

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة د مولاي الطاهر  
Université de Saida Dr MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté de sciences de la nature et de la vie

قسم البيولوجيا

Département de biologie

**Mémoire présentée pour l'obtention de diplôme Master**

En Biochimie

Thème

## **La mise en évidence de l'activité probiotique des bactéries présentes dans la flore intestinale des nourrissons**

Présentée par :

■ M<sup>lle</sup> : Mokedddem Fatima zahra

Soutenu le :

Devant le comité de jury composé de :

Président

Examineur

Encadrant

Me Chahrour Wassila

Mr Kebir Nasr eddine

Mr. Bellil Yahia

MCA à Université de Saida

MCA à Université de Saida

MCA à Université de Saida

**Année universitaire 2024-2025**

## **Remerciements**

Je remercie tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce mémoire. Un grand merci à Mr Bellil pour ses conseils et son soutien. Merci aussi à ma famille pour son aide et ses encouragements. Je remercie également l'Université de Saïda et tout son personnel pour leur soutien durant mon parcours.

**Sommaire:**

**Liste des abréviations**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Résumé**

**Introduction**

**Synthèse bibliographique**

|                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------|
| <b>Chapitre I: Le microbiote intestinal</b>                              |
| 1.1. La flore intestinale.                                               |
| 1.1.1 Définition.                                                        |
| 1.1.2.Composition de la flore intestinale humaine.                       |
| 1.1.2.1. Flore dominante                                                 |
| 1.1.2.2. Flore intestinale sous dominante                                |
| 1.1.2.3. Flore résiduelle                                                |
| 1.1.2.4.Flore fécale                                                     |
| 1.2.L'épithélium intestinal                                              |
| 1.3. Analyse de la flore intestinale                                     |
| 1.4. Composition de la flore intestinale                                 |
| 1.4.1. Classification des principales bactéries du microbiote intestinal |
| 1.5.Mise en place de la flore                                            |
| 1.6.Répartition topographique des espèces intestinales.                  |
| 1.6.1. Diversité du microbiote intestinal du colon.                      |
| 17. Les facteurs influençant la flore                                    |
| 1.7.1. Le mode d'accouchement                                            |
| 1.7.2. Facteurs liés à l'individu                                        |
| 1.7.3. Le terme de naissance                                             |
| 1.7.4. L'environnement                                                   |
| 1.7.5. L'alimentation                                                    |
| 17.5.1.Lait maternel et lait infantile.                                  |
| 1.7.5.2. L'alimentation de l'adulte                                      |
| 1.8. L'usage de l'antibiothérapie                                        |
| 1.9. Les fonctions du microbiote.                                        |
| 1.9.1.Fonction de barrière et protectio                                  |
| 1.9.2.Fonction métabolique                                               |
| 1.9.2.1. Synthèse des molécules indispensables.                          |
| 1.9.2.2. Métabolisme digestif.                                           |
| 1.9.3. Fonction immunitaire                                              |
| 1.10. Le syndrome de l'intestin irritable.                               |
| 1.11. La dysbiose.                                                       |
| <b>Chapitre II: Les probiotique</b>                                      |
| 2-1-Définition                                                           |

|                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 2-2-Classification des probiotiques                                                 |
| 2-3-Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques.                   |
| 2-3-1-La résistance à l'acidité gastrique.                                          |
| 2-3-2-La résistance aux sels biliaires.                                             |
| 2-3-3-L'adhésion aux cellules épithéliales.                                         |
| 2-3-4-La production de substances antimicrobiennes                                  |
| 2-3-5-Résistance aux antibiotiques.                                                 |
| 2-4-Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur santé.                          |
| 2-5-Rôle du probiotique                                                             |
| 2-6-Application des probiotique                                                     |
| 2-7-Mécanismes d'actions des probiotique                                            |
| 2-7-1-Inhibition de l'adhésion des pathogènes : phénomène de composition /exclusion |
| 2-7-2-Production de substances antimicrobiennes                                     |
| 2-7-2-1-Les bacteriocines                                                           |
| 2-7-2-2-Les acides organiques..                                                     |
| 2-7-2-3-Les peroxyde d'hydrogène.                                                   |
| 2-7-3-Stimulation de l'activité du système immunitaire intestinale.                 |
| 2-7-4-Allégations santé associés à la consommation des probiotiques                 |

### **Chapitre III : Partie expérimentale**

## Liste des abréviations

MRS: Man-Rogosa et Sharp

MH: Mueller-Hinton

NaCl : chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

pH : potentiel Hydrogène

ml : millilitre

g : gramme

h: Heure

UFC : une unité formatrice de colonie

## **Liste des tableaux**

Tableau 1: La Composition du microbiote intestinal:

Tableau 2: Principaux déterminants influençant la composition et les fonctions de la microflore intestinale

Tableau 3 : Liste des microorganismes considérés comme des probiotiques.

Tableau 4 : Critères de sélection des probiotiques.

Tableau 5 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.

Tableau 6: Caractéristiques des échantillons collectés

Tableau 7 : Liste des antibiotiques utilisés

Tableau 8: Résultats du test d'antibiogramme

Tableau 9: Les valeurs des zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne en mm

Tableau 10 : Résultats de dénombrement direct après incubation des isolats bactériens à différents pH

Tableau 11 : Résultats de dénombrement direct après incubation des isolats bactériens en présence de sels biliaires

Tableau 12 : Résultats de test d'hydrophobicité des isolats lactiques

Tableau 13: Caractérisation physiologique des isolats lactiques

Tableau 14 : Caractères morphologiques et biochimiques des souches lactiques sélectionnées.

## Liste des figures

Figure 1: L'épithélium intestinal

Figure 2: Répartition de la quantité des bactéries dans le tractus digestif

Figure 3 : Les microflores des différents compartiments de l'appareil digestif de l'homme

Figure 4 : Vue générale sur la microflore du colon humain

Figure 5: Représentation schématique des principales fonctions du microbiote intestinal

Figure 6 : Les principaux bienfaits des probiotiques. (Nagpal et al., 2012)

Figure 8: purification des souches lactique

Figure 9 : conservation à longterme

Figure 11: Photo prise après observation microscopique X100 montrant le Gram des isolats

Figure 12 : Croissance des isolats à différentes température

Figure 13: Croissance des isolats en milieu hyper salé

Figure 14: Test d'antibiogramme de quelques souches vis-à-vis 12 antibiotiques

Figure 15: Résultats du test d'hémolyse sur gélose au sang

Figure 16 : Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats lactiques vis-à-vis les bactéries indicatrices

Figure 17: Dénombrement des cellules viables après exposition à des environnements acides (pH 2 et pH 3) aux temps 0 h, 2 h et 4 h.

Figure 18 : Dénombrement directe des souches viables après exposition à différentes concentrations de sels biliaries (1%, 5%)



## الملخص :

تهدف هذه الدراسة إلى إبراز النشاط البروبيوتيك للبكتيريا الموجودة في الفلورا المعوية لدى الرضع. تم تحليل أربعة عينات براز لأطفال تتراوح أعمارهم بين شهر واحد وخمسة أشهر والذين يرضعون طبيعياً، وذلك لعزل وتوصيف الكائنات الحية الدقيقة ذات الأهمية. تم عزل ثلاثين سلالة بكتيرية، ومن بينها تم اختيار ثماني سلالات لإجراء تقييم معمق لخصائصها البروبيوتيك. شملت معايير الاختيار قدرتها على مقاومة الظروف المعوية المحاكية (حموضة المعدة وأملاح الصفراء)، وقدرتها على الالتصاق بالظهارة المعوية، فضلاً عن دورها المحتمل في تحقيق التوازن الميكروبي. وقد ركزت الدراسة على أجناس *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* و *Enterococcus* لما لهما من دور أساسي في نمو وحماية ميكروبيوتا أمعاء الرضع. أظهرت النتائج أن بعض السلالات تمتلك خصائص واعدة، ليس فقط في الحفاظ على صحة الجهاز الهضمي للرضع، بل أيضاً في تعزيز الجهاز المناعي في المراحل المبكرة من الحياة. كما تناولت الدراسة الجوانب المتعلقة بسلامة استخدام البروبيوتيك وإمكانيات توظيفها في الأغذية الوظيفية، وخاصة في منتجات الألبان المخمرة وتغذية الرضع. وخلاصة القول، يؤكد هذا العمل على أهمية تحديد واستغلال البكتيريا النافعة المستخلصة من ميكروبيوتا الأمعاء عند الرضع، حيث يمكن أن تمثل السلالات المختارة مرشحين مهمين للتطبيقات المستقبلية في تغذية الأطفال والوقاية من الاضطرابات الهضمية.

الكلمات المفتاحية: الميكروبات المعوية ، *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* , الرضاعة الطبيعية،  
الرضع، تغذية الرضع



## Résumé

Cette étude s'inscrit dans le cadre de l'exploration du potentiel probiotique des bactéries constituant la flore intestinale des nourrissons. Quatre échantillons de selles provenant d'enfants âgés de 1 à 5 mois et allaités exclusivement au sein ont été analysés afin d'isoler et de caractériser les microorganismes d'intérêt. Au total, trente souches bactériennes ont été isolées, parmi lesquelles huit ont été retenues pour une évaluation approfondie de leurs propriétés probiotiques. Les critères de sélection incluaient la résistance aux conditions simulant l'environnement gastro-intestinal (acidité gastrique et sels biliaires), la capacité d'adhésion à l'épithélium intestinal, ainsi que les effets bénéfiques potentiels sur l'équilibre microbien. L'accent a été mis sur les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus*, connus pour leur rôle majeur dans le développement et la protection du microbiote infantile. Les résultats mettent en évidence que certaines souches possèdent des caractéristiques prometteuses, non seulement pour le maintien de la santé digestive des nourrissons, mais aussi pour le renforcement du système immunitaire en période précoce de la vie. L'étude discute également des critères de sécurité liés à l'utilisation de probiotiques et de leurs perspectives d'application dans les produits alimentaires fonctionnels, notamment les laits et préparations fermentées. En conclusion, ce travail confirme l'importance d'identifier et de valoriser les bactéries bénéfiques issues du microbiote infantile. Les souches sélectionnées pourraient constituer des candidates pertinentes pour des applications futures dans la nutrition infantile et la prévention des troubles gastro-intestinaux.

**Mots-clés :** Microbiote intestinale, nourrissons, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, Allaitement maternel, nutrition infantile.

## Abstract

This study aims to highlight the probiotic potential of bacteria present in the intestinal flora of infants. Four stool samples from breastfed infants aged 1 to 5 months were analyzed to isolate and characterize microorganisms of interest. A total of thirty bacterial strains were isolated, from which eight were selected for a thorough evaluation of their probiotic properties. The selection criteria included resistance to simulated gastrointestinal conditions (gastric acidity and bile salts), adhesion capacity to the intestinal epithelium, and potential benefits on microbial balance. Special focus was given to the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Enterococcus*, which play a key role in the development and protection of the infant gut microbiota. The results revealed that some strains exhibit promising characteristics, not only in maintaining digestive health in infants but also in strengthening the immune system during early life. The study also discusses safety considerations for probiotic use and their possible applications in functional foods, particularly fermented dairy products and infant nutrition formulas. In conclusion, this work emphasizes the importance of identifying and valorizing beneficial bacteria from the infant gut microbiota. The selected strains may represent valuable candidates for future applications in infant nutrition and the prevention of gastrointestinal disorders.

**Keywords:** Intestinal microbiota, infants, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, breastfeeding, infants nutrition.

## Introduction

Au cours des dernières décennies, le microbiote intestinal a suscité un intérêt croissant en tant qu'acteur central de la santé humaine. Loin de se limiter à un simple consortium de micro-organismes, il représente une communauté complexe de bactéries, archées, champignons et virus coexistant en équilibre au sein du tractus gastro-intestinal. Ce microbiote assure des fonctions vitales, telles que la digestion des aliments, l'absorption des nutriments, la synthèse de vitamines, ainsi que la modulation du système immunitaire et le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (Burcelin et al., 2016 ; O'Hara et al., 2006). Plus récemment, des recherches ont mis en évidence son implication dans l'axe intestin-cerveau, soulignant son rôle potentiel dans la régulation de l'humeur et des fonctions neurologiques.

Chez le nourrisson, cette flore est en pleine constitution et s'avère particulièrement influencée par plusieurs facteurs précoces : le mode d'accouchement, le type d'alimentation (lait maternel ou infantile), l'environnement et l'exposition aux antibiotiques (Rutayisire et al., 2016 ; Campeotto et al., 2007). Ces éléments contribuent à façonner un microbiote dont l'équilibre est déterminant pour la santé future de l'individu.

Parmi les micro-organismes qui colonisent l'intestin, certaines souches se distinguent par leurs propriétés probiotiques. Ces bactéries, qualifiées de probiotiques, exercent des effets bénéfiques sur l'hôte : elles modulent la composition du microbiote, renforcent la barrière intestinale, inhibent la croissance d'agents pathogènes et stimulent la réponse immunitaire (Gaggia et al., 2010). Pour être reconnues comme probiotiques, ces souches doivent répondre à plusieurs critères : tolérance à l'acidité gastrique et aux sels biliaires, adhésion à l'épithélium intestinal, production de composés antimicrobiens et innocuité, notamment l'absence de gènes de résistance aux antibiotiques.

C'est dans cette perspective que s'inscrit la présente étude, intitulée « Mise en évidence de l'activité probiotique des bactéries présentes dans la flore intestinale des nourrissons ». L'objectif principal est d'isoler, purifier et caractériser 42 souches bactériennes à partir d'échantillons de selles de nourrissons âgés de 1 à 5 mois. Ces isolats ont été soumis à une série de tests microbiologiques, biochimiques et physiologiques visant à évaluer leur capacité de survie dans des conditions gastro-intestinales hostiles, leur production de métabolites bioactifs et leurs propriétés fonctionnelles.

Cette étude repose sur une revue approfondie de la littérature scientifique récente (2010–2024), combinée à des investigations expérimentales. Elle vise à identifier des souches locales présentant un potentiel probiotique, qui pourraient être valorisées dans des approches nutritionnelles ou thérapeutiques innovantes, adaptées à la population pédiatrique. Nous espérons que ce travail contribuera à enrichir la compréhension du rôle du microbiote intestinal et des probiotiques dans le maintien de la santé humaine, tout en ouvrant des perspectives de recherche future axées sur des interventions microbiologiques personnalisées.



# Chapitre 1

### I.1.1.Définition

La flore intestinale, également appelée microbiote, représente l'ensemble des micro-organismes non pathogènes vivant dans un environnement spécifique appelé microbiome, chez un hôte animal, végétal ou même dans des matières d'origine animale ou végétale. Notre organisme comprend plusieurs microbiotes, notamment sur la peau, dans la bouche et dans le vagin, mais le microbiote intestinal demeure le plus crucial parmi eux (Burcelin et al., 2016).

Les composants principaux du microbiote intestinal sont des bactéries, avec la présence également d'archées, de virus et de champignons. Ce microbiote se situe entre la lumière du tube digestif et le mucus de l'épithélium intestinal, étant le plus abondant dans l'intestin grêle et le côlon (O'Hara et al., 2006).

Chez l'être humain, le microbiote intestinal forme un écosystème extrêmement complexe (Conway, 1995), interagissant avec l'hôte à la fois localement, par le biais de contacts étroits avec la muqueuse intestinale, et systématiquement, affectant les fonctions immunologiques, physiologiques, métaboliques et nutritionnelles de l'hôte. Ainsi, l'écosystème colique joue un rôle crucial dans la santé humaine dès le plus jeune âge (Cinquin, 2005).

La flore intestinale humaine comprend environ  $10^{14}$  cellules microbiennes, soit 10 à 20 fois le nombre de cellules de l'organisme. Cependant, parmi cette population, seules 20% des espèces bactériennes sont actuellement répertoriées dans les collections de souches (Bjorksten, 2004).

Bien que les méthodes moléculaires d'étude aient représenté un grand pas en avant dans ce domaine, la composition complète de la flore intestinale reste encore largement inconnue. De plus, bien que chaque individu possède une microflore fécale relativement stable dans le temps en raison de l'effet protecteur de la flore elle-même, les différences interindividuelles accentuent la biodiversité et rendent l'étude et la compréhension de ce microbiote plus complexes (Benmoussa, 2019).

### I.1.2. Composition de la flore intestinale humaine

**I.1.2.1. Flore dominante :** La flore dominante est principalement constituée de plus de  $10^9$  unités formant colonies (UFC) par gramme d'espèces strictement anaérobies telles que les Bacteroides, Eubacterium, Bifidobacterium, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Clostridium et Propionibacterium (Jaglin, 2013).

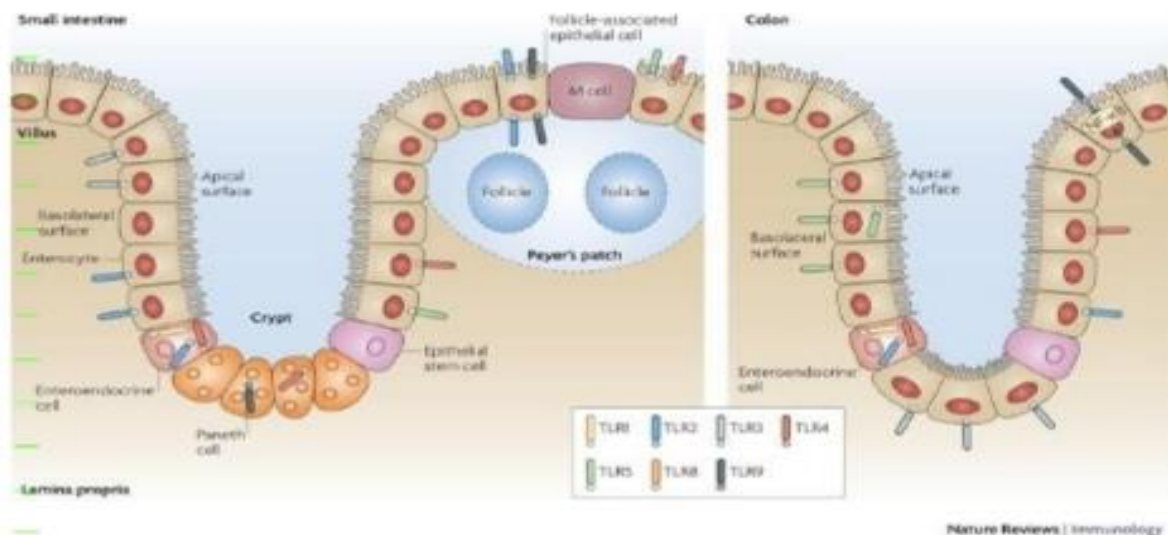
**I.1.2.2. Flore sous-dominante :** La flore sous-dominante comprend entre  $10^6$  et  $10^8$  UFC/g, principalement constituée d'Escherichia coli et de plusieurs espèces de la famille des Enterobacteriaceae, ainsi que certains genres comme les Streptococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Fusobacterium, Desulfovibrio et Methanobrevibacter (Jaglin, 2013).

**I.1.2.3. Flore résiduelle :** La flore résiduelle comprend moins de  $10^6$  UFC/g. La flore dominante empêche le développement des bactéries de cette flore (Debré et Le Gall, 2014).

**I.1.2.4. Flore fécale :** L'analyse de la flore fécale permet d'identifier un nombre important d'espèces mortes, donnant ainsi une vision limitée de l'ensemble des micro-organismes constituant la flore intestinale totale, y compris certaines souches pathogènes pour l'hôte (Debré et Le Gall, 2014).

## I.2. L'épithélium intestinal

L'épithélium qui tapisse l'intestin grêle et le côlon est un épithélium prismatique simple composé de divers types cellulaires. Sa structure unique, avec des invaginations et des cryptes (voir figure 1), ainsi que la présence de microvillosités, favorise une surface d'absorption très étendue (Muniz et al., 2012).



**Figure 1 :** L'épithélium intestinal (Abreu, 2010).

Les cellules prédominantes sont les entérocytes (ou colonocytes dans le côlon), caractérisées par des microvillosités et exerçant différentes fonctions. Elles assurent l'absorption des nutriments grâce à la sécrétion d'enzymes spécifiques et contribuent à la protection par leur effet barrière (Durand, 1993).



### **D'autres types cellulaires incluent :**

Les cellules caliciformes, responsables de la production de mucus,

Les cellules endocrines,

Dans l'iléon, les cellules M sont présentes dans les plaques de Peyer où elles identifient et capturent les antigènes et micro-organismes présents dans la lumière intestinale,

Au fond des cryptes de l'intestin grêle se trouvent les cellules de Paneth, qui participent au système immunitaire inné en sécrétant des peptides antimicrobiens.

Sous l'épithélium de revêtement se trouve un tissu conjonctif de soutien appelé lamina propria ou chorion, qui comporte un réseau vasculaire et lymphatique très dense permettant l'absorption des nutriments digérés. Il renferme également de nombreux éléments cellulaires participant au système immunitaire, agissant comme une ligne de défense contre les microbes ayant franchi l'épithélium intestinal (Niess et al., 2008; Gaboriau-Routhiau et al., 2009).

### **I.3.Analyse de la microbiote intestinal**

Pendant de nombreuses années, l'étude du microbiote intestinal a été limitée en raison de la difficulté de cultiver la majorité de ses espèces, notamment les anaérobies strictes, en laboratoire ou en utilisant des milieux de culture spécifiques. On estime que seules environ 30 % des espèces de notre flore intestinale peuvent être cultivées in vitro. L'avènement de la biologie moléculaire et du séquençage a permis une analyse plus approfondie de la composition du microbiote (Claude et al., 2011).

Pendant plus de 30 ans, le séquençage de l'ADN a été réalisé selon la méthode de synthèse enzymatique de Sanger. À partir des années 2000, les premiers appareils de séquençage à haut débit ont émergé, accélérant considérablement le processus. Ce séquençage commence par l'amplification des molécules d'ADN à analyser, suivi de l'incorporation des bases complémentaires du brin à séquencer, puis de la lecture de la séquence (Claude et al., 2011).

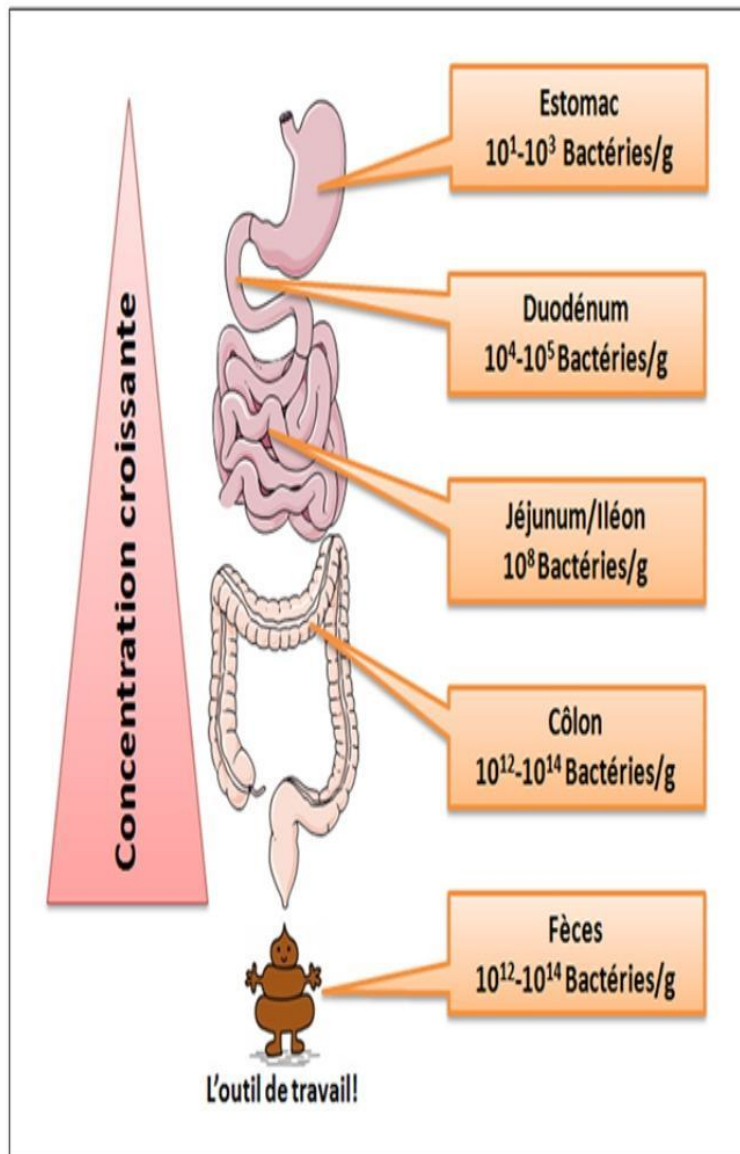
Pour analyser la composition du microbiote intestinal, le séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S est largement utilisé. L'ARN ribosomal 16S est présent dans toutes les bactéries, avec des régions conservées communes à toutes les bactéries, des régions variables communes à un groupe bactérien donné, et des régions hypervariables spécifiques à chaque espèce (Qin et al., 2010).

L'analyse métagénomique consiste à étudier l'ensemble des génomes bactériens présents dans un écosystème donné, visant à découvrir tous les organismes constituant ce mélange complexe (Kim, 2013).

L'étude MetaHIT, lancée en 2008 et dirigée par l'INRA, visait à identifier tous les génomes microbiens intestinaux (métagénome) par séquençage à haut débit. Cette étude, basée sur l'analyse d'échantillons de selles provenant de 124 personnes, a identifié un total de 3,3 millions de gènes différents, appartenant à plus de 1000 espèces différentes, principalement d'origine bactérienne (MetaHIT, 2010; Qin et al., 2010). Elle a révélé que chaque individu portait en moyenne 540 000 gènes microbiens, provenant de plus d'une centaine d'espèces réparties en sept phyla différents. Ainsi, le génome du microbiote contient environ 150 fois plus de gènes que le génome humain. Cette étude a été la première à démontrer l'extrême richesse de la flore intestinale en identifiant des centaines d'espèces bactériennes jusqu'alors inconnues (Qin et al., 2010).

#### **I.4. Composition du microbiote intestinal**

Chaque individu héberge dans son système digestif  $10^{14}$  micro-organismes qui forment son microbiote intestinal, représentant une quantité 10 fois supérieure au nombre total de cellules eucaryotes dans le corps humain (Cdu-hge., 2014). On observe des variations en termes de diversité et de quantité du microbiote intestinal tout au long du tractus digestif, de la bouche à l'anus. La diversité bactérienne dans la bouche est considérable, incluant des bactéries aérobies et anaérobies, tandis que celle de l'estomac est plus restreinte, tant en termes de nombre que de diversité. Les concentrations augmentent de manière progressive ( voir figure 02) : au niveau de l'estomac, on compte quelques centaines de bactéries par gramme de contenu, alors qu'au niveau du côlon distal, ce nombre atteint  $10^{11}$  bactéries par gramme de contenu (Barbut et Joly, 2010).



**Figure 2.** Répartition de la quantité des bactéries dans le tractus digestif.

---

#### 1.4.1. Classification des principales bactéries du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est spécifique à chaque individu, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Certaines espèces dominantes, présentes chez la plupart des individus, demeurent stables et exécutent les fonctions essentielles du microbiote, tout en étant associées à des populations minoritaires qui sont uniques à chacun. Les bactéries prédominantes du microbiote peuvent être classées en trois principaux phyla bactériens (voir tableau I) (Barbut et Joly, 2010).

- Le phylum des Firmicutes : Les Firmicutes sont des bactéries à Gram positif et représentent généralement plus de la moitié des micro-organismes du microbiote. Ce phylum comprend trois classes de bactéries : • La classe I des Clostridia qui englobe les genres Clostridium, Ruminococcus et Faecalibacterium, • La classe II des Mollicutes contenant des bactéries du genre Mycoplasma, • La classe III des Bacilli comprenant les genres Listeria, Staphylococcus, Lactobacillus, Enterococcus et Streptococcus (Eckburg et al., 2005).
- Le phylum des Bacteroidetes : Ce phylum représente jusqu'à 30% de la population bactérienne. On y trouve notamment les bactéries du genre Bacteroides, des bactéries en forme de bacille à Gram négatif anaérobies, ainsi que le genre Prevotella (Suau et al., 1999; Eckburg et al., 2005).
- Le phylum des Actinobacteria : Les Actinobacteria représentent généralement moins de 10% de la population du microbiote. Ce sont des bactéries à Gram positif, notamment les genres Actinomyces, Mycobacterium ou Bifidobacterium. On trouve également des bactéries du phylum des Proteobacteria, incluant l'ordre des Entérobacterales, des bactéries anaérobies facultatives présentes en faible quantité (Rigottier-Gois et al., 2003; Eckburg et al., 2005).

Les principales bactéries du microbiote intestinal sont réparties en trois phyla majeurs : les Firmicutes, les Bacteroidetes et les Actinobacteria (voir tableau 1).

**Tableau 1 :** La composition du microbiote intestinal adaptée de Barbut et Joly (2010) et Eckburg et al. (2005).

| Phylum bactérien      | Gram        | Proportion approximative | Genres principaux                                                                       |
|-----------------------|-------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Firmicutes</b>     | Positif (+) | > 50 %                   | Clostridium,<br>Ruminococcus,<br>Faecalibacterium,<br>Lactobacillus,<br>Enterococcus... |
| <b>Bacteroidetes</b>  | Négatif (-) | ≈ 30 %                   | Bacteroides,<br>Prevotella                                                              |
| <b>Actinobacteria</b> | Positif (+) | < 10 %                   | Bifidobacterium,<br>Actinomyces,<br>Mycobacterium                                       |
| <b>Proteobacteria</b> | Négatif (-) | Faible (<1-5%)           | Escherichia,<br>Enterobacter, etc.                                                      |

## I. 5.Mise en place de la microbiote

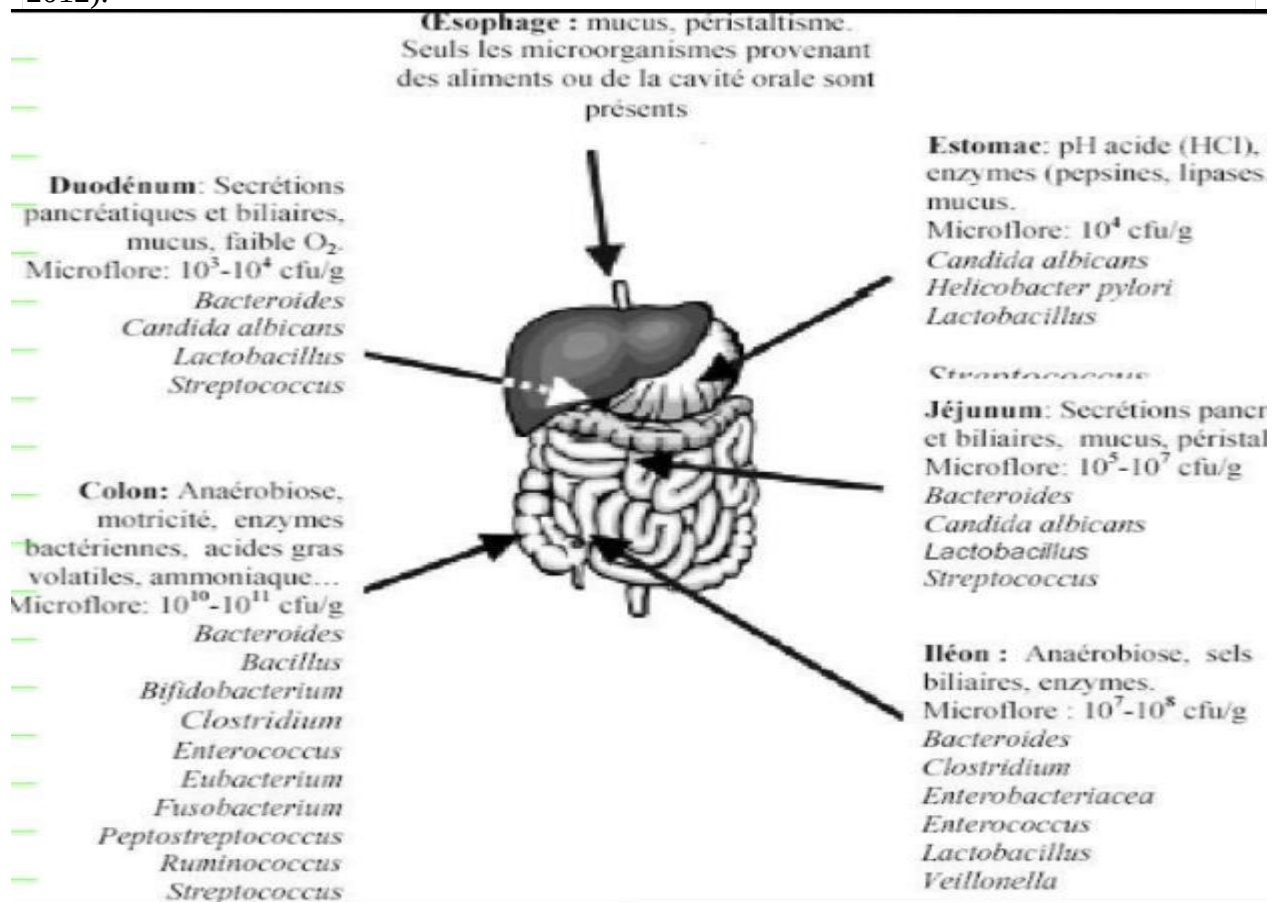
Lors de la naissance, le nouveau-né est dépourvu de micro-organismes et le processus de colonisation bactérienne commence immédiatement après l'accouchement à partir des flores maternelles et de l'environnement immédiat. Cette colonisation dépend du type d'accouchement, avec un contact plus important lors d'une naissance par voie basse par rapport à une césarienne, ainsi que de l'environnement de naissance et du contact avec le personnel médical (Campeotto et al., 2007).

Chez les enfants nés à terme, les premières bactéries à s'implanter sont principalement des organismes aérobies-anaérobies facultatifs tels que les entérobactéries (notamment *E. coli*), les entérocoques et les staphylocoques. Ces bactéries initiales consomment rapidement l'oxygène dans l'intestin, favorisant l'installation d'organismes anaérobies stricts tels que *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* et *Lactobacilles* microaérophiles (Ducluzeau, 1993).

Selon Mitsuoka (1996), le nourrisson est continuellement exposé à de nouvelles bactéries provenant de l'environnement, de l'alimentation et des bactéries cutanées des adultes. Une microbiote intestinale complexe et stable, similaire à celle des adultes mais unique à chaque individu, semble se former entre 2 et 4 ans. Bien que la composition de la microbiote reste stable pendant une grande partie de la vie, des changements peuvent survenir chez les personnes âgées, notamment une diminution des bifidobactéries qui deviennent moins dominantes et une augmentation des entérobactéries, des bactéries lactiques et des clostridies (Conrads et Lütticken, 1992).

## I. 6.Répartition topographique des espèces intestinales

La distribution de la microbiote varie selon les segments du tractus gastro-intestinal, comme illustré dans la figure 3. Ce milieu gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions microbiologiques distinctes pour la survie des différents microorganismes (Ebel, 2012).



**Figure 3 :** Les microflores des différents compartiments de l'appareil digestif de l'homme (Ouwehand et Vesterlund, 2003).

Au niveau gastrique : La croissance microbienne est significativement réduite (moins de  $10^3$  UFC/g) en raison de l'apport d'oxygène par la déglutition et de l'acidité élevée. Par conséquent, l'estomac héberge sélectivement les micro-organismes résistants à l'acidité et facultativement anaérobies tels que les lactobacilles, streptocoques, levures, etc. (Goulet, 2009).

- Dans l'intestin grêle : On observe des variations quantitatives (duodénum  $10^3$ - $10^4$  UFC/g, jéjunum  $10^4$ - $10^6$  UFC/g, iléon  $10^6$ - $10^8$  UFC/g) et qualitatives : diminution progressive des

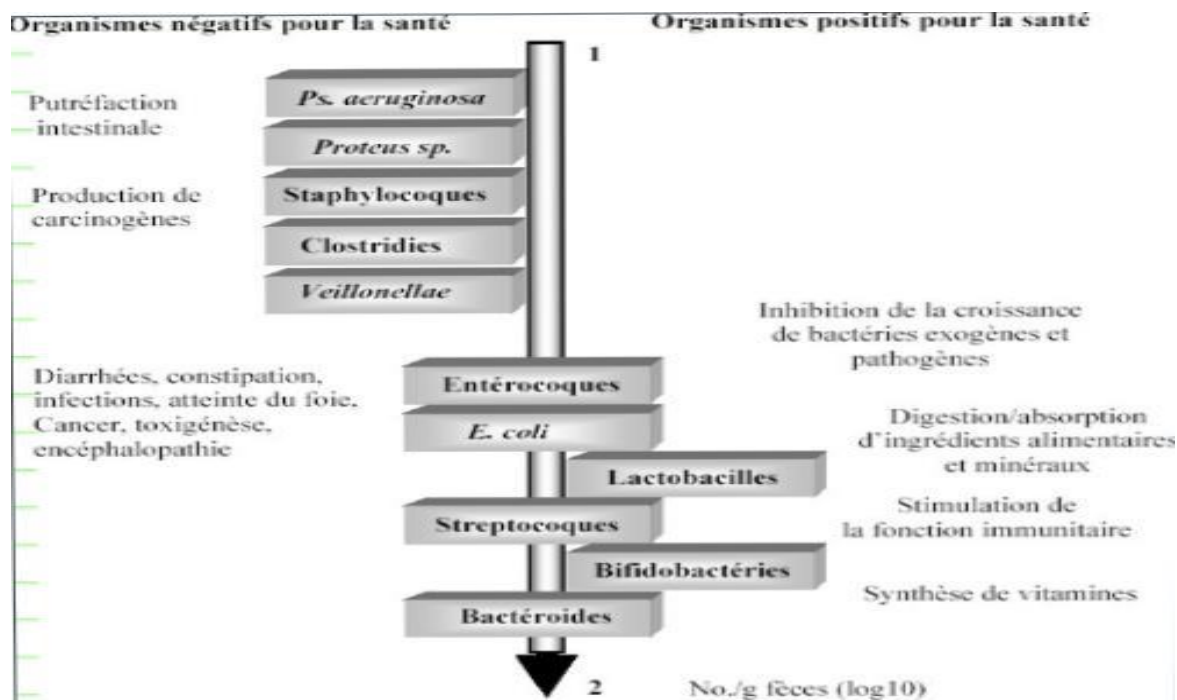
bactéries aérobies au profit des bactéries strictement anaérobies telles que les Bifidobactéries, les Bactéroides et les Clostridies. L'intestin grêle abrite peu de bactéries aérobies qui jouent un rôle négligeable (Gournier-Chateau, 1994; Dacosta, 2001).

- Au niveau du côlon : Le transit, considérablement ralenti, entraîne une stase favorisant une augmentation significative de la population bactérienne (de 10<sup>9</sup> à 10<sup>11</sup> UFC/g). Il s'agit d'une véritable chambre de fermentation, où ont lieu de nombreuses transformations des aliments non digérés provenant de l'intestin grêle. Le côlon est la seule région colonisée de manière permanente : la flore microbienne, principalement anaérobie, est dense et active, produisant localement de nombreux métabolites (Blum et al., 1999; Rastall, 2004).

**I. 6.1.Diversité du microbiote colique** Le microbiote du côlon constitue un écosystème complexe composé de plusieurs centaines d'espèces bactériennes, sous-espèces et biotypes. La majorité de ces bactéries sont strictement anaérobies (Conway, 1995), avec certaines espèces plus abondantes que d'autres. Environ 40 espèces représentent approximativement 99 % de la flore bactérienne (Macfarlane et Macfarlane, 1997).

Le microbiote intestinal du côlon existe sous deux états : l'état planctonique, où les populations bactériennes évoluent librement et isolément dans l'environnement colique, et l'état sessile, où les bactéries sont attachées à des particules alimentaires ou au mucus intestinal, formant ainsi un biofilm (Macfarlane et al., 1990; Probert et Gibson, 2002).

L'analyse de sa composition en taxa (genres bactériens et/ou grands groupes phylogénétiques) révèle des composantes récurrentes retrouvées chez tous les individus. Les principaux composants de la flore colique ainsi que leurs impacts sur l'hôte sont illustrés dans la figure 4.



**Figure 4 :** Vue générale sur la microflore du colon humain (Gibson et Roberfroid, 1995).

### I.7. Les déterminants de la flore intestinale

La constitution et les rôles de la microflore du tractus gastro-intestinal sont impactés par divers paramètres relatifs aux changements physiologiques de l'hôte (comme l'âge et l'état de santé), à la nature du régime alimentaire, aux conditions physico-chimiques (telles que le pH intestinal et la motricité), ainsi qu'aux facteurs environnementaux (tels que la contamination par des agents pathogènes, l'administration d'antibiotiques, de médicaments chimiothérapeutiques, le climat, le stress, et l'hygiène) (Mitsuoka, 1989; Hopkins et al., 2002). Ces principaux déterminants qui influencent la microflore gastro-intestinale sont synthétisés dans le tableau II.



**Tableau 2:** Principaux déterminants influençant la composition et les fonctions de la microflore intestinale (Holzapfel et al., 1998).

| Facteurs liés à l'hôte                              | Facteurs microbiens                        |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| -pH, sécrétions<br>(immunoglobulines, bile,         | - adhésion                                 |
| sels, enzymes)                                      | - motilité                                 |
| - mobilité (péristaltisme)                          | - flexibilité nutritionnelle               |
| -physiologie (variable selon les                    | - Spores, capsules, enzymes,<br>composants |
| compartiments)                                      | Antimicrobiens                             |
| - cellules détachées, mucines,<br>exsudats de tissu | - temps de génération                      |

### I.7.1. Mode d'accouchement

L'implantation microbienne diffère entre les nouveau-nés nés par césarienne et ceux nés par voie vaginale (Rutayisire et al., 2016). Les nourrissons nés par césarienne ne sont pas immédiatement exposés aux bactéries maternelles en raison des conditions hygiéniques strictes liées à cette intervention. Ils entrent d'abord en contact avec les bactéries de leur environnement, y compris celles présentes dans l'air et sur le personnel soignant. Indépendamment du mode d'accouchement, les premières bactéries colonisatrices sont toujours des anaérobies facultatifs (Entérobactéries, Entérocoques, Staphylocoques). Cependant, la colonisation par des bactéries anaérobies strictes se fait beaucoup plus tardivement chez les enfants nés par césarienne, avec un retard pouvant aller jusqu'à six mois pour le genre *Bacteroides*.

### I.7.2. Facteurs génétiques individuels

Des études sur des jumeaux monozygotes ont montré que la composition du microbiote est partiellement influencée par la génétique. Les individus partageant le même environnement et des conditions de vie similaires présentent un microbiote semblable, bien que moins génétiquement proche (comme dans le cas des frères et sœurs) (Fond et al., 2015).

### **I.7.3. Terme de naissance**

Chez les nouveau-nés prématurés, il existe un retard significatif de colonisation microbienne par rapport aux enfants nés à terme, avec une diversité réduite d'espèces bactériennes. Ce retard est particulièrement notable pour les bactéries anaérobies (*Bifidobacterium* et *Bacteroides*), tandis que les bactéries aérobies (*Entérobactéries*, *Entérocoques*, *Staphylocoques*) colonisent rapidement les prématurés. Ce retard s'explique en partie par le fait que ces enfants sont souvent nés par césarienne, rapidement séparés de leur mère et placés dans un environnement de soins intensifs très aseptisé, souvent soumis à une antibiothérapie à large spectre (Westerbeek et al., 2006).

### **I.7.4. Influence de l'environnement**

L'exposition du nourrisson aux bactéries environnementales joue un rôle crucial dans le développement de sa flore intestinale. Les règles d'hygiène strictes en maternité limitent initialement cette exposition, retardant ainsi la colonisation par les *Bacteroides* et les *Bifidobacterium* (Campeotto et al., 2007). En revanche, un environnement rural avec la présence d'animaux pendant l'enfance favorise une plus grande diversité microbienne (Penders et al., 2006).

### **I.7.5. Influence de l'alimentation**

#### **I.7.5.1. Lait maternel et lait infantile**

Le lait maternel est naturellement riche en bactéries commensales telles que les *Staphylocoques*, les *Streptocoques* et les *Bifidobactéries*. Les nourrissons allaités au sein ont un microbiote dominé par ces bactéries par rapport à *Escherichia coli* et *Clostridium difficile*. Bien que le lait infantile soit formulé pour ressembler au lait maternel, les enfants nourris avec celui-ci présentent un microbiote plus complexe, avec une moindre quantité de *Bifidobactéries* et une prépondérance de *Bacteroides*, *Clostridium* et *Staphylococcus* (Frayssinhes, 2017).

#### **I.7.5.2. Alimentation de l'adulte**

La composition initiale du microbiote se modifie progressivement avec les changements alimentaires, devenant plus complexe et stable vers l'âge de 2 à 4 ans. Cette maturation s'accompagne d'une augmentation des genres *Bacteroides*, *Enterocoques*, et *Streptocoques* (Yatsunenko et al., 2012).

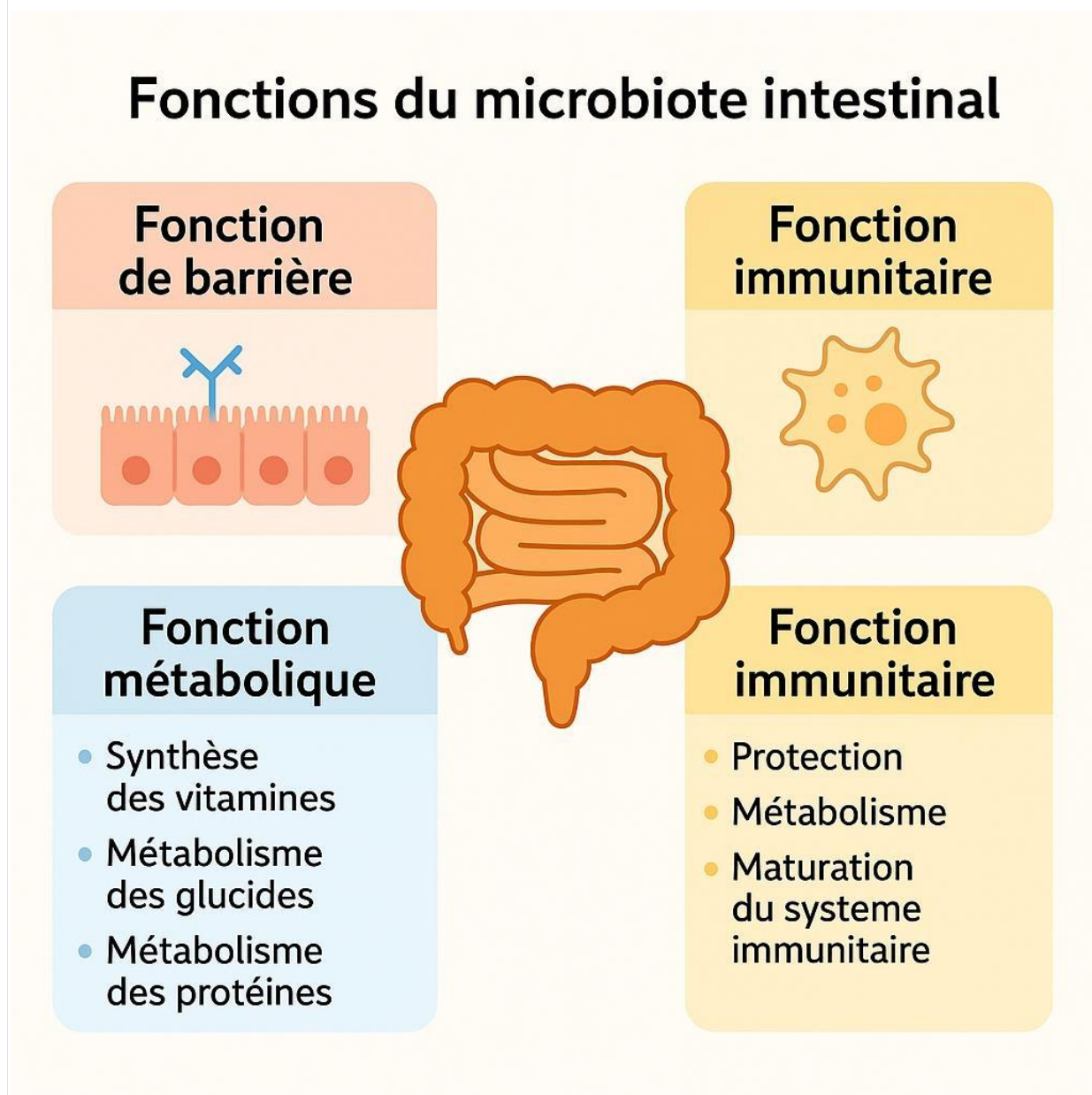
### **I.8. Effets de l'antibiothérapie**

L'utilisation d'antibiotiques administrés à la mère pendant l'accouchement peut affecter l'établissement de la flore microbienne du nouveau-né. Par exemple, l'antibioprophylaxie pour prévenir les infections néonatales à streptocoque du groupe B. Des recherches ont montré, d'une part, une augmentation des infections néonatales causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques, et d'autre part, une modification de la flore intestinale du nouveau-né, notamment une diminution de la colonisation par les genres *Bifidobacterium* et *Clostridium*. Ce changement

de la flore microbienne pourrait altérer l'effet barrière de la flore intestinale, favorisant ainsi la colonisation par des microorganismes résistants (Campeotto et al., 2007).

### I.9. Fonctions du microbiote

Le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans de nombreuses fonctions physiologiques et apporte divers bénéfices à l'hôte (figure 5).



**Figure 5** : Représentation schématisque des principales fonctions du microbiote intestinal (d'après Descoins, 2017; Frayssinhes, 2017; Delzenne et Cani, 2008; Termaroli et Backhed, 2012; CDU-HGE, 2014; Gailhard et Balard, 2015).

---

### **I.9.1. Fonction de barrière et protection**

La microbiote intestinale agit comme une barrière protectrice pour l'hôte en cas de prolifération massive de bactéries pathogènes ou opportunistes. La perméabilité de la barrière intestinale peut être altérée par les bactéries en réduisant les jonctions entre les cellules épithéliales, dans le but de restreindre le passage des substances vers la circulation sanguine. En outre, certaines bactéries, comme *Lactobacillus plantarum*, produisent des molécules cruciales pour la protection et l'hydratation de la muqueuse intestinale, telles que les mucines MUC 2, ce qui permet une régénération rapide du tissu épithélial (Delzenne et Cani, 2008; Termaroli et Backhed, 2012; CDU-HGE, 2014; Gailhard et Balard, 2015).

Des substances antimicrobiennes (bactériocines, acide lactique) sont également synthétisées par ces bactéries, induisant une compétition avec les espèces pathogènes ou en empêchant leur adhérence aux sites épithéliaux, ainsi qu'une compétition sur les besoins nutritionnels (Gailhard et Balard, 2015).

### **I.9.2. Fonction métabolique**

#### **I.9.2.1. Synthèse des molécules indispensables**

##### **Synthèse des vitamines**

La microbiote intestinale est composée de bactéries responsables de la synthèse de plusieurs vitamines essentielles au niveau cellulaire, telles que le facteur de coagulation sanguine (vit K), la thiamine (vit B1), la biotine (vit B8), l'acide folique (vit B9) et la cobalamine (vit B12) (Descoins, 2017).

##### **Synthèse des neurotransmetteurs**

Les neurotransmetteurs, ou neuromédiateurs, sont des molécules chimiques qui permettent la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses. Les bactéries de cette flore produisent également des neurotransmetteurs similaires à ceux de notre tissu épithélial, pouvant influencer le système nerveux central par les voies de communication entre le microbiote intestinal et le cerveau (Descoins, 2017).

#### **I.9.2.2. Métabolisme digestif**

##### **Métabolisme des glucides**

Le microbiote intestinal participe à la dégradation des glucides consommés par l'individu, en transformant les polysaccharides en métabolites de fermentation par plusieurs étapes. Les bactéries fibrolytiques produisent des enzymes qui hydrolysent les polymères glucidiques des fibres végétales en fragments plus petits (oses et oligosaccharides) comme première étape, ce

---

que les cellules humaines ne peuvent réaliser. Ensuite, les bactéries glycolytiques transforment ces glucides en pyruvate par glycolyse, lequel est ensuite converti en acides gras à chaîne courte, comme l'acétate, le propionate et le butyrate, qui servent de source d'énergie pour les cellules épithéliales du côlon, favorisant leur renouvellement rapide et stimulant les échanges d'eau et de minéraux (Descoins, 2017).

### **Métabolisme des protéines**

L'activité enzymatique de certaines bactéries (protéases, désaminases, transaminases) dans le côlon intervient dans la dégradation des protéines en petits peptides, qui sont ensuite hydrolysés en acides aminés. Ces acides aminés servent alors de source d'énergie ou d'azote pour les bactéries qui n'utilisent pas les glucides lors de la fermentation. Les produits issus de la désamination des acides aminés incluent des acides gras à chaîne courte (AGCC) et de l'ammoniac. L'ammoniac, étant un élément toxique, est rapidement absorbé et transformé en urée par le foie, puis éliminé dans les urines (Descoins, 2017; Frayssinhes, 2017).

### **Métabolisme des lipides**

Les acides gras non absorbés au niveau de l'intestin grêle sont transformés par les bactéries coliques par divers types de réactions (hydrolyse, hydroxylation, oxydation et réduction). Le coprostanol, qui est un produit non absorbable issu du métabolisme de 70% du cholestérol par le microbiote, est éliminé dans les fèces. Une étude de Gerard et al. (2007) a montré le rôle d'une souche proche de l'espèce **Bacteroides dorei** dans le métabolisme du cholestérol, bien que les espèces bactériennes responsables du métabolisme de cette molécule restent peu connues (Veiga et al., 2005).

### **Métabolisme des gaz**

L'hydrogène est produit en quantité significative dans le côlon lors du processus de fermentation bactérienne. Bien que les bactéries hydrogénotrophes transforment une grande partie de cet hydrogène, une partie est également éliminée vers l'extérieur par voie pulmonaire ou par émission de gaz rectaux. Le méthane peut être produit par les bactéries méthanogènes comme les **Archaea** et par les bactéries sulfato-réductrices comme **Desulfovibrio** (Descoins, 2017).

### **I.9.3. Fonction immunitaire**

Les progrès récents dans la compréhension du système immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale ont permis de développer le concept de l'immuno-nutrition, qui correspond à l'interaction physiologique de l'hôte avec la microflore intestinale, un facteur déterminant dans la maturation du système immunitaire. Des aliments ou facteurs nutritionnels comme les oligosaccharides prébiotiques jouent un rôle crucial dans ce processus. Les OS du lait maternel influencent le développement de la flore bifidogène et l'immunité, en réduisant les infections,

---

l'inflammation et les allergies. Certaines formules de lait infantile enrichies en OS sont efficaces pour les nourrissons qui ne peuvent être allaités. La maturation et la régulation du système immunitaire digestif sont des étapes essentielles durant les premiers mois de vie. Plusieurs études ont suggéré que ce processus est largement influencé par des facteurs externes, notamment d'origine microbienne. Cela commence dès les premières heures de vie, lorsque le tube digestif, initialement stérile, est colonisé par diverses bactéries, selon le mode d'accouchement, l'environnement bactérien et le mode d'alimentation (Elsevier Masson, 2007).

### **I.10. Le syndrome de l'intestin irritable**

Le syndrome de l'intestin irritable (SII), également connu sous le nom de colopathie fonctionnelle, est l'une des maladies digestives fonctionnelles les plus courantes. Cette pathologie est qualifiée de fonctionnelle car elle n'est pas associée à des causes organiques ni à des lésions visibles à l'imagerie médicale. Le SII permet d'illustrer la communication entre le microbiote intestinal et le cerveau en situation de stress. Cette condition se manifeste par une hypersensibilité viscérale et une altération de la motricité digestive, pouvant entraîner des épisodes de diarrhée, de constipation ou une alternance des deux, affectant ainsi la qualité de vie des patients (Pellissier et al., 2008). On observe également une modification de la composition et de l'activité du microbiote intestinal, une activation du système immunitaire avec une inflammation chronique de bas grade, une augmentation de la perméabilité intestinale et une perturbation de l'axe microbiote-intestin-cerveau (Descoins, 2017).

### **I.11. La dysbiose**

La dysbiose représente un déséquilibre quantitatif et qualitatif de la diversité microbienne intestinale, influencée par divers facteurs. Ce déséquilibre est une cause majeure de nombreuses pathologies, telles que l'obésité, le syndrome métabolique, le syndrome de l'intestin irritable, les maladies inflammatoires intestinales, les maladies auto-immunes, le cancer colorectal et hépatique, ainsi que certains troubles psychiatriques comme la dépression et les troubles du spectre autistique (TSA) (Mondor et al., 2013). Dans un microbiote équilibré, Sampson et al. (2016) ont rapporté une abondante expression de l'alpha-synucléine, une protéine clé dans le cerveau humain présente aux terminaisons pré-synaptiques des neurones. La présence de dysbiose chez les patients atteints de troubles neurodégénératifs pourrait aggraver la maladie en affectant la communication neuronale (Grasset et Burcelin, 2019).

### **I.12. Interactions hôte-microbiote dans l'intestin**

#### **Homéostasie intestinale:**

L'homéostasie désigne la capacité de l'organisme à maintenir un état de stabilité relative de son milieu interne, malgré les variations constantes de l'environnement externe. Le microbiote intestinal est constitué de nombreux micro-organismes tolérés par le système immunitaire intestinal et vivant en symbiose avec leur hôte. Ce microbiote est considéré comme un véritable organe ayant co-évolué avec son hôte pour établir une relation symbiotique conduisant à l'homéostasie physiologique. L'hôte fournit un environnement riche en nutriments que les bactéries commensales utilisent pour accomplir des fonctions telles que la production de

---

---

vitamines, la digestion de polysaccharides complexes grâce à des enzymes absentes chez l'hôte, et la formation d'un système immunitaire efficace. Les bactéries de la flore intestinale favorisent le développement des défenses immunitaires innées et adaptatives. Cependant, le système immunitaire intestinal doit constamment maintenir un état de tolérance envers la flore commensale tout en étant capable de déclencher des réponses immunitaires pro-inflammatoires protectrices contre les pathogènes gastro-intestinaux. Le maintien de cet équilibre repose sur des mécanismes de régulation qui assurent une réactivité réduite du système immunitaire intestinal face aux bactéries commensales inoffensives (Sonnenberg et al. 2011; Sawa, Lochner et al. 2011; Sonnenberg, Monticelli et al. 2012).

---

## Chapitre 2



---

## 1-Définition:

Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantité adéquate, exercent un impact positif sur la santé. Principalement constitués de bactéries et de levures, ils sont soit naturellement présents, soit réintroduits dans la flore intestinale résidente. Ils se divisent en quatre grands groupes : les ferments lactiques, les bifidobactéries, les levures de type saccharomyces, et d'autres sporules tels que *Bacillus subtilis* et *cereus*. Le concept de probiotique repose sur quatre principes fondamentaux : ils sont vivants, ingérés par voie orale, bénéfiques pour la santé, et agissent pour rétablir l'équilibre de la flore intestinale. De plus, les probiotiques peuvent être considérés comme des vecteurs de principes actifs tels que des enzymes, des composants de paroi, des peptides immuno-modulateurs et des substances antibactériennes, agissant dans le tractus digestif pour atteindre leurs cibles spécifiques (Gaggia et al., 2010; Marteau et al., 1993 et 1998).

## I-2-Classification des probiotiques :

### Classification des probiotiques

Les probiotiques peuvent être regroupés en quatre catégories (Tableau 03). La première catégorie comprend les espèces du genre *Lactobacillus*. Les lactobacilles sont des bactéries Gram-positif, appartenant au phylum des Firmicutes et à la famille des Lactobacillaceae (Hammes et Vogel, 1995). Ce sont des bacilles ou des coques anaérobies facultatives, immobiles, non flagellés et non sporogènes. Les lactobacilles constituent une part importante des bactéries lactiques capables de produire de l'acide lactique par fermentation de certains sucres comme le lactose. Elles colonisent l'organisme humain et se trouvent généralement dans le tractus gastro-intestinal, les muqueuses vaginales et la cavité buccale (Rouster et al., 2005). Les lactobacilles sont parmi les probiotiques les plus utilisés chez l'homme, notamment dans la fabrication de produits laitiers fermentés tels que le yogourt (Klaenhammer, 1998). Des souches commerciales courantes incluent *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* et *L. johnsonii* (Holzapfel et Schillinger, 2002).

La deuxième catégorie est constituée des espèces de *Bifidobacterium*. Ce sont des bacilles Gram-positif, anaérobies stricts et immobiles, qui constituent le groupe bactérien principal de la flore intestinale humaine (Mitsuoka, 1990). Les bifidobactéries sont largement utilisées comme probiotiques, en particulier dans l'industrie agroalimentaire, en raison de leurs nombreux bienfaits pour la santé. Par exemple, la souche commerciale *B. animalis* ssp. *lactis* Bb12 est largement utilisée (Mohan et al., 2006 ; Kabeerdoss et al., 2011).

Le troisième groupe de probiotiques comprend d'autres bactéries lactiques en forme de coques, telles que les *Enterococcus* et les *Streptococcus*. Quant au quatrième groupe, il est constitué de micro-organismes non-lactiques, notamment des bactéries sporulées comme *Bacillus cereus*, des bactéries de l'espèce *Propionibacterium freudenreichii*, ainsi que certaines levures comme *Saccharomyces*, principalement utilisées par l'industrie agroalimentaire.

---

Tableau (03) : Liste des microorganismes considérés comme des probiotiques. (Holzapfel et al, 2001)

| <i>Lactobacillus</i> | <i>Bifidobacterium</i> | Autres bactéries lactiques         | Bactéries lactiques           | non |
|----------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------------|-----|
| <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>Saccaromyces cervisiae</i> |     |
| <i>L.brevis</i>      | <i>B.bifidum</i>       | <i>Lactococcus lactis</i>          | <i>Saccaromyces boulardii</i> |     |
| <i>L.casei</i>       | <i>B.breve</i>         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>   |                               |     |
| <i>L.cellobius</i>   | <i>B.infatis</i>       | <i>Pedicoccus acidilactici</i>     |                               |     |
| <i>L.cripatus</i>    | <i>B.lactis</i>        | <i>sporolactobcillus</i>           |                               |     |
| <i>L.curvatus</i>    | <i>B.longum</i>        | <i>Streptococcus thermophilus</i>  |                               |     |
| <i>L.delbrueckii</i> | <i>B.thermophilum</i>  | <i>Streptococcus diacetylactis</i> |                               |     |
| <i>L.faciminis</i>   |                        | <i>Streptococcus intermedius</i>   |                               |     |
| <i>L.fermentum</i>   |                        |                                    |                               |     |
| <i>L.gallinarum</i>  |                        |                                    |                               |     |
| <i>L.gasseri</i>     |                        |                                    |                               |     |
| <i>L.jhonsonii</i>   |                        |                                    |                               |     |
| <i>L.paracasei</i>   |                        |                                    |                               |     |
| <i>L.plantarum</i>   |                        |                                    |                               |     |
| <i>L.reuteri</i>     |                        |                                    |                               |     |
| <i>L.rhamnosus</i>   |                        |                                    |                               |     |

### 2-3-Propriétés et Critères de Sélection des Souches Probiotiques

Pour qu'un microorganisme puisse être considéré comme un candidat probiotique, il doit répondre à certains critères essentiels. Tout d'abord, il doit être non pathogène et reconnu comme sûr. De plus, il doit démontrer une capacité à survivre et à se développer dans les conditions

physiologiques du tube digestif, tout en ayant une bonne tolérance au pH acide de l'estomac et aux sels biliaires du duodénum (Dunne et al., 2001).

L'adhérence aux cellules épithéliales intestinales est souvent citée comme un critère clé de sélection (Guarner et Schaafsma, 1998). Cette caractéristique revêt une grande importance car de nombreux probiotiques ne colonisent pas durablement l'intestin et doivent donc s'attacher à ses parois pour exercer leurs effets bénéfiques. Par exemple, les bactéries du genre *Lactobacillus* présentent une meilleure capacité d'adhérence aux lignées cellulaires intestinales HT-29 et Caco-2 par rapport aux *Bifidobacterium* (Thornton, 1996).

Le tableau (04) résume les critères les plus couramment utilisés pour la sélection des souches probiotiques.

**Tableau 04 :** Critères de sélection des probiotiques. (Nousiainen et al, 2004)

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

### **II.3.1. Résistance à l'acidité gastrique**

La capacité des bactéries à survivre dans le suc gastrique dépend de leur tolérance aux pH bas. Le temps de transit peut varier d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime alimentaire.

Ainsi, certains auteurs suggèrent que les souches probiotiques doivent pouvoir résister à un pH de 2,5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (Ammor et Mayo, 2007).

### **II.3.2. Résistance aux sels biliaires**

Dans l'intestin grêle, la capacité à tolérer les sels biliaires est cruciale pour la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent ensuite faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après la consommation de repas gras. Les bactéries peuvent atténuer l'effet émulsifiant des sels biliaires par hydrolyse à l'aide d'hydrolases, ce qui réduit leur solubilité (Ammor et Mayo, 2007 ; Gu et al., 2008).

### **II.3.3. Adhésion aux cellules épithéliales**

La capacité d'adhérer à la paroi intestinale est un critère de sélection important pour les probiotiques car elle favorise leur colonisation. L'adhésion constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion par des bactéries pathogènes. Elle est évaluée par une batterie de tests in vitro et in vivo utilisant des cellules animales et/ou humaines (Palomares et al., 2007 ; Reyes-Gavilan et al., 2011). En plus de l'adhésion aux cellules épithéliales, les probiotiques peuvent se fixer au mucus intestinal ou à d'autres microorganismes présents dans le tractus gastro-intestinal (Lamoureux, 2000).

### **II.3.4. Production de substances antimicrobiennes**

Les bactéries lactiques produisent des molécules à action bactéricide ou bactériostatique telles que des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, du diacétyle et des bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens sont utilisés pour améliorer la conservation des aliments (Titi et al., 1996 ; Labioui et al., 2005).

### **II.3.5. Résistance aux antibiotiques**

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à de nombreux antibiotiques en raison de leur structure et de leur physiologie. Des études ont montré que de nombreuses souches probiotiques présentent une résistance à un ou plusieurs antibiotiques (Temmerman et al., 2003). Par exemple, certaines souches de *Lactobacillus* sont résistantes à la kanamycine (81%), à la tétracycline (29,5%), à l'érythromycine (12%) et au chloramphénicol (8,5%). Bien que la résistance ne soit souvent pas transmissible, il est crucial de sélectionner des souches probiotiques dépourvues de potentiel de transfert de résistance (Denohue, 2004).

---

#### **II.4. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé**

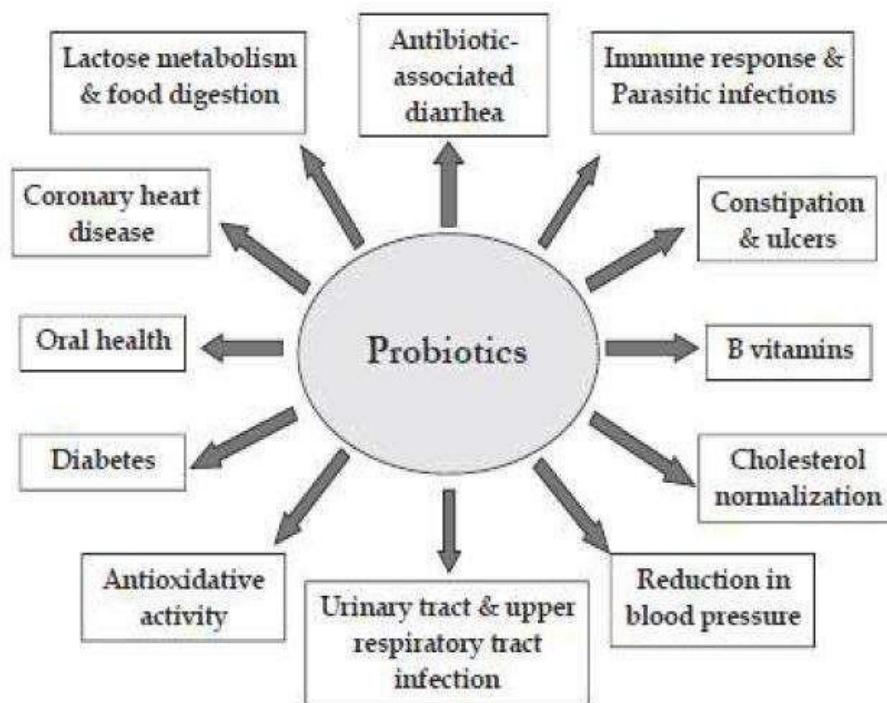
---

De nombreuses études ont démontré les multiples bienfaits des probiotiques, notamment dans la prévention et le traitement de diverses diarrhées, y compris la diarrhée du voyageur et la diarrhée associée aux antibiotiques (Beausoleil et al., 2007 ; McFarland, 2007). Les probiotiques sont également impliqués dans la réduction et le traitement des infections gastro-intestinales (Salminen et al., 2005), la modulation du système immunitaire et le renforcement de la muqueuse intestinale (Matsuzaki et Chin, 2000 ; Madsen, Cornish et al., 2001). Ils favorisent aussi la digestion des aliments et peuvent réduire les symptômes de l'intolérance au lactose (Nagpal et al., 2007). En outre, certains probiotiques pourraient jouer un rôle dans la prévention de maladies chroniques telles que la maladie de Crohn, l'obésité et le diabète (Schultz et al., 2004 ; Yadav et al., 2007), voire dans la prévention du cancer du côlon (Wollowski et al., 2001).

adhèrent aux villosités intestinales et inhibent la fixation d'Escherichia coli entéropathogènes. (Roselli, Finamore et al., 2006 ; Collado Meriluoto et al., 2007)

**Tableau 05** : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques. (Salminen et al., 2004 ; Patterson, 2008)

| Effets intestinaux                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Effets sur le système immunitaire                                                                                                                                                                        | Autres effets                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Contrôle des troubles suivants :</b><br>-Mauvaise digestion du lactose.<br>-Diarrhée due aux rota virus et Diarrhée-associée aux antibiotiques.<br>-Syndrome du côlon irritable<br>-Constipation.<br>-Infection par <i>Helicobacter pylori</i> .<br>-Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle.<br>-Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin<br>Prévention de l'entéocolite Nécrosante du nouveau-né. | -Modulation immunitaire - Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation.<br>-Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants ( <i>Salmonella, Shigella</i> ) | <b>Réduction du risque de :</b><br>-Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein)<br>-Coronaropathie.<br>-Maladie des voies Urinaires<br>-Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle. |



**Figure 06** : Les principaux bienfaits des probiotiques. (Nagpal et al., 2012)

## II.2-5. Rôle des probiotiques

- Les probiotiques contribuent à activer le système immunitaire et à réduire les allergies chez les personnes à risque.
- Sa résistance à l'acide gastrique et à la bile fournit un environnement approprié à sa survie dans le système digestif, où se trouve une partie du système immunitaire.
- Les probiotiques contribuent au développement du système immunitaire chez les nourrissons et l'améliorent chez les personnes âgées en augmentant le nombre de phagocytes et de cellules tueuses naturelles, qui constituent les premières lignes de défense contre les facteurs externes.
- Les probiotiques renforcent le système immunitaire en colonisant l'intestin, obtenant un « effet barrière » qui empêche l'occupation du revêtement qui tapisse les voies par des agents pathogènes et renforcent le système immunitaire au niveau des muqueuses en augmentant la production d'IgA et de mucus. (Makhloufi, 2012).

## II.2-6. Applications probiotiques

- Les différents produits disponibles comme probiotiques pour les humains et les animaux comprennent soit un seul organisme (produits monoswitch), soit une combinaison de plusieurs espèces (produits polyswitch). Actuellement, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes :
  - Concentré de culture ajouté aux aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales.
  - Ingrédient ajouté aux aliments contenant du lait ou du soja et capable de fermenter à un rythme élevé.
  - Cellules séchées, concentrées, en poudre et en gélules ou comprimés. Les probiotiques sont couramment introduits avec les produits laitiers, car la gamme de produits probiotiques comprend désormais du fromage, de la crème glacée et du yaourt glacé ainsi que des aliments et des boissons non laitiers (Patterson, 2008).

## II.2-7. Mécanismes d'action des probiotiques

- Les probiotiques bénéficient actuellement d'un relatif consensus au sein de la communauté scientifique grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Plusieurs mécanismes explicatifs ont été proposés quant à la manière dont certains probiotiques pourraient avoir des effets protecteurs ou thérapeutiques. Cependant, ces mécanismes ne sont pas encore pleinement révélés. Ces mécanismes majeurs incluent le renforcement de la barrière intestinale, l'inhibition de la fixation des agents pathogènes sur la muqueuse intestinale, la production de substances antimicrobiennes et la modulation du système immunitaire.

### II.2.7.1. Inhibition de l'adhésion des pathogènes : Phénomène de compétition/exclusion

Les probiotiques agissent directement en empêchant les microorganismes pathogènes d'envahir le tube digestif et en bloquant leur adhésion aux parois intestinales, créant ainsi une compétition pour les sites d'adhésion avec les germes infectieux. Certains probiotiques possèdent une capacité d'adhérence au tube digestif et peuvent s'y installer de manière durable, favorisant ainsi leur implantation au niveau des parois intestinales et empêchant la fixation des germes pathogènes. Des lactobacilles, par exemple, ont été observés adhérant aux villosités intestinales et inhibant la fixation d'*Escherichia coli* entéro-pathogènes (Roselli, Finamore et al., 2006 ; Collado Meriluoto et al., 2007).

### II.2.7.2.. Production de substances antimicrobiennes

Les probiotiques peuvent également freiner la croissance d'agents pathogènes en exerçant une action antimicrobienne indirecte. Ceci est réalisé grâce à la production de divers composés antimicrobiens.



---

a- Les bactériocines Ce sont des composés protéiques qui ralentissent efficacement l'invasion des souches bactériennes. (Klaenhammer, 1993) Ces substances nocives produites par les probiotiques ciblent les bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. Ils agissent principalement sur la membrane externe des bactéries cibles, formant des pores qui conduisent à la libération du contenu intracellulaire et à la mort des bactéries affectées. Contrairement aux souches de bifidobactéries, les lactobacilles et les lactocoques sont le plus souvent associés à la production de bactériocines. (Fooks et Gibson, 2002) La nisine, produite par la bactérie *Lactococcus lactis*, est la bactériocine la mieux documentée.

b- Acides organiques Les bactéries probiotiques ont la capacité de produire des acides organiques qui contribuent à l'inhibition de la croissance des micro-organismes entérovirulents. (Servin, 2004) Il s'agit notamment de l'acide lactique et de l'acide acétique, qui sont produits respectivement par les lactobacilles et les bifidobactéries par fermentation de l'hexose. Ces acides organiques, dérivés des glucides ingérés lors de la prise alimentaire, contribuent à abaisser le pH intestinal. Leur diffusion passive à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée permet, lors de la dissociation, l'acidification du cytoplasme, inhibant ainsi la propagation, la croissance et la survie des pathogènes sensibles aux acides.

c- Peroxyde d'hydrogène Certaines bactéries lactiques produisent du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en milieu humide, ce qui inhibe de nombreuses souches bactériennes pathogènes. (Ouwehet Vesterlund, 2004) La production de peroxyde d'hydrogène, accompagnée de la production d'acide lactique, inhibe le développement de certaines espèces pathogènes comme certains virus comme le virus de la fièvre aphteuse, certains champignons comme *Candida albicans*, ou certaines bactéries comme *Escherichia coli*, etc.

Stimulation de l'activité du système immunitaire intestinal L'interaction des probiotiques avec le système immunitaire améliore la réponse immunitaire de l'hôte contre les entéropathogènes. En effet, les probiotiques jouent un rôle dans la stimulation de l'immunité adaptative, comme la production d'anticorps IgA (Shu et Gill, 2002), ainsi que de l'immunité innée, comme la production de macrophages, de monocytes, etc. (Oelschlaeger, 2010). agissent comme adjuvants en modulant une réponse rapide de la muqueuse intestinale, renforçant ainsi le système immunitaire intestinal.

#### Allégations de santé associées à la consommation de probiotiques

Les probiotiques, présents depuis des siècles dans les produits laitiers fermentés traditionnels, suscitent à nouveau l'intérêt des industriels. Ces derniers mettent en avant les effets positifs de ces probiotiques sur le système digestif et l'équilibre de la flore intestinale. Par ailleurs, la demande croissante des consommateurs pour ces produits bénéfiques pour la santé stimule la croissance du marché des probiotiques. Cependant, l'adoption de nouvelles réglementations concernant les allégations de santé a freiné cette croissance. Récemment, Santé Canada a mis en

place de nouveaux règlements portant sur les déclarations génériques liées à la consommation de probiotiques (Santé Canada, 2009)

# Partie Expérimentale

## V. 1 Matériels et méthodes :

### V.1 .1.Echantillonnage :

Les échantillons ont été collectés de selles humains (4 échantillons) ont été prélevés chez des enfants âgés de 1 à 5 mois en utilisant des écouvillons stériles en mars 2024. Après la collecte, les échantillons ont été transportés à 4°C. Les analyses ont été réalisés dès l'arrivée au laboratoire. Le tableau 6 représente les caractéristiques de chaque échantillon.

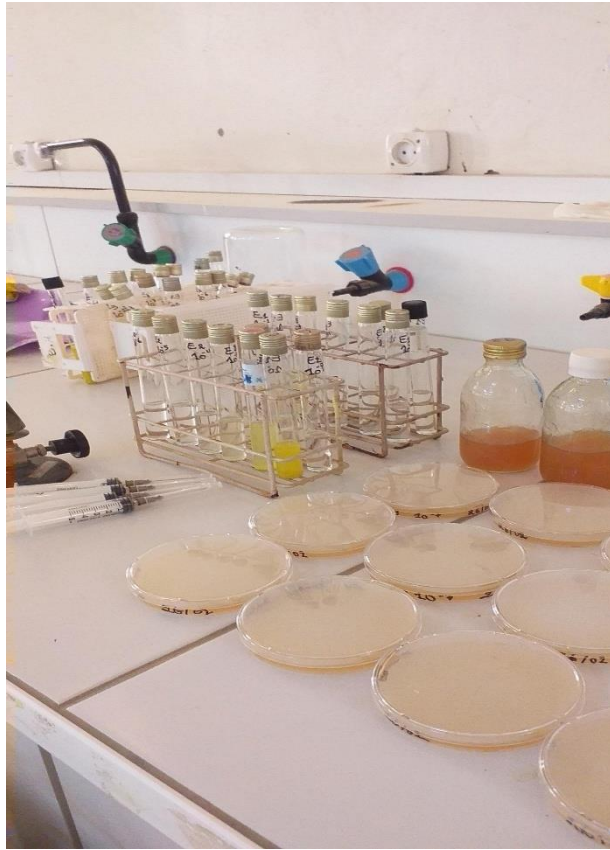
**Tableau 06:** Caractéristiques des échantillons collectés

| Échantillon | Nourrisson             | Âge (mois) | Sexe | Mode d'alimentation  | Consistance des selles | pH  | ATB | Lieu de collecte        |
|-------------|------------------------|------------|------|----------------------|------------------------|-----|-----|-------------------------|
| E1          | Abdelli Rahab Amine    | 4          | F    | Allaitement maternel | Molle                  | 5.8 | Non | Tossemouline, El Bayadh |
| E2          | Aliouane Israa         | 1          | F    | Allaitement maternel | Liquide                | 5.5 | Non | Tossemouline, El Bayadh |
| E3          | Merzouki Youssef Bahaa | 5          | G    | Allaitement maternel | Molle                  | 6.0 | Non | Tossemouline, El Bayadh |
| E4          | Lakhdari Sondos        | 4          | F    | Allaitement maternel | Molle                  | 5.7 | Non | Tossemouline, El Bayadh |

### V.1.2.Isolement et purification:

Pour l'isolement des bactéries lactiques, il convient de respecter les conditions suivantes : utiliser le milieu de culture adéquat, la température d'incubation idéale et les conditions de culture. Un gramme de chaque échantillon a été homogénéisé avec 9 ml d'eau physiologique et des dilutions décimales ont été réalisées (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup>). Les dilutions ainsi préparées, puis un ml des dilutions (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>) appropriée a étéensemencé en masse sur gélose de Man, Rogosa et Sharpe (MRS, Fluka).

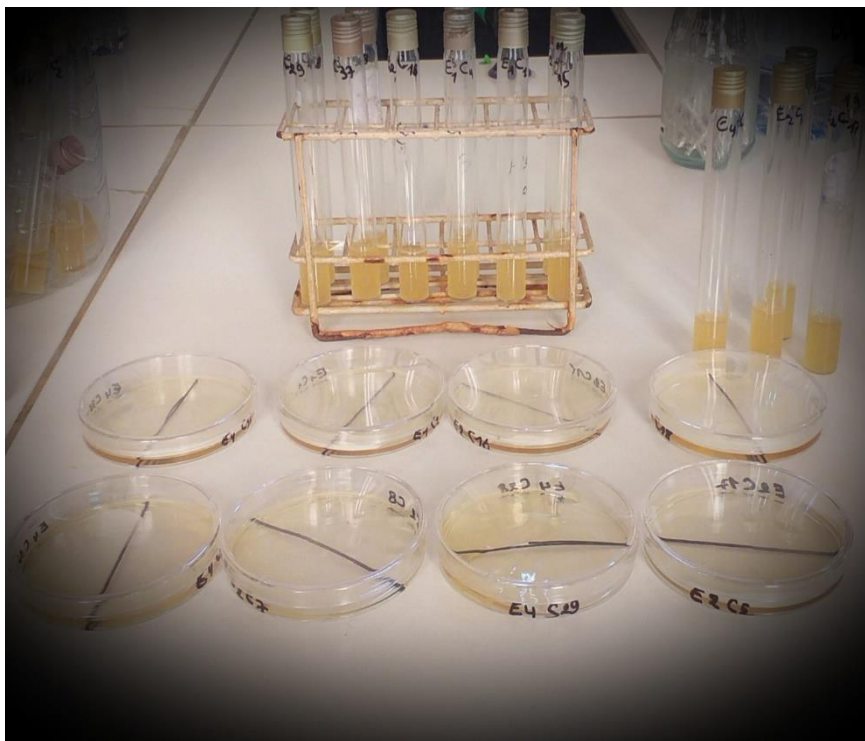
Les boîtes ont été incubées de 24h à 48 h à 30°C (Norme NF ISO 7218, 2007), des colonies distinctes ont été sélectionnées de manière aléatoire et purifiées par repiquages successifs sur le même milieu. Les isolats ont ensuite été observés macroscopiquement puis microscopiquement après coloration de Gram, et la catalase a également été recherchée pour l'ensemble des souches.



**Figure 7 : Photo prise lors d'isolement des bactéries**

#### V.1.4. Purification :

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur bouillon et gélose MRS (Hicham Lakehel, 1998). Quelques colonies bien isolées qui appartiennent aux dilutions préalablement réalisées ont été repiquées dans des tubes stériles contenant 5ml, les tubes ont été incubés pendant 24h à 30°C, l'apparition du trouble confirme une croissance bactérienne, la boîte pétrie contient le gélose MRS coulé et solidifié à partir des tubes ayant montré une croissance bactérienne à l'aide d'une anse en platine et selon la méthode d'épuisement de charge (méthode de quadrants), l'incubation a été faite pendant 48h à une température 30°C.



### **V.1.5. Pré-identification :**

#### **V.1.5.1. Etude macroscopique :**

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS Solide et liquide ; Pour caractériser la taille, la forme, l'aspect et la couleur des colonies sur milieu MRS solide et le trouble dans le milieu liquide.

#### **V.1.5.2. Étude microscopique:**

L'observation microscopique se fait aux différents grossissements en général (40X et 100 X) afin de déterminer l'aspect morphologique des colonies, le forme, la taille, le type de Gram et le mode d'association.

#### **-Coloration de GRAM :**

##### **➤ Réalisation d'un frottis :**

Déposer sur une lame propre une goutte d'eau distillée puis prélever à l'aide d'une lance de platine stérile une colonie de la culture. Incorporer progressivement de façon à obtenir une suspension homogène. Réaliser le frottis en partant du centre de la lame, en décrivant un mouvement circulaire de façon à obtenir un étalement mince et homogène. Sécher et fixer le frottis au dessus de la flamme du bec bunsen sans trop le chauffer.

- -Technique :
- ➤ recouvrir la lame de violet de gentiane phéniqué durant une minute.
- ➤ laver à l'eau distillée.
- ➤ recouvrir la lame d'une solution de Lugol durant une minute.
  - ➤ laver à l'eau distillée.
  - ➤ recouvrir la lame d'éthanol à 0,95 durant 10 secondes.
  - ➤ laver rapidement et recouvrir la lame de fuchsine phéniquée, pendant 1 minute.
- ➤ laver à l'eau distillée.

#### **V.1.5.3 Tests physiologiques**

##### **V.1.5.3 Recherche de catalase :**

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau métabolique (H<sub>2</sub>O) et oxygène (O<sub>2</sub>). Pour ce test une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10% est déposée sur une lame en verre propre et une quantité de colonie prélevée à l'aide d'une anse stérile y est ajoutée, le résultat est positif lorsqu'il y a apparition de bulles représentants le dégagement d'O<sub>2</sub>. Seules les colonies négatives au test de catalase ont été retenues pour la suite des analyses.

### **I.3.5. La conservation des souches**

#### **I.3.5.1. Conservation à court terme**

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation à 30°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à 4°C. Le renouvellement des cultures se fait tous les trois semaines (SAIDI *et al*, 2002).

#### **3.5.2. Conservation à longue durée**

A partir des jeunes cultures (18h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminée, on ajoute le milieu de conservation sur le culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé 0.2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorf à -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0.5% d'extrait de levure, deux fois avant utilisation (Saidi *et al*, 2002, Guessas et Kihal, 2004).

### **2.3.1 Croissance des lactobacilles à différentes températures**

Le but de ce test est d'évaluer la vitesse de croissance des bactéries à différentes températures et de les classer en souches selon la méthode de( Leveau et al.1991).

Différentes séries de tubes ont été ensemencées par les bactéries testées, chaque série est incubée à une température différente (30°C, 37°C et 45°C). La croissance est estimée par l'apparition de trouble après 24h à 48h d'incubation.

### **2.3.2Recherche du type fermentaire**

Ce test permet de mettre en évidence le type de métabolisme réalisé par le micro-organisme pour la transformation du substrat carboné présent dans le milieu. Les bactéries lactiques utilisent les sucres comme source d'énergie et le convertissent en acide lactique (lactate), les bactéries sont dites homofermentaires si elles produisent uniquement de l'acide lactique, si en revanche, elles synthétisent des métabolites supplémentaires dont le CO<sub>2</sub>, elles seront considérées comme hétérofermentaires.

La recherche de type fermentaire permet de classer les bactéries hétérofermentaire ou homofermentaire. Les cultures jeunes sont cultivées dans des tubes contenant des cloches Durhams et incubées à 37C Pendant 24h à 48h, les bactéries hétérofermentaire se manifeste par l'apparition de bulles dans la cloche qui signifie la production de gaz (CO<sub>2</sub>) (Garvie, 1986).

### **Croissance en milieu hyper salée :**

Les différentes concentrations de chlorure de sodium (Na Cl) ont été utilisées pour étudier la croissance des séquences. Disposées sur des bouillons hyper salés à 6,5 % de Na Cl, elles sont incubées à une température de 37C° pendant 24 h et 48h. Le trouble qui apparait dans le milieu représentant la croissance bactérienne, constitue un résultat positif à ce test.

### **2.3.3L'activité hémolytique**

L'étude de l'activité hémolytique a été étudiée selon la méthode de (Maragkoudakis et al.2006). Le caractère hémolytique a été recherché par l'ensemencement des lactobacilles en stries à la surface de la gélose Columbia au sang 5%. Après incubation pendant une période de 24h à 30°C, le type d'hémolyse a été examiné.

Les zones d'hémolyse se manifestent comme suit :  $\alpha$ -hémolyse (zone avec reflets verdâtres),



$\beta$ -hémolyse (zones claires autour des colonies) ou -hémolyse (le milieu n'est pas modifié).

### **2.3.4 Croissance des lactobacilles en milieu hostile**

Selon différentes études, la plupart des bactéries sont détruites par l'acide gastrique. Seules les souches les plus résistantes parviennent indemnes dans l'intestin, or les probiotiques sont bénéfiques pour notre santé uniquement si leur viabilité est assurée jusqu'au côlon.

Une sélection préliminaire des lactobacilles les plus résistants est réalisée en testant indépendamment l'effet de l'acidité et des sels biliaires sur leur croissance. La méthode utilisée dans cette étude pour évaluer la viabilité des cellules sous différents stress a été adaptée à partir de différents protocoles (Conway et al., 1987 ; Brashears et al., 2003 ; Tsai et al., 2007).

**3.4.1 Croissance des bactéries lactiques en milieu acide :** La méthode utilisée consiste à soumettre les lactobacilles à différents pHs pH2 à pH3. Les séries de bouillon MRS ont été ajustées aux différents pHs en utilisant une solution de HCl 1M. Chaque tube est ensemencé avec 1% d'une culture de lactobacilles ( $DO_{600nm} \approx 1$ ). La croissance est estimée par dénombrement direct sur gélose MRS après 24h d'incubation à 37°C.

### **2.3.4.2 Résistance aux sels biliaires**

La tolérance des lactobacilles est recherchée à des concentrations croissantes en sels biliaires (1.0%, 5.0%). De la bile de mouton a été stérilisée à l'aide d'un filtre millipore (Millipore, MILLEXGV, 0.22 $\mu$ m, SLGV0130S, Perkin Elmer, Boston, MA) puis additionnée stérilement au bouillon MRS. Chaque tube a été ensemencé avec 1% d'une pré-culture de lactobacilles ( $DO_{600nm} \approx 1$ ).

La croissance bactérienne est mesurée après 24h d'incubation à 37°C par dénombrement direct sur gélose MRS.

### **2.3.5 Résistance aux antibiotiques**

Selon l'EFSA (European Food Safety Authority) pour être probiotique une bactérie doit être sensible à un maximum d'antibiotiques afin d'éviter la propagation des gènes de résistance aux microorganismes de l'hôte.

La résistance des lactobacilles est testée sur un ensemble d'antibiotiques de différentes familles (voir tableau 46, annexe 09) par la technique de l'antibiogramme en bicouche en milieu solide. Une couche « Support » de gélose MRS est recouverte de 7ml de gélose molle MRS inoculée avec 1% d'une culture jeune de lactobacille standardisée ( $DO_{600nm}$  entre 0.8 et 1). Après solidification de la gélose, les disques d'antibiotiques sont déposés à sa surface. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24h.

Les bactéries sont dites résistantes si le diamètre des zones d'inhibition est inférieur à 15mm, si par contre il dépasse ce seuil elles sont considérées comme sensibles (Karam, 1994).

Les bactéries sont considérées résistantes si le diamètre des zones d'inhibition est inférieur à 15 mm ; en revanche, si ce diamètre dépasse cette limite, ils sont jugés sensibles (Karam, 1994). Pour cette analyse, huit souches ont été sélectionnées : E1C2, E1C3, E2C16, E2C17, E3C39, E3C41, E4C31, E4C33

**Tableau 7 : Liste des antibiotiques utilisés**

| <b>L'Antibiotique</b> | <b>Abréviation</b> |
|-----------------------|--------------------|
| Ofloxacin             | OF                 |
| Rifampicin            | RF                 |
| Tobramycin            | TB                 |
| Amikacin              | AM                 |
| Ciprofloxacin         | CP                 |
| Neomycin              | NE                 |
| Cefoperazone          | CZ                 |
| Erythromycin          | EM                 |
| Treméthoprim          | TS                 |
| Azithromycin          | AZ                 |
| Imipinem              | IP                 |
| Doxycycline           | DX                 |
| Streptomycin          | ST                 |

### **2.3.6 Etude de l'activité inhibitrice des bactéries vis-à-vis des pathogènes:**

La capacité des bactéries à résister aux agents pathogènes est l'un des principaux critères de sélection des bactéries probiotiques. Cette activité a été étudiée selon différentes méthodes.

But du test :

Le but de ce test est de déterminer l'effet des bactéries sur les bactéries pathogènes. Pour réaliser ce test, les étapes suivantes sont suivies :

**1. Cultures primaires :**

Des cultures primaires de toutes les souches (inhibitrices et indicatrices) sont préparées. Les bactéries sont cultivées dans un bouillon **MRS** pour les souches inhibitrices et dans un bouillon **MH** (Mueller-Hinton) pour les souches pathogènes.

**2. Germination des bactéries :**

Les bactéries standards (OD<sub>600nm</sub> entre 0,8 et 1) sont cultivées sur un milieu solide **MRS** à l'aide d'un écouvillon stérile.

**3. Séchage et incubation :**

Après deux heures de séchage à température ambiante, les plaques sont incubées pendant 24 heures à une température de 30°C.

**4. Découpe des cylindres de gélose :**

Après l'incubation, des cylindres sont découpés dans le milieu de gélose à l'aide d'un outil de coupe spécial.

**5. Germination des bactéries pathogènes :**

Les cylindres découpés sont placés sur un milieu **MH** , préalablement inoculés avec 1% (V/V) de culture fraîche standardisée (DO600nm entre 0,8 et 1) de bactéries pathogènes.

**6. Suivi de l'effet antagoniste :**

L'efficacité est démontrée par la formation de zones d'inhibition autour des cylindres contenant les bactéries. La taille de ces zones est vérifiée après incubation à 37°C pendant 24 heures.

Cette méthode permet d'évaluer l'efficacité des bactéries à inhiber la croissance des bactéries pathogènes, ce qui constitue l'un des critères de base.

**7. Test de l'hydrophobicité :**

Le test de l'hydrophobicité des cellules bactériennes est une méthode importante pour évaluer la capacité des bactéries à adhérer aux surfaces hydrophobes, ce qui peut être un indicateur de leur potentiel probiotique. Une méthode courante pour tester l'hydrophobicité est le test d'affinité pour les hydrocarbures, généralement l'octane ou le xylène.

**1. Préparation des bactéries :**

- Cultivez les souches bactériennes candidates dans le milieu de culture approprié, tel que le bouillon MRS, jusqu'à la phase exponentielle.

- Collectez les bactéries par centrifugation (10 minutes à 4000 rpm), puis lavez-les deux fois avec du PBS stérile pour éliminer le milieu de culture.

- Resuspendez les bactéries dans du PBS pour obtenir une densité cellulaire d'environ  $1 \times 10^8$  UFC/mL et ajustez la densité optique (OD) à 600 nm à environ 0,5.

**2. Préparation du test :**

- Prenez 3 mL de la suspension bactérienne et placez-les dans un tube à essai ou un tube Falcon.

- Ajoutez 0,6 mL d'hydrocarbure (comme le xylène) dans le même tube.

### 3. Mélange et séparation des phases :

- Vortexez vigoureusement le mélange pendant 2 minutes pour permettre aux bactéries de se mélanger avec l'hydrocarbure.
- Laissez le tube reposer à température ambiante pendant 15 à 30 minutes pour permettre la séparation des phases aqueuse (inférieure) et organique (supérieure).

### 4. Mesure de l'hydrophobicité :

- Après la séparation des phases, prélevez 1 mL de la phase aqueuse (inférieure) sans perturber la phase organique (supérieure).
- Mesurez l'OD de la phase aqueuse à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

### 5. Calcul de l'hydrophobicité :

- Calculez le pourcentage d'hydrophobicité en utilisant la formule suivante :

$$100 \times ( OD \text{ initiale} - OD \text{ finale} / OD \text{ initiale} ) = \text{Pourcentage d'hydrophobicité}$$

- Où OD initiale correspond à l'OD de la suspension bactérienne avant l'ajout de l'hydrocarbure, et OD finale est l'OD de la phase aqueuse après séparation.

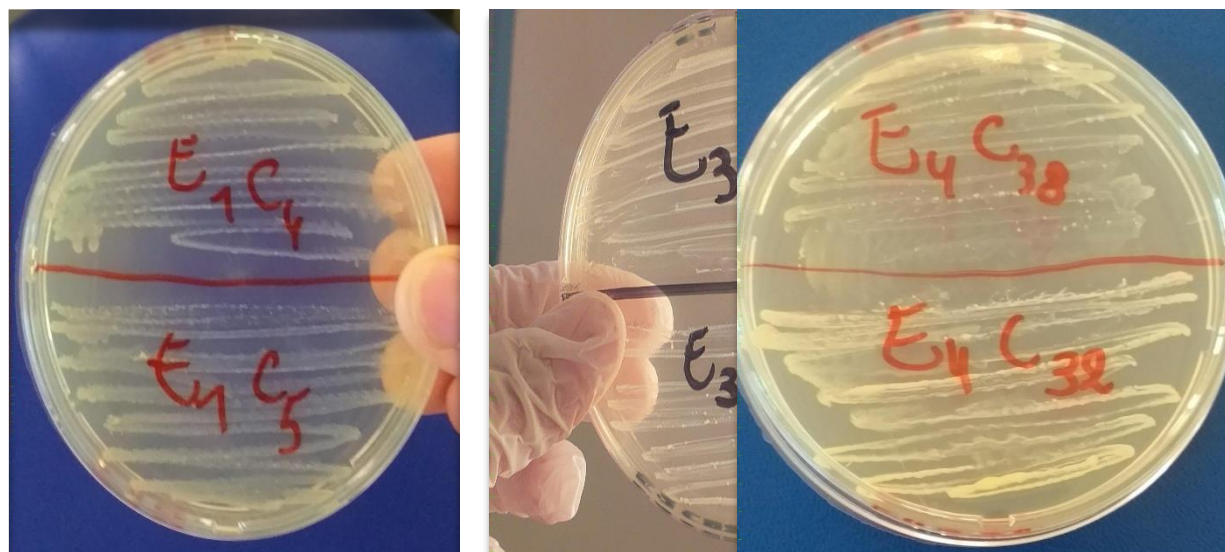
---

## Résultats & Discussions

---

### **Isolement et purification des souches :**

Après avoir incubé les boîtes inoculées, nous avons réussi à isoler quarante-trois souches provenant de quatre échantillons différents, E1, E2, E3 et E4, provenant des selles de nourrissons. Les colonies ont été purifiées et les premiers tests ont montré ce qui suit :



**Figure 10: Aspect des colonies bactériennes purifiées sur MRS solide**

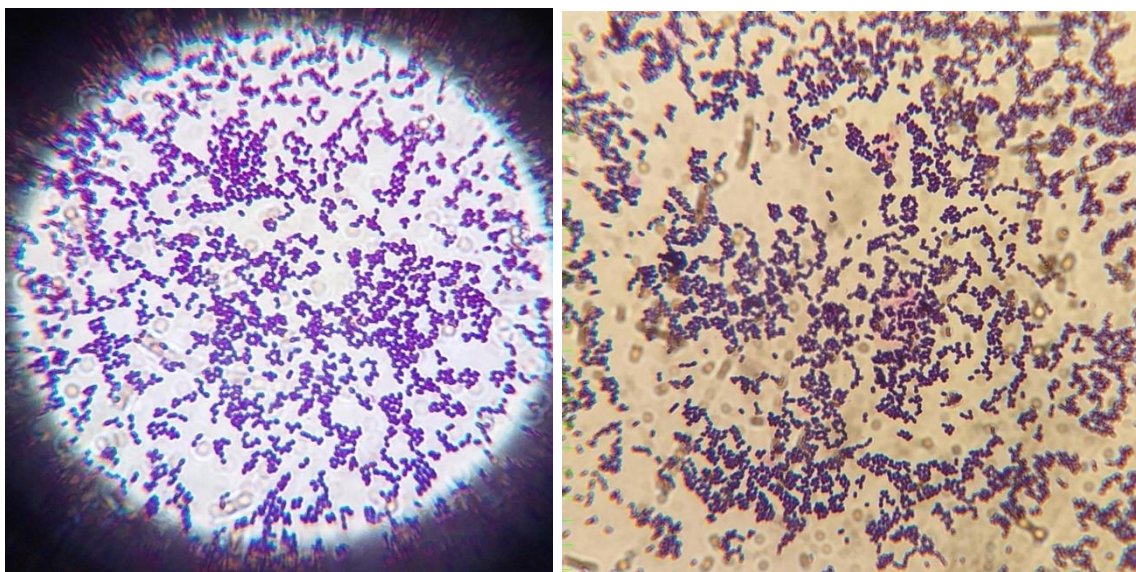
### **L'étude macroscopique:**

Les colonies des souches sélectionnées cultivées sur milieu MRS solide apparaissent sous forme lenticulaire et circulaires de couleur blanchâtre à blanc crème et beige et présentent un aspect lisse en surface et elles sont de petites tailles.

L'étude microscopique:

Les résultats des observations microscopiques aux grossissements (G : x 100) avec l'huile à immersion, après coloration de Gram ont montré que les colonies des souches cultivées présentent des cellules à Gram positif, en forme de cocci isolées, groupées en paires, en chaînes, en amas, et en diplo (Figure 11)



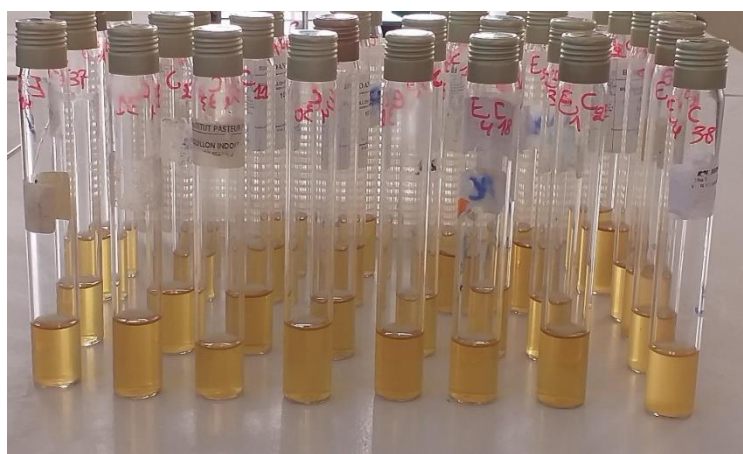


**Figure 11:** Observation microscopique X100 montrant le Gram des isolats

#### **Test catalase:**

Toutes les souches isolées n'ont pas montré de péttillement lorsqu'une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été ajoutée, à l'exception de quatre souches : E2C6, E2C9, E2C12, E2C20, qui ont montré du péttillement, et cela peut s'expliquer par le fait que ces bactéries ont une activité catalase.

Croissance à différentes températures : toutes les souches isolées poussent à 45°C



**Figure 12 :** Croissance des isolats à différentes température

### **Croissance en milieu hyper salé :**

Le milieu salé à concentration de 6.5 % est un milieu hostile pour la plupart des bactéries, celles qui le tolèrent peuvent y pousser. Après l'incubation, Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches isolées se développer à 6.5% de NaCl, sauf trois souches : E1C13, E2C10, E2C15 (Figure 11)



**Figure 13:** Croissance des isolats en milieu hyper salé



### **Type de fermentation :**

Dans le but de caractériser le profil fermentaire des souches isolées, celles-ci ont été cultivées dans un milieu MRS liquide muni de cloches de Durham, puis incubées à 37°C. L'absence de production gazeuse dans l'ensemble des tubes indique que ces micro-organismes métabolisent le glucose sans dégagement de CO<sub>2</sub>, traduisant ainsi un métabolisme de type homofermentaire (Bey, 2009).

### **.Test de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme)**

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des antibiotiques vis-à-vis des souches isolées a été effectuée par la méthode de diffusion sur gélose selon la technique de Kirby-Bauer. Après incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures, des zones d'inhibition circulaires, correspondant à l'absence de croissance bactérienne autour des disques antibiotiques, ont été observées et mesurées en millimètres.

L'interprétation des résultats s'est basée sur le diamètre des zones d'inhibition, permettant de classer les souches comme suit :

Sensibles (S) : diamètre  $\geq 21$  mm

Intermédiaires (I) : diamètre entre 16 et 20 mm

Résistantes (R) : diamètre  $\leq 15$  mm

Cette classification repose sur les critères décrits par Liasi et al. (2009), et est conforme aux recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023) et du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM-EUCAST, 2024).

**Tableau 08:** Résultats du test d'antibiogramme

| L'antibiotique | Les souches |      |       |       |       |       |       |       |
|----------------|-------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                | E1C2        | E1C3 | E2C16 | E2C17 | E3C39 | E3C41 | E4C31 | E4C33 |
| TS             |             | R    |       |       |       |       | S     |       |
| AZ             |             |      |       |       |       |       | S     | R     |
| AXC            |             | S    |       |       |       |       | S     | S     |
| IP             |             | S    | S     |       |       |       | S     | I     |
| DX             | R           | S    | I     |       | R     | R     | S     | I     |
| ST             |             |      | I     | R     |       |       | S     | R     |
| OF             | R           | R    | R     |       | R     | R     | I     | I     |
| RF             | I           | S    | R     | R     | I     | S     | S     | I     |
| TB             |             |      |       | S     |       |       | R     |       |
| CP             |             | I    |       |       | R     | R     | R     | I     |
| AM             |             | I    |       | R     |       |       | R     |       |
| NE             |             |      |       |       |       |       |       |       |

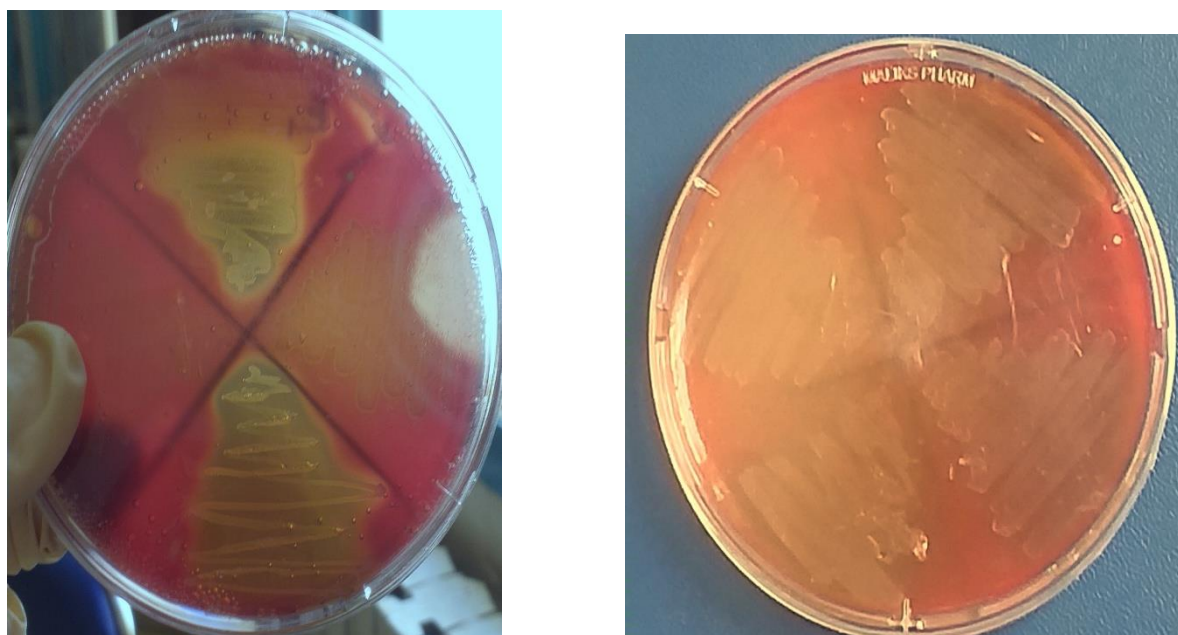


**Figure 14:** Test d'antibiogramme de quelques souches vis-à-vis 12 antibiotiques

### Test d'hémolyse:

Dans le test d'hémolyse, après une incubation de 24 heures à 37°C, il a été observé que sur la première boîte, toutes les souches étaient non hémolytiques (aucune dégradation du sang).

Sur la deuxième boîte, certaines souches ont présenté des zones claires autour des colonies, indiquant une hémolyse (dégradation partielle ou totale du sang), tandis que d'autres souches sont restées non hémolytiques.



**Figure 15:** Résultats du test d'hémolyse sur gélose au sang

### Activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne des isolats lactiques joue un rôle fondamental dans le choix des probiotiques, en particulier pour les nourrissons, en raison de leur capacité à inhiber la croissance des micro-organismes pathogènes. Cela non seulement permet de prolonger la durée de conservation des aliments, mais aussi de prévenir les infections gastro-intestinales chez les nourrissons, en favorisant un équilibre microbien sain dans le tractus intestinal. Cette activité est particulièrement importante pour maintenir un environnement intestinal optimal chez les jeunes enfants, qui sont plus vulnérables aux déséquilibres microbiens (Vinderola et al., 2019; Parvez et al., 2020).



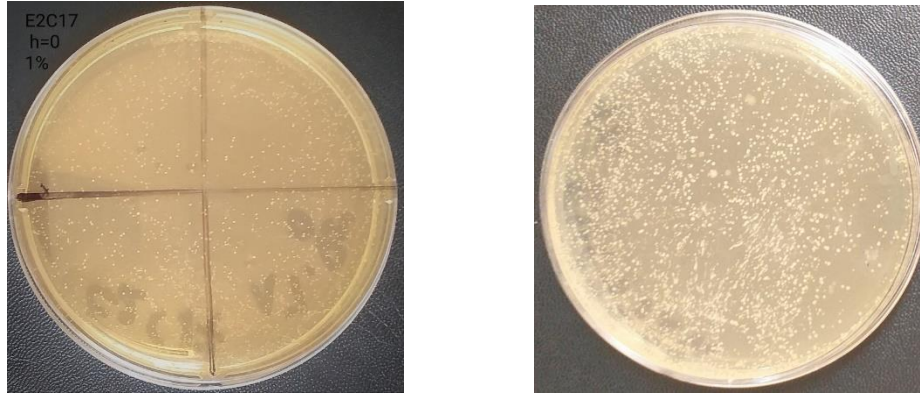
**Figure 16 :** Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats lactiques vis-à-vis les bactéries indicatrices

Les interactions bactériennes observées par la méthode des disques ont révélé que certaines souches lactiques possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis des souches pathogènes, mise en évidence par la formation de zones claires bien définies autour des disques. L'absence d'inhibition chez d'autres souches suggère une variabilité naturelle entre les souches testées. La diversité des diamètres mesurés reflète la différence de sensibilité des souches pathogènes ainsi que le potentiel antimicrobien propre à chaque souche lactique.

**Tableau 09:** Les valeurs des zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne en mm

| Les bactéries indicatrices              | Zone d'inhibition en mm |       |        |        |       |        |        |        |
|-----------------------------------------|-------------------------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
|                                         | E1 C2                   | E1 C3 | E2 C16 | E2 C17 | E3C39 | E3 C41 | E4 C31 | E4 C33 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922      | 9                       | 7     | 7      | 9      | 9     | 9      | 15     | 15     |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633      | 7                       | -     | -      | 11     | 7     | -      | 13     | 9      |
| <i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603 | -                       | -     | -      | 7      | -     | -      | 10     | 12     |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | -                       | -     | -      | -      | -     | -      | 13     | -      |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 | -                       | -     | -      | -      | -     | -      | 12     | 12     |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231      | 9                       | -     | -      | 7      | 8     | 8      | 8      | -      |

Évaluation de la viabilité des souches en milieu acide simulant des conditions gastriques  
Incubation à 37 °C durant 24 heures — Test de tolérance aux pH extrêmes



**Figure 17 :** Dénombrement des cellules viables après exposition à des environnements acides (pH 2 et pH 3) aux temps 0 h, 2 h et 4 h.

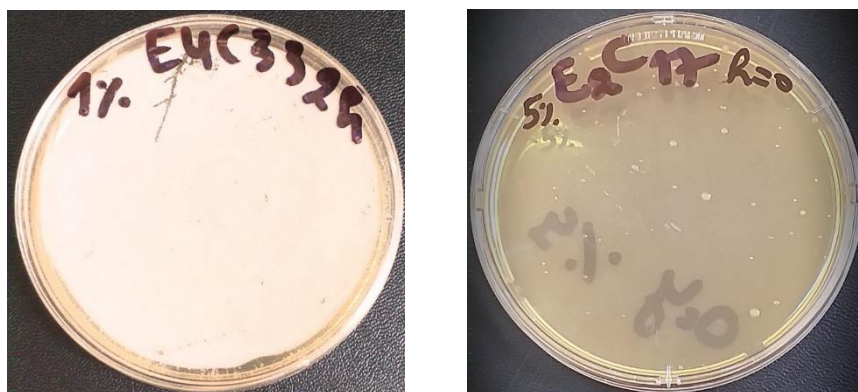
**Tableau 10 :** Résultats de dénombrement direct après incubation des isolats bactériens à différents pH

|            | $\times 10^5$ (UFC/ml) |     |       |     |        |     |  |  |
|------------|------------------------|-----|-------|-----|--------|-----|--|--|
|            | E2 C17                 |     | E4C31 |     | E4 C33 |     |  |  |
|            | pH2                    | pH3 | pH2   | pH3 | pH2    | pH3 |  |  |
| UFC à T=0h | 40                     |     | 20    |     | 4      |     |  |  |
| UFC à T=2h | 300                    | 170 | 90    | 150 | 70     | 110 |  |  |
| UFC à T=4h | 70                     | 140 | 230   | 30  | 70     | 30  |  |  |

### Tolérance aux sels billiaires

**Tableau 11 :** Résultats de dénombrement direct après incubation des isolats bactériens en présence de sels biliaries

|            | $\times 10^4$ (UFC/ml) |     |        |    |        |    |  |  |
|------------|------------------------|-----|--------|----|--------|----|--|--|
|            | E2C17                  |     | E4 C31 |    | E4 C33 |    |  |  |
|            | 1%                     | 5%  | 1%     | 5% | 1%     | 5% |  |  |
| UFC à T=0h | 1200                   | 110 | 2400   | 30 | 2400   | 30 |  |  |
| UFC à T=2h | 300                    | 14  | 2600   | 25 | 1600   | 60 |  |  |
| UFC à T=4h | 120                    | 60  | 350    | 10 | 361    | 15 |  |  |



**Figure 18 :** Dénombrement directe des souches viables après exposition à différentes concentrations de sels biliaries (1%, 5%)

## Hydrophobicité des souches

**Tableau 12 :** Résultats de test d'hydrophobicité des isolats lactiques

| <b>Les souche</b>      | <b>E2C17</b> | <b>E4C31</b> | <b>E4C33</b> |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Culture ajustée</b> | 0,274        | 0,189        | 0,275        |
| <b>Mélange</b>         | 0,481        | 0,971        | 0,598        |
| <b>Hydrophobicity%</b> | 43,04 %      | 80,54 %      | 54,01 %      |

L'hydrophobicité des souches a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\% \text{ Hydrophobicity} = \text{DO initial} - \text{DO final} / \text{DO initial} \times 100$$



## Discussion :

L'étude a permis l'isolement et la purification de 43 souches à partir de 4 échantillons fécaux de nourrissons allaités (1–5 mois). Toutes les souches sont présumées *Enterococcus* sur la base des caractères phénotypiques observés (coques Gram-positifs, dispositions en paires/chaînes, catalase négative, bile-esculine positive présumée), et présentent des traits fonctionnels intéressants : tolérance à l'acidité et aux sels biliaires (0,3–0,5 %), croissance à 45 °C et en 6,5 % NaCl, profils homofermentaires, valeurs élevées d'hydrophobicité pour certaines souches et activité antimicrobienne variable contre des pathogènes modèles. La majorité montre une sensibilité aux antibiotiques testés selon les normes CLSI, avec quelques exceptions.

### 1. Interprétation de la dominance présumée d'*Enterococcus*

- Signification écologique : la prédominance des *Enterococcus* peut refléter la composition naturelle du microbiote des nourrissons allaités dans la zone étudiée, la sélectivité des milieux utilisés (certains milieux favorisent la croissance d'entérocoques) et la saisonnalité. Chez le nourrisson, *Enterococcus* (p.ex. *E. faecalis*, *E. faecium*) est fréquemment rapporté comme commensal précoce.

- Implication pour l'étude : la dominance d'un seul genre simplifie l'analyse fonctionnelle (homogénéité) mais limite la diversité génétique explorée ; il faut vérifier qu'il ne s'agit pas d'un biais méthodologique (milieu, conditions d'incubation, dilution, conservation des échantillons).

### 2. Signification des caractères physiologiques observés

- Croissance à 45 °C et tolérance à 6,5 % NaCl indiquent une robustesse adaptée à des conditions stressantes (utile pour la formulation et le stockage).

- Catalase négative et homofermentation : conformes au comportement des bactéries lactiques/entérocoques commensales, favorables à un rôle acidifiant (production d'acide lactique) et à l'utilisation alimentaire.

Ces traits soutiennent le potentiel d'utilisation technologique mais ne remplacent pas les tests de sécurité.

### 3. Résistance acide et aux sels biliaires — interprétation et métriques

- Interprétation : la survie à pH acide et en présence de 0,3–0,5 % de sels biliaires est un indicateur de capacité à traverser le tractus digestif.

- Comment rapporter les données : exprimer la tolérance comme % de survie ou réduction en log<sub>10</sub> CFU après exposition (ex. exposition 90–180 min à pH 2, 3 et 120–180 min à 0,3 % bile).

- Critères usuels : souvent une réduction <1 log<sub>10</sub> ou une survie >50 % est considérée comme acceptable pour une souche candidate probiote, mais utilisez des seuils justifiés par la littérature.

#### **4. Hydrophobicité et adhésion**

- Hydrophobicité (test xylène/hexadecane) : valeurs élevées suggèrent une probabilité d'adhésion plus forte, mais ce test reste indirect.
- Validation nécessaire : confirmer par essais d'adhésion sur cellules épithéliales (Caco-2 ou HT-29) et/ou modèles de mucus. Mesurer pourcentage d'adhésion (CFU attachés/CFU initiaux) ; un taux d'adhésion  $\geq 10$  % est souvent considéré comme prometteur selon les études, mais c'est contextuel.

#### **5. Activité antimicrobienne**

- Observations : inhibition variable des pathogènes modèles.
- Interprétation : l'effet peut provenir de l'acidification, des bactériocines ou d'autres métabolites.
- Expériences complémentaires :
  - Neutraliser le pH des extraits (ou supernatants) puis tester l'activité pour séparer l'effet acide de facteurs protéiques ;
  - Traiter par protéases (pronase, proteinase K) pour vérifier la nature protéique (bactériocine)

#### **6. Profil de sensibilité aux antibiotiques**

- Interprétation : sensibilité générale rassurante ; toutefois, la présence éventuelle de résistances, même minimales, chez Enterococcus soulève des questions (gènes transmissibles).
- Analyses à mener :
  - Tests MIC (microdilution) pour quantifier la résistance ;
  - Recherche moléculaire des gènes de résistance (vanA/vanB, erm, tet, aac(6')-Ie-aph(2'')) etc.)
  - Tests de transfert de plasmides (conjugaison) in vitro pour évaluer le risque de dissémination.

#### **7. Évaluation de la sécurité**

Pour considérer une souche comme sûre pour un usage infantile, effectuer au minimum :

- Hémolyse sur gélose sang ( $\alpha/\beta/\gamma$ ) : sélectionner souches non-hémolytiques ( $\gamma$ ).
  - Gelatinase (gelE) et autres enzymes de virulence : tests phénotypiques + PCR ciblée.
  - Cytotoxicité (MTT ou LDH) sur lignées intestinales (Caco-2) : absence d'effet cytotoxique significatif.
  - Études in vivo préliminaires : biodistribution, absence de bactériémie/translocation systémique.
- Écarter toute souche présentant des marqueurs de virulence ou potentiellement dangereuse.

## Conclusion :

L'objectif principal de ce travail était de mettre en évidence l'activité probiotique des bactéries isolées de la flore intestinale de nourrissons allaités naturellement, âgés de un à cinq mois. À partir de quatre échantillons de selles, quarante-trois souches bactériennes ont été isolées et purifiées. Leur caractérisation phénotypique, physiologique et fonctionnelle a permis d'évaluer leur potentiel probiotique.

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches isolées sont présumées appartenir au genre *Enterococcus*, un groupe bactérien fréquemment retrouvé dans le microbiote infantile. Ces souches ont révélé des caractéristiques favorables : tolérance à l'acidité gastrique et aux sels biliaires (0,3–0,5 %), croissance dans des conditions stressantes (jusqu'à 45 °C et 6,5 % NaCl), absence d'activité catalasique et profil homofermentaire typique des bactéries lactiques. Certaines souches se distinguent par une forte hydrophobicité, suggérant une bonne aptitude d'adhésion à l'épithélium intestinal, ainsi qu'une activité antimicrobienne significative contre des pathogènes modèles. Leur profil de sensibilité aux antibiotiques a montré une conformité globale aux normes de sécurité, renforçant leur intérêt potentiel en tant que candidats probiotiques.

Le caractère dominant des *Enterococcus* dans cet échantillonnage soulève deux points essentiels :

1. D'une part, il met en évidence leur rôle important dans la colonisation précoce du microbiote intestinal infantile et leur potentiel biotechnologique dans les formulations probiotiques.
2. D'autre part, il rappelle la nécessité d'une évaluation rigoureuse de leur innocuité, car certaines souches d'*Enterococcus* peuvent être opportunistes ou acquérir des résistances génétiques préoccupantes.

Ces résultats confirment le rôle clé du microbiote infantile dans le maintien de l'équilibre intestinal et ouvrent la voie au développement de souches probiotiques adaptées à la santé des nourrissons, tout en imposant une approche prudente et intégrée pour leur valorisation. Toutefois, deux limites majeures doivent être soulignées : (i) l'ensemble des expérimentations a été mené in vitro, sans validation in vivo, et (ii) l'échantillonnage est restreint, ce qui limite la représentativité des résultats.

## Perspectives

### 1. Identification approfondie

- Séquençage génomique complet pour déterminer précisément les espèces d'*Enterococcus* isolées et caractériser leurs gènes fonctionnels (adhésion, production de bactériocines, résistance).
- Utilisation de la métagénomique et de la phylogénie comparative pour situer ces souches par rapport aux *Enterococcus* commensaux et pathogènes connus.

## **2. Évaluation in vivo et sécurité**

- Tests sur modèles animaux et cliniques pour évaluer la capacité de colonisation, l'innocuité et l'effet sur l'immunité infantile.
- Études de la résistance aux antibiotiques et recherche de gènes de virulence pour exclure toute souche présentant un risque sanitaire.

## **3. Potentiel technologique et applications**

- Étude de la viabilité des souches *d'Enterococcus* dans des matrices alimentaires infantiles (formules lactées, laits fermentés) et pharmaceutiques.
- Développement de formulations microencapsulées pour assurer leur stabilité et leur efficacité au cours du stockage et du transit intestinal.

## **4. Applications nutritionnelles et thérapeutiques**

- Exploration de l'utilisation des *Enterococcus* isolés dans la prévention ou l'atténuation de colopathies infantiles.
- Évaluation de synergies potentielles avec des prébiotiques adaptés (ex. galacto-oligosaccharides) afin de renforcer leur effet bénéfique.

# Références

1. FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food.
2. Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378.
3. Guarner, F., & Schaafsma, G. J. (1998). Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39(3), 237–238.
4. Salminen, S., et al. (1998). Demonstration of safety of probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 661S–664S.
5. Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 279–289.
6. Holzapfel, W. H., et al. (1998). Overview of functional foods: Microbial and food aspects. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 85–101.
7. Dunne, C., et al. (2001). Probiotics: from myth to reality. *Gut*, 50(3), 54–58.
8. Marteau, P., & Shanahan, F. (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 17(9), 1263–1272.
9. Gilliland, S. E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 175–188.
10. Lee, Y. K., & Salminen, S. (1995). The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7), 241–245.
11. Vinderola, G., & Reinheimer, J. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 13(6), 497–503.
12. Charteris, W. P., et al. (1998). Development and application of an in vitro methodology. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 759–768.
13. Liong, M. T., & Shah, N. P. (2005). Acid and bile tolerance. *International Dairy Journal*, 15(1), 95–105.
14. Gilliland, S. E., & Speck, M. L. (1977). Deconjugation of bile acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(1), 15–18.
15. Collado, M. C., et al. (2007). Adhesion of selected probiotic strains. *Food Research International*, 40(5), 557–566.
16. Pan, D., & Mei, X. (2010). Antimicrobial mechanism of *Lactobacillus*. *Journal of Food Safety*, 30(4), 805–816.
17. Gopal, P. K., et al. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3), 207–216.
18. Jacobsen, C. N., et al. (1999). Screening of probiotic activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4949–4956.
19. Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 39–85.
20. Zago, M., et al. (2011). Evaluation of probiotic characteristics. *Annals of Microbiology*, 61(4), 681–689.

21. Sornplang, P., & Piyadeatsoontorn, S. (2016). Probiotic isolates. *Journal of Veterinary Medicine*, 2016, Article ID 9437186.
22. Schillinger, U., & Lucke, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1901–1906.
23. Bernbom, N., et al. (2012). *Lactobacillus acidophilus* effects. *International Dairy Journal*, 26(2), 93–99.
24. Kim, H. J., et al. (2014). Probiotic characteristics of *Lactobacillus*. *Food Science and Biotechnology*, 23(6), 1777–1781.
25. Saarela, M., et al. (2000). Probiotic potential of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 10(1-2), 103–110.
26. Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 103–125.
27. Salminen, S., Wright, A. V., & Ouwehand, A. (2004). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. CRC Press.
28. FAO/WHO. (2006). *Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*.
29. Ouwehand, A. C., & Vesterlund, S. (2004). Health aspects of probiotics. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3rd Ed.
30. Collado, M. C., & Sanz, Y. (2007). Characterization of probiotic strains. *International Dairy Journal*, 17(6), 636–645.
31. Borriello, S. P., et al. (2003). Safety of probiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5), 711–718.

# Annexes

## Annexe 1 : Les milieux de culture utilisés

- MRS Agar (Conda / Pronadisa - Espagne) : Utilisé pour l'isolement et la culture des bactéries lactiques.
- MRS Broth (Conda / Pronadisa - Espagne) : Utilisé pour le repiquage et l'enrichissement des souches lactiques.
- Nutrient Broth (Biokar Diagnostics - France) : Utilisé pour la croissance des souches pathogènes.
- Mueller-Hinton Agar (HIMEDIA) : Utilisé pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

## Annexe 2 : Les produits chimiques et colorants

Colorants utilisés pour la coloration de Gram :

- Violet de gentiane : Coloration principale.
- Lugol : Mordantage.
- Alcool : Décoloration.
- Éthanol : Fixation et décoloration.
- Fuchsine : Contre-coloration.

Autres réactifs utilisés :

- Eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) : Pour le test de catalase.
- Solution saline ( $NaCl$  0.9%) : Pour les dilutions et les frottis.
- Eau distillée : Pour la préparation des milieux et le rinçage.
- Huile à immersion : Pour l'observation microscopique.
- Acide chlorhydrique ( $HCl$ ) : Pour ajustement de pH.
- Hydroxyde de sodium ( $NaOH$ ) : Pour ajustement de pH.

## Annexe 3 : L'appareillage et le petit matériel utilisé

Appareillage :

- Bec bunsen, Vortex, Balance, Plaque chauffante avec agitateur magnétique, Cocotte autoclave,
- Réfrigérateur, Centrifugeuse, Agitateur électrique, Microscope optique, pH-mètre,
- Micropipettes, Incubateur, Bain-marie, Spectrophotomètre.

Petit matériel :

- Boîtes de Pétri, Pipettes Pasteur, Tubes à essai et supports, Bêchers, Lames microscopiques,
- Anse de platine, Verres de montre, Tubes Eppendorf, Pipettes graduées, Seringues,
- Flacons, Emporte-pièce, Entonneurs (100, 200, 1000  $\mu l$ ), Filtres, Écouvillons.

## Annexe

### 4 : Compositions des milieux de culture

#### Bouillon MRS (1 L)

| Composant                         | Quantité              |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Peptone                           | 10,0 g                |
| Extrait de viande                 | 8,0 g                 |
| Extrait de levure                 | 4,0 g                 |
| Glucose                           | 20,0 g                |
| Acétate de sodium trihydraté      | 5,0 g                 |
| Citrate d'ammonium                | 2,0 g                 |
| Tween 80                          | 1,0 ml                |
| Phosphate dipotassique            | 2,0 g                 |
| Sulfate de magnésium heptahydraté | 0,2 g                 |
| Sulfate de manganèse tétrahydraté | 0,05 g                |
| Agar                              | 22,0 g                |
| Eau distillée                     | 1000 ml               |
| pH                                | 6,2                   |
| Stérilisation                     | 120 °C pendant 20 min |

#### Gélose nutritive (1 L)

| Composant          | Quantité              |
|--------------------|-----------------------|
| Extrait de viande  | 1,0 g                 |
| Extrait de levure  | 2,5 g                 |
| Peptone            | 5,0 g                 |
| Chlorure de sodium | 5,0 g                 |
| Agar               | 22,0 g                |
| Eau distillée      | 1000 ml               |
| Stérilisation      | 120 °C pendant 20 min |

#### Gélose Columbia (1 L)

| Composant          | Quantité              |
|--------------------|-----------------------|
| Peptone            | 23,0 g                |
| Chlorure de sodium | 5,0 g                 |
| Amidon             | 1,0 g                 |
| Agar               | 22,0 g                |
| Eau distillée      | 1000 ml               |
| Stérilisation      | 120 °C pendant 20 min |

#### Milieu LB (1 L)

| Composant          | Quantité |
|--------------------|----------|
| Peptone            | 10,0 g   |
| Extrait de levure  | 5,0 g    |
| Chlorure de sodium | 5,0 g    |
| Agar               | 22,0 g   |
| Eau distillée      | 1000 ml  |



|               |                       |
|---------------|-----------------------|
| Stérilisation | 120 °C pendant 20 min |
|---------------|-----------------------|

#### Milieu lait écrémé (100 ml)

| Composant     | Quantité              |
|---------------|-----------------------|
| Lait écrémé   | 10 g                  |
| Eau distillée | 100 ml                |
| Stérilisation | 120 °C pendant 20 min |

#### Milieu hyper salé (100 ml)

| Composant          | Quantité              |
|--------------------|-----------------------|
| MRS liquide        | 100 ml                |
| Chlorure de sodium | 6,5 g                 |
| Stérilisation      | 120 °C pendant 20 min |

#### Eau physiologique (1 L)

| Composant          | Quantité              |
|--------------------|-----------------------|
| Chlorure de sodium | 9 g                   |
| Eau distillée      | 1000 ml               |
| Stérilisation      | 120 °C pendant 20 min |

#### Solution HCl 0,1N (100 ml)

| Composant     | Quantité           |
|---------------|--------------------|
| HCl (25%)     | 13 ml              |
| Eau distillée | 100 ml (compléter) |

**Tableau 13:** Caractérisation physiologique des isolats lactiques

| Les souches testées | Température 45C° |  | Concentration de Na Cl 6,5 (%) |     | Type fermentaire |
|---------------------|------------------|--|--------------------------------|-----|------------------|
|                     | 24 h             |  | 24h                            | 48h |                  |
| E1C1                | +                |  | +                              |     | Homofermentaire  |
| E1C2                | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E1C3                | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E1C4                | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E1C5                | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E1C22               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E1C23               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E1C24               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E1C25               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E2C10               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E2C13               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E2C14               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E2C15               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E2C16               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E2C17               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E2C18               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E2C21               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E3C39               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E3C40               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E3C41               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E3C42               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C26               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C27               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C28               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C29               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C30               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C31               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C32               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C33               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C34               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C35               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C36               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C37               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |
| E4C38               | +                |  | +                              |     | homofermentaire  |

**Tableau14** : Caractères morphologiques et biochimiques des souches lactiques sélectionnées.

| Souche test | Caractères microscopique             |      |       | Mobilité | Test catalase |
|-------------|--------------------------------------|------|-------|----------|---------------|
|             | Regroupement                         | Gram | Forme |          |               |
| E1C1        | En diplo En amas                     | +    | Cocci | —        | —             |
| E1C2        | En diplo En chaînettes               | +    | Cocci | —        | —             |
| E1C3        | En diplo En chaînettes En amas       | +    | Cocci | —        | —             |
| E1C4        | En diplo En chaînette                | +    | Cocci | —        | —             |
| E1C5        | En diplo En chaînette                | +    | Cocci | —        | —             |
| E1C22       | En diplo                             | +    | Cocci | —        | —             |
| E1C23       | Isole                                | +    | Cocci | —        | —             |
| E1C24       | En diplo En chaînette                | +    | Cocci | —        | —             |
| E1C25       | En diplo En chaînette                | +    | Cocci | —        | —             |
| E2C6        |                                      |      |       |          | +             |
| E2C7        |                                      |      |       |          | +             |
| E2C8        |                                      |      |       |          | +             |
| E2C9        |                                      |      |       |          | +             |
| E2C10       | En diplo                             | +    | Cocci | —        | —             |
| E2C11       |                                      |      |       |          | +             |
| E2C12       |                                      |      |       |          | +             |
| E2C13       | En diplo                             | +    | Cocci | —        | —             |
| E2C14       | En diplo                             | +    | Cocci | —        | —             |
| E2C15       | En diplo En chaînette En amas        | +    | Cocci | —        | —             |
| E2C16       | En diplo En chaînette                | +    | Cocci | —        | —             |
| E2C17       | En diplo En chaînette                | +    | Cocci | —        | —             |
| E2C18       | Isole En chaînettes En amas          | +    | Cocci | —        | —             |
| E2C21       | En diplo                             | +    | Cocci | —        | —             |
| E3C39       | Isole En chaînette En amas           | +    | Cocci | —        | —             |
| E3C40       | Isole En chaînette, grappe de raisin | +    | Cocci | —        | —             |
| E3C41       | En diplo En chaînettes En amas       | +    | Cocci | —        | —             |
| E3C42       | En diplo                             | +    | Cocci | —        | —             |
| E4C26       | En diplo                             | +    | Cocci | —        | —             |
| E4C27       | En diplo                             | +    | Cocci | —        | —             |
| E4C28       | En diplo En chaînette                | +    | Cocci | —        | —             |
| E4C29       | En diplo                             | +    | Cocci | —        | —             |
| E4C30       | En diplo                             | +    | Cocci | —        | —             |
| E4C31       | Isole                                | +    | Cocci | —        | —             |

|       |                        |   |       |   |   |
|-------|------------------------|---|-------|---|---|
| E4C32 | En diplo En chaînettes | + | Cocci | – | – |
| E4C33 | En diplo               | + | Cocci | – | – |
| E4C34 | En diplo               | + | Cocci | – | – |
| E4C35 | En diplo               | + | Cocci | – | – |
| E4C36 | En diplo En chaînette  | + | Cocci | – | – |
| E4C37 | En diplo En chaînettes | + | Cocci | – | – |
| E4C38 | En diplo En chaînette  | + | Cocci | – | – |