

TABLE DES MATIERES

Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Listes des figures	
Listes des tableaux	
Introduction	2
Chapitre I : Etude bibliographique	
1.Écosystème gastro-intestinal : composition et évolution	
1.1 Description générale	5
1.2 La microflore intestinale	5
1.3 Effets bénéfique	9
1.3.1 Participation à la nutrition	9
1.3.2 Protection contre les pathogènes	9
1.3.3 Fonction immunologique	11
1.4 Facteurs agissant sur la colonisation bactérienne	12
1.4.1 Influence du terrain génétique	12
1.4.2 Influence du terme de naissance	12
1.4.3 Influence du mode d'accouchement	12
1.4.4 Influence de l'alimentation	13
1.4.5 Influence des traitements médicamenteux	13
1.4.6 Influence des conditions d'hygiène	13
2.Les probiotiques	14
2.1Définitions	14
2.2Les propriétés fonctionnelles des Probiotiques	14
2.2.1 Survie des probiotiques dans le tube digestif chez l'Homme.....	14
2.2.2 Mécanismes d'action et d'adaptation des probiotiques	15
2.3Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé.....	17
a) Les probiotiques et les infections gastro-intestinales	17

b) Les probiotiques et l'intolérance au lactose	18
c) les probiotiques et le cholestérol.....	18
d) Les probiotiques et la prévention du cancer du colon	18
e) Les probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin	19
f) Les probiotiques et la perméabilité intestinale	19
g) Les probiotiques et la motilité de l'intestin.....	19
2.1 Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique.....	21
3. Les Bifidobacteries.....	25
3.1 Définition	25
3.2 Ecologie des bifidobactéries	25
3.3 Taxonomie et les différents espèces:	26
3.4 Caractéristiques morphologiques , physiologiques et biochimiques des bifidobactéries:	29
3.4.1 Morphologie:	29
3.4.2 Physiologies des bifidobacteries :.....	29
3.4.2.1 Température:	29
3.4.2.2 L'Oxygène:.....	30
3.4.2.3 Le pH :.....	30
3.4.2.4 La sensibilité aux antibiotiques	30
3.4.2.5 Les besoins nutritionnels des bifidobacteries	31
3.4.3 Biochimie des bifidobacteries.....	31
3.4.3.1 Le Métabolisme	31
3.4.3.2 Métabolisme des vitamines	34
3.4.3.3 Production des substances antimicrobiennes.....	34
3.4.3.4 Les bifidobactéries en tant qu'agents aromatisants.....	35
3.5 Les caractéristiques des principales espèces utilisées dans les aliments	35
3.5.1 <i>Bifidobacterium longum</i>	35
3.5.2 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	36
3.5.3 <i>Bifidobacterium breve</i>	36
3.5.4 <i>Bifidobacterium infantis</i>	36
3.5.5 <i>Bifidobacterium lactis</i>	36
3.5.6 <i>B. Adolescentis</i>	38
3.5.7 <i>B. Pseudo Longum</i>	38
3.5.8 <i>B. Thermophilum</i>	38

3.5.9 <i>B.Suis</i>	38
3.6 L'utilisation des bifidobactéries dans les produits laitiers.....	39
3.7. Propriétés génotypiques	41
3.7.1 La composition en bases cytosine-guanine del'ADN	41
3.7.2 Les plasmides.....	41
3.7.3 Les séquences d'ADN étudiées	42
Le gène codant pour la protéine Hsp60.....	43
L'espace intergénique 16S-23.....	43
Chapitre II : Matériel et méthodes	
1 Provenance des échantillons	46
2 Milieux de Cultures	46
3 Isolement et purification des bifidobactéries	46
3.1 Purification des souches	48
3.2 Pré-identification des bifidobactéries	48
3.2.1 Étude macroscopique	48
3.2.2 Étude microscopique.....	49
3.3 Identification du genre.....	49
3.3.1 Recherche de la catalase	49
3.3.2 Recherche de l'oxydase	49
3.3.3 Recherche de type fermentaire.....	49
3.3.4 Mise en évidence de la production d'indole	49
3.3.5 Mise en évidence de l'uréase	50
3.3.6 Protéolyse de la gélatine.	50
3.3.7 Test de croissance sur bile (2 %)	50
3.3.8 Test de croissance en milieu hyper-salé.....	50
3.4 Caractérisation des espèces	50
3.5 Dosage de l'acide lactique et l'acide acétique par HPLC.....	52
3.6 Identification génotypiques des souches	52
3.6.1 Extraction de l'ADN.....	53
3.6.2 Amplification et séquençage du gène 16S rDNA	53
3.6.3 Séquençage	55
4 Résistance aux conditions gastro-intestinales stimulées	55
4.1 Tolérance aux conditions acides de l'estomac.....	55
4.2 Résistance aux sels biliaires	56

4.3	Résistance aux sucs gastriques	57
4.4	Résistance aux enzymes pancréatiques	57
5	Cinétique de croissance à différentes concentration de salinité en culture pure	57
6	L'antibiogramme	58
7	La mise en évidence des interactions	58
7.1	Recherche des interactions entre les différentes espèces de Bifidobacterium et des espèces pathogènes.....	58
8	Conservation des souches bactériennes.....	58
8.1	Conservation courte durée.....	58
8.2	Conservation longue durée	59
ChapitreIII :Résultats et discussion		
Résultats		
1.	Isolement et purification	63
2.	Pré-identification des souches	63
2.1	Aspect macroscopiques	63
2.2	Aspect microscopiques.....	63
2.3	Caractérisation du genre	65
2.4	Caractérisation des espèces	67
2.5	Dosage de l'acide lactique et l'acide acétique par HPLC	67
3	. L'identification génétique des souches	69
3.1	Extraction de l'ADN	69
3.2	Amplification d'ADN.....	69
3.3	Séquençage	69
3.3.1	Séquences de quelque souche étudiée	70
4	.Résistance aux conditions gastro-intestinales stimulées	75
4.1	Tolérance aux conditions acides de l'estomac:	75
4.2	Résistance aux sels biliaires	77
4.3	La résistance aux sucs gastriques	77
4.4	La résistance aux enzymes pancréatiques	77
5	.Cinétique de croissance à différentes concentration de salinité en culture pure... 78	78
6	L'antibiogramme	81
7	La mise en évidence des interactions	82
Discussion		
1.	Isolement et identification phénotypique des souches	84

2. Identification géotypique des souches.....	87
3. Caractérisation technologique des souches étudiées.....	88
4. La mise en évidence des critères probiotiques des souches étudiées.....	89
Conclusion	94
Références bibliographiques	97
ANNEXES	

Résumé

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Plusieurs propriétés fonctionnelles, et critères biotechnologiques sont pris en considération dans la sélection des souches probiotiques.

Sept souches ont été étudiées, isolées localement à partir de différentes origines, selles des nourrissons âgé d'une semaine à 3 mois (naît par accouchement normale, sans traitement d'antibiotiques, allaité exclusivement au sein) ,de lait maternel commercialisé ,de yaourt contenant des bifidus (Activia) et d'intestin des abeilles provenant de la wilaya d'Oran et de Ghardaïa. La caractérisation phénotypique et génotypique en utilisant des tests classiques et séquençage d'ADN a permis l'identification suivante: 3 souche de *Bifidobacterium longum subsp. Longum* indiqué comme B11 , BI2, BI3 isolés de selles des nourrissons .A partir des intestins d'abeilles on a isolés 2 souche de bifidobactéries indiqué comme *Bifidobacterium longum subsp. Longum* Ba1 et *Bifidobacterium astéroïdes* Ba2. A partir du yaourt Activia on a isolé une souche de *Bifidobacterium breve* indiqué comme By1 et à partir de lait maternisé commercialisé on a pu isoler une seul souche de *Bifidobacterium breve* indiqué comme Bm1.

Plusieurs tests consécutifs ont été effectués afin de connaitre leurs potentiels probiotique. Les résultats obtenus montrent que les souches possèdent une tolérance au pH acide, aux sels biliaires et aux suc gastrique.

Dans cet étude on a pu évaluer la résistance de nos souches à différentes concentration de salinité :4.5% , 5% et 5.5% de NaCl. On a constaté une inhibition totale de croissance à 5.5% de NaCl et une croissance modérée de nos isolats à 5% de NaCl par rapport à une croissance significative à 4.5 % de NaCl.

Mots clés : Probiotique, souche, *Bifidobacterium*, acidité, viabilité, salinité.

summary

Probiotics have properties that vary depending on the species or microbial strain. Several functional properties and biotechnological criteria are taken into consideration in the selection of probiotic strains.

Seven strains were studied, isolated locally from different origins, infants stool aged one week to 3 months (born by vaginal delivery, without antibiotic treatment, breast fed exclusively), commercialized milk formula for baby, yogurt containing bifidus (Activia) and the intestines of bees from the wilaya of Oran and Ghardaia.

Phenotypic and genotypic characterization using standard assays and DNA sequencing yielded the following identification: 3 strains of *Bifidobacterium longum subsp. Longum* indicated as B11, B12, B13 isolated from stool of infants. From the intestines of bees 2 strains of bifidobacteria were isolated indicated as *Bifidobacterium longum sub sp. Longum* Ba1 and *Bifidobacterium asteroides* Ba2. From Activia yoghurt, 1 strain of *Bifidobacterium breve* indicated as B1 were isolated and from commercialized milk formula for baby a single strain of *Bifidobacterium breve* indicated as Bm1 could be isolated.

Several consecutive tests were conducted to know their probiotic potentials. The results obtained show that the strains have a tolerance to acidic pH, bile salts and gastric juice.

In this study we could evaluate the resistance of our strains at different salinity concentrations: 4.5%, 5% and 5.5% NaCl. Total growth inhibition at 5.5% NaCl was observed and moderate growth was observed at 5% NaCl compared with significant growth at 4.5% NaCl.

Key words: Probiotic, strain, Bifidobacterium,,acidity, viability, salinity.

ملخص:

البروبيوتيك لها خصائص تختلف باختلاف السلالات أو الأنواع البيكتيرية.

تؤخذ عدة خصائص وظيفية ومعايير بيوتكنولوجية في انتقاء البيكتيريات المستعملة كبروبيوتيك

تمت دراسة سبعة بيكتيريا معزولة محليا من أصول مختلفة:

من براز الرضع تتراوح أعمارهم بين أسبوع وثلاثة أشهر (من ولادة طبيعية دون علاج بمضادات حيوية مع رضاعة طبيعية)، من حليب رضع مسوق يحتوي على البيفيدوبكتيريا، من لبن زبادي (Yaourt) وأخيرا من امعاء نحل من ولاية وهران وغرداية.

الوصف المجهرى والوراثى باستخدام المقاييس الكلاسيكية وتسلسل الحمض النووي مكننا من

عزل 3 سلالات كالتالي:

- *Bifidobacterium longum longum* المشار إليها ب B11 – B12 – B13 المعزولة من براز الرضع.

- *Bifidobacterium longum longum* المشار إليها ب Ba1 و

Bifidobacterium Asteroides المشار إليها ب Ba2 المعزولة من أمعاء النحل.

- *Bifidobacterium breve* المشار إليها ب By1 المعزولة من لبن زبادي و

Bifidobacterium breve والمشار إليها ب Bm1 المعزولة من حليب الرضع.

أجرنا عدة اختبارات متتالية لمعرفة إمكانية استعمال هذه السلالات كبروبيوتيك والنتائج أظهرت قدرة هذه الأخيرة على تحمل درجات من الحموضة ، الأملاح الصفراء وعصائر المعدة.

في دراستنا تمكنا أيضا من تقييم مدى قدرة السلالات المعزولة على تحمل تركيزات مختلفة من الملوحة 4,5% - 5% – 5,5% من كلوريد الصوديوم.

وقد لاحظنا تثبيط نمو كلي عند 5,5% من كلوريد الصوديوم بينما كان النمو معتدلا عند 5% من كلوريد الصوديوم مقارنة بنمو هذه السلالات في 4,5% من كلوريد الصوديوم .

الكلمات المفتاحية: بروبيوتيك ، سلالة، بيفيدوباكتريوم، ملوحة.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique.

ADNr /ARNr : ADN ou ARN ribosomal.

CO₂ : Dioxyde de carbone

Do: densité optique.

F6PPK : fructose-6-phosphokétolase

HPLC : haute performance liquide chromatographie

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

Lb: Lactobacillus

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

MRS: Milieu de Man, Rogosa and Sharpe (1960)

pH: potentiel d'hydrogène

Subsp. : sous-espèce

ufc : unité formant colonie

µg: microgrammes

Bif :Bifidobacterium

C: Cytosine

dNTP : Désoxyribonucléotides Triphosphate

EDTA : Ethylène Diamine TétracétiqueAcid

FAO/OMS: Food and Agriculture Organization / Organisation Mondiale de la Santé

GLY :Glycerol

HCl :chlorhydrate d'hydrogene

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium Min minute

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

Pb : Paire de base

Sor:sorbitol

Tré:tréhalose

Inu:inuline

Mél :mélezitose

Sal :salicine

Xyl:xylose

Cél : célébiose

Rha :rhamnose

Fru : fructose

Ara :arabinose

Rib :ribose

Lac :lactose

Glu :glucose.

Liste des figures

Pages

Figure 1 : Évolution de la flore intestinale du nouveau-né, de la naissance à 7 jours(Kantha, 1999).....	6
Figure 2 : Concentration en bactéries le long du tube digestif.....	8
Figure 3 : Les fonctions du microbiote intestinal D'après	9
Figure 4 : Mécanismes d'action des probiotiques	17
Figure 5 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.....	20
Figure 6 : Les principales espèces utilisées comme probiotique.....	21
Figure 7 : Critère de sélection des probiotiques selon le rapport du FAO 2002	23
Figure 8 : Métabolisme général des bifidobactéries.....	32
Figure 9 : La voie du fructose 6-phosphate des bifidobactéries.....	33
Figure 10: schéma de la production des acides aminés à partir de la voie bifide F6PPK..	34
Figure 11: Arbre phylogénétique des bifidobactéries	44
Figure 12 : Broyage des abeilles	47
Figure 13 : la technique suivie pour l'isolement des bifidobactéries	48
Figure 14 : plaque d'Elisa pour la fermentation.....	51
Figure 15 : Protocole de détermination de l'effet du pH gastrique simulé sur la viabilité des souches isolées	56
Figure 16 : Conservation à courte durée	59
Figure 17 : protocole de conservation des souches à longue durée	60
Figure 18 : Aspects macroscopiques et microscopiques des souches (B11,Bm1).....	65
Figure 19: la détermination des acides organique par chromatographie en phase liquide (HPLC) de la souche B11, By1, Bm1	68
Figure 20 : Réaction d'amplification PCR du gène 16S des souches étudiées sur gel agarose.....	69
Figure 21: Cinétique de croissance de la souche BL1 dans le milieu MRS Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl	78

Figure 22: Cinétique de croissance de la souche Ba1 dans le milieu MRS	
Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl	78
Figure 23: Cinétique de croissance de la souche By1 dans le milieu MRS	
Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl	79
Figure 24: Cinétique de croissance de la souche Bm1 dans le milieu MRS	
Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl	79
Figure 25: Cinétique de croissance de la souche B12 dans le milieu MRS	
Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl	80
Figure 26: Cinétique de croissance de la souche B13 dans le milieu MRS	
Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl	80
Figure 27: Cinétique de croissance de la souche Ba2 dans le milieu MRS	
Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl	81
Figure 28 : Microbiote humain durant la première année de vie	84

Liste des tableaux	Pages
Tableau 1: les microorganismes considérés comme probiotiques	22
Tableau 2: Quelques souches probiotiques et leurs effets cliniques.....	24
Tableau 3: les différentes espèces appartenant au genre <i>Bifidobacterium</i>	27
Tableau 4: profile fermentaire des différentes espèces de <i>BIfidobactérium</i>	37
Tableau 5: Quelques produit laitiers commercialisés contiennent de Bifidobacterium spp dans different pays.....	39
Tableau 6: Différents aspects macroscopiques et microscopiques	64
Tableau 7: Mise en évidence de certaines activités enzymatiques chez les souches étudiées	66
Tableau 8: Mise en évidence de la fermentation de sucres chez les souches étudiées	67
Tableau 9: Résumé des résultats d'identification phénotypique et génotypique des souches étudiées	75
Tableau 10: Les résultats obtenus pour les isolats concernant la résistance aux substances gastro-intestinales pour la souche B11,B12,B13 isolées des selles de nourissons	76
Tableau 11: Les résultats obtenus pour les isolats concernant la résistance aux substances gastro-intestinales pour la souche Ba1,Ba2 isolées des intestins d'abeilles	76
Tableau 12: Résultats obtenues à t0 pour les sels biliaires	77
Tableau 13: Résultats de résistance des souches aux sucres gastriques	77
Tableau 14: résistance des souches aux enzymes pancréatique.....	77
Tableau 15 : Résultats de l'évaluation de l'antibiorésistance des souches.	81
Tableau 16 : les diametres des zones d'inhibitions en mm lors des int eractions des souches de <i>bifidobactrium</i> (B11 , B12 ,B13 , Ba1 , Ba2) avec les bacteries entéropathogenes	82

Introduction

Introduction

Le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans le maintien de la santé humaine tout au long de la vie. Il contribue à la résistance aux agents pathogènes et interagit avec le système immunitaire de l'hôte, les bifidobactéries intestinales en particulier ont reçu une attention particulière en raison de leur association avec un «microbiote intestinal sain» et de leurs avantages thérapeutiques (**Sampo, 2009**)

Les probiotiques sont définis comme étant des «microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, confèrent des effets bénéfiques à l'hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal» (**Liong et Shah, 2005**). À l'heure actuelle, les lactobacilles et les bifidobactéries sont des probiotiques courants associés à des «aliments fonctionnels» favorables à la santé ainsi qu'à des compléments thérapeutiques, prophylactiques et de croissance pour les animaux et l'homme. (**Michael et al., 2011**)

Les bifidobactéries représentent un des groupes dominants des micro-organismes de l'intestin humain, elles constituent >1 % de la population intestinale chez les adultes et représentant plus que 90 % de la flore fécale anaérobique des enfants allaités au sein. Elles forment la flore intestinale humaine depuis la première année de la vie. (**Arboleya et al., 2018**). Elles sont impliquées dans la morphogénèse et les fonctions de divers systèmes de l'organisme hôte (digestif, immunitaire, cardiovasculaire, endocrinien, etc.) impliqués dans le métabolisme des protéines, des lipides et des glucides, produisant une variété de substances biologiquement actives (enzymes, protéines extracellulaires et polysaccharides) possédant des propriétés immunomodulatrices, radioprotectrices, anticarcinogènes et autres propriétés.

Aujourd'hui, plusieurs espèces probiotiques du genre bifidobactéries sont intégrées dans les produits laitiers et les nourritures pour nourrissons, ainsi qu'en nombre élevé comme bactéries vivantes dans de nombreux produits alimentaires présentant diverses allégations de santé. Lorsqu'on utilise des bifidobactéries pour des applications probiotiques.

L'objectif de cette étude est la mise en évidence des souches bactériennes isolées en Algérie à partir d'un nombre d'écosystème différent et caractérisées par leur potentiel probiotique du point de vue biotechnologique.

Cette thèse est constituée de trois parties:

La première partie :

- d'une étude bibliographique qui révèle plusieurs points et englobe des connaissances sur les probiotiques en général et les bifidobactéries.

La deuxième partie composée:

- d'une méthodologie de travail qui rassemble tout les matériels et méthodes utilisés pour démontrer et exécuter les travaux de cette étude.

La troisième partie regroupe:

- L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail.

- Une discussion des résultats.

- Une conclusion et perspectives du travail.

Chapitre I:
Etude bibliographique

Rapport Gratuit.com

1.Écosystème gastro-intestinal : composition et évolution

1.1 Description générale

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. De par sa surface totale (muqueuse) estimée à 200-300 m², il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement (**Holzapfel et al., 1998**). L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable entre l'épithélium gastro-intestinal, le système immunitaire et une importante flore microbienne.

Ces trois composants sont continuellement liés entre eux et évoluent ensemble en assurant une fonction et une activité normales de l'écosystème. Si l'un des trois composants de l'écosystème est défaillant, l'alliance est altérée et par conséquent diverses pathologies s'y installent (**McCracken et Lorenz, 2001**). Les interactions entre les microorganismes et l'hôte peuvent être de trois types: symbiose, commensalisme et pathogénicité (**Hooper et Gordon, 2001**). L'hôte est protégé contre la microflore intestinale pathogène par les barrières chimiques et physiques formées par l'épithélium gastro intestinal(**Kagnoff et Eckmann, 1997**).

1.2 La microflore intestinale

La flore intestinale normale est une collection complexe et en équilibre de microorganismes qui habitent normalement le tractus gastro-intestinal et remplissant un rôle dans la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire de l'hôte. Après une colonisation complète, la microflore intestinale est considérée comme un organe acquis après la naissance. Il est constitué d'une grande diversité d'espèces microbiennes assurant différentes fonctions pour l'hôte. La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de 10¹³-10¹⁴ cellules microbiennes représentant 400 à 500 espèces et sous espèces. Cette microflore représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain (**Moore et Holdeman, 1974; Bjorksten, 2004**).

Kantha(1999) nous a démontrée qu'il y'a une évolution de la flore untestinale du nouveau-né,de la naissance à 7 jours comme le montre la **Figure 1**.

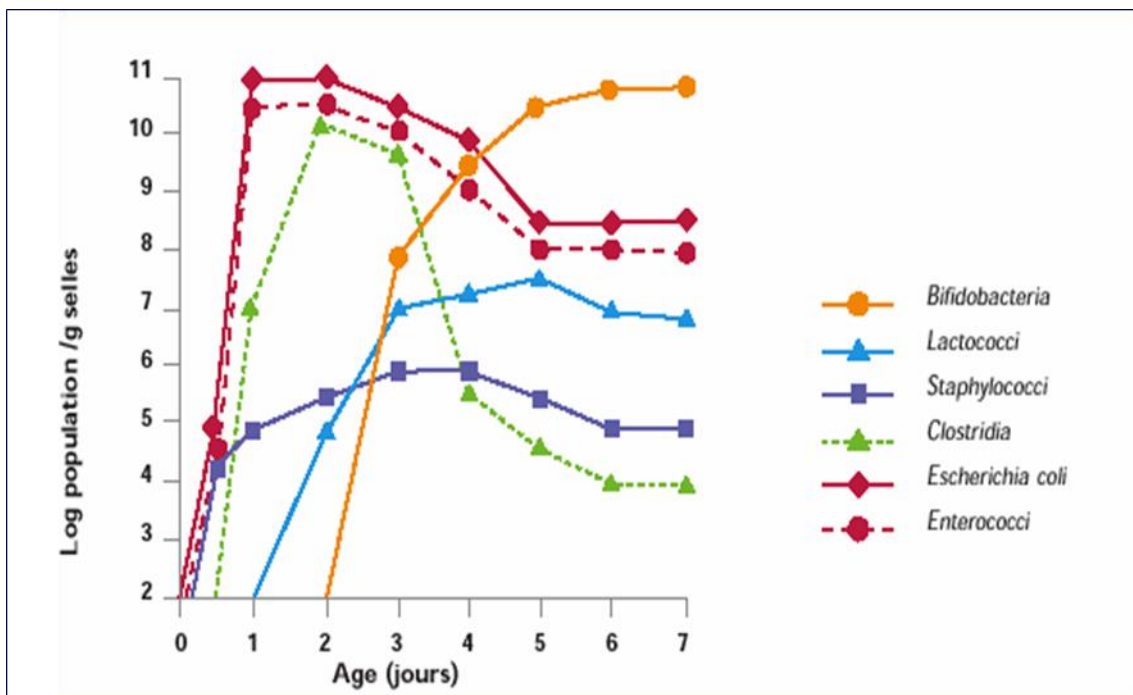


Figure 1. Évolution de la flore intestinale du nouveau-né âgé de 7 jours (Kantha,1999)

La prévalence des bactéries dans le tractus gastro-intestinal dépend des conditions régnant dans le compartiment du tractus. Deux catégories de bactéries ont été identifiées : les bactéries autochtones ou indigènes se trouvant dans des niches particulières, et les bactéries allochtones ou transitoires rencontrées dans d'autres habitats du tractus. La majorité des bactéries pathogènes sont allochtones et vivent normalement en harmonie avec l'hôte, excepté lorsque l'équilibre du système est rompu (Hao et Lee, 2004).

Du point de vue microbiologique, comme le montre la **Figure 2** l'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions très différentes pour la survie des différents microorganismes. Dans le premier compartiment, l'estomac, la prolifération microbienne est fortement réduite par la présence d'oxygène apporté par la déglutition et d'une forte acidité. De ce fait, l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acidotolérants et anaérobies facultatifs comme les lactobacilles,

streptocoques, levures, etc. Dans le deuxième compartiment qui est le petit intestin, la microflore est constituée essentiellement de bactéries anaérobies facultatives tels que les lactobacilles, les streptocoques et les entérobactéries, et anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies. Dans le dernier compartiment qui est le colon (dépourvu d'oxygène), le transit digestif est plus lent et la flore microbienne est plus abondante, représentant 35 à 50 % du volume du contenu du colon humain (**Cummings et al., 1989; Gounier-Château et al., 1994**). La microflore du colon est très complexe et dominée par les bactéries anaérobies strictes (*Bacteroides* spp. *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Atopobium* spp...). Tandis que les bactéries anaérobies facultatives sont moins nombreuses et représentées par les lactobacilles, les entérocoques, les streptocoques et les *Enterobacteriaceae*. Les levures (ex. *Candida albicans*) sont relativement faiblement représentées. La charge microbienne dans les différents compartiments a été estimée à environ : 10^4 , 10^{3-4} , 10^{5-7} , 10^{7-8} et 10^{10-11} colonies formant unité (ufc)/g dans l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le colon respectivement (Ouwehand et Vesterlund, 2003; Isolauri et al., 2004). Les bifidobactéries et les lactobacilles, ainsi que certains entérocoques, *E. coli*, streptocoques et bactéroïdes, se distinguent par leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, comme l'amélioration de la maturation et de l'intégrité de l'intestin, l'antagonisme contre les pathogènes et la modulation de la fonction immunitaire (**Gibson et Roberfroid, 1995; Schiffrin et Blum, 2002; Rastall et al., 2004**).

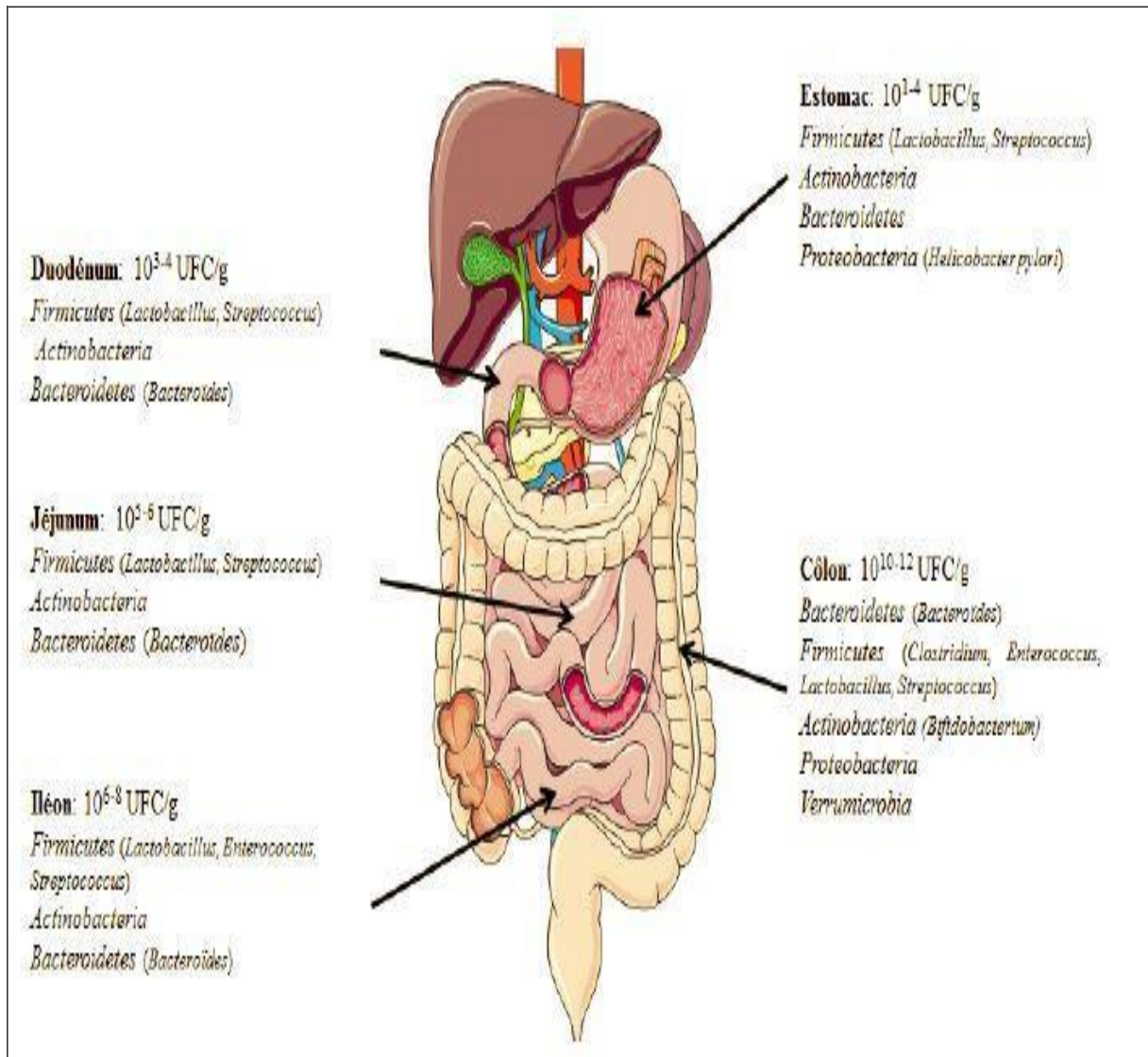


Figure 2 : Concentration en bactéries le long du tube digestif. (Le Lay 2015)

1.3 Effets bénéfique:

Les bactéries du microbiote sont impliquées dans diverses fonctions bénéfiques à l'hôte, comme la prévention des infections causées par les pathogènes, la digestion et la mise à disposition de nutriments ainsi que la maturation du système immunitaire associé aux muqueuses (**Figure3**).

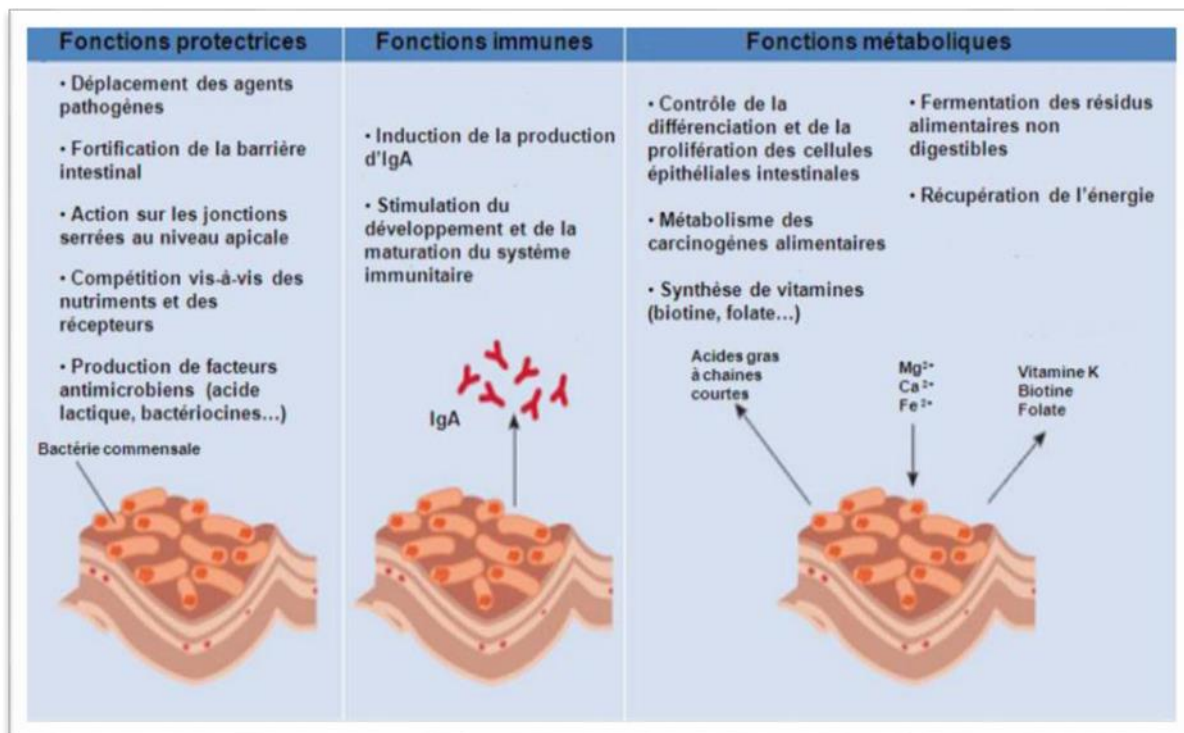


Figure 3 : Les fonctions du microbiote intestinal D'après **O'Hara and Shanahan (2006)**

1.3.1 Participation à la nutrition:

Les bactéries du microbiote intestinal peuvent participer au métabolisme de l'hôte en consommant des éléments non digérés par l'hôte comme les carbohydrates (pectine, cellulose...), fournissant ainsi des nutriments à l'hôte ou à d'autres bactéries du microbiote.

L'activité métabolique la plus intense se retrouve au niveau du colon qui contient le plus grand nombre de bactéries (**Srikanth et McCormick 2008**).

En plus de sa participation dans l'hydrolyse des macromolécules apportées par l'alimentation, le métabolisme du microbiote intestinal libère dans la lumière du tube digestif des vitamines B et K, essentielles à la santé de l'hôte, ou facilitent l'absorption de la vitamine D issue du bol alimentaire, en augmentant l'expression de son récepteur à la surface des entérocytes (**Feng et al., 2005**).

Plusieurs glucides résistants d'origine végétale représentent une part importante des sources de carbone utilisées par la flore colique comme l'amidon résistant, la cellulose, l'hémicellulose, la lignine, la pectine ou l'inuline (**Louis et al., 2007**). De la même façon, de nombreuses protéines résistent aux protéases pancréatiques dans l'intestin grêle et arrivent donc intactes dans le côlon où elles sont dégradées par la microflore (**Macfarlane et al., 1986**).

La fermentation des glucides résistants aboutit essentiellement à la formation de SCFA (Short Chain Fatty Acid), principalement de l'acétate, du propionate et du butyrate, ainsi qu'à différents gaz tels que du CO₂, CH₄, H₂, H₂S (**Topping et Clifton, 2001**). Ces SCFA sont une source d'énergie non négligeable utilisable par l'épithélium intestinal puisqu'ils couvrent 10 % à 15 % des besoins de l'organisme et jouent un rôle positif, notamment le butyrate, dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose des cellules tumorales de l'intestin (**Comalada et al., 2006**).

1.3.2 Protection contre les pathogènes:

En dehors de son rôle au niveau des défenses immunitaires de l'hôte, le microbiote intestinal participe activement par d'autres mécanismes dans la lutte contre les infections (**Stecher et Hardt, 2008 ; Scarpellini et al, 2015**).

Parmi les genres les plus abondants dans la flore intestinale commensale, les

bifidobactéries et les lactobacilles ont été caractérisés pour leurs propriétés antimicrobiennes et plusieurs de leurs mécanismes inhibiteurs ont été décrits.

La production par des bactéries lactiques de composés antibactériens tels que des bactériocines et des molécules apparentées, des acides organiques ou le peroxyde d'hydrogène (uniquement en présence d'oxygène). Les bactériocines sont des molécules produites par des bactéries à Gram positif, comme les lactobacilles et ayant des effets toxiques sur d'autres bactéries à Gram positif en ménageant des pores dans les parois cellulaires.

Il agit également en perméabilisant les parois des bactéries à Gram négatif, augmentant ainsi leur sensibilité à d'autres composés antimicrobiens.

Par ailleurs, des bactéries lactiques peuvent entrer directement en compétition avec des espèces néfastes pour leurs sites d'adhésion. *L. reuteri* a la capacité de se fixer sur le même récepteur que celui de *Helicobacter pylori*. Certaines souches de bifidobactéries inhibent quant à elles l'adhésion d'*Escherichia coli* entérotoxiques en exprimant une molécule d'adhésion similaire à la leur (Gill, 2003) et même plusieurs d'autres bactéries pathogènes (Youngster et al, 2016)

1.3.3 Fonction immunologique:

Le développement de l'immunité du nouveau-né est stimulé par la colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal qui est dépourvu de germe *in-utero*. Cette colonisation intervient dans le développement de l'immunité innée et adaptative.

Des résultats suggèrent que cette relation entre le microbiote intestinal et le système immunitaire est spécifique à l'hôte et aussi à l'espèce. Une étude récente montre en effet que l'influence du microbiote intestinal sur la maturation du système immunitaire de l'hôte est dépendante de la spécificité hôte microbiote. Dans cette étude, des souris axéniques (sans microbiote) ont été colonisées par un microbiote de souris, de rat ou d'humain. L'analyse des cellules du système immunitaire a révélé que les souris colonisées par les microbiotes provenant de rat et d'humain présentent certaines caractéristiques des souris axéniques c'est à dire que leur système immunitaire semble être peu développé. De plus les souris axéniques colonisées par un microbiote de souris sont mieux protégées contre les infections comparées aux souris colonisées avec un microbiote humain (Chung et al., 2012 ;Francino et al, 2014).

1.4 Facteurs agissant sur la colonisation bactérienne:

1.4.1 Influence du terrain génétique:

Malgré le fait que le nouveau-né se retrouve confronté à une multitude de microorganismes à la naissance, son tractus gastro-intestinal ne sera colonisé que par certaines bactéries capables d'interagir de façon symbiotique avec l'hôte. L'influence du terrain génétique sur la modulation de la colonisation bactérienne a été mise en évidence par l'observation de l'importante similarité entre des microbiotes provenant de jumeaux.

Différentes études rapportent en effet que les similarités au niveau de la composition du microbiote intestinal sont liées au degré de similitude du terrain génétique (**Stewart, Chadwick et Murray 2005**).

1.4.2 Influence du terme de naissance :

Le microbiote intestinal des nouveau-nés prématurés est moins diversifié et présente un retard d'implantation, notamment pour les espèces anaérobies strictes, comparé à celui des nouveau-nés à terme (**Campeotto et al., 2007**).

Ce retard peut s'expliquer par le fait que les enfants prématurés naissent souvent par césarienne et qu'ils nécessitent parfois une lourde prise en charge (soins intensifs, antibiotiques) associée à un environnement protégé qui les sépare de toute source de microorganismes (**Loren et al., 2001**).

1.4.3 Influence du mode d'accouchement:

Le mode d'accouchement influence fortement les conditions de la colonisation du tractus gastro-intestinal du nouveau-né. Des études rapportent que les enfants nés par césarienne présentent une composition du microbiote différente de celle des enfants nés par voie basse (**Rutayisire et al., 2016**). De plus, la population bactérienne du microbiote intestinal des enfants nés par voie basse est semblable à celle du microbiote vaginal de leur mère tandis que le microbiote intestinal des enfants nés par césarienne présente des similitudes avec le microbiote cutané de la mère (**Reid et al., 2011**). Les enfants nés par césarienne présentent en général un retard de colonisation par les lactobacilles, les bifidobactéries et les *Bacteroides* associé à une colonisation par des *Clostridium* plus rapide et plus intense par rapport aux enfants nés par voie basse.

1.4.4 Influence de l'alimentation :

La composition chimique du régime alimentaire apparaît avoir un rôle déterminant pour la définition du microbiote intestinal du tractus gastro-intestinal immature (**Poroyko et al., 2011**). Chez les enfants nourris au sein, la population bactérienne est plus uniforme et plus stable que celle des enfants nourris avec des formules infantiles (**Le Huërou-Luron et al., 2010**). Un enfant né à terme et nourri au sein possède un microbiote intestinal au sein duquel les lactobacilles et les bifidobactéries prédominent par rapport à d'autres bactéries potentiellement pathogènes alors que des coliformes de *Bacteroides* et d'entérocoques prédominent chez les enfants nourris avec des formules infantiles (**Bezirtzoglou et al., 2011**).

D'autre part, la consommation d'aliments dits fonctionnels du fait de leur contenu en probiotiques, prébiotiques ou en protéines bioactives (lactoferine) a également été décrite comme étant capable de modifier la composition du microbiote intestinal (**Prakash et al., 2011**).

1.4.5 Influence des traitements médicamenteux:

L'antibiothérapie est le principal facteur de risque associé à l'altération du microbiote intestinal. Le manque de spécificité attribué à certains antibiotiques peut être responsable de divers désordres notamment au niveau des différents microbiotes d'un organisme.

Une étude a observé que les traitements à base d'antibiotiques réduisent la diversité du microbiote fécal des nouveau-nés et retardent la colonisation par des espèces, considérées comme ayant des effets bénéfiques, telles que les lactobacilles et les bifidobactéries. De plus, ces traitements durant les premiers mois de vie favorisent la colonisation par des pathogènes opportunistes résistant aux antibiotiques (**Bonnemaison et al., 2003**).

D'autres médicaments comme les anti-acides, les inhibiteurs des pompes à protons, ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent modifier l'environnement intestinal et donc perturber l'équilibre au sein du microbiote (**Huffnagle, 2010**).

1.4.6 Influence des conditions d'hygiène:

L'établissement du microbiote intestinal dépend du degré d'exposition aux bactéries. Cela explique pourquoi en général, le processus d'établissement du microbiote intestinal est différent entre des enfants nés dans les pays émergents par rapport aux pays industrialisés.

Au cours des dernières décennies, la colonisation précoce par les entérobactéries semble

avoir fortement diminué dans les pays industrialisés en faveur de la colonisation par les staphylocoques (Adlerberth et al., 2006). Les procédures strictes d'obstétrique et d'hygiène appliquées dans les maternités au moment de la naissance semblent être à l'origine de la réduction de l'exposition aux microorganismes provenant de la mère et de l'environnement. Cela a pour conséquence de modifier le processus de colonisation du tractus gastro-intestinal du nouveau-né.

On observe en effet dans ces pays un retard de la colonisation par des bactéries appartenant aux groupes *Bifidobacterium* ou *Bacteroides* (Campeotto et al., 2007) et aussi des bactéries des groupes *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Eubacteria* (Sepp et al., 1997).

Ces différents facteurs influencent la composition du microbiote intestinal mais on peut noter que le microbiote intestinal est résilient. Cela signifie que malgré l'apparition de déséquilibres, la composition du microbiote intestinal tend à retrouver son état d'origine. Ces observations suggèrent l'existence d'une communication régulière entre le microbiote et son hôte.

3. Les probiotiques

3.1 Définitions

Le principe décrivant que les bactéries lactiques offraient des bénéfices pour la santé a été défini par le Russe Elie Metchnikoff, prix Nobel de médecine en 1908 (Guarner et al. 2011). Il disait à l'époque que "la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour modifier la flore dans nos corps et remplacer les microbes dangereux par des microbes utiles". Il a développé un régime alimentaire à base de lait fermenté par une bactérie qu'il appela le bacille bulgare.

La première bifidobactérie a été isolée par un membre de l'institut Pasteur : Henry Tissier chez un enfant en bonne santé nourri au sein. Il la nomma *Bacillus bifidus communis* (maintenant nommée *Bifidobacterium bifidum*) et recommanda de l'administrer aux nourrissons souffrant de diarrhées. En 1917, une souche non pathogène d'*Escherichia coli* a été isolée par le professeur allemand Alfred Nissle à partir de selles d'un soldat qui n'avait pas développé d'entérocolite lors d'une épidémie sévère de shigellose.

Le terme "probiotique" a vu le jour en 1965 par opposition aux antibiotiques. Il a été défini par Lilly et Stillwell comme des facteurs dérivés des micro-organismes et stimulant la

croissance des autres micro-organismes.

Le préfixe « pro » signifie pour et le suffixe «-biotique » signifie la vie. Probiotique signifie donc en faveur de la vie.. Selon **Parker (1974)**, « probiotiques » désigne les microorganismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale. Cette définition englobant les microorganismes et les métabolites microbiens produits (les antibiotiques), a été modifiée par **Fuller (1992)** qui redéfinit les probiotiques comme étant : "des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale". Enfin, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) (**Report of FAO/WHO, 2002**), les probiotiques sont « des microorganismes vivants administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfiques pour la santé de l'hôte».

3.2 Les propriétés fonctionnelles des Probiotiques:

2.2.1 Survie des probiotiques dans le tube digestif chez l'Homme:

Aujourd'hui, il est admis que les bactéries probiotiques doivent conserver une certaine viabilité lors du transit gastrointestinal pour être en mesure d'exercer un rôle bénéfique sur la santé humaine (**Snook et al. 2003**). Il leur est normalement nécessaire de survivre à l'acidité gastrique et aux sécrétions bilio pancréatiques, principaux mécanismes endogènes d'inactivation des bactéries ingérées (**Lee et al., 2008**). C'est pourquoi l'exposition à des mélanges simulant ces conditions a été adoptée comme l'un des principaux critères d'évaluation et de sélection in vitro des candidats probiotiques (**FAO, 2002**).

Pour pouvoir exercer leur effet biologique, les probiotiques, ingères oralement, doivent atteindre l'intestin grêle et le colon vivants et en quantité suffisante.

Cela suppose qu'ils puissent résister à un certain nombre de barrières physiologiques à la colonisation bactérienne digestive, parmi lesquelles la sécrétion d'acide gastrique, les acides biliaries, les peptides antimicrobiens du mucus et ceux sécrétés par certaines cellules intestinales (immunoglobulines a sécrétoires, lactoferrine, lysozyme, etc.) (**Dann et Eckmann , 2007; Wehkamp et al., 2007**).

Un des premiers critères de sélection des probiotiques sera donc leur survie dans le tube digestif et leur capacité a coloniser le colon, certes de manière transitoire, mais suffisamment

longtemps pour pouvoir y exercer leur action. Ce processus de sélection a été à l'origine du développement de méthodes spécifiques d'étude de la survie des probiotiques chez l'Homme (Flourie et Nancey 2007).

2.2.2 Mécanismes d'action et d'adaptation des probiotiques :

Les mécanismes d'action des probiotiques sont encore très incomplètement connus. Il est par ailleurs vraisemblable qu'ils varient en fonction du (ou des) probiotique utilise, et peut-être de la dose administrée.

Les effets des probiotiques résultent essentiellement de leurs interactions avec le contenu digestif d'une part, à la fois avec les nutriments présents dans la lumière intestinale et avec les composants de la flore endogène, et avec le contenant d'autre part, principalement les cellules épithéliales intestinales et les cellules immunocompétentes (Backhed et al., 2005).

Le processus de résistance des bactéries aux stress rencontrés dans le tractus digestif, l'adaptation de leur métabolisme à l'environnement nutritionnel de l'hôte, que sur les déterminants de leur adhésion à la muqueuse intestinale ; les investigations concernent un des trois mécanismes d'action communément attribués à ces bactéries que sont : (Lebeer et al., 2008) figure (4).

- L'inhibition des pathogènes et la restauration de l'homéostasie microbienne
- La protection de l'épithélium intestinal
- La modulation

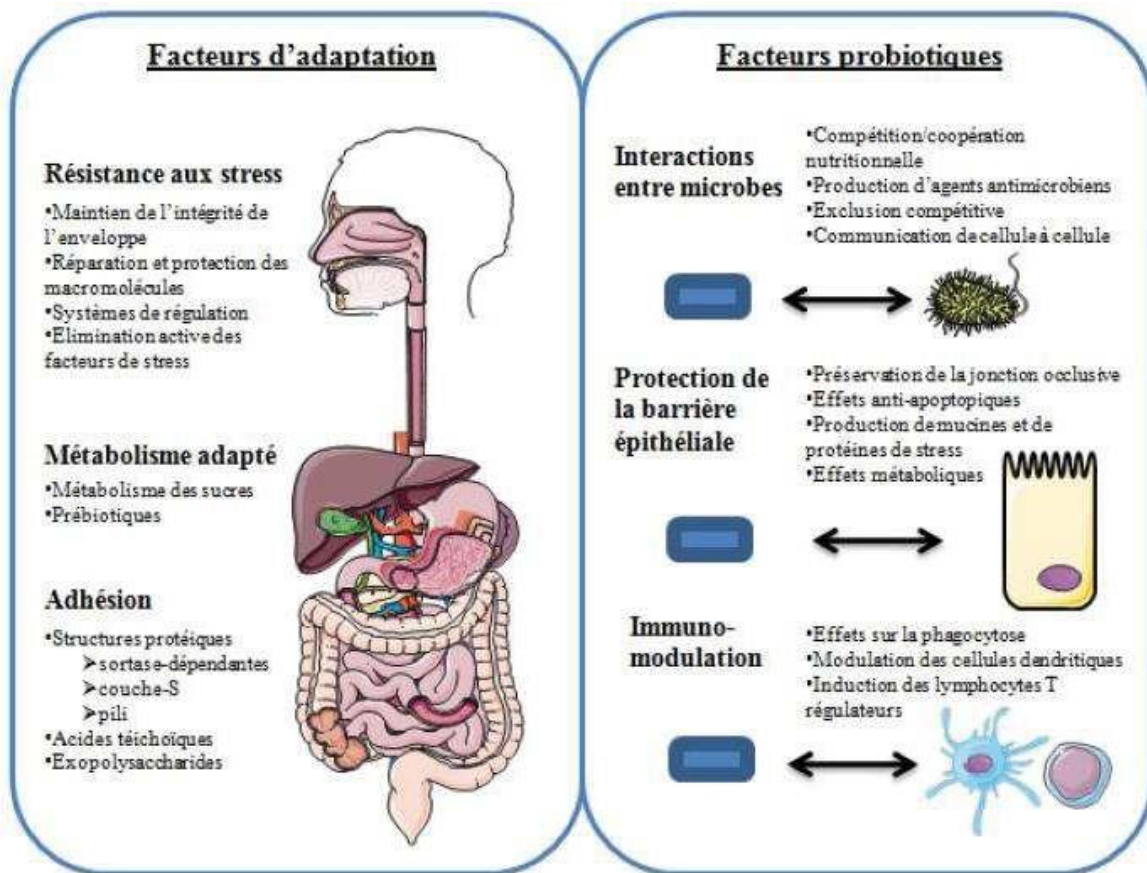


Figure 4 : Mécanismes d'action des probiotiques selon Leeber et al., 2008

Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation de probiotiques.

a) **Les probiotiques et les infections gastro-intestinales** : des études cliniques ont démontré que des infections gastro intestinales causées par *Helicobacter pylori*, la diarrhée du voyageur, diarrhée due aux rotavirus, diarrhée-associée aux antibiotiques comme celle causée par *Clostridium difficile*, peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques (Mercenier et al., 2002, Turchet et al., 2003; Wang et al., 2004; Tursi et al., 2004, Plummer et al., 2004 ; Lunch et al, 2016). A titre d'exemple Wang et al., 2004 ont rapporté que la consommation régulière de yogourt additionné de *Lactobacillus acidophilus* La5 ou de *Bifidobacterium lactis* Bb12 induit une suppression effective de l'infection due à *H. pylori*. Tandis que Rosenfeldt et al. (2002) ont mentionné que des souches de *L.*

rhamnosus et *L.reuteri* ont permis de traiter des gastro-entérites à rotavirus chez des enfants hospitalisés.

b) **Les probiotiques et l'intolérance au lactose** : il a été rapporté que la consommation de lait ou de yogourt enrichis en probiotiques améliore l'absorption de lactose chez les patients déficients en lactase et réduit les symptômes digestifs dus à l'intolérance au lactose (Marteau et al., 2005 ; Morin et al., 2015 ; Deng et al., 2015). Jiang et al., 1996 ont démontré que la consommation de lait contenant des souches de *Bifidobacterium longum* réduit les symptômes de la mal absorption de lactose chez des sujets humains suite à une élévation de la sécrétion de β -galactosidase.

c) **les probiotiques et le cholestérol**: des études préliminaires ont révélé que la consommation de yogourt ou de lait fermenté contenant des probiotiques entraînent une diminution du taux de cholestérol dans le sang, et par conséquent la réduction des risques d'hypercholestérolémie responsable des maladies coronariennes. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par des bactéries ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués. Les acides biliaires, synthétisés par le foie à partir du cholestérol, sont recyclés et utilisés en moyenne trois fois pendant un même repas. L'hydrolyse des sels biliaires conjugués (les acides biliaires doivent être conjugués à la taurine et à la glycine pour être solubles) rend nécessaire la synthèse de sels biliaires supplémentaires, ce qui conduirait à une réduction du cholestérol (Liong et Shah, 2005). Par exemple, Bukowska et al., (1998) ont mis en évidence une diminution du taux de cholestérol sanguin chez des sujets soumis à un régime supplémenté avec *Lactobacillus plantarum* 299v.

d) **Les probiotiques et la prévention du cancer du colon**: La flore intestinale et le système immunitaire jouent un rôle important dans le processus de la carcinogénèse et certains probiotiques semblent pouvoir agir sur la prévention et le traitement de tumeurs *in vitro* et chez les animaux (Marteau et al., 2002). Selon certaines études, les bactéries probiotiques ont la propriété d'inhiber les processus conduisant à la formation du cancer (Richard et al., 2009). En effet, Matsumoto et Benno (2004) ont mentionné que la consommation de yogourt contenant *Bifidobacterium lactis* LKM512 réduit significativement la mutagénécité dans l'intestin de volontaires par comparaison à un placebo. Des études sur l'animal ont montré que la supplémentation de l'alimentation avec des souches spécifiques pouvait prévenir l'établissement, la croissance et la métastase des tumeurs induites chimiquement (Moreno de LeBlanc et Perdígón., 2007 ; Sun et al., 2014).

Cependant, cette avenue pour l'utilisation des probiotiques reste très attrayante compte tenu de l'augmentation constante des cas de cancer.

e) **Les probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin**: selon la littérature, les processus inflammatoires impliqués dans les pathologies de l'intestin de l'homme comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la pouchite sont contrôlés par les probiotiques. Une étude de **Guandalini (2002)** a montré que l'ingestion de *LactobacillusGG* entraîne une amélioration notable de l'état clinique chez des enfants souffrant de la maladie de Crohn. De même **Gosselink et al., (2004)** ont observé des effets cliniques bénéfiques chez des patients affectés par une colite ulcéreuse après ingestion de produits fermentés contenant *Lactobacillus GG* ($1-2 \times 10^{10}$ bactéries/jour). Une étude randomisée a étudié l'usage du probiotique composé de 8 souches : *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis* et *S. thermophilus*, chez des patients souffrant de Maladie de Crohn dans les 30 jours suivants une résection iléo-colique et Il a été observé que les patients prenant les probiotiques avaient des niveaux de cytokines proinflammatoires diminués par rapport aux patients sous placebo à J90. L'évaluation de la qualité de vie dans les 2 groupes était similaire. (**Fedorak et al. 2015**).

f) **Les probiotiques et la perméabilité intestinale** : l'altération de la perméabilité intestinale (fonction-barrière) causée par une infection, toxines ou autre facteur favorise un transfert aberrant d'antigènes (y compris la microflore locale) à travers l'intestin en engendrant des réponses immunitaires inappropriées (réactions inflammatoires ou auto-immunes) (**Baumgart et Dignass, 2002 ; Gill, 2003**). Des études ont montré que la consommation de probiotiques stabilise la fonction barrière de l'épithélium intestinal. Par exemple, une étude de **Rosenfeldt et al. (2004)** a démontré qu'une administration de probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus reuteri*) permet de stabiliser la fonction-barrière de l'intestin et de diminuer les symptômes gastro-intestinaux chez des enfants souffrant d'une dermatite atopique. Cependant les mécanismes impliqués dans cette normalisation ne sont pas encore bien connus.

g) **Les probiotiques et la motilité de l'intestin** : La motilité intestinale joue un rôle important dans la réduction de la croissance des microorganismes pathogènes dans l'intestin. Les probiotiques pourraient avoir des effets positifs sur la motilité de l'intestin en réduisant le temps de transit des microorganismes pathogènes (**Takiguchi et al., 1998**). Une étude de **Grimaud et al. (1993)** a montré que l'ingestion de lait fermenté avec *Bifidobacterium animalis* entraîne une réduction significative du temps du transit du contenu gastro-intestinal

chez des volontaires. Tandis que **Verdu et al. (2004)** ont rapporté que l'effet de *Lactobacillus paracasei* (probiotique) sur la motilité de l'intestin se traduit par une atténuation de l'hypercontractilité post-infection du muscle. Ils suggèrent que les probiotiques peuvent être utilisés dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable. **Agrawal et al (2009)** démontre l'effet du lait fermenté avec *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 sur l'amélioration des symptômes de sujets SII-C (prédominance de constipation) en association avec une accélération des temps de transit dans l'intestin grêle et le côlon. Du fait de son action globale sur les paramètres intestinaux, ce lait fermenté pourrait être intéressant dans la gestion des symptômes liés au SII-C. Plusieurs souches de probiotiques ont été aussi étudiées et semblent efficaces dans la constipation chronique de l'adulte en améliorant la fréquence et la consistance des selles comme la souche *L casei Shirota* ou *B. lactis* DN-173010 (**Chmielewska et Szajewska .,2010.**).

Tous ses effets bénéfiques que procurent l'ingestion de probiotiques sont démontrées dans **la figure (5)** par (**Mercenier et al., 2002**).

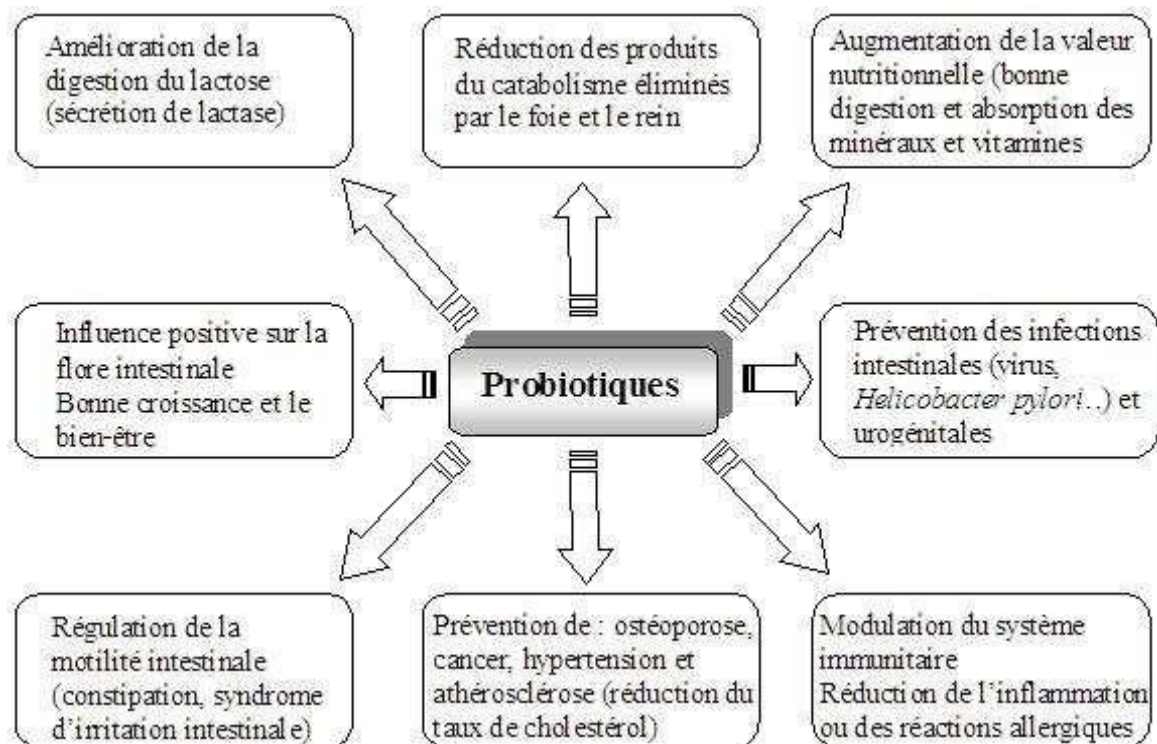


Figure 5 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (**Mercenier et al., 2002**).

3.3 Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique:

Les souches ou espèces probiotiques sont des composants normaux de la flore intestinale (Dunne *et al.*, 2001). En alimentation humaine, les genres microbiens les plus utilisés comme probiotiques sont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* figure (6) ((Izquierdo.,2009)). Par contre, en alimentation animale de nombreux genres bactériens et fongiques sont utilisés, comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* et *Torulopsis* (Tannock,1997).

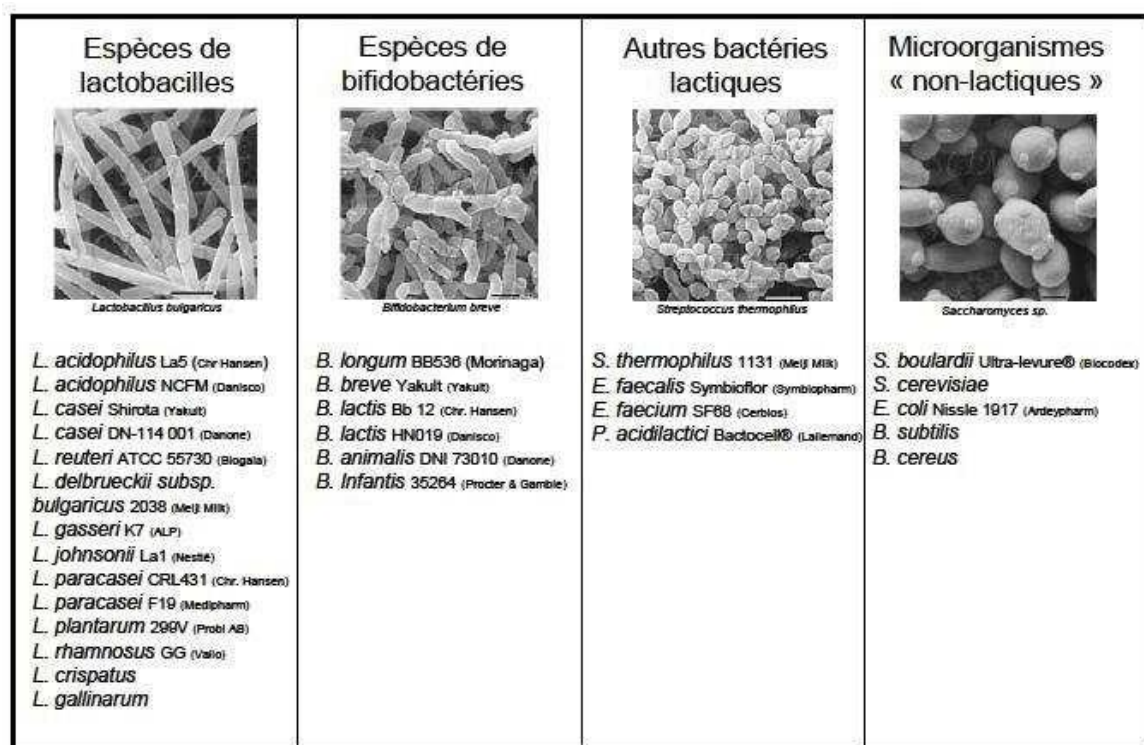


Figure 6 : Les principales espèces utilisées comme probiotique (Izquierdo.,2009)

En général, les souches probiotiques sont sélectionnées prioritairement pour leurs effets bénéfiques et leur sécurité d'utilisation. Le tableau (1) rapporte les microorganismes considérés comme probiotiques (Holzapfel *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Les microorganismes considérés comme probiotiques (**Holzapfel et al., 1998 ; Holzapfel et al., 2001**)

Les espèces de <i>Lactobacillus</i>	Les espèces de <i>Bifidobacterium</i>	Autre bactéries lactiques	Autre bactéries non lactiques
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> 4	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i> 4	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> 2	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> 4	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

3.4 Critères de sélection des souches à potentiel probiotique:

Le choix des probiotiques dépend de ses propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Selon le rapport de la **FAO/WHO (2002)**, comme le démontre la **figure (7)**, un micro- organisme doit être soumis aux étapes de caractérisations suivantes avant d'avoir le statut probiotique:

- Non pathogènes.
- Résistant au pH acide de l'estomac et aux concentrations biliaires présentes dans l'intestin grêle.
- Adhérer aux différents tissus épithéliaux du tractus gastro-intestinal.
- Avoir une bonne colonisation du tube digestif.
- Produire des substances antimicrobiennes capables d'inactiver des pathogènes.
- Moduler les réponses immunitaires.

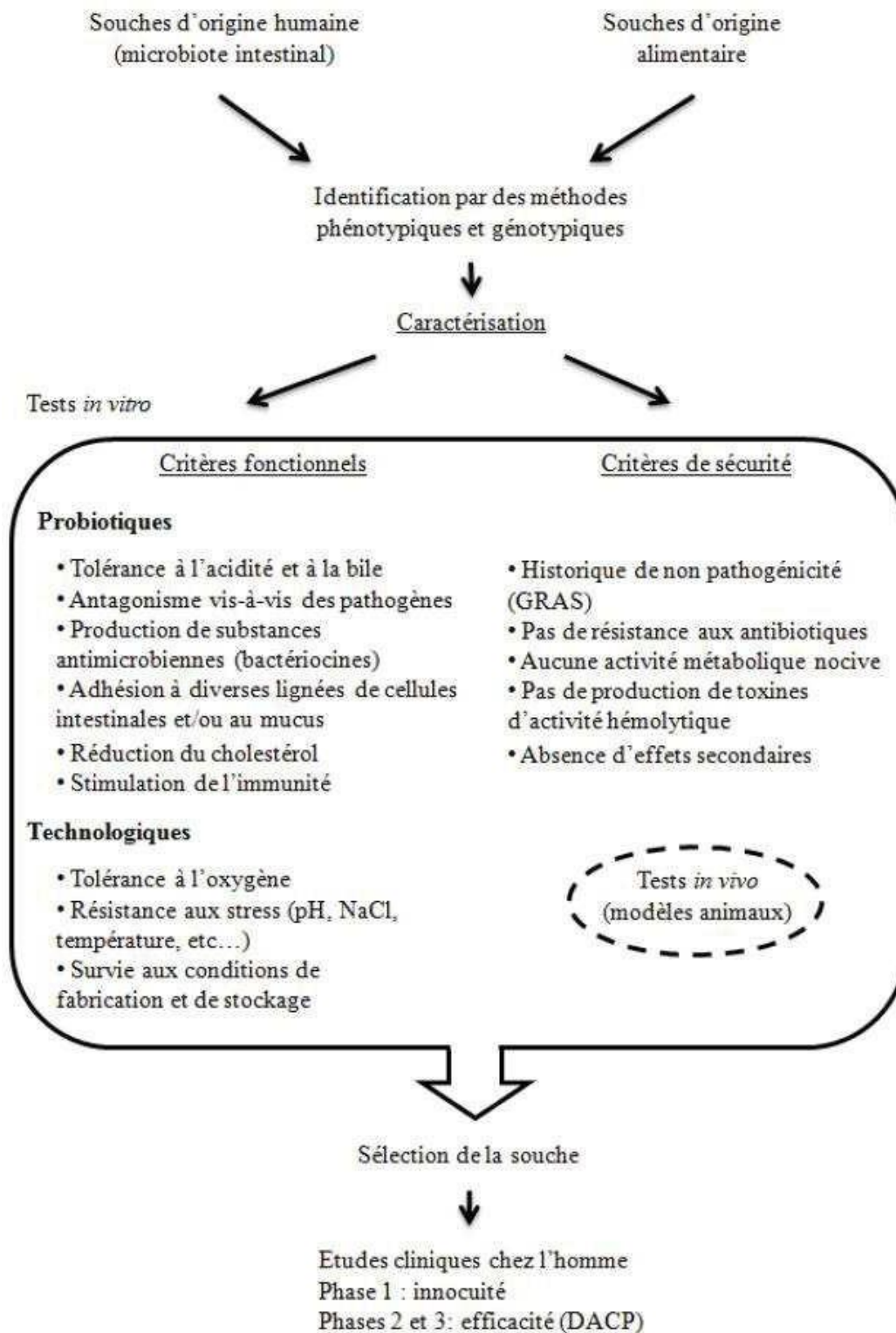


Figure 7 : Critère de sélection des probiotiques selon le rapport du FAO 2002 adapté par **Hamon 2011**

Tableau 2 : Quelques souches probiotiques et leurs effets cliniques. Adapté de Mattila-Sandholm et al. (1999).

Souche probiotique	Effets cliniques sur l'Homme
<i>Lactobacillus GG ATCC 53103</i>	Adhésion aux cellules intestinales humaines, réduction de l'activité des enzymes fécales, prévention des diarrhées associées aux antibiotiques, prévention et traitement des diarrhées à rotavirus et autres diarrhées,
<i>Lactobacillus johnsonii Lj-1(LA-1)</i>	Prévention de la diarrhée du voyageur, modulation de la flore intestinale, réduction des symptômes de l'intolérance au lactose, traitement de la constipation, amélioration de l'immunité, adjuvant dans le traitement de <i>Helicobacter pylori</i>
<i>Bifidobacterium lactis (bifidum) Bb- 12</i>	Prévention de la diarrhée du voyageur, traitement des diarrhées virales (rotavirus), modulation de la flore intestinale, traitement de la constipation, modulation de la réponse immunitaire
<i>Lactobacillus reuteri ATCC 55730</i>	Colonisation du tractus intestinal, réduction de la durée des diarrhées aux rotavirus, traitement des diarrhées virales
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Modulation de la flore intestinale, réduction de l'activité des enzymes fécales, effets positifs sur le cancer superficiel.
<i>Lactobacillus plantarum DSM 9843</i>	Adhésion aux cellules intestinales humaines, modulation de la flore intestinale
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Prévention et traitement des diarrhées associées aux antibiotiques (ex. <i>Clostridium difficile colitis</i>)

3. Les bifidobactéries :

3.1 Définition :

Les bifidobactéries ont été découvertes, par Tissier 1900. Ont été isolées à partir de selles d'enfants nourris au lait maternel. Tissier avait alors décrit ces organismes comme des bactéries anaérobies, Gram positif en forme de bâtonnet. Ces bactéries avaient alors reçu le nom de *Bacillus bifidus communis*. Au même moment, en Italie, Moro découvrait des bactéries semblables qu'il a identifiées comme des *Lactobacillus* (Ballongue, 1993).

3.2 Ecologie des bifidobactéries :

Les bifidobactéries font partie de la flore prédominante de l'intestin chez les humains et les animaux à tous les stades de vie. Cette flore dominante chez l'humain change au cours des différents stades de vie. Chez un jeune enfant nourri au lait maternel, la flore intestinale est composée de 85-99 % de bifidobactéries et les principales espèces retrouvées sont *Bifidobacterium infants* et *B. bifidum*. Les entérocoques, les coliformes et les lactobacilles représentent environ 1-15% de la flore fécale alors que les bactéroïdes et les clostridies sont absents (Rasic et Kurmann, 1983).

Le lait maternel contient des facteurs, tels que des oligosaccharides comme le galactose et le N-acetylglucosamine, qui stimulent la croissance des bifidobactéries (Bezkorovainy et Miller-Catchpole, 1989). L'absence de ces facteurs dans les préparations de laits pourrait expliquer la différence observée entre les flores des enfants nourris au lait maternel et ceux nourris au lait de vache (Tamime et al., 1995).

La flore adulte devient plus complexe et la flore dominante est composée de *bactéroïdes*. Bien que les bifidobactéries ne soient plus prédominantes, elles demeurent un des groupes les plus importants de la flore intestinale (Mahmoudi et al., 2013). Les espèces de bifidobactéries les plus retrouvées chez l'adulte sont *Bifidobacterium adolescentis* et *B. longum* (Tamime et al., 1995).

3.3 Taxonomie et les différentes espèces :

Pendant plusieurs années, les bifidobactéries ont été classées parmi les bactéries du genre *Lactobacillus*. C'est d'ailleurs sous ce nom que sont retrouvées les bifidobactéries dans les quatre premières éditions du manuel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Après 1965, suite à l'apparition des nouvelles technologies génétiques, deux équipes

derecherche(**Sebaldet et al.,1965 ; Werneret al.,1966**) ont démontré,grâce au pourcentage G+C, que les bifidobactéries étaient différentes des lactobacilles, des corynébactéries ainsi que despropionibactéries.Ils ont démontré que le pourcentage de G+C était de 60.1% pour les bifidobactéries alors qu'il était de 67.6% pour les propionibactéries, de 54.7% pour les corynébactéries et se situait entre 33 et 49% pour les lactobacilleses (**Sebald et al., 1965; Werner et al., 1966**).

Les bifidobacteries sont phylogénétiquement distinctes des autres bactéries lactiques avec un contenu en G+C généralement élevé qui varie de 42 % à 67 % (**Benkaddour, 2013**). Ce taux est en général supérieur à 55% par rapport aux bases A+T. **Miyake et al** ont classé les bifidobactéries en deux groupes : les « G+C pauvre » (45-55%) et les « G+C riches » (55-67%) tan disque Jian et al 2001 ont les a classer en 3 groupes : les « G+C riches » (55-67%), les « G+C pauvres » (45%) et les bifidobactéries ayant un % G+C intermédiaire (55%) (**Heddadji, 2007**).

À partir de 1974, le genre *Bifidobacterium* a été reconnu par les éditeurs du manuel *Bergey's Manual of Deteminative Bacteriology* et à ce moment là, le genre *Bifidobacterium* était composé de 11 espèces. Selon **Crociani et al (1996)** les bifidobactéries sont répertoriées de 32 espèces, 12 seraient d'origine humaine, 3 proviendraient de l'abeille, 14 seraient d'origine animale à sang chaud et 2 proviendraient des eaux usés.

On outre les espèces de bifidobactéries ne cesse d'augmenter, l'équipe de **Crociani et al (1996)** ont pu isolé une nouvelle espèce *Bifidobacterium Iactis* à partir des produits laitiers.

Selon **Euzéby (2007)**, le nombre d'espèces citées est de 35 et le nombre de sous-espèces est de 6.Et selon, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> il y aurait 32 espèces et 9 sous-espèces, *Bifidobacterium denticolens* et *Bifidobacterium inopinatum*, isolés de caries dentaires chez l'homme, ne sont plus considérés comme des espèces du genre *Bifidobacterium*. *Bifidobacterium denticolens* a été transféré dans le genre *Parascardovia* et l'espèce *Bifidobacterium inopinatum* dans le genre *Scardovia*.

Les différentes espèces de *bifidobacterium* et leur origines sont mentionnées au **tableau (3) (Heping et Cai., 2014)**.

Tableau 3 : les différentes espèces appartenant au genre *Bifidobacterium* (Heping et Cai., 2014) .

Numero	Espèces	Date	Source	Phylogroupe
d'isolement				
1	<i>B.actinocoloniiforme</i>	2011	Bee-GI	<i>B. asteroides</i>
2	<i>B. adolescentis</i>	1963	Human-GI	<i>B. adolescentis</i>
3	<i>B. angulatum</i>	1974	Human-GI	<i>B. adolescentis</i>
4	<i>B. animalis ssp. Animalis</i>	2004	Rodent-GI	<i>B. pseudolongum</i>
5	<i>B. animalis ssp. lactis</i>	1997	Dairy products	<i>B. pseudolongum</i>
6	<i>B. asteroides</i>	1969	Bee-GI	<i>B. asteroides</i>
7	<i>B. biavatii</i>	2012	Monkey-GI	<i>B. scardovii</i>
8	<i>B. bifidum</i>	1924	Human-GI	SS
9	<i>B. bohemicum</i>	2011	Bee-GI	SS
10	<i>B. bombi</i>	2009	Bee-GI	SS
11	<i>B. boum</i>	1979	Bovine-GI	<i>B. boum</i>
12	<i>B. breve</i>	1963	Human-GI	SS
13	<i>B. callitrichos</i>	2012	Monkey-GI	<i>B. adolescentis</i>
14	<i>B. catenulatum</i>	1974	Human-GI	<i>B. adolescentis</i>
15	<i>B. choerinum</i>	1979	Swine-GI	<i>B. pseudolongum</i>
16	<i>B. coryneforme</i>	1982	Bee-GI	<i>B. asteroides</i>
17	<i>B. cuniculi</i>	1979	Rodent-GI	<i>B. cuniculi</i>

Tableau 3 (suite)

18	<i>B. dentium</i>	1974	Human-dental	<i>B. adolescentis</i>
19	<i>B. gallicum</i>	1990	Human-GI	<i>B. pseudolongum</i>
20	<i>B. gallinarum</i>	1983	Poultry-GI	<i>B. pullorum</i>
21	<i>B. indicum</i>	1969	Bee-GI	<i>Ki<B. asteroides</i>
22	<i>B. kashiwanohense</i>	2011	Human-GI	<i>B. adolescentis</i>
23	<i>B. longum ssp. Infantis</i>	2008	Human-GI	<i>B. longum</i>
24	<i>B. longum ssp. Longum</i>	1963	Human-GI	<i>B. longum</i>
25	<i>B. longum ssp. suis</i>	2008	Swine-GI	<i>B. longum</i>
26	<i>B. magnum</i>	1974	Rodent-GI	ss
27	<i>B. merycicum</i>	1991	Bovine-GI	<i>B. adolescentis</i>
28	<i>B. minimum</i>	1982	Sewage	ss
29	<i>B. mongoliense</i>	2009	Dairy products	ss
30	<i>B. pseudocatenulatum</i>	1979	Human-GI	<i>B. adolescentis</i>
31	<i>B. pseudolongum ssp. Globosum</i>	1992	Bovine-GI	<i>B. pseudolongum</i>
32	<i>B. pseudolongum ssp. pseudolongum</i>	1992	Swine-GI	<i>B. pseudolongum</i>
33	<i>B. psychraerophilum</i>	2004	Swine-GI	<i>B. cuniculi</i>
34	<i>B. pullorum</i>	1974	Poultry-GI	<i>B. pullorum</i>
35	<i>B. reuteri</i>	2012	Monkey-GI	ss
36	<i>B. ruminantium</i>	1991	Bovine-GI	<i>B. adolescentis</i>
37	<i>B. saeculare</i>	1992	Rodent-GI	<i>B. pullorum</i>
38	<i>B. saguini</i>	2012	Monkey-GI	Ss

39	<i>B. scardovii</i>	2002	Human-blood	<i>B. scardovii</i>
40	<i>B. stellenboschense</i>	2012	Monkey-GI	<i>B. scardovii</i>
41	<i>B. stercoris</i>	2010	Human-GI	<i>B. adolescentis</i>
42	<i>B. subtile</i>	1982	Sewage	ss
43	<i>B. thermacidophilum</i> <i>ssp. Porcinum</i>	2003	Swine-GI	<i>B. boum</i>
44	<i>B. thermacidophilum</i> <i>ssp.thermacidophilum</i>	2003	Sewage	<i>B. boum</i>
45	<i>B. thermophilum</i>	1969	Swine-GI	<i>B. boum</i>
46	<i>B. tsurumiense</i>	2008	Rodent-dental	ss

3.4 Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bifidobactéries:

3.4.1 Morphologie:

Les bifidobactéries sont des bactéries non mobiles et non-sporulantes. sont Gram-positif. Elles sont souvent retrouvées sous forme de Y ou V.

Leurs extrémités sont effilées, bifurqués ou spatulées elles peuvent se présenter aussi sous forme de cocoides ou sous formes de petites bacilles réguliers (**Rasic et Kurmann, 1983 ; Scardovi, 1986 ; Gavini et al .,1990**).Les cellules de certaines espèces peuvent présenter des structures semblables à des membranes enroulées en hélice ou en cercle se répartissant dans le cytoplasme et qui peuvent être colorés au bleu de méthylène.Les colonies des bifidobactéries sont d'apparence très variable, selon les souches ellesforment des colonies lissent, muqueuses de contours réguliers. (**Scardovi, 1986**).

3.4.2 Physiologies des bifidobacteries :

3.4.2.1 Température:

Les espèces de bifidobactéries d'origine humaine montre une croissance à une température varie entre 36° et 38°C par contre les espèces d'origine animales peuvent se croître a des température plus élevée qui varie entre 41° et 43°C (**Scardovi, 1986 ; Martin et**

chou, 1992).

L'espèce *B. thermacidophilum* pousse a une température plus élevée égale 49.5°C

(Dong et al., 2000).Au dessous de 20°C la croissance des bifidobactéries n'est plus détectable avec l'exception de *B.psychroaerophilum* qui a une faible croissance a 8°C (Simpson et al., 2003).

3.4.2.6 L'Oxygène:

Les bifidobactéries sont des microorganismes anaérobies strictes (Scardovi 1984), mais la sensibilité à l'oxygène varie entre les espèces (De Vries et Stouthamer 1967).Les espèces qui tolèrent l'oxygène (ex : *B. lactis*, *B. aerophilum* et *B. psychroaerophilum*) présentent une faible activité catalytique qui élimine les traces du super oxyde d'hydrogène formées (H₂O₂) ou par le fait que le NADH oxydase de ces souches ne forme pas de H₂O₂, alors l'accumulation d'H₂O₂ inhibe l'activité du Fructose 6 Phosphate Phospho Kétolase.

Pour les souches extrêmement sensibles à l'oxygène, n'accumulent pas l'H₂O₂ et l'oxygène bloque la multiplication bactérienne par l'intermédiaire d'un potentiel d'oxydoréduction trop élevé (Scardovi, 1986 ; Romond et al., 1992 ; Shimamura et al., 1992, Ventura et al., 2004).

3.4.2.7 Le pH :

Les bifidobactéries sont considérées comme des microorganismes acidophiles, mais elles ne supportent pas les pH trop bas > 4 et les pH basiques < 9 (Biaviti et al., 1992). A l'exception l'espèce *B.animalis supp lactis* résiste à un pH =3.7 (Meile et al., 1997).

La production maximale d'acide lactique et acétique chez les bifidobactéries exige un pH optimal initial proche de la neutralité qui varie entre 6-7 (Collins et Hall,1984 ;Scardovi, 1986).

3.4.2.8 La sensibilité aux antibiotiques:

Les bifidobacteries sont généralement sensible aux antibiotiques du spectre Gram positif(macrolides, bacitracine, erythromcine, lincomicine, novobicine et vancomicine) aussi aux beta-lactamine(penicilline, ampicicilline, amoxicilline, piperacilline et ticarcilline)

(Zhou et al., 2005 ; Masco et al., 2006 ; Ammor et al., 2007).

La sensibilité des bifidobacteries au tetracycline est variables selon les espèces (

Delagdo et al.,2005; Masco et al., 2006 ; Ammor et al., 2007).

Beaucoup d'espèces des bifidobactrie sont résistante aux antibiotiques du spectre Gram négatif (acide fusidique, acide nalidixique et polymixine) et les aminoglycosides (neomycine, gentamicine, kanamicine et streptomycine) (**Delagdo et al.,2005; Moubarek et al., 2005 ; Zhou et al., 2005 ; Masco et al., 2006 ; Ammor et al., 2007).**

3.4.2.9 Les besoins nutritionnels des bifidobacteries:

En générale les bifidobactéries sont capables d'utiliser les sels d'ammonium comme seul source d'azote par contre d'autres espèces comme *B.magnum*, *B. cuniculi* et *B. choerinum* exigent la présence d'azote organique (**Hassinen et al.,1951**).

L'activité des enzymes comme le glutamate dehydrogénase et le glutamine synthétase permet l'assimilation d'ammonium. Ces deux enzymes sont isolés et caractérisé a partir de *B.breve* , *B. pseudolongum* et *B.bifidum* (**Ballongue, 1993**).

Aussi la croissance des bifidobactéries est stimulées par la présence d'ions, vitamines et par d'autres facteurs qui sont métabolisés par l'hôte ou par les microorganismes du tractus gastro-intestinale comme la thréonine, extrait de levure, cystéine, dextrine, maltose et β -glycerophosphate et les facteurs bifidogènes qui sont des substances qui se trouve dans le laits maternel ces facteurs incluent N- acetyl glycosamine, fructooligosaccharides, lactoferine, lactulose, lactitol, oligoholosides et les polyholosides (**Modler et al.,1994**).

3.4.3 Biochimie des bifidobacteries :

3.4.3.5 Le Métabolisme :

La majorité des bifidobactéries utilisent le lactose, le glucose, le galactose, le sucrose et le fructose comme sources de carbone **figure (8)**. L'ammoniac est la seule source d'azote utilisée par la majorité des espèces de bifidobactéries Contrairement aux autres bactéries lactiques qui dégradent le glucose via le système glycolytique ou encore par la voie des hexoses monophosphates, les bifidobactéries dégradent le glucose par la voie du fctose-6-phosphate. La dégradation du glucose par cette voie est rendue possible grâce à l'enzyme fructose-6-phosphate phosphokétolase, qui est particulière aux bifidobactéries et qui scindele

fructose-6-phosphate en acétylphosphate et en érythrose-4-phosphate (**Rasic et Kurmann, 1983**).

Une étude faite sur 22 souches de bifidobactéries d'origine humaine a démontré que

toutes les souches testées possédaient les activités α et β galactosidases et une activité α -glucosidase (Desjardins et al., 1990).

La voie métabolique du fructose-6-phosphate phosphocétolase produit de l'acide lactique et de l'acide acétique comme métabolites primaires en proportion de 2/ 3 **figure (9)** (Scardovi et Trovatelli ., 1965 ; DeVries et al., 1967) et par cette même voie métabolique il y' a la production des acides aminés à partir de cette voie bifide F6PPK (Daniel et al.,2010) comme nous le démontre **la figure(10)**.

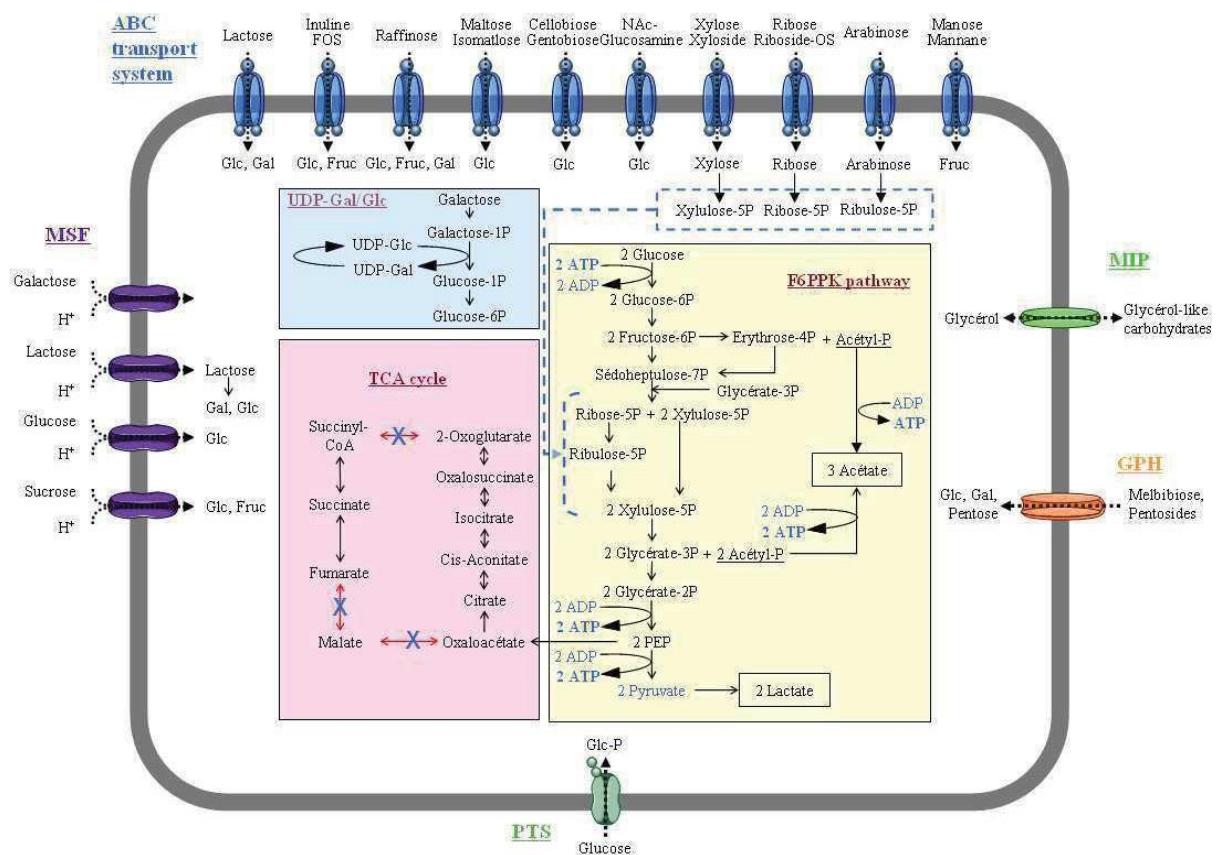


Figure 8 : Métabolisme général des bifidobactéries Lee et O’Sullivan ,2010

Toutefois, certaines souches de bifidobactéries vont produire plus d'acide acétique et moins d'acide lactique. Le surplus d'acide acétique formé provient d'une autre voie métabolique des bifidobactéries qui convertit le pyruvate en acide formique et en acétate plutôt qu'en acide lactique. Par la suite, une partie de l'acide acétique est transformé en éthanol (De Vries et Stouthamer, 1968; Lauer et Kandler,1976).

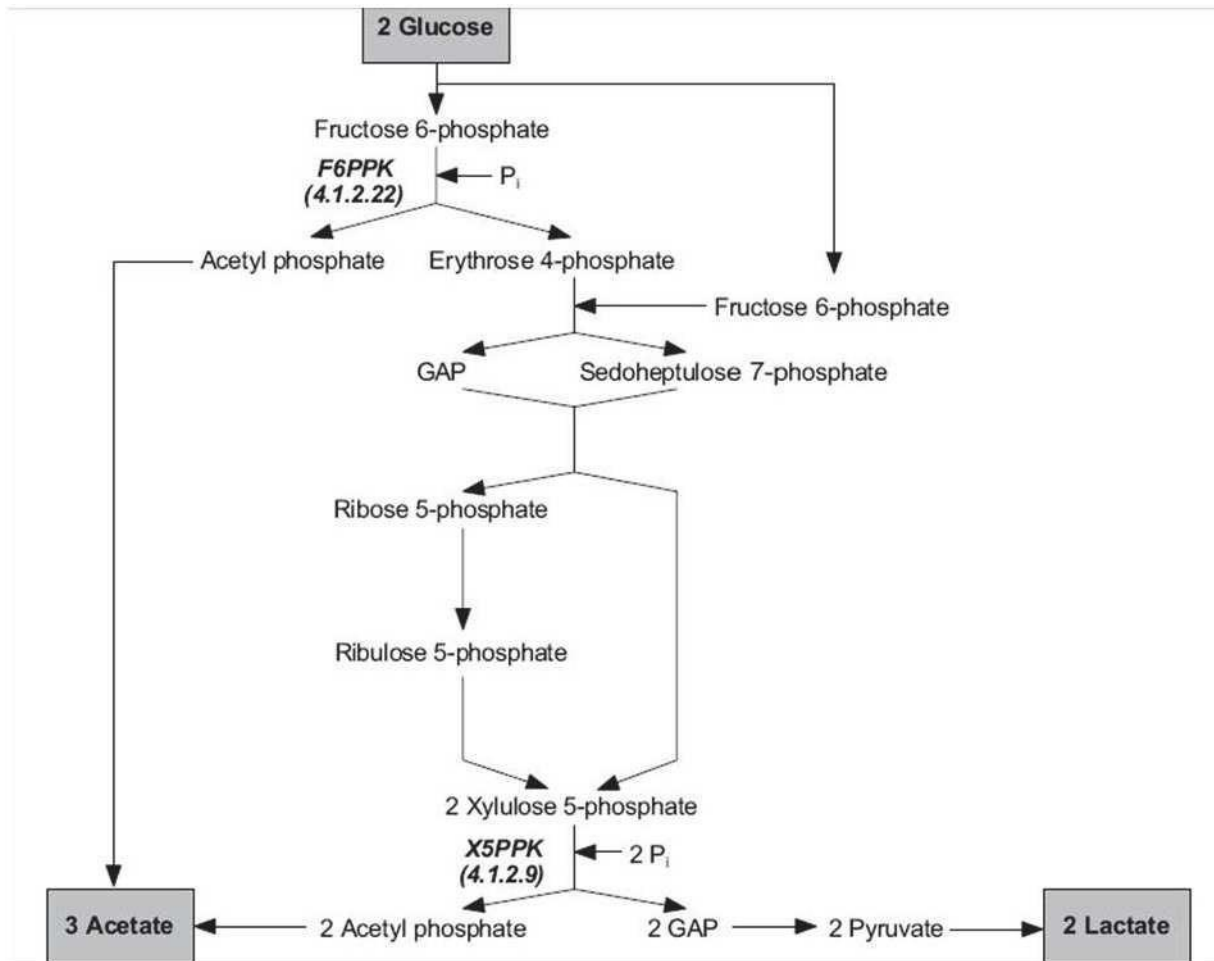


Figure 9 : La voie du fructose 6-phosphate des bifidobactéries (Scardovi et Trovatelli, 1965 ; De Vries et al., 1967).

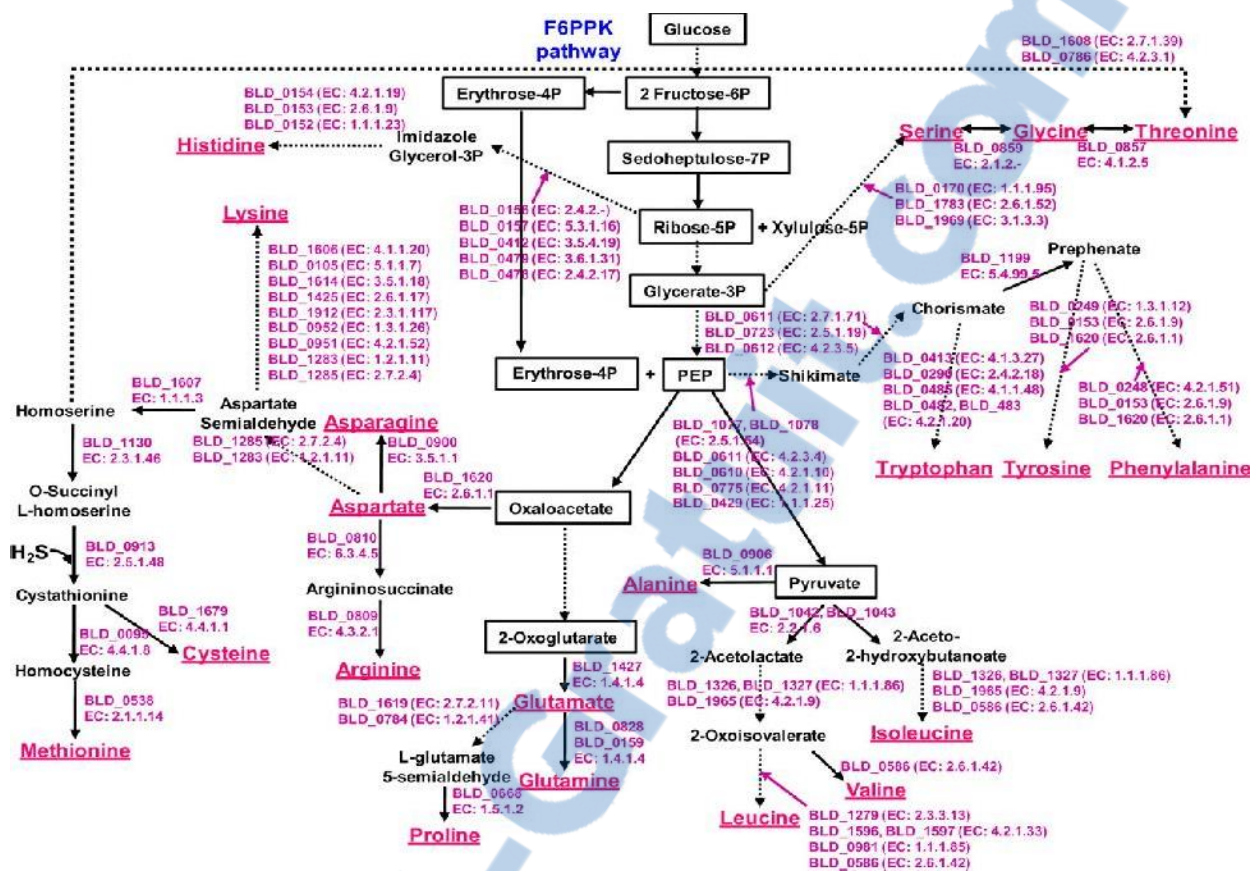


Figure 10: schéma de la production des acides aminés à partir de la voie bifide F6PPK (Daniel et al., 2010).

3.4.3.6 Métabolisme des vitamines:

Les bifidobactéries sont capables de produire des vitamines tels que thiamine (Vit B1), l'acide folique (Vit B9) et l'acide nicotinique (Vit B3) (Tamura 1983 ; Deguchi et al., 1985). Les espèces *B.breve* et *B.infantis* excrete un taux trop élevé de l'acide nicotinique et le biotine, de même *B.bifidum* et *B.infantis* possèdent une bonne production des vitamines B1 et B9 (Tamura, 1983).

3.4.3.7 Production des substances antimicrobiennes:

Malgré la grande utilisation des bifidobactérie dans la production des aliments fonctionnels les études sur son pouvoir antimicrobien est un peu restreint (Ventura et al., 2004).

Chartensis et al., 1998 ont testé la sensibilité de 16 souche de bifidobactéries aux

antibiotique la plupart montraient une résistance aux cefoxitine, aztreoname, kanamycine, amikacine, gentamicine, acide fusidique, polymyxine B et une sensibilité aux penicilline, chloramphenicol, erythromycin, bacitracine et rifampicine.

L'activité antimicrobienne du genre *Bifidobacterium* a été détectée en premier lieu par **tissier (1900)**, il a pu dériver plusieurs types des effets antagonistes de *B.bifidum* contre *E.coli*.

Récemment d'autres études décrivent l'activité antagoniste ou l'activité antimicrobienne spécifique des bifidobactéries liées à la production des acides lactique et acétique ou à la production des bactériocines (**Gibson et Wang 1994 ; Yildirim et Johnson 1998 ; Yildirim et al., 1999 ; Abd El-Salam et al., 2004 ; Bevilacqua et al., 2003 ; Cheikhyoussef et al., 2007 ; Cheikhyoussef et al., 2008**).

3.4.3.8 Les bifidobactéries en tant qu'agents aromatisants :

Certaines études ont mis en évidence le rôle des bifidobactéries en tant qu'agents aromatisants. Dès 1968, l'équipe de **Schuler-Malyoth et al.**, avait déterminé que les produits laitiers contenant des bifidobactéries avaient un goût et un arôme typiques qui étaient distincts des saveurs habituellement produites par les bactéries lactiques .

Depuis cette étude, grâce aux développements des technologies permettant d'identifier et de quantifier les composés volatils, certaines études ont été faites afin de déterminer quels composés aromatiques, résultant du métabolisme des bifidobactéries, étaient responsables du goût particulier des produits faits avec celles-ci. (**Lamoureux, 2000**).

Ainsi, **Yuguchi et al., (1989)**, ont évalué la capacité, de cinq souches de *Bifidobacterium*, de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ou de *Streptococcus thermophilus*, en monoculture ou en culture mixte, à produire des composés volatils. Il a été constaté que les espèces *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum* et *B. breve* produisaient de petites quantités de composés aromatiques tels l'acétaldéhyde, le diacétyle, le 2-butanone et le sulfure de diméthyle.

3.5 Les caractéristiques des principales espèces utilisées dans les aliments.

3.5.1 *Bifidobacterium longum*:

C'est une espèce dominante de la flore intestinale du nourrisson, elle a été isolée aussi chez les animaux (rats, cochon, et veaux). Les cellules de cette espèce sont très allongées,

minces, formes irrégulières et leur Gram est variable (**Ballongue, 1993**). Les souches étudiées présentent des taux d'homologie de 50-76% (**Scardovi, 1986**). La nomenclature de

Bifidobacterium longum a été proposée en 1963. Cette espèce fermente les pentoses, sa température de croissance maximale est de 35 °C à 45°C (**Buchanan et al., 1974**).

3.5.2 *Bifidobacterium bifidum*:

Ils'agit de l'espèce type du genre, découvert par (**Tissier, 1900**) dans les selles de bébés allaités au sein. Les bactéries en forme de bâtonnets ont des apparences très variables (0,5 à 0,7µm ×2 à 5µm), la présence de CO₂ est indispensable à la croissance, leur température de croissance minimale est de 25°C 32°C et pas de croissance en dessous de 20°C et au delà de 45°C, le pH optimum est de 6-7. Leur taux d'homologie est inférieur à 30% avec les autres espèces.

3.5.3 *Bifidobacterium breve* :

Les cellules bactériennes ont une forme courte, fine ou épaisse en bâtonnets associés. Leur température de croissance est de 35 °C à 37°C et pas de croissance à 46.5. Elle est rencontrée chez le nourrisson allaité exclusivement au sein. Les souches présentent des taux d'homologie de 40-60 % (**Gavini et al ., 1990**).

3.5.4 *Bifidobacterium infantis*:

Elle prédomine les bifidobactéries retrouvées dans les selles de bébés allaités au sein, sa morphologie cellulaire ne présente pas de traits spécifiques au genre. C'est une espèce qui se rapproche de l'espèce *Bifidobacterium longum* avec un taux d'homologie de 50-70%.Il produit l'uréase et synthétise la thiamine, l'acide nicotinique et l'acide folique.

3.5.5 *Bifidobacterium lactis*:

Elle peut être isolée à partir des selles de l'homme (nouveau-né et adulte), du lapin et du poulet et elle est retrouvée dans les eaux usées. Se sont des bacilles Gram positive, de forme très irrégulière et présentent souvent des branchements ou des extrémités bifides. Elle se caractérise par une température optimale entre 39 et 42°C , par une tolérance d'une faible tension d'oxygène et par sa croissance dans le lait et les milieux à base de lait et par la production d'acide lactique, d'acide acétique et surtout d'acide formique et leur survie à pH 3,5 (**Matsumoto et al., 2004**). Les souches présentent un taux d'homologie de 61% (**Masco et al., 2004**).

Tableau 4: profile fermentaire des différentes espèces de *Bifidobactérium* (Scardovi, 1986).

<i>Sucres espèces</i>	Xyl	Man	Fru c	Gal	Sucr	Treh	Mlb	Matol	Inul	Sali
<i>B bifidum</i>	-	-	+	D	-	-	D	-	-	-
<i>B. longum</i>	D	D	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. longum Biotype Infantis</i>		D	+	+	+	-	+	-	D	-
<i>B. breve</i>	D	+	+	+	+	D	+	D	D	+
<i>B.adolescentis</i>	-	D	+	+	+	D	+	D	D	+
<i>B. angulatum</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>B. catenulatum</i>	+	-	+	+	+	D	+	D	D	+
<i>B. Pseudocatenulatum</i>	+	+	+	+	+	D	+	-	-	+
<i>B. Dentium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>B. pseudolongum subsp. Globosum</i>	D	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. pseudolongum subsp. Pseudolongum</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. cuniculli</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. choerinum</i>	D	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. Animalis</i>	+	D	+	+	+	D	+	-	-	+
<i>B. Thermophilum</i>	+	-	+	+	+	D	+	-	D	D
<i>B. boum</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>B. magnum</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. pullorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>B. longum Biotype suis</i>	+	D	D	+	+	-	+	-	-	-

<i>B. minimum</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>B. subtile</i>	-	-	+	+	+	D	+	-	D	D
<i>B. coryneforme</i>	+	+	+	+	+	-	+	-		+
<i>B. asteroides</i>	+	-	+	+	D	-	+	-	-	+
<i>B. indicum</i>	-	D	+	+	D	-	+	-	-	+

Xyl : Xylose, Man : Mannitol, Fruc : Fructose, Gal : Galactose, Sucr: Sucrose, Treh: Trehalose , Mlb: Melobiose , Malt: Maltose, Inul: Inulin, Sali:Salicin.

3.5.6 *B. Adolescentis* :

Ce sont des bâtonnets, courts, incurvés, anaérobies et ont des apparences variables; leur isolement se fait à partir de caries dentaires, du vagin humain et des selles de nourrissons (Scardovi., 1986). La croissance optimale est obtenue à la température optimale de 35°C à 37°C; la croissance est inhibée à 20°C et 46.5 °C (Bouchaman, et al., 1974). La présence de l'acide et CO₂ stimule l'utilisation de la voie oxydative des hexoses mono phosphates qui fermentent le gluconate.

3.5.7 *B. Pseudo Longum* :

Ce sont des cellules bactériennes qui ont des formes coccoïde ou incurvées courtes souvent associées en deux et rarement en chaînes par fois isolées. Elles exigent pour leur croissance un pH optimale de 6.5 et 7; leur croissance est lente à pH: 6 et inhibée à pH: 8 (Buccheri, et al., 1979). Elles ont été isolées à partir de selles de souris, de poulets, de bovins et d'ovins.

3.5.8 *B. Thermophilum* :

Leur association se fait en paires avec des jonctions entre deux cellules présentant un aspect irrégulier; pas de fermentation de ribose ni de xylose (Bensoltane, et al., 1997). Leur température de croissance optimale est de 46°C avec un pH optimal de croissance de 6.5 à 7. Elles sont isolées à partir de selles de porc, de poulet et de rognons des bovins.

3.5.9 *B. Suis*:

Cette espèce a des cellules en forme de bâtonnets fins et font jusqu'à 6 µm de long avec

des colonies lisses, blanches. Elles sont anaérobies et circulaires. Elles poussent dans des conditions optimums de température minimale de 20°C et la température maximale de 44°C, pas de croissance à 60°C (Bouchaman, et al.,1974).

3.5 L'utilisation des bifidobactéries dans les produits laitiers:

Bien que les bifidobactéries fassent déjà partie de la flore intestinale indigène chez l'humain, un apport quotidien de bifidobactéries peut être nécessaire pour stimuler ou compléter la population déjà existante. L'ingestion de bifidobactéries permet aussi de remplacer la flore qui est détruite par des infections ou encore par la prise d'antibiotiques (Piquet et al., 2007).

L'incorporation des bifidobactéries s'est faite pour la première fois par Mayer, en 1948 en Allemagne. *Bifidobacterim bifidum* a été incorporé à de la nourriture pour bébé qui était prescrite à des enfants ayant des carences nutritionnelles. Par la suite, en 1968, l'équipe de Schuler-Malyoth a démontré que les bifidobactéries pouvaient être cultivées dans les produits laitiers (Rasic et Kurman, 1983). Quelques produits laitiers commercialisés contiennent de *Bifidobacterium* spp dans différent pays (Lourens-Hattingh et Viljoen 2001) sont cités dans le tableau (5) ci desous.

Tableau 5 : Quelques produit laitiers commercialisés contiennent de *Bifidobacterium* spp dans différent pays (Lourens-Hattingh et Viljoen 2001)

Produit	Pays	Culture
Acidophilus bifidus yogurt	Allemagne	A + B + yaourt culture
LC 1	Australie	<i>L. acidophilus</i> +C +B+ yogurt culture
Bifidus yaourt	Plusieurs pays	<i>B. longum</i> + yogurt culture
Bifihurt	Allemagne	<i>B. bifidum</i> or <i>B. longum</i> + yogurt culture
Biobest	Allemagne	<i>B. longum</i> + <i>S. Thermophilus</i>
Yoplus	Australie	<i>B. bifidum</i> or <i>B. longum</i> + yogurt culture
Bioghurt	Allemagne	A + B + C + yogurt culture

Philus	Suède	A + B + <i>S. Thermophilus</i>
BA live	Grande Bretagne	A + B + yogurt culture
Vaalia	Australie	<i>Lactobacillus</i> +B+ yogurt culture
Kyr Italy	Italie	A + B + yogurt culture
Ofilus	France	A + B + <i>S. Thermophilus</i>
Biodynamic yogurt	Australie	A + B + C + yogurt culture
BIO	France	A + B + yogurt culture
Biogarde	Allemagne	A + B + <i>S. Thermophilus</i>
Mil-Mil	Japon	A + B + yogurt culture
Cultura	Danemark	A + B + yogurt culture
AKTIFIT plus	Suisse	A + B + <i>L. casei</i> + <i>S. Thermophilus</i>
Ski-Divine	Australie	A + B + yogurt culture
ZabAby	Egypte	<i>B. bifidum</i> + yogurt culture

A = *L. acidophilus*; B = *Bifidobacterium spp.*; C = *L. casei*.

Aujourd'hui, plus de 100 types de produits contenant des bifidobactéries sont retrouvés sur le marché à travers le monde mais plus particulièrement au Japon et en Europe (**Hugues et Hoover, 1991 ; Fuller, 1992 ; Tharmaraj, 2003**).

3.5.1 La viabilité des bifidobactéries dans les produits laitiers :

Pour que l'apport de bifidobactéries soit efficace, certaines conditions doivent être observées. En premier lieu, la consommation de produits contenant des bifidobactéries doit se faire sur une base régulière et ceux-ci doivent contenir un minimum de 10^6 UFC/g de produit au moment de la consommation. Les espèces de bifidobactéries utilisées doivent survivre au passage de la barrière gastrique (**Tamime et al., 1995**).

De plus, la survie des bifidobactéries dans les produits laitiers doit être assurée jusqu'à la consommation du produit par le consommateur. Ainsi, la viabilité des bifidobactéries dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels on retrouve le degré d'acidification, l'espèce utilisée, les conditions de fermentations, la température d'entreposage, la post-acidification et les méthodes de conservation (**Kneifel et al., 1993**).

Actuellement, les bifidobactéries sont incorporées aux produits laitiers de deux façons. Les bifidobactéries peuvent être ajoutées aux produits laitiers déjà fermentés ou encore elles peuvent être ajoutées aux bactéries lactiques lors de l'ensemencement (**Roy, 2005**).

Lorsqu'elles sont ajoutées au moment de la fabrication du produit, les bifidobactéries sont utilisées en monoculture ou encore en culture mixte avec des bactéries lactiques (**Patel et al., 1991**).

Les espèces de bifidobactéries les plus utilisées dans le domaine laitier sont *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. animalis*, *B. lactis* et *B. infantis* (**Roy, 2005**).

3.7. Propriétés génotypiques:

3.7.1 La composition en bases cytosine-guanine de l'ADN

Les bifidobactéries sont phylogénétiquement distinctes des autres bactéries lactiques avec un contenu en G+C généralement élevé qui varie de 42 % à 67 % (**Benkaddour, 2013**). Ce taux est en général supérieur à 55% par rapport aux bases A+T. **Miyake et al** ont classé les bifidobactéries en deux groupes : Les « G+C pauvre » (45-55%) et les « G+C riches » (55-67%) tandis que **Jian et al 2001** ont les a classer en 3 groupes : les « G+C riches » (55-67%), les « G+C pauvres » (45%) et les bifidobactéries ayant un % G+C intermédiaire (55%) (**Heddadji, 2007**).

3.7.2 Les plasmides

Les plasmides ne sont pas ubiquitaires chez les bifidobactéries et lorsque ils sont présents soient de petite taille (1000 à 1500pb), leur présence chez une espèce donnée est plutôt considérée comme facteur de caractérisation que d'identification de cette espèce (**Mattarelli et Biavati, 2014**). Dans l'étude de **Sgorbati et al., 1982**, vingt pour cent des souches de bifidobactéries contenaient un ou plusieurs plasmides. *B. longum* est la seule espèce d'origine humaine dont 70% des souches sont porteuse d'ADN extrachromosomique. De manière étonnante, *B. infantis*, souvent présent avec *B. longum* dans les prélèvements, ne

présente pas de plasmides (**Kouame, 2013**).

A présent, les plasmides sont détectés chez cinq espèces de *Bifidobacterium* : *B. longum*, *B. breve*, *B. globosum*, *B. asteroides* et *B. indicum* (**Lee et O'Sullivan, 2006**).

- *B. longum* (espèce du genre *Bifidobacterium* la plus fréquente dans l'intestin humain) renferme treize modèles plasmidiques (1,25 à 9,5 MDa).

- *B. globosum* (bifidobactérie d'origine animale la plus courante) contient un plasmide de chacune des trois classes de poids moléculaires (13,5-24,5 et 46MDa).

- *B. asterofdes* (exclusivement trouvé dans l'intestin d'abeille) possède quatorze types de plasmides (1,2 à 22 MDa) structurellement très hétérogènes.

- *B. indicum* (provenant également uniquement d'intestin d'abeille) : 60% des souches isolées contiennent un plasmide unique de 22MDa.

- *B. breve* (espèce fréquente dans l'intestin d'enfant) : C'est dans le but d'utiliser cette souche pour des recherches en génie génétique que **Iwata et Morishita (1989)** se sont intéressés à *B. breve* et y ont mis en évidence des plasmides dans 40 % des souches de cette espèce. Cependant, **Sgorbati et al** n'avaient pas trouvé de plasmide chez *B. breve*. L'équipe d'IWATA expliquerait cette différence par l'origine écologique des souches testées, les siennes provenant bien d'intestins humains (**Baratte-Euloge, 1992**).

3.7.3 Les séquences d'ADN étudiées

L'étude de la séquence de l'ADN est un bon moyen pour pouvoir identifier une espèce bactérienne, mais aussi pour pouvoir étudier le lien de parenté entre des souches appartenant à une même espèce (**Hedaddji, 2007**) :

Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S : Le gène codant pour l'ARNr 16S a été séquencé pour presque toutes les espèces et sous espèces de bifidobactéries. Ce gène est très bien conservé, jusqu'à 99% dans le genre *Bifidobacterium* (**Delcenserie et al., 2002**).

En tenant compte de leur différentes niches écologiques en combinant ces informations avec les analyses comparatives des séquences de leur ADN 16S, ainsi que le séquençage de gènes de ménages (*clpC*), (*dnaJ*), (*xfp*), (*dnaB*), (*rpoC*) et (*purF*), les différentes espèces de *Bifidobacterium* peuvent être regroupées en six groupes : *B. adolescentis*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. longum*, *B. pullorum*, et *B. pseudolongum* (**Turroni et al., 2011**).

Le gène codant pour la protéine Hsp60:

La séquence partielle du gène codant pour la protéine de choc thermique de 60kDa (*hsp60*) de 30 espèces de bifidobactéries ainsi que de *Gardnerella vaginalis* a été déterminée afin d'étudier la taxonomie du genre. Il a été établi que la similitude de séquence est de 99,4 à 100% dans la même espèce, 96% en cas de sous-espèces et 73-96% (85% en moyenne) entre les différentes espèces. La similitude entre la séquence du gène *hsp60* de *G. vaginalis* et les séquences de *Bifidobacterium* est de l'ordre de 75%. Cette classification semble être meilleure que la classification par le 16SrDNA car le dendrogramme obtenu est mieux corrélé avec le contenu en G+C. Avec le classement phylogénique basé sur *hsp60*, toutes les bactéries « G+C riches » (55-67%, la plupart des espèces du genre *Bifidobacterium*) sont dans un même cluster tandis que les bactéries « G+C pauvres » (45%, *B. inopinatum*) se retrouvent dans un autre cluster avec *Gardnerella vaginalis*. Un troisième groupe est formé par des bifidobactéries ayant un « G+C moyen » (55%, *B. denticolens*) (**Kouame, 2013**).

L'espace intergénique 16S-23S:

Les gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16S et 23S forment un opéron présent en plusieurs copies. Autant la séquence du 16SrDNA est un bon moyen d'identification du genre *Bifidobacterium*, autant la séquence nucléotidique située dans l'espace intergénique 16SrDNA-23SrDNA est un bon moyen d'établissement des relations intraspécifiques. En effet, chaque souche est caractérisée par sa séquence ITS « *Internally Transcribed Spacer* » (**Delcenserie et al., 2002**).

Ainsi, ces séquences sont de bons outils pour l'identification des souches. Le taux maximum de divergence entre les souches appartenant à la même espèce est de 13% (**Leblond-Bourget et al., 1996**).

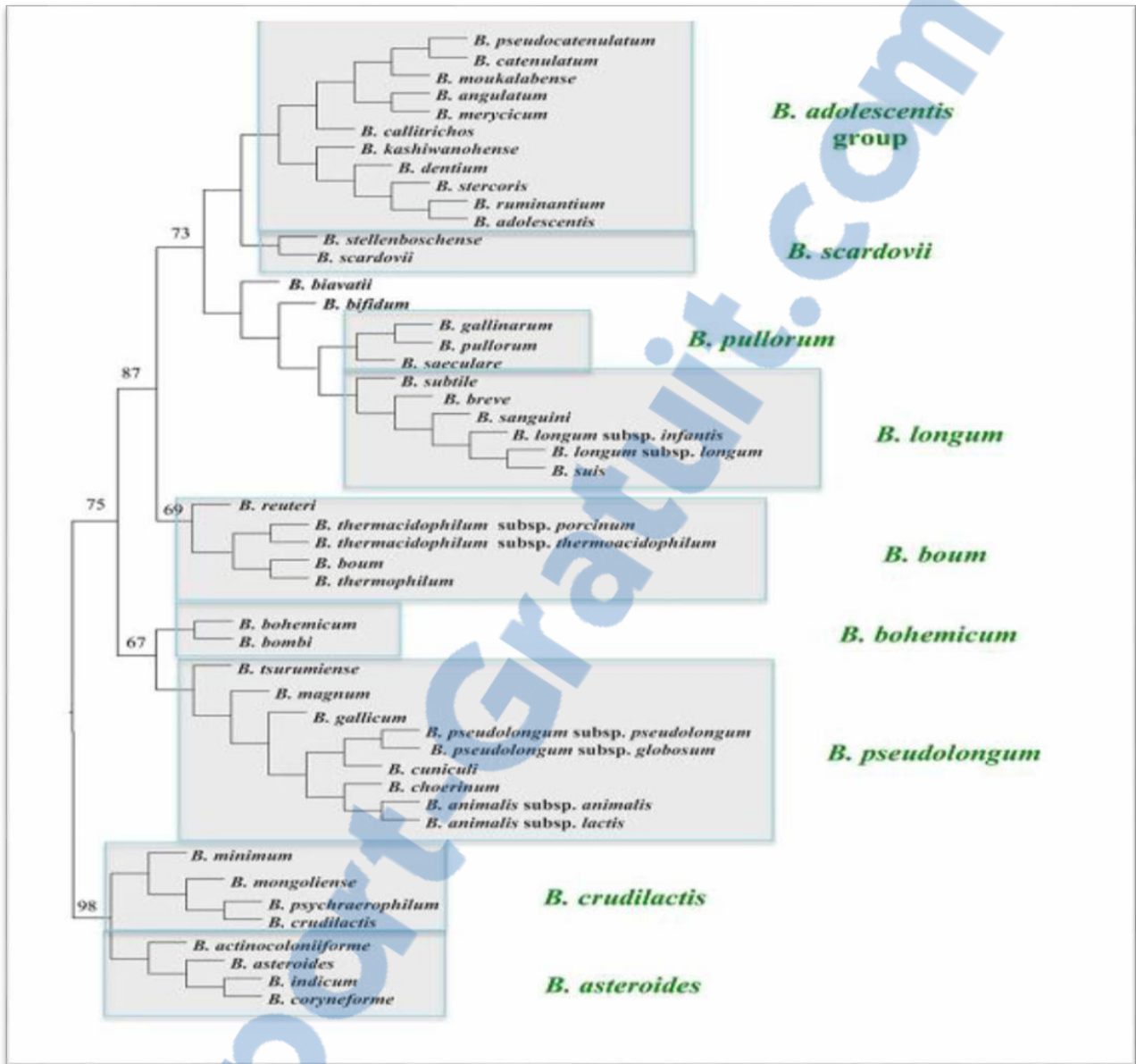


Figure 11: Arbre phylogénétique des bifidobactéries obtenue par l'analyse du gène codant pour L'ARN ribosomal 16S (Bottacini et al., 2014).

Chapitre II:

Matériel et méthodes

1 Provenance des échantillons

Les prélèvements ont été effectués de 5 types d'échantillons;

- 10 échantillons des selles de nourrisson âgé d'une semaine à 3 mois, (né par voie basse, sans traitement d'antibiotiques, allaité exclusivement au sein)
- 1 échantillon de lait maternel commercialisé
- 10 échantillons de yaourt contenant des bifidus (Activia)
- 3 échantillons d'intestin des abeilles provenant de la wilaya d'Oran et de Ghardaïa
- 6 échantillons d'eau de mer : 2 échantillons de la wilaya d'Oran (Bouseville) , 2 échantillons de Mostaganem (El Mactaa) et 2 échantillons de la wilaya de Ain Temouchent (Chat El Hillal)

2 Milieux de Cultures

L'isolement des bifidobactéries constitue l'étape la plus critique puisqu'il nécessite des conditions assez spécifiques, qui mettent en jeu des systèmes d'anaérobiose comme les anaérocults ou les gas-packs et des milieux très riches additionnés d'un agent réducteur tel que la cystéine-chlorhydrique (**Scardovi, 1986**).

- L'isolement des bifidobactéries s'est fait sur le milieu sélectif (milieu MRS additionné de 0.05% cystéine chlorhydrique et de 2 mg/l d'acide nalidixique)

3 Isolement et purification des bifidobactéries

L'isolement des bifidobactéries à partir des échantillons a été réalisé sur le milieu de culture cités au-dessus. A partir des selles un gramme a été suspendu dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique cystéinée (voir annexe). Chaque suspension a été homogénéisée pendant 2 à 3 minutes, puis des dilutions décimales sont réalisées de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-11} , à l'aide d'une micropipette, mettre dans chaque boîte 1ml.

Couler aseptiquement dans chaque boîte de Pétri la gélose fondue et maintenue à $45 \pm 1^\circ\text{C}$; homogénéiser soigneusement l'inoculum avec le milieu en effectuant des formes de 8.

Après solidification de milieu, les boîtes de Pétri sont incubées en anaérobiose pendant 5 jours à 37°C . Les boîtes qui ont des colonies bien distinctes et isolées sont récupérées.

Pour l'isolement à partir du yaourt et du lait maternisé commercialisé on a suivi le même protocole que pour les selles de nourrisson.

L'isolement à partir des abeilles s'est fait en séparant la partie abdominale et on l'a broyé en utilisant une pince et pipette pasteur et après quoi la dissoudre dans l'eau physiologique.



Figure 12: Broyage des abeilles.

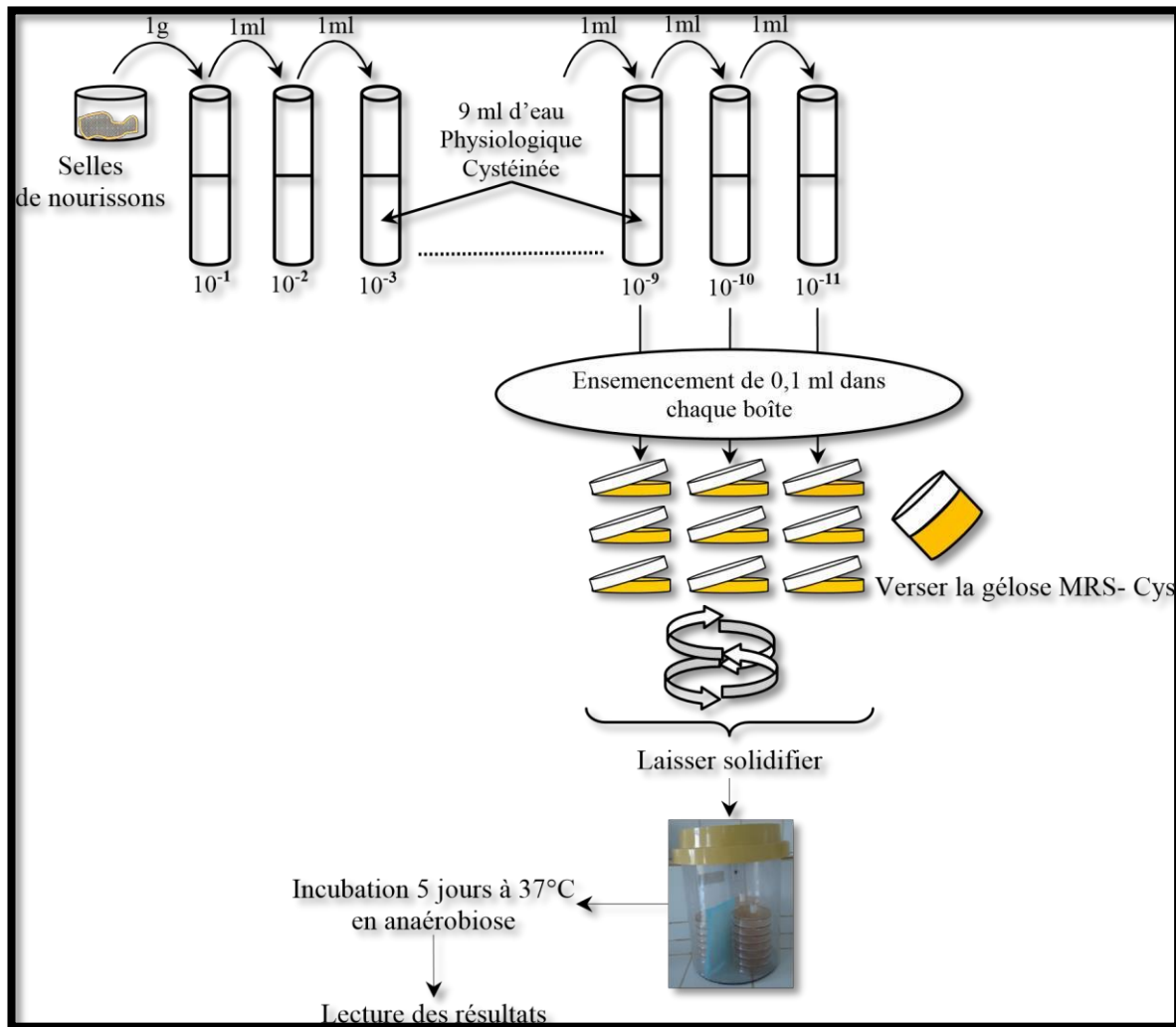


Figure 13: La technique suivie pour l'isolement des bifidobactéries.

3.1 Purification des souches

A partir des colonies obtenues, des purifications sont faites sur milieu MRS-Cys solide/solide ; solide /liquide par repiquage successif. L'opération est renouvelée en prenant chaque fois des colonies aléatoire identiques bien distinctes dans un milieu sélectif cité au-dessus. Ceci conduit à obtenir une culture dont la pureté est estimée par l'observation microscopique après coloration de Gram.

3.2 Pré-identification des bifidobactéries

Après la purification par repiquage successif dans le milieu adéquat, à partir des boites contenant des colonies bactériennes, les tests suivants ont été effectués

3.2.1 Étude macroscopique

Cette étude consiste à noter l'aspect macroscopique des colonies bactériennes

(contour, couleur, viscosité...).

3.2.2 Étude microscopique

Coloration de Gram (Larpen et Larpen, 1990)

Sur les frottis fixés, on ajoute quelques gouttes de violet de gentiane qu'on laisse agir 1 minute. Le colorant est jeté, et la préparation est recouverte du lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant 30 secondes puis rincer avec l'eau distillée. Ensuite, la préparation est décolorée à l'alcool 90°. On rince avec de l'eau distillée. En fin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir 1 minute. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique à l'immersion.

3.3 Identification du genre

3.3.1 Recherche de la catalase

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'H₂O₂ et à y dissocier directement un peu de la culture prélevée sur milieu solide.

La présence de la catalase se traduit par le dégagement de bulles gazeuses et le contraire indique l'absence de l'enzyme (Marchal *et al.*, 1991).

3.3.2 Recherche de l'oxydase

Sur une lame on dépose un disque d'oxydase et une goutte d'eau distillé, un peu de culture est prélevé et déposé sur le disque. Résultat positif se manifeste par une coloration rose violette. (Marchal *et al.*, 1991).

3.3.3 Recherche de type fermentaire

Pour déterminer le type fermentaire, les souches sont repiquées sur le bouillon MRS-Cys contenant une cloche de Durham. L'incubation s'effectue en anaérobiose à 37°C pendant 24 h. (Marchal *et al.*, 1991).

La présence du gaz dans la cloche indique que la souche est hétérofermentaire et son absence indique qu'elle est homofermentaire.

3.3.4 Mise en évidence de la production d'indole

Les souches sont ensemencées sur milieu urée-indole. Après 24 h d'incubation quelques gouttes de réactif Kovacs (mélange de para-diméthyl-amino benzaldehyde et d'alcool

amylique plus de l'HCl pure) sont ajoutées.

La réaction positive se traduit par la formation par un anneau en surface.

3.3.5 Mise en évidence de l'uréase

Une suspension dense de chaque souche est ensemencée dans un tube contenant 0,5 ml de milieu urée indole. Après incubation à 37°C pendant 24h, la présence de l'uréases et traduit par un virage de l'indicateur du jaune aurouge.

3.3.6 Protéolyse de la gélatine

Les souches sont ensemencées par piqûre centrale dans des tubes de milieu gélatine, puis laissés à la température ambiante du laboratoire (25°C).

L'absence de tout changement permet de conclure que les souches sont gélatinase négative.

3.3.7 Test de croissance sur bile (2%)

2 g de bile sont dissoutes dans 100 ml d'eau distillée et autoclavée 15 mn à 115°C. 0,5 ml de cette solution sont ajoutés à 10ml de MRS-Cys liquide. Après inoculation avec les souches, l'incubation se fait à 37°C pendant 48 h en anaérobiose (Sebald et Petit, 1997).

La croissance dans le milieu contenant la bile se traduit par la présence du trouble.

3.3.8 Test de croissance en milieu hyper-salé

Ce test est réalisé pour éliminer les entérocoques, il est réalisé dans le bouillon MRS-Cys contenant 4% et 6,5% de Na Cl (**Devriese *et al.*, 1993**).

Les souches de bifidobactéries sont inoculées dans des tubes contenant le bouillon MRS-Cys additionnés de 65g/l (6,5%) et 40 g/l (4 %) de Na Cl, puis incubé à 37°C pendant 24h sous conditions d'anaérobiose. La présence de trouble bactérien dans les tubes contenant 6,5% de Na Cl indique la présence des entérocoques.

3.7 Caractérisation des espèces

La fermentation des carbohydrates a été menée sur milieu MRS-Cys sans extrait de viande et additionné au pourpre de bromocrysol (BCP) comme indicateur de pH.

La source de carbone est représentée par l'un des sucres suivant : arabinose, cellobiose, fructose, glucose, inuline, melezitose, raffinose, ribose, salicine, sorbitol, tréhalose, xylose,

lactose. Les solutions sucrées sont préparées à 20 % et stérilisées par autoclavage (Sigma, France) (Tamime *et al.*, 1995).

Vu le nombre important de souches étudiées ainsi que le nombre de tubes à essai à utiliser avec chaque souche, une mini préparation est réalisée au laboratoire.

Une plaque d'Elisa est utilisée pour ses puits. Les puits de chaque ligne contiendront une source de carbone qui sera utilisée par différentes souches (**figure14**).

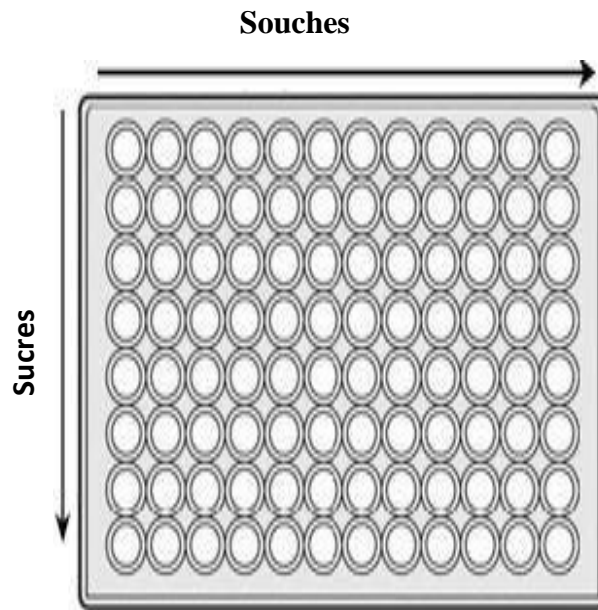


Figure 14 : plaque d'Elisa pour la fermentation

Une culture de 18-24 heures des souches appropriées a été préparée, à l'aide d'une anse de platine on racle les colonies bien isolées puis les additionner à 5 ml du MRS BCP-EV pour former la solution cellulaire servant à ensemercer les puits. On dépose 10 μ l de chaque sucre dans les puits de la plaque dans des conditions stériles puis ajouter 200 μ l de la solution bactérienne préparée au-dessus. Les préparations sont recouvertes de 50 μ l de l'huile de paraffine stérile afin d'obtenir l'anaérobiose. Les plaques d'Elisa sont incubées en anaérobiose pendant 24-48 h à 37°C.

La lecture des résultats se fait après 24 et 48 heures d'incubation. La fermentation des sucres est révélée par le virement de l'indicateur le (BCP) du violet au jaune.

Dosage de l'acide lactique et l'acide acétique par HPLC

• Milieu de culture utilisé pour la fermentation :

Le milieu MRS sans acétate de sodium a été préparé, car ce dernier pourrait fausser les résultats des analyses des acides organiques. Le milieu MRS modifié a été autoclavé pendant 15 mn à 121°C, puis additionné avec 0,05% (p / v) de la cystéine-HCl (Qian Qian Wu et al., 2012). Les acides organiques ont été déterminées en utilisant la méthode décrite par (Ong et al., 2006; Qian Qian Wu et al., 2012; Elghali et al., 2012) avec les modifications suivantes :

• Préparation des échantillons :

Les échantillons de 1,5 ml ont été centrifugés à 13 000 × g pendant 30 min et les surnageants ont été filtrés à travers des filtres de 0,45 µm. Les échantillons ont été dilués avec une solution de d'éthanol à 95% à raison de (1: 4, v/v) juste avant l'injection.

Les standards (l'acide lactique et l'acide acétique) ont été également dilués.

• Injection :

Une fois l'échantillon filtré et dilué il est tout de suite injecté dans un Système HPLC SHIMADZU Prominence-I LC2030C; Analytes ont été séparés avec la colonne (c18). La longueur d'onde du détecteur UV a été réglée à 210 nm. La solution mobile utilisée est l'éthanol à 95% avec un débit de 0,1 ml / min.

Les acides organiques ont été identifiés selon leurs temps de rétention comparés à ceux des solutions standard d'acides lactique et acétique. Les courbes d'étalonnage standard ont été préparées à l'aide de dilutions en série d'acides lactique et acétique.

3.9 Identification génotypiques des souches

L'identification des souches a été réalisée au niveau du laboratoire DIAG Gène et cela pour achever les travaux d'identification de ses souches par séquençage:

1: mise en culture des souches

2: extraction d'ADN

3 : PCR avec les amorces universelles 16s

3.1 mise au point du Mix PCR

3.2 Mise point des conditions de températures

4. Amplification PCR des échantillons étudiés
5. Purification des produits PCR
6. Séquençage des produits purifiés
7. identification des souches par Blast

3.9.1 Extraction de l'ADN

-en suivant le protocole du choc thermique

- 1) préparer des tube stérile rempli de 1ml d'eau distillées stériles.
- 2) partir de culture bactérienne fraîche et purifiée prendre une masse de crème bactérienne correspondant à une anse de bactériologie bien pleine il ne faut pas hésiter à mettre 2 anses si on n'arrive pas à bien prélevé (très important éviter de prendre la glose de la boîte).
- 3) on fait bouillir les tube à 95°C dans un bain marie sur un support en polystylène.. On chauffe 10 min et juste après on met les tubes dans de la glace pendant 15min puis on les stocke au congélateur (-20°C)

3.9.2 Amplification et séquençage du gène 16S rDNA

Les essais d'amplifications PCR ont été réalisés avec un thermocycleur de type Icyclor de Biorad (Biorad, USA) avec les amorces universelles décrites par LANE (1991) synthétisées par Eurofins Genomique, (France)

- 27f (forward): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
- 1492R (Reverse): 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'

Ces amorces permettent d'amplifier le gène 16SrDNA (1.5Kb). 4µl d'ADN génomique obtenu par extraction au choqe thermique sont amplifiés dans un volume de 25µl volume final de mixture réactionnelle contenant tous les réactifs nécessaire pour l'amplification PCR

Réaction et programme d'amplification :

La réaction d'amplification est réalisée dans le mélange réactionnel suivant :

Réactifs	Concentrations Initiales	Concentrations Finales	Volume à prélever
Eau ultra pure			
Tampon de Taq Promega	5X	1X	5 µl
MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5 µl
dNTP	25mM	0,2mM	0,2 µl
Amorce 27F	10 µM	0,5	1,25 µl
Amorce 1492R	10µM	0,5	1,25 µl
Taq polymérase Promega	5U	1U	0,2 µl
ADN génomique (Suspension Bactérienne)			4 µl
		Volume final :	25 µl

Condition de Température PCR

Dénaturation initiale 35cycles	95°C pendant 1min
Dénaturation	95°C pendant 30sec
Hybridation	58°C pendant 30sec
Elongation	72°C pendant 45sec
final élongation	72°C pendant 7sec

Electrophorèse

Electrophorèse des produits de la réaction PCR : Les produits de la réaction PCR sont séparés et vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5 % on charge les puits du gel avec 8 µl des produits PCR + 1.6 µl du tampon de charge (Promega, USA). Les puits situés au début, au milieu et à la fin du gel sont chargés de 6µl de marqueur de poids moléculaire (200bp) (Promega, USA). L'électrophorèse est effectuée dans du TAE 1X à 100V /1h. le gel est coloré une solution de TAE (1X) contenant 100 µl de bromure d'éthidium à une concentration de (1µg/ml) et décoloré dans une solution du TAE (1X) pendant 15 min. Après migration, l'ADN a été visualisé et photographié sous UV.

3.9.3 Séquençage

Les produits PCR ont été purifié par l'utilisation le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. Les amplicons ont été séquencés par la technique de Sanger en utilisant le kit BigDye v3.1 d'Applied Biosystems et par l'utilisation des amorces universelles 27f (forward):

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1492R (Reverse): 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'

4 Résistance aux conditions gastro-intestinales stimulées

4.1 Tolérance aux conditions acides de l'estomac

Ce test a été réalisé selon la technique décrites par (Thirabunyanon et *al.*,2009) et qui comporte les étapes suivantes :

-Préparation des solutions acides stimulées au pH de l'estomac humain

Des solutions d'eau distillée sont ajustées au pH 2, 3 et 4 avec l'HCl 1M.L'eau distillée au pH 6,5 est utilisée comme témoin .Les solutions sont préparées dans des tubes de 10 ml stérilisées et conservées à température ambiante avant leur utilisation. Par la suite ; 1ml de chaque culture jeune des souches étudiées est transféré dans les tubes contenant les solutions acides. Le dénombrement des cellules viables a été déterminé à t0 et après 3h

Afin de calculer le nombre des unités formant colonie (ufc)/ml on a appliqué la formule suivante :

$$N_{ufc} = \frac{\Sigma C}{V(n_1 \cdot 1) + (n_2 \cdot 0,1) + (n_3 \cdot 0,01) + \dots + (n_n \cdot 10^{-(n-1)})d}$$

ΣC : La somme des colonies dénombrées sur les boîtes. V : Le volumeensemencé dans la boîte de Pétri.

n 1 : Le nombre de boîtes ayant servi au dénombrement à la première dilution utilisée. n 2 : Le nombre de boîtes ayant servi au dénombrement à la deuxième dilution utilisée.

d : la valeur correspondant à la dilution à partir de laquelle les premiers comptages ont été effectués.

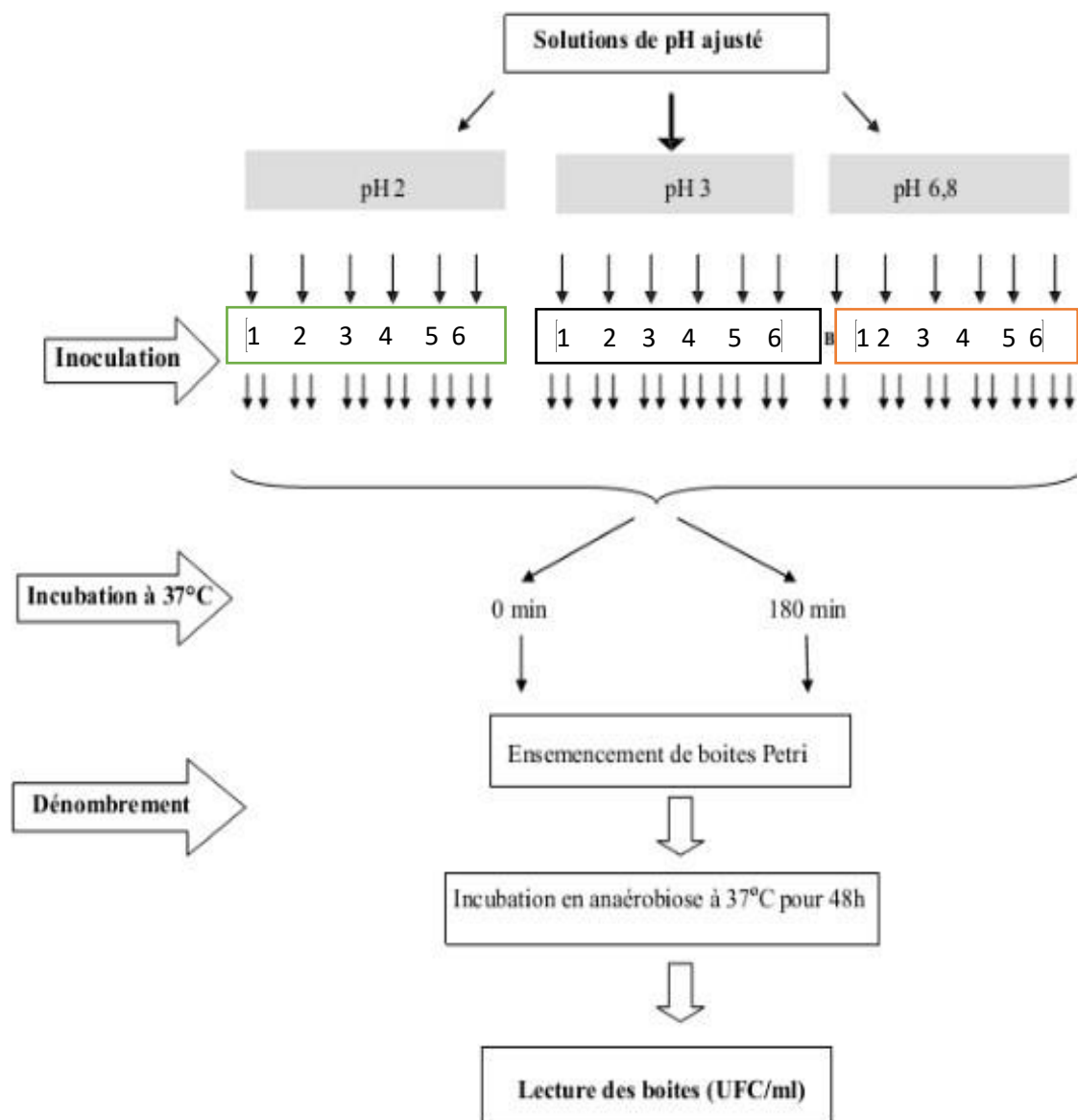


Figure 15 : Protocole de détermination de l'effet du pH gastrique simulé sur la viabilité des souches isolées.

4.2 Résistance aux sels biliaires

La technique décrite par (Thirabunyanon et al., 2009) a été appliquée :

Préparation des solutions biliaires

Des différentes concentrations de bile sont préparées 0.2 % ,0.3%,0.4%,0.5% dans du milieu MRS. Les solutions sont préparées dans des tubes de 9 ml stérilisés et conservées à température ambiante avant leur utilisation. Par la suite, 1ml de la culture jeune de chaque souche testée est transféré dans les tubes contenant les solutions des sels biliaires puis effectuer des dilutions 10^{-1}

jusqu'à 10^{-8} ; les trois dernières dilutions sont ensemencées dans une gélose MRS en masse suivi d'incubation à 37°C en anaérobiose pendant 48h. Les tubes 10^{-1} de chaque souche sont incubés à 37°C en anaérobiose pour 3h, le dénombrement est effectué aussi après 3hd'incubation.

D'autres concentrations de bile ont été préparées 3%,4% et 5% dans un milieu MRS gélosé avec une agitation manuelle, puis couler les boîtes ; après solidification ; l'ensemencement en surface est effectué à l'aide d'une anse de platine. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C sous conditions d'anaérobiose.

La résistance aux sels biliaires est exprimée par la présence ou l'absence des colonies.

4.3 Résistance aux sucs gastriques

Pour la résistance aux sucs gastriques (voir annexe) ; nous avons suivi la procédure suivante :

0.5 ml de culture jeune est ajoutée à 4,5 ml de solution de sucs gastriques, puis des dilutions décimales sont effectuées 10^{-1} à 10^{-8} puis à partir des trois dernières, l'ensemencement est fait en masse ; on refait l'opération après 3h ; les boîtes sont incubées à 37°C sous conditions d'anaérobiose. Le dénombrement est effectué après 48h.

4.4 Résistance aux enzymes pancréatiques

Une solution des enzymes trypsine et d' α -chymotrypsine est préparée (voir annexe) ; la réalisation du test s'est faite comme cité au-dessus en effectuant des dilutions 10^{-1} à 10^{-8} puis l'ensemencement s'effectue au t_0 et après 3h.

5 Cinétique de croissance à différentes concentration de salinité en culture pure :

Des flacons de 100ml de milieu MRS additionné de 0.05% cystéine chlorhydrique et de 2 mg/l d'acide nalidixique a une concentration de 4.5% ,5% ,5.5% de NaCl ont été inoculés par les souches de bifidobactéries à raison de 1% (v/v) puis répartie dans des tubes à raison de 10ml et incubés à 37°C en anaérobiose. Des prélèvements ont été effectués au temps 0, 2, 4, 6, 8, 24, 48, et 72h d'incubation. Une série de tubes à été préparé pour chaque intervalle de temps pour ne pas fausser les résultats. Le dénombrement des cellules à été réalisé sur milieu MRS-cys gélosé après dilutions décimales

Evaluation de la viabilité des souches potentiellement probiotique : L'objectif de cette partie était d'évaluer l'influence de la salinité sur la viabilité de quelques souches sélectionnées présentant un fort potentiel probiotique (B11, B12, B13, Ba1, Ba2, By1, Bm1)

6 L'antibiogramme :

L'antibiogramme des souches de bifidobactéries est déterminé par la technique standardisée de diffusion (d'après la comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2004) sur milieu gélosé (MRS additionné de 0.05% cystéine chlorhydrique et de 2 mg/l d'acide nalidixique gélosé), à partir d'une culture jeune en milieu liquide MRS et à l'aide d'un écouvillon stérile, nous avons ensemencé toute la surface du milieu. Après le séchage, nous avons déposé les disques d'antibiotiques sur la boîte et on les à incubé à 37°C.

Les zones d'inhibition observés autour des colonies classent les bactéries comme chimiquement sensibles (S) ou résistantes à un antibiotique donné.les disques testés sont : Amoxicillin + Clavulanic Acid, Cefazolin, Cefotaxime, Cefoxitin, Cefsulodin, Ceftazidime, Cephalothin, Ciprofloxacin, Clindamycin , Erythromycin, , Imipenem, Netilmicin, Nitrofurantoin, Ofloxacin, Oxacillin, Pefloxacin, Pristinamycin, Rifampin, Ticarcillin, Tobramycin, Trimethoprim-Sulfamethoxazole (co-trimoxazole,), Vancomycin.Ces disques proviennent de Bio-rad (Marnes-la-Coquette,France),sauf VA de OXOID (Basingstoke.Hampshire ,England).

7 La mise en évidence des interactions

7.1 Recherche des interactions entre les différentes espèces de *Bifidobacterium* et des espèces pathogènes

Les souches pathogènes choisies sont *E coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria*.

La technique choisie est celle de Fleming *et al.*, (1975), elle consiste à ensemencer les différentes espèces de *Bifidobacterium* dites inhibitrices à la surface du milieu MRS additionné de 0.05% cystéine chlorhydrique et de 2 mg/l d'acide nalidixique) solide à l'aide d'un multipoint, après séchage 30 mn à la température ambiante, les boîte de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 18h sous conditions d'anaérobiose.

Les cultures sont ensuite recouvertes de 7 ml de milieu MH inoculé avec 500 µl de culture de la souche pathogène.Après solidification, les boîtes sont remises à l'étuve à 37°C pendant 24h sous condition d'anaérobiose.La présence des zones claires autour des souches ensemencées par touche indique l'inhibition de la souche indicatrice. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

8 Conservation des souches bactériennes

Deux types de conservation de nos souches sont à noter. Une de courte durée et l'autre à longue durée.

8.1 Conservation courte durée

Les souches sont ensemencées sur gélose MRS-Cys en boîtes ou en tubes inclinés. Après incubation à 37°C pendant 18-24 heures, les boîtes ou les tubes sont conservés à + 4°C. Les repiquages se font toutes les deux semaines (Scardovi, 1986).

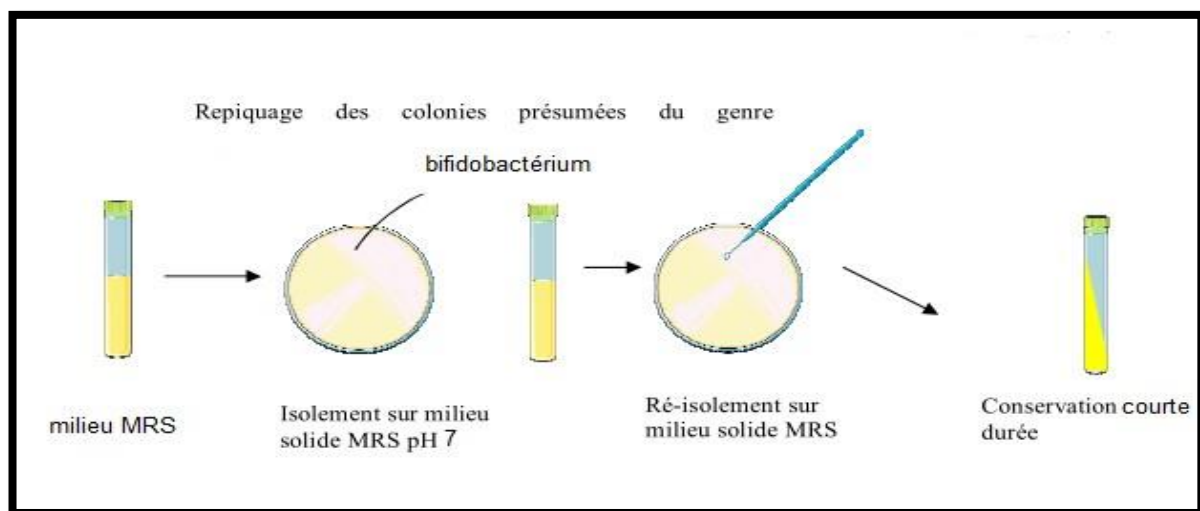


Figure 16 : Conservation à courte durée.

8.2 Conservation longue durée

A partir de jeunes cultures (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 13000tr/min pendant 20 min à 4°C. Une fois le surnageant éliminé, on répète l'opération avec de l'eau physiologique éliminant l'acidité puis le culot récupéré ; le surnageant est jeté. A l'aide d'une micropipette le milieu de conservation additionné sur le culot.

Le milieu de conservation contient du 10% lait écrémé, 30 % de glycérol, 20 % de l'acide ascorbique. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes eppendorfs à -20 °C.

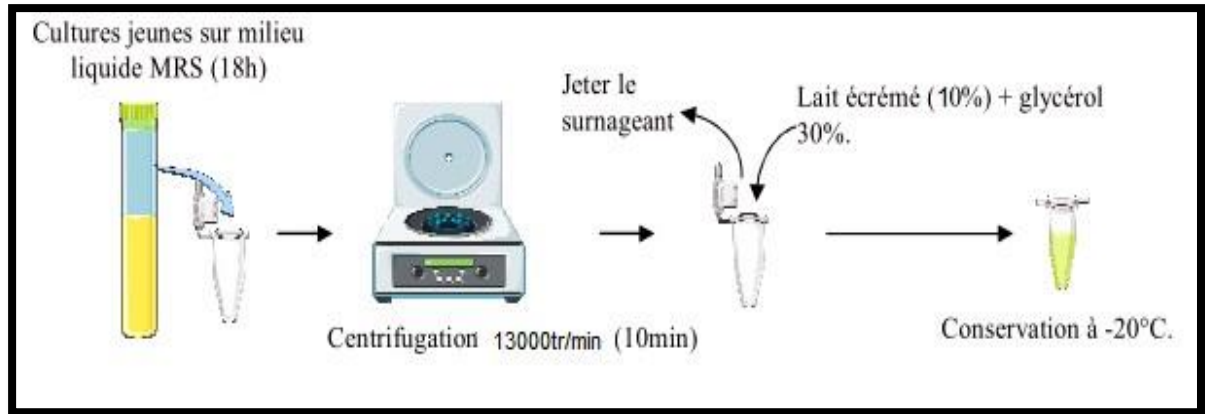


Figure 17 : protocole de conservation des souches à longue durée.

Chapitre III:

Résultats et Discussion

RapportGratuit.com

Résultats

Résultats

1. Isolement et purification

Dans notre étude on a ciblé l'isolement des bifidobactéries pour cela les souches qui remplissent les propriétés suivantes bacille a Gram positif et catalase négative ont été gardées pour la suite de l'étude , toutes les souches restantes qui ne remplissent pas ces critères ont été éliminées pour la suite des tests . A partir des échantillons des selles des nourrissons on a pu isolé 3 souche de bifidobacteries indiqué comme B11 , BI2, BI3 à partir des intestins d'abeilles on a isolé 2 souches de bifidobactéries indiqué comme Ba1 , Ba2. A partir du yaourt Activia on a isolé 1 souche de bifidobactéries indiquées comme By1 et à partir de lait maternel commercialisé on a pu isoler une seule souche indiquée comme Bm1 comme le montre **le tableau (6)**.

A partir des échantillon d'eau de mer malheureusement on a pas pu isolées aucune souche de bifidobactéries alors qu'on a précisément prélevé des échantillons avec des déversements urbains pour favoriser la contamination des eaux de mers par ces déversement urbains .

2. Pré-identification des souches :

2.1 Aspect macroscopiques :

- Les colonies des bifidobactéries développées sur le milieu MRS(milieu MRS additionné de 0.05% cystéine chlorhydrique et de 2 mg/l d'acide nalidixique modifiée)sont de petites colonies, de coloration blanchâtre et crème , de contour régulier et irrégulier suivant l'espèce **figure (17)**.

2.2 Aspect microscopiques :

L'observation microscopique après la coloration de Gram des frottis réalisés à partir des colonies apparues, révèle la présence des bactéries gram positif, des bacilles en formes Y et V incurvés avec des extrémités bifurquées isolées à partir des selles des nourrissons et celle,d'intestin des abeilles ,de lait maternel commercialisé et de pot de yaourt Activia Bifidus, immobile et asporulées . Leur mode d'association soit isolé ou en amas et un changement de formes après plusieurs repiquage pour plusieurs souches ce polymorphisme cellulaire est typique aux bifidobactéries**figure (18)**

Tableau 6: Différents aspects macroscopiques et microscopiques

Souches	Aspect macroscopique	Aspect microscopique Gram	
By1	Petites colonies, blanchâtre à surface lisse et contour régulier	Bâtonnets sous formes Y et V	+
Bm2	Petites colonies, blanchâtre à surface lisse et contour régulier	Bâtonnets sous formes Y et V	+
BI1	Petites colonies, blanchâtre à surface lisse et contour régulier	Bâtonnets à contour ondulés et des Extrémités bifurquées	+
BI2	Petites colonies blanchâtres à contour régulier	Bâtonnets à contour ondulés et des Extrémités bifurquées	+
BI3	Petites colonies blanchâtres à contour régulier	Bâtonnets à contour ondulés et des Extrémités bifurquées	+
Ba1	Petites colonies blanchâtres à contour régulier	Bâtonnets à contour ondulés et des Extrémités bifurquées	+
Ba1	Petites colonies blanchâtres à contour régulier	Bâtonnets à contour ondulés et des Extrémités bifurquées	+

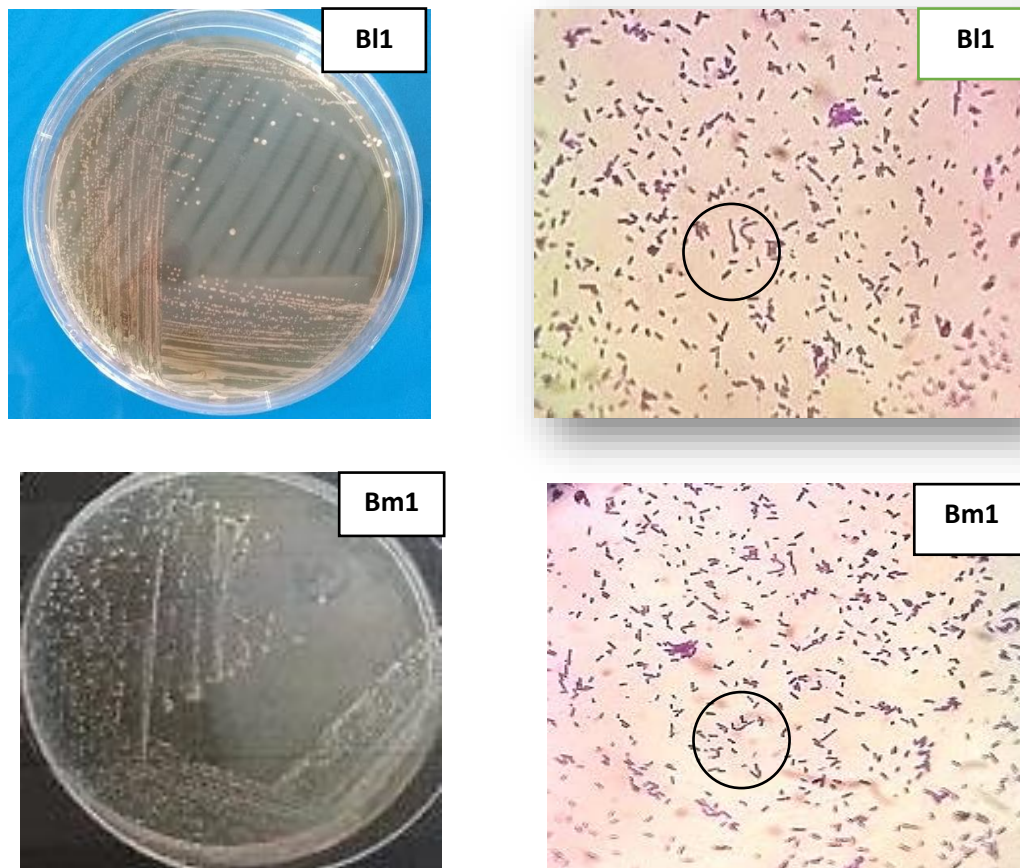


Figure 18 : Aspects macroscopiques et microscopiques des souches (B11, Bm1)

2.3 Caractérisation du genre:

Toutes les souches se développent en milieu anaérobie, ne produisent pas de gaz à partir du glucose, absence d'une activité urée indole et gélatinase aussi. Les résultats sont inscrits au **tableau (7)** suivant :

Tableau 7 : Mise en évidence de certaines activités enzymatiques chez les souches étudiées.

Test	BI1	BI2	BI3	Ba1	Ba2	By1	Bm1
Production du gaz	-	-	-	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-
Gélatinase	-	-	-	-	-	-	-
Croissance sur bile (2 %)	+	+	+	+	+	+	+
Croissance en milieu hyper-salé 4%	+	+	+	+	+	+	+
Croissance en milieu hyper-salé 4%	-	-	-	-	-	-	-

3.4 Caractérisation des espèces

Tableau 8 : Mise en évidence de la fermentation de sucres chez les souches étudiées.

	Sor	Tré	Inu	Mél	Sal	Xyl	Cel	Rha	Fru	Ara	Rib	Lac	Glu
Bl1	-	-	-	+/-	-	+	-	+/-	+	+	+	+	+
Bl2	-	-	-	+/ -	-	+	-	+/ -	+	+	+	+	+
Bl3	-	-	-	+/ -	-	+	-	+/ -	+	+	+	+	+
Ba1	-	-	-	+/ -	-	+	-	+/ -	+	+	+	+	+
Ba2	-	-	-	-	-	+	+/ -	+/ -	+	-	+	+	+
By1	+	+	-	+/ -	+	-	+	-	+	-	+	+	
Bm1	+	+	-	+/ -	+	-	+	-	+	-	+	+	+

Sor :sorbitol ;Tré :tréhalose ;Inu :inuline ;Mél :mélezitose ;Sal :salicine ;Xyl :xylose ;Cél :célébiose ;Rha :rhamnose ;Fru : fructose ;Ara :arabinose ; Rib :ribose ;Lac :lactose ; Glu :glucose.

(+) : sucre fermenté ; (-) : sucre non fermenté ; (+/-) : variable.

3 Dosage de l'acide lactique et l'acide acétique par HPLC

Les acides organiques produites au cours de la fermentation sur milieu MRS modifié ont été identifiés selon leurs temps de rétention comparé à celui des solutions des standards de l'acide lactique et l'acide acétique. Au cours de la fermentation, environ 3/2 moles d'acide acétique / lactique ont été produits (**figure 19 ; Bl1, By1,Bm1**), observations qui concordent avec les montants théoriques rapportés par Scardovi(**Ong et Shah, 2009**) ce résultat nous permet de classer nos souches au genre *Bifidobacterium*.

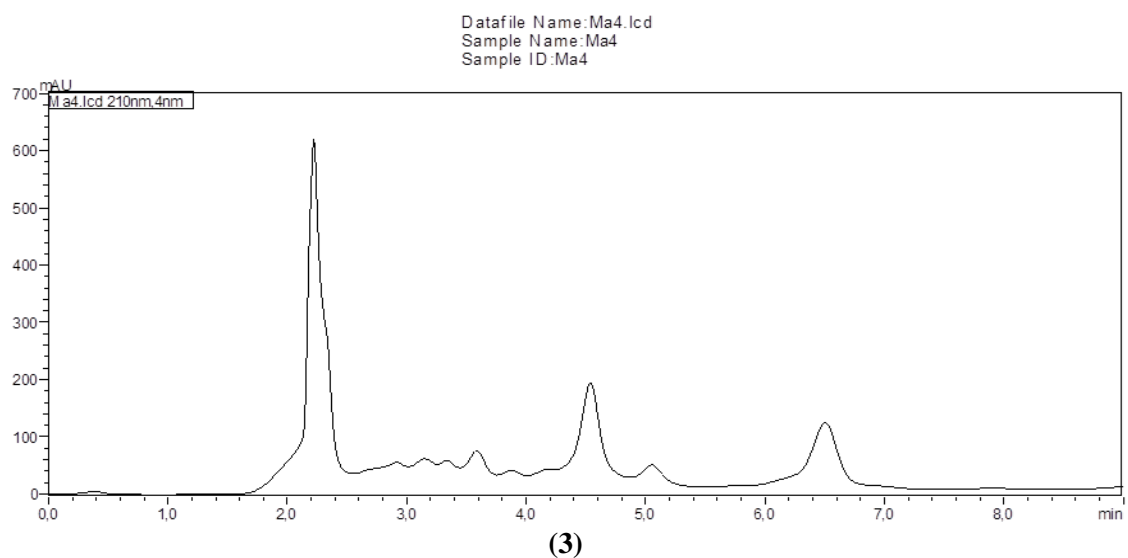
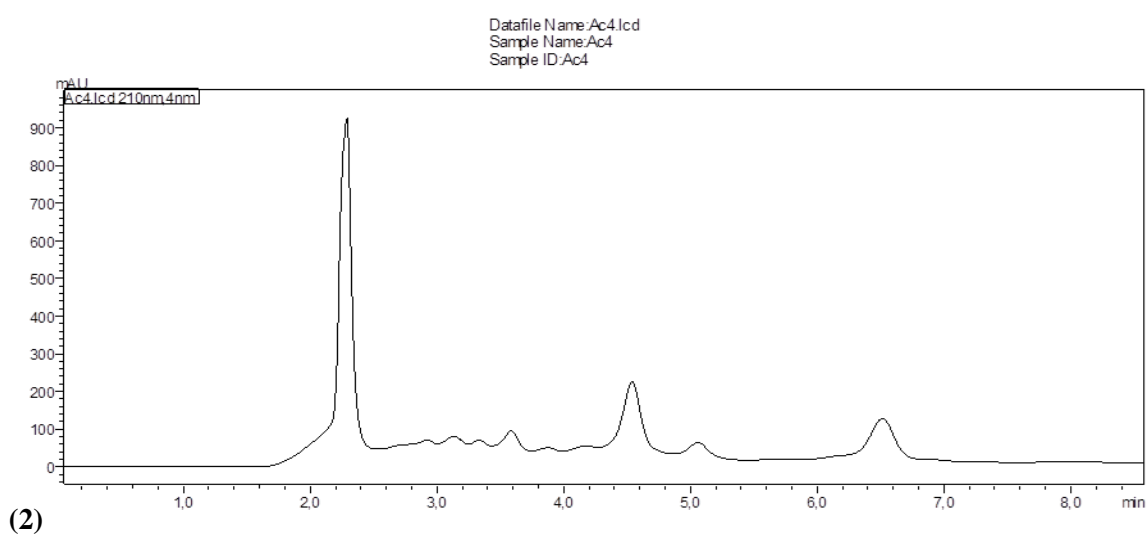
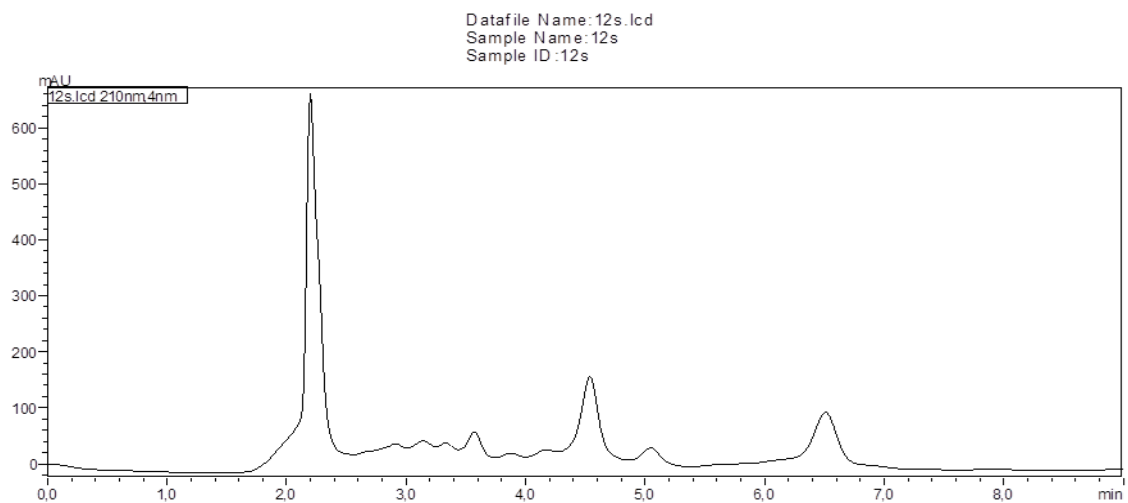


Figure 19 : la détermination des acides organique par chromatographie en phase liquide (HPLC) de la souche B11 (1), By1(2), Bm1(3)

4 L'identification génétique des souches

3.2 Extraction de l'ADN:

Une électrophorèse est faite pour la vérification d'ADN pour montrer que l'ADN total est pur et débarrassé de toute contamination en comparaison avec le marqueur.

3.2 Amplification d'ADN:

Après l'amplification d'ADN par réaction de PCR une électrophorèse est faite pour la vérification du déroulement de la réaction **figure (20)** ou on peut constater qu'elle correspond à la taille attendue 1500 pb .

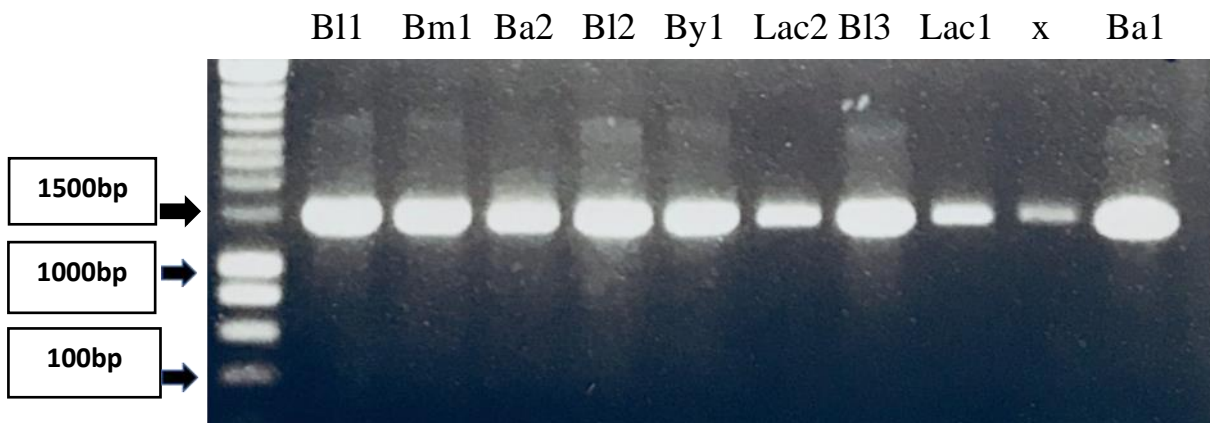


Figure 20 : Réaction d'amplification PCR du gène 16S des souches étudiées sur gel agarose

3.3 Séquençage

Les amplicons ont été séquencés par la technique de Sanger en utilisant le kit

BigDye v3.1 d'Applied Biosystems et par l'utilisation des amorces universelles

27f (forward): 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'.

1492R (Reverse): 5'TACGGTTACCTTGTTACGACTT3'.

La comparaison des séquences obtenus avec celles de Gene Bank montre que les séquences des souches :

- By1 (échantillon de Yaourt)
- Bm1 (échantillon de lait maternisé commercialisé)
- Ba2 (échantillon des intestins d'abeilles)

Présente un pourcentage d'homologie de 98% avec la souche de *Bifidobacterium sp.* PG13 (ID: JF519689.1) quand elles sont comparées uniquement avec les séquences des *Bifidobacterium* de GeneBank .

Les souches :

- B11 (selles de nourrisson allaitée au sein)
- B12 (selles de nourrisson allaitée au sein)
- B13 (selles de nourrisson allaitée au sein)
- Ba1(intestin d'abeilles)

Montrent une homologie de 99% avec la souche *Bifidobacterium longum subsp. longum* strain CCUG30698, (ID: CP011965.1) quand elles sont comparées uniquement avec les séquences des *Bifidobacterium* de GeneBank .

La souches Lac1 montre une homologie de 99% avec *Lactobacillus fermentum* strain MH23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Sequence ID: MG027694.1

La souches Lac2 montre une homologie de 98% avec *Lactobacillus fermentum* strain CAU1847 16S ribosomal RNA gene, partial sequence .Sequence ID: MF424315.1

3.3.1 Séquences parciel du gene 16S de quelque souches étudiées

BL1 species : 99% *Bifidobacterium longum subsp. Longum* strain CCUG30698, complete genome

Sequence ID: CP011965.1

```
CTTAGGCGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAACTC
TCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATG
CTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAA
TCCGAAGTGAAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACTCG
TTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATT
TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCA
ACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA
CATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCA
```

>HB4.18.1_1492r

```
CTTAGGCGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAACTC
TCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATG
CTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAA
TCCGAAGTGAAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACTCG
TTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATT
TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCA
ACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA
```

CATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATCATGTCCCCGA
 AGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCT
 TCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA
 TTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTT
 AGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTTCATCGTTTACGG
 TATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATACTTTCGAGCCTCAGCG
 TCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGC
 ATTTACCCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCCC GCAGT
 TTCCGATGCGGATCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACC
 GCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATT
 ACCGCGGCTGCTGGCACGTA GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCATAC
 CTGAACAGTACTCTCAAAATGTTCTTCTTTACAACAAAGTTTACGAGCCGAACCC
 TTCTTCCTCACGCGGCTTGCTCATCAAATTTTCGTCCTTGGGGAAAATCCCTATGCT
 GCTCCCGAAGAATTGGGCCTGGCCAGTCCATTGGGCAATACCCTCAGGTTCGGTAC
 GTCATTGCAGGGGAGCGTTCCCCCCTTA ACTA ACCCCGGGACTCCA AAGGAGCCG
 ACCCTTTCT

Species Ba1:98% *Bifidobacterium* sp. PG13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: JF519689.1

TAAGCGGCTGGCTCCTAGAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAACTCTCA
 TGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTG
 ATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAGTCC
 GAACTGAGAACGGTTTTAAGAGATTTGCTTGCCCTCGCGAGTTCGCGACTCGTTG
 TACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGA
 CGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACT
 TAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAAT
 CTCACGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCATTGCGTTCCCGAAGG
 AAACGCCCTATCTCTAGGGTTGGCGCAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCG
 CGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
 CTTTGAGTTTCAACCTTGC GGTCGTA CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGC
 TCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCAT
 GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTACCCATGCTTTCGAGTCTCAGCGTCA
 GTTGCAGACCAGGTAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATT
 CCACCGCTACACATGGAGTT

>15.2.1_BAC= 15.1_1492r (BACR

GGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTG
 TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGAT
 TCCGACTTCGTGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAGTCCGAACTGAGAACGGTTTTAA
 GAGATTTGCTTGCCCTCGCGAGTTCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGT
 GTGTAGCCCAGGTCATAAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCC
 GGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAA
 CAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC

Species B12: 99% *Bifidobacterium longum* subsp. *Longum* strain CCUG30698, complete genome

SequenceID: CP011965.1

GCGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTA
 TGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTG
 ATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCC
 GAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACTCGTTG
 TACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGGCATGATGATTTGA
 CGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACT
 TAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT
 CTCACGACACGAGCTGACGA

>HB4.14.1_1492r=14.2.1_BAC R

GCGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTCATG
 GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGAT
 CCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGA
 ACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACTCGTTGTA
 CCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGGCATGATGATTTGACG
 TCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTTA
 ATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
 CACGACACGAGCTGACGACAACCATGCAC
 CACCTGTATCCATGTCCCCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATG
 TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG
 CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCA
 GGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACA
 CTTAGCATTTCATCGTTTACGGTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTAC
 CCATACTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTG
 GTGTTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTC
 TTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTT
 TCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCCAATAAATCCGGAC
 AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA
 GTTAGCCGTGGCTTTCT

Species Bm1 : 98%*Bifidobacterium* sp. PG13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: JF519689.1

TCACTTAGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAA
 CTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGC
 ATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGCAGGCGAGTTGCAGCCTG
 CAGTCCGAACTGAGAACGGTTTTAAGAGATTTGCTTGCCCTCGCGAGTTCGCGAC
 TCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGGCATGATG
 ATCTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGC
 CCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC
 CAACATCTCACGACACGAGCTGAC

>HB4.12.1_1492r= 12.2.1_BAC R

GGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTG
 TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGAT
 TCCGACTTCGTGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAGTCCGAACTGAGAACGGTTTTAA
 GAGATTTGCTTGCCCTCGCGAGTTCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGT
 GTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCC
 GGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAA
 CAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACG
 ACGACCATGCACCACCTGTCATTGCGTTCCCCGAAGGAAACGCCCTATCTCTAGGG

TTGGCGCAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACC
 ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCG
 GTCGTA ACTCCCCAGGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGA
 AACCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAA
 TCCTGTTTCGCTACCCATGCTTTTCGAGTCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGGTAGCCG
 CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGT
 TCCACTACCCTCTTCTGCACTCAAGTTATCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTA
 AGCCGAAGGCTTTACATCAGACTTAGAAAACCGCCTGCACTCTCTTTACGCCCA
 AATAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT
 TAGCCGTGA

**Species Lac1: 99% *Lactobacillus fermentum* strain MH23 16S ribosomal RNA gene,
 partial sequence .
 Sequence ID: MG027694.**

ACACGCCGACTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAA
 GGCCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGA
 CTTCGTGCAGGGCAGTTGCAGCCTGCAGTCCGAACTGAGAACGGTTTTAAGAGAT
 TTGCTTGCCCTCGCGAGTTCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTA
 GCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTT
 GTCACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGG
 GTTGCCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGAC
 CATGCACCACCTGTCAATTGCGTTCCCGAAGGAAACGCCCTATCTCTAGGGTTGGC
 GCAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATG
 CTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCTG
 ACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCC
 TCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG
 TTCGCTACCCATGCTTTTCGAGTCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGGTAGCCGCCTTC
 GCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCAC
 TACCCTCTTCTGCACTCAAGTTATCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTA

>9HB_1492r -- 218..345 of sequence

CGAGTGAAGTGCTGCCTATATAGTTTATCTGAGCCATGATCAAACCTCTGCGGCTT
 CGGGGGGTACCAACTTTCATGGGTTGGCGGGGGGGGGGACAAGCCCCGGGAAC
 GTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGAGG
 GCGAGTTGCAAACCCCAATCCGAACTGAAACCGGCTTTCGGAGATTGCTCACCC
 TCGCAGGTTCCGCACTCTCTGTACCAGCCATTGTAGCATGGGTGAAGCCCTGGAC
 ATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCCGGC
 GGTCTCCACTGAGTCCCCACCTTAATGTGGTGGCCAAAGTGAACGGGGGGCGCGC
 TCGGTGCGACATTTAACCCCATCTCTCGACACACGAGCTGAACACAGCCGTGCCA
 CCTGTGTTAACCGACCCCAAAGAGGCACACCCATCTCTGAGCAGTCCCGATCCAT
 GTCAAACCGAGGTAAGGTTCTACGCGTTGCATAAAAAAATCCGCATGCTCCGCC
 GCTTGGGGGGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTACTCTTGCGCGCCGCACTCCC
 CGGGGGGGGTACTTTAAGCGTTATCTAGGGCGGGGAGGCGGAGAAATGCACACC
 ACTACTACTACTCATTGATGACATGGAGTACTAGCATGTCATCTAATGCTGTTTAC
 TCCCGACGTTTTTCGCTCATCAGCGTCAGGAAAGGACCAGACAACCGCTCTTCGCC
 ACTGGTTCTTCCTCCTGATCAACTGCATTTTCCCGCTACTCCATCAGGAATCTCCA
 TTCTCCTCCTAGCATTCTCGAGTACACACCGTTCTCAAGAAGCTTCCTCAGGGGTA
 TACCCGACGAGATTCTCTTCAGATTGCGATCACGCCCCCTACGAGCTCTTTTAGC
 GCAAATAAATCGAGAACAGCGTCTTGCCACCTACGATTATATCGCGGGCTGCTGA
 AGTAGTTAGGCGGACTTCTTGATCAAATACCGTCCACTCTACGGCTTCGATACTA

Species Lac2: 98 % *Lactobacillus fermentum* strain CAU1847 16S ribosomal RNA gene, partial sequence .
Sequence ID: MF424315.1

AAGCCTACTGTGAAGTCTATATAGTATCATCTGAGCCATGATCAAACCTCTCCCGA
TTTTGGGGGTTACAAATTTCCCTGGGGGGGACGGGGGGGGGGTACAAGGCCCGGA
AACGTTTTCCCCGGGCTGGCTGATCCCCAATTACTAACAATTCCGATTTCTGGAA
GGCAATTTGCAACCTGCATCCCGAATTGAAAACGGTTTTTAAGAAATTTGCTTGCC
CCCCGAGTTCCCGACTCCTTGTACCGCCCTTTGAAGCACGGGGGTACCCAGGC
CAAAGGGGAAGGAGGATTTGACTCCTCCCCCCCCCTTCCTCCGGTTTGTCCCCGG
CAGCCTCCTTAAATGGCCCAACTTAAGGTTGGCAACTAAAAACAAGGGTGGGGCT
CGTTGCGGGACTTAACCCAAATTCTCCCAACCCAAGCTGACAACGACCATGCCCC
ACCTGTTATTTCTTTCCCGAAGGAAAAGCCCTATTTCTTAGGTTGGCGCAAGAAGT
CAAACCTGGGAAGGTTCTTCCCGCATCTTCTAATTAACCACATGCTCCACCGC
TTGTGGGGGCCCCCCCCCTTTCCTTTGAGTTTTAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCG
GGGAATGCTTAATGGGTTATCTCCTGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCTACACC
TACCACTCCTCGTTTACTGGATGGGACTAACCAGGGGATCTAATCCTGTTCGTTAC
CCCTGCTTTCTAGGCCACGTCAGTTGCAGACCAGGAAAGACGCCCTCCGCCACT
GGGGTTCCTCCACTATCTACGCTTTTCATCGCTACACATGGAATTTCCCTCCCT
CTTCTGCATTCAAGTCATCCACGTTTCGAATGCACTTCCTCCGTTGAAGCCGAAT
GCCTTTTCACATCAGACTTAGAAGACCGCCTGCCGCTCTCATTTGCCAATTATCT
GAATAATGCATGCCAACTACTATTACGCGCTGCTGCAGTAGTAGCCGTGAACCTT
CTGCTAGTCGTCCACGTTGCACAGTATCTACACATTGAC

Après des comparaisons entre l'identification phénotypique, et les traitements bioinformatiques des résultats génotypiques nos 7 souches étudiées sont caractérisées, les résultats obtenus sont montrés dans **le tableau(9)**.

Tableau 9 : Résumé des résultats d'identification phénotypique et génotypique

Souche	Identification phénotypique	Identification génotypique	Résultat
Bl1	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>subsp. Longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>subsp. Longum</i>
Bl2	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>subsp. Longum</i>	<i>Bifidobacterium Longum</i> <i>subsp. Longum</i>
Bl3	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>subsp. Longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>subsp. Longum</i>
Ba1	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>subsp. Longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>subsp. Longum</i>
Ba2	<i>Bifidobacterium astéroïdes</i>	<i>Bifidobacterium sp</i>	<i>Bifidobacterium astéroïdes</i>
By1	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium sp</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
Bm1	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium sp</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>

4 Résistance aux conditions gastro-intestinales stimulées

4.1 Tolérance aux conditions acides de l'estomac:

La tolérance de nos souches étudiées via les différentes concentrations de pH était diverse et variable d'une espèce à une autre, on remarquant tout d'abord que les souches *Longum* ont une meilleure tolérance et celles principalement isolées des selles de nourrissons allaités au sein. Les résultats sont démontrés dans les tableaux 10 et 11.

Tableau10: Les résultats obtenus pour les isolats concernant la résistance aux substances gastro-intestinales pour la souche B11, B12, B13 isolées des selles de nourissons

T 0	Souche BL1			Souche BL2			Souche BL3		
	pH 3	pH 4	pH 6	pH 3	pH 4	pH 6	pH 3	pH 4	pH 6
	0.27x10 ⁸	2.3x10 ⁸	3.6x10 ⁸	0.65x10 ⁸	2.5x10 ⁸	3,4x10 ⁸	0.50x10 ⁸	2.15x10 ⁸	3.12x10 ⁸
T 3h	0	0.52x10 ⁸	4,5x10 ⁸	0	0.65x10 ⁸	3.9x10 ⁸	0	0.4x10 ⁸	3.5x10 ⁸

Tableau11: Les résultats obtenus pour les isolats concernant la résistance aux substances gastro-intestinales pour la souche Ba1, Ba2 isolées des intestins d'abeilles

T 0	Souche Ba1			Souche Ba2		
	pH 3	pH 4	pH 6	pH 3	pH 4	pH 6
	2.5x10 ⁷	0.34x10 ⁸	3.02x10 ⁸	0.55x10 ⁸	2.25x10 ⁸	2,9x10 ⁸
T 3h	0	0.46x10 ⁸	3.32x10 ⁸	0	0.55x10 ⁸	3.2x10 ⁸

La perte de viabilité à pH 6 était négligeable pour la totalité des souches testées, dont la portion de cellules viables après 3h d'incubation était presque maximale.

Lors de l'exposition à pH 3, la souche *longum* a maintenu la plus grande portion de cellules viables, le plus faible taux de survie pour ce pH est noté par la souche Ba1.

Pour le pH 4, la plus grande portion de cellule ayant maintenu leur viabilité à la fin de la période d'exposition est enregistrée par la souche B12.

4.2 Résistance aux sels biliaires

Tableau 12 : Résultats obtenus à T₀ pour les sels biliaires.

Souche	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	2%	3%	4%	5%
B11	+	+++	++	++	++	-	-	-
B12	+	+++	++	++	++	-	-	-
B13	+	+++	++	++	++	-	-	-
Ba1	+	+++	++	+	+	-	-	-
Ba2	+	+++	++	++	++	-	-	-

+ : croissance faible, ++ : intermédiaire, +++ : forte, - : croissance nulle.

7.3 La résistance aux sucs gastriques

Le tableau suivant représente les résultats obtenus par les souches isolées à leur résistance aux sucs gastriques.

Tableau 13: Résultats de résistance des souches aux sucs gastriques.

	Souche Ba1	Souche Ba2	Souche B11	Souche B12	Souche B13
T₀	2.80x10 ⁸	3.30x10 ⁸	2.92x10 ⁸	3.76x10 ⁸	2.88x10 ⁸
T 3h	2.30x10 ⁸	2.95x10 ⁸	2.56x10 ⁸	2.50x10 ⁸	2.54x10 ⁸

5.4 La résistance aux enzymes pancréatiques

Tableau 14 : résistance des souches aux enzymes pancréatique.

	Souche Ba1	Souche Ba2	Souche B11	Souche B12	Souche B13
T₀	0.504x10 ⁸	1.74x10 ⁸	2.32x10 ⁸	2.24x10 ⁸	2.11x10 ⁸
T 3h	0.448x10 ⁸	1.20x10 ⁸	2.03x10 ⁸	2.09x10 ⁸	1.96x10 ⁸

8 Cinétique de croissance à différentes concentration de salinité en culture pure:

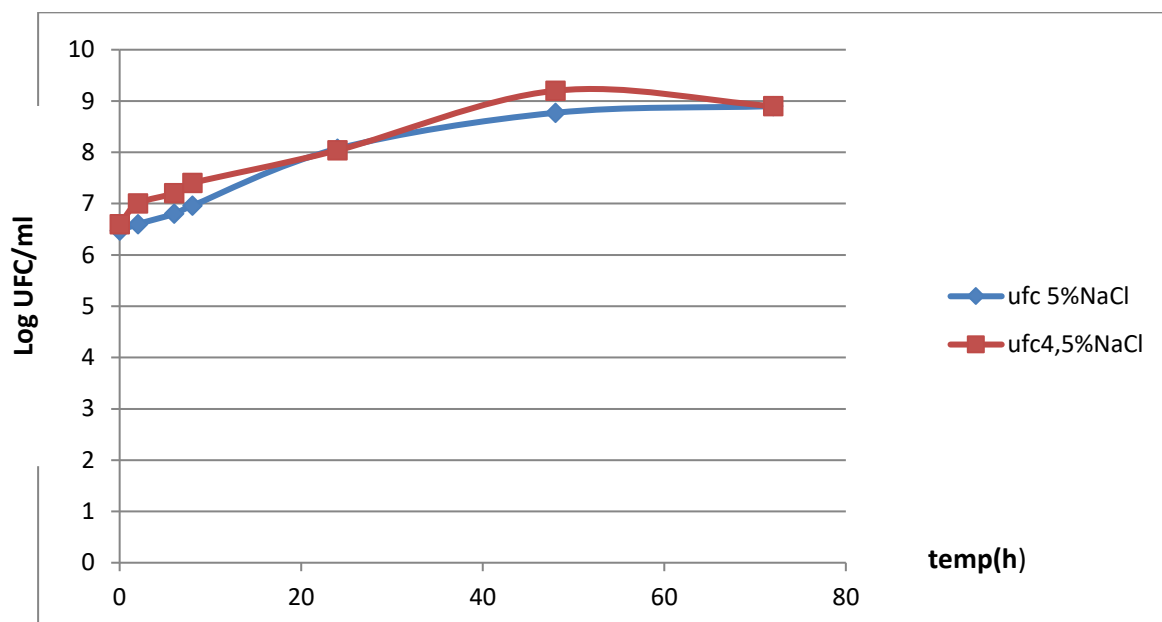


Figure 21: Cinétique de croissance de la souche BL1 dans le milieu MRS Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl.

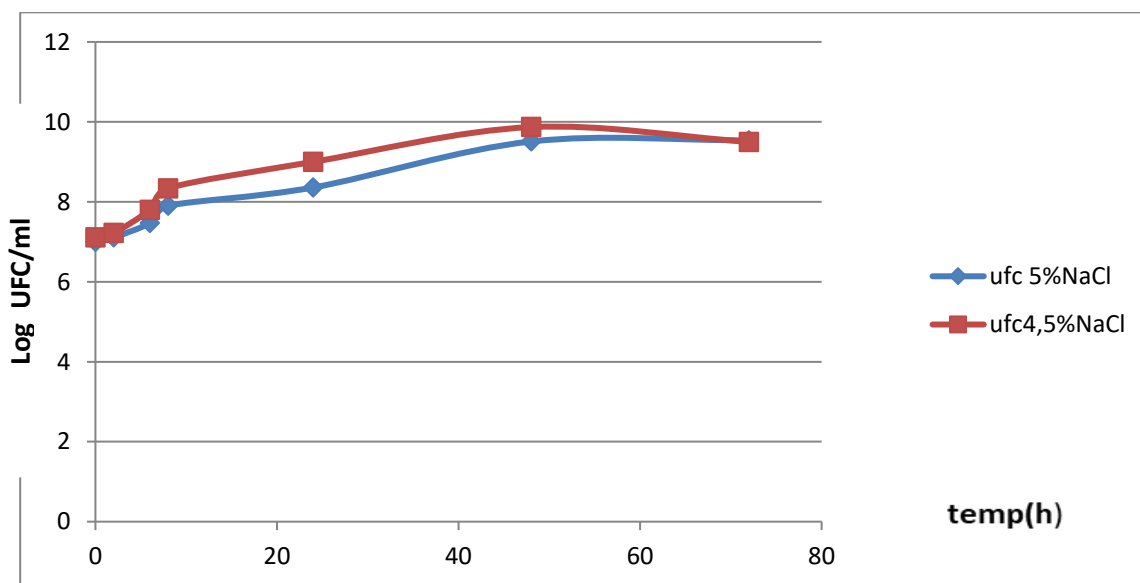


Figure 22: Cinétique de croissance de la souche Ba1 dans le milieu MRS Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl .

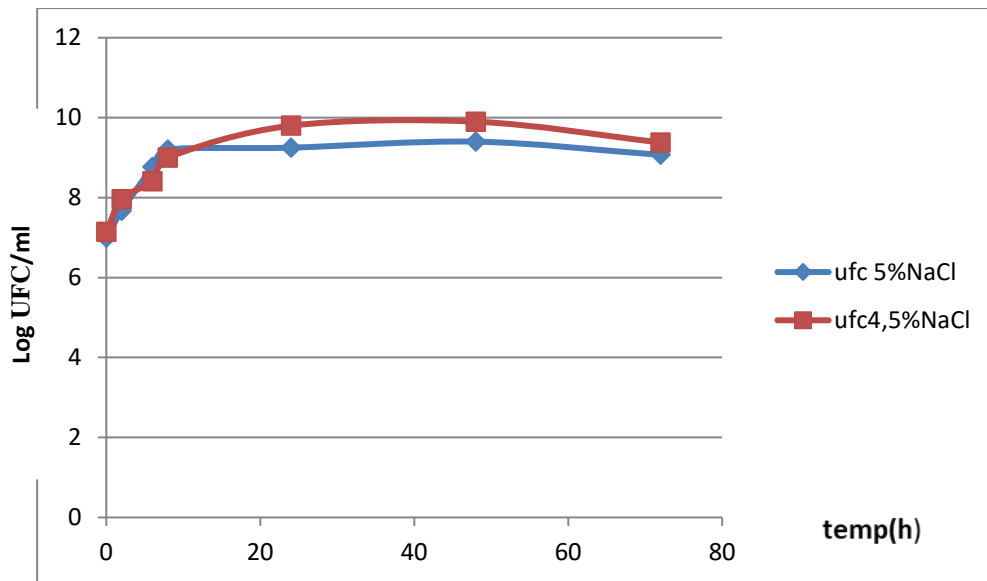


Figure 23: Cinétique de croissance de la souche By1 dans le milieu MRS Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl .

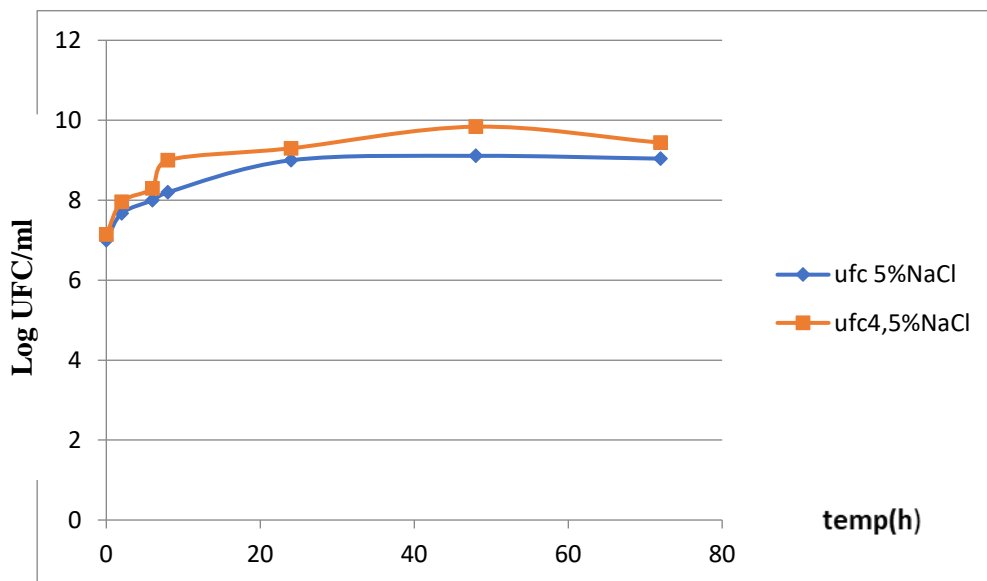


Figure 24: Cinétique de croissance de la souche Bm1 dans le milieu MRS Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl .

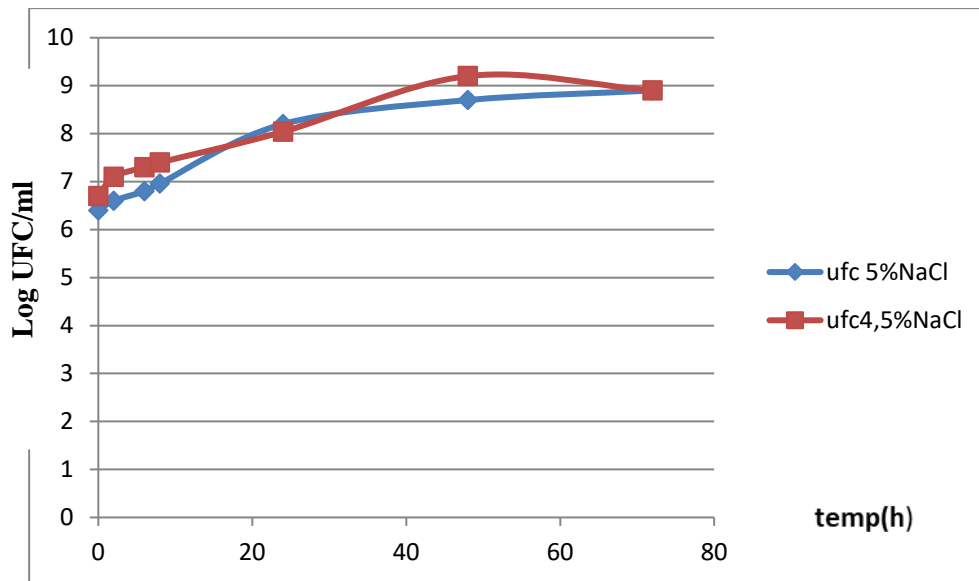


Figure 25: Cinétique de croissance de la souche B12 dans le milieu MRS Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl .

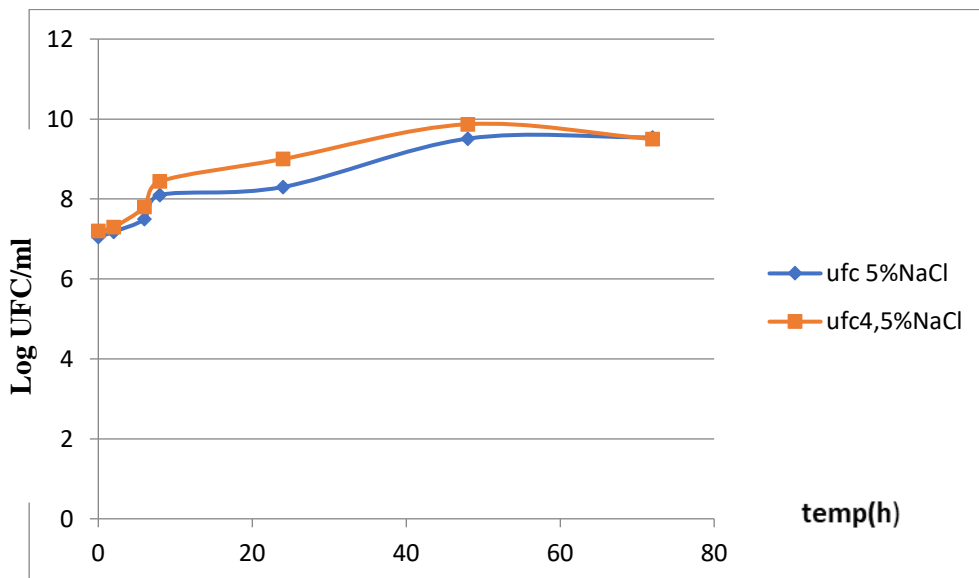


Figure 26: Cinétique de croissance de la souche B13 dans le milieu MRS Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl.

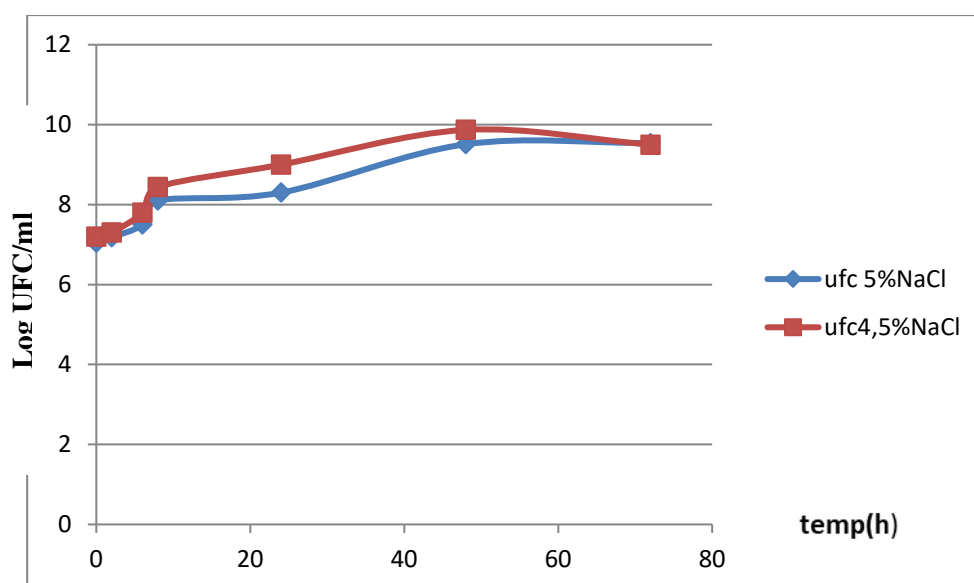


Figure 27: Cinétique de croissance de la souche Ba2 dans le milieu MRS Cystéiné à 4.5% et 5% NaCl.

9 L'antibiogramme

Comme toutes les bactéries la résistance ou la sensibilité des bifidobactéries aux antibiotiques est un critère qui contribue d'une part pour leur sélection et d'autre part pour leur classification. Les souches présentant un diamètre de zone d'inhibition supérieur à 15 mm sont considérées comme sensibles comme le montre le **tableau 15**

Tableau 15 : Résultats de l'évaluation de l'antibiorésistance des 5 souches étudiées.

L'antibiotique	Charge de disque	B11	B12	B13	Ba1	Ba2
Amoxicillin + Clavulanic Acid	20µg+10 µg	R	R	S	S	S
Cefazolin	30 µg	R	R	R	R	R
Cefotaxime	30 µg	R	R	R	R	R
Cefoxitin	30 µg	R	R	R	R	R
Cefsulodin	30 µg	R	R	R	R	R
Ceftazidime	30 µg	R	R	R	R	S
Cephalothin	30 µg	R	R	R	S	S
Ciprofloxacine	5 µg	S	S	S	S	S
Clindamycine	2 µg	S	S	S	S	S
Erythromycine	15 µg	S	S	S	S	S
Imipenem	10 µg	S	S	S	S	S
Netilmicine	30 µg	R	R	S	S	S
Nitrofurantoin	300 µg	S	S	S	S	S
Ofloxacine	5 µg	S	S	S	S	S
Oxacilline	1 µg	S	S	S	S	S
Pefloxacine	5 µg	S	S	S	S	S
Pristinamycine	15 µg	S	S	S	S	S
Rifampine	30 µg	S	S	S	S	S
Ticaracilline	75 µg	R	R	S	R	S

Tobramycin	10 µg	R	R	R	S	S
Trimethoprim-Sulfamethoxazole (co-trimoxazole,)	1.25 µg +23.7 µg	R	R	R	R	R
Vancomycin	30 µg	R	R	R	R	R

S : sensible / R : resistant

7 La mise en évidence des interactions

7.1 Les interactions entre les différentes espèces de *Bifidobacterium* et Les espèces pathogènes *E coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria*.

Les résultats des interactions des souches de *Bifidobacterium* dans le milieu MRS additionné de 0.05% de cysteine chloridrique et de 2mg/l d'acide nalidixique contenant 2% non tomponné sont représentés par le **tableau 16**

Ces résultats montrent une variabilité de taux de diamètre d'inhibition mais on constate que la plupart des souches ont inhibés les bacteries entéropathogenes

Tableau 16 : les diametres des zones d'inhibitions en mm lors des interactions des souches de *bifidobactrium* (**B11** , **B12** ,**B13** , **Ba1** , **Ba2**) avec les bacteries entéropathogenes .

Souches indicartices Souches hinibitrices	<i>E coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria</i>
B11	10mm	12mm	10mm
B12	11mm	//	09mm
B13	8mm	//	16mm
Ba1	9mm	8mm	11mm
Ba2	6mm	//	10mm

Discussion

Discussion

1. Isolement et identification phénotypique des souches

Deux facteurs sont très importants lors de l'isolement des Bifidobactéries, Le premier de ces facteurs est l'obtention des conditions anaérobies et le second est un milieu de culture adéquat (Rasic et Sad 1990).

Les conditions d'anaérobie sont facilement obtenues depuis l'utilisation des anaerocult ou les gas pack ou l'apparition des hottes anaérobies qui ont des atmosphères modifiées composées de 10% de CO₂ et de 90% de N₂(Shah, 1997 ; Scardovi, 1986) . Dans notre travail l'anaérobiose est assurée par l'utilisation des anaerocult plus bougie pour assurer les conditions citées au dessus dans des jarres d'anaérobioses.

De plus, les milieux de culture contiennent généralement des suppléments tels que la **cystéine**, chlorure de lithium , des sels métalliques, l'acide ascorbique et le sulfite de sodium qui réduisent le potentiel redox (Shah, 1997).

Le milieu utilisé été le MRS modifié, La propriété de ce milieu repose sur ces élément chimique, la cystéine-Hcl qui joue un agent réducteurs du potentiel d'oxydoréduction, (Tabasco et al., 2007). L' antibiotiques additionnés au milieu MRS est l'acide nalidixique , Il inhibe la croissance des bacilles Gram positif et Gram négatif (Karimi et al., 2012).

L'identification des souches basées sur des aspects morphologiques, macroscopiques et microscopiques. Les bacilles qui poussent sur les milieux MRS-cys formes de petites colonies dépourvues de toute activité catalase et oxydase confirme l'anaérobiose des souches isolées(Tabasco et al., 2007)..

Microscopiquement les souches B11,B12,B13,Ba1,Ba2 ,By1,Bm1 sont des Gram+ de forme bifide qui est la forme typique au bifidobactéries (Scardovi, 1986 ;Beerens, 1990 ; Tabasco et al, 2007).

L'observation microscopique des bifidobactérie cultivés sur milieu MRS cys représente des forme Y et V on a observé aussi un pléomorphisme après plusieurs repiquages. Ce pléomorphisme observé chez les bifidobacteries est souvent associé à la composition du milieu de culture aussi la morphologie cellulaire des bifidobactéries est influencées par la nature de la source de carbone (Tamime et al., 1995 ; Abdelmalek et al., 2009).

Les souches appartenant au genre bifidobactéries ne forment pas d'indole, ne possèdent pas une activité uréique et ne liquéfient pas la gélatine (Mitsuoka, 1984). Ces caractères biochimiques n'ont pas été constatés chez les souches retenues.

Selon de nombreuses études antérieures (Edwards et Parrett, 2002. Fanaro et al., 2003. Mahmoudi et al., 2013), les nourrissons allaités maternellement ont une flore intestinale stable riche en bifidobactéries à partir d'environ 7 jours de la vie; la principale source de la flore intestinal pour les nourrissons nés à terme est la flore de la mère figure (34) (Backhed et al., 2015). Ces taux élevés des bifidobactéries dans les selles, peuvent être expliqué par la présence des facteurs bifidogènes dans le lait maternel, tels que des oligosaccharides comme le galactose, le fucose et le N-acetylglucosamine, qui stimulent la croissance des bifidobactéries. L'absence de ces facteurs dans les préparations des laits pourrait expliquer la différence observée entre les flores des enfants nourris au lait maternel et ceux nourris au lait de vache (Tamime et al., 1995. Lee et al., 2015) et c'est ce qui nous a poussé à prendre des échantillons de selles de nourrisson allaités au sein et nait par voie basse pour favoriser plus de présence de souche Bifidobactéries dans nos isolats .

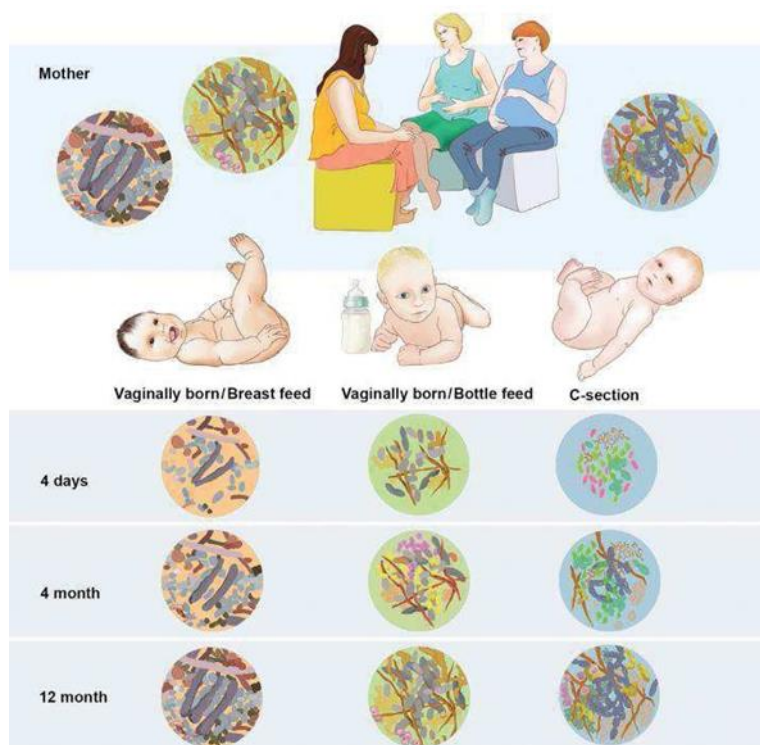


Figure 28: Microbiote humain durant la première année de vie selon (Backhed et al., 2015)

Selon (**Biavati et Mattarelli, 2006**) la recherche des acides lactique et acétique est aussi un moyen pour l'identification des bifidobactéries, car contrairement aux bactéries lactique qui produisent uniquement de l'acide lactique, les bifidobactéries produisent également de l'acide acétique avec 2/3 moles lactique/acétique respectivement.

La mise en évidence de ces deux derniers acides a été révélée par la haute performance liquide chromatographie (HPLC), effectivement après fermentation sur milieu MRS nos souches ont bien produit approximativement de l'acide lactique et l'acide acétique respectivement. Ce résultat nous a bien permis de classer nos souches au genre *Bifidobacterium*. Ces résultats ont également été notés par (**Dinakar et Mistry, 1994 ; Hilde et al., 2003 ; Elghali et al., 2012 ; Mehdi et al., 2015**).

Du point de vue physiologique, les bifidobactéries se caractérisent par leur activité enzymatique leur permettant d'utiliser de nombreux sucres, comme le lactose, le galactose, la raffinose, le sucrose, l'amylopectine, l'amylose et le xylan (**Kouame, 2013**).

En ce référant aux travaux précédents, l'ensemble des résultats de la fermentation des différents sucres nous a permis de classer nos souches en trois espèces suivantes ; *B. longum* (B11, B12, B13, Ba2), *B. breve* (By1, Bm1) et *B. Asteroides* (Ba1).

La différenciation des espèces de bifidobactéries repose sur la fermentation des carbohydrates. En effet, (**Schell et al., 2002**) ont démontré que la souche NCC 2705 de *Bifidobacterium longum* possède des gènes codant pour des enzymes (fumarase, oxoglutarate déhydrogénase, et le malate déhydrogénase) qui permettent la dégradation de plusieurs sucres (arabinose, xylose, ribose, cellobiose, melibiose, maltose, raffinose et mannose) . Les résultats ont démontré que les souches B11, B12, B13, Ba2 fermentent presque tous les sucres testés (fructose, ribose, glucose, lactose, le xylose, rhamnose et le melezitose) sauf l'inuline, sorbitol, le cellobiose, le tréhalose ainsi que le salicine. cela se confirme aussi par les travaux réalisés récemment par **Arboleya et al., 2018** sur le catabolisme des carbohydrates du génome de *Bifidobacterium longum* d'enfant..

La comparaison du profil fermentaire de cette souche avec le profil fermentaire décrit par **Mitsuoka, (1984)** et **Scardovi, (1986)** nous a permis de l'identifier comme *Bifidobacterium longum*.

De même, le profil fermentaire de la souche Ba1 a montré que cette dernière fermentent également presque tous les sucres à part l'arabinose, le salicine, melezitose, tréhalose, et le

sorbitol. Cette particularité nous a mené en référant à la littérature que la souche Ba1 appartient à l'espèce *asteroides* qui est une espèce spécifique aux abeilles.

Contrairement aux autres, les souche By1 et Bm1 se particularisent qu'elles ont fermenté 9 sucres (sorbitol, tréhalose,melezitose,salicine, celebiose, fructose,ribose, lactose,et le glucose) de 13 sucres testés. En effet. Cette souche n'a pas dégradé, le rhamnose, l'arabinose,et le xylose et son profil suggère de la classer parmi l'espèce *Bifdobacterium breve*.

Ces 3 espèces isolées *B. longum*, *B. breve* et *B. asteroides* sont fréquemment isolées et prédominantes dans la microbiote fécale des nourrissons allaités au sein , l'intestin des abeilles ainsi dans plusieurs produits commercialisé contenant des bifidobactéries utilisées comme additifs probiotique. D'ailleurs, ces résultats obtenus se conforment avec les résultats obtenus par (**Hadadji et al., 2005. Benkaddour et al., 2015. Mahmoudi et al ., 2013**).

2. Identification génotypique des souches

Depuis l'évènement de la technologie de l'ADN recombinant dans les années 1970 et jusqu'au milieu des années 1990, les scientifiques ont été limités dans leurs investigation à une approche réductionniste basée, au mieux sur un petit groupe de genes ou de protéines (**Callanan 2005**) .aujourd'hui avec l'émergence de techniques à haut débit, les génomes entiers des micro-organismes peuvent être séquencés rapidement et a faibles cout, et j'usqu'en Aout 2011 les séquences complètes et annotées de 1698 bactéries étaient librement accessibles sur le site du National Center for Biotechnology Information (**NCBI : www.ncbi.nlm.nih.gov**). Parmi elles figuraient 36 souches de lactobacillus et 22 souches de Bifidobacterium, les deux principaux genres représentant les probiotiques actuellement sur le marché. Cette revolution génomique a favorisé l'apparition de stratégies et d'outils innovants pour l'analyse des déterminants des propriétés et activités probiotiques.

La comparaison des séquences du gène rARN est actuellement considéré comme la méthode la plus puissante et précise pour déterminer la mesure dans laquelle les micro-organismes sont phylogénétiquement liés (**Woese., 1987**). L'avancement dans les techniques de biologie moléculaire ont permis de séquencer une longue sonde du gène ARNr. Initialement, la transcription inverse a été utilisée pour générer l'ADN à partir de ARNr, et cet ADN a ensuite été séquencé. Il est maintenant possible de séquencer 16S ou 23S d'ADNr par séquençage direct PCR, et cette méthode a généré une grande base de données de séquences. Bien que la spécificité des séquences se trouvent dans la première moitié du gène de l'ARNr

16S (V1-V3 région), l'identification est plus précise si le gène entier est séquencé (**Stackebrandt et al., 1994**). Cela nécessite le séquençage d'environ 1500pb de ADN.

La méthode la plus couramment utilisée pour l'analyse globale de l'expression génique chez les bactéries utilise les puces à ADN. Son principe est basé sur l'hybridation comparative de populations d'ARN messager accumulés dans les cellules soumises à différents traitements. Concrètement pour chaque condition, les ARNm totaux des cellules sont extraites sélectivement puis copiées par PCR en ADN complémentaires (ADNc) monocaténares. Ces ADNc cibles sont alors marqués par fluorescence, leur synthèse se déroule en présence d'une base nucléotidique modifiée. Les deux populations d'ADNc cibles sont ensuite mélangées et hybridées sur une même biopuce (portant les ADN sondes). A la lecture de la puce, le signal obtenu correspond au rapport de fluorescence des cibles de la population 2, traduisant la modification du niveau d'expression des gènes entre les deux conditions.

Après des comparaisons entre l'identification phénotypique, et les traitements bioinformatiques des résultats génotypiques nos 7 souches sont identifiées comme étant *Bifidobacterium. longum sup longum* (B11, B12, B13, Ba2), *Bifidobacterium. breve* (By1, Bm1) et *Bifidobacterium. Asteroides* (Ba1)..

Dans notre travail, nos études ont été faites en collaborations avec le laboratoire **Diag Gene** à Anger en France pour faire une identification génotypique et un séquençage complet de nos souches.

3. Caractérisation technologique des souches étudiées

Le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques. Ainsi la capacité de survie des probiotiques dans l'hôte après leur ingestion, dépend de leur résistance intrinsèque, des facteurs de l'hôte et du véhicule par lequel ils ont été intégrés (**Marteau et al., 2003. Cionci et al., 2018**). Parmi les facteurs de l'hôte qui réduisent la survie des probiotiques, on cite principalement l'acide gastrique, l'oxygène, le potentiel redox, les sels biliaires, les autres sécrétions digestives et l'interaction avec la flore endogène (**Godward et al., 2000**). Compte tenu de tous ces facteurs, il est donc recommandé de consommer des probiotiques à des doses appropriées pour obtenir les effets bénéfiques escomptés 10⁹ UFC/jour.

En général, les bifidobactéries ont été rapportés pour être résistants à l'acide gastrique, le suc pancréatique et la bile, mais de grandes différences existent entre les souches (**Shigeru et al., 2001. Li et al., 2018**).

Les bifidobactéries sont généralement sensible a des pH inférieurs à 4.6 (**boylston et al., 2004**). Cependant les souches de *Bifidobacterium animalis* montrent une résistance au pH acide que d'autres espèces appartenant au genre de Bifidobacterium (**Jayamanne et Adams, 2006**).

Les bifidobactéries préfèrent les milieux neutres ou légèrement acides a des pH compris entre 5 et 8 (**Rommond et al, 1992 ; Wang et Gibson, 1993 ; Akalin et al., 2004 ; Collado et al., 2006**).

La résistance des bifidobactéries à l'acidité est importante pour avoir de bon effet thérapeutique et pour garder sa viabilité dans les produits fermentés (**Takiguchi et Suzuki, 2000**).

Plusieurs facteurs influencent la viabilité des bactéries probiotiques ces facteurs regroupent : l'acidité du produit, acidité produisait durant le stockage ou post acidification le degré d'oxygène dans le produit, la sensibilité aux substances antimicrobiennes produisait par les bactéries lactiques (**Gilliland et al., 2002. Li et al ., 2018**).

4. La mise en évidence des critères probiotiques des souches étudiées

L'une des principales conditions pour qu'une souche réponde à la définition de probiotique est qu'elle reste viable à la production à la consommation et pendant le transit gastro-intestinal (FAO). Les bactéries sont confrontées à la forte acidité des sucs gastriques, composés essentiellement d'acide chlorhydrique et pepsine (**Van de Guetche et al ., 2002**). Un pH de 1.5 est atteint à jeun dans l'estomac et augmente à des valeurs comprises entre 3 et 5 au cours de l'alimentation (**Cotter et al., 2007**). L'acidité est ensuite progressivement neutralisée lors de son passage dans le duodénum (**Shulkers et al., 2006**).

La perte de viabilité à pH 6 était négligeable pour la totalité des souches testées, dont la portion de cellules viables après 3h d'incubation était presque maximale.

Lors de l'exposition à pH 3, la souche longum a maintenu la plus grande portion de cellules viables, suivi par la souche astéroïdes ; le plus faible taux de survie pour ce pH est noté par la souche Ba1.

Pour le pH 4, la plus grande portion de cellule ayant maintenu leur viabilité à la fin de la période d'exposition est enregistrée par la souche longum, suivie par les souches astéroïdes par des taux les plus faibles.

Il apparaît que la résistance à l'acidité varie selon la souche et le pH considéré. Les souches du groupe B longum montrent une résistance remarquable et il semble que B longum soit plus résistante que B breve aux conditions gastriques. Cette observation n'est cependant pas généralisée mais elle est similaire avec d'autres études (**Roopashri et al., 2009**, **Mehdi et al., 2015**, **Djellid et al., 2015**).

Le dénombrement par culture sur boîte gélosé ne détermine que les cellules cultivables est ignore le nombre vraiment réel des cellules vivantes (**Lahtinen et al., 2006**). Mais malgré ces limites les études comparatives donnent une vision préliminaire de la résistance relative des souches aux conditions gastriques (**Izquierdo et al., 2009**).

Les effets de la bile sur les cellules bactériennes sont multiples. Ils englobent une action détergente, la baisse du pH intracellulaire, la dégradation de l'ADN, ainsi que des stress osmotique et oxydatif (**Begley et al., 2009**). Par conséquent, cette diversité des effets doit être prise en compte dans les études portant sur le stress biliaire. Bien que les mécanismes de survie des bactéries aux effets de la bile ne soient pas bien compris, un certain nombre de voies ont été mises en évidence comme l'identification des marqueurs potentiels de la tolérance à la bile (**Sanchez et al., 2012**).

Les souches isolées étudiées ont montré une bonne croissance en milieu additionné de 3% ,0.4%,0.5% et de 2% de sels biliaires ; alors que les souches de bifidobactéries mise en contact avec des concentrations plus élevées telle que 3% ;4% ;et 5% ne marque aucune croissance. Effectivement, il a été démontré que les bifidobactéries dégradent les sels biliaires, ce critère probiotique est dû à une enzyme qui hydrolyse les sels biliaires(BHS), cette enzyme a été isolée de la souches B .longum BB536 par (**Grill et al., 1995**) , et chez la souche B. longum SBT2928 par (**Tanaka et al., 2000**). Ce qui se confirme avec les résultats obtenus par **Delgado (2008)**, **Mahmoudi (2013)** et **Mehdi (2015)**

Les mécanismes adaptatifs de tolérance aux sels biliaires pourraient conduire à une meilleure adaptation à l'environnement colique et aux sources de carbone disponibles ainsi qu'à une augmentation de la viabilité persistance de Bifidobacterium dans l'environnement intestinal (**De los Reyes-Gavillan et al., 2005**, **Turrioni et al., 2016**).

Les résultats obtenus ont montré une bonne résistance vis-à-vis des enzymes pancréatiques ainsi que les sucs gastriques et cela est un bon indice prouvant que nos souches possèdent un caractère probiotique. En effet, nos résultats concordent avec ceux obtenus par **Hemdi (2008)** ou il a testé le pouvoir probiotique des lactobacillus isolées de lait de chamelle.

Tous ces résultats trouvés peuvent nous conduire à considérer que nos souches Bifidobactéries isolées ont un bon potentiel probiotique.

1. Cinétique de croissance à différentes concentration de salinité en culture pure:

Pour la croissance de nos souches à différentes concentration de salinité, on a remarquée une croissance variable et cela en rapport avec la concentration de NaCl du milieu. L'inhibition de croissance de toutes les souches à 5.5% de NaCl était totale, y a pas une souche qui y a pu résister à cet concentration ce qui nous laisse peut être expliquer notre difficultés à isoler des souches de bifidobactéries isolées de l'eau de mer contaminer par des rejets urbains à fin de pouvoir favoriser la présence de ces derniers dans ce dernier et la difficulté de ces souches à résister à telle pression osmotique.

La croissance de nos souche à une concentration de 5% était modéré et un peu lente par rapport à la croissance à 4.5%. Une étude de **Amar et al 2016** qu'un total de 15 souches de deux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* isolés du beurre et du lben, ont fait l'objet d'une étude sur la résistance saline et on démontrait une variabilité de résistance à différents seuils de concentration saline et que la croissance des bactéries s'arrête lorsqu'elles subissent un stress salin qui est dû à une forte concentration de NaCl dans le milieu, car des mécanismes de détresse se mettent en place pour éviter la mort cellulaire. La principale réponse à un choc osmotique consiste en l'accumulation dans le cytoplasme de molécules protectrices.

Les souches isolées résistent à l'acide nalidixique et la Vancomycine. Ces antibiotiques sont utilisés comme agents sélectifs dans les milieux pour l'isolement et le dénombrement des bifidobactéries (**Ventoura, 2004 et Vlkova et al., 2005**). La résistance des bifidobactéries aux antibiotiques cités au dessus sont signalés par plusieurs auteurs (**Ammor et al., 2007 ; D'AIMMO et al., 2007. Bahloul et al 2012**).

Les bifidobactéries sont généralement sensibles aux antibiotiques beta-lactamine (penicilline, ampicilline, amoxicilline, piperacilline et ticarcilline) (**Ammor et al., 2007 ; D'AIMMO et al., 2007 ; Ouoba et al., 2008 ; Mehdi et al., 2015**). On a constatés que nos

souches étudiées ont un grand spectre de sensibilités en vers un nombre important d'antibiotiques utilisés.

Yazid et al., (2007) ont montré que les bifidobactéries sont plus résistantes à un grand spectre d'antibiotiques par rapport aux lactobacilles et les propose comme un agent d'équilibre durant le traitement aux antibiotiques.

D'après une étude de **Charteris et al., (1998)** ont constaté en étudiant 46 souches de *Lactobacillus* d'origine humaine et alimentaire qu'une minorité de souches ne présentent pas une résistance typique aux antibiotiques cela diminue la possibilité de les utiliser comme agent probiotique ou bactériothérapeutique, mais la majorité des souches possède une résistance naturelle à un large spectre d'antibiotiques cliniquement importants peut permettre le développement d'antibiotiques / probiotique thérapies combinées .

L'utilisation d'antibiotiques et l'évaluation de sécurité des souches probiotiques doivent être exécutées avant l'application technologique ou probiotique avec l'importance des programmes combinés antibiotiques/probiotiques qui est une fonction très diverse et que l'on retrouve chez les principales espèces bactériennes, en particulier chez les bactéries lactiques et les bifidobactéries (**Arauz et al., 2009 .Alboleary et al., 2016**).

La majorité des souches étudiées possèdent un pouvoir inhibiteur des souches pathogènes *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, *Escherichia coli*. Les diamètres d'inhibition varient selon le genre et l'espèce, et la bactérie pathogène ciblée . Des études similaires ont montré que les substances antibactériennes produites par des souches probiotiques ont des effets individuels ou en synergie pour inhiber la croissance des bactéries pathogènes. (**Mahmoudi et al., 2013**).

Les bifidobactéries possèdent une activité inhibitrice contre un grand spectre des bactéries pathogènes comme *E.coli*, *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, *Listeria* et les rotavirus (**Bermudez-Brito et al., 2012**). Plusieurs souches de *Bifidobacterium* ont la capacité de produire une bactériocine spécifique il s'agit de bifidocin B, à partir de *B.bifidum* qui est active sur les bactéries à Gram positive. Les bifidobactéries possèdent une forte activité inhibitrice contre plusieurs bactéries pathogènes comme *Salmonella enterica* et *E.coli* (**Saez-Lara et al., 2015**).

Conclusion

Conclusion

Les probiotiques constituent un thème de recherche majeur de XXI ème siècle. Beaucoup d'études ont démontré les effets bénéfiques des bactéries lactiques et bifidobactéries du potentiel probiotique ceci a mis l'importance sur la recherche techniques et stratégies analytiques permettant de différencier les souches ayant un réel interet probiotique.

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés à l'isolement des *bifidobacterium* à partir des différentes origines selles des nourrissons, intestin d'abeille , yaourt et lait maternelle commercialisé .

Nous avons choisi d'étudier des propriétés bacterienne qui sont utilisées en priorité lors de la sélection des souches d'intérêt probiotique, en incluant des caractères technologiques et caractères biologiques : résistance aux conditions gastro-intestinales, tolérance a la bile,suc gastrique et salinité faisant d'elles de très bonne candidates pour des applications technologiques.

Pour notre travail nous avons sélectionné trois souches de bifidobacterium d'origine humaine de selles des nourrissons allaités maternellement, deux souches de *bifidobacterium* d'origine animal des intestin d'abeilles et deux souches d'origine commerciale de yaourt et de lait maternelle commercialisée..

Après plusieurs identifications phénotypique et genotypique les 7 souches été sélectionnées comme suit 3 souche de *Bifidobacterium longum subsp. Longums* indiqué comme B11 , BI2, BI3 isolés à partir de selles de nourrisson .A partir des intestins d'abeilles on a isolés 2 souche de bifidobactéries indiqué comme *Bifidobacterium longum subsp. Longums* Ba1 et *Bifidobacterium astéroïdes* Ba2. A partir du yaourt Activia on a isolé 1 souches de *Bifidobacterium breve* indiqué comme By1 et à partir du maternelle commercialisé on a pu isoler une seul souche de *Bifidobacterium breve* indiqué comme Bm1

Parmi les propriétés bactérienne importantes pour l'activité probiotiques il ya la résistance à l'acidité gastro-intestinale, la tolérance à la bile , le suc gastrique et la résistance à certains conditions de production industrielle . La sériedes 5 souche de *Bifidobacterium longum subsp. Longums* indiqué comme B11 , BI2, BI3 isolés à partir de selles de nourrisson ,la souches de *Bifidobacterium breve* indiqué comme By1 isolés de yaourt et à partir du maternelle commercialisé la souche de *Bifidobacterium breve* indiqué comme Bm1d'origine humaine et commercial ont montrés qui possèdent un pouvoir acidifiant très élevés possédant

une résistance et tolérance a la bile très importantes par rapport aux souche souche de bifidobactéries indiqué comme *Bifidobacterium longum subsp. Longums* Ba1 et *Bifidobacterium astéroïdes* Ba2 isolés d'intestin d'abeille d'origine animale.

La séries de nos 7 souches a pu montrés une certaine résistance de croissance a des concentration de NaCl assez significative , ce qui nous laisse prédire leurs utilisation dans des production d'aliment à une certaine concentration de salinité donné .sa nous laisse aussi prédire qu' ils ont aussi un certain pouvoir de résistance à certaine pression osmotique du fait qu'il est une corrélation direct entre la concentration de Nacle et la pression osmotique

Ceci met en évidence le fait que le caractère probiotique d'une souche sera toujours basé sur un arrangement de plusieurs critères dans le but d'arriver à une collaboration entre certaine propriétés très bien exprimés.

Dans cette étude, on a pu mettre un certain nombre de tests qui révèlent des caractères probiotiques a partir des bactéries localement isolé et caractériser.

Perspectives

La recherches de l'agent inhibiteur (acide ,bactériocine...)

Des tests invivo de nos souches localement isolé et caractériser qui révèlent un certains nombre de caractères probiotiques.

Une étude approfondie de la résistance de nos souches à la salinité.

Références bibliographiques

Abdelmalek.A, Bey.F, Y.Gheziel, A.Ait Abdeslam, M.Meribai, L.Medouakh and A.Bensoltane .(2009). Viability and resistance to acidity of bifidobacterium sp in Algerians bio yogurts. *Egy JO of Appl Sci* 24: (2A) 193-201.

Abdelmalek.A, Heyndrickx.M, Dali Y, Bensoltane.A.(2015).Determination of survival and resistance to acidity as probiotic potential of infant and calf faecal Bifidobacteria. (2015). *IOSR Jour of Pharm & Bio Sciences* 10: 1-4.

Abdelsalam, M.H., Saleh, F. A., Kholif. A. M., El-Sayed, E. M., Abdou, S. M., El-Shibiny,S.,(2004). Isolation and characterization of bacteriocins produced by *Bifidobacterium lactis* BB-12 and *Bifidobacterium longum* BB-46. *9th Egyptian conference for dairy science and technology, Cairo, Egypt, 9-11 .*

Adlerberth,” I., E. Lindberg, N. Aberg, B. Hesselmar, R. Saalman, I.L. Strannegård & A. E. Wold (2006) Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? *Pediatr Res*, 59, 96-101.

Agrawal A, Houghton L.A., Morris J., Guyonnet D., Goupil Feuillerat N., Schlumberger A., Jakob S. and Whorwell P.J (2009). Effets d'un lait fermenté avec le probiotique *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 sur la distension abdominale, le temps de transit gastrointestinal et les symptômes digestifs chez des sujets atteints du syndrome de l'intestin irritable avec constipation.

Akalin, A.S., Fenderya,S and Akbulut, N.(2004).Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharides during refrigerated storage. *International Journal of food Science.*39:613-62

Amar, R; Manaa, A; Benachour, K (2016).Etude de la résistance à la salinité de quelques bactéries lactiques isolées du smen traditionnel URI: <http://univ-bejaia.dz/dspace/123456789/5476>

Ammor M S , Florez A B, Mayo B.(2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Microbiology* 24:559–570.

Arboleya S ,botaccini F , O’Connell M, Anthony R , Ross R.P , D van Sinderen and Stanton C .(2018) .Gene-trait matching across the *bifidobacterium longum* pan-genome reveals considerable diversity in carbohydrate catabolism among human infant strains.

Alboleya,S., Sanchez,B., Solis, G., Fernadez ,N.,Suarez ,M.,Milani, C., et al.(2016) Impact Of Permaturacy and perinatal antibiotics on the developpement intestinal microbiota:A functional inference study.int.J.Mol.Sci.17(05)649

Arauz L., Faustino Jozala A., Gava P.,Vessoni Penna(2009) . a Production et application biotechnologiques de nisine: Tendances en science et technologie alimentaires Volume 20, numéros 3–4 , avril 2009 , pages 146-154

• **Bahloul H, Hadadji M, Guessas B, Saidi N and Kihal M (2012)**. Characterization and Technological Properties of Bifidobacterium Strains Isolated from Breast-fed Infants, Journal of Food Science and Engineering 2 (2012) 576-582.

Bäckhed F, Josefine R,Yangqing P, Qiang Fet al.(2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. Cell Host & Microbe 17, 690–703

Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich and J. I. Gordon (2005). "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." Proceedings of the National Academy of Sciences 101(44): 15718-15723.

Ballongue ,J., Grill J.P.et Baratte-eulooge, P.(1993). Action sur la flore intestinale de laits fermentés au Bifidobacterium. Laits 73 : 249-256.

Baratte-Euloge P, 1992. Action comparée sur la flore intestinale de trois laits fermentés au Bifidobacterium. Evaluation de propriétés probiotique et du comportement de la souche BB536 Bifidobacterium longum chez l'homme. Thèse de doctorat. Université de Nancy 1.

Baumgart D. C., Dignass A. U., 2002. Intestinal barrier function. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 5, 685-94

Beerens,H.(1990).An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *LettersinAppliedMicrobioiogy.II:155-157*.

Begley, M. , Kerr, C. , Hill C. (2009). Exposure to bile influences biofilm formation by *Listeria monocytogenes* . *Gut Pathog* 1,11.

Bensoltane A.(1997). Etude bibliographique sur la caractérisation de Bifidobacterium sp.annales de l'université d'Oran. 5-31.

Benkaddour B (2013). Caractérisation des bifidobactéries isolées des selles des nourrissons et leur viabilité dans le lait de chamelle stérile. Thèse de magister, Université d'Oran, Es-Senia.

Bermudez-Brito M., Plaza-Díaz J., Muñoz-Quezada S., Gómez-Llorente C., Gil A(2012) Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Institute of Nutrition and Food Technology 'José Mataix', Biomedical Research Center, University of Granada, Armilla, Spain

Bezirtzoglou, E., A. Tsiotsias & G. W. Welling (2011) Microbiota profile in feces of breastand formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe*, 17, 478-82. Probiotic Mechanisms of Action

Bonnemaison, E., P. Lanotte, S. Cantagrel, S. Thionois, R. Quentin, C. Chamboux & J. Laugier (2003) Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection. *Biol Neonate*, 84, 304-10.

Biavati B And Paola M, 2006. The Family Bifidobacteriaceae. CHAPTER 1.1.2, *Prokaryotes* (2006) 3:322–382.

Bjorksten B., 2004. Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Seminras in Immunopathology*, 25, 257-270.
Blaut M., 2002. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*, 41, 11- 16.

Bottacini F., Ventura M., Van Sinderen D., Motherway M O. (2014). Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories*.13 (Suppl 1):S4

Buchanan R., Gibson N. E., Cohen S., Holt J. G and Staner R. Y., (1974). bergey's manual of determinative bacteriology. Eighth edition. Ed. Williams and willins company 1246

Bukowska H., Pieczul-Mroz J., Jastrzebska M., Chelstowski K., & Naruszewicz M., 1998. Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis* 137, 437–438.128

Callanan, M. (2005). Mining the probiotic genome: advanced strategies, enhanced benefits, perceived obstacles. *Curr Pharm Des* 11: 25–36.

Campeotto, F., A. J. Waligora-Dupriet, F. Doucet-Populaire, N. Kalach, C. Dupont & M. J. Butel (2007) [Establishment of the intestinal microflora in neonates]. *Gastroenterol Clin Biol*, 31, 533-42.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K.(1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journ Appl Microbiol* 84, 759–768.

Cheikhyoussef A, Pogori N , Wei C and Zhang H (2008). Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application. *International Journal of Food Microbiology, Inpress*.

Cheikhyoussef, A., Pogori, N., Zhang, H., (2007). Study of the inhibition effects of *Bifidobacterium* supernatants towards growth of *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *International Journal of Dairy Science* 2, 116-125.

Chung, H. S. J. Pamp, J. A. Hill, N. K. Surana, S. M. Edelman, E. B. Troy, N. C. Reading, E. J. Villablanca, S. Wang, J. R. Mora, Y. Umesaki, D. Mathis, C. Benoist, D. A. Relman & D. L. Kasper (2012) Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*, 149, 1578-93.

Coinci, N. B., Baffoni, L., Gaggia, F., Di Gioia, D (2018). Therapeutic Microbiology: *Bifidobacterium Breve* as food supplement for the prevention treatment of Paediatric Diseases

Collado, M.C., Moreno, Y., Cobo, JM., and Hernandez, M.(2006). Microbiological evaluation and molecular characterization of bifidobacteria strains in commercial fermented milks. *European food research technological*. 222: 112-117.

Collins EB., Hall BJ. (1984). Growth of bifidobacteria milk and preparation of *Bifidobacterium infantis* for a dietary adjunct. *Journal of Dairy Sciences* 67(7):1376– 80.

Comalada, M., E. Bailon, O. de Haro, F. Lara-Villoslada, J. Xaus, A. Zarzuelo and J. Galvez (2006). "The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype." *J Cancer Res Clin Oncol* 132(8): 487-97.

Campeotto, F., A. J. Waligora-Dupriet, F. Doucet-Populaire, N. Kalach, C. Dupont & M. J. Butel (2007) [Establishment of the intestinal microflora in neonates]. *Gastroenterol Clin Biol*, 31, 533-42.

Crociani, F., Biavati, B., Alessandrini, A., Chiarini, C, et Scardovi, V. (1996). *Bifidobacterium inopatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol* 46:564-571.

Cummings J. H., Gibson G. R., & Macfarlane G. T., 1989. *Quantitative estimates of fermentation in the hind gut of man. Acta Veterinaria Scandinavica*, 86, 76-82.130

Dann SM, Eckmann L (2007). Innate immune defenses in the intestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 23: 115-12.

Djellid Y(2015) . étude comparative des propriétés technologique et probiotiques des souches de bifidobactéries indigènes et celle utilisé en industrie laitière

De Vries,W. et Stouthamer,A.H.(1967). Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *J.Bacteriol.*, 93:574-576.

De Vries,W. et Stouthamer,A.H. (1968). Fermentation of glucose, lactose. galactose, mannitol and xylose by bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 96(2): 472-478.

Deguchi, Y., Morishita, T., & Mutai, M. (1985). Comparative studies on synthesis of water soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 13–19.

Delgado S., Florez A.B. and Mayo B. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr. Microbiol*, 50: 202–207.

Delcenserie V., China B., Gavini F., Beerens H., Daube G (2002). Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments : le genre *Bifidobacterium*. *Ann. Méd. Vét*, 146: 279-293

Desjardins,M.-L., Roy,D. et Goulet,J. (1990). Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *Journal of Dairy Science.*; 73(2): 299-307.

De los Reyes-Gavillan C.G., Ruas-Madiedo P., Noriega L., Cuevas I., Sanchez B et Margolles A. (2005). Effect of acquired resistance to bile salts on enzymatic activities involved in the utilization of carbohydrates by *Bifidobacteria*. *Lait*. 85,pp : 113-123.

Deng Y, Misselwitz B, Dai N (2015), Fox M. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. *Nutrients* 2015 Sep 18;7(9):8020-35

Dinakar, P., & Mistry, V. V. (1994). Growth of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 77, 2854–2864.

Dong, X., Xin, Y., Jian, W., Liu, X. and Ling, D. (2000). *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal Systematic Evol Microbiol.*, 50,119–125.

Dunne, C.L., L.M. O'Mahony, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. O'Sullivan, F. Shanahan and J.K. Collins, (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 386- 392.

D'Aimmo M R , Modesto M, Biavati B.(2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology* 115 : 35–42

Edwards, C.A., Paret, A.M., (2002). Intestinal flora during the first months of life : New perspectives. *Brit.J.Nutr.* 88 : S11-S18.

Elghali S, Shuhaimi M, Mehrnosh A, Mohd Y A M, Amin I, Faridah A, (2012). Bioconversion of daidzein to equol by *Bifidobacterium breve* 15700 and *Bifidobacterium longum* BB536, *journal of functional foods*, 4: 736-745.

Fanaro, S., Chierici, R., Gurrini, P., Vigi, V., (2003). Intestinal microflora in early infancy : composition and development. *Acta Paediatr., Suppl.* 441 :48-55.

FAO/WHO (2002) Report of a Joint FAO-WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.

Feng, J., S. J. Lee and S. Resta-Lenert (2005). "Effect of probiotic and commensal bacteria on vitamin D-receptor and calcium transport protein expression in intestinal epithelial cells in vitro. " *Gastroenterology* 128: A-47204

Flourie B, Nancey S (2007). Propriétés fonctionnelles des probiotiques. *Cah Nutr Diet* 42(3 Hors-série 2): 2S 38-44.

Francino M (2014). Early development of the Gut Microbiota and Immune Health. *Pathogens* ,3,769-790.

Fuller R , (1992). Probiotics in human medicine. *Gut*.32: 439-442.

Guarner F, Aamir G, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, Justus Krabshuis, Ton L et Gonvers J. (2011). « World Gastroenterology Organisation Global Guidelines - Probiotiques et Prébiotiques ».

Gavini F, Pourcher A.M, Bahaka D, Freney J, Romond C, and Izard D (1990) . Le genre *Bifidobacterium* .classification, identification, aspect critiques, *Méd. Mal infect.*20: 53-62.

Gibson G.R. and Wang X. (1994). Enrichment of Bifidobacteria from Human Gut Contents by Oligofructose using Continuous Culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, 118: 121-128.

Gibson G. R., et Roberfroid M.B., (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prébiotics. *J. Nutr.* 125. 6 : 1401-1412.

Gill, H. S. (2003). Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastro-intestinal tract. *Best.Pract.Res.Clin.Gstroenterol.* 17:755- 773.globosum, subjective synonym of *Bifidobacterium pseudolongum*, and description of *Bifidobacterium pseudolongum subsp. pseudolongum* and *Bifidobacterium pseudolongum subs. globosum* . *Syst. Appl. Microbiol.* 15:380-385.

Godward, G., K. Sultana, K. Kailasapathy, P. Peiris, R. Arumugaswamy and N. Reynolds (2000). "The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods " *Milchwissenschaft* 55(8): 441-445.

Gournier-château N., Larpent J. P., Castillanos M. I., & Larpent J. L.,(1994). Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Édition Technologie et documentation Lavoisier pp. 1-192, Paris, France.

Gosselink M. P, Schouten W. R., van Lieshout L. M., Hop W. C., Laman J. D., & Ruselervan Embden J. G., (2004). Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Disease of Colon and Rectum*, 47, 876-884.

Grill, JP ; Grociani J ; Ballongue, j (1995). Effects of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines letters, *appl, microbiol* .20 :328+330.

Guandalini S., (2002). Use of *Lactobacillus*-GG in paediatric Crohn's disease. *Digestive and Liver Disease*, 3, 63-65.

Hassinen, J. B., G. T. Durbin, R. M. Tomarelli, and F. W. Bemhart. (1951). The minimal nutritional requirement of *Lactobacillus bifidus*. *Journal. Bacteiology*. 62:771-776.

Heddadji M, (2007). Caractérisation Microbiologique et Biochimique des Bifidobactéries isolées à partir des selles de nourrissons. Etude des critères Technologiques et Thérapeutiques. Thèse de doctorat, Université d'Oran, Es-Senia.

Hadadji M., Benaama R., Saidi N., Henni, D. E et kihal, M. (2005). Identification of cultivable bifidobacterium species isolated from breast-fed infants feces in west-Algeria. *African journal of biotechnology* vol. 4 5

Heping Z et Cai Y, (2014). Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice.

Hilde M. Østlie, Merete H. Helland, Judith A. Narvhus, (2003). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology* 87 (2003) 17– 27.

Holzappel, W. H., Haberer, O., Snel, J., Schillinger, U., & Huis in't Veld, J. H. J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85–101.

Holzappel. Wilhelm Hl, Haberer P, Geisen,P Björkroth J, and Ulrich S (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*,73(suppl):365S–373S.

Hooper L. V., & Gordon J. I., (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292, 1115-1118.

Huffnagle, G. B. (2010) The microbiota and allergies/asthma. *PLoS Pathog*, 6, 549.

Hughes, D. B., and D. G. Hoover. (1991). Bifidobacteria-their potential for use in American dairy products. *Food Technol.* 45(4):75.

Isolauri E., Salminen S., & Ouwehand A. C., 2004. Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18, 299-313.

Izquierdo Alegre, E. (2009) . les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, Strasbourg.

Jayamanne, V. S., & Adams, M. R. (2006). Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bioyoghurts. *Letters in Applied Microbiology*,

42, 189–194

Jiang T., Mustapha A., & Savaiano D. A., (1996). *Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing Bifidobacterium longum.* *Journal of Dairy Sciences*, 79, 750-757.

Karimi Reza, Amir M. Mortazavian, Atefeh Amiri-Rigi, (2012). Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese, *Food Microbiology*, 29: 1-9.

Kagnoff, M. F., & Eckmann L., (1997). Epithelial cells as sensors for microbial infection. *Journal of Clinical Investigation*, 100, 6-10.

Kneifel, W., Jaros, D., et Erhard, F. (1993). Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 18: 179-189.

Kouame – S M, (2013). Contribution a la gestion des risques de contamination microbienne et diversité génotypique des espèces du genre *bifidobacterium* isolées de la chaîne de production du lait local a Abidjan. Thèse de doctorat, Université Nangui Abrogoua

Lahtinen, S.J., Jalonen, L., Ouwehand, A.C. (2007) .Specific *Bifidobacterium* strains isolated from elderly subjects inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol* 117:125–128.

Lamoureux .L.(2000).Exploitation de l'activité B-galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides ; Mémoire M.Sc. l'université LavalCanada.

Lauer. E, Kandler.O, (1976). Mechanismus der Variation der Verhältnisse AcetaVLactat bei der Verqârunq von Glucose durch Bifidobakterien. *Arch Mikrobiol* ,10: 271-277.

Larpent J. P., et Larpent MG., (1990). Memento technique de microbiologie . Second Ed. Technique et Documentaire Lavoisier. 417 p.

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

Leblond-Bourget N., Philippe, H., Mangin I., Decaris B. (1996). 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribe spacer sequence analyses reveal inter- and intra-studies on

synthesis of water soluble vitamins among specific *Bifidobacterium* phylogeny. Int. J. Syst.

Le Huërou-Luron, I., S. Blat & G. Boudry (2010) Breast- v. formula- feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr Res Rev*, 23, 23-36.

Lee, J.-H. and D. J. O'Sullivan (2010). "Genomic insights into *Bifidobacteria*." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(3): 378-416.

Lee, K., H., G. Lee, and Y. J. Choi. (2008). Proteomic analysis of the effect of bile salts on the intestinal and probiotic bacterium *Lactobacillus reutri*. *J Biotechnol* 137 : 14-19.

Lee Y H., O'Sullivan DJ. (2006). Sequence analysis of cryptic plasmids from *Bifidobacterium* DJO10A and construction of a shuttle cloning vector. *App. Environ. Microbiol.* 72 (1): 527-535.

Lee ,S.A.; Lim,J.Y Kim,B.S.; Cho,S.J.; Kim,O.B; Kim,Y. (2015).Comparison of the gut microbiota profile in breast-fed and formula-fed Korean infants using pyrosequencing .*Nutr.Res.Pract.*9,242-248(CrossRef)(PubMed)

Le Lay, Christophe. (2015). « *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. diacetylactis UL719 et la nisine : une nouvelle approche dans le traitement des infections à *Clostridium difficile* ».

LE J , Shen Y , Li Q , Sun Z (2018).Deep Exploration of Bifidobacteria through Metabolomics Study.

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

Liong, M. T. and N. P. Shah. (2005). Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co- precipitating properties. *Food Research International* 38:135-142.

Lourens-Hattingh A, Viljoen BC.(2001). Review: Yoghurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J* 11: 1-17.

Louis, P., K. P. Scott, S. H. Duncan and H. J. Flint (2007). "Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine." *J Appl Microbiol* 102(5): 1197-208.

Lorenz, M. (2001) The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol*, 3, 1-11.

Lynch,S.V and Pedersen O (2016).The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med* 2016; 375:2369-2379

Macfarlane, G. T., J. H. Cummings and C. Allison (1986). "Protein degradation by human intestinal bacteria." *J Gen Microbiol* 132(6): 1647- 56.

Mahmoudi F, Hadadji M, Guessas B, Kihal M (2013). Identification and Physiological Properties of Bifidobactérium Strains Isolated from Different Origin. *J.F.S.E.* 3:196-206.

Mahmoudi F, Hadadji M, Guessas B, Kihal M (2013). Evaluation of in vitro antagonism and protection against enteropathogenic experimental challenge of different strains of Bifidobacterium. *A.J.M.R*, vol 7

Mahmoudi F, Hadadji M, Benlahcen K (2015). Safety and protective effect of *bifidobactérium spp.* used as probiotic agent in vivo against enteropathogenic *escherichia coli*, innovative romanian food biotechnology.

Marchal N , Bourdon J, and Richard C.L (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed.Doin P.65-149.

Marteau A. & Marteau Ph (2005). Entre intolérance au lactose et maldigestion. *Cah. Nutr. Diet.*, 40: 20S1-23S1.

McCracken V. J., & Lorenz R. G.(2001). The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology*, 3, 1-11

Mercenier A., Pavan S., & Pot B.(2002). Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 99-110.

Matsumoto M., Ohishi H, and Hand Benno Y, (2004). H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int. J. Food. Microbiol.* 93: 109-113

Marteau, P., Seksik, P., et Jian, R. (2002) Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *British Journal of Nutrition.* 88 Suppl. 1: S51-S57.

Marteau, P. and F. Shanahan (2003). "Basic aspects and pharmacology of probiotics:

an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects." Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 17(5):725-740.

Martin J.H, et Chou K.M , (1992). Selection des bifidobacteria for use as Dietary adjuncts in cultured dairy food: I-Tolerance to pH of yoghurt Cultured. *Dairy product J* 27(4) : 21-26.

Masco, L., Van Hoorde, K., De Brandt, E., Swings, J., & Huys, G. (2006). Antimicrobial susceptibility of Bifidobacterium strains from humans, animals and probiotic products. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 85–94. **O** H⁺-ATPase activity in Bifidobacterium with special reference to acid tolerance. *Int. J. Food. Microbiol.* 93: 109-113

Mattila-Sandholm T., Matto J., & Saarela M.(1999). Lactic acid bacteria with health claimsinteraction and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, 9, 25-35

Mattarelli P. and Biavati B. (2014). The genera Bifidobacterium, Parascardovia and Scardovia. *Lactic Acid Bacteria, biodiversity and taxonomy.* John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK: 510-541

Mehdi K, Hadadji M, Benkaddour B, Guessas B and Kihal K(2015).. Resistance at Low Ph Values and Bile Tolerance for Selection of *Bifidobacterium* Strains Isolated from New Born Feces as Potential Probiotic. Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Oran University, 31100 Es-senia Oran, Algeria

Meile L., Ludwig W., Rueger U., Gut C., Kaufmann P., Dasen G., Wenger S. and Teuber M. (1997). *Bifidobacterium lactis* sp.nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *System. Appl. Microbiol.*, 20:57-64.

Mercenier A ,Pavan M and Pot B. (2002). Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospect. *Current pharmaceutical design.*8:99-110.

Michael R. Stenger & Kristina M. Reber & Peter J. Giannone & Craig A. Nankervis (2011) Probiotics and Prebiotics for the Prevention of Necrotizing Enterocolitis *Curr Infect Dis Rep* 13:13–2

Mitsuoka, T. 1984. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*, 3: pp 11-28.

Nannizzi M, H.W. (1994). Bifidodogenic Factors-Sources, Metabolism and Applications . *Int. Dairy J.*, 4: 383-407.

Moubarek, C., Gavini, F., Vaugien, L., Butel, M.J., Doucet-Populaire, F., (2005). Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55, 38–44.

Moreno de LeBlanc, A., C. Matar, and G. Perdigón. (2007). The application of probiotics in cancer. *British Journal of Nutrition* 98.

Morin M.C (2015). Prise en soin diététique de l'intolérant au lactose : quand et comment ? *Information Diététique*; 3: 20-30

O'Hara, A. M. & F. Shanahan (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*, 7, 688- 93.

Ouwehand A. C., & Vesterlund S., (2003). Health aspects of probiotics. *Drugs*, 6, 573-580.

Ouoba Labia Irene Ivette , Vicki Lei , Lars B Jensen.(2008). Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 121: 217–224.

Patel, J. R., Dave, R. I., Sannabhadti, S. S., et Dave, J. M.(1991). Use of bifidobacteria in fermented dairy products. *Indian Daj.man.*43 : 181-185.

Parker R. B.(1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29, 4-8.

Piquet M.-A, R. Gloro, A.-M. Justum , J.-M. Reimund (2007). Les probiotiques, des outils thérapeutiques pour moduler les effets biologiques de la flore intestinale : une introduction. *Springer Obes .* 2: 227–233.

Poroyko, V., M. Morowitz, T. Bell, A. Ulanov, M. Wang, S. Donovan, N. Bao, S. Gu, L. Hong, J. C. Alverdy, J. Bergelson & D. C. Liu (2011) Diet creates metabolic niches in the "immature gut" that shape microbial communities. *Nutr Hosp*, 26, 1283-95.

Prakash, S., L. Rodes, M. Coussa-Charley & C. Tomaro-Duchesneau (2011) Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics.

Biologics, 5, 71-86.

Plummer S., Weaver M. A., Harris J. C., Dee P., & Hunter J.(2004). *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhea. *International Microbiology*, 7, 59-62.

Rasic, J. Lj. et Sad, N. (1990). Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Bull. IDF (International Dairy Federation)*, 252:24-34.

Rasic, J.Lj. et Kurmann, J.A.(1983). Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. Birkhauser Verlag, Basel, Suisse.

Reid, G., J. A. Younes, H. C. Van der Mei, G. B. Gloor, R. Knight & H. J. Busscher (2011) Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol*, 9, 27-38.

Richard K. Le Leu*, Ying Hu, Ian L. Brown, Richard J. Woodman¹ and Graeme P. Young (2009) , Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats Pp. 246-251.

Romond M.B, Romond C, and Izard D in Hermier J, Lenoir J et Weber F (1992). Les groupes microbiens d'intérêt laitiers. *Ed Tec Et Doc .Paris*. 61-80.

Roopashree, T. S., Dang,R., Rani, R.H.S and Narendra ,C. (2009). Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. *International J. App. Res. Nat. Prod.* 1:20-28.

Rosenfeldt V., Michaelsen K. F., Jakobsen M., Larsen C.N., Moller P. L., Pedersen P., Tvede M., Weyrehter H., Valerius N. H., Paerregaard A.(2002). Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatrics and Infectious Diseases Journal*, 21, 411-416.

Rosenfeldt V., Benfeldt E., Valerius N. H., Paerregaard A., & Michaelsen K. F., (2004). Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *Journal of Pediatrics*, 145, 612-616.

Roy D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products, *Lait* ;85:39–56.

Rutayisire E, Kun H, Yehao L, et Fangbiao T. (2016). « The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review ». BMC Gastroenterology.

Saez-Lara M.J., Gomez-Lorrente C., Plaza-Diaz J et al (2015) The role of probiotics lactic acid bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and other Related Disease: A Systematic Reviews of Randomized Human Clinical Trials. BioMed Res. Int

Sampo J. Lahtinen , Liisa T et Jaakko K , Riikka P , Ahokoski H, Hannu M , Seppo J. S (2009) Probiotics modulate the Bifidobacterium microbiota of elderly nursing home residents AGE 31:59–66

Sánchez, Y., Correa, T.M., Y. Abreu, Y., Pino, O. (2012). Efecto del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* Dawson Rev. Protec. Veg., 27 pp. 39–44.

Scardovi, V. (1984). Genus *Bifidobacterium*. Orla-Jensen. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. ed. Kreig, N.R. and Holt, J.G. pp. 1418–1434. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.

Scardovi, V. (1986) Genus *Bifidobacterium*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. pp. 1418–1434. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.

Scardovi, V. and Trovatelli, L.D. (1965). The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Annali di Microbiologia* 15, 19–29.

Schuler-Malyoth, R., Ruppert, A. and Muller, F. (1968) .The microorganisms of bifidus group (*Lactobacillus bifidus*). 1. Hysterical review, nutritional, physiological and therapeutic aspects, morphology, culture procedures and taxonomy. *Milch- Wessenschaft* 23, 356–360.

Schiffrin E. J., & Blum S. (2002). Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 60–64.

Sebald, M; Gasser, F, et Werner, H. (1965). DNA base composition and classification. Application to group of bifidobacteria and to related genera. *Ann. Institut de Pasteur* 109:SS 1–

269.

Sepp, E., K. Julge, M. Vasar, P. Naaber, B. Björkstén & M. Mikelsaar (1997) Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr*, 86, 956-61.

Shigeru F, Honoo H, Tetsuji H, Janet F. F (2001). Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor ganglioside GM1 on the cell surface. *International Journal of Food Microbiology* 67 (2001). 97–106.

Schell, M, A., Karmirantzou, M., Snel, B, Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Wahlen, M,C., Desiere, F., Bork, P., Delly, M., Primore, R,D., Arigoni, F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc natl acad sci usa* 99 : pp 14422-14427. Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. *Biotechnology*

Scarpellini E, Laniro G, Attili F, Bassanelli C, De Santis A, Gasbarrini A (2015). The human gut Microbiota and virome: potential therapeutic implications. *Dig.Liver* is .47,1007-1012.

Shah, N.P., (1997). Isolation and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products: a review. *Milchwissenschaft* 52, 72–76.

Simpson P.J., Stanton C., Fitzgerald G.F. and Ross R.P. (2003). Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *J. Bacteriol.* 185: 2571–2581.

Snook, C,F, Tipton, P,A and Beamer, L.J (2003). Crystal structure of GDP mannose of alginate biosynthesis in *P.aeruginosa*. *Biochemistry* 42, 4658- 4668.

Stecher, B. and W. D. Hardt (2008). "The role of microbiota in infectious disease." *Trends Microbiol* 16(3): 107-14.

Stewart, J. A., V. S. Chadwick & A. Murray (2005) Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. *J Med Microbiol*, 54, 1239-42.

Srikanth, C. V. & B. A. McCormick (2008) Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk. *Interdiscip Perspect*

Infect Dis.

Sun, Z.(2014) developement of Gene Expression System in *Bifidobacterium bfidum* S17 and Their Application for Tumor Therapy.Dissertation , Open Access Repositorium der Universitat Ulm ,Ulm.

Tabasco,R, T. Paarup, C. Janer, C. Pelaez, T. Requena (2007). Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei subsp. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal* .23:250-255.

Takiguchi, R. and Suzuki, Y. (2000). Survival of lactic acid bacteria in simulated digestive juice. *J Intest Microbiol* 14, 11–18.

Tamime, A.Y Mashale, V.M.E and Robinson, R.K (1995). Microbiological and technological aspects of fermented milks by bifidobacteria. *journal of dairy research* 62 , 151 – 187.

Tamura,Z.(1983). Nutriology of bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora*. 2(1): 3-16.

Tanaka, H., Hashiba, H., kock, j et Mierau, I.(2000). Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*. Biochemical and genetic characterisation. *Appl. Env. Microbiology*. Pp.2502-2512. vol. 66, N°6.

Tannock, G.W., (1997). Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends Biotechnol*, 15, 270-74.

Tharmaraj, N., Shah, N.P.,(2003). Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *J. Dairy Sci.* 86, 2288–2296.

Thirabunyanon M., Boonprasom P. and Niamsup P. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells.*Biotechnol. Lett.*, 31 pp: 571–576.

Topping, D. L. and P. M. Clifton (2001). "Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides." *Physiol Rev* 81(3):

Turroni, F., van Sinderen, D., Ventura, M.(2011). Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* 149: 37-441031-64.

Turchet P., Laurenzano M., Auboiron S., & Antoine J. M.(2003). Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *Journal of Nutrition and Health Aging*, 7, 75-77.

Tursi A., Brandimarte G., Giorgetti G. M., & Modeo M. E.(2004). Effect of *Lactobacillus casei* supplementation on the effectiveness and tolerability of a new second-line 10-day quadruple therapy after failure of a first attempt to cure *Helicobacter pylori* infection. *Medical Science Monitor*, 10, 662-666.

Turroni , F.,Milani , C., Duranti ,S., et al (2016) . Deciphering *Bifidobacteria* Mediated Metabolic Interactions and Their Impact on Gut Microbiota by a Multi-omics approach. *ISME Journal*,10,1656-1668.

Tissier, H. (1900). Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (Etat normal et pathologique). Thesis, ed. Georges Carre´ et C.Maud, University of Paris (medecine)[Fr], Paris, France, pp. 253.

Ventura Marco., Douwe van Sinderen., Gerald Fitzgerald., and Ralf Zink (2004). Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:205–223

Verdu E. F, Bercik P., Bergonzelli G. E., Huang X. X., Blennerhasset P., Rochat F., Fiaux M., Mansourian R., Corthesy-Theulaz I., & Collins S. M.(2004) *Lactobacillus paracasei* normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology*, 127, 826-837.

Volkova, E., J. Nevoral, B. Jencikova , J. Kopecny, J. Godefrooij , I. Trojanova, V. Rada. (2005). Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods, *Journ of Microbio Methods*. 60 :365-373.

Wang, X. & Gibson, G. R. (1993). Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Appi. Bacteriol.* 75: 373-380.

Wehkamp J, Schauber J, Stange EF (2007). Defensins and cathelicidins in

gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol* 23: 32-38.

Werner, H., Gasser, F, et Sebald, M.(1966). DNA-Basenbestimmungen an 28 Bifidus Stunnen und Ansthmen Morphologisch Ahnlicher GaMinger. *Zbl. Bak. l.Brig. 198S :504-516.*

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.

Yazid, A.M., Ali, A.M., Shuhaimi, M., Kalaivaani, V., Rokiah, M.Y. and Reezal, A. (2007) .Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Lett Appl Microbiol* 31, 57–62.

Yildirim, Z., Johnson, M.G.(1998). Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Food Protection* 61, 47-51.

Yildirim, Z., Winters, D.K., Johnson, M.G.(1999). Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454.*Journal of Applied Microbiology* 86, 45-54.

YoungsterI, Jasmin M, Hannah K. Systrom, Jenny S, Hamed K, Levin J, Jess L. Kaplan, et Elizabeth L. Hohmann. (2016). « Oral, frozen fecal microbiota transplant (FMT) capsules for recurrent *Clostridium difficile* infection».

Yuguchi, H., Hiramatsu, A., Doi, K., Idach, et Okogoni, S. (1989).Studies on the flavor of yogurt fermented with Bifidobacteria: Signifiame of volatils components and organic acids in the sensory acceptance of yogurt. *Jpn J. Zootech Sci.;* 60:734-741.

Wang J. L., Kang L., & Jia H. L.(2004). Generation and characterization of monoclonal antibodies against Botulinum neurotoxin type A (BoNT/A).

Zhou. J.S, C.J. Pillidge, P.K. Gopal, H.S. Gill (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus and Bifidobacterium* strains ; *International Journal of Food Microbiology* 98 (2005) 211 –217.

Annexes

Annexes :

Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure 5 g

Extrait de viande 10 g

Polypeptone 10 g

Citrate de sodium 2 g

Acetate de sodium 5 g

Glucose 20 g

KH₂PO₄ 2 g

MgSO₄ 0,25g

MnSO₄ 0,05 g

Agar-Agar 15 g

Cysteine chlorhydrique 0.5g

Acide nalidixique 2 mg

Eau distillee 1000 ml

pH 6.8

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Milieu MRS-BCP

MRS (milieu liquide) 1000 ml

Bromocresolpourpre 0,025 mg

pH 7.0

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Infusion de viande de boeuf 3000 cm³

Peptone de caseine 17,5 g

Amidon de mais 1,5 g

Agar-agar 17 g

pH 7.4

Autoclavage 120°C/ 15 minutes

Lait écrémé

Lait en poudre 100 g

Extrait de levure 0,5 g

Eau distillée 1000 ml

cystéine-Hcl 0,5g

Autoclavage 110°C pendant 10 minutes

Eau Physiologique

Chlorure de sodium 8,5 g

Peptone 0,5 g

Cysteine chlorhydrique 2g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,0

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Milieu urée-indole

Uree 2.0g

l-tryptophane 0.3g

ethanol a 0.95 1cm³

rouge phenol 2.5mg

Chlorure de sodium 0.5g

K₂HPO₄ 0.1g

KH₂PO₄ 0.1g

Sterilisation par filtration

Gélatine nutritive

Extrait de viande 3g

Peptone 5g

Gelatine 130g

pH 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Sels biliaries (Fernandez et al., 2002)

MRSc 1000ml

Sels biliaries 50g

pH 6,8

Bain marie 100°C pendant 10 min

Tampon phosphate de sodium

Solution (a) : 27.8g NaH₂PO₄ dans 100ml d'eau distillée.

Solution (b) : 53.65 Na₂HPO₄, 7H₂O dans 100ml d'eau distillée

Tampon 0.1M : 39ml(a) + 61ml(b) + eau distillée.

Sterilisation à 110° pendant 20min

Bouillon nutritif: Pour les cultures jeunes des bactéries pathogènes

Extrait de viande 1g

Extrait de levure 2g

Peptone 5g

Chlorure de sodium 5g

Eau distillé q.s.p 1000ml

pH=7.4

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Eau physiologique: Pour les dilutions

Chlorure de sodium 8,5g

Peptone 0,5g

Eau distillée q.s.p 1000ml

pH=7

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Enzymes pancréatiques

MRS 1000ml

Trypsine 100mg

α -chymotrypsine 100mg

pH 7

Bain marie 100°C pendant 10 min

Sucs gastriques de synthèse (Fernandez et al., 2002)

Glucose 3,5g

NaCl 2,05g

KH₂PO₄ 0,6g

CaCl₂ 0,11g

KCl 0,37g

Pepsine 13,3g

Eau distillée q.s.p 1000ml

pH 2

Bain marie 100°C pendant 10 min

Résumé

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Plusieurs propriétés fonctionnelles, et critères biotechnologiques sont pris en considération dans la sélection des souches probiotiques. Sept souches ont été étudiées, isolées localement à partir de différentes origines, selles des nourrissons âgé d'une semaine à 3 mois (naît par accouchement normale, sans traitement d'antibiotiques, allaité exclusivement au sein) ,de lait maternel commercialisé ,de yaourt contenant des bifidus (Activia) et d'intestin des abeilles provenant de la wilaya d'Oran et de Ghardaïa. La caractérisation phénotypique et génotypique en utilisant des tests classiques et séquençage d'ADN a permis l'identification suivante: 3 souche de *Bifidobacterium longum subsp. Longum* indiqué comme B11 , BI2, BI3 isolés de selles des nourrissons .A partir des intestins d'abeilles on a isolés 2 souche de bifidobactéries indiqué comme *Bifidobacterium longum subsp. Longum* Ba1 et *Bifidobacterium astéroïdes* Ba2. A partir du yaourt Activia on a isolé une souche de *Bifidobacterium breve* indiqué comme By1 et à partir de lait maternisé commercialisé on a pu isoler une seul souche de *Bifidobacterium breve* indiqué comme Bm1. Plusieurs tests consécutifs ont été effectués afin de connaitre leurs potentiels probiotique. Les résultats obtenus montrent que les souches possèdent une tolérance au pH acide, aux sels biliaires et aux suc gastrique. Dans cet étude on a pu évaluer la résistance de nos souches à différentes concentration de salinité :4.5% , 5% et 5.5% de NaCl. On a constaté une inhibition totale de croissance à 5.5% de NaCl et une croissance modérée de nos isolats à 5% de NaCl par rapport à une croissance significative à 4.5 % de NaCl.

Mots clés :

Probiotique; Souche; *Bifidobacterium*; Acidité; Viabilité; Salinité; Résistance; Sels biliaires; Suc gastrique; Ecosystèmes.