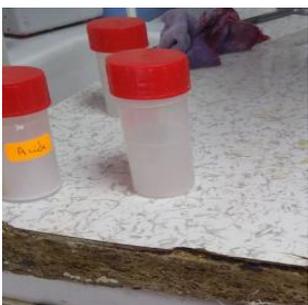
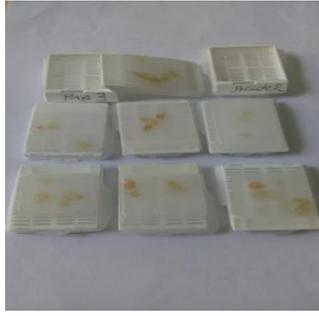


Figure (12) : les étapes de dessiccation d'un hamster et le prélèvement du colon





4



5



6

Figure (13) : les étapes de l' étude histologique du colon

Résultats
et
discussion

1- Isolement et purification

L'isolement des bactéries lactiques sur le milieu de culture MRS à partir de trois échantillons du lait de vache cru a permis l'obtention de plusieurs colonies de différents aspects (colonies lenticulaires de couleur jaune clair, des colonies rondes parfois bombées de couleur blanchâtre de taille variable, Il y a aussi l'aspect de colonies de forme irréguliers gluantes et d'une couleur crème) **Figure (14)**.

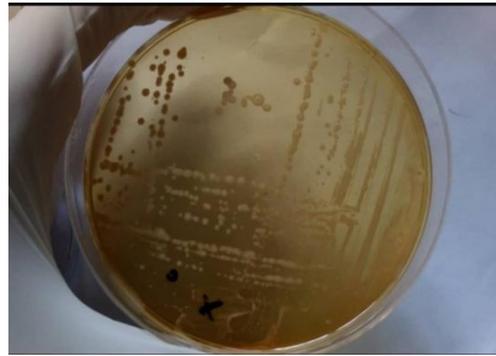


Figure (14). Aspect macroscopique de différentes colonies de bactéries lactiques

Nous avons repiqué que les colonies caractéristiques du genre lactobacillus sur milieu MRS, les colonies opaques, lisses et blanchâtres qui nous permis d'obtenir dix souches pures après plusieurs repiquages successifs.

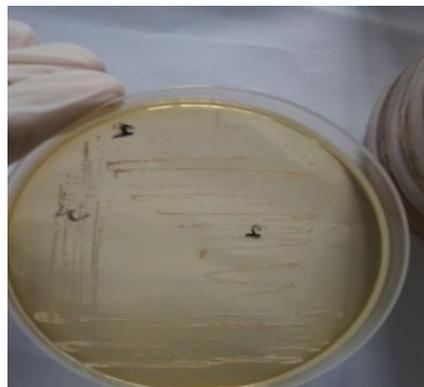
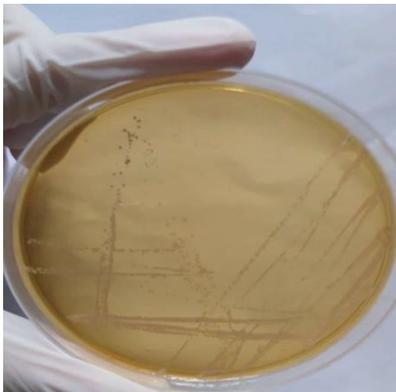


Figure (15). Aspect macroscopique de différentes colonies de

2- Identification des lactobacilles

2.1. Examen Macroscopique

Les colonies sont apparues de petite taille, de couleur blanchâtre ou laiteuse, de forme lenticulaire à pourtour régulier et elles dégagent une odeur agréable, semblable à celle des laits fermentés.

2.2. Examen microscopique

Après coloration de Gram l'observation microscopique a révélé que nos souches sont Gram positif, de forme bacilles ou bâtonnet. **Figure (16)**

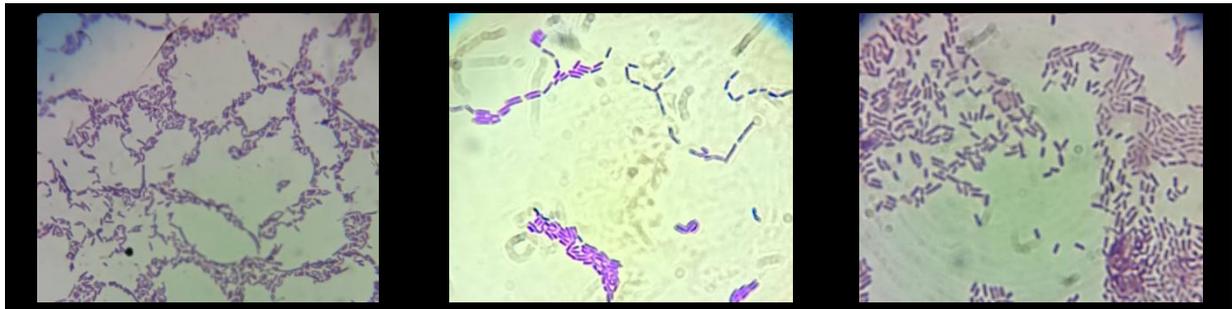


Figure (16). Observation microscopique après coloration de Gram au G x100.

Via ces critères (l'aspect des colonies et les cellules) nos isolats appartenaient au genre *Lactobacillus* ce qui est en accord avec les études menées par (Leveau et al.,1991 ; Sutra et al.,1998).

2.3. Test catalase

Les résultats de ce test ont révélé que toutes les souches isolées sont catalase négative. Selon (De Vos et al., 2009) les lactobacilles sont catalase négative.

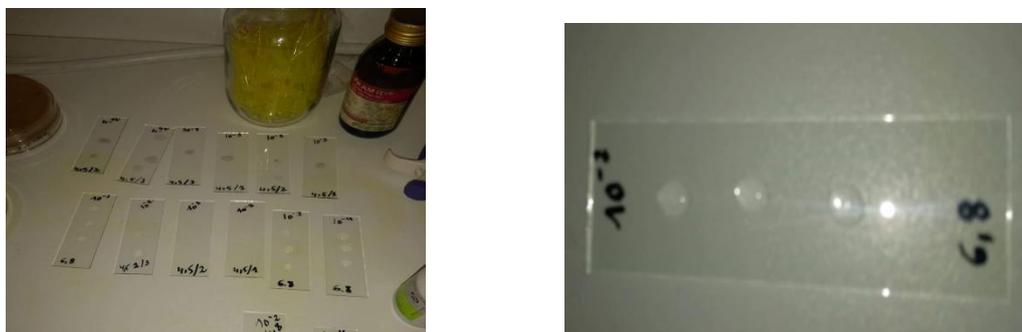


Figure (17). Résultats de test catalase chez les isolats lactiques

2.4. Croissance à différentes températures

Dans ce test, la majorité des souches testées sont thermophiles, elles poussent bien à 44°C après 48 h d'incubation à l'exception des souches LBK 2, KB1, CK1 qui est incapable à se développer à cette température, elles sont considérées comme des bactéries lactiques mésophiles. **Figure (18).**

Après exposition à une température de 63,5°C pendant 10 min suivis d'une incubation de 48h, tous les isolats ont révélés un résultat positif. Cela est en accord avec les résultats menés par (**Tailliez.,2004**), la plupart des lactobacilles se multiplie dans une gamme de températures comprise entre 15 °C et 42 °C. Certaines souches de lactobacilles dite « thermophiles » restent viables à 55 °C.

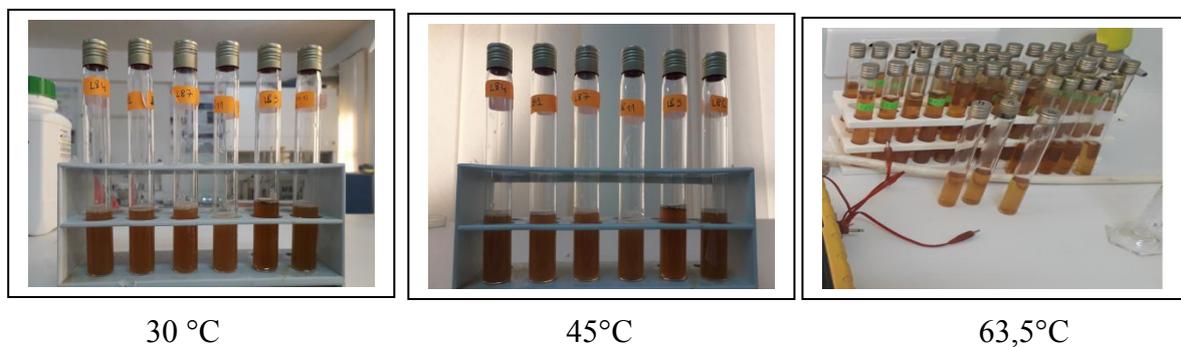


Figure (18) : La croissance à différentes températures

2.5. Profil de fermentation des sucres

Les résultats du profil fermentaire des sucres par système API 50 des huit souches testées sont mentionnés dans le tableau indiqué dans (**l'annexe III**). Ce test nous a permis d'identifier approximativement nos souches dont la répartition est la suivante :

Lb1 : *Lactobacillus plantarum* ; Lb2 : *Lactobacillus paracasei* ; Lb3 : *Lactobacillus fermentum* ; Lb4 : *Lactobacillus acidophilus* ; Lb9 : *Lactobacillus brevis* ;
LB11 : *Lactobacillus acidophilus* ; 6904 : *Lactobacillus plantarum* ; LBK2 : *Lactobacillus lactis*.

En comparant le profil fermentaire des sucres de nos souches, nous constatons qu'une même espèce de bactérie lactique peut présenter des biotopes différents par exemple le cas de LB4 et LB11 qui appartiennent les deux à l'espèce acidophilus mais leurs profils fermentaires ne sont pas identiques.



(a)



(b)

■ (+) : Fermentation du sucre

■ (-) Pas de fermentation

Figure (19) : Exemple de profil fermentaire des bactéries lactique (a), (b)

(a) *L.plantarum* 6904 ; (b) *L. acidophilus* Lb11

1)- **Habilité à survivre dans les conditions gastriques simulées**

Les souches probiotiques, pour être efficaces, doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin, et donc résister lors de leur passage à des conditions hostiles de l'estomac telles que l'acidité et l'action de la pepsine (**Dunne et al., 2001**)

Durant le jeûne, le pH stomacal peut descendre très bas, jusqu'à atteindre 1,5 chez certaines personnes ce qui peut affecter fatalement la croissance bactérienne (**Draser et al. 1969**) mais in vitro les essais à pH 2.5 / 3 sont préférables pour la sélection des souches probiotiques (**Garriga et al., 1997**) et le passage du bol alimentaire dans le tractus digestif ne dépasse pas 2h selon (**Ehrmann et al.,2002**).

Dans notre travail, les lactobacilles testées ont montré des comportements très différents vis-à-vis de leur sensibilité au pH 2.5 et à l'action de la pepsine, parmi les dix souches, huit souches ont résisté à ces conditions gastriques simulés après 2h d'incubation et ils ont montré des taux de survie plus ou moins intéressants et variables d'une souche à une autre avec des pertes de viabilité non négligeables notamment pour les souches :

L. acidophilus (Lb11), *L. paracasei* (Lb2), *L. lactis* (LbK2), *L. brevis* (Lb9) respectivement allant de 50% à 80 %, on remarque aussi que quelques souches de lactobacillus ont marqués une très faible croissance dans ces conditions voir même deux autres souches ont été totalement inhibée. Contrairement aux souches *L. Plantarum* (Lb1), *L. Acidophilus* (Lb4) qui ont montrés une résistance remarquable vis-à-vis du suc gastrique artificiel à pH 2.5 avec une moyenne de taux de survie très importante qui dépasse 75%, les résultats sont représentés dans le **Tableau (6)**

Il en ressort ainsi, que la sensibilité des Lactobacillus au pH acide dépend de la souche ; on remarque que le taux de survie se diffère d'une souche à l'autre même au sein de la même espèce, *L. acidophilus* (LB4) 74.90% ; *L. acidophilus* (LB11) 28.68% ce qui montre que la résistance est un caractère individuelle indépendant propre à la souche.

Notre résultat est en accord avec ceux rapporté par (**Fernandez et al.,2002**)et (**Zago et al.,2011**) sur des souches de lactobacilles qui ont montrés une bonne adaptation au suc gastrique simulé à pH 2.5 et que les souches d'origine humaine appartenant aux espèces : *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum* et au groupe *L. casei* possèdent une tolérance importante aux conditions stomacales montrés dans des études similaires de (**Lim et al., 2000 ; Dunne et al., 2001 ; Xiaodong et al., 2009**).

Dans une autre étude similaire (**Bahri., 2014**) ont trouvé que sur 52 souches de lactobacilles testées, 16 seulement ont résisté après 1h d'incubation et seulement 6 souches ont montré une résistance remarquable après 2h d'exposition (*L. plantarum* F12 (61,34 %), suivie par *L. paracasei* B13 (54,61 %) *L. fermentum* H2 (48,06%), *L. brevis* G6 (47,52 %) et *L. paracasei*A20 (23,78 %) ce qui corrèle avec nos résultats puisque seulement ces dernières qui ont pu résister à ces conditions simulés avec des taux de survie variables après 2h d'incubation.

Cette résistance peut être expliquée par la capacité des lactobacilles à limiter l'entrée des acides dans leur cytoplasme ou par alcalinisation du milieu intracellulaire grâce aux ATPases (**Poolman et al., 1991 ; Nanatani et Abe, 2011**) et puisque les huit souches acido-résistantes sélectionnées dans notre étude sont hétérofermentaires ; On suppose que leur résistance à l'acidité est due, entre autres, à la fermentation malolactique dans laquelle la décarboxylation de L-malate en L-lactate et production de CO₂ permet l'alcalinisation du cytoplasme et la production d'ATP comme il a été montré par (**Poolman et al., 1991 ; Nanatani et Abe, 2011**).

Tableau (6): Habilité des souches de lactobacilles à survivre dans les conditions gastriques simulées.

| Souches | Nombre de cellules viables (UFC.ml-1) | | | | Taux de survie |
|------------------------------------|---|-----------|---------------------|-----------|----------------|
| | DO = 0.5 | | | | |
| | 0h | | 2h | | |
| | UFC/ ml | Log | UFC/ ml | Log | |
| - LB 1- <i>L. plantarum</i> | 1,2 * 10 ⁸ | 8±0,02 | 7,4*10 ⁶ | 6,86±0,03 | 85.75% |
| - LB 2 – <i>L. paracasei</i> | 1,9*10 ⁸ | 8,27±0,11 | 1,5*10 ³ | 3,17±0,07 | 38% |
| - LB 3 – <i>L. fermentum</i> | 1,1*10 ⁸ | 8±0,13 | 7,6*10 ³ | 3,88±0,32 | 48,5% |
| - LB 4 – <i>L. acidophilus</i> | 2,7*10 ⁸ | 8,43±0,02 | 2,1*10 ⁶ | 6,32±0,01 | 74,90% |
| - 6904- <i>L. plantarum</i> | 9,4*10 ⁷ | 7,98±0,00 | 1,3*10 ⁴ | 4,11±0,02 | 51% |
| - LB 9- <i>L. brevis</i> | 2,6*10 ⁸ | 8,41±0,03 | 2,2*10 ⁴ | 4,34±0,04 | 49,26% |
| - LB 11 – <i>L. acidophilus</i> | 3,0*10 ⁸ | 8,47±0,04 | 2,7*10 ² | 2,43±0,01 | 28,68% |
| - LB K2- <i>L. lactis</i> | 3,1*10 ⁸ | 8,5±0.04 | 2,1*10 ³ | 3,32±0,13 | 39% |
| Lactobacillus sp (1 souches) | Très faible taux de survie à pH 2,5 après 2h d'exposition | | | | |
| Lactobacillus sp. (1 souches) | Aucune survie à pH 2,5 après 2h d'exposition | | | | |

Les valeurs de log UFC.ml. -1 expriment la moyenne ± écart-type, chaque point de donnée est la moyenne des mesures répétées de 03 expériences réalisées indépendamment, n = 3. P < 0,05

2)- Habilité à survivre dans les conditions intestinales simulées

Les isolats résistants à l'acidité sont testés pour leur capacité à résister à pH 8, avec et sans 0,3% de sels biliaries. Après 4 h d'exposition et la viabilité est évaluée par dénombrement et les résultats de ce test sont présentés dans le **Tableau (7)**

Les huit souches testées présentent une résistance très différente en présence de la bile, nous avons remarqué une diminution plus importante de la viabilité de la majorité des lactobacilles testés en présence de la bile, cependant, on note une légère diminution n'atteignant même pas le 1% observée chez les souches *L. paracasei* (Lb2) et *L. brevis* (Lb9) dans les mêmes conditions, mais sans la bile.

Sept souches ont marqué une bonne tolérance aux conditions intestinales simulées avec des taux de survie variant de 34% à 90% à savoir *L. plantarum* (Lb1), *L. Acidophilus* (Lb4), *L. paracasei* (Lb2), *L. fermentum* (Lb3), *L. plantarum* (6904), *L. brevis* (Lb9) en présence de la bile après 4h.

La souche la plus résistante est *L. acidophilus* (Lb4) avec un taux de survie de 89% suivie par *L. plantarum*(6904) avec un taux de 87% en présence de la bile, le taux de survie a diminué pour atteindre les valeurs de 78%, 51%, 36%, 34% pour les souches *plantarum* (Lb1), *L. fermentum* (Lb 3), *L. brevis* (Lb9), *L. paracasei* (Lb2) respectivement. En revanche, la souche *L. acidophilus* (Lb11) est presque totalement inhibée dans ces conditions et sa viabilité a diminué de plus de 2 logs UFC.ml⁻¹ dans le milieu alcalin sans la bile.

La résistance aux sels biliaires est une caractéristique importante qui permet aux lactobacilles de survivre et atteindre leurs sites d'action (**Hyronimus et al. 2000**) ; La concentration moyenne de la bile intestinale est considérée comme étant 0,3% P/ V, en outre, le temps de passage est suggéré être de 4 heures (**Song et al., 2015**).

Dans notre étude, tous les isolats ont pu supporter la concentration de 0.3% de sels biliaries après quatre heures d'exposition à l'exception de *L. acidophilus* (Lb11) ce qui est en accord avec les résultats portés par (**Dunne et al., 2001 ; Haller et al., 2001 ; Köll et al., 2010 ; Guo et al., 2015**) sur la résistance des lactobacilles aux conditions intestinales simulées observés avec des souches appartenant aux espèces : *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. paracasei sp paracasei* et *L. brevis*. En contrepartie, (**Burns et al., 2008**) ont trouvés que la plupart des souches appartenant aux espèces de *Lb. Delbrueckis* sp et *Lb. Lactis* sont sensibles à la bile pareille pour (**Zago et al., 2011**) qui ont révélé une moyenne de survie de 40% chez des lactobacilles isolés à partir de lait. Cela nous a permis de déduire que la résistance aux sels biliaries reste un effet de souche qui peut être liée à la durée d'exposition.

D'après (Moser., 2001), La résistance des lactobacilles à la bile est expliquée par leurs capacité de deconjuger les sels biliaries par les enzymes biles salts hydrolase (BSH) afin d'exploiter la taurine comme accepteur d'électron qui a pour effet de diminuer la solubilité de la bile à pH bas et de réduire ses activités détergentes, cela est confirmé dans les études menées par (Begley et al., 2006 ; Hamon et al., 2011).

Récemment (Pfeiler et Klaenhammer, 2009) ont montrés que cette résistance est due à l'extrusion de la bile qui est réalisé grâce aux systèmes multidrug resistance (MDR), ce type de transporteurs sont responsables de la résistance à de nombreux composés toxiques comme les antibiotiques, les solvants organiques, les détergents et les sels biliaries (Sami et al. 1997 ; Whitehead et al., 2008).

Tableau (7): Habilité des souches de lactobacilles à survivre dans les conditions gastriques simulées.

| Souches | Nombre de cellules viables (log UFC.ml-1) DO = 0.5 | | | | |
|------------------------------------|--|------------|----------------------------|------------|----------------|
| | Absence de la bile | | Présence de la bile à 0,3% | | Taux de survie |
| | 0h | 4h | 0h | 4h | |
| - LB 1- <i>L. plantarum</i> | 9,60±0,06 | 9,19±0,00 | 9,60±0,03 | 7.48±0,06 | 78 % |
| - LB 2 – <i>L. paracasei</i> | 8,35±0,02 | 7,43±0,10 | 8,35±0,03 | 2,90±0,12 | 34,73 % |
| - LB 3 – <i>L. fermentum</i> | 8,82±0,01 | 7,54±0,02 | 8,82±0,07 | 4.42±0,02 | 50.1% |
| - LB 4 – <i>L. acidophilus</i> | 9,66±0,06 | 9,16 ±0,04 | 9,66±0,03 | 8,62 ±0,02 | 89% |
| - 6904- <i>L. plantarum</i> | 7,91±0,09 | 7,97±0,08 | 7,91±0,10 | 6,89±0,00 | 87% |
| - LB 9- <i>L. brevis</i> | 8,32±0,01 | 6,54±0,06 | 8,32±0,10 | 3,41±0,13 | 36,20% |
| - LB 11 – <i>L. acidophilus</i> | 7,9±0,01 | 5,54±0,02 | 7,9±0,09 | <1 | |

Les valeurs de log UFC.ml. -1 expriment la moyenne ± écart-type, chaque point de donnée est la moyenne des mesures répétées de 03 expériences réalisées indépendamment, n =3. P <0,05

3)- Activité antibactérienne

Parmi les critères les plus importantes de sélection des micro-organismes probiotiques est leur capacité de ralentir et d'inhiber l'activité et la croissance des bactéries pathogènes par la production de facteurs inhibiteurs (**Dib et al. 2013**).

L'étude de l'effet inhibiteur des 4 souches de lactobacille, contre 5 souches pathogènes est mentionnée dans le **Tableau (8)**. D'après les résultats que **la figures (20)** montre, on observe que toutes les souches de lactobacilles testées ont une activité inhibitrice sur les différentes souches pathogènes avec des variations plus ou moins importantes et des zones d'inhibition de 6mm et plus, traduisant un bon ou fort potentiel antagoniste à l'exception de la souche Lb3 qui a montré une activité faible contre la majorité des souches testés.

La meilleure activité a été noté avec la souche *L. acidophilus* (Lb4) avec des diamètres d'inhibition allant jusqu'à 12mm vis à vis de *Staphylococcus aureus* et l'activité la moins importante est observé chez la souche *L. fermentum* (Lb3) à l'égard de la souche *E. coli* O55.

Par ailleurs, les surnageants des quatre souches testés, neutralisés à pH 6,5 et traités avec de la catalase, ont potentiellement inhibé les bactéries Gram positives (*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*) avec des diamètres d'inhibition de 6 mm. Par contre ils étaient faiblement actifs sur les pathogènes à Gram-négatif ceci suggère que l'activité antagoniste de nos souches contre les bactéries Gram négatifs est due à l'action du pH bas ou à l' H_2O_2 ou une action synergétique entre les substances antibactériennes synthétisées par les lactobacilles.

Ces résultats sont en accord avec (**Adour et al.,2016**) qui ont rapporté que l'effet inhibiteur des souches de lactobacilles est lié à la production d'acide lactique, et probablement aux bactériocines agissant dans les conditions acides ainsi que d'autres mécanismes sont proposés pour expliquer l'antagonisme microbien comme la concurrence pour les éléments nutritifs et l'inhibition de l'adhésion des agents pathogènes aux surfaces (**Amin et al.,2011**).

Tous les isolats testés sont dotés d'une activité antisalmonellique plus ou moins importante ce qui est ce qui est en accord avec les essais in vivo de (**Higgins et al.,2010**) qui ont trouvés que des lactobacilles probiotiques ont réduit significativement le nombre de *Salmonella enteridis* dans les fientes et cette inhibition se fait par régulation de l'expression des gènes (**Higgins et al.,2011**).

Nous avons remarqué que les surnageants avaient une bonne activité antimicrobienne sur les bactéries à Gram positif (*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*).

Cela est probablement dû à la production de bactériocines ce qui concorde avec les données publiées par **(Dortu et Thonart.,2009)** où les auteurs rapportent qu’aucune bactériocine produite par des LB était active contre les bactéries à Gram négatif en raison de la structure de la paroi de ces derniers dont les bactériocines ne peuvent pas traverser la membrane externe pour accéder à la membrane interne, le site de leur activité.

Contrairement aux bactéries Gram positif, les bactériocines agissant généralement sur la membrane cytoplasmique par la formation de petits pores membranaires **(Luquet et Courrieu, 2005)**.

En outre, certains auteurs ont proposé une action synergétique entre les substances protéiques antimicrobiennes et les acides organiques pour expliquer l’action inhibitrice des bactéries probiotiques **(Gopal et al. 2001)** ce qui est le plus probables pour nos souches.

Enfin il est à noter que chaque souche est indépendante et les mécanismes associés à des souches particulières ne peuvent pas être extrapolés à tous les microorganismes probiotiques **(FAO/OMS, 2002)**.

Tableau (8). Activité antibactérienne des lactobacilles contre des bactéries pathogènes indicatrices

| B. indicatrices | <i>L.plantarum</i> (Lb1) | | <i>L.fermentum</i> (Lb3) | | <i>L.acidophilus</i> (Lb4) | | <i>L.plantarum</i> (6904) | |
|------------------|--------------------------|-----|--------------------------|-----|----------------------------|-----|---------------------------|-----|
| | Culture | SNG | Culture | SNG | Culture | SNG | Culture | SNG |
| <i>S. aureus</i> | 7mm | 5mm | 5mm | 2mm | 12mm | 7mm | 9mm | 6mm |
| <i>B. cereus</i> | 6mm | 4mm | 4mm | 2mm | 10mm | 8mm | 7mm | 4mm |
| SE | 7mm | 3mm | 6mm | 3mm | 11mm | 5mm | 7mm | 3mm |
| PA | 6mm | 3mm | 2mm | 0mm | 8mm | 4mm | 6mm | 3mm |
| <i>E. coli</i> | 5mm | 2mm | 2mm | 0mm | 9mm | 3mm | 6mm | 2mm |

Dans le tableau :

Diamètre 0 : absence d'activité antibactérienne

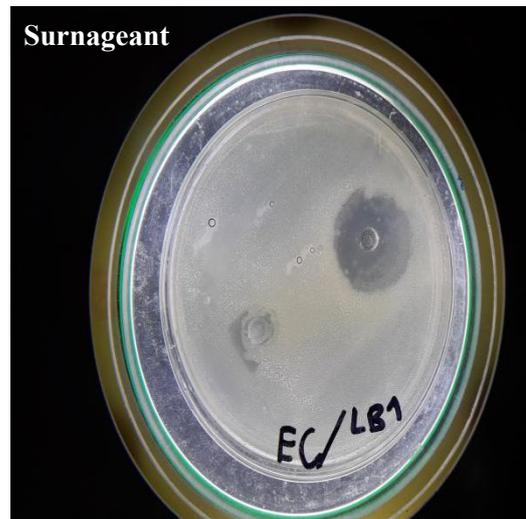
Diamètre 0 – 3 mm : faible activité

Diamètre 3 – 6 mm : bonne activité

Diamètre supérieur à 6 mm : Forte activité



Activité antibactérienne de *L.acidophilus*
contre *Staphylococcus aureus*



Activité antibactérienne du surnageant de
L.plantarum contre *S.aureus*

Figure (20) . L'activité antibactérienne de culture de souches de lactobacilles à l'égard de souches pathogènes

4)- L'auto- agrégation des isolats

L'auto- agrégation est la capacité des bactéries à interagir de manière non spécifique pour former un biofilm sur les cellules de la muqueuse intestinale afin d'empêcher la colonisation des pathogène (**Boris et al.,1998**), elle joue un rôle important dans l'adhésion aux cellules intestinale (**Dunne et al.,2001**).

Dans le premier test, l'auto-agrégation est évaluée par le temps de la sédimentation et les résultats sont présentés dans **la figure (21)** qui montre que l'auto-agrégation des souches testés est variable d'une souche à l'autre mais elle est plus au moins importante avec la plupart des isolats au cours des 5 heures d'incubation.

Le deuxième test a pour objectif de mesurer le pourcentage d'auto-agrégation de ces isolats pour confirmer les résultats du test précédent d'une manière quantitative. Selon **la figure (22)**, l'auto-agrégation la plus forte est observée chez la souche *L. acidophilus* (LB4) dont le pourcentage atteint 75,30% suivi de *L. plantarum* (Lb1) (65,5%) et *L. plantarum* 6904 (51.61%) et on remarque une diminution relative du pourcentage avec le reste des isolats respectivement, *L. fermentum* (42 %) ; *L. brevis* (39,9%) ; *L. paracasei* (36.78%). Nos résultats sont accordés avec (**Del Re et al., 2000**) qui ont montrés que les probiotiques devraient avoir un potentiel d'auto-agrégation supérieur à 40% Ainsi que (**Kassaa et al.,2014**) qui ont rapportés des valeurs d'auto-agrégation de 30 à 76 % de différentes souches de lactobacilles.

Dans une étude de (**Shaktisiek et al., 2004**) ils ont considéré l'auto-agrégation comme un marqueur pour la capacité d'adhérence et la colonisation au mucus du tractus digestif qui rend ce test parmi les plus importants critères de sélection des souches probiotiques.

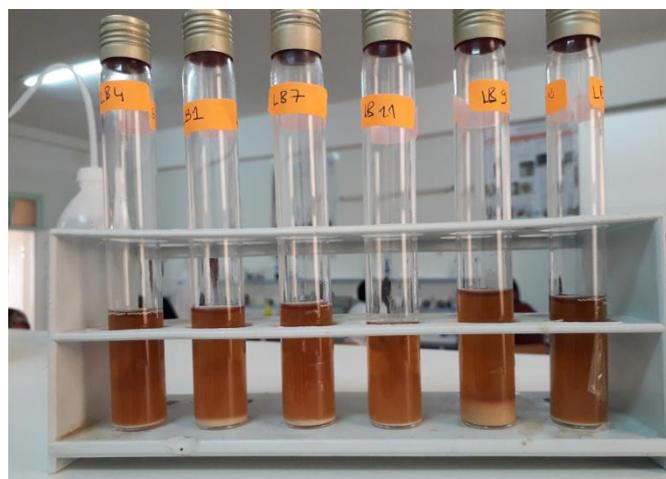


Figure (21) Auto-agrégations des isolats

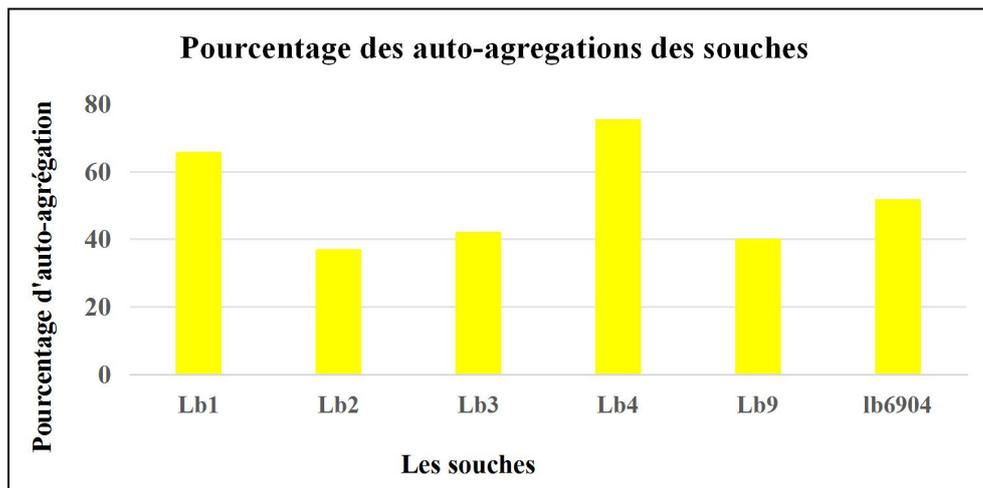


Figure (22) : Pourcentage d'auto-agrégations des isolats

5)- Test de Co-aggrégation

La Co-aggrégation est une interaction entre deux micro-organismes de souches ou d'espèces différentes, elle détermine le pouvoir des cellules de la bactérie probiotique à se lier aux cellules des bactéries pathogènes afin qu'ils empêchent leurs adhésions aux cellules épithéliales.

Le tableau (9) / Figure (23) montrent que parmi les six souches retenues par le test de l'auto-agrégation, cinq isolats ont dépassés 50% de Co-aggrégation avec les différentes souches pathogènes testés, le pourcentage le plus élevé est observé chez la souche *L. plantarum* (6904) avec les quatre souches pathogènes et un isolat qui a exprimé un faible taux de co-aggrégation avec la plupart des souches testés il s'agit de la souche *L. paracasei* (Lb2) dont sa co-aggrégation ne dépasse pas les 30%.

D'après la figure (23), on remarque que tous les isolats présentent un taux de co-aggrégation avec la souche *Salmonella interdis* remarquable qui est en accord avec les résultats rapportés par (Bahria B., 2012) qui a trouvé que parmi 32 isolats, 19 souches de lactobacilles ont dépassé les 50 % de co-aggrégation avec *S. enteridis*.

Il est à noter que les isolats qui ont une haute agrégation ne signifie pas qu'ils ont qu'ils ont une forte co-aggrégation en revanche les isolats qui possèdent une forte co-aggrégation manifeste toujours une haute agrégation décrit par (Ehrmann et al. 2002). Elle est considérée comme un mécanisme de défense contre les infections intestinales par (Vandervoerde et al. 1992).

Tableau (9) Pourcentage de Co-aggrégation des isolats de lactobacilles avec les différentes souches pathogènes (PA, BC, EC, SE)

| Lactobacilles S. pathogènes | <i>Pseudomonas aerogenosa</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>E. coli</i> | <i>Salmonella enteridis</i> |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------|----------------|---------------------------------|
| <i>L.plantarum</i> (Lb1) | 69% | 65% | 70 % | 69,7% |
| <i>L.paracasei</i> (Lb2) | 42,11% | 31% | 37,2% | 39,05% |
| <i>L.fermentum</i> (Lb3) | 57,9% | 55,0% | 67,2% | 69% |
| <i>L.acidophilus</i> (Lb4) | 70,1% | 69,83% | 66,9% | 77% |
| <i>L.plantarum</i> (6904) | 72% | 74,53% | 70,1% | 79,33% |
| <i>L.brevis</i> (Lb9) | 62,2% | 55% | 66,8% | 68,8% |

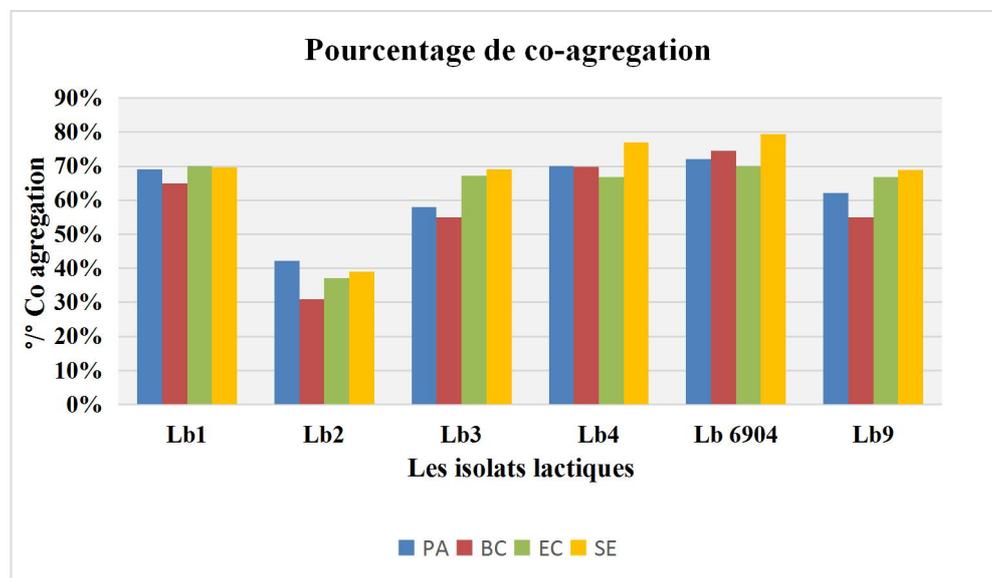


Figure (23) : Pourcentage de Co-aggrégation des isolats de lactobacilles avec les différentes souches pathogènes (PA, BC, EC, SE)

6)- Pourcentage d'hydrophobicité des isolats

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes.

Ce test a permis d'évaluer l'hydrophobicité de la surface cellulaire de nos isolats vis-à-vis du xylène qui peut refléter le potentiel de colonisation des souches aux mucus intestinale.

La répartition des cellules entre la phase aqueuse et le xylène résulte de l'interaction hydrophobe entre les microorganismes et les hydrocarbures. Les résultats de ce test sont démontrés dans la **figure (24)**

D'après la **figure (25)**, on remarque que les souches mises en test présentent une bonne hydrophobicité, un seul isolat avait 39,19% d'hydrophobicité et le reste des isolats marquent un pourcentage élevé entre 42,19% et 85,2% dont la valeur la plus faible est enregistrée avec la souche *L. brevis*(39,19%) et la plus élevée avec la souche *L. plantarum* 6904 (85,2 %). Cela qui est proche des résultats portés par (**Giaours et al.,2009**) qui ont trouvé des valeurs d'hydrophobicité de différents isolat lactiques qui oscillaient entre 5% et 88%ce qui est en accord avec les travaux de (**Guglienmotti et al.,2007**) qui a trouvé que les isolats lactiques testés, les lactobacilles ont révélés une hydrophobicité qui varie entre 5% et 63%.

Une étude conduite par (**Lebeer et al.,2008**) a supposé que la présence du monocouche protéique chez la plupart des souches de lactobacilles leurs confie la capacité d'adhésion aux cellules eucaryotes et permis la réduction de l'adhésion des bactéries pathogènes (**Jafarey et al.,2011**)



Figure (24) : Pourcentage d'hydrophobicité des isolats

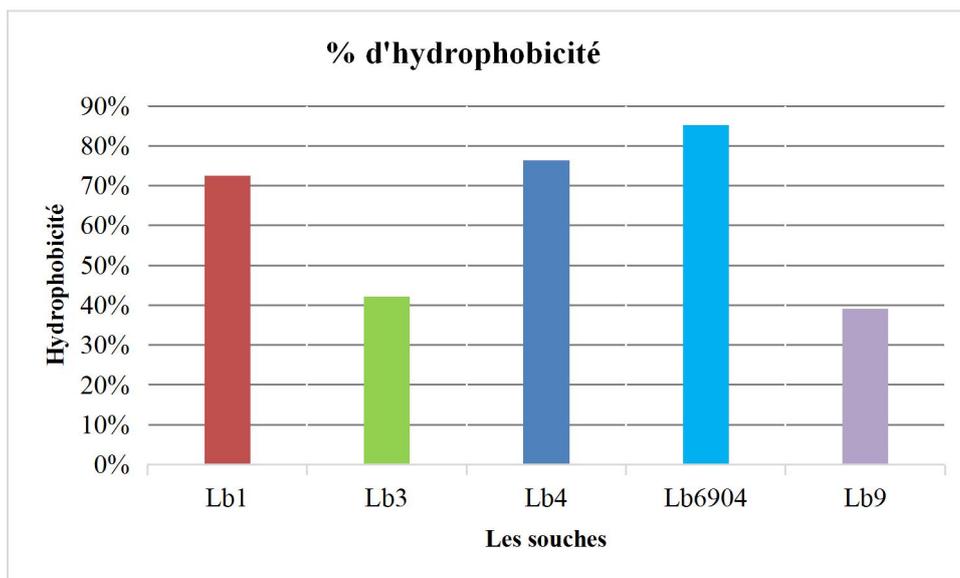


Figure (25): Pourcentage d'hydrophobicité des isolats

7)- Evaluation de l'aspect sécuritaire

7.1. Activité hémolytique

La détection de l'activité hémolytique est l'une des exigences de sureté des souches probiotiques, Selon (FAO/OMS, 2002). Les microorganismes probiotiques doivent être dénués de toutes formes de pathogénicité.

Nos souches ont été testés pour leurs pouvoir hémolytique et les résultats sont représentés dans la **figure (26)**. Aucune zone d'hémolyse de type alpha α ou beta β n'a été observée autour des colonies cultivées sur gélose au sang au sang humain qui indique que nos souches ne sont pas capables d'hydrolyser le sang humain. Ces résultats sont accordés par (Benmechernene et *al.*,2013).

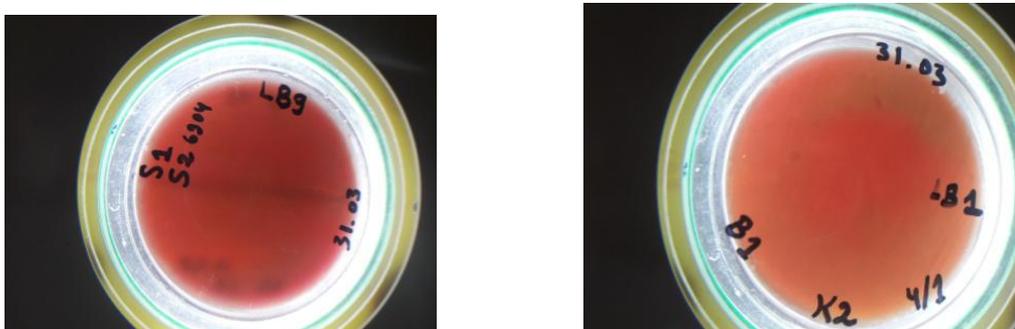


Figure (26): Activité hémolytique des isolats

7.2. Résistance aux antibiotiques

Un autre aspect important de la sécurité sanitaire des probiotiques destinés à l'Homme est le profil de la résistance aux antibiotiques (FAO/OMS, 2002).

Les résultats de la résistance et la sensibilité des souches aux antibiotiques sont regroupés dans le **tableau (10)**. Les quatre souches testées sont sensibles à l'ampicilline (10µg), la pénicilline (10U/I), la gentamicine (10 µg) et l'érythromycine (15 µg) et résistantes aux autres antibiotiques testés à savoir l'oxacilline (1µg), la céfoxitine (30µg)(à l'exception de Lb3) et l'acide nalidixique (30µg).

En règle générale, les lactobacilles sont sensibles aux antibiotiques inhibant la synthèse protéique tels que l'érythromycine, la clindamycine et les tétracyclines ainsi que ceux inhibant la synthèse de la paroi tel que l'ampicilline et la pénicilline (Coppola et al., 2005 ; D'Aimmo et al., 2007) ce qui soutient nos résultats, de même pour (Mathur et Singh, 2005) qui ont signalé dans une étude faite sur des espèces de lactobacilles isolé d'un yaourt Turque a prouvé qu'elles étaient résistantes à la gentamicine, l'érythromycine et à la pénicilline avec des proportions de (65%, 26% et 79%) respectivement. Contrairement, certains chercheurs ont signalé des cas de résistances de *Lactobacillus* à la gentamicine (Charteris et al., 1998 ; Sami et al., 1998). Pour (Gureimond et al., 2013) cette résistance est due à la non-liaison de cette dernière sur le peptidoglycane des Lactobacilles. Ces résultats démontrent que le phénomène d'antibiorésistance est espèce-dépendante et la résistance à divers antibiotiques varie selon les espèces confirmées par (Danielsen et al. 2003).

Nos souches sont tous sensibles à la pénicilline et l'ampicilline et résistantes à la céfoxitine ce qui concorde avec (Danielsen et Wind, 2003) qui ont démontrés que les lactobacilles sont généralement sensibles aux bêta-lactamines ; mais ils sont naturellement résistant aux céphalosporines comme la céfoxitine dont le mécanisme de résistance n'est pas complètement élucidé, mais l'imperméabilité de la membrane cellulaire a été suggérée (Ammor et al. 2007).

Ainsi que la pression de sélection de souches multi-résistantes par l'usage fréquent d'antibiotiques génèrent plusieurs mutants à partir de souches naturellement sensibles. Cette résistance acquise présente un grand risque de transmission de gènes de résistance à des bactéries intestinales pathogènes et commensales (Ishibashi et Yamazaki, 2001). Mais le profil de résistance de nos souches semble être intéressant.

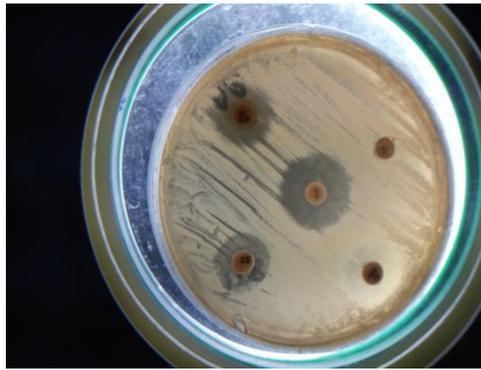
Ceci est lié, peut-être, au fait que ces souches ont été collectées dans des zones rurales où les vaches ont généralement une alimentation naturelle et traités avec des méthodes rationnelles. En outre, les résistances observées avec nos souches à la céfoxitine, l'acide nalidixique, et l'oxacilline semblent être naturelles. La résistance intrinsèque n'est pas horizontalement transférable (**Mathur et Singh, 2005**).

Il faut signaler que cette résistance et sensibilité trouvées dans notre étude peuvent être liées à la concentration de chaque antibiotique et à la nécessité de tester plusieurs concentrations pour confirmer les résultats.

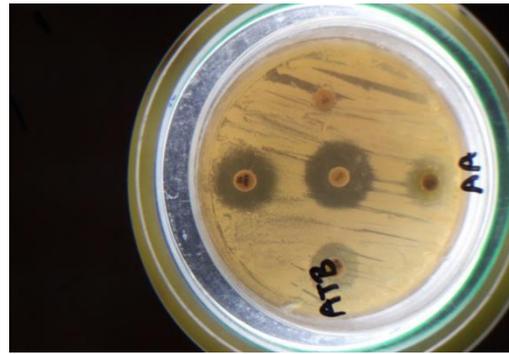
Tableau (10) Résistance des souches de lactobacilles aux antibiotiques

| Souches ATB | <i>L.plantarum</i> (Lb1) | <i>L.fermentum</i> (Lb3) | <i>L.acidophilus</i> (Lb4) | <i>L.plantarum</i> (6904) |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Les inhibiteurs de la paroi bactérienne | | | | |
| AMP (10µg) | S | S | S | R |
| OX (1 µg) | R | R | R | R |
| PE (10 U/I) | S | S | S | S |
| CS (30µg) | R | S | R | R |
| Les inhibiteurs de la synthèse protéique | | | | |
| GE (10µg) | S | S | S | S |
| E(15µg) | S | S | S | S |
| Les inhibiteurs des acides nucléiques | | | | |
| Acide nalidixique (30µg) | R | R | R | R |

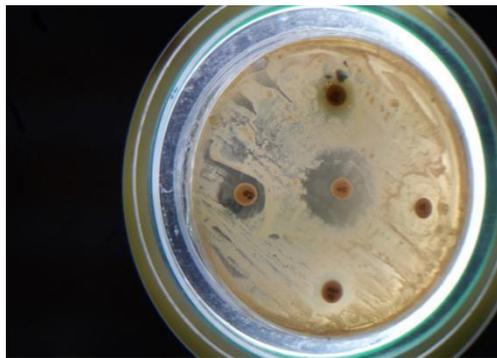
R : résistant, **S** : sensible



L. plantarum (Lb1)



L. acidophilus (Lb4)



L. fermentum (Lb3)



L. plantarum (6904)

Fig (27). Le profil de la résistance aux antibiotiques des isolats

Plusieurs critères ont été proposés afin de définir une souche bactérienne comme probiotique, ces critères sont principalement des propriétés observables *in vitro* comme la survie au suc gastrique et intestinal, L'adhésion aux cellules intestinales ou la production de substances antimicrobienne. Ces propriétés sont indispensables pour le choix d'une bactérie probiotique mais elles ne sont pas automatiquement observables *in vivo*. Par exemple la démonstration de l'effet antimicrobien et la modulation de la flore intestinale *in vivo* est plus fiable qu'une simple inhibition de croissance *in vitro* ainsi que la modulation des populations des globules blancs ou l'expression des différentes cytokines chez l'animal démontre avec beaucoup plus d'efficacité que les bactéries ont un réel effet.

III / Evaluation des aptitudes probiotiques *in vivo*

Dans cette étude, nous avons utilisé des hamsters mâles qui ont reçu les souches de *L. acidophilus* Lb4, *L. plantarum* 6904 par des administrations orales à une dose de 10^9 UFC/souris, pendant 7 jours avant l'induction de l'inflammation et 7 jours plus tard, On a

suivi la consommation journalière de la nourriture après l'introduction de l'inflammation ainsi que la perte de poids en calculant les variations par rapport au poids de départ.

1)- Consommation en nourriture

La Figure (28) montre l'évolution de la consommation journalière moyenne en nourriture pour les différents lots de hamsters.

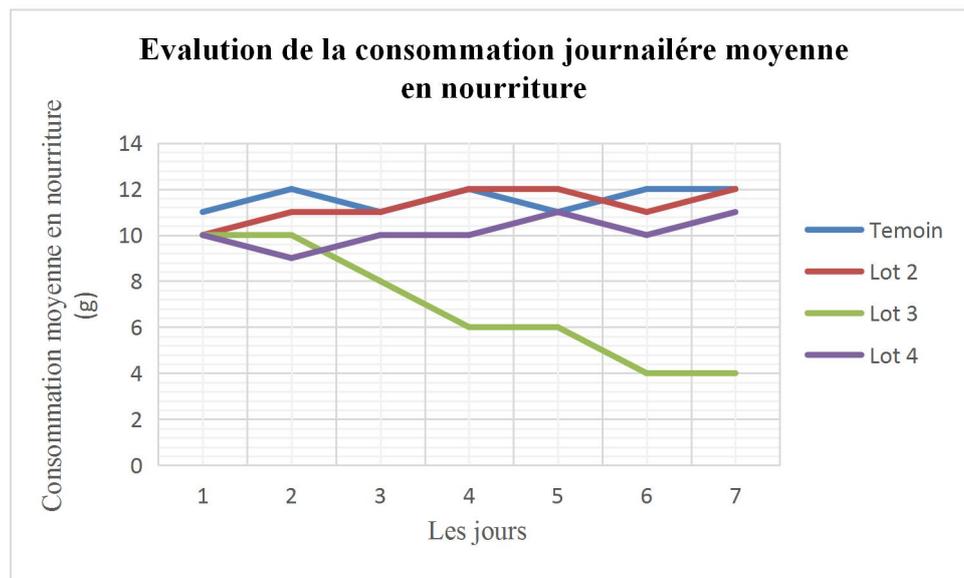


Figure (28): Evaluation de la consommation journalière moyenne en nourriture

Dans le lot témoin, on remarque que la quantité de nourriture consommée évolue à travers les jours avec la croissance des animaux. Néanmoins le lot traité au probiotiques consomme d'avantages par rapport aux autres lots.

En ce qui concerne le lot traité au DSS, On remarque une diminution considérable dans la consommation de nourriture notée à partir du troisième jour de l'inflammation jusqu'à la fin de l'expérience. Contrairement au lot 4, le traitement probiotique a modulé l'effet de l'inflammation et la consommation est au retour à la normale.

Ces résultats sont en accord avec les travaux menés par (Tayebet *al.*,2009) qui ont trouvés qu'au cours d'un traitement probiotique (*L. plantarum*)la consommation de nourriture chez le poulet était améliorée.

2)- Suivi des paramètres de l'inflammation intestinale

2.1 Les variations du poids au cours de l'inflammation

Le résultat des variations du poids moyenne chez les hamsters de différents lots est présenté dans la **Figure (29)**, On a observé des pertes de poids plus ou moins importante chez les hamsters traités au DSS par rapport au lot témoin qui sont de l'ordre de 11%.

Par contre, les hamsters qui avaient reçu un traitement probiotique au cours de l'inflammation récupèrent leurs poids rapidement ainsi que les hamsters sains traités aux probiotiques prennent du poids grâce à une consommation supplémentaire de la nourriture (effets bénéfiques des probiotiques) .

Ces résultats rejoignent ceux de (**Idoui et al.,2008**), indiquant qu'un gain de poids important à la suite d'une bonne valorisation de l'aliment par les animaux recevant la souche probiotique *L. plantarum*.

Dans le cadre de l'inflammation intestinale induite au DSS, une étude réalisée par (**Chen et al., 2009**), Les souris sont traitées au DSS pendant 13 jours perdent à la fin de l'essai 15 % de leur poids initial au maximum. En effet, il est difficile de comparer les résultats obtenus d'une étude à une autre dans des contextes différents. Si avec une dose de 3% DSS nos animaux perdent au maximum 8g pendant toute la durée de l'essai, l'équipe de Chen a montré que sur une durée plus longue et avec une dose de DSS plus importante, leurs souris perdent presque le même poids que nos cobayes.

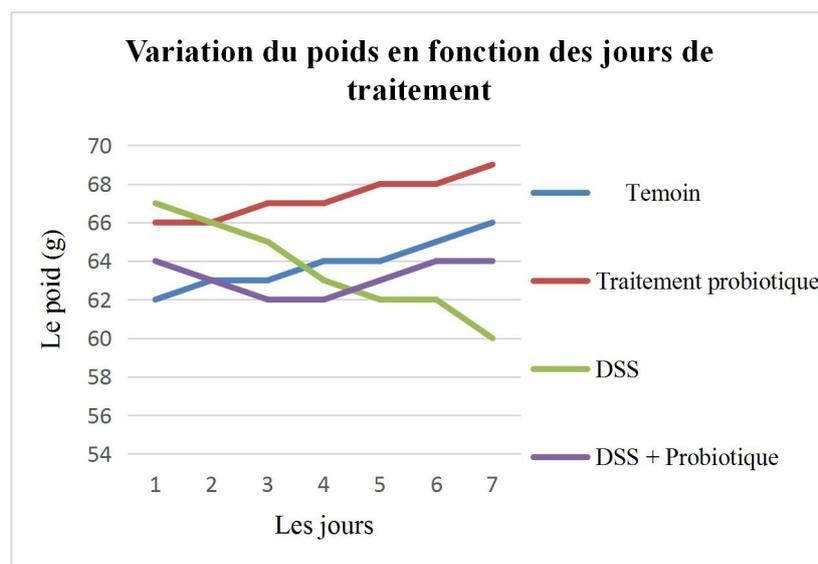


Figure (29) Variation du poids des hamsters en fonction des jours de traitement

2.2 L'aspect des selles

On remarque chez les hamsters traités au DSS, des selles molles, morcelées à bord déchiquetés. Les trois autres lots présentent des selles de consistance normale (dures, moulées et relativement sèches) durant toute la période de l'essai. **Figure (30)**

On note aucune présence du sang dans les selles chez les 4 lots testés.



Figure (30) : Aspect des selles des hamsters traités au DSS (a) et les hamsters sains (b)

Après sacrifice des hamsters, nous avons analysé les scores macroscopiques relevés sur les côlons des hamsters des différents lots **Figure (31)**.

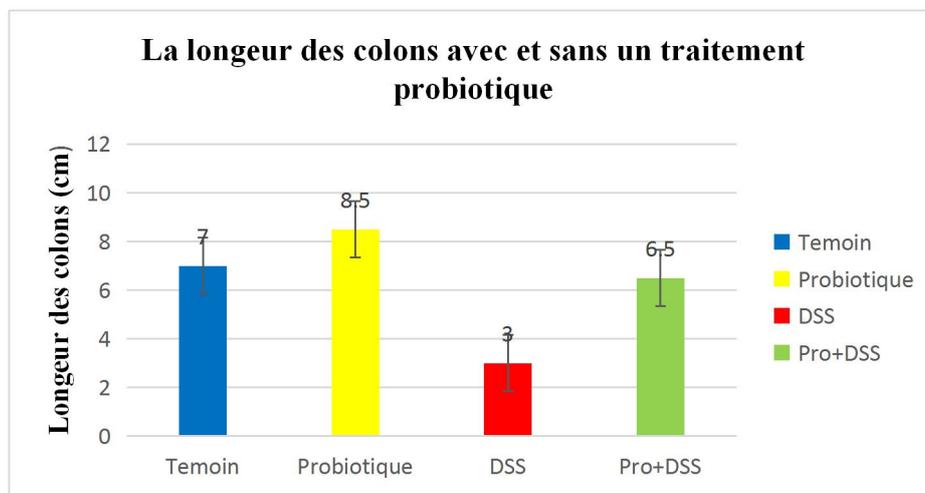


Figure (31) : La longueur des colons après un traitement probiotique

Pour le paramètre longueur des côlons, nous observons une amélioration notable de ce paramètre chez les hamsters traités au DSS et ayant reçu un traitement probiotique par contre chez le lot traité au DSS seul, nous remarquons des colons plus courts par rapport au témoin.

3)- L'étude histologique des échantillons

3.1. L'étude macroscopique

Le résultat de l'analyse macroscopique des côlons est présenté dans le **Tableau (11)**

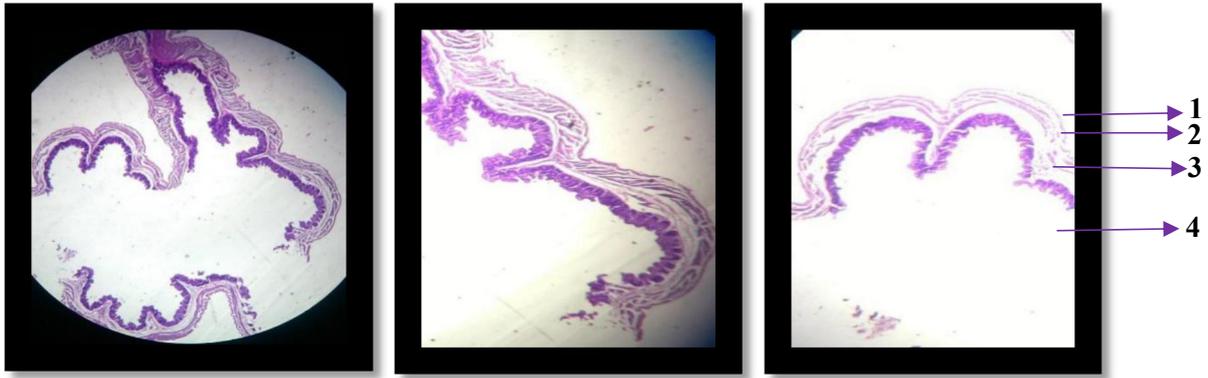
Tableau (11) : Scores macroscopiques sur les côlons des hamsters

| Lot | Longueur du colon (cm) | Etat de la muqueuse | Présence d'ulcérations |
|-------------------|------------------------|---------------------|------------------------|
| Témoin | 7 | Normale | - |
| Probiotique | 8,5 | Epaisse | - |
| DSS | 3 | Epaisse | + |
| DSS + Probiotique | 6,5 | Epaisse | - |

Nous notons une différence significative entre les longueurs des côlons des hamsters témoins et celle qui sont traitées au DSS avec présence d'ulcérations chez ces derniers. Ainsi qu'une amélioration de la longueur des côlons des hamsters traitées avec les souches probiotiques et modification de leurs muqueuses.

3.1. L'étude microscopique

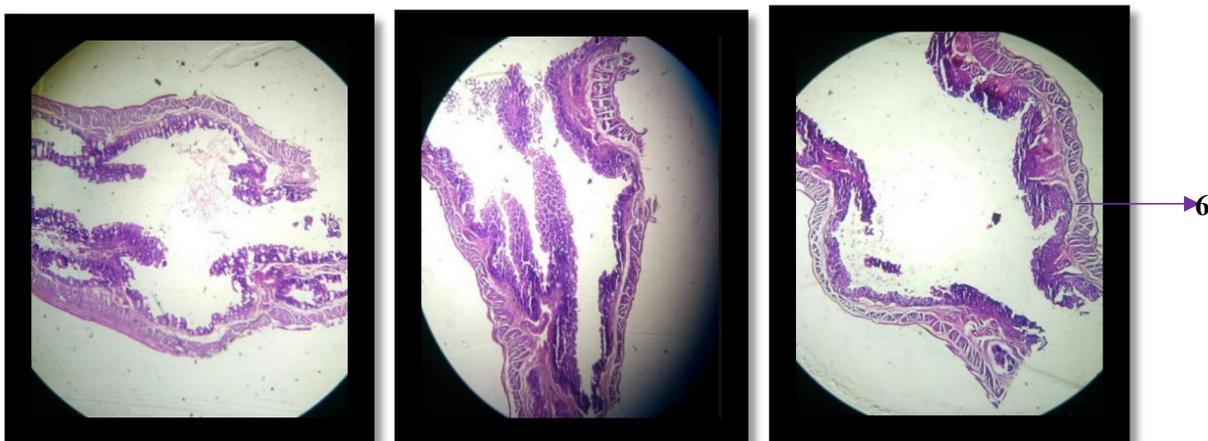
Après avoir réalisé les lames histologiques des colons des hamsters des quatre lots étudiés, On procède à l'observation microscopique et les résultats sont mentionnés dans **la Figure (32)**



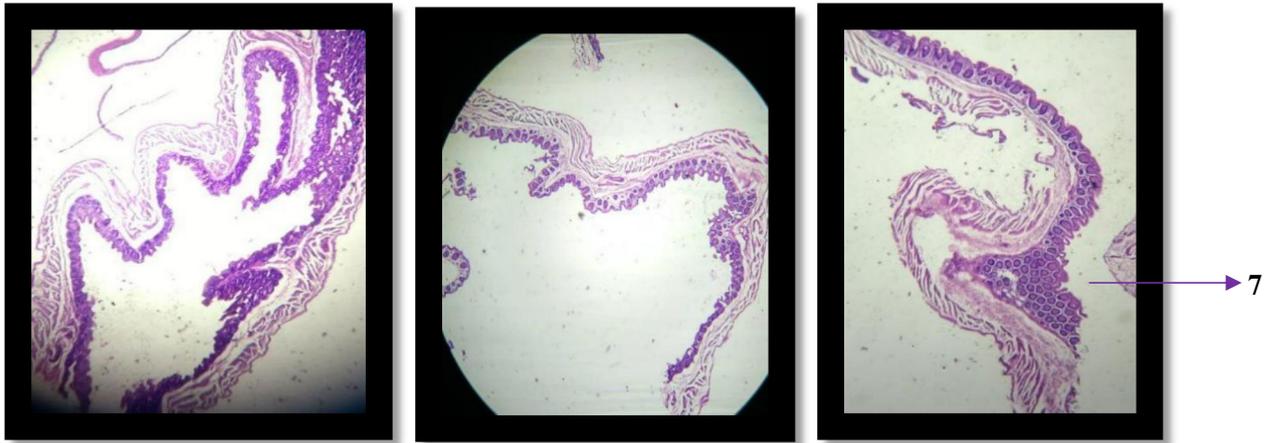
(a) Observation microscopique du colon d'un hamster sain (Témoin).



(b) Observation microscopique du colon d'un hamster sous traitement probiotique.



(c) Observation microscopique du colon d'un hamster sous DSS



(d) Observation microscopique du colon d'un hamster sous DSS traité au probiotique.

- 1 : La muqueuse
- 2 :Sous-muqueuse
- 3 :Musculeuse
- 4 :Séreuse
- 5 : Les cryptes
- 6 :infiltrat inflammatoire
- 7 :lymphocytes (leucocytes)

Figure (32) : Coupe histologique des colons enflammée (c, d) et non avec du DSS (a, b)

L'examen histologique des biopsies coliques d'hamster sain montrait :

- Une muqueuse (1) normal et comporte un épithélium de revêtement qui s'invagine dans la muqueuse en cryptes de Lieberkühn (5) dont la base repose sur la musculaire muqueuse. Elles sont soutenues par un chorion parsemé de leucocytes mononucléés.
- Une sous-muqueuse (2) tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques.
- Une musculouse (3) principalement circulaire interne, avec une couche longitudinale externe formant une bande continue.

Chez les hamsters ayant reçu un traitement probiotique, nous observons un allongement au niveau des cryptes qui intervient probablement dans la modification de la longueur du colon.

Le lot traité au DSS, nous observons une augmentation des lymphocytes au niveau de l'épithélium de surface de la muqueuse colorectale associée des lésions inflammatoires du chorion et des altérations de l'épithélium de surface (déformation des cryptes) : signes d'inflammation. L'apport bénéfique des souches probiotiques se traduit par la diminution de l'infiltration du chorion et de l'épithélium par les lymphocytes et la reconstitution des cryptes qui avait réduit l'incidence de l'inflammation.

La présence des lymphocytes (7) aux niveaux de la musculaire muqueuse indique qu'il y avait une éventuelle inflammation, qui était probablement réduite par le traitement probiotique.

Les travaux de **(Lazenby et al., 1989)** sont probablement les premiers à avoir décrit les processus inflammatoires au niveau du colon à la suite d'une colite chimio-induite.

Plusieurs études après **(Geier et al., 2007 ; Claes et al., 2010 ; Santos Rocha et al., 2011)** ont montré les propriétés anti-inflammatoires de quelques souches de lactobacilles (*L. rhamnosus* LGG, *L. delbrueckii* CNRZ 327, *L. paracasei* VEL12195, *Lactobacillus fermentum* BR11) dans le modèle d'inflammation intestinale induite avec DSS.

Cet essai nous a permis de mettre en évidence les propriétés anti-inflammatoires du mélange des souches *L. plantarum* ; *L. acidophilus* dont il a déjà été démontré qu'un mélange de bactéries probiotiques permet de maximiser les effets et de favoriser les synergies entre les bactéries **(Chapman, Gibson et al. 2010)**.

Conclusion
et
Perspectives

Les bactéries lactiques regroupent une large variété de bactéries à Gram positif telles que les lactobacilles et les Bifidobactéries, qui font partie intégrante du microbiote humain, mais aussi de nouveaux produits probiotiques.

Par définition, une souche bactérienne probiotique est une bactérie vivante apportée par l'alimentation des consommateurs et qui doit exercer un effet positif sur sa santé.

Les effets bénéfiques des souches probiotiques qui sont souche- dépendants, regroupent la lutte contre les microorganismes pathogènes, la colonisation du microbiote, mais aussi le maintien de l'homéostasie immunitaire. Ils ont montré aussi des effets positifs sur des pathologies inflammatoires (MICI, la pochte ...).

L'objectif principal de cette étude était d'isoler des souches de lactobacilles à caractères probiotiques, à partir de lait de vache cru récolté de différents lieux de la région de Ain Témouchent.

Les isolats sont sélectionnés préalablement en se basant sur les caractères morphologiques et physiologiques du genre lactobacillus (La forme, la coloration du Gram, la température de croissance et la production de la catalase).

Ces isolats sont retenus pour déterminer leurs pouvoir probiotique, On s'est intéressée principalement à l'étude de la résistance aux conditions gastriques et intestinales simulés. Ensuite, ils ont subi une série de test pour déterminer leurs persistances au milieu intestinal. Le test d'autoaggrégation , co-aggrégation et le test d'hydrophobicité qui reflète la capacité des isolats à adhérer à la muqueuse intestinale et exercer l'effet barrière contre les pathogènes. Puis, On a étudié leur activité antibactérienne contre des germes pathogènes intestinaux ainsi que l'aspect sécuritaire de ces souches est également étudié via leur activité hémolytique et leur résistance aux antibiotiques.

Enfin, des expériences étaient réalisées à l'aide d'un modèle animal d'inflammation intestinale induite par le DSS à 3% afin de prouver l'efficacité, les effets bénéfiques et les propriétés anti-inflammatoire des souches sélectionnées précédemment.

Dix souches de lactobacilles étaient mises en place parmi quinze souches de bactéries lactiques isolées.

Par rapport à l'évaluation de leurs aptitudes probiotiques :

l'étude de l'habilité à survivre dans des conditions gastriques et intestinales simulées (action combinée de la pepsine et pH 2,5/ sels biliaires) a conduit à huit souches résistantes. Le taux le plus élevé était observé avec *L. acidophilus* Lb4 suivie par *L. plantarum*. Les tests suivants ont permis la sélection de quatre souches qui peuvent se lier aux germes pathogènes et occuper les sites de fixation sur les cellules épithéliales et coloniser la muqueuse intestinale avec succès. Par ailleurs, l'étude de leur activité antibactérienne a montré un profil d'inhibition intéressant de deux souches (*L.plantarum* 6904 ; *L.acidophilus* Lb4) contre les bactéries pathogènes testées.

Enfin, par rapport à leur aspect sécuritaire, les souches sélectionnées étaient non hémolytiques et leur résistance aux antibiotiques semblait être naturelle ce qui présume le caractère non transférable de leurs gènes de résistance.

L'administration orale des souches *L. plantarum* (6904) ; *L. acidophilus* (Lb4) dans le cadre d'une inflammation intestinale induite par le DSS aux animaux à limiter la perte des poids et améliorer la consommation chez les hamsters ainsi qu'une diminution de l'incidence de l'inflammation.

En perspective, c'est approfondir ce travail par l'identification génétique des isolats potentiellement probiotique et l'étude à l'échelle moléculaire leurs mécanismes d'adhésion et la détermination de la nature des substances inhibitrice secrétées. Aussi l'étude de la possibilité du transfert des gènes de résistance aux antibiotiques entre les souches probiotiques et les autres bactéries commensales ou pathogènes présentes dans l'écosystème digestif. Il intéressant aussi de déterminer l'efficacité de ces souches chez d'autres modèles Animals (souris, poulet, lapin) dans le cadre d'autres infection (virale , bactérienne , fongique)

Il n'est pas toujours facile de transposer les résultats observés *in vivo* aux résultats observés chez l'homme parce que d'une part l'homme possède un régime alimentaire beaucoup plus varié que celui des animaux de laboratoire, avec une consommation importante de vitamines, de minéraux et de fibres qui peuvent potentialiser les effets des probiotiques et que d'autre part, la transformation industrielle de la souche, ainsi que la matrice utilisée pour commercialiser le produit probiotique peuvent modifier les propriétés des souches. Alors des essais cliniques devaient être mise en place sous le suivi d'un clinicien.

References

bibliographiques

Adams, M. R., & Moss, M. O. (2000). Microbiology of primary food commodities. In *Food Microbiology* (pp. 121-160).

Adour, K., Dabouz, S., & Benachour, K. E. (2016). Evaluation des aptitudes probiotiques des lactobacilles isolés du beurre et du L'ben.

Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A. M., Takagi, A., & Koga, Y. (1998). Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *The American journal of gastroenterology*, *93*(11), 2097-2101.

Ait-Belgnaoui, A., Han, W., Lamine, F., Eutamene, H., Fioramonti, J., Bueno, L., & Theodorou, V. (2006). *Lactobacillus farciminis* treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction. *Gut*, *55*(8), 1090-1094.

Al Kassaa, I., Hober, D., Hamze, M., Chihib, N. E., & Drider, D. (2014). Antiviral potential of lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Probiotics and antimicrobial proteins*, *6*(3-4), 177-185.

Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, *66*(5), 2001-2005.

Alvarez-Olmos, M. I., & Oberhelman, R. A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical infectious diseases*, *32*(11), 1567-1576.

Amin, M., Goodarzi, H., Orang, Z., Farsi, S., & Jorfi, M. (2011). Isolation and identification of *Lactobacillus* species from the vagina and their antimicrobial properties. *African Journal of Microbiology Research*, *5*(20), 3300-3304.

Ammor, M. S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food microbiology*, *24*(6), 559-570.

Antikainen, J., Anton, L., Sillanpää, J., & Korhonen, T. K. (2002). Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Molecular microbiology*, *46*(2), 381-394.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales " arabia et kabyle". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, (23), 30-37.

Bahri, F. Isolement et caractérisation des souches de lactobacilles à caractères probiotiques à partir de selles d'enfants.

Bahria-Sediki, I. B., Yousfi, N., Paul, C., Chebil, M., Cherif, M., Zermani, R., ... & Bettaieb, A. (2016). Clinical significance of T-bet, GATA-3, and Bcl-6 transcription factor expression in bladder carcinoma. *Journal of translational medicine*, *14*(1), 144.

Barefoot, S. F., & Klaenhammer, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *45*(6), 1808-1815.

- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G.** (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(3), 1729-1738.
- Bell, L. N.** (2002). Stability testing of nutraceuticals and functional foods. In *Handbook of nutraceuticals and functional foods* (pp. 504-519). CRC Press.
- Benmechernene, Z., Chentouf, H. F., Yahia, B., Fatima, G., Quintela-Baluja, M., Calomata, P., & Barros-Velázquez, J.** (2013). Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. *BioMed research international*, 2013.
- Bennai, T., Temine, S., & Faradji, S. E.** (2017). Isolement de souches de lactobacilles performantes.
- Bensidhoum, K., Boudrahem, N., & Benachour, K. E.** (2017). Isolement et caractérisation des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* à partir des produits laitiers traditionnels artisanaux.
- Boris, S., Suárez, J. E., Vázquez, F., & Barbés, C.** (1998). Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and immunity*, 66(5), 1985-1989.
- Both, E., Gyorgy, E., Kibedi-Szabo, C. Z., Tamas, E., Abraham, B., Miklossy, I., & Lanyi, S.** (2010). Acid and bile tolerance, adhesion to epithelial cells of probiotic microorganisms. *UPB Buletin Stiintific, Series B: Chemistry and Materials Science*, 72(2), 37-44.
- Burns, P., Vinderola, G., Binetti, A., Quiberoni, A., de Los Reyes-Gavilan, C. G., & Reinheimer, J.** (2008). Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *International Dairy Journal*, 18(4), 377-385.
- Calder, P. C., & Kew, S.** (2002). The immune system: a target for functional foods? *British Journal of Nutrition*, 88(S2), S165-S176.
- Cario, E., Gerken, G., & Podolsky, D. K.** (2007). Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology*, 132(4), 1359-1374.
- Champagne, C. P., Gardner, N. J., & Roy, D.** (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(1), 61-84.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K.** (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology*, 26(5), 333-337.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K.** (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology*, 84(5), 759-768.
- Chen, L. L., Wang, X. H., Cui, Y., Lian, G. H., Zhang, J., Ouyang, C. H., & Lu, F. G.** (2009). Therapeutic effects of four strains of probiotics on experimental colitis in mice. *World journal of gastroenterology: WJG*, 15(3), 321.
- Christiansen, P. S., Edelsten, D., Kristiansen, J. R., & Nielsen, E. W.** (1996). Some properties of ice cream containing *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*, 51(9), 502-504.

- Claes, I. J. J., Lebeer, S., Shen, C., Verhoeven, T. L. A., Dilissen, E., De Hertogh, G., ... & Rutgeerts, P.** (2010). Impact of lipoteichoic acid modification on the performance of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in experimental colitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 162(2), 306-314.
- Collado, M. C., Gueimonde, M., Hernandez, M., Sanz, Y., & Salminen, S.** (2005). Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of food protection*, 68(12), 2672-2678.
- Condon, S.** (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(3), 269-280.
- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., & Sorrentino, E.** (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Le Lait*, 85(3), 193-204.
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., & Biavati, B.** (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International journal of food microbiology*, 115(1), 35-42.
- Danielsen, M., & Wind, A.** (2003). Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. *International journal of food microbiology*, 82(1), 1-11.
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... & Whitman, W. B.** (2009). *The firmicutes* (Vol. 3). Springer.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., & Palenzona, D.** (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in applied microbiology*, 31(6), 438-442.
- Dib, H., Hajj Semaan, E., Mrad, R., Ayoub, J., Choueiry, L., Moussa, H., & Bitar, G.** (2012). Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. *Lebanese, Science Journal*, 13(1), 43-58.
- Dib, W., Biscola, V., Grar, H., Zouaoui, S., Gourine, H., Choiset, Y., ... & Kheroua, O.** (2013). Effet protecteur de bactérie lactique sur la structure épithéliale intestinale de la souris Balb/c immunisée par voie intrapéritonéale à la β -lactoglobuline. *Revue Francaise d'Allergologie*, 53(3), 384.
- Dortu, C., & Thonart, P.** (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 143-154.
- Draksler, D., Gonzáles, S., & Oliver, G.** (2004). Preliminary assays for the development of a probiotic for goats. *Reproduction Nutrition Development*, 44(5), 397-405.
- Drasar, B. S., Shiner, M. A. R. G. O. T., & McLeod, G. M.** (1969). Studies on the intestinal flora: I. The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons. *Gastroenterology*, 56(1), 71-79.
- Ducluzeau, R., & Raibaud, P.** (1980). Interest in gnotoxenic systems for the study of host-microbial flora of the digestive tract. *Reproduction, nutrition, developpement*, 20(5B), 1667-1678.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., ... & Kiely, B. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 386s-392s.

Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J., & Vogel, R. F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of applied microbiology*, 92(5), 966-975.

FAO/OMS (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). Working Group Report. Cordoba, Argentina.

FAO/OMS (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). Working Group Report. London, Ontario, Canada.

Fernandez, M. F., Boris, S., & Barbes, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94(3), 449-455.

Finegold, S. M., Sutter, V. L., Mathisen, G. E., & Hentges, D. J. (1983). Human intestinal microflora in health and disease. *Normal indigenous intestinal flora*, 3-31.

Fogh, J., Fogh, J. M., & Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(1), 221-226.

Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88(S1), s39-s49.

Ford, A. C., Talley, N. J., Spiegel, B. M., Foxx-Orenstein, A. E., Schiller, L., Quigley, E. M., & Moayyedi, P. (2008). Effect of fibre, antispasmodics, and peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, 337, a2313.

Fuller, R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*, 32(4), 439.

Gardiner, G. E., O'sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., ... & Stanton, C. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic lactobacillus paracasei and l. salivarius strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(6), 2605-2612.

Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J. M., & Hugas, M. (1998). Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *Journal of applied microbiology*, 84(1), 125-132.

Geier, M. S., Butler, R. N., Giffard, P. M., & Howarth, G. S. (2007). *Lactobacillus fermentum BR11*, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. *International journal of food microbiology*, 114(3), 267-274.

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.

- Gill, H. S.** (2003). Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 755-773.
- Gomes, A. M., & Malcata, F. X.** (1998). Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *Journal of Dairy Science*, 81(6), 1492-1507.
- Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., & Gill, H. S.** (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*, 67(3), 207-216.
- Grabig, A., Paclik, D., Guzy, C., Dankof, A., Baumgart, D. C., Erckenbrecht, J., ... & Wiedenmann, B.** (2006). *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2-and toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infection and immunity*, 74(7), 4075-4082.
- Gueimonde, M., & Salminen, S.** (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*, 38, S242-S247.
- Gueimonde, M., Jalonen, L., He, F., Hiramatsu, M., & Salminen, S.** (2006). Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food research international*, 39(4), 467-471.
- Guglielmotti, D. M., Marcó, M. B., Golowczyc, M., Reinheimer, J. A., & Quiberoni, A. D. L.** (2007). Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *International Dairy Journal*, 17(8), 916-925.
- Guiraud, J. P.** (1998). La Microbiologie alimentaire.
- Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., Park, S. Y., & Kim, J. M.** (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16(4), 321-326.
- Guo, X., Liang, Y., Zhang, Y., Lasorella, A., Kee, B. L., & Fu, Y. X.** (2015). Innate lymphoid cells control early colonization resistance against intestinal pathogens through ID2-dependent regulation of the microbiota. *Immunity*, 42(4), 731-743.
- Haller, D., Colbus, H., Gänzle, M. G., Scherenbacher, P., Bode, C., & Hammes, W. P.** (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(2), 218-226.
- Hamon, E., Horvatovich, P., Izquierdo, E., Bringel, F., Marchioni, E., Aoudé-Werner, D., & Ennahar, S.** (2011). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC microbiology*, 11(1), 63.
- Havenaar, R., Ten Brink, B., & Huis, J. H.** (1992). Selection of strains for probiotic use. In *Probiotics* (pp. 209-224). Springer, Dordrecht.

- Hechard, Y., Dherbomez, M., Cenatiempo, Y., & Letellier, F.** (1990). Antagonism of lactic acid bacteria from goats' milk against pathogenic strains assessed by the 'sandwich method'. *Letters in applied microbiology*, *11*(4), 185-188.
- Heller, K. J.** (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American journal of clinical nutrition*, *73*(2), 374s-379s.
- Higgins, J. P., Higgins, S. E., Wolfenden, A. D., Henderson, S. N., Torres-Rodriguez, A., Vicente, J. L., ... & Tellez, G.** (2010). Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella enteritidis* in neonatal broilers. *Poultry Science*, *89*(2), 243-247.
- Higgins, S. E., Wolfenden, A. D., Tellez, G., Hargis, B. M., & Porter, T. E.** (2011). Transcriptional profiling of cecal gene expression in probiotic-and *Salmonella*-challenged neonatal chicks. *Poultry Science*, *90*(4), 901-913.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U.** (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, *73*(2), 365s-373s.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & in't Veld, J. H. H.** (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International journal of food microbiology*, *41*(2), 85-101.
- Hsieh, M. H., & Versalovic, J.** (2008). The human microbiome and probiotics: implications for pediatrics. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, *38*(10), 309.
- Huang, Y., & Adams, M. C.** (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *91*(3), 253-260.
- Hynönen, U., Westerlund-Wikström, B., Palva, A., & Korhonen, T. K.** (2002). Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *Journal of Bacteriology*, *184*(12), 3360-3367.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, A. H., & Deschamps, A.** (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, *61*(2-3), 193-197.
- Idoui, T., & Karam, N. E.** (2008). Lactic acid bacteria from Jijel traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas y Aceites*, *59*(4).
- Ishibashi, N., & Yamazaki, S.** (2001). Probiotics and safety. *The American journal of clinical nutrition*, *73*(2), 465s-470s.
- Jafarei, P., & Ebrahimi, M. T.** (2011). *Lactobacillus acidophilus* cell structure and application. *African Journal of Microbiology Research*, *5*(24), 4033-4042.
- Jay, J. M.** (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.*, *44*(3), 525-532.

Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Ali, M. A., & Jalaludin, S. (1996). Antagonistic effects of intestinal Lactobacillus isolates on pathogens of chicken. *Letters in Applied Microbiology*, 23(2), 67-71.

Kaur, I. P., Chopra, K., & Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 1-9.

Khalil, R., El-Halafawy, K., Mahrous, H., Kamaly, K., Frank, J., & El Soda, M. (2007). Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. *African Journal of Biotechnology*, 6(7).

Khan, S. H., & Ansari, F. A. (2007). Probiotics--the friendly bacteria with market potential in global market. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 20(1), 76-82.

Kirtzalidou, E., Pramateftaki, P., Kotsou, M., & Kyriacou, A. (2011). Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe*, 17(6), 440-443.

Klaenhammer, T. R., & Kullen, M. J. (1999). Selection and design probiotics. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 45-57.

Klaenhammer, T. R., Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E., & Barrangou, R. (2007). Influence of the dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *The Journal of nutrition*, 137(3), 748S-750S.

Klayraung, S., & Okonogi, S. (2009). Antibacterial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of Lactobacillus fermentum isolated from miang. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(4), 757-766.

Koll, P., Mändar, R., Smidt, I., Hütt, P., Truusalu, K., Mikelsaar, R. H., ... & Mikelsaar, M. (2010). Screening and evaluation of human intestinal lactobacilli for the development of novel gastrointestinal probiotics. *Current microbiology*, 61(6), 560-566.

Lacroix, C., & Yildirim, S. (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 176-183.

Lazenby, A. J., Yardley, J. H., Giardiello, F. M., Jessurun, J., & Bayless, T. M. (1989). Lymphocytic ("microscopic") colitis: a comparative histopathologic study with particular reference to collagenous colitis. *Human pathology*, 20(1), 18-28.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72(4), 728-764.

Lee, Y. K., & Mazmanian, S. K. (2010). Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*, 330(6012), 1768-1773.

Leveau, J. Y., Boiux, M., & De Roissart, H. B. (1991). La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier. Paris*, 3, 2-40.

Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical microbiology reviews*, *19*(2), 315-337.

Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, *147*(3659), 747-748.

Lim, E. M., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2000). Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. electrophoresis: *An International Journal*, *21*(12), 2557-2561.

Lorca, G. L., de Valdez, G. F., & Ljungh, A. (2002). Characterization of the protein-synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, *4*(6), 525-532.

Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., ... & De Simone, C. (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*, *121*(3), 580-591.

Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, *16*(3), 189-199.

Marchal, N., Bourdon, J. L., & Richard, C. (1982). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.

Marraffini, L. A., DeDent, A. C., & Schneewind, O. (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *70*(1), 192-221.

Marteau, P. R., Vrese, M. D., Cellier, C. J., & Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American journal of clinical nutrition*, *73*(2), 430s-436s.

Marteau, P., Pochart, P., Doré, J., Béra-Maillet, C., Bernalier, A., & Corthier, G. (2001). Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.*, *67*(10), 4939-4942.

Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International journal of food microbiology*, *105*(3), 281-295.

Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, *12*(2-3), 173-182.

Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N., & Bruewer, M. (2009). Probiotic mixture VSL# 3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *American journal of physiology-Gastrointestinal and liver physiology*, *296*(5), G1140-G1149.

Metchnikoff, E., & Mitchell, P. C. S. (2004). The prolongation of life. Optimistic studies. 1907. *Trans. P. Chalmers Mitchell. Classics in Longevity and Aging. Eds. Robert N. Butler and S. Jay Olshansky. New York: Springer Publishing Company.*

Metlef, S., & Dilmi-Bouras, A. (2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrémophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Nature & Technology*, (1), 33.

Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, 106(1), 1-24.

Moser, S. A., & Savage, D. C. (2001). Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8), 3476-3480.

Nanatani, K., & Abe, K. (2011). Energy Generation Coupled with Decarboxylation Reactions in Lactic Acid Bacteria. *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research*, 67.

Nayra, S. M., Sharaf, O. M., Ibrahim, G. A., & Tawfik, N. F. (2002). Incorporation and viability of some probiotic bacteria in functional dairy food I. Soft cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 30(2), 217-230.

Nicaise, P., Gleizes, A., Forestier, F., Quero, A. M., & Labarre, C. (1993). Influence of intestinal bacterial flora on cytokine (IL-1, IL-6 and TNF-alpha) production by mouse peritoneal macrophages. *European cytokine network*, 4(2), 133-138.

Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions—a review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57-62.

Oliveira, M. N., Sodini, I., Remeuf, F., & Corrieu, G. (2001). Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International dairy journal*, 11(11-12), 935-942.

Otero, M. C., & Nader-Macías, M. E. (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal reproduction science*, 96(1-2), 35-46.

Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 279-289). Springer, Dordrecht.

Pagnini, C., Saeed, R., Bamias, G., Arseneau, K. O., Pizarro, T. T., & Cominelli, F. (2010). Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the national academy of sciences*, 107(1), 454-459.

Pfeiler, E. A., & Klaenhammer, T. R. (2009). Role of transporter proteins in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(18), 6013-6016.

- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., & Matuchansky, C.** (2005). bifidobacteria as probiotic agents—physiological effects and clinical benefits. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 22(6), 495-512.
- Pinto, M.** (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. cell*, 47, 323-330.
- Poolman, B., Molenaar, D., Smid, E. J., Ubbink, T., Abee, T., Renault, P. P., & Konings, W. N.** (1991). Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *Journal of Bacteriology*, 173(19), 6030-6037.
- Porter, E. M., Bevins, C. L., Ghosh, D., & Ganz, T.** (2002). The multifaceted Paneth cells. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 59(1), 156-170.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., & Gopal, P. K.** (1998). Selection and characterisation of Lactobacillus and Bifidobacterium strains for use as probiotics. *International Dairy Journal*, 8(12), 993-1002.
- Preidis, G. A., & Versalovic, J.** (2009). Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology*, 136(6), 2015-2031.
- Pridmore, R. D., Pittet, A. C., Praplan, F., & Cavadini, C.** (2008). Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. *FEMS microbiology letters*, 283(2), 210-215.
- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., ... & Raz, E.** (2004). Toll-like receptor 9 signalling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*, 126(2), 520-528.
- Raibaud, P., Ducluzeau, R., Dubos, F., Hudault, S., Bewa, H., & Muller, M. C.** (1980). Implantation of bacteria from the digestive tract of man and various animals into gnotobiotic mice.
- Rammelsberg, M., Müller, E., & Radler, F.** (1990). Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Archives of Microbiology*, 154(3), 249-252.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., & McCormick, J. K.** (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical microbiology reviews*, 16(4), 658-672.
- Reniero, R., Cocconcelli, P., Bottazzi, V., & Morelli, L.** (1992). High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *Microbiology*, 138(4), 763-768.
- Roberfroid, M. B., Bornet, F., Bouley, C. E., & Cummings, J. H.** (1995). Colonic microflora: nutrition and health. Summary and conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI)[Europe] workshop held in Barcelona, Spain. *Nutrition Reviews*, 53(5), 127-130.

- Rochat, T., Bermúdez-Humarán, L., Gratadoux, J. J., Fourage, C., Hoebler, C., Corthier, G., & Langella, P.** (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microbial Cell Factories*, 6(1), 22.
- Romond, M. B., Hamze, M., Romond, C., & Bourlioux, P.** (1990). Host-Bifidobacterium interactions in the axenic mouse: partial characterization of bifidogenic factors in the intestinal contents. *Canadian journal of microbiology*, 36(4), 286-291.
- Rosique, R. M., Miquel, S., Ulmer, J., Kechaou, N., Langella, P., & Humaran, L. B.** (2012). Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. *Microbial Cell Factories*, 12, np.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M. J., Nevado, F. P., & de Guía Córdoba, M.** (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, 80(3), 715-721.
- Rumney, C. J., & Rowland, I. R.** (1992). In vivo and in vitro models of the human colonic flora. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 31(4), 299-331.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T.** (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.
- Saidi, N., Guessas, B., Bensalah, F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D. E., ... & Kihal, M.** (2002). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides*, 1, 01-11.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., ... & Rowland, I.** (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British journal of nutrition*, 80(S1), S147-S171.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., ... & Birkeland, S. E.** (1998). Demonstration of safety of probiotics—a review. *International journal of food microbiology*, 44(1-2), 93-106.
- Sami, M., Yamashita, H., Hirono, T., Kadokura, H., Kitamoto, K., Yoda, K., & Yamasaki, M.** (1997). Hop-resistant *Lactobacillus brevis* contains a novel plasmid harboring a multidrug resistance-like gene. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 1-6.
- Sanders, M. E.** (2003). Probiotics: considerations for human health. *Nutrition reviews*, 61(3), 91-99.
- Santos Rocha, C., Lakhdari, O., Blottière, H. M., Blugeon, S., Sokol, H., Bermu'Dez-Humara'N, L. G., ... & Maguin, E.** (2011). Anti-inflammatory properties of dairy lactobacilli. *Inflammatory bowel diseases*, 18(4), 657-666.
- Servin, A. L.** (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS microbiology reviews*, 28(4), 405-440.

- Servin, A. L., & Coconnier, M. H.** (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 741-754.
- Siuta-Cruce, P., & Goulet, J.** (2001). Improving probiotic survival rates. *Food technology*, 55(10), 36-42.
- Song, M., Yun, B., Moon, J. H., Park, D. J., Lim, K., & Oh, S.** (2015). Characterization of selected Lactobacillus strains for use as probiotics. *Korean journal for food science of animal resources*, 35(4), 551.
- Soomro, A. H., Masud, T., & Anwaar, K.** (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1), 20-24.
- Sutra, L., Federighi, M., & Jouve, J. L.** (1998). *Manuel de bactériologie alimentaire*. Polytechnica..
- Tailliez, P.** (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques*, 6(1), 35-41.
- Tayeb, I., Boudjerda, D., Essaid, L., & Nour-Eddine, K.** (2009). The effect of *Lactobacillus plantarum* BJ0021 feeding on growth performance and faecal microflora of chickens (ISA 15 strain). *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 4(4), 277-280.
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., & Rowland, I.** (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18(5), 530-538.
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M.** (2005). Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 45(4), 312-322.
- Ton-That, H., Marraffini, L. A., & Schneewind, O.** (2004). Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1694(1-3), 269-278.
- Trinkley, K. E., & Nahata, M. C.** (2011). Treatment of irritable bowel syndrome. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 36(3), 275-282.
- Van De Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E.** (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 187-216.
- Vandevoorde, L., Christiaens, H., & Verstraete, W.** (1992). Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 72(3), 214-219.

Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, *18*(7), 714-728.

Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M., & Ouwehand, A. C. (2005). Measurement of bacterial adhesion—in vitro evaluation of different methods. *Journal of microbiological methods*, *60*(2), 225-233.

Watterlot, L., Rochat, T., Sokol, H., Cherbuy, C., Bouloufa, I., Lefèvre, F., ... & Corthier, G. (2010). Intragastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice. *International journal of food microbiology*, *144*(1), 35-41.

WGO: World Gastroenterology Organisation. (2008). Probiotiques et prébiotiques. Recommendations pratique

Whitehead, K., Versalovic, J., Roos, S., & Britton, R. A. (2008). Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Appl. Environ. Microbiol.*, *74*(6), 1812-1819.

Xiaodong, P., Chen, F., Wu, T., Tang, H., & Zhao, Z. (2009). The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*, *20*(6), 598-602.

Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suàrez, V., Vinderola, G., ... & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, *28*(5), 1033-1040.-Adams MR, Moss MO (2000). *Food Microbiology*. Second Edition, The Royal Society of Biochemistry éd. Cambridge. UK. pp. 318-323.

Zweibaum, A., Laburthe, M., Grasset, E., & Louvard, D. (1991). Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. *Handbook of physiology. The gastrointestinal system*, *4*, 223-255.

ANNEXE I

Coloration de Gram

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- Prélever un ose d'une colonie et mélanger avec la goutte d'eau physiologique, strier et fixer à la chaleur par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- Ajouter le Violet de Gentiane pendant 1mn, toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau déminéralisée.
- Ajouter le Lugol pendant 1mn. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.
- Décolorer avec de l'alcool pendant 10 secondes.
- Ajouter le deuxième colorant, la Fushine et laisser 1 mn puis laver à l'eau. Les bactéries Gram- sont colorées en rose.
- Sécher la lame et mettre une goutte d'huile à immersion puis passer à l'observation microscopique au grossissement X100.

ANNEXE II

Tampon phosphate salin PBS

PBS : est une solution tampon couramment utilisée en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et un peu de chlorure de potassium. En général, la concentration de ces sels est celle du corps humain (isotonicité). Ce tampon sert surtout à rincer les cellules lorsqu'il faut enlever toute trace de milieu avant de les traiter.

Préparation :

- Pour préparer 1000 ml de PBS :

| Concentration et réactifs | Quantité |
|---|----------|
| 137 mM NaCl | 8,0 g/L |
| 2,7 mM KCl | 0,2 g/L |
| 10 mM Na ₂ HPO ₄ | 1,44 g/L |
| 1,76 mM KH ₂ PO ₄ | 0,24 g/L |

| | Test / Isolats | LB1 | LB2 | LBK2 | LB4 | LB3 | LB9 |
|----|----------------------------|-----------|-----------|--------|-------------|-----------|--------|
| 0 | Témoin | - | - | - | - | - | - |
| 1 | Glycerol | - | - | - | - | - | - |
| 2 | Erythritol | - | - | - | - | - | - |
| 3 | D-Arabinose | - | - | - | - | - | - |
| 4 | L-Arabinose | + | - | - | - | - | + |
| 5 | D-Ribose | + | - | + | - | + | + |
| 6 | D-Xylose | - | - | - | - | - | + |
| 7 | L-Xylose | - | - | - | - | - | - |
| 8 | D-Adonitol | - | - | - | - | - | - |
| 9 | Méthyl-βD-Xylopyranoside | - | - | - | - | - | - |
| 10 | D-Galactose | + | - | - | - | + | + |
| 11 | D-Glucose | + | - | + | + | + | + |
| 12 | D-Fructose | + | - | + | - | + | + |
| 13 | D-Mannose | + | - | + | - | - | - |
| 14 | L-Sorbose | - | - | - | - | - | - |
| 15 | L-Rhamnose | - | - | - | - | - | - |
| 16 | Dulcitol | - | - | - | - | - | - |
| 17 | Inositol | - | - | - | + | - | - |
| 18 | D-Mannitol | + | - | + | + | - | - |
| 19 | D-Sorbitol | + | - | - | + | - | - |
| 20 | Méthyl-αD-Mannopyranoside | + | + | - | + | - | - |
| 21 | Méthyl-αD-Glucopyranoside | - | + | - | + | - | + |
| 22 | N-Acétyleglucosamine | + | + | + | + | - | + |
| 23 | Amygdaline | + | + | - | + | - | - |
| 24 | Arbutine | + | + | + | + | - | - |
| 25 | Esculine citrate de fer | + | + | + | + | - | - |
| 26 | Salicine | + | + | + | + | - | - |
| 27 | D-Cellobiose | + | + | + | + | - | - |
| 28 | D-Maltose | + | + | + | + | + | + |
| 29 | D-Lactose (origine bovine) | + | + | + | + | + | - |
| 30 | D-Melibiose | + | + | - | + | + | + |
| 31 | D-Saccharose | + | + | + | + | + | - |
| 32 | D-Tréhalose | + | + | + | + | - | - |
| 33 | Inuline | - | + | - | + | - | - |
| 34 | D-Mélézitose | + | + | - | + | - | - |
| 35 | D-Raffinose | + | + | - | + | - | - |
| 36 | Amidon | - | + | + | + | - | - |
| 37 | Glycogène | - | + | - | + | - | - |
| 38 | Xylitol | - | + | - | + | - | - |
| 39 | Gentiobiose | + | + | + | + | - | - |
| 40 | D-Turanose | + | + | - | + | - | - |
| 41 | D-Lyxose | - | + | - | + | - | - |
| 42 | D-Tagatose | - | + | - | + | - | - |
| 43 | D-Fucose | - | + | - | + | - | - |
| 44 | L-Fucose | - | + | - | + | - | - |
| 45 | D-Arabitol | - | + | - | + | - | - |
| 46 | L-Arabitol | - | + | - | + | - | - |
| 47 | Potassium Gluconate | + | + | - | + | + | + |
| 48 | Potassium 2-Cétogluconate | - | + | - | + | - | - |
| 49 | Potassium 5-Cétogluconate | - | + | - | + | - | + |
| | | plantarum | paracasei | Lactis | acidophilus | Fermentum | brevis |

ANNEXE III : Résultats API

CHL

| | Test / Isolats | 6904 | LB11 |
|----|-----------------------------------|------------------|--------------------|
| 0 | Témoin | - | - |
| 1 | Glycerol | - | - |
| 2 | Erythritol | - | - |
| 3 | D-Arabinose | - | - |
| 4 | L-Arabinose | - | - |
| 5 | D-Ribose | + | - |
| 6 | D-Xylose | - | - |
| 7 | L-Xylose | - | - |
| 8 | D-Adonitol | - | - |
| 9 | Méthyl-βD-Xylopyranoside | - | - |
| 10 | D-Galactose | + | + |
| 11 | D-Glucose | + | + |
| 12 | D-Fructose | + | - |
| 13 | D-Mannose | + | - |
| 14 | L-Sorbose | - | - |
| 15 | L-Rhamnose | - | + |
| 16 | Dulcitol | - | - |
| 17 | Inositol | - | + |
| 18 | D-Mannitol | + | - |
| 19 | D-Sorbitol | + | + |
| 20 | Méthyl-αD-Mannopyranoside | - | + |
| 21 | Méthyl-αD-Glucopyranoside | + | + |
| 22 | N-Acétyleglucosamine | + | - |
| 23 | Amygdaline | + | + |
| 24 | Arbutine | + | + |
| 25 | Esculine citrate de fer | + | - |
| 26 | Salicine | + | + |
| 27 | D-Cellobiose | + | + |
| 28 | D-Maltose | + | + |
| 29 | D-Lactose (origine bovine) | - | + |
| 30 | D-Melibiose | + | + |
| 31 | D-Saccharose | - | + |
| 32 | D-Tréhalose | - | + |
| 33 | Inuline | - | + |
| 34 | D-Mélézitose | - | + |
| 35 | D-Raffinose | - | + |
| 36 | Amidon | - | + |
| 37 | Glycogène | - | + |
| 38 | Xylitol | - | + |
| 39 | Gentiobiose | + | + |
| 40 | D-Turanose | - | + |
| 41 | D-Lyxose | - | + |
| 42 | D-Tagatose | - | + |
| 43 | D-Fucose | - | + |
| 44 | L-Fucose | - | + |
| 45 | D-Arabitol | - | + |
| 46 | L-Arabitol | - | + |
| 47 | Potassium Gluconate | + | + |
| 48 | Potassium 2-Cétogluconate | - | + |
| 49 | Potassium 5-Cétogluconate | - | + |
| | | Plantarum | Acidophilus |

ANNEXE IV

Antibiogramme de souche E.coli ATCC 25922

Technique :

Une culture jeune de la souche E.coli était ensemencées sur gélose nutritive et incubée en aérobiose pendant 24h à 37°C. A partir de cette culture pure, des colonies ont été prélevées afin de préparer des suspensions inoculum sur eau physiologique 0,9% équivalent à 0,5 standard Mac Ferland (McF) mesuré par un densitomètre.

La gélose Muller Hinton était ensemencée par stries serrées de toute la surface du milieu à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans l'inoculum et bien essoré. Les disques d'antibiotiques (tableau 5) ont été placés, par la suite, sur la surface de la gélose ensemencée en appliquons délicatement avec une pince stérile pour qu'ils ne se détachent pas. Les boites étaient incubées en aérobiose à 37°C pendant 24h.

La technique était réalisée selon le guide de Standardisation de l'Antibiogramme à l'Echelle Nationale, 6ème édition (2011) et les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2007).

Résultats de l'antibiogramme de la souche Escherichia coli ATCC 25922

| Ampicilline (10µg) | Gentamicine (10µg) | Acide nalidixique (30µg) | Oxacilline (1 µg) | Pénicilline (10 U/I) |
|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|----------------------|
| S | S | S | S | S |