

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université Constantine I
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie**

N° d'ordre

N° de série

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES

En

Microbiologie Appliquée

Présentée par

BAHRI Fathia

Titre

**ISOLMENT ET CARACTERISATION DES SOUCHES
DE LACTOBACILLES A CARACTERES PROBIOTIQUES
A PARTIR DE SELLES D'ENFANTS**

Soutenue le : 19/06/2014

Devant le jury :

Président : KACEM CHAUCHE Noredine. *Professeur. Université Constantine I*

Directeur de thèse: BOULAHROUF Abderrahmane. *Professeur. Université Constantine I*

Examineurs: ZADI-KARAM Halima. *Professeur. Université d'Oran Es-sénia*

BELABED Kaddour. *Professeur. Université Constantine III*

LAROUS Larbi. *Professeur. Université. Sétif I*

HARZZALLAH Daoud. *Professeur. Université. Sétif I*

Année Universitaire 2013/2014

DEDICACES

A mes parents et ma famille.

REMERCIEMENTS

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

*Je remercie le **Pr Abderrahmane Boulahrouf** pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses nombreux conseils qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*Je remercie **Pr Nouredine Kacem chaouche, Pr Halima Zadi-Karam, Pr Kaddour Belabed, Pr Larbi Larous et Pr Daoud Harzallah** d'avoir accepté d'être membres de ce jury et pour l'intérêt porté à ce travail.*

*Je remercie le **Pr Philippe Thonart** de l'Unité Bio-Industrie de Gembloux, Agro. Bio-Tech. Université de Liège, pour son accueil dans son laboratoire, son suivi et ses conseils scientifiques avisés. Je remercie également **Annick Lejeune, Robin Dubois-Dauphin et Thami Elmejdoub** pour leur aide et leur conseils précieux.*

*Je remercie **Dr Tayeb Idoui** de l'Université de Jijel pour m'avoir initiée à ce travail, pour ses conseils et son assistance technique.*

*Mes remerciements vont également à **Isabelle** et toute l'équipe de l'Unité de Bio-Industrie de Gembloux. Agro. Bio-Tech. Université de Liège.*

*Je remercie également le **Dr Luc Willems** de l'institut de Biologie Cellulaire et Moléculaire de Gembloux. Université de Liège, pour son aide.*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION..... 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Historique et définition des probiotiques..... 4

2. Le genre *Lactobacillus*..... 5

2.1. Habitat..... 5

2.2. Caractères morphologiques..... 5

2.3. Caractères biochimiques..... 6

2.4. Caractères culturels et exigences nutritionnels..... 8

2.5. Identification..... 9

3. Rôle bénéfique des lactobacilles probiotiques dans les diarrhées chez l'Homme..... 10

3.1. Généralités..... 10

3.2. Les diarrhées infectieuses infantiles..... 13

3.3. Les diarrhées des voyageurs..... 14

3.4. Les diarrhées à *Clostridium difficile*..... 14

4. Mécanisme d'action des *Lactobacillus* probiotiques contre les bactéries pathogènes.... 16

4.1. Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion..... 18

4.2. Production de substances antimicrobiennes..... 20

4.3. Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments..... 22

4.4. Stimulation des mécanismes de défense immunitaire..... 22

5. Critères de sélection des souches probiotiques destinées à l'Homme..... 23

5.1. Propriétés fonctionnelles..... 25

5.1.1. Résistance aux conditions gastriques..... 25

5.1.2. Résistance aux conditions intestinales..... 26

5.1.3. Adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte..... 28

5.1.4. Activité antimicrobienne..... 30

5.2. Aspect sécuritaire..... 30

5.3. Propriétés technologiques..... 30

5.3.1. Aptitude à la production industrielle..... 30

5.3.2. Présentation du probiotique et ses conditions de stockage..... 31

6. La matière fécale : source de probiotiques..... 31

PARTIE EXPERIMENTALE

MATÉRIELS et MÉTHODES.....	35
1. Collection des échantillons.....	35
2. Isolement des bactéries lactiques.....	35
3. Purification des bactéries lactiques.....	36
4. Identification des lactobacilles.....	36
4.1. Etudes des caractères morphologiques.....	36
4.1.1. Examen macroscopique.....	36
4.1.2. Examen microscopique.....	36
4.2. Etudes des caractères biochimiques.....	36
4.2.1. Recherche de la catalase.....	36
4.2.2. Type fermentaire.....	37
4.2.3. Profil de fermentation des sucres.....	37
5. Evaluation des aptitudes probiotiques <i>in vitro</i>.....	39
5.1. Capacité à survivre dans les conditions gastriques simulées.....	39
5.2. Capacité à survivre dans les conditions intestinales simulées.....	41
5.3. Adhésion aux cellules Caco-2.....	41
5.4. Activité antibactérienne.....	46
6. Evaluation de l'aspect sécuritaire.....	49
6.1. Activité hémolytique.....	49
6.2. Résistances aux antibiotiques.....	49
7. Identification par l'ARN 16S.....	50
7.1. Extraction de l'ADN bactérien et vérification de son intégrité.....	50
7.2. Amplification du gène de l'ARNr16S par PCR.....	54
7.2.1. Vérification de la spécificité de l'amplification.....	56
7.2.2. Purification des produits PCR.....	57
7.2.3. Dosage des produits PCR.....	57
7.3. Réaction de séquençage du gène ADNr 16S.....	58
7.3.1. Préparation au séquençage du gène ADNr 16S.....	58
7.3.2. Purification des produits de séquençage.....	60
7.4. Traitement des séquences du gène ADNr 16S.....	61
7.5. Identification des souches par NCBI>BLAST.....	61

RÉSULTATS et DISCUSSION.....	63
1. Isolement des bactéries lactiques.....	63
2. Purification des bactéries lactiques.....	63
3. Identification des <i>Lactobacillus</i>.....	63
3.1. Etude des caractères morphologiques.....	63
3.1.1. Examen macroscopique.....	63
3.1.2. Examen microscopique.....	64
3.2. Etude des caractères biochimiques.....	66
3.2.1. Recherche de la catalase.....	66
3.2.2. Type fermentaire.....	66
3.2.3. Profil de fermentation des sucres.....	69
4. Evaluation des aptitudes probiotiques <i>in vitro</i>.....	70
4.1. Capacité à survivre dans les conditions gastriques.....	70
4.2. Capacité à survivre dans les conditions intestinales.....	71
4.3. Adhésion <i>in vitro</i> aux cellules Caco-2.....	74
4.4. Activité antimicrobienne.....	76
5. Aspect sécuritaire.....	79
5.1. L'activité hémolytique.....	79
5.2. La résistance aux antibiotiques.....	79
6. L'identification des souches à fort potentiel probiotiques par séquençage de l'ADNr 16S.....	81
6.1. Extraction de l'ADN et vérification de son intégrité.....	81
6.2. Amplification du gène ADNr 16S.....	83
6.2.1. Vérification de la spécificité de l'amplification.....	83
6.2.2. Dosage des produits PCR purifiés.....	83
6.2.3. Purification et séquençage du gène ADNr 16S.....	86
6.3. Traitement des séquences et identification des souches par analyse BLAST.....	84
DISCUSSION	86
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	102
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	105
ANNEXES.....	124
RESUMES	

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ATCC : American Type Culture Collection
B : *Bifidobacterium*
BET : Bromure d'Ethidium
BL : Bactéries Lactiques
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
BSH : Biles Salts Hydrolase
C : *Clostridium*
CLSI : Clinical and Laboratory standards Institute
CRL : CERELA Culture Collection
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DN : groupe Danone
EC: Enzym Commission Number
EMBL : European Molecular Biology Laboratory
FAO : Food and Agriculture Organization
FPM : Force Proton Motrice
GI : Gastro-Intestinal
GRAS : Generally Recognized As Safe
JCM : Japan Collection of Microorganisms
L. *Lactobacillus*
MDR : MultiDrug Resistance
MPM : Marqueur de Poids Moléculaire
MRS : De Man, Rogosa et Sharpe
MUB : MUcus Binding protein
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NCC : Nantes Center Collection
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS : Phosphate Buffer salin
PCR : Polymerase Chain Reaction
RDP : Ribosomal Database Project
Rpm : Rotation par minute

SNC : Surnageants Neutralisés à pH 6,5 et traités avec de la Catalase

CWBI : Centre Wallon de Bio-Industrie

TAE : Tris Acétate EDTA

TBE : Tris-Borate-EDTA

TE : Tris EDTA

UFC : Unités Formant Colonie

UNICEF : United Nations Children's Fund

WGO : World Gastroenterology Organisation

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Effet bénéfique des lactobacilles probiotiques sur la santé humaine.....	12
Tableau 2 :Souches de lactobacilles probiotiques utilisés dans les diarrhées chez l'enfant...	15
Tableau 3 : Critères de sélection des probiotiques destinés à l'Homme.....	24
Tableau 4 : Souches de lactobacilles probiotiques commercialisées à utilisation chez l'Homme.....	32
Tableau 5 : Bactéries indicatrices utilisées pour l'étude de l'activité des bactéries lactiques.....	47
Tableau 6 : Réactifs utilisés pour l'amplification PCR.....	55
Tableau 7 : Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S des souches de lactobacilles.....	59
Tableau 8 : Milieu réactionnel pour l'amplification du gène ADNr 16S avec les amorces.....	59
Tableau 9 : Programme d'amplification du gène ADNr 16S sur thermocycleur.....	60
Tableau 10 : Mesure des pH des échantillons de selles.....	63
Tableau 11 : Caractères morphologiques des bactéries lactiques isolées sur MRS.....	64
Tableau 12 : Caractères morphologiques et biochimiques des souches identifiées du genre <i>Lactobacillus</i>	67
Tableau 13 : Habilité des souches de lactobacilles à survivre dans les conditions gastriques simulées.....	72
Tableau 14 : Habilité des souches de lactobacilles à survivre dans les conditions intestinales simulées.....	73
Tableau 15 : Activité antimicrobienne des lactobacilles contre les bactéries pathogènes indicatrices.....	77
Tableau 16 : Activité hémolytique des souches de lactobacilles.....	79
Tableau 17 : Résistance des souches de lactobacilles aux antibiotiques.....	80

Tableau 18 : Résultats de la vérification de l'intégrité de l'ADN des souches de lactobacilles.....	82
Tableau 19 : Mesures des concentrations des produits purifiés de la PCR des souches de lactobacilles à caractères probiotiques G6, B13 et F12.....	85
Tableau 20 : Calcul des dilutions de l'ADN des souches G6, F12 et B13 pour la réaction d'amplification du gène ADN _r 16S.....	85
Tableau 21: Comparaison entre l'identification phénotypique (par API système) et moléculaire (ADN _r 16S) des souches potentiellement probiotiques.....	87
Tableau 22. Résultats de l'antibiogramme des souches <i>Escherichia coli</i> O55, <i>Escherichia coli</i> O111 et <i>Salmonella</i> Typhimurium (Cité en Annexe 4)	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Souche de lactobacilles observée par microscopie électronique à balayage.....	6
Figure 2 : Schéma succinct des principales voies métaboliques des lactobacilles.....	7
Figure 3 : Effet des probiotiques sur la muqueuse intestinale - Cas d'infection à <i>Clostridium difficile</i> (photos observées par microscopie électronique)	16
Figure 4 : Mécanismes d'action des probiotiques contre les germes entéropathogènes.....	17
Figure 5 : Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques.....	19
Figure 6 : Activité antibactérienne d'une souche de <i>L. fermentum</i> contre <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Listeria monocytogenes</i>	22
Figure 7 : Structure chimique des acides biliaires et détection de l'activité BSH chez <i>L. plantarum</i>	28
Figure 8 : Défenses antimicrobiennes de l'hôte face à l'intrusion de microorganismes pathogènes au niveau du tractus intestinal.....	34
Figure 9 : Schéma illustrant les différentes étapes de la mise en évidence du type fermentaire des bactéries lactiques.....	38
Figure 10 : Diagramme de sélection <i>in vitro</i> de souches à usage probiotique.....	40
Figure 11 : Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'habilité des bactéries lactiques à survivre dans les conditions gastriques simulées.....	42
Figure 12 : Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'habilité des bactéries lactiques à survivre dans les conditions intestinales simulées.....	43
Figure 13 : Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'adhérence des bactéries lactiques aux cellules épithéliales de la lignée humaine Caco-2.....	44
Figure 14 : Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude l'activité antibactérienne des bactéries lactiques.....	48
Figure 15 : Identification des souches des bactéries lactiques par séquençage du gène ADN _r 16S.....	51
Figure 16 : Courbe caractéristique d'un ADN intègre.....	53

Figure 17 :Aspect macroscopique de colonies d'une souche de bactéries lactiques (G6).....	65
Figure 18 : Aspect macroscopique de colonies d'une souche de bactéries lactiques (9*).....	65
Figure 19 : Aspect microscopique après coloration de Gram d'une souche de bactéries lactiques (H8) isolée sur gélose MRS (Grossissement X100).....	65
Figure 20 : Aspect microscopique après coloration de Gram d'une souche de bactéries lactiques (B13) isolée sur gélose MRS (Grossissement X100).....	65
Figure 21 : Aspect homofermentaire des bactéries lactiques sur milieu Gibson-Abdelmalek.....	66
Figure 22 : Répartition des espèces de lactobacilles identifiées par galerie API CHL 50.....	69
Figure 23 : Effet du pH 1,5 sur les souches de lactobacilles testées après 1h et 2h d'exposition.....	70
Figure 24 : Adhérence des souches de lactobacilles aux cellules Caco-2 après 2 h d'incubation à 37 ° C dans une atmosphère à 5% de CO2..	74
Figure 25 : Adhérence de <i>L.plantarum</i> (F12) aux cellules Caco-2 observée par microscope (X 100) après coloration au cristal violet (0,5%).....	75
Figure 26 : Effet inhibiteur des cultures des souches B13 et G6 et leur surnageants sur <i>Listeria monocytogenes</i> CWBI 2232 testé par la méthode des puits sur gélose MRS.....	78
Figure 27 : Migration sur gel d'agarose des ADN des souches de lactobacilles à caractères probiotiques : G6, F12 et B13.....	84
Figure 28 : Dosage des produits PCR purifiés des trois souches de lactobacilles à caractères probiotiques : G6, F12 et B13.....	84
Figure 29 : Identification des genres des bactéries lactiques.....	89

INTRODUCTION

L'Homme vit continuellement avec une population de microorganismes complexe et diversifiée habitant son tractus gastro-intestinal (GI) appelée microbiote (Eckburg *et al.*, 2005). L'un des principaux effets bénéfiques de cette alliance est la protection et l'amélioration de la résistance aux maladies infectieuses de l'organisme hôte (Hsieh, 2008). À la naissance, l'ensemble du tractus GI est stérile, mais il est rapidement colonisé par les bactéries apportées par la première alimentation. Après l'enfance, la composition de la microflore intestinale reste relativement constante jusqu'à la mort (Quigely, 2011).

Les lactobacilles sont des bactéries lactiques (BL) qui produisent par fermentation de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme énergétique. Ils sont représentatifs du microbiote intestinal bénéfique de l'Homme et par conséquent sont les microorganismes les plus en vue en tant que probiotiques (Kesarcodei - Watson *et al.*, 2008). Les probiotiques sont définis comme « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, confèrent des effets bénéfiques pour l'hôte » (FAO/OMS, 2001).

Plusieurs allégations santé sont attribuées aux probiotiques. Parmi les effets bénéfiques, les mieux documentés des probiotiques, figurent leur rôle positif dans la prévention et/ou le traitement des diarrhées infectieuses (WGO, 2008). Plusieurs études cliniques ont démontré l'efficacité des BL probiotiques, en particulier les souches de lactobacilles dans les diarrhées infantiles d'origine microbienne (Preidis *et al.*, 2011).

À une époque où nous avons besoin de nouvelles façons de contrôler et traiter les infections ; des stratégies se développent pour élargir les applications des probiotiques en tant qu'aliments fonctionnels (Nagpal *et al.*, 2012). Dans ce contexte, une approche sous-explorée commence à se développer ; les probiotiques, pourraient combiner profil d'innocuité favorable avec amélioration de la nutrition et de la fonction du microbiote intestinal et par conséquent peuvent constituer une bonne stratégie de lutte contre les diarrhées infectieuses infantiles dans les pays en développement (FAO/OMS, 2001 ; Preidis *et al.*, 2011).

En Algérie, comme dans certains pays en développement, malgré la baisse des cas, les diarrhées infectieuses demeurent une cause majeure de mortalité infantile. Les causes

sont étroitement liée à une mauvaise hygiène, parfois la mal nutrition et le non accès aux structures sanitaires (UNICEF/OMS, 2009).

Dans les pays développés, les souches probiotiques sont souvent intégrées dans des stratégies marketing pour construire des allégations de santé en réponse à l'attention des consommateurs pour un mode de vie « sain ». En revanche, en Algérie, d'une part, les mérites des probiotiques sont généralement ignorés par les professionnels de santé et méconnus par le consommateur et d'autre part, très peu de recherches existent sur les probiotiques isolés chez l'Homme, et encore moins sur les lactobacilles probiotiques. Selon la base des données biomédicale Pubmed ; 4 articles sur les probiotiques dont un article sur les lactobacilles, apparaissent en entrant les mots clés [Probiotic, human origin, Algeria] contre 322 articles en France et 1159 aux USA par exemple.

La matière fécale constitue une meilleure source d'isolement des bactéries probiotiques. Pour être sélectionnées, les souches probiotiques doivent remplir certains critères, *in vitro*, comprenant, la résistance aux conditions gastriques et intestinales, la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte et l'origine humaine pour un emploi chez l'Homme (FAO / OMS, 2001). les souches probiotiques doivent également être dépourvues de pouvoir hémolytique et de résistance aux antibiotiques à caractère transmissible (Salyers *et al.*, 2004).

Considérant le fort potentiel probiotique des lactobacilles et leur rôle établi dans la prévention et le traitement des diarrhées infantiles d'origine infectieuse, ceci nous a conduits à s'interroger sur des souches de lactobacilles isolées de selles d'enfants vivants en Algérie : possèdent-elles un pouvoir probiotique leur permettant d'avoir un éventuel intérêt dans les gastroinfections infantiles ? En réponse à notre interrogation, nous avons réalisé ce travail afin de sélectionner des souches de lactobacilles à profil probiotique dans une perspective d'une éventuelle utilisation dans la prévention et le contrôle des diarrhées infectieuses chez l'enfant, en Algérie.

L'objectif de ce travail de thèse est d'isoler et identifier des souches de lactobacilles à partir de selles d'enfants afin d'évaluer leur profil probiotique, *in vitro*, par la résistance aux conditions gastro – intestinales simulées, l'adhérence aux cellules épithéliales Caco-2, leur activité antibactérienne, l'étude de leur aspect sécuritaire par l'activité hémolytique et la résistance aux antibiotiques et enfin la confirmation de leur identification

phénotypique par le séquençage du gène ADNr 16S et leur dépôt à la GenBank.

Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Jijel et au Centre Wallon de Bio-Industries / Gembloux Agro-Biotech - Université de Liège/Belgique. Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication dans la revue *African Journal of Microbiology Research*.

1. Historique et définition des probiotiques

Il y a un siècle, Elie Metchnikoff (microbiologiste russe, élève de Louis Pasteur et lauréat du prix Nobel) émit l'hypothèse que la bonne santé et la longévité de certaines populations de l'Europe de l'est seraient dues à leur consommation quotidienne de laits fermentés (Sanders, 2000). Il suggéra que "l'auto-intoxication intestinale" et que le vieillissement en résultant pouvait être supprimé en modifiant la flore microbienne de l'intestin et en remplaçant des microbes protéolytiques qui produisent des substances toxiques comme les phénols, les indoles et l'ammonium à partir des protéines de la digestion par des microbes utiles. Il développa un régime alimentaire avec du lait fermenté par une bactérie appelée "Bacille bulgare" (WGO, 2008). Entretemps, plusieurs travaux se sont développés selon le concept que l'ingestion de microorganismes peut améliorer la santé de l'hôte. Ce fut Parker qui proposa pour la première fois en 1974 le terme « probiotique » qui signifie pour la vie afin de désigner les microorganismes et substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la microflore intestinale (Vasiljevic et Shah, 2008). Plus tard, Fuller (1991) a redéfini les probiotiques de la façon suivante : « préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additif alimentaire, ayant une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale ». Depuis, plusieurs définitions des probiotiques ont succédé sur la base des nouvelles connaissances de leurs modes d'actions et de leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Actuellement, la définition la plus utilisée est celle proposée par Salminen *et al.*, 1998. Elle a été validée par le groupe de travail conjoint mandaté par l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO) et par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS). Ce groupe d'experts internationaux définit les probiotiques comme étant « des microorganismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » (FAO/OMS, 2001). Les principaux microorganismes probiotiques connus à ce jour sont des bactéries (lactobacilles, bifidobactéries, propionibactéries, *Escherichia coli* et enterocoques) et des levures (*Saccharomyces boulardii*) (Ouwehand *et al.*, 2002).

2. Le genre *Lactobacillus*

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparate. Ils appartiennent au groupe des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae* (De Vos *et al.*, 2009).

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Créé, pour la première fois, par Beijerinck en 1901, il comprend actuellement, au moins 145 espèces reconnues qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême (Corrieu et Luquet, 2008 ; Barinov *et al.*, 2011). Cette diversité est due à la variation en contenu guanine/cytosine (G/C) qui varie entre 30 et 55 % selon les espèces (De Vos *et al.*, 2009).

2.1. Habitat

Les lactobacilles ont un habitat vaste et ils sont présents dans de nombreux biotopes : eau, sol, lait et produits laitiers, végétaux, produits carnés, poissons, bière, vin, fruits et jus de fruits (Fredereghi, 2005).

Les lactobacilles constituent, entre autres, une part importante du microbiote humain et animal. Chez l'Homme sain, ils se retrouvent tout au long du système digestif : de la bouche au côlon. Les espèces les plus rencontrées sont : *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. brevis*, le groupe *L. casei*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. vaginalis* et *L. ruminis* (Reuter, 2001; Eckburg *et al.*, 2005 ; Walter, 2008; Ozgun et Vural, 2011).

2.2. Caractères morphologiques

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulées et généralement non mobiles. Les souches mobiles le sont grâce à une ciliature péritriche. Ils peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins ou très courts ou coccobacilles. La formation de chaînes de cellules est courante (De Vos *et al.*, 2009). La figure 1 montre l'aspect microscopique d'une souche de lactobacilles observée par microscopie électronique à balayage.



Figure 1. Souche de lactobacilles observée par microscopie électronique à balayage.
(Tirée de www.inra.fr)

2.3. Caractères biochimiques

Les lactobacilles sont catalase négative, certains ont une pseudocatalase. Ils sont dépourvus de cytochrome. Généralement, nitrate réductase négative, gélatinase négative et ils sont microaérophiles ou anaérobies (Prescott *et al.*, 2003). Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement fermentaire. La figure 2 résume les voies métaboliques des lactobacilles (Perry *et al.*, 2004).

Les lactobacilles sont subdivisés selon leur type fermentaire en trois groupes selon la classification d'Orla-Jensen remaniée par Kandler et Weiss (Selon De vos *et al.*, 2009).

- **Le groupe I :** comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire qui produisent uniquement de l'acide lactique à partir du glucose et qui sont incapables de fermenter les pentoses ou le gluconate. Elles possèdent une fructose 1,6-diphosphate aldolase et une phosphofructokinase. Ce groupe est constitué majoritairement d'espèces présentes chez l'Homme et les animaux et qui participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme. Exemple : *L. acidophilus* et *L. gasseri*.
- **Le groupe II :** comprend les espèces à métabolisme hétérofermentaire facultatif. Ces espèces utilisent la voie homofermentaire mais elles sont capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration de glucose limitée. Elles ont une fructose 1,6-diphosphate aldolase et une

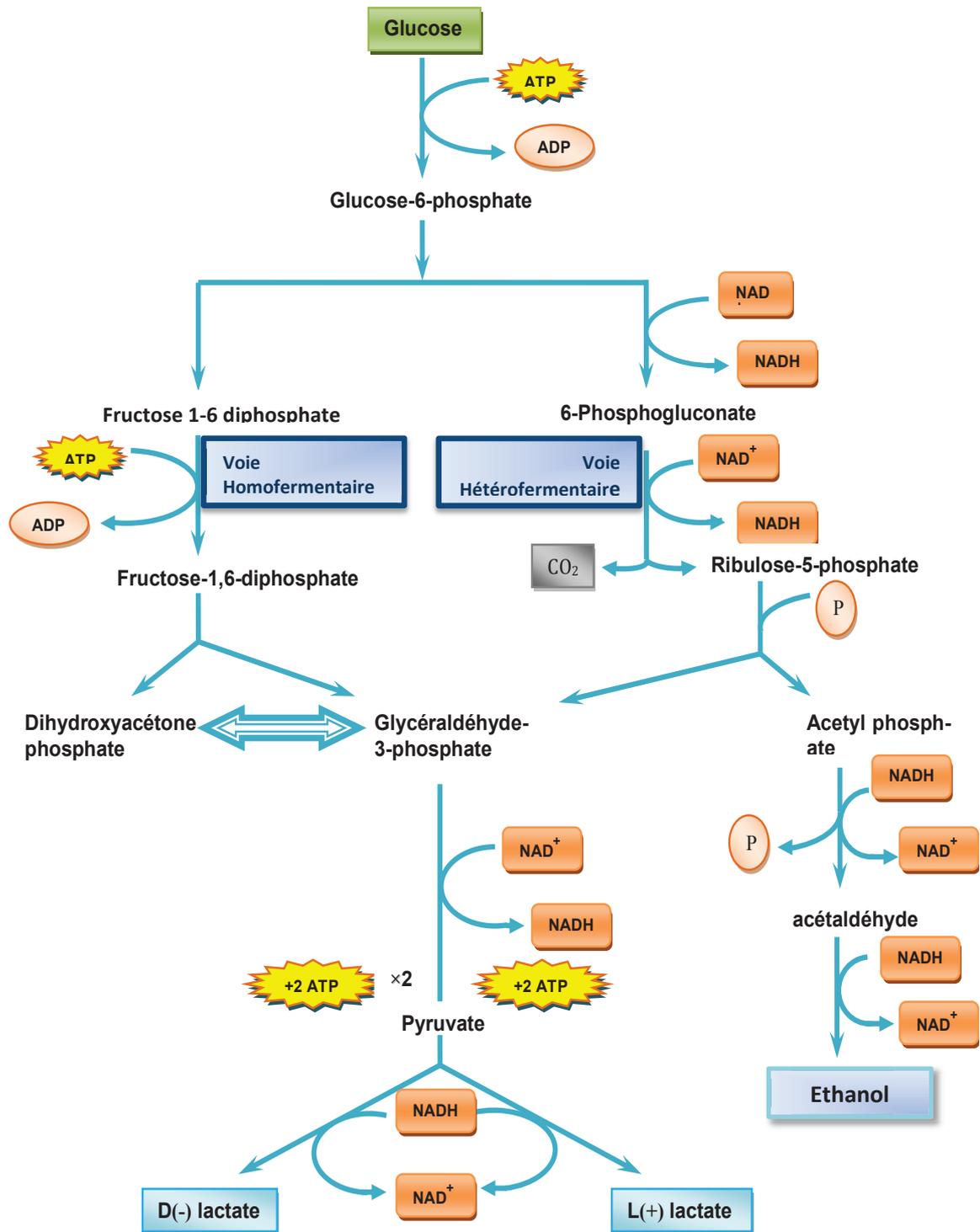


Figure 2. Schéma succinct des principales voies métaboliques des lactobacilles (Source Perry *et al.*, 2004).

6-phosphogluconate déshydrogénase. Exemple : *L. casei*, *L. sake*, *L. curvatus* et *L. plantarum*.

- **Le groupe III** : comprend les espèces hétérofermentaires obligatoires qui forment des quantités équimolaires de CO₂, d'acide lactique, d'acide acétique et /ou d'éthanol. Les pentoses sont fermentés en acides lactique et acétique par la voie de la phosphocétolase car ces bactéries possèdent une phosphocétolase mais pas d'aldolase. Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'Homme et participent à l'équilibre de la flore intestinale. Exemple : *L. brevis* et *L. fermentum*.

2.4. Caractères cultureux et exigences nutritionnelles

La plupart des lactobacilles se multiplie dans une gamme de température comprise entre 15°C et 42°C. Certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55 °C (Adams et Moss, 2000 ; Tailliez, 2004). Les lactobacilles se développent au mieux dans des conditions acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4, mais leur croissance s'arrête lorsque le pH avoisine 3,5 (De Vos *et al.*, 2009). Le milieu le plus adapté à leur culture est celui De Man, Rogosa et Sharpe (MRS). Sur MRS gélosé, les colonies se développent en 24 à 48 heures. Elles sont généralement petites, incolores, blanchâtres ou jaunâtres, lisses ou rugueuses, arrondies ou lenticulaires (De Vos *et al.*, 2009).

En plus de la source de carbone et d'azote, les lactobacilles sont caractérisés par des exigences nutritionnelles nombreuses qui peuvent être classées selon De Man *et al.*, (1960) ; De Vos *et al.*, (2009) comme suit :

- exigences en vitamines

Toutes les espèces ont un besoin absolu en vitamines telles que la pantothenate (B5), en niacine (B3) et en cobalamine (B12). Les déficiences en vitamine B12 peuvent induire une diminution de la synthèse de l'ADN et entraîner des changements morphologiques et les cellules deviennent filamenteuses. Une telle élongation cellulaire a été observée avec *L. helveticus* sp *jugurti* lors de déficiences en cobalamine (B12) ou en acide folique.

- **exigences en bases azotées**

Dans les milieux synthétiques, les lactobacilles, exigent la présence d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile. Ces exigences sont variables selon les espèces.

- **exigences en cations**

Les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} ou Fe^{2+} sont nécessaires pour la croissance des lactobacilles. Il a été démontré que le manganèse et le magnésium interviennent comme activateurs d'un grand nombre de réactions enzymatiques et comme stabilisateurs de la structure des acides nucléiques, de l'intégrité des ribosomes et de la membrane cellulaire des lactobacilles.

2.5. Identification

L'identification d'espèces de lactobacilles peut être difficile à réaliser par les méthodes biochimiques en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Elle repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres. La galerie API 50 CH avec l'utilisation du milieu pour lactobacilles, est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (Roissart et Luquet, 1994 ; Ozgan et Vural, 2011).

L'utilisation des outils de taxonomie moléculaire comme l'hybridation quantitative ADN/ADN et le séquençage des gènes d'ADNr 16S ont permis de lever des ambiguïtés et de nommer précisément les espèces de lactobacilles d'intérêt en santé et en alimentation humaine parmi plus d'une centaine d'espèces de lactobacilles actuellement décrites (Dellaglio et Felis, 2005).

- **Identification par l'ARNr 16S**

L'ARNr 16S possèdent l'ensemble des propriétés requises pour servir d'outil couvrant tous les niveaux taxonomiques, du règne à l'espèce. De par l'existence de zones ayant des contraintes différentes, l'ARN 16S ressemble à une horloge à plusieurs aiguilles, celles correspondant aux zones les plus conservées se déplaçant lentement et permettent de suivre l'évolution sur de longues périodes et celles correspondant aux zones plus variables permettent de différencier des groupes d'organismes plus voisins (Woese, 1985). De plus, des études minutieuses de régions conservées ont montré qu'il existait des séquences

caractéristiques de grands groupes de bactéries. Ces séquences sont appelées « séquences signatures » et permettent d'établir des relations entre des organismes phylogéniquement distants (Woese *et al.*, 1985). Des catalogues d'oligonucléotides ont été obtenus pour de nombreuses souches bactériennes. Il existe une base de données sur Internet qui contient des séquences des ARNr. On peut, à ce propos consulter le projet RDP (Ribosomal Database Project) qui propose une collection d'au moins 100 000 séquences, en plus des informations phylogénétiques, de références bibliographiques et des séquences nouvellement établies (Madigan et Martinko, 2007).

La nécessité d'étendre ces études préliminaires à l'ARNr 23S et d'obtenir plus d'information sur l'ARNr 16S ont conduit à développer des méthodes de séquençage rapide de l'ARN. Deux d'entre elles prédominent actuellement. La technique de la transcriptase reverse (reverse transcriptase) mis au point par Lane *et al.*, (1985) et la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction) de Saiki *et al.*,(1988).

- **Séquençage par la méthode PCR**

La PCR permet d'obtenir en très grande quantité une région d'ADN dans laquelle ont été définies des séquences bordantes. Ces séquences vont servir d'amorces à une polymérase qui va synthétiser le brin correspondant à l'ADN présent entre les amorces.

L'utilisation des amorces définies par Lane *et al.*, (1985) a permis d'obtenir, à partir de très faible quantités d'ADN de la souche à étudier, des fragments d'ADN séquençables par la méthode de Sanger *et al.*, (1977). La PCR est de plus en plus utilisée en taxonomie bactérienne, du fait de l'existence de souches difficiles à cultiver ou des espèces très proches dont l'identification par les méthodes phénotypiques est délicate.

3. Rôle bénéfique des lactobacilles probiotiques dans les diarrhées chez l'Homme

3.1. Généralités

De nombreuses allégations santé ont été associées à l'utilisation des lactobacilles probiotiques en tant que médicaments ou alicaments chez l'Homme. Les principaux effets bénéfiques sont :

- prévention et traitement des diarrhées,

-
- atténuation de l'intolérance au lactose,
 - prévention des allergies atopiques,
 - diminution du risque de réapparition des infections urinaires,
 - prévention et retardement de l'apparition de certains cancers,
 - prévention et thérapie des vaginoses bactériennes,
 - réduction du taux de cholestérol et prévention de certaines maladies cardiovasculaires,
 - modulation et stimulation de la fonction immunitaire,
 - prophylaxie et thérapie des maladies intestinales inflammatoire : maladie de Crohn, et le syndrome du côlon irritable,
 - prévention et traitement de l'infection par *Helicobacter pylori* (Reid *et al.*, 2003, Hsieh et Versalovic, 2008 ; Vasiljevic et Shah, 2008).

Le tableau 1 résume les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine selon la FAO/OMS, (2001) et WGO, (2008).

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle intestinale et par conséquent, leur plus grande évidence, sur la santé humaine, concerne leur rôle sur l'intestin par l'inhibition des germes pathogènes et la prévention et/ou le traitement des diarrhées infectieuses (FAO/OMS, 2002).

Selon la définition de l'OMS, (2013) ; la diarrhée est l'émission d'au moins trois selles molles ou liquides par jour, ou à une fréquence anormale pour l'individu. Elle est généralement le symptôme d'une infection gastro-intestinale, qui peut être due à diverses bactéries, divers virus ou parasites. L'infection se transmet par le biais de l'eau ou d'aliments contaminés, ou d'une personne à l'autre en cas d'hygiène insuffisante. La diarrhée sévère entraîne une perte de liquides et peut être mortelle, en particulier chez les enfants en bas âge et les personnes malnutries ou immunodéprimées.

Tableau 1. Effet bénéfique des lactobacilles probiotiques sur la santé humaine (Source : FAO/OMS, 2001 ; WGO, 2008).

Effet probiotiques	Mode d'activité proposé
Réduction des risques des diarrhées	-Résistance à la colonisation des pathogènes. -Stimulation du système immunitaire.
Diminution des allergies alimentaires	-Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité membranaire intestinale. -Stimulation du système immunitaire.
Amélioration de la digestion du lactose	-Action de la β galactosidase dans l'intestin grêle.
Traitement des maladies inflammatoires	-Modulation de la flore intestinale. -Stimulation du système immunitaire.
Réduction du cholestérol	-Assimilation du cholestérol. -Déconjugaison des sels biliaires.
Prévention du cancer du côlon	-Stimulation du système immunitaire. -Production de composés antimutagéniques -Modulation des enzymes fécales carcinogéniques. -Dégradation des carcinogènes. -Élimination des bactéries impliquées dans la production de carcinogènes.

Les diarrhées peuvent être, également, d'origines médicamenteuses (antibiotiques, chimiothérapie), voire inflammatoire ou liées à des intolérances alimentaires ; mais, les diarrhées infectieuses sont les plus nombreuses avec une dominance, de germes bactériens en été, virales en hiver, avec un risque de déshydratation chez l'enfant en bas âge.

Sous le terme de « diarrhées aiguës » sont regroupées les diarrhées dont la durée est limitée à une dizaine de jours. Les diarrhées aiguës sont le plus souvent de nature infectieuse. Elles sont très fréquentes dans les pays en développement et y représentent une cause majeure de mortalité infantile. Elles sont moins fréquentes et le plus souvent bénignes dans les pays industrialisés (OMS, 2013).

3.2. Les diarrhées infectieuses infantiles

Les diarrhées infectieuses infantiles, d'origine bactériennes peuvent être causées par différents pathogènes *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio cholerae* et autres vibrions et à moindre degré *Listeria*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* et *Bacillus cereus* (Lemberg *et al.*, 2007).

Différentes souches probiotiques, incluant *L. reuteri* ATCC 55730, *L. rhamnosus* GG et *L. casei* DN-114 001 ont prouvé leur efficacité dans la réduction de la sévérité et de la durée de la maladie diarrhéique aiguë chez l'enfant (Rosenfeldt *et al.*, 2002 ; Szajewska *et al.*, 2007 ; Lemberg *et al.*, 2007). Les mécanismes d'action sont liés aux souches. Selon la FAO/OMS, (2001) ; Michail *et al.*, (2006) ; Preidis *et al.*, (2011), l'emploi des souches microbiennes probiotiques peut être une stratégie pour la prévention et le contrôle des diarrhées infectieuses infantiles dans les pays en voie de développement. Il est important de noter, dans certains cas, que la thérapie probiotique de la diarrhée aiguë devrait être associée à la réhydratation (FAO/OMS, 2001).

L'effet bénéfique de *Lactobacillus rhamnosus* GG a parfaitement été démontré pour la prévention de la diarrhée aiguë causée principalement par des rotavirus chez les enfants. Outre les infections à rotavirus, de nombreuses espèces bactériennes causent la mort chez l'enfant (FAO/OMS, 2001, 2002). Des études ont prouvé que certaines souches de lactobacilles probiotiques peuvent inhiber *in vitro* la croissance et l'adhérence d'une gamme d'entéropathogènes (Gopal *et al.*, 2001; Servin, 2004 ; Rishi *et al.*, 2011; Campana *et al.*, 2012). D'autres études sur des modèles animaux ont indiqué des effets bénéfiques

de *L. casei* Shirota, *L. acidophilus* LB, *L. rhamnosus* GG contre des agents pathogènes comme *Salmonella* (Ogawa *et al.*, 2001 ; WGO, 2008) (Tableau 2).

3.3. Les diarrhées des voyageurs

Il ressort de certaines études, de la diarrhée des voyageurs, que la souche *Lactobacillus* GG est efficace en prévention des diarrhées survenant chez les touristes. L'administration du probiotique durant la période à risque a permis de réduire l'apparition des diarrhées de 39,5% chez les sujets traités (Fedorak et Madsen, 2004).

3.4. Les diarrhées causées par *Clostridium difficile*

Un problème grave associé au traitement antibiotique est l'apparition de la diarrhée, souvent causée par *Clostridium difficile*. Le nombre de ce microorganisme est très faible dans un tractus intestinal sain, mais le bouleversement de la microflore indigène par des antibiotiques provoque une augmentation anormale de leur nombre et l'apparition des symptômes liés à la production de toxines. L'administration de microorganismes commensaux exogènes (c'est-à-dire de probiotiques) est nécessaire pour ramener la microflore à un état d'équilibre qui reflète la flore normale avant la thérapie antibiotique. Certaines études ont montré, en effet, que cette approche peut atténuer les signes et les symptômes de l'infection par *C. difficile* (Tong *et al.*, 2007). Dans la diarrhée associée aux antibiotiques, il y a une forte évidence d'efficacité pour *L. rhamnosus* GG chez l'adulte et l'enfant avec thérapie antibiotique (FAO/OMS, 2001). Une recherche concluante a indiqué l'efficacité de *L. casei* DN-114 001 chez l'adulte hospitalisé pour prévenir une diarrhée associée aux antibiotiques à *C. difficile* (Tuohy *et al.*, 2003). La figure 3 montre l'effet des probiotiques sur la muqueuse intestinale dans le cas d'infection à *Clostridium difficile* observé par microscopie électronique (Hickson *et al.*, 2007).

Tableau 2. Souches de lactobacilles probiotiques utilisés dans les diarrhées chez l'enfant (Source WGO, 2008).

Pathologie	Produit	Dosage recommandé
Traitement de la diarrhée infectieuse aiguë chez l'enfant	<i>L. rhamnosus</i> GG	10^{10} – 10^{11} UFC, 2 fois par jour
	<i>L. casei</i> DN-114 001	10^{10} UFC, 2 fois par jour
	<i>L. reuteri</i> ATTC 55730	10^{10} – 10^{11} UFC, 2 fois par jour
	<i>L. acidophilus</i> + <i>B. infantis</i>	10^{10} – 10^{11} UFC, 3 fois par jour
Prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques chez l'enfant	<i>L. rhamnosus</i> GG	10^{10} UFC, 1 ou 2 fois par jour
Prévention de la diarrhée nosocomiale chez l'enfant	<i>L. rhamnosus</i> GG	10^{10} – 10^{11} UFC, 2 fois par jour
	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	10^9 UFC, 2 fois par jour
Prévention de la diarrhée par <i>C. difficile</i>	<i>L. casei</i> DN-114 001	10^{10} UFC, 2 fois par jour

B. *Bifidobacterium*, C. *Clostridium*.

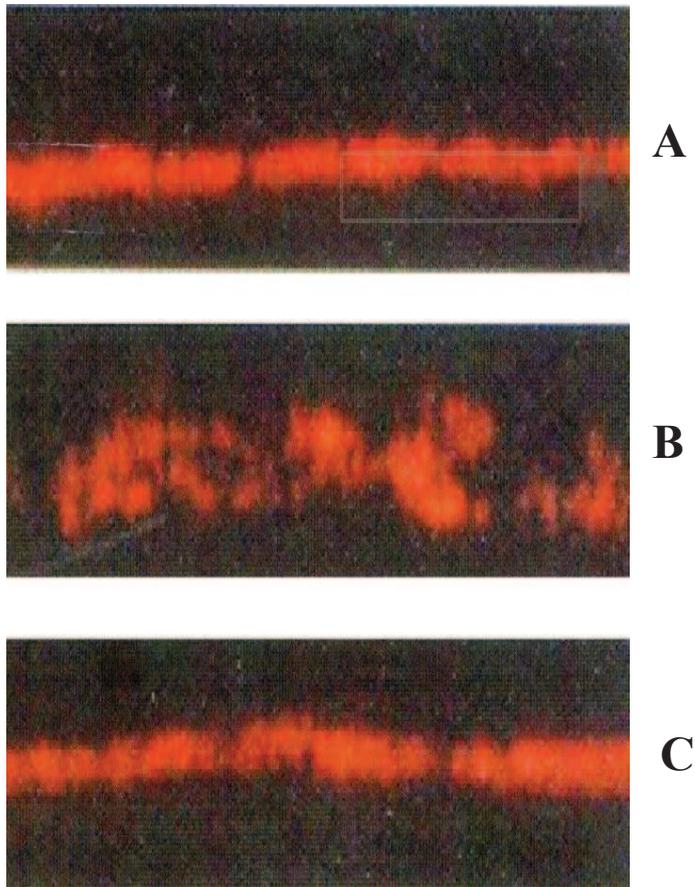


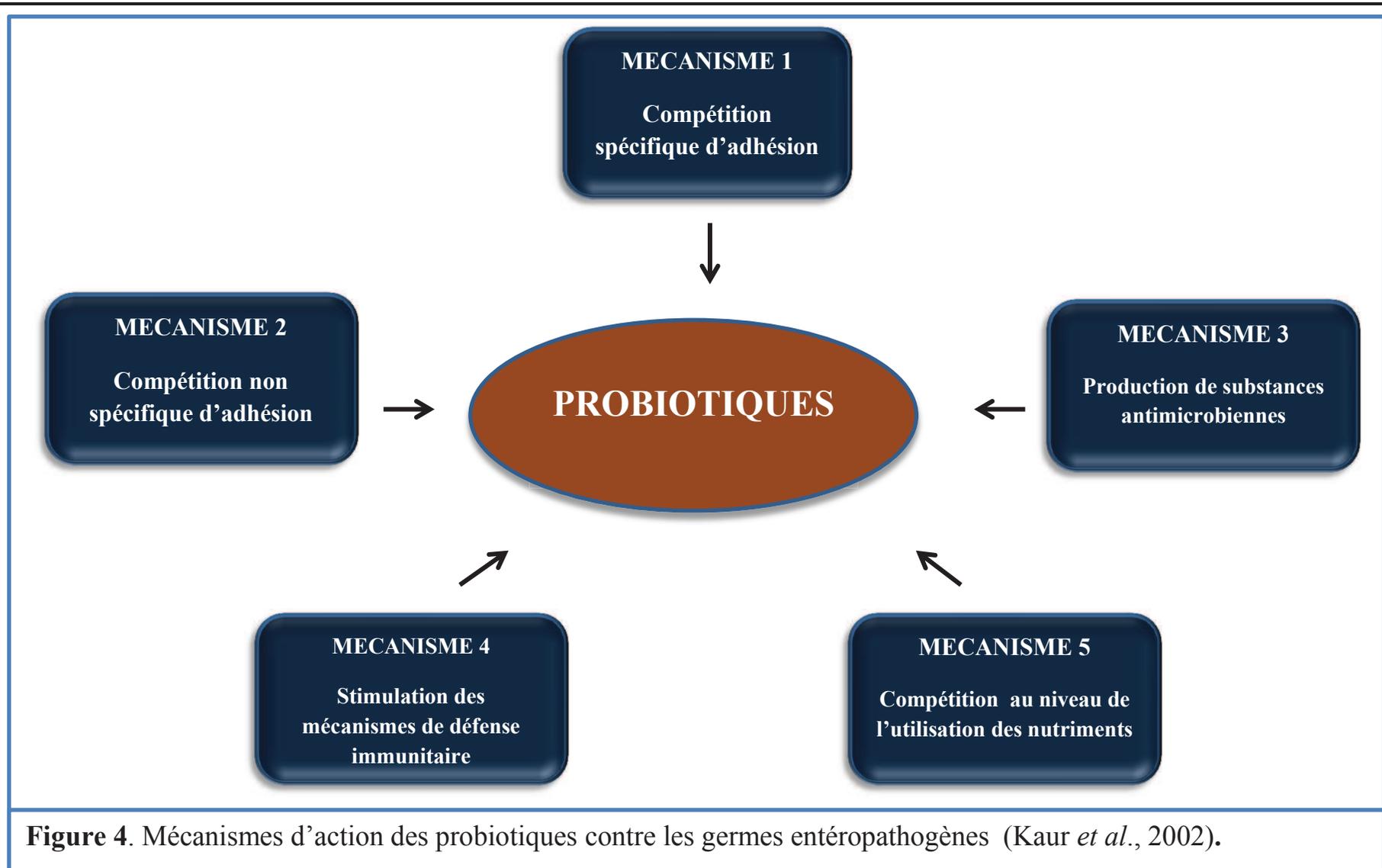
Figure 3. Effet des probiotiques sur la muqueuse intestinale - Cas d'infection à *Clostridium difficile*. (Photos observées par microscopie électronique) - A) Muqueuse intestinale + Probiotique B) Muqueuse intestinale + *Clostridium difficile*. C) Muqueuse intestinale + *Clostridium difficile* + Probiotique (Hickson *et al.*, 2007).

4. Mécanisme d'action des lactobacilles probiotiques contre les germes pathogènes

Des mécanismes basés sur des études *in vivo* et *in vitro* ont été proposés pour expliquer les modes d'action majeurs associés aux probiotiques, entre autres les lactobacilles, pour prévenir la colonisation et la croissance des germes pathogènes (Kaur *et al.*, 2002) (Figure 4).

Les mécanismes d'action des lactobacilles probiotiques se résument comme suit :

- stabilisation de la flore intestinale par compétition avec des bactéries pathogènes au niveau de la fixation aux récepteurs (adhésion),



-
- inhibition des germes pathogènes ou indésirables par production de métabolites tels que les acides organiques (diminution de pH), peroxyde d'hydrogène et production de substances antibactériennes comme les bactériocines,
 - stimulation du système immunitaire intestinale de l'hôte,
 - neutralisation de produits toxiques (ammoniac, amines et indoles) et diminution des biotransformations des sels biliaires et des acides gras en substances toxiques. Matilla-Sandholm *et al.*, 2002; Isalouri *et al.*, 2004 ; Patel et Lin, 2010 ; Quigley, 2011).

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

Les lactobacilles probiotiques inhibent l'adhésion des pathogènes aux cellules intestinales (Isolauri *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2009 ; Kim et Ho, 2010). Étant donné que la majorité des infections intestinales sont initiées par l'adhésion des pathogènes aux cellules entérocytaires de l'hôte ; certaines lactobacilles auraient la capacité de bloquer physiquement l'accès des pathogènes aux entérocytes (Gueimond *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2008 ; Lebeer *et al.*, 2010).

Ce mécanisme d'action serait similaire à celui exercé par le microbiote intestinal résidant face aux infections microbiennes (O'Hara et Shanahan, 2007).

Les mécanismes de compétition de l'adhésion se font généralement de deux façons (Servin et Cocconier, 2003) (Figure 5) :

- compétition spécifique par l'intermédiaire des adhésines (Gueimond *et al.*, 2006),
- compétition non spécifique en impliquant des interactions de faibles liaisons (forces de Van Der Waals, forces électrostatiques et liaisons hydrogène) (Kim *et al.*, 2008 ; Shanahan, 2011).

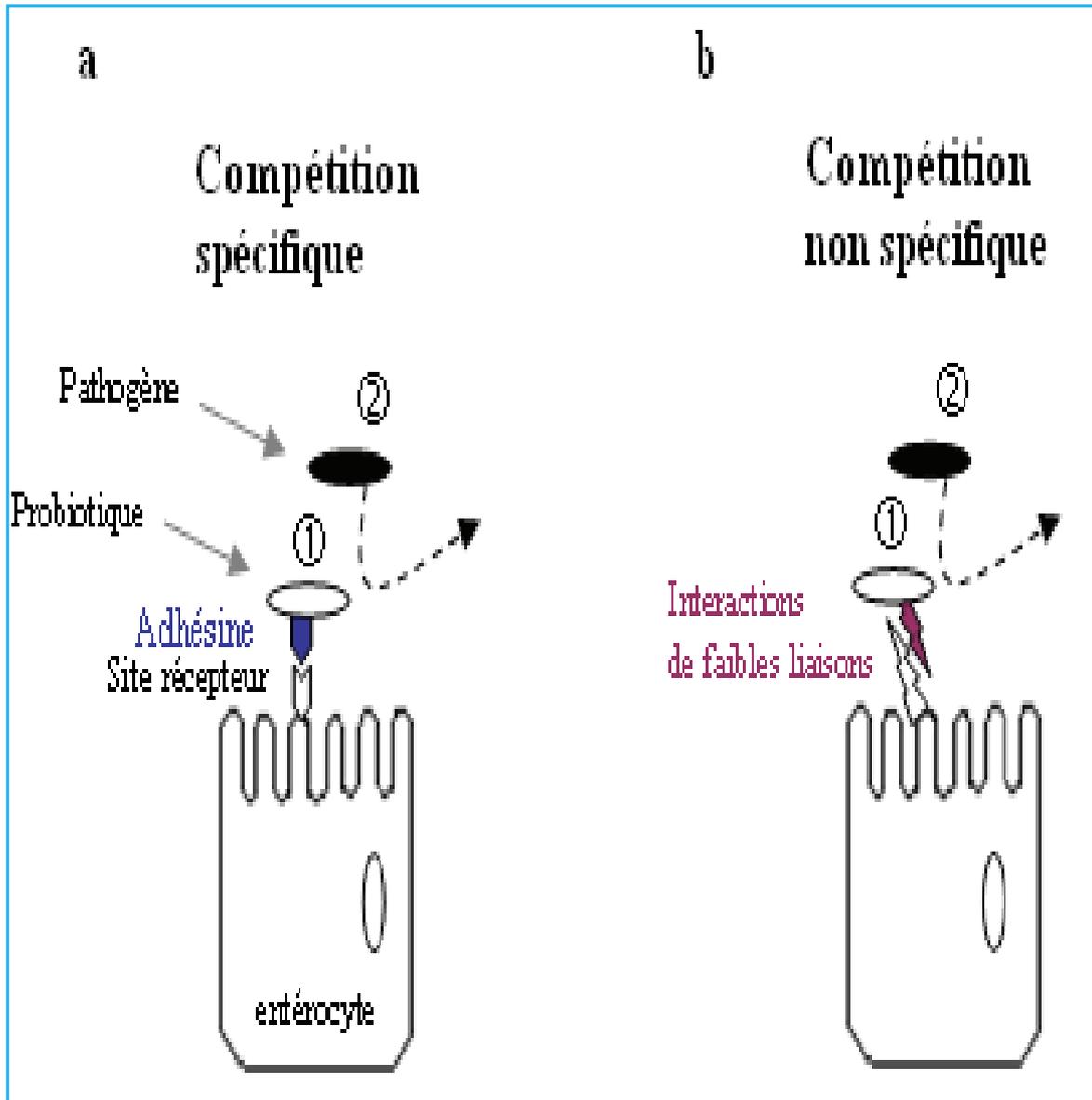


Figure 5. Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques. (Selon Servin et Coconnier, 2003).

4.2. Production de substances antimicrobiennes

Les lactobacilles, d'origine humaine, peuvent produire des substances antimicrobiennes, actives *in vitro* et *in vivo* sur les pathogènes. Ces substances sont les acides organiques (acide lactique, acétique et le diacétyl), le peroxyde d'hydrogène et des substances de nature protéiques appelées bactériocines (Servin, 2004).

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

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

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

Le diacétyl ou 2,3-butanedione est un composé aromatique possédant aussi une activité antibactérienne. Il a des effets inhibiteurs plus importants sur la croissance des bactéries à Gram négatif que sur celles des bactéries à Gram positif (Jay, 1982).

Les bactériocines sont des protéines, ou complexes de protéines ayant une activité inhibitrice contre un large spectre de souches bactériennes (Kleanhammer, 1993). La synthèse des bactériocines par voie ribosomique les différencie des antibiotiques de

nature peptidique provenant de l'assemblage enzymatique d'acides aminés libres. La famille des bactériocines est très diverse. Elle est constituée de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram+. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram- n'a été décrite. La membrane externe des bactéries à Gram négatif ne permet pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Dortu et Thonart, 2009).

Les bactériocines agissent généralement sur la membrane cytoplasmique des cellules sensibles et cela par la formation de petits pores membranaires (Luquet et Courrieu, 2005). Le résultat de cette action est un efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composants de la force proton motrice FPM : un composant électrique, le potentiel électrique et un composant chimique, le gradient du pH. La FPM joue un rôle central dans la synthèse de l'ATP, le transport actif et la mobilité bactérienne et donc sa désorganisation entraîne la cessation rapide des activités cellulaires et la mort de la cellule (Luquet et Courrieu, 2005 ; Dortu et Thonart, 2009).

Les lactobacilles sont largement connus par leur production de bactériocines (Todorov, 2005) telles que : l'acidocine B (*L. acidophilus* M46), la lactacine F (*L. johnsonii*), la lactacine S1 et lactacine S2 (*L. salivarius* BGHO1), la gasséricine A (*L. gasseri* LA39), la brévicine 27 (*L. brevis* SB27), la plantaricine ASM1 (*L. plantarum* A1) (Dortu et Thonart, 2009) et la caseicine 80 (*L. casei* B80) (Rammelsberg *et al.*, 1990).

La figure 6 montre l'activité antibactérienne d'une souche de *Lactobacillus fermentum* contre *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*. Les images, observées par microscopie électronique, montrent la désorganisation et la détérioration des cellules des germes pathogènes (Klayraung et Okonongi, 2009).

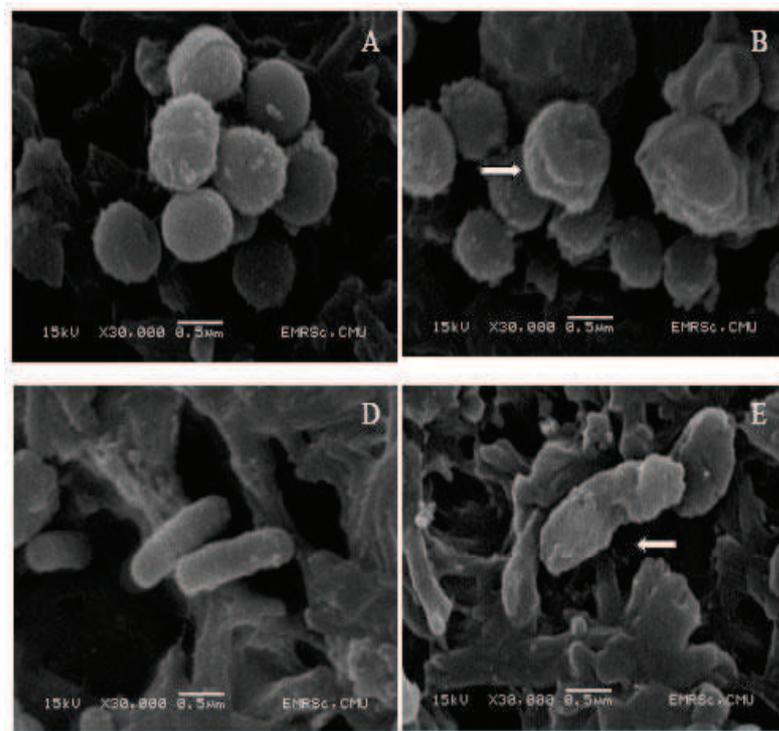


Figure 6. Activité antibactérienne d’une souche de *L. fermentum* contre *Staphylococcus aureus* Et *Listeria monocytogenes*. Les images (B) et (E) montrent des cellules détériorées de *S. aureus* et *L. monocytogenes* respectivement. Les images A et D correspondent à leurs cultures sans *Lactobacillus* (Microscopie électronique à balayage) (Klayraung et Okonongi , 2009).

4.3. Compétition au niveau de l’utilisation des nutriments

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

4.4. Stimulation des mécanismes de défense immunitaire

Ce mécanisme porte sur l’interaction des lactobacilles avec le système immunitaire pour accroître la réponse immune de l’hôte contre les pathogènes. Parmi les effets

observés, quelques auteurs soulignent une stimulation de l'immunité adaptative (IgA, IgG) et innée (macrophages, basophiles, monocytes) (Lee et Mazmanian , 2010).

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

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

En résumé, les mécanismes d'action exposés dans cette section présentent l'état actuel des connaissances sur l'action des lactobacilles probiotiques contre des pathogènes entériques. Toutefois, les mécanismes associés à des souches particulières ne peuvent pas être extrapolés à tous les microorganismes probiotiques. Chaque souche doit être étudiée de façon indépendante. Plusieurs recherches se développent pour identifier ces mécanismes d'action de probiotiques contre les germes pathogènes.

5. Critères de sélection des souches probiotiques destinées à l'Homme

Pour être sélectionnées en tant que probiotiques chez l'Homme, les souches microbiennes doivent posséder certaines propriétés fonctionnelles, sécuritaires et technologiques (FAO/ OMS, 2001 ; FAO/OMS, 2002 ; Tannock, 2003 ; WGO, 2008 ; Vasiljevic et Shah, 2008). Les différents critères de sélection sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3. Critères de sélection des probiotiques destinés à l'Homme (FAO/OMS, 2002).

<p>CRITERES FONCTIONNELS</p>	<ul style="list-style-type: none">- tolérance à l'acidité et aux enzymes gastriques.- tolérance à la bile et aux enzymes digestives.- adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastrointestinal.- production de substances antimicrobiennes et antagonisme vis-à-vis des pathogènes.- effets sur la santé documentés.
<p>CRITERES DE SECURITE</p>	<ul style="list-style-type: none">- souche pour l'usage humain d'origine humaine (isolée du tractus intestinal d'un Homme sain) ou alimentaire (utilisée dans les produits fermentés).- souche déposée dans une collection de cultures reconnue internationalement.- souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques.- historique de non pathogénicité.- pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques.
<p>CRITERES TECHNOLOGIQUES</p>	<ul style="list-style-type: none">- stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini.- conservation des propriétés probiotiques après production.

5.1. Propriétés fonctionnelles

Afin d'être conformes à la définition des probiotiques, les microorganismes doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte (Vasiljevic et Shah, 2008).

5.1.1. Résistance aux conditions gastriques

Les souches probiotiques, pour être efficaces, doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin et donc résister au cours de leur passage aux conditions hostiles de l'estomac telles que l'acidité et l'action de la pepsine (Dunne *et al.*, 2001). Durant le jeûne, le pH stomacal peut descendre très bas, jusqu'à atteindre 1,5 chez certaines personnes ce qui peut affecter drastiquement la croissance et la viabilité bactérienne (Draser *et al.*, 1969).

Les lactobacilles sont naturellement bien adaptés à des pH acides (Van de Guchte *et al.*, 2002). Lors de la fermentation lactique, ils produisent et accumulent dans leur environnement des composés acides qui rendent le milieu acide et défavorable à la croissance des autres bactéries (Adams, 2000 ; Servin, 2004). Dans ces conditions, les lactobacilles, sont protégés grâce à des mécanismes inductibles leur conférant une tolérance aux stress acide (Foster et Hall, 1991). Cette tolérance est augmentée en phase de croissance exponentielle ou bien si la bactérie subit une phase d'adaptation à pH acide préalablement au choc acide. Par conséquent, après ingestion, les lactobacilles rencontrent un autre environnement acide, l'estomac ce qui suggère leur adaptation et leur fonctionnement à des pH bas (Van de Guchte *et al.*, 2002).

Les lactobacilles peuvent réagir au stress acide par trois mécanismes (Lim *et al.*, 2000; Lorca *et al.*, 2002) :

- en limitant l'entrée des acides dans son cytoplasme,
- en alcalinisant le milieu intracellulaire grâce aux ATPases, les enzymes impliqués dans la libération d'ammonium et les enzymes impliquées dans la consommation

de protons par décarboxylation dans la fermentation malolactique ou L-malate est décarboxylé dans le cytoplasme par les enzymes malolactiques pour produire le L-lactate et du CO₂. Cette décarboxylation permet l'alcalinisation du cytoplasme et la production d'ATP (Poolman *et al.*, 1991 ; Nanatani et Abe, 2011),

- en protégeant les macromolécules contre les dérivés chargés par les protéines chaperonnes dont la fonction est d'assister d'autres protéines en assurant un repliement spatial adéquat (Lim *et al.*, 2000; Lorca *et al.*, 2002).

Les méthodes d'études, *in vitro*, de la résistance des probiotiques aux conditions stomacales reposent généralement sur la survie des bactéries mesurée principalement par dénombrement sur des milieux de culture gélosés après exposition à des conditions simulant le jus gastrique.

Plusieurs études ont montré que diverses souches appartenant aux espèces : *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. casei* sp, *L. plantarum* et *L. rhamnosus* possèdent une tolérance aux conditions du suc gastriques (Dunne *et al.*, 2001 ; Lim *et al.*, 2000; Lorca *et al.*, 2002; Khalil *et al.*, 2007; Xiaodong *et al.*, 2009; Kirtzalidou *et al.*, 2011).

1.1.2. Résistance aux conditions intestinales

La bile est une solution aqueuse jaune - verdâtre dont les constituants principaux sont les acides biliaires, le cholestérol, les phospholipides et le pigment biliverdine. Les acides biliaires (également connu sous le nom de sels biliaires) sont formés par des dérivés du cholestérol et par des stéroïdes acides sécrétés par le foie. Ils sont stockés et concentrés dans la vésicule biliaire et injectés dans le duodénum après la prise alimentaire. Ils permettent la fragmentation des gros globules de lipides alimentaires conduisant ainsi à la formation de microgouttelettes. Cette émulsion facilite alors la digestion des lipides par la lipase pancréatique. Le deuxième rôle des acides biliaires est d'inhiber la prolifération des bactéries de la flore intestinale dans la partie haute de l'appareil digestif par désassemblage des membranes biologiques (Begley *et al.*, 2006).

Le terme *acides biliaires* se réfère à la forme conjuguée. Dans le duodénum, les acides biliaires peuvent devenir des sels biliaires à la suite de la baisse de pH. Le terme *sels biliaires* se réfère à la forme ionique (déconjugée) de la sécrétion d'acides biliaires (figure 7).

Les tests de résistance à la bile reposent sur la survie et le comptage des bactéries après exposition à l'oxgall (Huang et Adams, 2004). L'oxgall, un dérivé de la bile bovine, est très fréquemment employé pour ces tests à une concentration de 0,3% correspondant à la concentration physiologique estimée chez l'Homme. Le temps d'exposition est généralement de 4 heures, il correspond au temps de passage du digeste au niveau intestinal (Parasad *et al.*, 1998; Huang et Adams, 2004).

Plusieurs études ont montré que les probiotiques d'origine intestinale comme les lactobacilles ont développé des résistances à l'action détergente des sels biliaires. L'un des mécanismes de cette résistance est la déconjugaison des sels biliaires grâce à la « Bile Salt Hydrolase » (BSH) qui est aussi appelée cholyglycine hydrolase. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des sels biliaires conjugués avec la glycine ou la taurine en résidus d'acides aminés et en sels biliaires libres ce qui a pour effet de diminuer la solubilité de la bile et de réduire son activité détergente (figure 7) (Begley *et al.*, 2006 ; Hamon *et al.*, 2011).

Un autre mécanisme responsable de la résistance des lactobacilles aux sels biliaires est l'extrusion de la bile. Ce mécanisme est réalisé grâce aux systèmes *multidrug resistance* (MDR). Les MDR sont ainsi responsables de la résistance à de nombreux composés toxiques comme les antibiotiques, les solvants organiques, les détergents et les sels biliaires. La première caractérisation d'un système à efflux de type MDR chez les lactobacilles a été réalisée chez *L. brevis*, démontrant ainsi son rôle dans la résistance à des composés toxiques (Sami *et al.*, 1997). D'autres travaux ont démontré l'importance des systèmes MDR dans la résistance aux sels biliaires chez différentes souches de *L. acidophilus* (Pfeiler et Klaenhammer, 2009) et chez *L. reuteri* ATCC 55730 (Whitehead *et al.*, 2008).

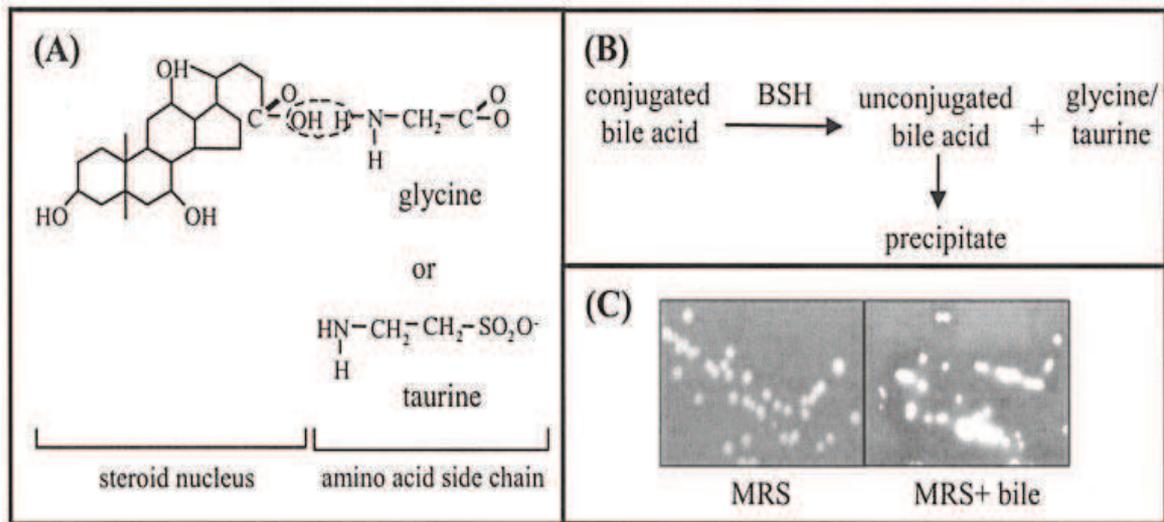


Figure 7. (A) La structure chimique des acides biliariques. Les acides biliariques primaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol et sont conjugués avec soit la glycine ou la taurine avant la sécrétion. Le groupe carboxyle de l'acide biliaire et le groupe amine de l'acide aminé sont liés par une liaison amide. (B) La réaction catalysée par l'enzyme BSH (*bile salt hydrolase*) ; la BSH clive la liaison peptidique d'acides biliariques, ce qui se traduit par l'élimination du groupe d'acides aminés à partir du noyau stéroïde. Les acides biliariques non conjugués résultants précipitent à un pH faible. (C) Détection de l'activité BSH : *L. plantarum*, qui a été cultivé pendant une nuit dans du bouillon MRS, a été ensemencé sur gélose MRS et sur gélose MRS supplémenté avec 0,2% (P/V) d'acide glycodéoxycholique (dérivé de la bile) et incubées de manière anaérobie pendant 48 h. Les précipités blancs autour des colonies et les zones claires dans le milieu sont indicatifs de la présence d'une activité BSH (Begley *et al.*, 2006).

5.1.3. Adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte

Afin d'exercer leurs effets bénéfiques, les probiotiques doivent adhérer au mucus intestinal ou aux cellules épithéliales et persister dans l'intestin (Collado *et al.*, 2005; Xiaodong *et al.*, 2009). La capacité des probiotiques à adhérer aux surfaces des muqueuses empêche leur évacuation rapide par la contraction intestinale et après écoulement péristaltique du digeste.

Vu la difficulté d'étudier l'adhérence des probiotiques, *in vivo*, différentes méthodes ont utilisées, *in vitro*, des lignées cellulaires intestinales d'origine humaine en culture comme modèles mimant l'épithélium intestinal (Vesterlund *et al.*, 2005; Gueimonde *et al.*, 2006). La lignée Caco-2 est l'un des meilleurs modèles pour étudier l'adhésion

bactérienne (Servin, 2003). Elle a été isolée à l'origine d'un adénocarcinome du colon humain (Fogh *et al.*, 1977). Les cellules Caco-2 se différencient spontanément dans des conditions standard de culture. Une fois différenciées ; elles expriment les caractéristiques des entérocytes matures (Pinto *et al.*, 1983). L'adhésion entre les cellules Caco-2 enterocyte-like et les bactéries probiotiques se fait par interactions entre récepteurs spécifiques eucaryotes et ligands bactériens.

Plusieurs recherches ont démontré l'adhésion de certaines souches de lactobacilles aux cellules Caco-2 enterocyte-like telles que *L. acidophilus* BG2FO4, *L. johnsonii* La I, *L. rhamnosus* DR20, *L. acidophilus* HN017, *L. casei* sp *rhamnosus* Lcr35 et *L. rhamnosus* GG (Coconnier *et al.*, 1992 ; Tuomola et Salminen, 1998).

Les mécanismes d'adhésion des lactobacilles impliquent plusieurs protéines de leurs structures de surface. Parmi ces structures les adhésines. Ce sont des protéines ou des sous unités de glycoprotéines de la couche S (S layer) présentant toutes une structure similaire. Elles possèdent en commun une extrémité N-terminale (ayant un peptide signal qui cible le transport de la protéine vers la membrane plasmique), une extrémité C-terminale (qui contient un motif LPxTG reconnu par une famille de protéines appelées sortases et qui va permettre l'ancrage de la protéine au peptidoglycane de la paroi bactérienne) et un domaine MUB (pour MUcus Binding protein) (Ton-That *et al.*, 2004, Marraffini *et al.*, 2006). Un autre type de protéines favorisant l'adhésion pourraient également se trouver dans la surface S de certains lactobacilles. Antikainen *et al.*, (2002) a démontré que la protéine CbsA de *L. crispatus* JCM 5810 pouvait adhérer aux collagènes, à la laminine et aux acides lipotéichoïques . Il a été démontré aussi que la protéine SlpA de *L. brevis* ATCC 8287 adhérerait à des lignées cellulaires épithéliales humaines et à la fibronectine (Hynonen *et al.*, 2002).

D'autres protéines de surface ont été décrites par des auteurs impliquant la liaison des lactobacilles à l'un des composants des cellules épithéliales ; le mucine (Coconnier *et al.*, 1992 ; Roos et Jonsson , 2002).

Des molécules non protéiques (fractions saccharidiques de surfaces, acide lipotéichoïque) ont été décrites comme favorisant l'adhésion des mais elles ne sont pas pour l'instant précisément identifiées (Velez *et al.*, 2007).

Des structures comme les fimbriae ont été supposées être impliqués dans l'adhésion des lactobacilles. Des gènes codant pour des fimbriae ont été retrouvés dans le génome de *L. johnsonii* NCC533 (Pridmore, 2004).

5.1.4. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne contre les germes pathogènes est l'un des critères fréquemment utilisés pour la sélection des souches probiotiques. La méthode la plus utilisée est la co-incubation généralement sur un milieu gélosé permettant la croissance du probiotique et de la gamme de souches pathogènes indicatrices (Dunne *et al.*, 2001). Les substances antimicrobiennes produites par les lactobacilles ont été détaillées plus haut dans la section - production de substances antimicrobiennes.

5.2. Aspect sécuritaire

Les microorganismes utilisés comme probiotiques doivent répondre à un critère de santé majeur ; c'est l'absence de toute pathogénicité. En effet, les probiotiques sont des organismes vivants et de ce fait, ils peuvent être responsables théoriquement d'effets secondaires comme des risques d'infection systémique ou de transfert génétique de résistance (Gupta *et al.*, 1995 ; Salminen *et al.*, 1998). Les lactobacilles ont été associés depuis longtemps aux fermentations alimentaires et sont généralement considérées comme étant sans danger en tant que partie d'aliments et de suppléments alimentaires chez l'Homme (Gasser, 1994). Toutefois, l'isolement croissant des bactéries lactiques dans des infections cliniques (Aguirre et collins, 1993 ; Kochan *et al.*, 2011) ainsi que l'augmentation de souches résistantes aux antimicrobiens par transfert génétique imposent l'étude de l'innocuité des souches de lactobacilles probiotiques (FAO/OMS, 2002).

5.3. Propriétés technologiques

Plusieurs aspects technologiques doivent être pris en compte dans la sélection des probiotiques tels que :

5.3.1. Aptitude à la production industrielle

Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les probiotiques doivent survivre en grand nombre au procédé de fabrication (FAO/OMS, 2002). Il est généralement admis

qu'un nombre minimal de 10^7 cellules viables par gramme de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique (Holzaphel, 2002). Une souche qui ne peut pas atteindre une concentration minimum de 10^9 cellules/g de produit déshydraté à chaud (spray) ou de 10^{10} cellules/g de produit déshydraté à froid (lyophilisation) ne peut être utilisée industriellement car, à plus faible concentration, son prix de revient serait trop élevé et les doses de médicaments et d'additifs à ajouter aux aliments deviendraient trop importantes (Holzaphel, 2002 ; Hansen, 2002 ; Leroy et De Vuyst, 2004).

5.3.2. Présentation du probiotique et ses conditions de stockage

Les probiotiques doivent rester stables dans les conditions de stockage. Sous forme de préparations concentrées, le médicament ou l'additif alimentaire doivent pouvoir se conserver au moins pendant une année (Bell, 2001). Pour ce faire, il est impératif que leur teneur en humidité ne dépasse pas 3 %. Par contre, dans l'aliment dont l'humidité atteint normalement et légalement 13 %, la conservation peut être réduite à environ 3 mois (Gardiner *et al.*, 2000 ; Bell, 2001 ; Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). Tous ces facteurs doivent être connus. Le fait qu'ils ne soient pas assez respectés explique les fréquents échecs dans l'emploi des probiotiques (Siuta-Cruce et Goulet, 2001). Le tableau 4 indique les souches de lactobacilles commercialisées en tant qu'alicament chez l'Homme.

6. La matière fécale source de probiotiques

La composition de la microflore intestinale est spécifique de chaque espèce animale; voir même de l'individu (Ducluzeau et Raibaud, 1979). En effet, à la naissance chez l'Homme, le tube digestif du nouveau-né est pratiquement stérile. Cependant, il est rapidement colonisé par divers groupes de microorganismes. L'établissement de cette microflore gastro-intestinale est fortement influencé par des facteurs génétiques, la flore bactérienne maternelle, les facteurs environnementaux (Roger et McCartney, 2005; Jose et Saavedra, 2007) et le type de nutrition (Holzaphel *et al.*, 1998; Parasho *et al.*, 2007). La distribution des espèces bactériennes de cette microflore diffère dans les compartiments du tube digestif. Une population moins dense est observée dans l'estomac et le duodénum en raison des conditions acides, alors qu'une population plus diversifiée et plus dense est observée dans le jéjunum et l'iléum. Le côlon est la partie la plus colonisée du tractus

Tableau 4. Souches de lactobacilles probiotiques commercialisées à utilisation chez l'Homme (WGO, 2008).

Souches (désignation, alternatives)	Nom commercial	Fabriquant
<i>L. acidophilus</i> LA-5		Chr. Hansen
<i>L. acidophilus</i> NCFM		Danisco
<i>L. casei</i> DN-114 001	Actimel, DanActive	Danone/Dannon
<i>L. casei</i> CRL431		Chr. Hansen
<i>L. casei</i> F19	Cultura	Arla Foods
<i>L. casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>L. johnsonii</i> La1 (Lj1)	LCI	Nestlé
<i>L. plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva	Next Foods Probi
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Reuteri	BioGaia Biologics
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit et autress	Valio
<i>L. rhamnosus</i> LB21	Verum	Norrmejerier
Testé comme mélange: <i>L. acidophilus</i> CL1285 & <i>L. casei</i> Lbc80r	Bio K+	Bio K+ Interantional
Testé comme mélange: <i>L. rhamnosus</i> GR-1 & <i>L. reuteri</i> RC-14	FemDophilus	Chr. Hansen
Testé comme mélange: <i>L. helveticus</i> R0052 & <i>L. rhamnosus</i> R0011	A'Biotica et autres	Institut Rossel
Testé comme mélange: VSL#3 (mélange d'une souche de <i>Streptococcus thermophilus</i> , quatre souches de <i>Lactobacillus</i> sp & trois de <i>Bifidobacterium</i> sp	VSL#3	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.

digestif (Salminen *et al.*, 1998). Après quelques minutes de la naissance, nous retrouvons principalement des coliformes et des streptocoques, mais les bifidobactéries et les bactéroïdes deviennent rapidement majoritaires. À un âge plus avancé, la flore se diversifie et les lactobacilles, les eubactéries, les clostridies et les fusobactéries augmentent en proportion (Mackie *et al.*, 1999).

La microflore intestinale possède des fonctions nutritionnelles, métaboliques, immunologiques et protectrices. En effet, par la fermentation de sucres (digestibles ou non), elle libère principalement des gaz (H₂, CO₂), de l'acide lactique et des acides gras à courtes chaînes (acétate, butyrate et propionate) (Tannock, 2003). Ces derniers, particulièrement le butyrate, sont absorbés au niveau du colon et sont utilisés comme source d'énergie par les cellules humaines (Quigley, 2011). La microflore joue aussi un rôle de protection contre les bactéries potentiellement pathogènes (figure 8) par un effet barrière, en empêchant leur passage dans la circulation sanguine, en inhibant leur prolifération (production de substance antimicrobiennes) et en empêchant leur implantation dans le tractus digestif (compétition pour les nutriments et les sites d'adhésion) (Liévin-Le Moal et Servin, 2006).

C'est parmi cette flore bénéfique autochtone de sujets sains que nous pouvons isoler des souches bactériennes potentiellement probiotiques adaptées aux conditions gastro-intestinales et qui se trouvent dans la matière fécale (Vaughan *et al.*, 1999 ; FAO/OMS, 2002).

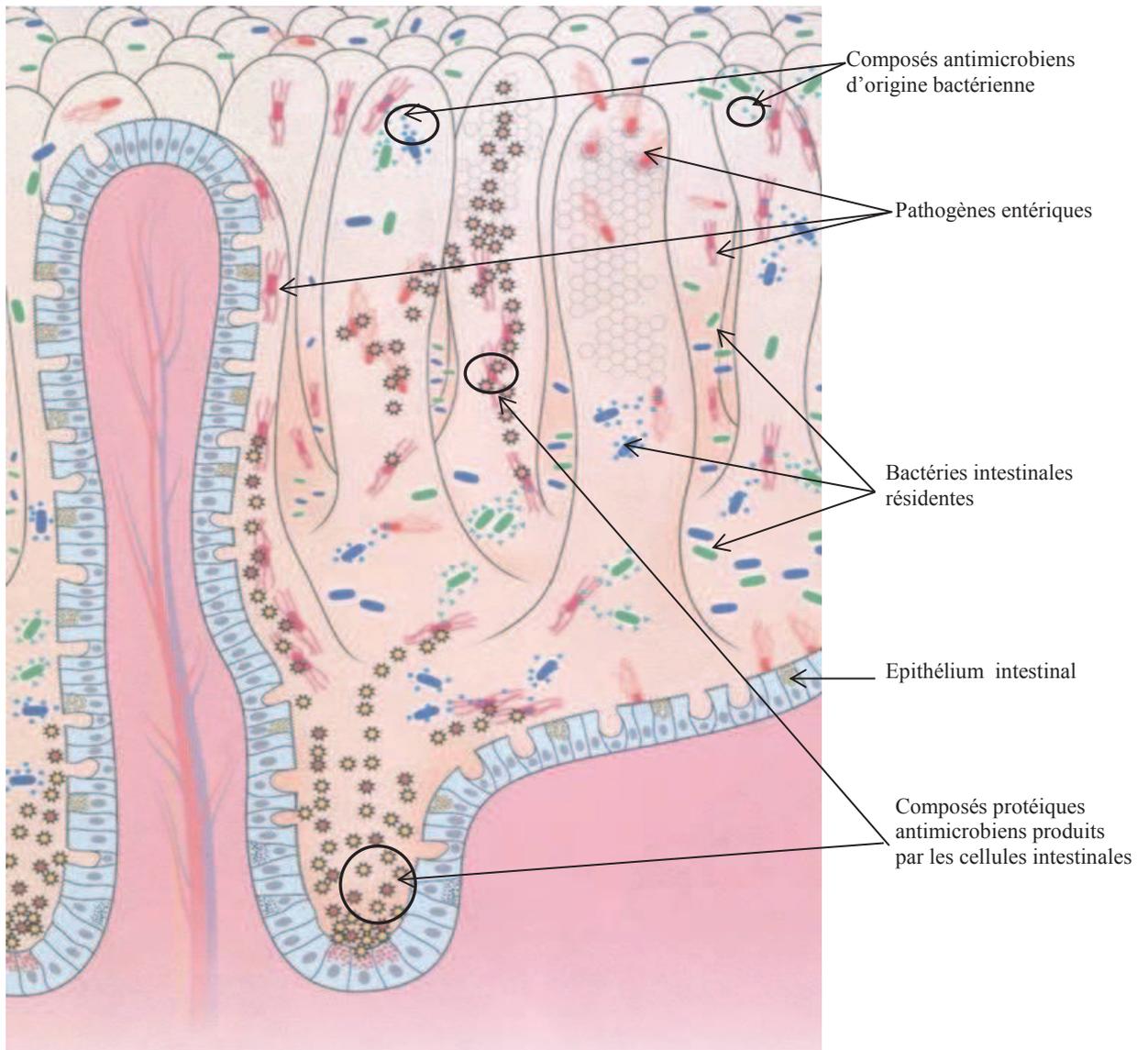


Figure 8. Défenses antimicrobiennes de l'hôte face à l'intrusion de micro-organismes pathogènes au niveau du tractus intestinal (Tirée de Liévin-Le Moal et Servin , 2006).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le but de cette étude était d'isoler des souches de lactobacilles à caractères probiotique à partir de selles d'enfants. Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Jijel et au Centre Wallon de Bio-Industries / Gembloux Agro-Biotech - Université de Liège/Belgique.

1. Collection des échantillons

La niche écologique utilisée, pour l'isolement des bactéries lactiques, est les selles d'enfants, âgés de 5 à 10 ans. L'étude, a été conduite sur 7 échantillons collectés dans différentes régions rurales de la wilaya de Jijel : Taxanna, Jimla, Borj Tahar, Beni Yadjis, El Aouana et Chahna. Les échantillons de selles d'enfants ont été collectés dans des pots propres et acheminés, dans des glacières directement au laboratoire pour être analysés le jour même.

2. Isolement des bactéries lactiques

La moyenne des pH des échantillons de selles collectés a été déterminée afin d'ajuster le pH du milieu de De Man Rogosa Sharp (MRS) préparé pour l'isolement des bactéries lactiques. Le milieu de De Man Rogosa Sharp (annexe 2) est un milieu sélectif pour l'isolement des lactobacilles mais il permet, également, le développement de certaines espèces de bactéries lactiques des genres *Leuconostoc* et *Streptococcus*.

Pour isoler les bactéries lactiques, deux séries de dilutions décimales ont été préparées à partir de selles d'enfants comme suit : Un gramme de chaque échantillon de selles a été pesé et déposé dans 9 ml d'eau peptonée stérile ; c'est la solution mère. Après homogénéisation, 1ml de cette solution mère a été transféré dans 9 ml d'eau peptonée ; c'est la dilution 10^{-1} . De la même manière, les dilutions suivantes ont été préparé jusqu'à la dilution 10^{-7} . Un ml de chaque dilution a été ensemencé sur gélose MRS à raison de 3 boîtes par dilution. Les boîtes de Pétri ont été incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24 à 72 h. Les lactobacilles sont généralement des microaérophiles ; leur incubation en anaérobiose a été assurée par la mise des boîtes de Pétri dans des sachets de plastiques stériles fermés.

3. Purification des bactéries lactiques

Afin de purifier les souches de bactéries lactiques, plusieurs repiquages successifs ont été réalisés sur gélose MRS. Le prélèvement et la remise en suspension ont été réalisés, uniquement, pour des colonies bien distinctes, homogènes et bien développées. La pureté de la souche a été vérifiée par examen macroscopique et microscopique.

Les souches de BL isolées ont été conservées sur bouillon MRS avec 40% (v/v) de glycérol stérile à -20°C .

4. Identification des lactobacilles

L'identification des bactéries lactiques, entre autres du genre *Lactobacillus*, est basée sur l'étude des caractères morphologiques (examen macroscopique et microscopique après coloration de Gram) et des caractères biochimiques (recherche de la catalase) (Sutra *et al.*, 1998).

4.1. Etudes des caractères morphologiques

4.1.1. Examen macroscopique

Il consiste à décrire les colonies obtenues après culture sur milieu MRS solide de la souche bactérienne pendant 24 à 48 h : selon la taille, la pigmentation, le contour, l'aspect...

4.1.2. Examen microscopique

L'examen microscopique est révélé par la coloration de Gram. Celle-ci permet de faire la différenciation entre les bactéries Gram positives et Gram négatives et renseigne sur la forme et la disposition des bactéries. La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode classique (annexe 1).

4.2. Etude des caractères biochimiques

4.2.1. Recherche de la catalase

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

1998). Pour réaliser ce test, une culture bactérienne (ose de colonie) à tester, a été émulsionnée dans de l'eau oxygénée sur lame. La présence d'une catalase se manifeste par l'apparition d'une mousse renseignant sur la présence de bulles d'oxygène.

4.2.2. Type fermentaire

La technique de Gibson - Abdelmalek modifiée (Guiraud, 1998) a été utilisée pour mettre en évidence le type fermentaire des bactéries lactiques testées. Elle permet d'apprécier le métabolisme énergétique utilisé, par une espèce bactérienne, pour la dégradation d'un substrat carboné. Deux voies cataboliques sont possibles : la voie hétérofermentaire qui s'accompagne avec un dégagement gazeux (CO₂) et la voie homofermentaire qui se produit sans gaz.

Une culture d'une nuit (18 h) de la souche, à tester, a été préparée sur bouillon MRS. L'incubation a été réalisée à 37°C en anaérobiose. Le milieu gélosé de Gibson – Abdelmalek (annexe 2) fondu a été mis en tubes stériles et laissé solidifier en position verticale. Ensuite, il a été ensemencé par piqure centrale par la culture de la souche testée. Un bouchon de gélose blanche stérile (composé d'agar seulement) a été coulé en surface. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 5 à 7 jours en anaérobiose. Le développement d'une espèce homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu de culture et le bouchon de gélose. Par ailleurs, le détachement de celui du milieu de culture traduit un dégagement de CO₂ caractéristique des espèces hétérofermentaires (figure 9).

4.2.3. Profil de fermentation des sucres

L'étude du profil fermentaire des sucres des souches isolées a été réalisée par galerie API 50 CH (Biomérieux, France). La galerie API 50 CHL est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'identification des lactobacilles. La galerie est constituée de 50 microtubes permettant la fermentation des hydrates de carbone et dérivés. Le test est réalisé selon les étapes suivantes :

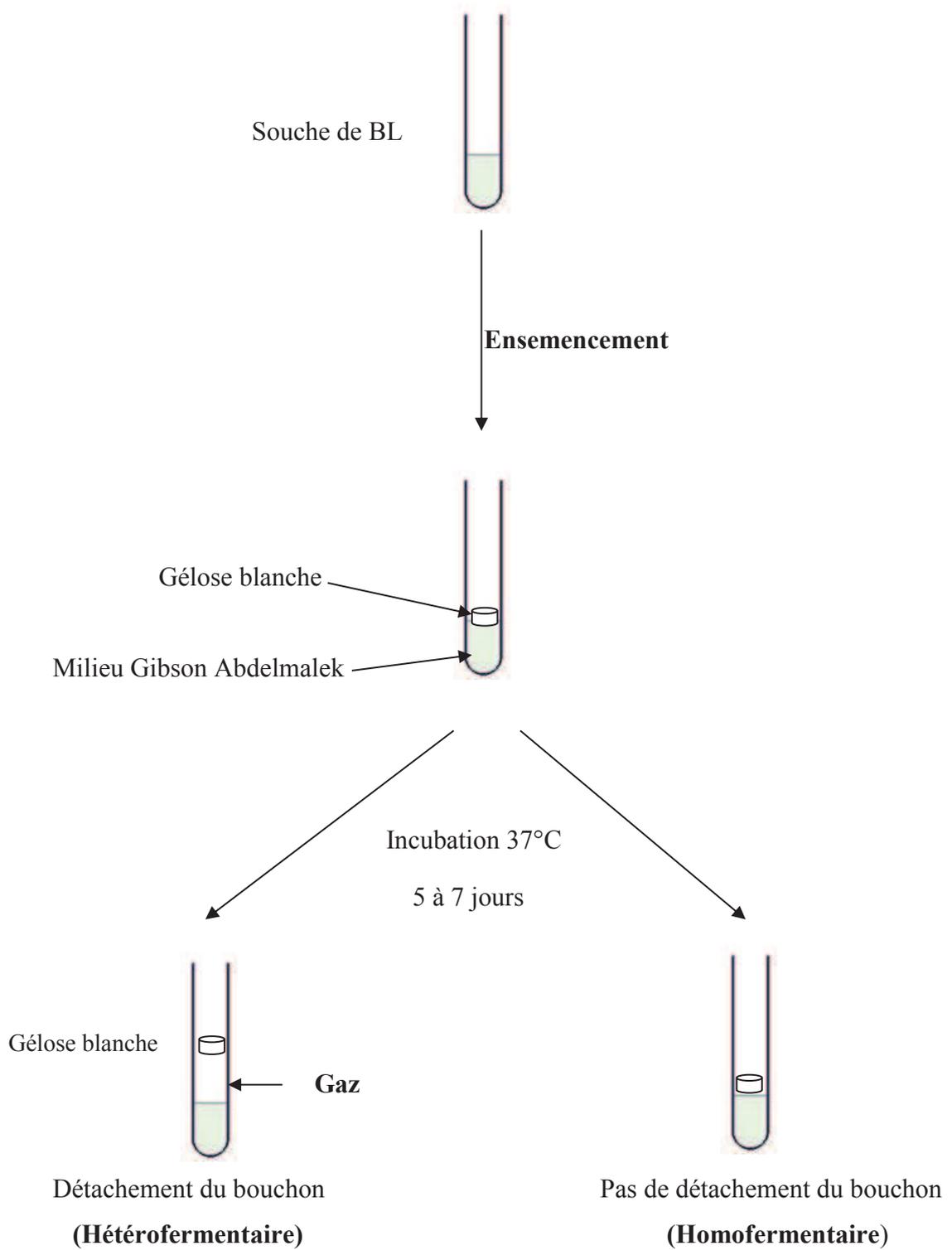


Figure 9. Schéma illustrant les différentes étapes de la mise en évidence du type fermentaire des bactéries lactiques.

- **Préparation des cultures des bactéries lactiques**

Des cultures d'une nuit des bactéries lactiques ont été préparées sur gélose MRS et la pureté de chaque souche a été vérifiée. Pour préparer l'inoculum, des colonies ont été récoltées par écouvillonnage et ensemencées sur le milieu CHL 50 afin d'obtenir une suspension bactérienne d'une densité de 2 McFarland (McF) standard.

- **Ensemencement, incubation et lecture**

Les 50 microtubes de la galerie API 50 CH ont été inoculés par la suspension bactérienne de chaque souche avec une pipette stérile en évitant la formation de bulles d'air et ensuite une couche de paraffine stérile a été ajoutée. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 48 h en anaérobiose. La fermentation se traduit par un changement de couleur dans le microtube, dû à une production d'acides en anaérobiose révélée par l'indicateur du pH du milieu choisi. Le premier tube sans principe actif sert de témoin négatif.

La lecture a été réalisée après 24h et 48h. Les résultats ont été envoyés à la société Biomerieux via le site <https://apiweb.biomerieux.com> pour le traitement des résultats et l'identification des espèces.

5. Évaluation des aptitudes probiotiques *in vitro*

L'étude des caractères probiotiques a été réalisée selon le diagramme de sélection des souches probiotiques schématisé dans de la figure 10 (Havenaar *et al.*, 1992 ; FAO/OMS, 2002).

5.1. Habilité à survivre dans les conditions gastriques simulées

Nombreuses études ont utilisées l'acidité, à elle seule, pour évaluer la survie des souches probiotiques lors du passage de l'estomac. Dans notre étude, Il nous a semblé intéressant de tester nos souches vis-à-vis de l'effet du pH bas seule et vis-à-vis des conditions gastriques simulées (effets pH bas avec de la pepsine).

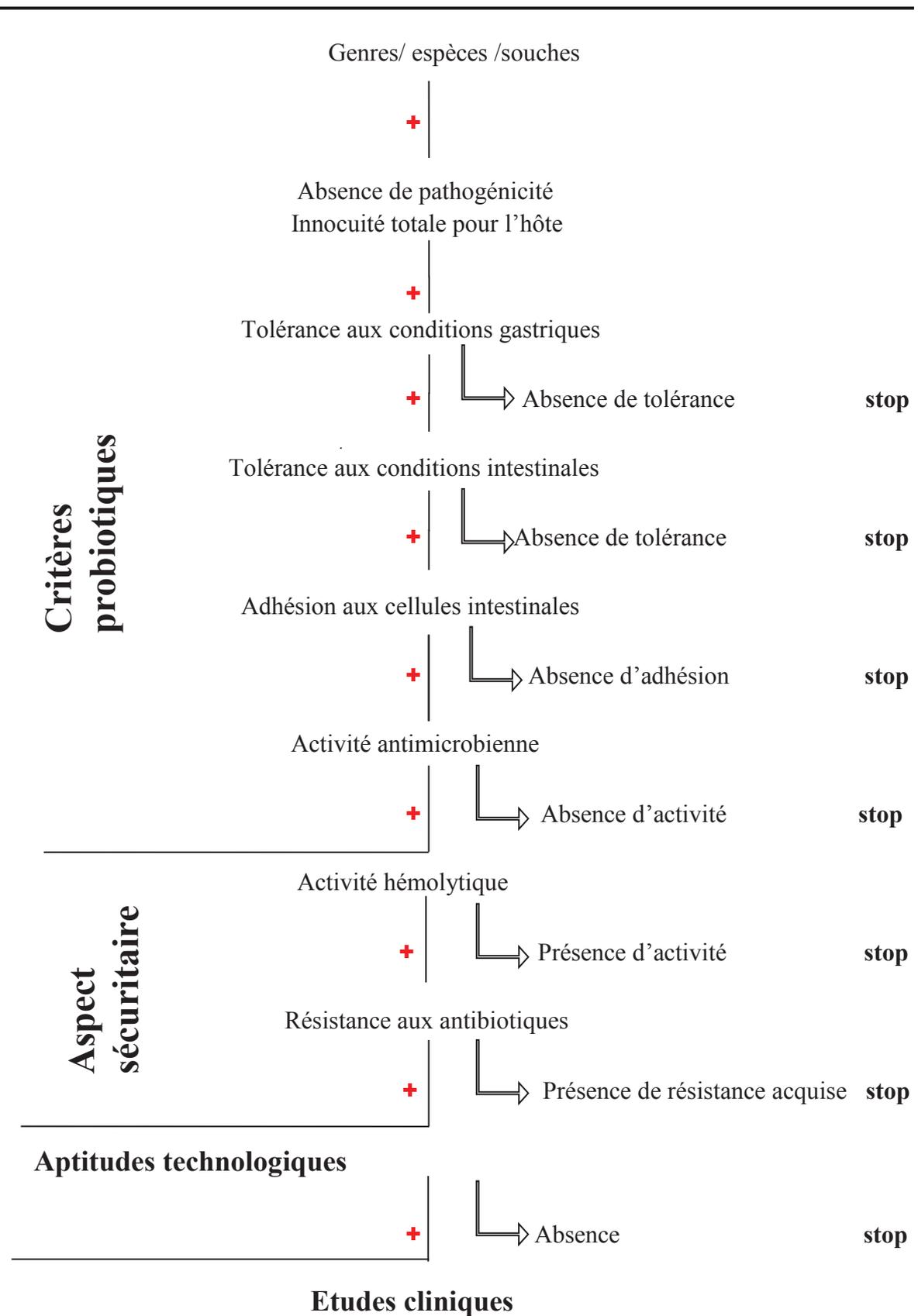


Figure 10. Diagramme de sélection, *in vitro*, des souches microbiennes à usage probiotique (source Havenaar *et al.*, 1992 ; FAO/OMS, 2002).

L'effet du pH 1,5, à lui seul, sur les souches de BL a été examiné après 1 h et 2 h d'exposition.

La capacité des BL à survivre dans des conditions mimant celles de l'estomac de l'Homme a été effectuée selon la technique décrite par Hung et Adams, (2004). Le jus gastrique simulé a été préparé comme suit : 3g/l de pepsine (EC 3.4.23.1, 7190 Merck) sont ajoutés à une solution de NaCl à 0.5% (P/V). La préparation a été ajustée à pH 1.5. Un millilitre de chaque culture bactérienne (10^9 cellules.ml⁻¹; DO_{620nm} entre 0,5 et 0,7) a été inoculé dans 9 ml du suc gastrique simulé. Ensuite, 0,1 ml du suc gastriqueensemencé ont été prélevé à 0 h et 2 h d'exposition et ensemencés par étalement sur gélose MRS. Le nombre des bactéries viables a été déterminé après 24 à 48 h d'incubation en anaérobiose (figure 11). L'expérience a été répétée trois fois.

5.2. Habilité à survivre dans les conditions intestinales simulées

La technique de Hung et Adams, (2004) a été utilisée pour étudier la capacité des bactéries lactiques à survivre dans des conditions similaires du petit intestin de l'Homme (figure 12). Pour cela, un jus intestinal simulé a été préparé de la manière suivante : 1 g/l de pancréatine (CE 232-468-9, P7545 Sigma-Aldrich), sont ajoutés à du NaCl à 0,5% (P/V), avec et sans 0,3% de sels biliaires oxgall (Ox-biliaire, Sigma). Les deux préparations sont ajustées à pH 8. Ensuite, Un millilitre de chaque culture bactérienne (10^9 cellules.ml⁻¹) a été inoculé dans 9 ml des deux préparations. 0,1 ml de chaque préparation ont été prélevés à 0 h et 4 h d'exposition et ensemencés par étalement sur gélose MRS. Les bactéries viables ont été dénombrées après 24 à 48 h d'incubation en anaérobiose. L'expérience a été répétée trois fois.

5.3. Adhésion, *in vitro*, aux cellules Caco-2

L'adhésion bactérienne des BL aux cellules épithéliales humaines de la lignée Caco-2 a été étudiée selon la méthode décrite par Sugimura et *al.*, (2011) modifiée par Ren *et al.*, (2012). Le test a été réalisé selon les étapes suivantes (figure 13) :

- Préparation des cellules Caco-2

Des monocouches de cellules Caco-2 ont été cultivées sur *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Lonza BE12- 604F) additionné de 10% de sérum fœtal bovin

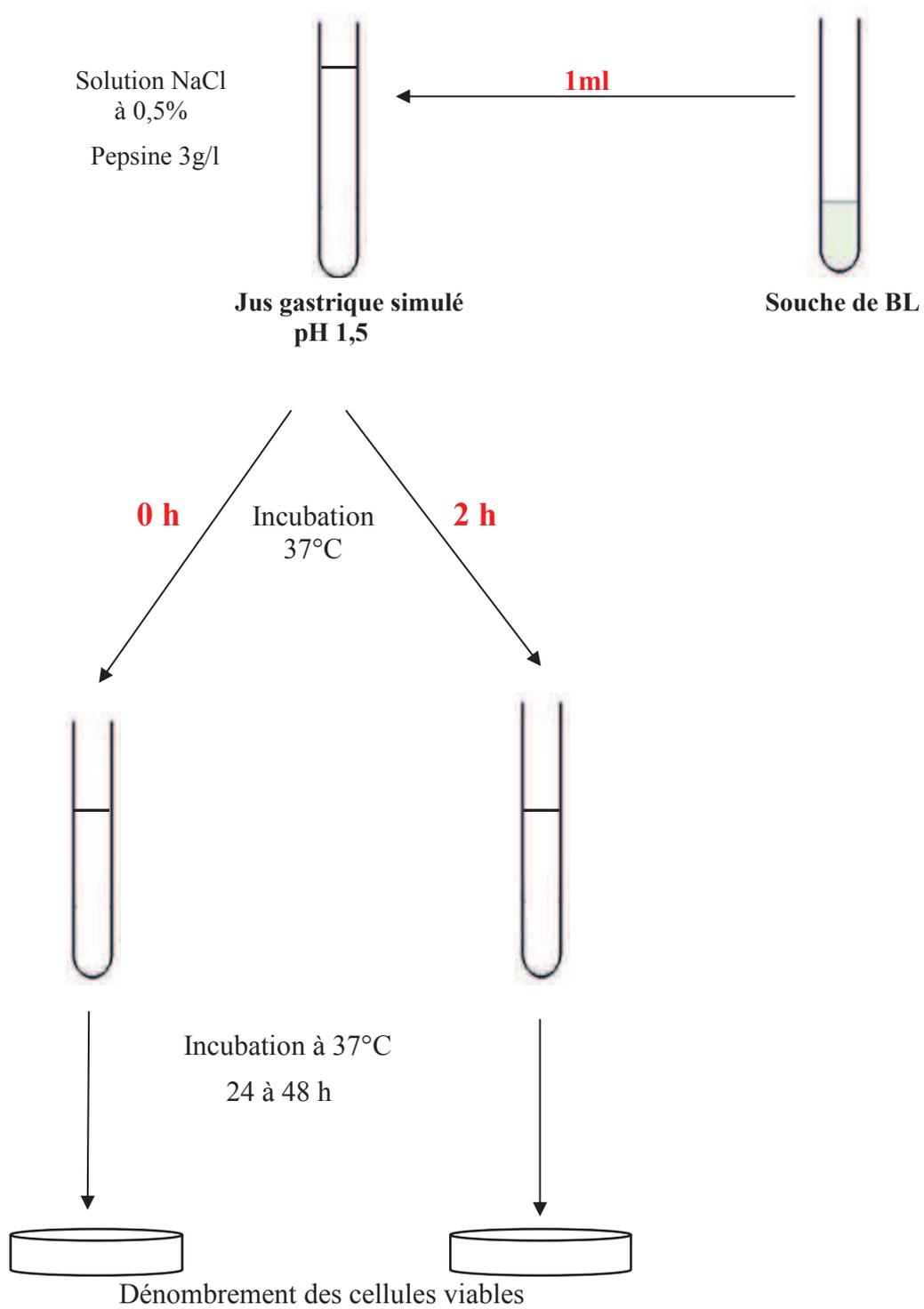


Figure 11. Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'habilité des bactéries lactiques à survivre dans les conditions gastriques simulées.

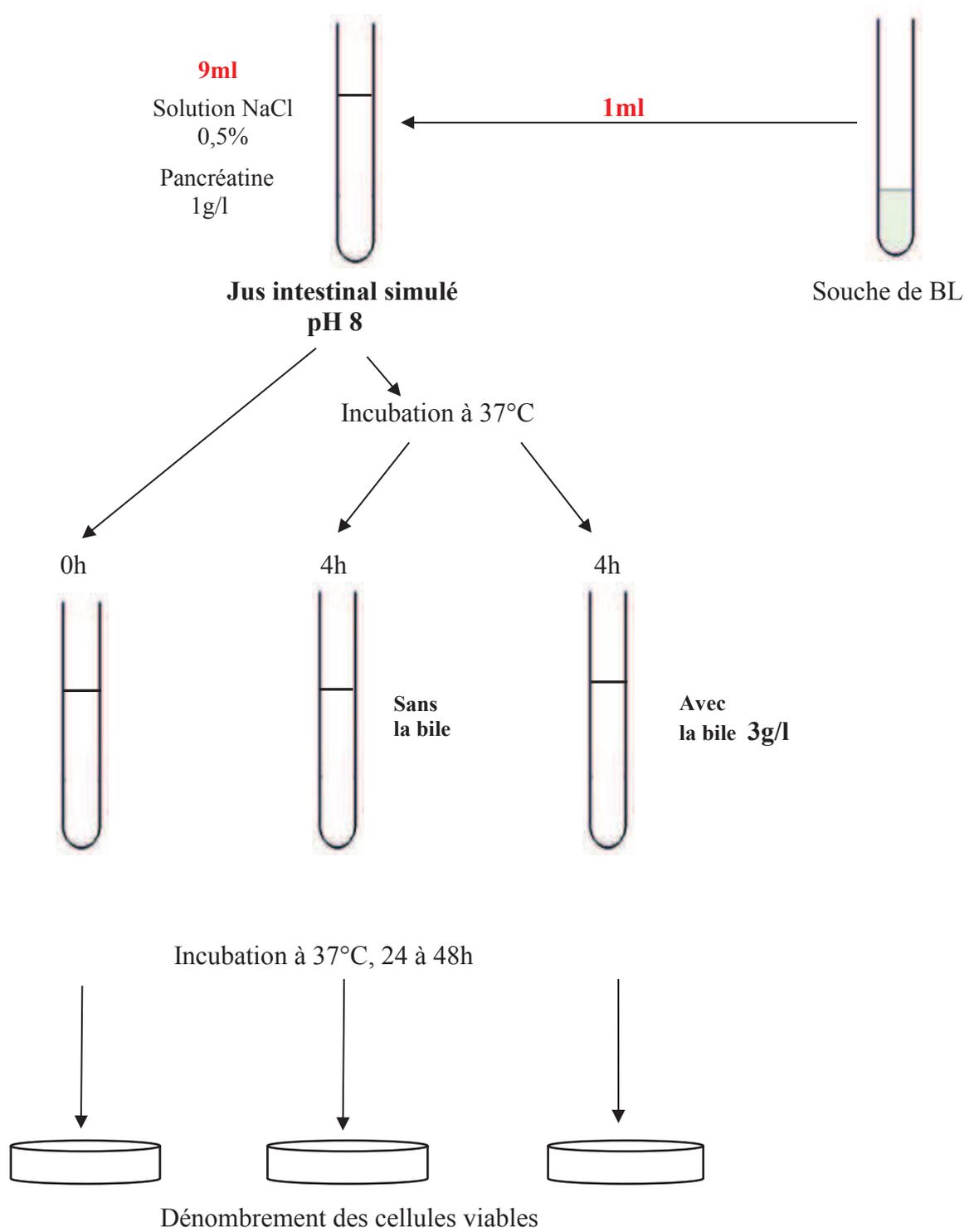


Figure 12. Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'habilité des bactéries lactiques à survivre dans les conditions intestinales simulées.

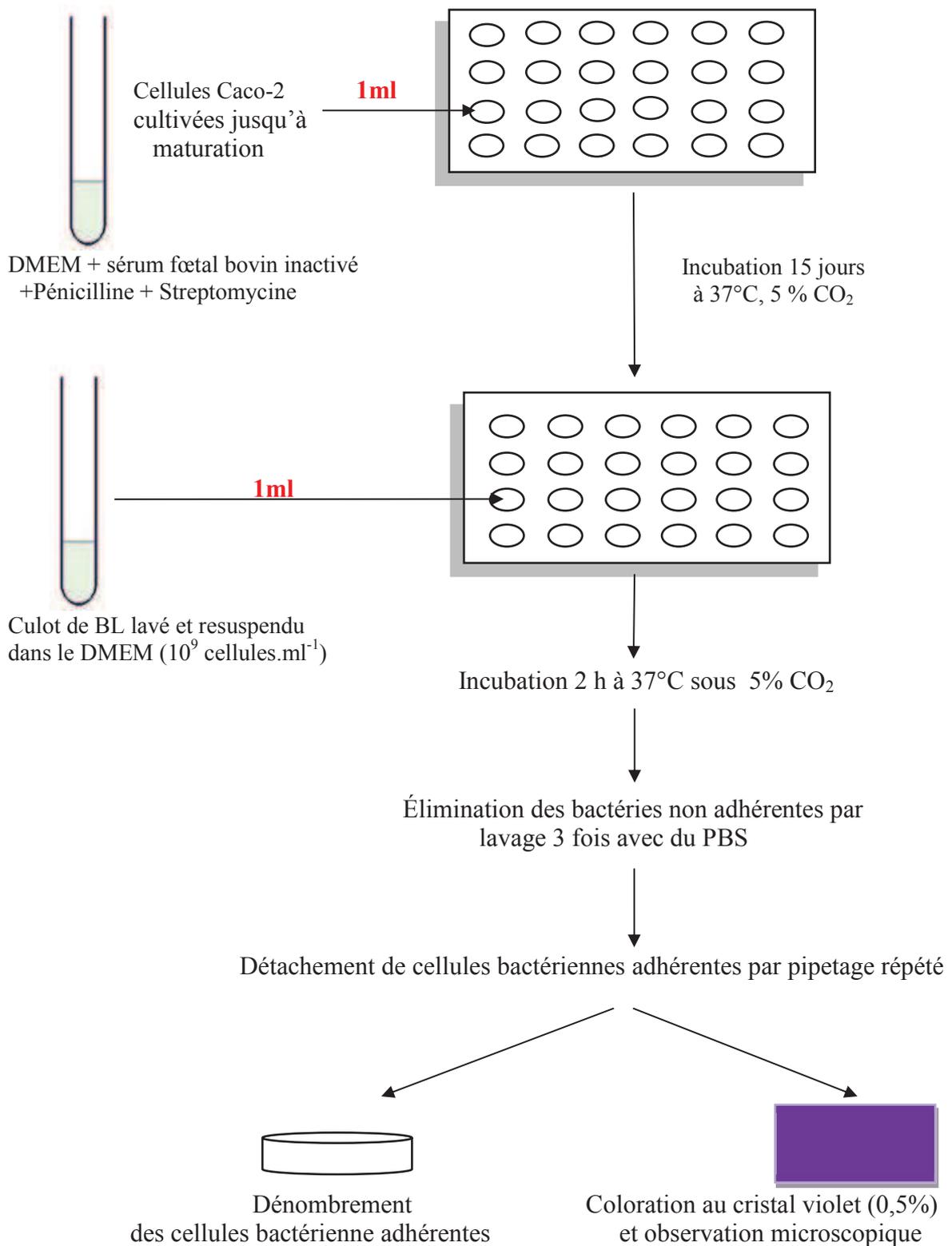


Figure 13. Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'adhérence des bactéries lactiques aux cellules épithéliales de la lignée humaine Caco-2.

inactivé par la chaleur (Gibco 10270-106), de la pénicilline (100 U.ml⁻¹; Lonza) et de la streptomycine (100 mg.ml⁻¹; Lonza). L'incubation des cellules Caco-2 a été réalisée à 37°C dans une atmosphère enrichie de 5% de CO₂. Après maturation, 1ml de cultures de cellules Caco-2 a été placé dans chaque puits de la plaque de culture cellulaire (24 puits, Cellstar 662-160) à une concentration de 1 x 10⁵ cellules.ml⁻¹. Les plaques de culture ont été incubées pendant 15 jours à 37°C avec 5% de CO₂ avec changement du milieu de culture tous les 2 jours.

- **Préparation des cultures des bactéries lactiques**

Chaque souche de lactobacilles a été cultivée sur bouillon MRS (10ml) pendant 18h à 37°C. Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 3500g pendant 5 min. Les culots ont été lavés deux fois avec la solution DMEM sans antibiotiques et puis resuspendus dans cette solution jusqu'à obtenir une concentration de 1 x 10⁹ cellules.ml⁻¹.

- **Adhésion des bactéries lactiques aux cellules Caco-2**

Avant le test d'adhésion, le milieu de culture des cellules Caco-2 a été aspiré deux fois et remplacé par du DMEM frais non supplémenté d'antibiotiques pour éliminer les cellules non attachées aux monocouches. Ensuite, 1ml de la solution DMEM de chaque souche de lactobacilles (10⁹ Cellules.ml⁻¹) a été placé dans chaque puits avec les cellules Caco-2. Ensuite les plaques de cultures ont été incubées pendant 2 h à 37 ° C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Après incubation, les monocouches sont lavées trois fois avec une solution du tampon PBS (pour *Phosphate Buffer Salin*) stérile (pH 7,4) pour éliminer les cellules bactériennes non adhérentes. Ensuite, les bactéries adhérentes ont été détachées par pipetage répété et leur comptage a été effectué en réalisant une série de dilutions et dénombrement sur gélose MRS. Le test a été répété trois fois pour chaque souche. Le nombre des bactéries adhérentes a été déterminé par calcul de la moyenne du nombre UFC/puits exprimée en pourcentage. D'autre part, les bactéries adhérentes aux cellules Caco-2 ont été fixées avec du méthanol pendant 30 min, colorées par du cristal violet à 0,5% et observées par un examen microscopique à immersion (grossissement X100).

5.4. Activité antibactérienne

La technique de diffusion en puits, décrite par Hechard *et al.*, (1990) a été utilisée pour étudier la capacité des bactéries lactiques à inhiber un groupe représentatif de bactéries pathogènes intestinales sensibles aux antimicrobiens à savoir : *Escherichia coli* O55, *Escherichia coli* O111, *Salmonella* Typhimurium (*S. enterica* serovar Typhimurium) isolées en pédiatrie et les souches de références : *Listeria monocytogenes* CWBI 2232, *Bacillus cereus* CWBI 935 et *Escherichia coli* ATCC 25922 (ATCC pour *American Type Culture Collection*) (Tableau 5).

Pour les bactéries indicatrices : *Escherichia coli* O55, *Escherichia coli* O111 et *Salmonella* Typhimurium, notre choix a été porté sur des souches locales sensibles aux antibiotiques ; isolées en pédiatrie dans des cas de diarrhées infantiles. Leur sensibilité a été confirmée vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques utilisée pour les entérobactéries selon le Guide de Standardisation de l'Antibiogramme à l'Echelle Nationale 6^{ème} édition (2011) et les recommandations du *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2007) (voir annexe 4).

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, le test a été réalisé selon les étapes suivantes (figure 14) :

- des cultures d'une nuit des bactéries indicatrices ont été préparées préalablement sur bouillon nutritif et incubées en anaérobiose à 37°C pendant 18 h à 24h selon les conditions de croissance décrites dans le tableau 5. *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* sont des bactéries aérobies anaérobies facultatives qui peuvent se développer aussi bien en anaérobiose qu'en aérobiose. Ils peuvent croître sur bouillon nutritif (Brenner *et al.*, 2009 ; De Vogs *et al.*, 2009). Des cultures d'une nuit ont été préparées, également, sur bouillon MRS pour les bactéries lactiques.
- vingt millilitres de gélose MRS fondue à 45 ° C ont été mélangés avec 200 µl de chaque souche indicatrice en suspension ($\sim 10^9$ cellules. ml⁻¹). Le mélange a été versés dans des boîtes de Pétri.

Tableau 5. Bactéries indicatrices utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques.

Souche	Origine	Milieu de culture	T°	Temps et mode d'incubation
<i>Escherichia coli</i> O55	Isolée en pédiatrie (hôpital de Taher, wilaya de Jijel)	Bouillon nutritif	37°C	18 h Aérobie - anaérobie
<i>Escherichia coli</i> O111	Isolée en pédiatrie (hôpital d'Ain el beida, wilaya d'Oum el Bouaghui)	Bouillon nutritif	37°C	18 h Aérobie-anaérobie
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Isolée en pédiatrie (hôpital de Jijel)	Bouillon nutritif	37°C	18 h Aérobie-anaérobie
<i>Listeria monocytogenes</i> CWBI 2232	Centre Walon de Bio-Industrie/Université de Liège. Belgique	Bouillon nutritif	37°C	24 h Aérobie-anaérobie
<i>Bacillus cereus</i> CWBI 935	Centre Walon de Bio-Industrie/Université de Liège. Belgique	Bouillon nutritif	37°C	18h Aérobie-anaérobie
<i>Escherichia coli</i> ATCC 29522	<i>American Type Culture Collection</i> 29522	Bouillon nutritif	37°C	18h Aérobie-anaérobie

T° : Température, h : Heure.

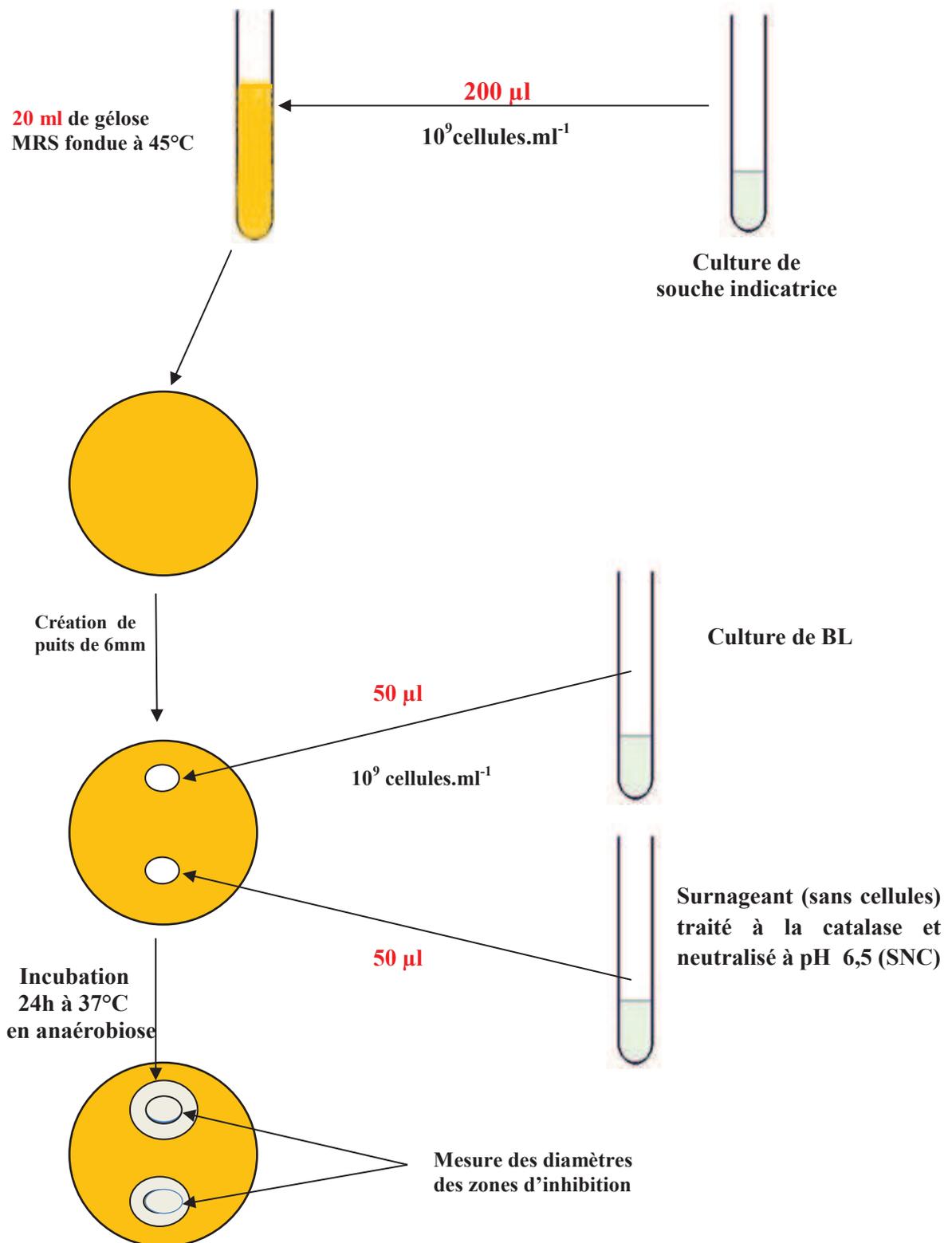


Figure 14. Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques.

-
- d'autre part, les surnageants des BL ont été préparés par centrifugation des cultures bactériennes à 8000 rotation par minutes (rpm) pendant 10 minutes et élimination du culot (cellules). Les surnageants ont été stérilisés par filtration à travers une membrane à 0,22 μm de pores (Sartorius, Allemagne). Une solution stérile de catalase (1000 U.ml⁻¹, Sigma) a été ajoutée à chaque surnageant filtré (à raison de 1ml de catalase pour 10 ml de surnageant) afin d'éliminer les effets possibles d'inhibition par le peroxyde d'hydrogène. Les surnageants ont été ensuite neutralisés à pH 6,5 avec du NaOH 5N.
 - des puits de 6 mm ont été creusés dans la gélose MRS mélangée avec la souche indicatrice. 50 μl d'une suspension de BL (10⁹ cellules.ml⁻¹) et 50 μl de leurs surnageants neutralisés et traités à la catalase (SNC) ont été placés séparément dans les puits. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48 h. Le test a été réalisé trois fois en trois expérimentations indépendantes.
 - L'inhibition de la croissance de l'agent pathogène a été déterminée par la mesure des zones d'inhibition : (-) Aucune inhibition ; (+) faible inhibition, diamètre compris entre 0 et 3 mm ; (+ +) bonne inhibition, diamètre compris entre 3 et 6 mm et (+ + +) forte inhibition, diamètre supérieur à 6 mm.

6. Evaluation de l'aspect sécuritaire

6.1. Activité hémolytique

L'activité hémolytique des BL a été déterminée par la méthode de Maragkoudakis *et al.*, (2006). Des cultures d'une nuit des BL ont été ensemencées en stries sur des boîtes de gélose Columbia contenant 5% (P/V) de sang humain et incubées pendant 48 h à 37°C. Après incubation, les boîtes ont été examinées pour des signes de β -hémolyse (zones claires autour des colonies), α -hémolyse (zones avec reflets verdâtres autour des colonies).

6.2. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques des BL a été évaluée par la méthode de diffusion en disques selon Charteris *et al.*, (1998). Les bactéries lactiques ont été testées vis-à-vis de

13 antibiotiques (Biomérieux), à savoir : les inhibiteurs de la paroi bactérienne [pénicilline (10 U/I), ampicilline (10µg), oxacilline (1 µg), céfoxitine (30µg), vancomycine (30µg)], les inhibiteurs de la synthèse protéique [streptomycine (10 µg), gentamicine (10 µg), érythromycine (15 µg), tétracyclines (30 µg), clindamycine (2 µg), chloramphénicol (30 µg)] et les inhibiteurs des acides nucléiques [acide nalidixique (30 µg), triméthoprim (5µg)].

Pour réaliser ce test, les souches de lactobacilles ont été ensemencées sur gélose MRS et incubées pendant 24h à 37°C en anaérobiose. A partir de ces cultures pures, des colonies ont été prélevées afin de préparer des suspensions inoculum sur bouillon MRS équivalent au standard McF 0,5 (10^6 - 10^7 cellules.ml⁻¹). L'ensemencement des souches a été réalisé, sur gélose MRS en boîte par stries serrées en utilisant un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne et bien essoré. Ensuite, les boîtes ont été incubées pendant 24 h en anaérobiose à 37 °C. Après incubation, les zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques ont été mesurées. La souche *E.coli* ATCC 29522 a été utilisée comme contrôle de qualité.

7. Identification des souches de lactobacilles par l'ARN 16S

L'identification des souches de lactobacilles a été réalisée par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S ; par extraction de l'ADN, l'amplification par PCR du gène et son séquençage. Les différentes étapes de l'identification sont schématisées dans la figure 15.

7.1. Extraction de l'ADN bactérien et vérification de son intégrité

L'extraction de l'ADN a été réalisée par le Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, USA) selon le protocole suivant :

- une culture de 50 ml a été préparée sur milieu MRS liquide pour chaque souche de BL. Les cultures ont été incubées à 37°C sous agitation de 140 rpm pendant 24h. Après incubation, la pureté des souches a été vérifiée au microscope et puis l'extraction de l'ADN a été réalisée en trois répétitions ;

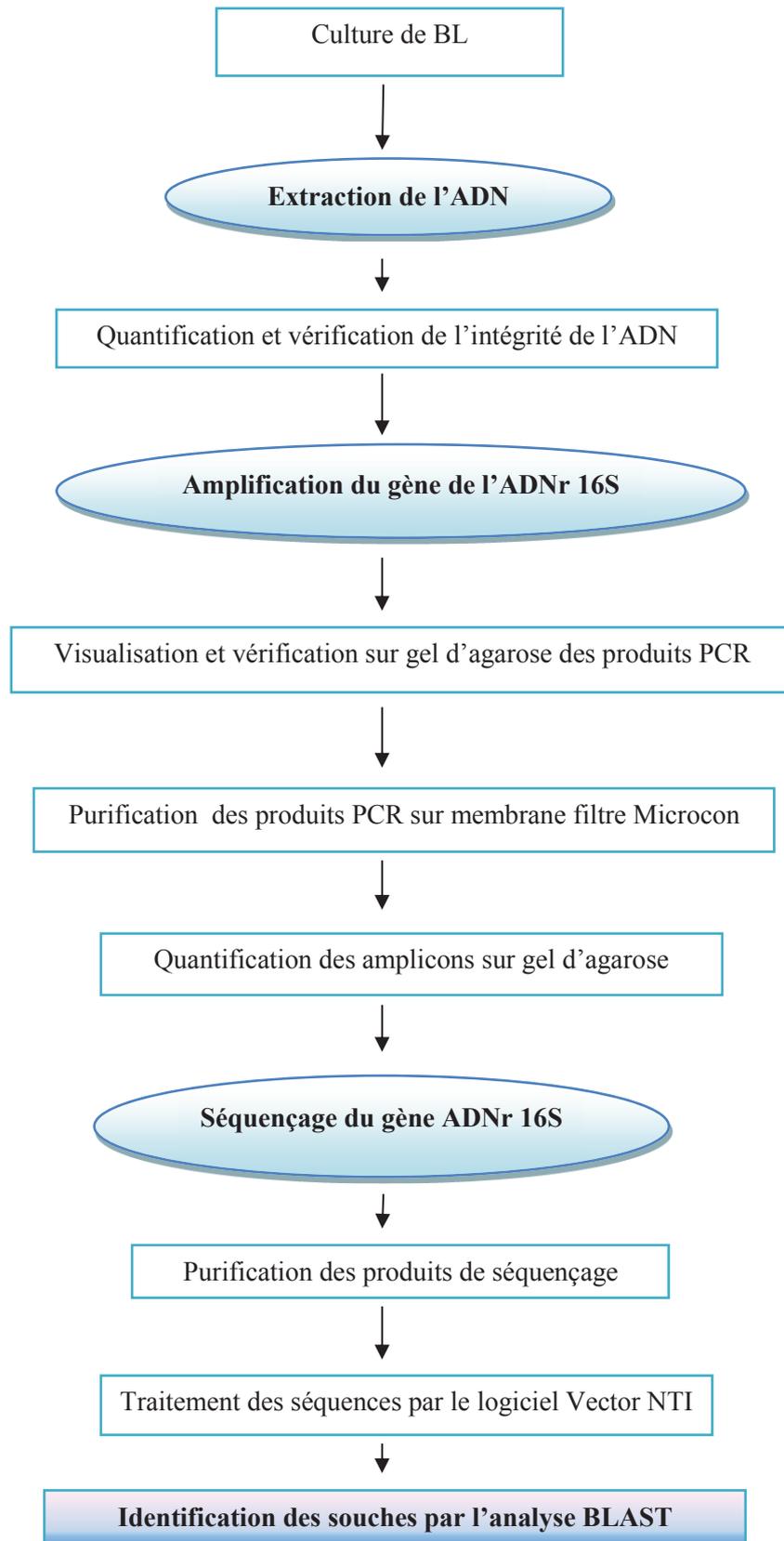


Figure 15. Identification des souches des lactobacilles par séquençage du gène ADNr 16S.

à partir des cultures bactériennes, 1,5 ml ont été prélevés et centrifugés pendant 5 min à 13000 rpm (centrifugeuse sigma/ Fisher), puis 1ml du surnageant prélevé par micropipette sans toucher le culot a été jeté. Le culot a été rincé 3 fois avec de l'eau ultra pure stérile (Milli-Q) par retro-pipetage puis centrifugé pendant 5 min à 13000 rpm ;

- ensuite, 480 µl d EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic, 50 Mm pH 8) ont été additionnés au culot bactérien en mélangeant par retro-pipetage. 30 µl d'une solution de lysozyme à 20 mg/ml ont été ajoutés et puis le mélange a été incubé 37°C pendant 1 heure dans un bain-Marie à sec avec agitation. Après ce temps, 30 ml d'une solution de protéinase K à 20mg/ml ont été ajoutés suivi d'une incubation pendant 30 minutes à 37°C dans un bain-Marie à sec avec agitation ;
- le mélange a été centrifugé pendant 3min à 13000 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot a été repris par micro-pipetage dans 600 ml de solution de *NucleiLysis** (Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega)) et incubé 10 min à – 80°C au congélateur suivie d'une autre incubation 10 min à 40°C au bain-Marie à sec puis réincubation 5 min à – 80°C au congélateur suivie d'une incubation de 5 min à 40°C au bain- Marie à sec ;
- la solution a été refroidie à température ambiante puis additionnée de 200 µl de solution *Protein Precepitation* (Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega)), l'ensemble a été vortexé 20 min, incubé 10 min dans la glace pelée puis centrifugé 5min à 13000 rpm ;
- le surnageant a été transféré dans un tube stérile contenant 600 µl d'isopropanol à 100%, mélangé délicatement par inversion des eppendorfs puis centrifugé 5min à 13 000 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot lavé deux fois par 600µl d'éthanol à 70%. Après centrifugation 5 min à 13 000 rpm, le culot a été séché sous la hotte à flux lumineaire pendant 10 à 15 min;

- ensuite, le culot a été réhydraté par 50µl de solution de réhydrations (Kit Wizard®Genomic DNA Purification (Promega)) et incubé pendant 60 min à - 50°C.

L'ADN peut être conservé pendant 1 mois à 4°C. Au-delà de 1 mois il peut être conservé à - 20°C.

L'intégrité des ADN extraits des souches bactériennes a été vérifiée par spectrophotométrie en mesurant les densités optiques (DO). Un balayage a été effectué entre 200 et 400 nm. Dans le cas d'un ADN intègre ; le résultat est une courbe qui est caractéristique (figure 16). Si la courbe obtenue pour l'échantillon diffère de cette courbe type, l'ADN n'est pas de bonne qualité.

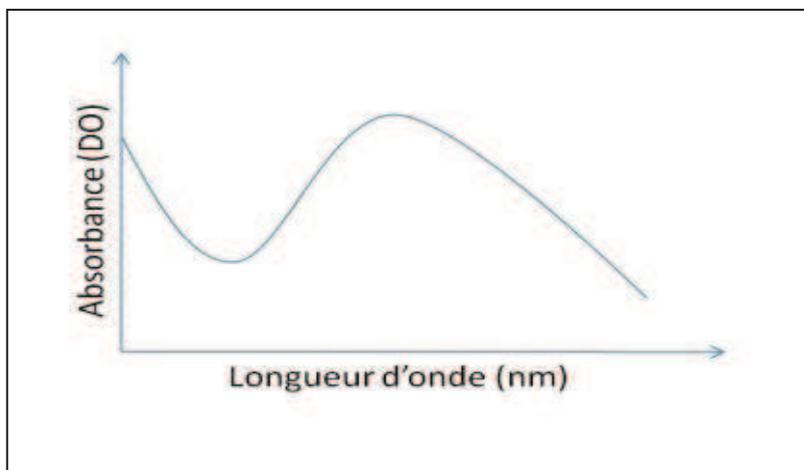


Figure 16. Courbe caractéristique d'un ADN intègre.

Le rapport des DO obtenues pour les longueurs d'onde 260 nm et 280 nm permettent de calculer un facteur d'intégrité. L'intégrité de l'ADN est mauvaise, bonne ou très bonne si ce facteur est respectivement, inférieur à 1,4, égale à 1,7 et compris entre 1,7 et 2. Dans les deux derniers cas, la concentration de l'ADN extrait peut être calculée, en nanogramme par microlitre (ng/µl), à partir de la DO obtenue. Sachant d'une part, qu'une unité d'absorbance à 260 nm est égale à 50µg d'ADN/ml et d'autre part qu'1µg = 1000 ng et 1ml = 1000 µl, donc la concentration de l'ADN en ng/ µl est calculée comme suit :

$$\text{La concentration de l'ADN en ng/ } \mu\text{l} = \text{DO}_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{dilution}$$

7.2. Amplification du gène de l'ADNr 16S par PCR

L'amplification en chaîne par polymérase ou réaction en chaîne par polymérase PCR est une méthode d'amplification génique, *in vitro*, qui permet de dupliquer en grand nombre, une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique; séquence spécifique d'ADN et des amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides (Saiki *et al.*, 1988). Cette technique comprend les cycles répétitifs suivants:

- dénaturation de l'ADN par fusion à haute température pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire;
- hybridation à l'ADN cible des deux oligonucléotides utilisés comme amorces;
- élongation de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase comme catalyseur en présence d'ions Mg⁺⁺.

Dans notre travail, l'amplification du gène ADNr 16S a été réalisée en utilisant les réactifs suivants :

- **les 2 amorces (primers):** 16SP0 - 16SP6 (qui serviront de matrice pour l'amplification de gène de l'ADN 16S (Ventura *et al.*, 2001) :
 - **16SP0:** 5'-GAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
 - **16SP6:** 5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'
- **de l'ADN extrait** des souches de bactéries lactiques ;
- **des désoxynucléotides triphosphates (dNTP: bases GCTA) ;**
- **de l'enzyme Taq polymérase** (DNA polymérase) : elle se fixe sur les amorces servant de point de départ et ajoute les dNTP afin de synthétiser le brin d'ADN complémentaire;
- **tampon KCL-Mg CL₂** : sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase.

Ces réactifs ont été mélangés avec de l'eau milli-Q dans un Eppendorf stérile selon les concentrations et les volumes mentionnés dans le tableau 6. Deux échantillons (répétitions) par ADN ont été amplifiés. Les réactifs ont été fournis par Thermo Scientific (Fermentas, USA).

Tableau 6. Réactifs utilisés pour la réaction PCR

Réactifs	Concentration de la solution mère	Concentration de travail	V (µl) utilisé pour une réaction
Tampon KCl- MgCl ₂	10X	1X	2,5
MgCl ₂	25 Mm	2 mM	2
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
16SP0	10 µM	0,5 µM	1,25
16SP6	10 µM	0,5 µM	1,25
Taq polymérase	5 U/µl	0,625 U/25 µl	1
ADN	-	250 ng/25 µl	1
H ₂ O Milli-Q	-	-	15,5
V total (µl)	-	-	25

10X : concentration 10 fois, 1X : concentration une fois, dNTPs : nucléotides, mM : millimolaire, µM : micromolaire, U/µl : Unité par microlitre.
- : valeur à déterminer

Le programme d'amplification a été réalisé sur thermocycleur (Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research)) selon les étapes suivantes :

- l'ADN subit une dénaturation primaire pendant 5 minutes à 95°C ;
- puis amplification durant 25 cycles comprenant : 30 secondes à 95°C (phase de dénaturation), 30 secondes à 55°C (phase d'hybridation) et 2 minutes à 72°C (phase d'élongation) ;
- la réaction est complétée par une période d'élongation finale de 10 minutes à 72°C.

Une fois le programme terminé ; les échantillons sont conservés à 4°C pour l'étape suivante.

7.2.1. Vérification de la spécificité de l'amplification

La vérification de la qualité des produits PCR de l'amplification a été réalisée en faisant migrer par électrophorèse les produits PCR sur un gel d'agarose pour la visualisation des bandes d'ADN sous ultraviolets (UV).

- Pour préparer le gel d'électrophorèse : 1 g d'agarose a été pesé et placé dans un erlenmeyer au quel sont ajoutés 100 ml du tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA). Le mélange a été chauffé, avec agitation, jusqu'à ébullition et disparition du trouble et puis refroidi jusqu'à ce qu'il devient possible de saisir le flacon à la main nue (température environ 45-50°C). Ensuite, 5µl de BET (Bromure d'Ethidium ; marqueur fluoresçant) ont été ajoutés dans 50 ml du tampon TAE (Tris, Borate, EDTA). Le mélange a été agité doucement pour éviter son chauffage et la formation des bulles d'air ;
- pour le coulage du gel, un moule a été préparé et placé sur une surface bien horizontale. Le gel a été coulé lentement sur une surface de 3 à 5 mm d'épaisseur et laissé gélifier dans le moule. Les puits ont été préparés avec un petit peigne sur ce gel d'agarose et placés du côté de la cathode ;
- les produits PCR (8µl) ont été mélangés par pipetage avec 2µl de tampon de charge concentré 6 fois (Loading Dye) sur un morceau de parafilm ;

-
- les mélanges ont été déposés délicatement dans les puits afin de ne pas déchirer le fond du gel. Un marqueur de poids moléculaire (100pb DNA Ladder) a été aussi chargé sur le gel à raison de 4µl pour vérifier que la bande recherchée est bien retrouvée dans les échantillons amplifiés. L'électrophorèse des produits PCR s'effectue pendant environ 20 min. Quand le colorant de charge (colorant bleu) atteint l'extrémité du gel, la migration est arrêtée par coupure du courant d'électricité ;
 - la lecture des résultats a été faite sous UV et par comparaison avec le marqueur de poids à 1500 bp ; poids moléculaire de l'ADNr 16S.

7.2.2. Purification des produits PCR

La purification des produits PCR (amplicons) s'effectue grâce au kit filtre Microcon YM-100 (Bedford, MA, USA) par plusieurs centrifugations selon le protocole suivant :

- chaque produit PCR a été déposé sur une membrane filtre (sans la toucher) placée dans un tube eppendorf. 400µl d'eau milli-Q ont été ajoutés et les tubes ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 15 min puis vidés (membrane dedans) et nettoyés avec 400µl d'eau milli-Q, centrifugés à 3000 rpm pendant 15 min, vidés une nouvelle fois et centrifugés à vide (membrane toujours dedans) pendant 4 min à 3000 rpm ;
- ensuite, la cellule de filtration a été déposée à l'envers dans un nouveau tube auquel ont été ajoutés 400µl l'eau milli-Q puis les tubes ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 4 min pour récupérer l'ADN dans le fond du tube. Les produits purifiés ont été stockés à 4°C en attendant le dosage.

7.2.3. Dosage des produits PCR purifiés

La quantification des produits PCR purifiés a été réalisée par électrophorèse par la même technique décrite précédemment. Les produits purifiés ont été chargés sur le gel

d'agarose, ainsi que le marqueur de poids moléculaire. La détermination des concentrations a été réalisée en comparant l'intensité de la bande à 1500 pb de chaque échantillon à celle de la bande correspondante pour le marqueur de poids moléculaire. Si l'intensité est 2 fois plus importante pour l'échantillon, la concentration de celui-ci sera 2 fois plus importante que pour le marqueur de poids moléculaire (MPM).

7.3. Réaction de séquençage du gène ADNr 16S

7.3.1. Préparation au séquençage du gène ADNr 16S

Huit amorces (4X2) couvrant le brin sens (*Forward*) F et le brin anti-sens (*Revers*) R du gène ADNr 16S ont été utilisées pour son séquençage. Ces amorces ont été fournies par Sigma-Proligo (Tableau 7). Leurs séquences ont été déterminées à partir de comparaison de séquences d'ADNr 16S codant pour l'ARN ribosomal 16S de bactéries, collectées de la banque de données de l'EMBL (Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire) accessible via le site BEN (Belgian EMB net Node, <http://www.be.embnet.org>).

Les réactifs utilisés proviennent du kit « ABI Prism® BigDye® terminator v3.A cycle sequencing kit » de la firme Applied Biosystems. Le Kit contient :

- Ready mix reaction : c'est un mélange contenant tous les réactifs (Taq polymérase, tampon KCl-MgCl₂, MgCl₂ et les nucléotides) nécessaires pour effectuer une réaction de PCR standard ;
- Big dye sequencing buffer (tampon) : est utilisé pour l'optimisation de la réaction de la PCR.

Le tableau 8 montre les volumes des réactifs et des amorces utilisés au cours de la PCR.

Les concentrations d'ADN des souches de BL à ajouter au milieu réactionnel de la PCR ont été déterminées en fonction des résultats de dosage des produits de l'amplification purifiés des ADN des souches. Elles doivent être comprises entre 5 à 15 ng.

Tableau 7. Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S des souches de lactobacilles.

Amorces	Séquences	Sens	Source
F1	5'-CTGGCTCAGGAYGAACG-3'	Forward	(Sigma-Proligo)
F2	5'-GAGGCAGCAGTRGGGAAT-3'	Forward	(Sigma-Proligo)
F3	5'-ACACCARTGGCGAAGGC-3'	Forward	(Sigma-Proligo)
F4	5'-GCACAAGCGGYGGAGCAT-3'	Forward	(Sigma-Proligo)
R1	5'-CTGCTGGCACGTAGTTAG-3'	Reverse	(Sigma-Proligo)
R2	5'-AATCCTGTTYGCTMCCCA-3'	Reverse	(Sigma-Proligo)
R3	5'-CCAACATCTCACGACACG-3'	Reverse	(Sigma-Proligo)
R4	5'-TGTGTAGCCCWGGTCRTAAG-3	Reverse	(Sigma-Proligo)

Amorces synthétiques utilisés pour le séquençage. Elles ont été déduites de l'alignement des gènes de l'ADNr codant pour l'ARN 16S bactérien recueillis à partir de la base des données de l'EMBL (Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire). Les amorces ont été fournies par Sigma-Proligo.

Tableau 8. Milieu réactionnel pour l'amplification du gène ADNr 16S avec les amorces.

Réactifs	Quantité	Volume ajouté (µl)
Ready mix reaction	-	1
Bigdye sequencing buffer	-	2
Amorce (F1, F2, F3, F4, R1, R2, R3, R4)	3,2 Pmol	3,2
ADN	5 à 15 ng	1
H ₂ O milli-Q	-	1,8
Volume total	-	10

(*) Pmol : picomole, ng : nanogramme

Le programme du thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène ADNr 16S est résumé dans le tableau 9. Il comprend une phase de dénaturation préliminaire de 5 minutes à 96°C (un cycle) et une amplification (25 cycles) comportant : une phase de dénaturation de 10 secondes à 96°C, une phase d'hybridation de 5 secondes à 50°C et une phase d'élongation de 4 minutes à 60°C suivie d'un cycle de refroidissement de 5 minutes à 16°C.

Tableau 9. Programme d'amplification du gène ADNr 16S sur thermocycleur.

Etape	Temps & température	Nombre de cycles
Dénaturation préliminaire	5 min à 96°C	1
Dénaturation	10 secondes à 96°C	25
Hybridation	5 secondes à 50°C	
Elongation	4 min à 60°C	
Refroidissement	5 min à 16°C	1

7.3.2. Purification des produits de séquençage

Afin de ne pas gêner la lecture des séquences, tous les réactifs de la PCR ont été éliminés (amorces, tampons et nucléotides).

La purification des produits de séquençage a été réalisée par centrifugation et lavage du culot par l'éthanol selon les étapes suivantes :

- le volume total (10µl) de la réaction de séquençage a été transféré dans un tube de 5 ml auquel 2µl d'acétate de sodium (3M pH 4,6) et 50 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés. La solution a été mélangée par 4 inversions du tube et incubée à température ambiante à l'abri de la lumière, pendant 20 minutes ;

-
- après incubation, la solution a été centrifugée 35 min à 13 000 rpm et puis le surnageant a été éliminé (1ml). Le culot (non visible) a été lavé deux fois par 250 µl d'éthanol à 70% et mélangé par inversion du tube ;
 - ensuite, le mélange a été centrifugé pendant 20 min à 13 000 rpm, le surnageant a été jeté et le culot a été séché à température ambiante dans la hotte à flux laminaire, à l'abri de la lumière.

Il est important, d'éliminer complètement l'éthanol pour ne pas fausser les résultats des étapes ultérieures. Les culots une fois séchés, les tubes contenant les produits du séquençage ont été protégés de la lumière et stockés à -20° C.

7.4. Traitement des séquences du gène ADNr 16S

Les produits de séquençage ont été envoyés à la firme PROGENUS pour le séquençage proprement dit. Les séquences obtenues par Progenus sont traitées grâce au logiciel Vector NTI. Ce logiciel permet la gestion d'information de molécules biologiques de type ADN ou protéines entre autres la gestion des bases d'oligonucléotides pour séquençage.

7.5. Identification des souches par NCBI>BLAST

Les séquences traitées ont été comparées à des bases de données pour permettre l'identification des souches de BL par le logiciel NCBI/BLAST (*National Center for Biotechnology Information/Basic Local Alignment Search Tool*) via le site internet : www.ncbi.nlm.nih.gov.

Le logiciel Blast permet de comparer une séquence, nucléique ou protéique, dite requête, à une banque de séquences, nucléiques ou protéiques. Blast compare, par alignement, les séquences nucléiques sur les 2 brins, c'est-à-dire la séquence étudiée (brin +) et son complémentaire inversé (brin -). Pour comparer une séquence nucléique à une séquence protéique, Blast traduit la séquence nucléique en générant toutes les séquences protéiques possibles, c'est-à-dire 6 séquences différentes (3 à partir du brin + et 3 à partir du brin -). Les codons de terminaisons sont inclus et représentés par "*".

L'alignement des séquences permet, donc, de trouver des similarités entre les séquences analysées. Ces similarités sont dues à une origine évolutive commune (homologie) ou à des fonctions semblables.

RESULTATS

1. Isolement des bactéries lactiques

Les résultats de la moyenne des pH des échantillons de selles sont mentionnés dans le tableau 10. Le pH du milieu MRS préparé pour l'isolement des bactéries lactiques a été ajusté à cette **valeur moyenne qui est de 6,01**.

L'isolement des bactéries lactiques sur milieu MRS gélosé a conduit à une collection de souches. Afin de les différencier, chaque souche a été désignée par une lettre et un chiffre ou un chiffre et un astérisque exemple : A20, 8*...

Tableau 10. Mesures des pH des échantillons de selles.

Selles	1	2	3	4	5	6	7	Moyenne
Moyenne des pH	6,19	6,16	5,79	5,37	6,21	6,16	6,25	6,01

2. Purification des bactéries lactiques

Les repiquages successifs sur gélose MRS ont permis d'obtenir **120 souches pures de BL**.

3. Identification des lactobacilles

L'appartenance ou non des 120 isolats **au genre *Lactobacillus*** a été étudiée selon les caractéristiques morphologiques et biochimiques.

3.1. Etude des caractères morphologiques

3.1.1. Examen macroscopique

L'observation macroscopique des colonies des 120 isolats de BL, obtenues sur gélose MRS, a révélé plusieurs types de colonies avec des différentes formes et couleurs.

Les résultats de l'étude des caractères macromorphologiques des isolats sont résumés dans le tableau 11.

3.1.2. Examen microscopique

L'examen microscopique des 120 souches de BL isolées sur gélose MRS, a révélé qu'elles étaient positives à la coloration de Gram avec deux formes dominantes : bacillaire et coccique. Les cellules bactériennes étaient isolées ou disposées en chaînettes ou tétrades (Tableau 11).

Tableau 11. Caractères morphologiques des bactéries lactiques isolées sur MRS

Genre	Macromorphologie (Aspect des colonies)	Micromorphologie (Formes des bactéries)	Coloration de Gram	Nombre de souches
<i>Lactobacillus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Arrondies ou lenticulaires - Blanchâtre ou jaunâtre - Tailles variables - Rugueuses ou lisses 	<ul style="list-style-type: none"> - Bacilles - Coccobacilles - Isolés ou en Chaînettes 	+	52
Autres genres	<ul style="list-style-type: none"> - Arrondies - Transparentes - Très petites 	<ul style="list-style-type: none"> - Coccis ou ovales - Disposés en chaînette 	+	68
	<ul style="list-style-type: none"> - Arrondies, - grisâtres ou blanchâtres - lisses 	<ul style="list-style-type: none"> - Coccis - Disposés en tétrades 	+	

+ Positives à la coloration de Gram

Les figures 17 et 18 montrent l'aspect macroscopique des colonies de deux souches de lactobacilles G6 et 9* cultivées sur gélose MRS. Les figures 19 et 20 montrent l'aspect microscopique après coloration de Gram de deux souches de lactobacilles H8 et B13 (grossissement X100).



G6

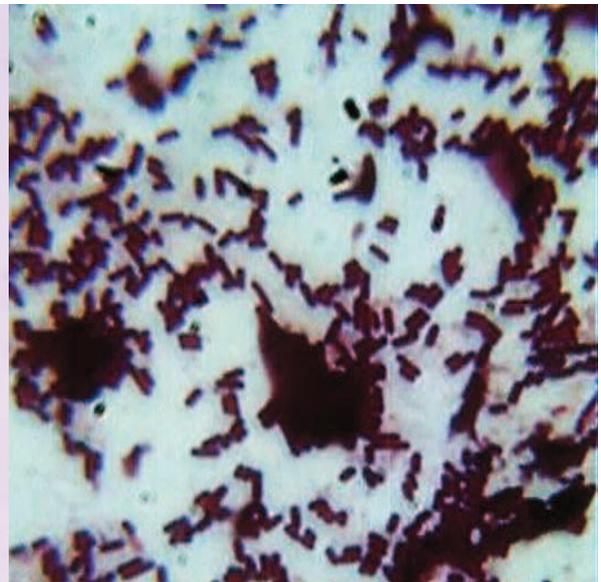


9*

Figures 17 et 18. Aspect macroscopique des colonies de deux souches de lactobacilles G6 et 9* isolées sur gélose MRS.



H8



B13

Figures 19 et 20. Aspect microscopique après coloration de Gram de deux souches de lactobacilles H8 et B13 (grossissement X100).

3.2. Etude des caractères biochimiques

3.2.1. Recherche de la catalase

Sur les 120 isolats de BL, **52 souches**, seulement, ont été retenues pour la recherche de la catalase. Elles étaient positives à la coloration de Gram, de forme bacillaire ayant des colonies circulaires ou lenticulaires, de couleur blanchâtre ou jaunâtre. Le test de la catalase a révélé qu'elles étaient **négatives à la réaction de la catalase**.

3.2.2. Type fermentaire

Les résultats de l'étude du pouvoir fermentaire sont mentionnés dans le tableau 12. La répartition selon le type fermentaire était inégale entre souches. Les souches homofermentaires représentent presque le double, en nombre, des souches hétérofermentaires à savoir :

- 34 souches étaient homofermentaires ne présentant aucun déplacement du bouchon de la gélose blanche ;
- 18 souches étaient hétérofermentaires se manifestant par le déplacement du bouchon de la gélose blanche à cause de la présence du gaz CO₂.

La figure 21 présente l'aspect homofermentaire des souches de lactobacilles sur milieu Gibson-Abdelmalek.



Figure 21. Aspect homofermentaire des souches de lactobacilles sur milieu Gibson-Abdelmalek.

Tableau 12. Caractères morphologiques et biochimiques des souches identifiées du genre *Lactobacillus*.

Souche	Gram	forme	Catalase	Type fermentaire	Identification par API CHL 50
A2	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. gasseri</i>
A7	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. fermentum</i>
A8	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. salivarius</i>
A9	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. paracasei</i> sp <i>paracasei</i>
A10	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. plantarum</i>
A12	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. salivarius</i>
A16	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. gasseri</i>
A20	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. plantarum</i>
A21	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. plantarum</i>
A23	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. fermentum</i>
B3	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. gasseri</i>
B5	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. vaginalis</i>
B11	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. casei</i>
B13	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. paracasei</i>
C3	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. salivarius</i>
C8	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. reuteri</i>
C11	positif	petits bacilles	négatif	Homo	<i>L. casei</i>
D1	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. gasseri</i>
D6	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. fermentum</i>
D9	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. casei</i>
D14	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. casei</i>
D18	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. salivarius</i>
E1	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. fermentum</i>
E8	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. vaginalis</i>
F1	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. casei</i>
F4	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. fermentum</i>
F12	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. plantarum</i>
G4	positif	petits bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. vaginalis</i>
G6	positif	petits bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. brevis</i>

G10	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. fermentum</i>
G11	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. reuteri</i>
H2	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. fermentum</i>
H7	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. acidophilus</i>
H8	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. paracasei</i> sp <i>paracasei</i>
H16	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. fermentum</i>
I2	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. salivarius</i>
I4	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. gasseri</i>
I5	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. casei</i>
I8	positif	petits bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. brevis</i>
I13	positif	petits bacilles	négatif	Homo	<i>L. ruminis</i>
2*	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. fermentum</i>
4*	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. casei</i>
7*	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. gasseri</i>
8*	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. acidophilus</i>
9*	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. casei</i>
11*	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. vaginalis</i>
14*	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. ruminis</i>
15*	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. gasseri</i>
17*	positif	bacilles	négatif	Homo	<i>L. paracasei</i> sp <i>paracasei</i>
21*	positif	bacilles	négatif	Hétéro	<i>L. fermentum</i>
22*	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. plantarum</i>
27*	positif	coccobacilles	négatif	Homo	<i>L. gasseri</i>

(+) : Test positif ; (-) : Test négatif ; Homo : homofermentaire ; Hétéro : hétérofermentaire.

3.2.3. Profil fermentaire des sucres

Les résultats de l'étude fermentaire des sucres par système API sont mentionnés dans le tableau 12 indiqué plus haut. La fermentation des hydrates de carbone et dérivés de la galerie a permis **d'identifier les espèces des lactobacilles** dont la répartition est la suivante (Figure 22) :

L. fermentum (10 souches ; 19 %), *L. casei* (8 souches ; 15%), *L. gasseri* (8 souches ; 15%), *L. salivarius* (5 souches ; 10%), *L. plantarum* (5 souches ; 10%), *L. vaginalis* (4 souches; 8%), *L. paracasei* sp (4 souches; 8%), *L. brevis* (2 souches; 4%), *L. reuteri* (2 souches; 4%), *L. acidophilus* (2 souches; 4%) et *L. ruminis* (2 souches; 4%).

Nous remarquons que les 52 souches sont majoritairement représentées par *L. fermentum* et le groupe *L. casei* (*L. casei* et *L. paracasei* sp) et minoritairement par *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. acidophilus* et *L. ruminis*.

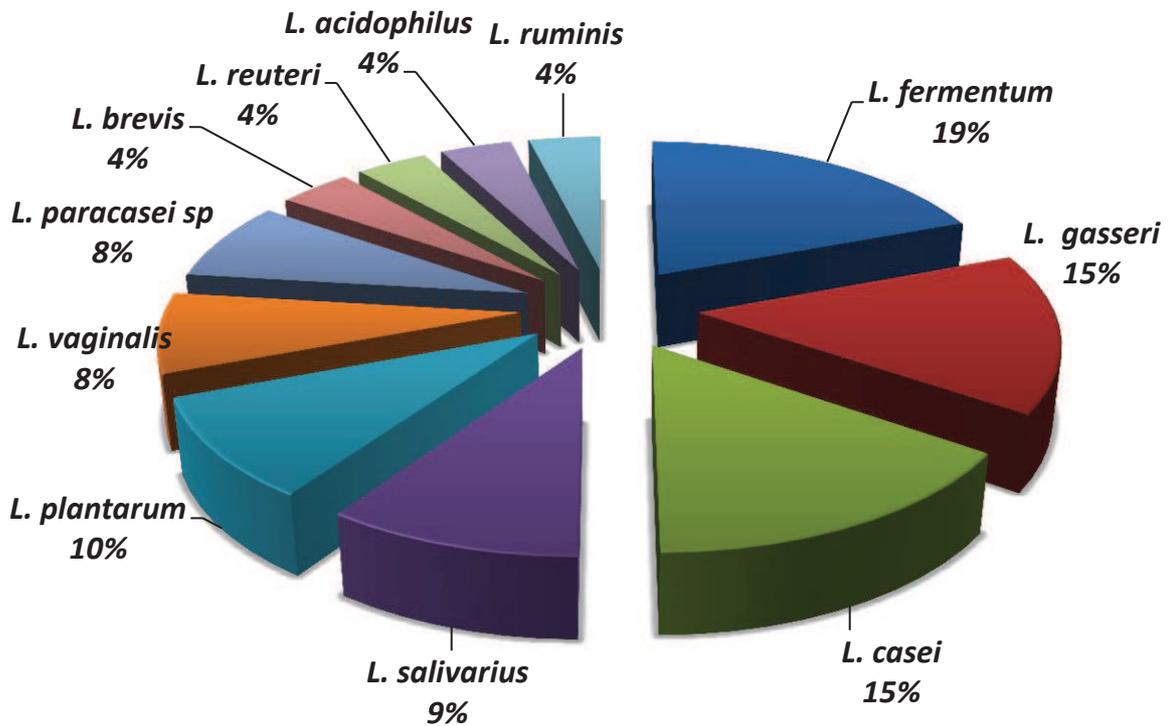


Figure 22. Répartition des espèces de lactobacilles identifiées par galerie API 50 CHL.

4. Evaluation des aptitudes probiotiques *in vitro*

4.1. Habilité à survivre dans les conditions gastriques

Afin de déterminer la capacité de survie des souches de lactobacilles au passage de l'estomac ; les bactéries ont été soumises à des conditions mimant le suc stomacal (pH 1,5 et pepsine à 3g/l). Après 2h d'exposition, la proportion des cellules viables a été évaluée par dénombrement sur gélose MRS en boîte de Pétri.

L'effet du pH, à lui seul, sur les souches de lactobacilles a été également examiné après 1 h et 2 h d'exposition (figure 23).

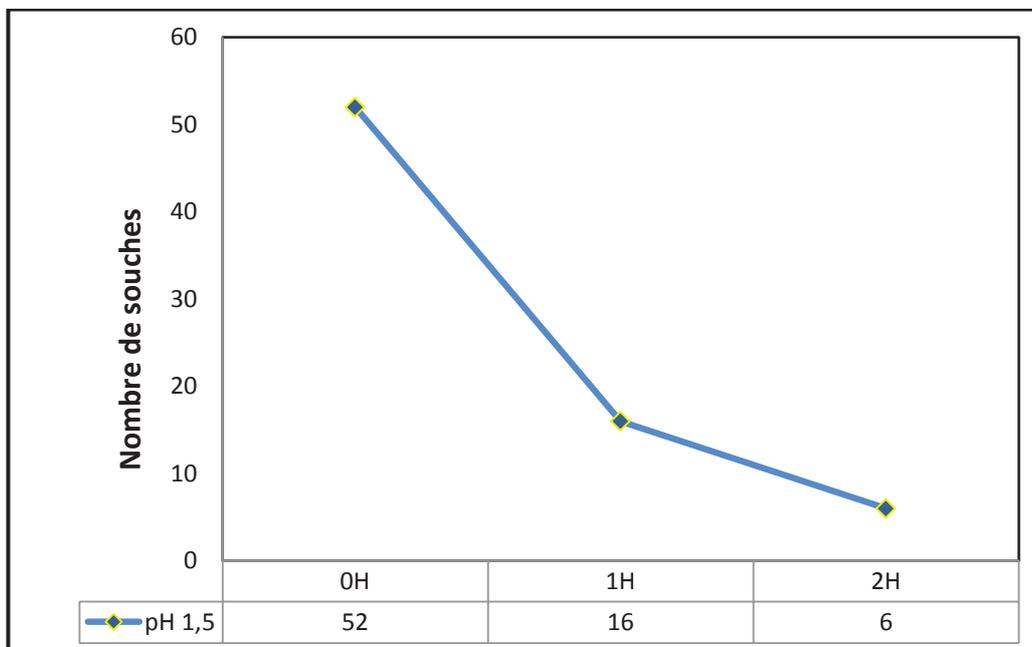


Figure 23. Effet du pH 1,5 sur les souches de lactobacilles testées après 1h et 2h d'exposition.

D'après la figure 23, Il apparait que le **pH 1,5**, à lui seul, a un **effet drastique** sur la majorité des isolats. En effet, sur les 52 souches de lactobacilles testées, 16 seulement ont résisté après 1h d'incubation et **seulement 6 souches ont montré une résistance remarquable après 2h d'exposition**. Il en ressort ainsi, que la sensibilité des *Lactobacillus* au pH acide **dépend de la souche** ; étant donné que même les souches

acido-résistantes **ont manifesté, différemment, des taux de survie**, plus ou moins intéressants, allant de 24,37% à 70,56 % (Tableau 13). Ces souches sont *L. plantarum* F12, *L. paracasei* B13, *L. fermentum* H2, *L. brevis* G6, *L. paracasei* sp *paracasei* A20 et *L. acidophilus* 8*.

Les six souches résistantes au pH 1,5 ont été étudiées pour leur habilité à survivre aux **conditions gastriques simulées** par comparaison à leur survie au pH seul. Les résultats sont représentés dans le tableau 13.

Dans les conditions gastriques simulées, **cinq souches sur six ont résisté à l'action combinée de la pepsine et le pH 1,5** ; la souche *L. acidophilus* 8* a été **complètement inhibée**. Le taux de résistance le plus élevé a été observé avec la souche *L. plantarum* F12 (61,34 %), suivie par *L. paracasei* B13 (54,61 %) , *L. fermentum* H2 (48,06%) , *L. brevis* G6 (47,52 %) et *L. paracasei* sp *paracasei* A20 (23,78 %) (Tableau 13). Toutefois, nous constatons que **toutes les souches ont subi des réductions de viabilité, lorsqu'elles sont soumises à des conditions gastriques simulées en comparaison à leur survie à pH 1,5 seul**. Cette réduction, n'était pas négligeable et varie selon les souches. Elle correspondait à des pertes en taux de viabilité variant de 8,78% (*L. paracasei* B13) à 100% de perte (*L. acidophilus* 8*).

4.2. Habilité à survivre dans les conditions intestinales

Dans la présente étude, les souches de lactobacilles les plus résistantes au suc gastrique simulé (F12, B13, H2, A20 et G6) ont été testées pour leur capacité à survivre dans les conditions simulées du petit intestin chez l'Homme ; à pH 8, en présence de pancréatine avec et sans 0,3% de sels biliaires. Après 4 h d'exposition, la proportion des cellules viables a été évaluée par dénombrement sur gélose MRS en boîte de Pétri.

Les résultats de l'étude de l'habilité des souches de lactobacilles à survivre dans les conditions gastriques simulées sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 13. Habilité des souches de lactobacilles à survivre dans les conditions gastriques simulées.

<i>Souches de Lactobacillus</i>	code	Nombre de cellules viables (log UFC.ml ⁻¹)* aux temps 0h et 2h			
		Jus gastrique simulé	0h	2h	Taux de survie (%)
<i>L. paracasei</i> sp <i>paracasei</i>	A20	pH 1,5	8,45±0,04	3,49±0,03	41,30
		pH 1,5 et pepsine		2,01±0,13	23,78
<i>L. plantarum</i>	F12	pH 1,5	9,65±0,11	6,81±0,01	70,56
		pH 1,5 et pepsine		5,92±0,07	61,34
<i>L. paracasei</i>	B13	pH 1,5	8,77±0,02	5,56±0,03	63,39
		pH 1,5 et pepsine		4,79±0,01	54,61
<i>L. brevis</i>	G6	pH 1,5	7,89±0,00	4,75±0,04	60,20
		pH 1,5 et pepsine		3,75±0,02	47,52
<i>L. fermentum</i>	H2	pH 1,5	8,80±0,13	5,35±0,32	60,79
		pH 1,5 et pepsine		4,23±0,04	48,06
<i>L. acidophilus</i>	8*	pH 1,5	8,37±0,03	2,04±0,01	24,37
		pH 1,5 et pepsine		<1	00
<i>Lactobacillus</i> sp. (9 souches)		Très faible croissance à pH 1,5 après 2h d'exposition			
<i>Lactobacillus</i> sp. (37 strains)		Pas de croissance à pH 1,5 après 2h d'exposition			

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

Tableau 14. Habilité des souches de lactobacilles à survivre dans les conditions gastriques simulées.

Souches	Code	Nombre de cellules viables (log UFC.ml ⁻¹)*			
		Absence de la bile		Présence de la bile à 0,3%	
		0h	4h	0h	4h
<i>L. paracasei</i> sp <i>paracasei</i>	A20	8,35±0,02	7,43±0,10	8,35±0,03	2,90±0,12
<i>L. plantarum</i>	F12	9,60±0,06	9,19±0,00	9,60±0,03	9,56±0,06
<i>L. paracasei</i>	B13	8,83±0,04	9,65±0,32	8,83±0,12	7,01±0,05
<i>L. brevis</i>	G6	7,91±0,09	7,97±0,08	7,91±0,10	6,89±0,00
<i>L. fermentum</i>	H2	8,82±0,01	6,54±0,02	8,82±0,07	<1

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

Dans le **test sans la bile** ; la présence de la pancréatine, après 4h d'exposition, a réduit, mais d'une manière non notable, la viabilité de la souche *L. paracasei* sp *paracasei* A20. En revanche, une légère augmentation de la croissance, n'atteignant même pas un log UFC.ml⁻¹, a été observée avec les souches *L. paracasei* B13 et *L. brevis* G6. La souche la plus affectée, dans ces conditions, c'est *L. fermentum* H2 dont la viabilité a diminué de plus de 2 logs UFC.ml⁻¹

Dans le **test avec la bile**, nous avons constaté **une diminution plus importante de la viabilité de la majorité des lactobacilles testés par rapport à leur culture dans les mêmes conditions, mais sans la bile**. Les marges de réduction observées variaient

d'environ 1,5 à 5,5 logs UFC.ml⁻¹ selon les souches. La souche la plus résistante est *L. plantarum* F12 dont le taux de viabilité, observé après 4h d'exposition, est presque de 100%. En revanche, la souche *L. fermentum* a été presque totalement inhibée dans ces conditions. Enfin, malgré la diminution de leur viabilité en présence de la bile, **quatre souches ont été sélectionnées, selon leur taux de survie, comme bonnes tolérantes aux conditions intestinales simulées** à savoir *L. plantarum* F12, *L. paracasei* B13, *L. brevis* G6 et *L. paracasei* sp *paracasei* A20. Ces souches ont été retenues pour le test de l'adhésion aux cellules humaine de la lignée Caco-2.

4.3. Adhésion, *in vitro*, aux cellules Caco-2

Dans la présente étude, les cellules humaines de la lignée Caco-2 ont été utilisées comme modèle pour l'étude de l'adhésion des souches de lactobacilles aux cellules épithéliales de l'intestin chez l'Homme. La moyenne, exprimée en pourcentage, des bactéries adhérentes de lactobacilles a été calculé après dénombrement sur gélose MRS. Une observation microscopique des souches adhérentes a été également réalisée. Les souches *L. plantarum* F12, *L. paracasei* B13, *L. paracasei* sp *paracasei* A20 et *L. brevis* G6 ont été étudiées pour leur capacité d'adhésion. Les résultats sont indiqués dans la figure 24.

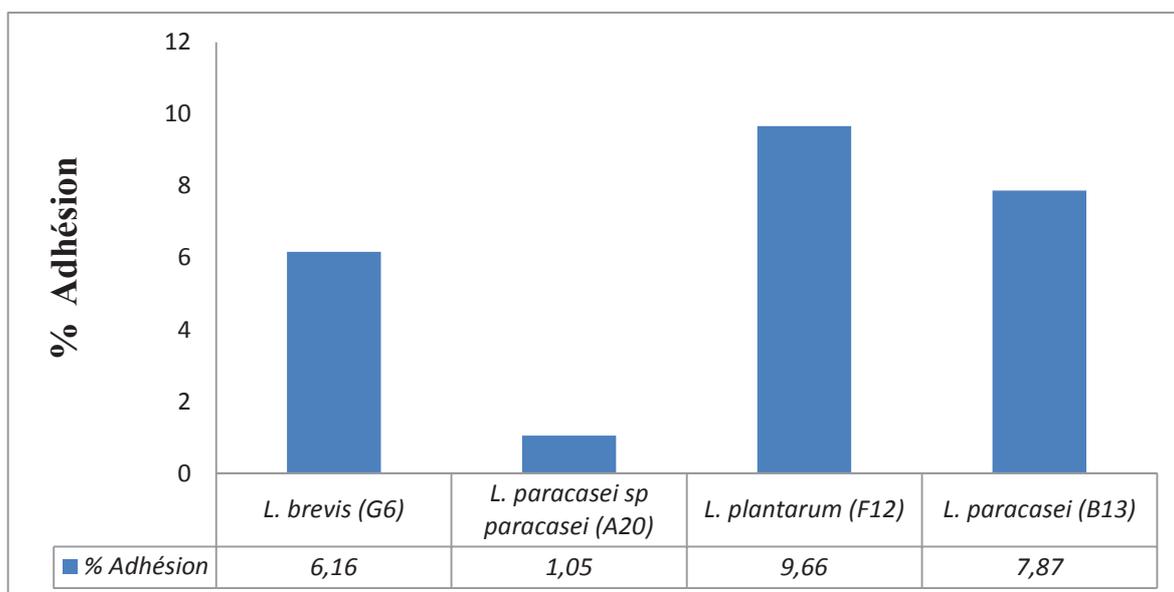


Figure 24. Adhérence des souches de lactobacilles aux cellules Caco-2 après 2 h d'incubation à 37 ° C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Pourcentage (%) des valeurs d'adhésion exprimant la moyenne ± écart-type. Chaque point de données est la moyenne des mesures répétées de 3 expériences réalisées indépendamment, n = 3, P <0,05.

D'après la figure 24, nous constatons, qu'il existe une large variabilité dans les taux d'adhésion entre les souches allant de 1,05 jusqu'à 9,99 %. **La souche la plus adhérente est *L. plantarum* F12 avec un taux de 9,66%, suivie par *L. paracasei* B13 (7,87%) et *L. brevis* G6 (6,16%).** L'adhérence la plus faible a été observée avec la souche de *L. paracasei* sp *paracasei* A20 avec un taux de 1,05 %.

La figure 25 représente l'adhésion de la souche F12 aux cellules Caco-2 observée par microscopie optique (X100) après coloration au cristal violet (0,5%). La photographie montre nettement l'adhésion des cellules de *L. plantarum* F12, en nombre important, tout autour de la paroi des enterocyte-like Caco-2. La photographie a été prise au Centre Wallon de Bio-Industries – Agro-Biotech. Gembloux/ Université de liège.

Par rapport à leur taux d'adhésion, les souches les plus adhésives *L. plantarum* F12, *L. paracasei* B13, *L. brevis* G6 ont été sélectionnées pour le test de l'activité antibactérienne. La souche A20 *L. paracasei* sp *paracasei* n'a pas été retenue étant donné son faible taux d'adhésion.

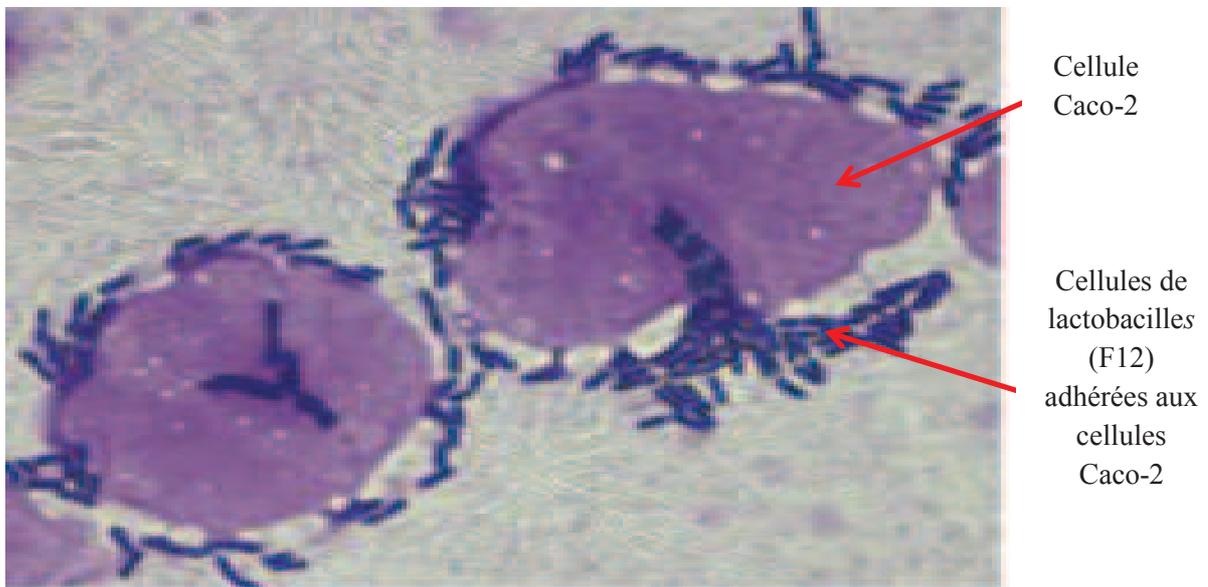


Figure 25. Adhérence de *L. plantarum* (F12) aux cellules Caco-2 observée par microscope (X100) après coloration au cristal violet (0,5%). Photographie prise au Centre Wallon de Bio-Industries - Agro-Biotech. Gembloux/ Université de liège.

4.4. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne des souches de lactobacilles a été étudiée par la techniques des puits contre un groupe de germes pathogènes intestinaux sensibles aux antimicrobiens : *Escherichia coli* O111, *Escherichia coli* O55, *Salmonella* Typhimurium isolés en pédiatrie (cas de diarrhées) et les souches de références : *Listeria monocytogenes* CWBI 2232, *Bacillus cereus* CWBI 935 et *Escherichia coli* ATCC 29522. L'effet inhibiteur des *Lactobacillus* a été déterminé par la mesure des zones d'inhibition.

Dans la présente étude, nous avons testé l'activité antibactérienne des souches *L. paracasei* (B13), *L. brevis* (G6) et *L. plantarum* (F12). Les résultats représentés dans le tableau 15, montrent que les cultures bactériennes des trois souches avaient des activités antibactériennes très intéressantes. Elles ont présenté des spectres d'activité actifs sur toute la collection des souches indicatrices testées ; aussi bien les Gram positives que les Gram négatives, avec des zones d'inhibition de 6mm et plus, traduisant un bon ou fort potentiel antagoniste. Seule la souche G6 a montré une activité faible contre *Escherichia coli* O111. L'activité antimicrobienne la plus forte a été observée avec la souche *L. paracasei* B13 contre tous les pathogènes avec des diamètres d'inhibition supérieurs à 6 mm.

Par ailleurs, les surnageants des trois souches de lactobacilles, neutralisés à pH 6,5 et traités avec de la catalase (SNC), ont inhibé seulement les bactéries Gram positives (*Bacillus cereus* CWBI 935 et *Listeria monocytogenes* CWBI 2232) et ont été totalement inactifs sur les pathogènes à Gram-négatif. Néanmoins, les surnageants des trois souches avaient présenté de bons pouvoirs inhibiteurs sur les bactéries à Gram positif avec des diamètres d'inhibition de 6 mm. La souche G6 a manifesté une forte activité antagoniste contre *Listeria monocytogenes* CWBI 2232 avec une moyenne des zones d'inhibitions de plus 6 mm.

La figure 26 montre l'effet inhibiteur des cultures jeunes des souches B13 et G6 et leurs SNC respectifs sur *Listeria monocytogenes* CWBI 2232.

Tableau 15. Activité antibactérienne des lactobacilles contre des bactéries pathogènes indicatrices.

Bactéries indicatrices	<i>L. plantarum</i> F12		<i>L. brevis</i> G6		<i>L. paracasei</i> B13	
	Culture bactérienne	SNC	Culture bactérienne	SNC	Culture bactérienne	SNC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 29522	++	-	++	-	+++	-
<i>Escherichia coli</i> O111	+++	-	+	-	+++	-
<i>Escherichia coli</i> O55	+++	-	++	-	+++	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	++	-	++	-	+++	-
<i>Listeria monocytogenes</i> CWBI 2232	+++	++	+++	+++	+++	++
<i>Bacillus cereus</i> CWBI 935	++	++	++	++	+++	++

SNC : Surnageant Neutralisé et traité à la Catalase.

(-) absence d'activité antimicrobienne, diamètre 0 ; (+) faible, diamètre compris entre 0 et 3 mm ; (+ +) bon, diamètre compris entre 3 et 6 mm et (+ + +) forte, diamètre supérieur à 6 mm. Chaque point de données est la moyenne des mesures répétées de 3 expérimentations réalisées indépendamment ; n= 3.

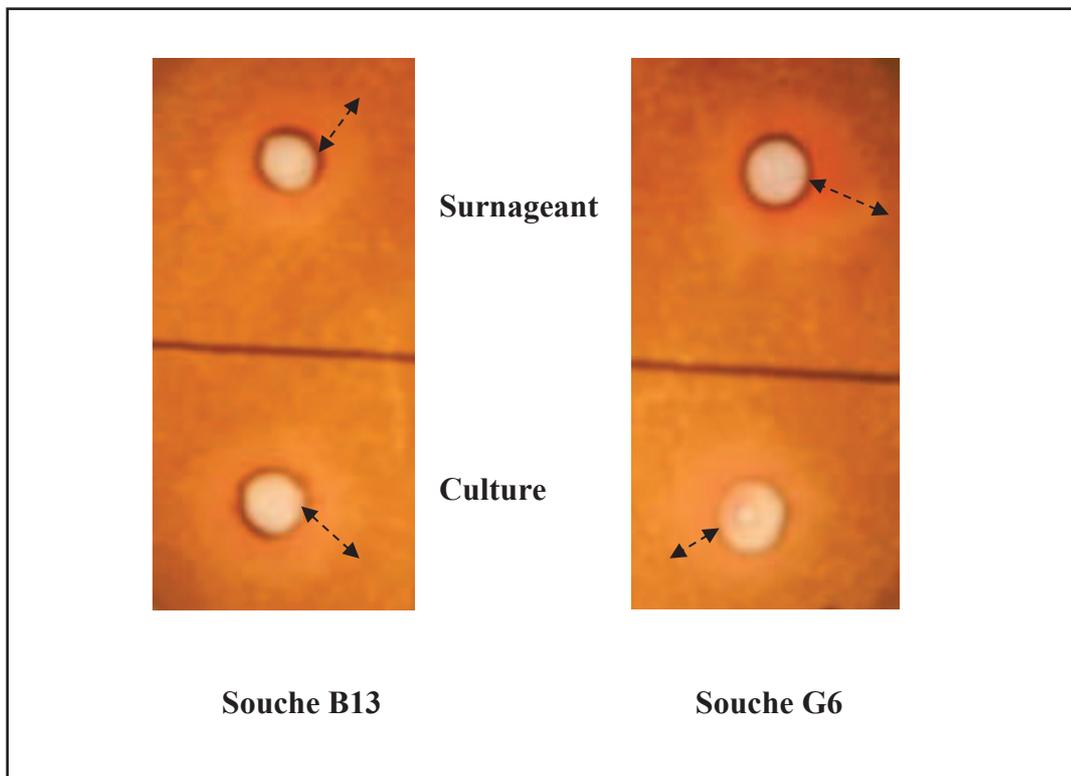


Figure 26. Effet inhibiteur des cultures des souches B13 et G6 et leurs surnageants (SNC) respectifs sur *Listeria monocytogenes* CWBI 2232 testé par la méthode des puits sur gélose MRS.

(-) absence d'activité antimicrobienne, diamètre 0 ; (+) faible, diamètre compris entre 0 et 3 mm ; (++) bon, diamètre compris entre 3 et 6 mm et (+++) forte, diamètre supérieur à 6 mm.

5. Aspect sécuritaire

5.1. L'activité hémolytique

L'étude de l'activité hémolytique a été étudiée sur gélose Columbia au sang. Ce milieu est utilisé pour la détection et la détermination des caractéristiques hémolytiques d'une souche bactérienne donnée. Les zones d'hémolyse se manifestent comme suit : β -hémolyse (zones claires autour des colonies), α -hémolyse (zone avec reflets verdâtres).

Les souches *L. plantarum* F12, *L. brevis* G6 et *L. paracasei* B13 ont été testées pour leur pouvoir hémolytique. Les résultats sont représentés dans le tableau 16. Aucune zone d'hémolyse de type alpha ou béta n'a été observée autour des colonies des trois souches de *Lactobacillus* cultivées sur gélose Columbia au sang humain.

Tableau 16. Activité hémolytique des souches de lactobacilles.

Souches	Types d'hémolyses	
	β -hémolyse	α -hémolyse
<i>L. plantarum</i> F12	-	-
<i>L. paracasei</i> B13	-	-
<i>L. brevis</i> G6	-	-

(-) absence d'hémolyse

5.2. La résistance aux antibiotiques

La sensibilité des souches de lactobacilles à une gamme d'antibiotiques a été évaluée par la méthode de diffusion en disques. La résistance ou non d'une souche a été déterminée par la mesure des zones d'inhibition autour des disques (Charteris *et al.*, 1998).

Les souches *L. plantarum* F12, *L. brevis* G6 et *L. paracasei* B13 ont été testées pour leur résistance aux antibiotiques. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 17. Les trois souches de *Lactobacillus* étaient **résistantes à la céfoxitine (30 μ g), l'acide**

nalidixique (30 µg), la vancomycine (30µg) et la triméthoprime (5µg) et sensibles aux autres antibiotiques testés à savoir la pénicilline (10U/I), l'ampicilline (10µg), l'oxacilline (1µg), l'érythromycine (15 µg), la clindamycine (2 µg), la streptomycine (10 µg), la gentamicine (10 µg), les tétracyclines (30 µg) et le chloramphénicol (30 µg).

Tableau 17. Résistance des souches de lactobacilles aux antibiotiques

Antibiotiques	Concentration disques	<i>L. plantarum</i> (F12)	<i>L. paracasei</i> (B13)	<i>L. brevis</i> (G6)
Béta-lactamines				
Pénicilline	10U/I	S	S	S
Ampicilline	10µg	S	S	S
Oxacilline	1µg	S	S	S
Céfoxitine	30µg	R	R	R
Quinolones				
Acide Nalidixique	30µg	R	R	R
Macrolides				
Erythromycine	15µg	S	S	S
Lincosamides				
Clindamycine	2µg	S	S	S
Aminoglycosides				
Streptomycine	10µg	S	S	S
Gentamycine	10µg	S	S	S
Tétracyclines				
Tétracyclines	30µg	S	S	S
Phénicols				
Chloramphénicol	30µg	S	S	S
Glycopeptides				
Vancomycine	30µg	R	R	R
Sulfamides				
Triméthoprime	5µg	R	R	R

R : résistant, S : sensible. Chaque point de données est la moyenne des mesures répétées de 3 expériences répétées indépendamment, n = 3. P <0,05.

6. L'identification des souches, à fort potentiel probiotique, par séquençage du gène de l'ADNr 16S

D'après nos résultats les souches F12, B13 et G6 ont été retenues comme souches à fort potentiel probiotique. Leur identification phénotypique a été confirmée par biologie moléculaire; par séquençage du gène de l'ADNr 16S.

6.1. Extraction de l'ADN et vérification de son intégrité

Les ADN des souches F12, B13 et G6 ont été extraits à raison de 3 échantillons par souche. L'intégrité des ADN extraits des trois souches de lactobacilles a été vérifiée. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 18.

La majorité des échantillons d'ADN extraits ont été conformes à la courbe caractéristique d'un ADN intègre (figure 16). Seules les courbes de l'échantillon (A) de l'ADN de *L. brevis* G6 et les échantillons (A) et (B) de l'ADN de *L. plantarum* F12 n'étaient pas conformes à la courbe et par conséquent leur valeurs de DO et de concentrations d'ADN correspondantes n'ont pas été calculées.

Le rapport d'intégrité a été calculé comme suit :

$$\frac{DO_{260nm}}{DO_{280nm}}$$

Si le facteur d'intégrité est compris entre 1,7 et 2 : l'intégrité de l'ADN est considérée comme très bonne. D'après le tableau 18 ; nous constatons que les facteurs d'intégrité de l'échantillon C de la souche G6, l'échantillon C de la souche F12 et l'échantillon A de la souche B13 ont des bons facteurs d'intégrité de 1,9, 1,93 et 1,77 respectivement (valeurs mentionnées en rouge dans le tableau 18). Ces échantillons d'ADN ont été retenus pour la suite du travail. Les concentrations des ADN extraits en nanogramme par microlitre (ng/μl) ont été calculées à partir des DO obtenues.

Tableau 18. Résultats de la vérification de l'intégrité de l'ADN des souches de lactobacilles.

Souches	Echantillon (Répétition)	Courbe	Dilution	DO à 260 nm	DO à 280 nm	Facteur d'intégrité	Concentration de l'ADN (ng/µl)
<i>L. brevis</i> G6	A	CNC	100	/	/	/	/
	B	CC	100	0,007	0,004	1,75	35
	C	CC	100	0,019	0,010	1,9	95
<i>L. plantarum</i> F12	A	CNC	50	/	/	/	/
	B	CNC	50	/	/	/	/
	C	CC	50	0,027	0,014	1,93	67,5
<i>L. paracasei</i> B13	A	CC	50	0,085	0,048	1,77	212,5
	B	CC	50	0,049	0,022	2,23	122,5
	C	CC	50	0,065	0,031	2,01	162,5

CNC : courbe non conforme, CC : courbe conforme, / : non déterminé.

Sachant que : **une unité d'absorbance à 260 nm = 50 µg d'ADN/ml ;**

Sachant que 1µg =1000 ng et 1ml = 1000µl ;

Donc la concentration de l'ADN en **ng/ µl** est calculée selon la formule suivante :

La concentration de l'ADN en ng/µl = DO_{260nm} X 50 X la dilution

Les résultats des concentrations obtenues sont mentionnés en rouge dans le tableau 18.

6.2. Amplification du gène ADNr 16S

L'amplification du gène ADNr 16S a été donc réalisée sur les échantillons C de la souche G6, A de la B13 et C de la souche F12.

6.2.1. Vérification de la spécificité de l'amplification

La migration des produits amplifiés a été effectuée pendant 20 minutes à raison de deux échantillons d'ADN par souche. La bande spécifique à 1500 bp se retrouve correctement pour les ADN des souches G6 (1 et 2), F12 (1 et 2) et la souche B13 (2) (figure 27). L'amplification s'est donc déroulée correctement, sauf pour l'un des échantillons de la souche B13. Il n'a pas été pris en considération pour les étapes suivantes.

6.2.2. Dosage des produits PCR purifiés

Le dosage des produits PCR purifiés a été réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose en présence du marqueur de poids moléculaire MPM. Les résultats sont présentés dans la figure 28.

La détermination des concentrations se fait en comparant l'intensité de la bande à 1500 pb de chaque échantillon à celle de la bande correspondante pour le marqueur de poids moléculaire dont la concentration est de 64 ng/µl. Si l'intensité est 2 fois plus importante pour l'échantillon, la concentration de celui-ci sera 2 fois plus importante que pour le MPM.

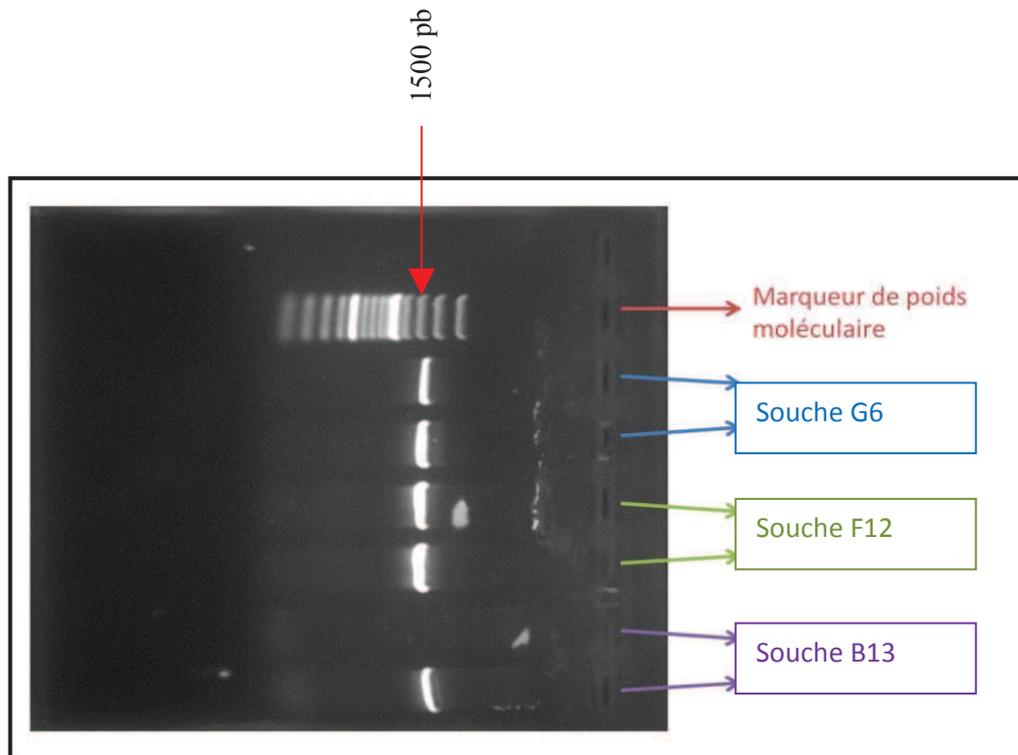


Figure 27. Migration sur gel d'agarose des ADN amplifiés des souches de lactobacilles à caractères probiotiques : G6, F12 et B13.

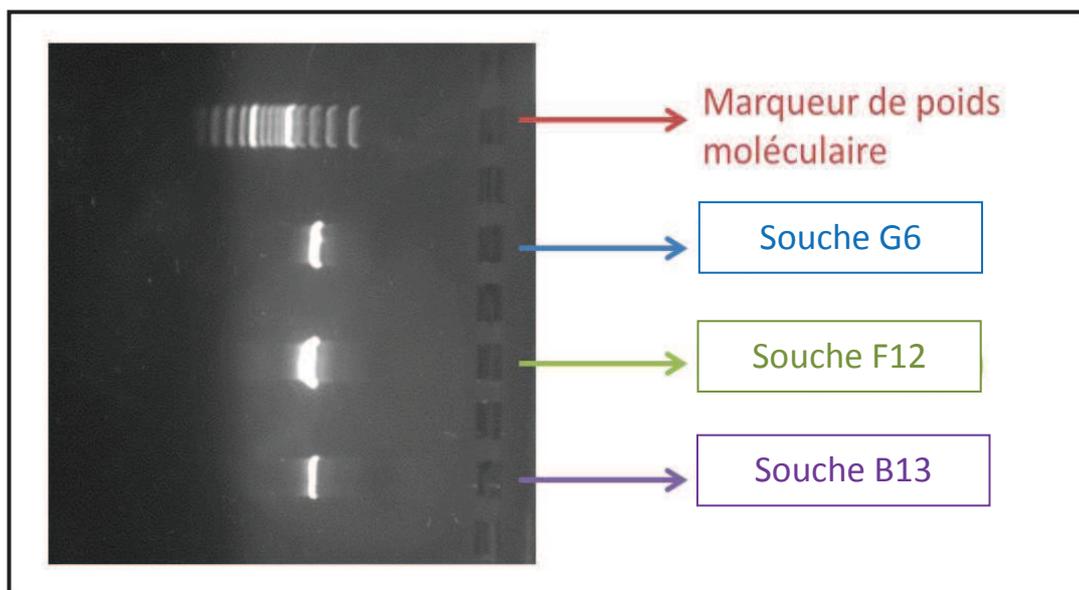


Figure 28. Dosage des produits PCR purifiés des trois souches de lactobacilles à caractères probiotiques : G6, F12 et B13.

Les volumes d'ADN des trois souches de lactobacilles à ajouter au milieu réactionnel pour le séquençage du gène ADNr 16S ont été calculés à partir des résultats des dosages des produits PCR purifiés des ADN des souches mentionnés dans le tableau 19. Des dilutions appropriées ont été préparées à partir des concentrations (ng/μl) afin d'atteindre des volumes de 1μl. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 20.

Tableau 19. Mesure des concentrations des produits purifiés de la PCR des souches de lactobacilles à caractères probiotiques G6, B13 et F12.

Echantillon	Intensité par rapport au MPM	Concentration (ng/μl)
G6	Même intensité	64
F12	2X plus intense	128
B13	Même intensité	64

MPM : marqueur de poids moléculaire.

Tableau 20. Calcul des dilutions de l'ADN des souches G6, F12 et B13 pour la réaction d'amplification du gène ADNr 16S

Souches	Concentration ADN (ng/μl)	Dilution	V ajouté (μl)
G6	64	6	1
F12	128	10	1
B13	64	6	1

6.2.3. Purification et séquençage du gène ADNr 16S

Le séquençage des produits purifiés de l'amplification du gène ADNr 16S des trois souches G6, F12 et B13 a été réalisé par la firme PROGENUS (Pour les séquences des trois souches voir Annexes).

6.3. Traitement des séquences et identification des souches par analyse BLAST

Les séquences du gène ADNr16S obtenues par Progenus des trois souches G6, F12 et B13 ont été traitées grâce au logiciel Vector NTI.

Les séquences traitées ont été comparées à la bases des données NCBI>BLAST via le site internet : www.ncbi.nlm.nih.gov.

L'analyse BLAST des séquences d'ADNr 16S correspondant aux souches G6, F12 et B13 a confirmé leur identification préalable par système API CH50 comme *L. paracasei* B13, *L. plantarum* F12 et *L. brevis* G6 (Tableau 21).

Les souches à caractères probiotiques *L. paracasei* B13, *L. plantarum* F12 et *L. brevis* G6 ont été enregistrées au Centre Wallon de Bio-Industrie (CWBI) et dans la base de données *GenBank* sous les numéros d'accès JQ436724, JQ436723 et JQ436725 (Tableau 21).

Tableau 21. Comparaison entre l'identification phénotypique (par API système) et moléculaire (ADNr 16S) des souches potentiellement probiotiques.

Souches	Identification API CHL 50	Identification par ADNr 16S	
		Identification	Numéro d'accès GenBank
CWBI\B- 1515* (B13)	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	JQ436724
CWBI/B- 1542* (G6)	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	JQ436725
CWBI/B- 1543* (F12)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	JQ436723

* Code de la souche enregistré au Centre Wallon de Bio-Industries (CWBI).

DISCUSSION

Le but de cette étude était d'isoler et de caractériser des souches de lactobacilles à potentiel probiotique à partir de selles d'enfants. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur les recommandations de la FAO/OMS, (2002) pour la sélection de nouveaux probiotiques destinés à l'utilisation chez l'Homme.

L'isolement et la purification des bactéries lactiques sur milieu MRS gélosé a conduit à la collection de 120 souches. Le milieu MRS est sélectif pour *Lactobacillus* mais quelques espèces de BL appartenant aux genres *Leuconostoc* et *Pediococcus* peuvent s'y développer. Par ailleurs, Il ne permet pas la culture des autres BL comme *Carnobacterium*, à cause de la présence de l'acétate, et les bifidobactéries qui nécessitent l'addition de la cystéine au milieu de culture. La figure 29 montre les différents critères utilisés pour l'identification des genres de bactéries lactiques selon Sutra *et al.*, (1998).

Etant donné que les lactobacilles sont des bacilles ; l'examen microscopique des isolats, nous a permis d'éliminer les souches aux formes cocciques correspondant aux genres *Leuconostoc* et *Pediococcus* (figure 29). Par conséquent sur les 120 BL testées, **52 souches positives à la coloration de Gram, de forme bacillaire ont été retenues**. En outre, l'examen macroscopique de leurs colonies obtenues sur gélose MRS a révélé qu'elles étaient circulaires ou lenticulaires, de couleurs blanchâtres ou jaunâtres, rugueuses ou lisses. Elles appartenaient, via ces critères, **au genre *Lactobacillus*** (Sutra *et al.*, 1998 ; De Vos *et al.*, 2009).

Le test de la catalase a révélé que les 52 souches étaient négatives à la réaction de la catalase. Selon le Bergey's Manuel de la Systématique Bactérienne « les *Firmicutes* », les lactobacilles sont catalase négative (De Vos *et al.*, 2009).

À ce stade de l'identification du genre, 52 isolats ont été identifiées appartenant au genre *Lactobacillus*. Elles ont été retenues pour l'étape de l'identification des espèces.

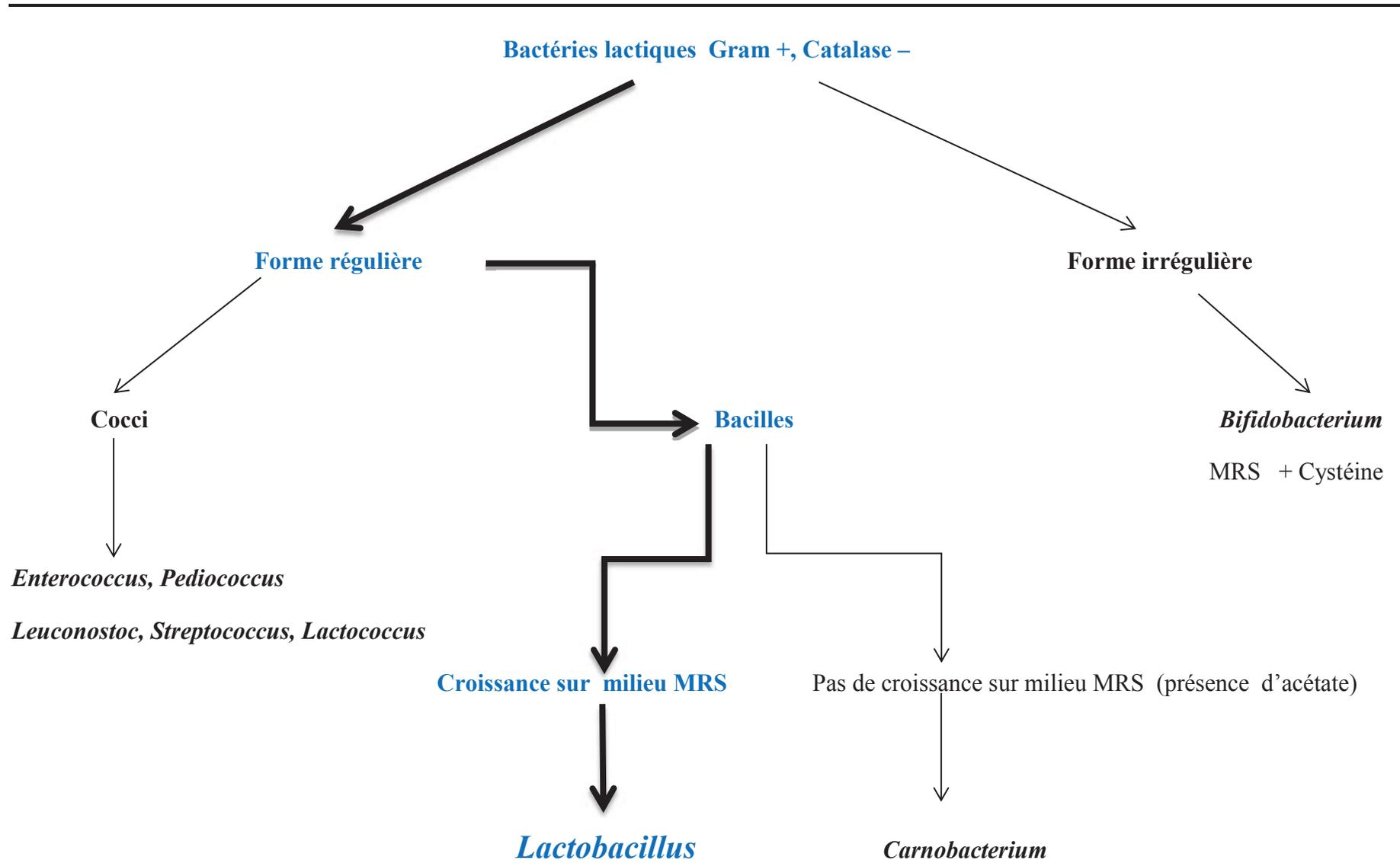


Figure 29. Identification des genres des bactéries lactiques (source Sutra *et al.*, 1998).

Un des critères d'identification des espèces de lactobacilles est l'étude du type fermentaire. Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement fermentaire. Certaines espèces sont homofermentaires (homolactiques) ne produisant que l'acide lactique, d'autres hétérofermentaires (hétérolactiques) produisant de l'acide acétique, de l'acétaldéhyde, de l'éthanol et du dioxyde de carbone (CO₂) à côté de l'acide lactique (De Vos *et al.*, 2009 ; Nanatani et Abe, 2011).

Le test de Gibson Abdelmalek ne détermine pas le caractère obligatoire ou facultatif du type fermentaire. Par ailleurs, les *Lactobacillus* retrouvés dans notre étude se subdivisent selon leur type fermentaire en trois groupes ; suivant la classification d'Orla-Jensen remaniée par Kandler et Weiss et donnée par le Bergey's Manuel de la Systématique Bactérienne « les *Firmicutes* » (De Vos *et al.*, 2009) :

- *L.acidophilus*, *L. gasseri*, *L. ruminis* et *L. salivarius* sont **homofermentaires obligatoires**,
- *L. casei*, *L. paracasei*, *L. paracasei* sp *paracasei* et *L. plantarum* sont homofermentaires et **hétérofermentaires facultatifs**,
- *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. reuteri* et *L. vaginalis* sont **hétérofermentaires obligatoires**.

L'identification des espèces de lactobacilles, par API 50 CHL, a montré qu'elles étaient représentées majoritairement par *L. fermentum*, le groupe *L. casei*, *L. gasseri* suivis par *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. vaginalis* et minoritairement par *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. acidophilus* et *L. ruminis*. Ces espèces sont rencontrées chez l'Homme sain (Reuter, 2001; Eckburg *et al.*, 2005 ; Walter, 2008; Khalil *et al.*, 2007 ; Ozgun et Vural, 2011).

Les souches probiotiques, pour être efficaces, doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin et donc **résister au cours de leur passage aux conditions hostiles de l'estomac** telles que **l'acidité et l'action de la pepsine** (Dunne *et al.*, 2001). Durant le jeûne, le pH stomacal peut descendre très bas, jusqu'à atteindre 1,5 chez certaines personnes ce qui peut affecter fatalement la croissance bactérienne (Draser *et al.*, 1969).

Les lactobacilles, isolés dans notre travail, ont montré des comportements très différents vis-à-vis de leur sensibilité au **pH 1.5**. Celui-ci a eu un **effet drastique** sur la majorité des isolats mais six souches ont résisté à cette forte acidité après 2h d'incubation. Toutefois, on peut constater que **le pH à lui seul n'est pas un bon critère pour évaluer la résistance des souches probiotiques au cours de leur passage de l'estomac**. Toutes les souches ont subi des pertes de viabilité non négligeables lorsqu'elles sont soumises à des conditions gastriques simulées en comparaison à leur survie à pH 1,5 seul ; voir même, la souche *L. acidophilus* 8* qui a été totalement inhibée en présence de la pepsine et du pH 1,5. Les souches résistantes au jus gastrique simulé : *L. plantarum* F12, *L. paracasei* B13, *L. fermentum* H2, *L. brevis* G6, *L. paracasei* sp *paracasei* A20 ont montré des taux de survie plus ou moins intéressants et variables d'une souche à une autre.

Les lactobacilles sont naturellement bien adaptés à des pH bas (Van de Guchte *et al.*, 2002) par leur production d'acide(s) organique(s) lors de la fermentation lactique. Par conséquent, chez l'Homme, après ingestion, les lactobacilles rencontrent un autre environnement acide, l'estomac, et certaines souches peuvent s'adapter au pH stomacal très bas (Van de Guchte *et al.*, 2002, Nanatani et Abe, 2011). Les lactobacilles peuvent réagir au stress acide par trois mécanismes (Lim *et al.*, 2000; Lorca *et al.*, 2002) : en limitant l'entrée des acides dans leur cytoplasme, en alcalinisant le milieu intracellulaire grâce aux ATPases (Poolman *et al.*, 1991 ; Nanatani et Abe, 2011) et en protégeant les macromolécules contre les dérivés chargés par les protéines chaperonnes dont la fonction est d'assister d'autres protéines en assurant un repliement spatial adéquat (Lim *et al.*, 2000; Lorca *et al.*, 2002).

Dans la fermentation malolactique, réalisée par les espèces hétérofermentaires, le L-malate est décarboxylé dans le cytoplasme par les enzymes malolactiques pour produire le L-lactate et du CO₂. Cette décarboxylation permet l'alcalinisation du cytoplasme et la production d'ATP (Poolman *et al.*, 1991 ; Nanatani et Abe, 2011). Les six souches acido-résistantes sélectionnées dans notre étude sont hétérofermentaires. *L. fermentum* H2 et *L. brevis* G6 sont hétérofermentaires obligatoires ; *L. plantarum* F12, *L. paracasei* B13 et *L. paracasei* sp *paracasei* A20 sont hétérofermentaires facultatifs. Ceci laisse à supposer que leur résistance à l'acidité est due, entre autres, à ce mécanisme de résistance par fermentation malolactique.

Dans l'estomac, en plus du pH bas, les probiotiques sont aussi, soumis au stress de l'enzyme protéolytique ; la pepsine (Holzapfel *et al.*, 1998). Dans la présente étude, l'addition de la pepsine aux conditions acides a provoqué une perte plus au moins importante de la viabilité bactérienne, selon les souches testées, par rapport à l'acidité seule. Vamanu et Vamanu, (2010); Vamanu *et al.*, (2011) ont rapportés des résultats similaires aux nôtres en constatant que la présence de la pepsine, en plus du pH bas, avait démunie d'une manière importante la viabilité des souches de *L. plantarum*, *L. paracasei* et *L. rhamnosus* testées.

D'autre part, plusieurs études ont montré que des souches d'origine humaine appartenant aux espèces : *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum* et au groupe *L. casei* possèdent une tolérance aux conditions stomacales (Dunne *et al.*, 2001 ; Lim *et al.*, 2000; Lorca *et al.*, 2002; Khalil *et al.*, 2007; Xiaodong *et al.*, 2009; Kirtzalidou *et al.*, 2011).

Les taux de survie intéressants, aux conditions gastriques simulées, observés avec les souches *L. plantarum* F12, *L. paracasei* B13, *L. brevis* G6, *L. fermentum* H2 et *L. paracasei* sp *paracasei* A20 laissent à suggérer leur capacité à transiter l'estomac et atteindre le niveau intestinal.

L'un des rôles des acides biliaires est l'inhibition de la prolifération de bactéries dans la partie supérieure de l'appareil digestif, chez l'Homme, par désassemblage des membranes biologiques. La concentration moyenne de la bile intestinale est considérée comme étant de 0,3% P/ V, en outre, le temps de passage est suggéré être de 4 heures (Parasad *et al.*, 1998).

L'effet de la pancréatine, sans la bile, ne semble pas affecter la viabilité des souches de lactobacilles testées. Nos résultats sont similaires à ceux retrouvés par Köll *et al.*, (2010) sur des souches de lactobacilles isolées de la matière fécale chez l'Homme dans le but d'isoler de nouveaux probiotiques. D'autre part, la présence de la bile dans le jus gastrique simulé a provoqué, selon les souches, une diminution plus ou moins importante de la survie des lactobacilles. Dans ces conditions, quatre souches ont exhibées une bonne tolérance à la bile. Il s'agit de *L. plantarum* F12, *L. paracasei* B13, *L. brevis* G6 et *L. paracasei* sp *paracasei* A20.

Plusieurs études ont montré l'habilité des lactobacilles à survivre dans des conditions mimant le suc du petit intestin de l'Homme. A l'instar de nos souches ; des cas de résistances aux conditions intestinales simulées ont été observés avec des souches appartenant aux espèces : *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. paracasei* sp *paracasei* et *L. brevis* (Dunne *et al.*, 2001 ; Haller *et al.*, 2001; Vamanu et Vamanu, 2010 ; Guo *et al.*, 2010 ; Köll *et al.*, 2010).

Les mécanismes de résistance des lactobacilles aux sels biliaries sont de mieux en mieux connus (Pfeiler et Klaenhammer, 2009). Les lactobacilles sont capables de métaboliser les acides biliaries ce qui les protègent contre la bile. L'un des mécanismes de cette résistance ; c'est la déconjugaison des acides biliaries par les enzymes *biles salts hydrolase* (BSH). L'hydrolyse libère les glycines et/ou les taurines du noyau stéroïde ce qui a pour effet de diminuer la solubilité de la bile à pH bas et de réduire ses activités détergentes (Begley *et al.*, 2006 ; Hamon *et al.*, 2011).

Un autre mécanisme responsable de la résistance des lactobacilles aux sels biliaries est l'extrusion de la bile. Ce mécanisme est réalisé grâce aux systèmes *multidrug resistance* (MDR). Les MDR sont responsables de la résistance à de nombreux composés toxiques comme les antibiotiques, les solvants organiques, les détergents et les sels biliaries (Sami *et al.*, 1997 ; Whitehead *et al.*, 2008 ; Pfeiler et Klaenhammer, 2009).

Afin d'exercer leurs effets bénéfiques, les probiotiques doivent **adhérer aux cellules épithéliales** ou au mucus intestinal et persister dans l'intestin (Collado *et al.*, 2005; Xiaodong *et al.*, 2009). La capacité des probiotiques à adhérer aux surfaces des muqueuses **empêche leur évacuation rapide** par la contraction intestinale et après écoulement péristaltique du digeste.

Les résultats de l'étude de l'adhésion aux cellules Caco-2 ont montré une différence dans la capacité des souches à adhérer aux cellules Caco-2. Les souches *L. paracasei* B13 et *L. brevis* G6 ont exhibé une bonne adhérence par comparaison à celle de la souche de référence, commercialisée comme probiotique ; *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 dont le taux d'adhésion aux cellules Caco-2 est de (9,7%) (Tuomola et Salminen, 1998 ; Ren *et al.*, 2012). *L. plantarum* F12 a manifesté le taux le plus fort d'adhérence (9,66%) comparable à celui de *L. rhamnosus* GG ATCC 53103.

Les cellules Caco-2 se différencient spontanément dans des conditions standard de culture. Une fois différenciées ; elles expriment les caractéristiques des cellules épithéliales intestinales ; les entérocytes matures (Pinto *et al.*, 1983). L'adhésion entre les cellules Caco-2 enterocyte-like et les bactéries probiotiques se fait par interactions entre récepteurs spécifiques eucaryotes et ligands bactériens.

Plusieurs mécanismes d'adhésion des lactobacilles aux cellules caco-2 ont été décrits. Ils ont été détaillés dans la partie bibliographique de ce travail. Ces mécanismes impliquent plusieurs protéines des structures de surface. Parmi ces protéines ; les adhésines retrouvées chez plusieurs souches de lactobacilles (Ton-That *et al.*, 2004 ; Marraffini *et al.*, 2006). Il a été démontré aussi que la protéine SlpA de *L. brevis* ATCC 8287 adhère à des lignées cellulaires épithéliales humaines et à la fibronectine (Hynonen *et al.*, 2002). Antikainen *et al.*, (2002) ont démontré que la protéine CbsA de *L. crispatus* JCM 5810 pouvait adhérer aux collagènes, à la laminine et aux acides lipotéichoïques. D'autres protéines de surface ont été décrites impliquant la liaison des *Lactobacillus* à l'un des composants des cellules épithéliales ; le mucine (Coconnier *et al.*, 1992 ; Roos et Jonsson , 2002).

Des molécules non protéiques (fractions saccharidiques de surfaces, acide lipotéichoïque) ont été décrites comme favorisant l'adhésion des lactobacilles mais elles ne sont pas pour l'instant précisément identifiées (Velez *et al.*, 2007). D'autres structures de surface comme les fimbriae ont été supposées être impliqués dans l'adhésion des lactobacilles. Des gènes codant pour des fimbriae ont été retrouvés dans le génome de *L. johnsonii* NCC533 (Pridmore, 2004).

Nos résultats sont en accord avec plusieurs travaux qui ont démontré l'adhésion aux cellules de lignées humaines de certaines souches appartenant aux espèces : *L. paracasei* (Verdenelli *et al.*, 2009), *L. plantarum* ATCC 8014 (Tuomola et Salminen, 1998) et *L. brevis* ATCC 8287 (Hynonen *et al.*, 2002).

La forte adhérence des souches B13, G6 et F12 aux cellules Caco-2 suggère leur capacité à adhérer au tissu d'épithélium intestinal humain et d'être en concurrence avec des agents entéropathogènes. En effet, l'adhésion aux cellules intestinales est reconnue comme l'un des principaux mécanismes qui permet aux bactéries probiotiques de bloquer les infections entériques (Mack et Lebel, 2003). Des auteurs ont

observé une diminution de l'adhésion de plusieurs bactéries pathogènes avec une relation directe entre la dose de probiotique ajoutée sur le taux de réduction de l'adhésion. Parmi les pathogènes inhibés, on retrouve différents types d'*E. coli* (entérotoxigénique, ETEC; entéro-pathogénique, EPEC; et diarrhé-génique, DAEC), *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis* et *Klebsiella pneumoniae* (Bernet *et al.*, 1993; Coconnier *et al.*, 1993; Forestier *et al.*, 2001).

Aussi, de plus en plus d'études sur l'inhibition de l'adhésion de pathogènes entériques, *in vitro*, par des bactéries probiotiques mentionnent la possibilité qu'une augmentation de la sécrétion de mucus par les cellules intestinales pourrait expliquer l'effet inhibiteur des probiotiques. Lorsque *L. plantarum* 299v est incubé avec des cellules épithéliales HT-29, une augmentation des niveaux de sécrétions de mucine est automatiquement accompagnée d'une réduction de l'adhésion d' *E. coli* entéro-pathogène EPEC (Mack *et al.*, 1999). De plus, *L. casei rhamnosus* et *L. casei* Shirota ont aussi montré un effet sur la production de mucus conduisant à une diminution de l'adhésion et à l'exclusion de *E. coli* et de *Salmonella* sp (Mattar *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2003).

L'activité antibactérienne d'un probiotique est primordiale pour la colonisation réussie des muqueuses intestinales. Elle lui assure un effet de barrière et de défense contre les pathogènes (Vaughan *et al.*, 1999). Les **lactobacilles, d'origine humaine**, peuvent produire des **substances antimicrobiennes, actives *in vitro* et *in vivo*** sur les pathogènes. Ces substances sont les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (Servin, 2004).

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne des trois souches testées *L. paracasei* (B13), *L. brevis* (G6) et *L. plantarum* (F12) ont montré que leurs cultures d'une nuit ont eu une forte activité antagoniste contre les bactéries pathogènes indicatrices. En revanche, les SNC : surnageants neutralisés à pH 6,5 (élimination de l'effet pH bas) et traités avec de la catalase (élimination de l'effet de l'H₂O₂) étaient incapables d'inhiber aucun des pathogène Gram-négatif testés. Ceci suggère que l'activité antagoniste de nos souches contre des bacilles Gram négatifs est due à l'action du pH bas ou à l' H₂O₂ ou une action synergétique entre les substances antibactériennes synthétisées par les lactobacilles.

L'activité antibactérienne des acides organiques contre les germes pathogènes s'explique par leur diffusion passive à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée et l'acidification du cytoplasme après dissociation qui se traduit par l'inhibition de l'activité enzymatique cellulaire des pathogènes acidosensibles. (Aiba *et al.*, 1998 ; Alakomi *et al.*, 2000 ; Lavermicocca *et al.*, 2008). Dans étude réalisée, *in vitro*, Hütt *et al.*, (2006) ont démontré l'activité anti-Salmonella associée aux acides organiques et aux pH acides produits par trois souches de lactobacilles, *L. paracasei* 8700:2, *L. plantarum* 299V et *L. fermentum* ME-3, en conditions microaérophiles.

En outre, en milieu acide, la compétitivité bactérienne des lactobacilles est avantagée par rapport aux autres bactéries à cause de leur tolérance à l'acidité (Servin, 2004 ; Tejero-Sarinena *et al.*, 2012).

Les lactobacilles sont catalase-négatifs et certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène (Condon, 1996). Le peroxyde d'hydrogène est toxique et capable d'inhiber de nombreux germes pathogènes qui ne peuvent pas le dégrader (Otero et Nader-Macias, 2006; Pridmore *et al.*, 2008).

Nous avons constaté que les SNC des souches de lactobacilles, contrairement avec les Gram négatif, ont eu une bonne activité antimicrobienne sur les bactéries à Gram positif, *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*. Cela est probablement dû à des substances supposées bactériocines. Les lactobacilles sont largement connus pour leur production de bactériocines (Todorov, 2005 ; Dortu et Thonart, 2009). Nos résultats sont en accord avec les données publiées par Dortu et Thonart (2009), où les auteurs rapportent qu'aucune bactériocine produite par des BL active contre les bactéries à Gram négatif n'a été décrite. En raison de la structure de la paroi des bactéries à Gram négatif, les bactériocines ne peuvent pas traverser la membrane externe pour accéder à la membrane interne, le site de leur activité.

Les bactériocines agissant généralement sur la membrane cytoplasmique des cellules sensibles (Gram +) et cela par la formation de petits pores membranaires (Luquet et Courrieu, 2005). Le résultat de cette action est un efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composants de la force proton motrice FPM : un composant électrique, le potentiel électrique et un composant

chimique, le gradient du pH. La FPM joue un rôle central dans la synthèse de l'ATP, le transport actif et la mobilité bactérienne et donc sa désorganisation entraîne la cessation rapide des activités cellulaires et la mort de la cellule (Luquet et courrieu, 2005 ; Dortu et Thonart, 2009).

Lors d'expériences, *in vitro*, certains auteurs ont proposé une action synergétique entre les substances protéiques antimicrobiennes et les acides organiques pour expliquer l'action inhibitrice des bactéries probiotiques. Ainsi, Gopal *et al.*, (2001) ont mené une série d'expériences pour étudier l'inhibition, *in vitro*, d'une souche d'*E. coli* entérotoxigène par *L. rhamnosus* DR20, *L. acidophilus* HN017 et *Bifidobacterium lactis* DR10. Le prétraitement d'*E. coli* avec les surnageants de culture des bactéries réduit l'adhésion de ce pathogène avec les cellules Caco-2. Les auteurs ont suggérer que les substances protéiques antibactériennes inhibe *E. coli* en agissant en concert avec le ou les acide(s) produit(s). Selon Alakomi *et al.*, (2000) ; Servin *et al.*, (2003) ceci s'expliquerait par une diminution du pH qui provoque une perméabilisation de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif facilitant ainsi la pénétration d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines.

L'inhibition de la croissance des pathogènes peut également s'effectuer par un processus de restriction des nutriments. Il est évident que la capacité des microorganismes à entrer en compétition pour limiter les nutriments disponibles est un facteur non négligeable qui détermine la composition du microbiote. Ainsi, une augmentation du nombre de lactobacilles obtenue lors d'un traitement probiotique permettrait de diminuer les substrats disponibles pour l'implantation de microorganismes pathogènes (Fooks et Gibson, 2002).

Plusieurs études ont montré l'effet des souches de lactobacilles contre les entéro-pathogènes utilisées dans notre étude : contre *E. coli* entéro-pathogènes (Alakomi *et al.*, 2000 ; Gopal *et al.*, 2001 ; Servin 2004), contre *Salmonella* Typhimurium (Servin, 2004 ; Hütt *et al.*, 2006 ; Rishi *et al.*, 2011; Tham *et al.*, 2011) contre *L. monocytogenes* (Coconnier *et al.*, 1993 ; Servin et Coconnier, 2003; Sevin, 2004 ; Collado *et al.*, 2005) et contre *B. cereus* (Dunne *et al.*, 2001 ; Servin, 2004; Rosslund *et al.*, 2005).

Ainsi, les données relatives à l'activité antibactérienne des souches probiotiques de lactobacilles sont abondantes dans la littérature. Toutefois, il est important de noter que

chaque souche est unique et les mécanismes associés à des souches particulières ne peuvent pas être extrapolés à tous les microorganismes probiotiques (FAO/OMS, 2002). Chaque souche doit être étudiée de façon indépendante. De plus en plus d'équipes de recherche travaillent actuellement pour identifier ces mécanismes d'action de probiotiques particuliers contre certains pathogènes.

Dans notre étude, **nos souches ont montré une forte activité antibactérienne** ; ceci renforce leur choix pour une éventuelle **utilisation**, après des études cliniques, dans **l'inhibition des bactéries entéro-pathogènes impliquées dans les diarrhées infantiles**.

Les lactobacilles, bien qu'ils portent le **statut GRAS** (*generally recognized as safe* ; généralement reconnu comme sûr), doivent être soumis, *in vitro*, comme tous les microorganismes **à des tests de sécurité** (Tannock, 2003; FAO/OMS, 2002).

Nos souches testées *L. plantarum* F12, *L. paracasei* B13 et *L. brevis* G6 n'ont pas présenté d'activité hémolytique. Köll *et al.*, (2010) ont rapporté des résultats similaires aux nôtres sur des souches isolées chez l'Homme. Aussi, Ouwehand *et al.*, (2004) n'ont observé aucun type d'hémolyse avec des souches de lactobacilles isolées chez des patients avec des cas de bactériémies par comparaison de leur caractères phénotypiques avec la souche commerciale *L. rhamnosus* GG. En revanche d'autres études ont rapporté des cas d'alpha-hémolyses chez des souches vaginales de lactobacilles (Brzin, 1972 ; Darbro *et al.*, 2009).

La détermination de l'activité hémolytique est l'une des **exigences de sureté des souches probiotiques**. Les microorganismes probiotiques doivent être dénués de toutes formes de pathogénicité (FAO/OMS, 2002). En effet, les probiotiques sont des organismes vivants et de ce fait, ils peuvent être responsables théoriquement d'effets secondaires comme des risques d'infections systémiques (Gupta *et al.*, 1995 ; Salminen *et al.*, 1998). Les lactobacilles ont été associés depuis longtemps aux fermentations alimentaires en tant que partie d'aliments et de suppléments alimentaires chez l'Homme et sont généralement considérées comme étant sans danger (Gasser, 1994). Toutefois, l'isolement croissant des bactéries lactiques dans des infections cliniques (Aguirre et Collins, 1993 ; Kochan *et al.*, 2011) impose l'étude de leur innocuité en tant que souches probiotiques (FAO/OMS, 2002).

L'absence de tout signe d'hémolyse indique l'aspect sécuritaire de nos souches : *L. plantarum* F12, *L. paracasei* B13 et *L. brevis* G6.

Un autre aspect important **de la sécurité sanitaire** des probiotiques destinés à l'Homme est le profil de la **résistance aux antibiotiques**. En effet, comme pour toutes les bactéries ; les souches probiotiques ont montré une résistance aux antimicrobiens (Salminen *et al.*, 1998). Dans ce contexte, il est recommandé d'étudier le profil de résistance des probiotiques pour les antibiotiques (FAO/OMS, 2002). La distinction entre la résistance naturelle et acquise aux médicaments antimicrobiens est d'une grande importance. La résistance acquise constitue un grand risque de transmission de gènes de résistance à des bactéries intestinales pathogènes et commensales (Ishibashi et Yamazaki, 2001).

Les trois souches de lactobacilles testées étaient sensibles à neuf antibiotiques sur treize. En accord avec nos résultats, des études ont rapporté que les lactobacilles sont généralement sensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines, comme le chloramphénicol, l'érythromycine, la clindamycine et les tétracyclines (Temmerman *et al.*, 2002 ; Coppola *et al.*, 2005 ; D'Aimmo *et al.*, 2007) et sensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la paroi bactérienne telles que les bêta-lactamines comme la pénicilline, l'ampicilline, l'oxacilline (Charteris *et al.*, 1998, Danielsen et Wind, 2003 ; Kacem et Karam, 2006 ; Coppola *et al.*, 2005 ; Ammor *et al.*, 2007 ; Khöll *et al.*, 2008). Pour la gentamicine et la streptomycine, nos souches étaient sensibles à ces deux antibiotiques. Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par Khöll *et al.*, 2008). Contrairement, certains chercheurs ont signalé des cas de résistances de *Lactobacillus* à ces deux antibiotiques (Charteris *et al.*, 1998 ; Sami *et al.*, 1998 ; Coppola *et al.*, 2005).

Pour la vancomycine nos résultats sont en accord avec ceux retrouvés par Elisha et Courvalin, (1995) ; Danielsen et Wind (2003) ; Elkins et Mullis, (2004); Mathur et Singh (2005) ; Ammor *et al.*, (2007). Selon ces auteurs, les espèces hétérofermentaires de lactobacilles sont naturellement résistantes à la vancomycine, alors que les espèces homofermentaires sont sensibles à cet antibiotique. Nos trois souches testées *L. paracasei* B13, *L. plantarum* F12 et *L. brevis* G6 sont des hétérofermentaires ce qui concorde avec ces données. La résistance intrinsèque des lactobacilles hétérofermentaires à la vancomycine est due à la présence de D-Ala-D-lactate dans leur peptidoglycane au lieu

du normal dipeptide D-Ala-D-Ala cible de la vancomycine (Ammor *et al.*, 2007).

Les lactobacilles sont généralement sensibles aux bêta-lactamines ; mais ils sont naturellement résistant aux céphalosporines de deuxième génération comme la céfoxitine (Danielsen et Wind, 2003) dont le mécanisme de résistance n'est pas complètement élucidé, mais l'imperméabilité de la membrane cellulaire a été suggérée (Elkins et Mullis, 2004 ; Ammor *et al.*, 2007). Les lactobacilles ont également une résistance intrinsèque aux quinolones, telle que l'acide nalidixique par un mécanisme de résistance mal connu (Hummel *et al.*, 2007 ; Ammor *et al.*, 2008). La résistance à caractère intrinsèque à des inhibiteurs de synthèse d'acides nucléiques comme le triméthoprim et les sulfamides a été également signalée chez les lactobacilles (Charteris *et al.*, 1998 ; Katla *et al.*, 2001 ; Ammor *et al.*, 2008).

Le profil de résistance de nos souches semble être intéressant. Ceci est lié, peut-être, au fait que ces souches ont été collectées dans des zones rurales où les gens ont généralement une alimentation naturelle et traitent avec des méthodes rationnelles. Ce qui limite l'utilisation des antibiotiques et par conséquent limite l'émergence des souches à résistance acquise dans cette catégorie de la population. En outre, les résistances observées avec nos souches à la céfoxitine, l'acide nalidixique, la vancomycine et le triméthoprim semblent être naturelles. La résistance intrinsèque n'est pas horizontalement transférable, et ne pose aucun risque dans des bactéries non pathogènes (Mathur et Singh, 2005).

La résistance naturelle des lactobacilles à une gamme d'antibiotiques cliniquement importants permet leur utilisation comme probiotiques «surs» ou leur emploi en thérapie de combinaison, antibiotique / probiotique, contre les infections bactériennes. En effet, de récentes études ont été menées sur les probiotiques, en combinaison avec des antibiotiques, comme une alternative à l'antibiothérapie chez l'Homme, en raison de l'émergence et l'augmentation des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques (Borriello *et al.*, 2003, Rishi *et al.*, 2011). Toutefois, selon Sami *et al.*, (1998) ; Saarela *et al.*, (2000) ; FAO/OMS, (2002), il est important de confirmer que la résistance aux antibiotiques de la souche probiotique est d'origine intrinsèque ou est portée par des éléments génétiques hautement transférables, tels que les plasmides et les transposons.

L'identification des souches **probiotiques** par les méthodes **de biologie**

moléculaire et leur dépôt dans des bases des données a été **recommandée par la FAO /OMS** (2002).

À la suite de notre étude, trois souches à haut profil probiotique ont été retenues (G6, F12 et B13). Leur identification par le séquençage du gène de l'ADNr 16S a confirmé leur identification préalable par système API CHL comme *L. paracasei* B13, *L. plantarum* F12 et *L. brevis* G6. Elles ont été enregistrées au Centre Wallon de Bio-Industrie (CWBI) et dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès JQ436725 (G6), JQ436724 (B13) et JQ436723 (F12).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les lactobacilles isolés chez l'Homme, pourraient être, par excellence, de bons candidats probiotiques par considération qu'ils sont des composants normaux et bénéfiques du microbiote intestinal humain et en vue de leur longue histoire d'utilisation comme microorganismes « surs » dans l'industrie alimentaire.

L'objectif principal de cette étude était d'isoler des souches de lactobacilles à caractères probiotiques, à partir de selles d'enfants Algériens, dans une perspective de leur utilisation pour la prévention et le contrôle des diarrhées infectieuses infantiles qui restent toujours l'une des premières causes de mortalités chez l'enfant en Algérie.

Cette recherche s'est intéressée principalement à l'étude de la résistance, des souches de lactobacilles isolées, aux conditions gastriques et intestinales simulées, à leur adhésion aux cellules épithéliales de la lignée humaine Caco-2 et leur activité antibactérienne contre des germes pathogènes intestinaux. L'aspect sécuritaire des souches probiotiques a été également étudié via leur activité hémolytique et leur résistance aux antibiotiques.

Ainsi, une collection de 52 souches de lactobacilles a été mise en place parmi 120 souches de bactéries lactiques isolées.

Par rapport à l'évaluation de leurs aptitudes probiotiques :

- l'étude de l'habilité à survivre dans des conditions gastriques simulées (action combinée de la pepsine et pH 1,5) a conduit à cinq souches résistantes. Le taux le plus élevé a été observé avec *L. plantarum* F12, suivie par *L. paracasei* B13, *L. fermentum* H2, *L. brevis* G6 et *L. paracasei* sp *paracasei* A20 ;
- l'étude de l'habilité, de ces cinq souches résistantes au jus gastrique simulé, aux conditions mimant l'intestin a conduit à 4 souches présentant une bonne tolérance aux sels biliaires et à la pancréatine. Le plus haut taux de résistance a été observé avec *L. plantarum* F12, suivie par *L. paracasei* B13, *L. brevis* G6 et enfin *L. paracasei* sp *paracasei* A20 ;

-
- l'étude de l'adhésion aux cellules Caco-2 des souches résistantes aux conditions gastro-intestinales simulées a permis de sélectionner 3 d'entre elles exhibant une bonne adhérence. Il s'agit de : *L. paracasei* B13, *L. brevis* G6, et en particulier, la souche *L. plantarum* F12 qui a manifesté le taux le plus fort d'adhérence ;
 - par ailleurs, l'étude de leur activité antibactérienne a montré un profil d'inhibition intéressant pour toutes les souches, contre les bactéries pathogènes testées.

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

L'évaluation des aptitudes probiotiques a conduit donc à une sélection de trois souches de lactobacilles à haut profil probiotique via l'ensemble des critères testés. En outre, leur aspect sécuritaire semble intéressant. Leur identification, comme recommandé pour les nouvelles souches probiotiques, a été confirmée par le séquençage du gène ADNr 16S. Il s'agit de : *L. paracasei* B13, *L. brevis* G6 et *L. plantarum* F12. Ces souches ont été déposées à la GenBank.

Pour conclure, notre travail nous a permis de sélectionner trois souches à fort potentiel probiotique et un profil sécuritaire présumé intéressant. D'autre part, cette étude contribue par l'apport de certaines connaissances sur les probiotiques chez l'Homme ; un sujet qui reste mal connu, chez nous, aussi bien par le consommateur que par le comité scientifique et les professionnels de santé.

Cette recherche s'inscrit dans une perspective d'une future utilisation des souches probiotiques sélectionnées dans le contrôle des diarrhées infectieuses infantiles, par conséquent d'autres études sont nécessaires pour justifier leur emploi en tant que telles. Ces études doivent être axées sur :

- l'étude de leurs mécanismes d'action ;
- la confirmation de leur profil de résistance aux antibiotiques ;
- l'évaluation de leurs aptitudes technologiques ;

-
- l'étude de leur pouvoir antimicrobien afin de prouver leur efficacité par des études cliniques, *in vivo*, qui ne peuvent être réalisées que par l'implication des professionnels de la santé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams MR, Moss MO (2000). Food Microbiology. Second Edition, The Royal Society of Biochemistry éd. Cambridge. UK. pp. 318-323.

Aguirre M, Collins MD (1993). Lactic acid bacteria and Human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* 75:95–107.

Aiba Y, Suzuki N, Kabir AM, Takagi A, Koga Y (1998). Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.* 93 : 2097-2101.

Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 2001-2005.

Ammor MS, Florez AB, Mayo B (2007). Antibiotic resistance in non enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food. Microbiol.* 24(6): 559-570.

Ammor MS, Flórez AB, van Hoek AHAM, de los Reyes-Gavilán CG, Aarts HJM, Margolles A, Mayo B (2008). Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. MoL. Microbio. Biotechnol.* 14: 6–15.

Antikainen J, Anton L, Sillanpaa J, Korhonen TK (2002). Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Mol. Microbiol.* 46:381-94.

Barinov A, Bolotin A, Langella P, Maguin E, Van De Guchte (2011). Genomics of the genus *Lactobacillus*. In « Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research » Sonomoto and Yokota/ Caister Academic Press éd. Norfolk. United kingdom. pp. 3-32.

Begely M, Hill C, Gahan CGM (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Apl. Env. Microbiol.* 72(3):1729-1738.

Bell LN (2001). Stability testing of nutraceuticals and functional foods. In « Handbook of

nutraceuticals and functional foods ». R.E.C Wildman éd. CRC Press. New York. pp 501-516.

Bernaola Aponte G, Bada Mancilla CA, Carreazo NY, Rojas Galarza RA (2010). Probiotics for treating persistent diarrhoea in children (Review). *Cochrane Database. Syst. Rev. Nov* 10;(11):CD007401. doi: 10.1002/14651858.CD007401.

Bernet MF., Brassart D, Neeser JF, Servin A (1993). Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of 118 enteropathogen-cell interactions. *Ap. Env. Microbiol.* 59:4121-4128.

Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, Valtonen V (2003). Safety of Probiotics That Contain Lactobacilli or Bifidobacteria. *Clin. Inf. Dis.* 36:775–780

Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (2009). Family *Enterobacteriaceae*. In « *Bergey's manual of systematic bacteriology–The Proteobacteria, Part B The Gammaproteobacteria* » Vol 2. Springer éd., New York. pp.587-848.

Brzin B (1972). Alpha-hemolytic vaginal lactobacilli. *Experientia.* 28(9):1121-1127.

Campana R, Federici S, Ciandrini E, Baffone W (2012). Antagonistic Activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the Growth and Adhesion/Invasion Characteristics of Human *Campylobacter jejuni*. *Curr. Microbiol.* 64: 371–378.

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food. Prot.* 61: 1636–1643.

CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute (2007). Performance Standards for Antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth Informational Supplement / M100- S17. 27(1): 1-177.

Coconnier MH, Klaenhammer TR, Kerneis S, Bernet MF, Servin AL (1992). Protein mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 :2034-2039.

Coconnier MH, Brenet M, Kernéis S, Chauvière G, Fourniat J, et Servin AL (1993).

Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decrease bacterial invasion. *FEMS. Microbiol. Lett.* 110:299-306.

Collado MC, Gueimonde M, Hernandez M, Sanz Y, Salminen S (2005). Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and its role in enteropathogen exclusion. *J. Food. Prot.* 68: 2672-2678.

Condon S (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS. Microbiol. Lett.* 46:269-280.

Coppola R, Succi M, Tremonte P, Reale A, Salzano G, Sorrentino Z (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmegiano Reggiano cheese. *Lait.* 85 :193–204.

Corrieu G, Luquet FM (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In: « Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments ». TEC&DOC/ Lavoisier éd. Paris. France. pp 19-106.

D'Aimmo MR, Modesto M, Biavati B (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *Int. J. Food. Microbiol.* 115: 35-42.

Danielsen M, Wind A (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. To antimicrobial agents. *Inter. J. Food. Microbiol.* 82(1):1-11.

Darbro BW, Petroelje BK, Doern JV (2009). *Lactobacillus delbrueckii* as the Cause of Urinary Tract Infection. *J. Clin. Microbiol.* 47:1 275-1277

Dellaglio F, Felis, GE (2005). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. In : « Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects». Caister Academic Press éd. Norfolk, UK. pp. 25-49

De Man, JC, Rogosa M, Sharpe, ME (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. App. Bacteriol.* 23 (1): 130-135.

De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH,

Whitmanet WB (2009). Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In : « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Springer éd., New York. pp.19-511.

Dortu C, Thonart P (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *B. A. S. E.* 3(1): 143-154.

Draser BS, Shiner M, McLeod GM (1969). Studies on the intestinal flora.I.The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons. *Gastroenterology.* 56:71–79.

Ducluzeau R, Raibaud P. Écologie microbienne du tube digestif : ces microbes qui nous protègent. Masson éd., Paris. France. pp. 1979-1995

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

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005). Diversity of the human microbial flora. *Science.* 308:1635-1638.

Elisha BG, Courvalin P (1995). Analysis of genes encoding D-alanine, D-alanine ligase related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp. *Gene.* 152 :79–83.

Elkins CA, Mullis LB (2004). Bile-mediated aminoglycoside sensibility in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 :7200–7209.

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

FAO/OMS (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and

Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). *Working Group Report*. London, Ontario, Canada.

Fedorak RN, Madsen KL (2004). Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 20:146–55.

Fogh J, Fogh, JM, Orfeo T (1977). One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer. Inst.* 59: 221–226.

Fooks LJ, Gibson GR (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *Br. J. Nutr.* 88: 39-49.

Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.* 152:167-173.

Foster JW, Hall HK (1991). Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173 : 5129-5135.

Fredereghi M (2005). Les bactéries lactiques. *In* : « Bactériologie alimentaire, Compendium d'hygiène des aliments ». Lavoisier éd., Paris.France. pp. 101-130.

Fuller R (1991). Probiotics in human medicine. *Gut.* 32: 439-442.

Gardiner G, O’Sullivan E, Kelly J, Auty MAE, Fitzgerald GF, Collins JK, Ross RP, Stanton C (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salvarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2605-2616.

Gasser F (1994). Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur.* 92:45–67.

Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus DR20* and *Bifidobacterium lactis DR10* strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. Food. Microbiol.* 67(3): 207-216.

Gueimonde M, Jalonen L, He F, Hiramatsu M, Salminen S (2006). Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food. Res. Int.* 39:467-471.

Guiraud JP (1998). Techniques d'analyse microbiologique. In: « Microbiologie alimentaire ». Dunod éd., Paris. France. pp. 171-246.

Guo XH, Kim JM, Nam HM, Park SY, Kim JM (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe.* 16:321–326.

Gupta PK, Mital BK, Gupta RS (1995). Antibiotic sensitivity pattern of various *Lactobacillus acidophilus* strains. *Indian. J. Exp. Biol.* 33:620–631.

Haller D, Colbus H, Ganzle MG, Scherenbacher P, Bode C, Hammes WP (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: A comparative *in vitro* study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 24:218-226.

Hamon E, Horvatovich P, Izquierdo E, Bringel F, Marchioni E, Aoude-Werner D, Ennahar S (2011). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC. Microbiol.* 11(63): 191-201.

Hansen EB (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food. Microbiol.* 78 :119–131.

Havenaar, R, Ten Brink B, Huisin't Veld JHJ. (1992). Selection of strains for Probiotic use. In: « *Probiotics. The Scientific Basis* ». Chapman & Hall éd., London.UK. pp. 209–221.

Hechard Y, Dherbomez M, Cenatiempo Y, Lettlier F (1990). Antagonism of lactic acid bacteria from goats' milk against pathogenic strains assessed by the 'sandwich method'. *Lett. Appl. Microbiol.* 11: 185–188.

Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, Rogers TR, Want S, Rajkumar C, Bulpitt CJ (2007). Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with

antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *B.M.J.* 335:80-83.

Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huisin't Veld JHJ (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food. Microbiol.* 41: 85–101.

Holzapfel WH (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food. Microbiol.* 75: 197– 212.

Hsieh MH, Versalovic J (2008). The Human Microbiome and Probiotics: Implications for Pediatrics. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health. Care.* 38:309-327.

Huang Y, Adams MC (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* 91: 253–260.

Hummel AS, Hertel C, Holzapfel WH, Franz CM (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(3): 730-739.

Hütt P, Shchepetova J, Loivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar (2006). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *J. Appl. Microbiol.* 100: 1324-1332.

Hynonen, U, Westerlund-Wikstrom B, Palva A, Korhonen TK (2002). Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* 184:3360-3367.

Ishibashi N, Yamazaki S (2001). Probiotics and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl): 465-470.

Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18:299-313.

Jay JM (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:525-532.

Jose M, Saavedra MD (2007). Use of probiotics in paediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutr. Clin. Pract.* 22: 351–365.

Kacem M, Karam NE (2006). In vitro preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. *Int. J. Probiotics. Prebiotics.* 1(1): 27-32.

Katla AK, Kruse H, Johnsen G, Herikstad H (2001). Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Inter. J. Food. Microbiol.* 67(1-2): 147-152.

Kaur IP, Chopra K, Saini A (2002). Probiotics, potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15:1–9.

Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture.* 274: 1–14.

Khalil R, Mahrous H, El-Halafawy K, Kamaly K, Frank J, El Soda M (2007). Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. *Afr. J. Biotechnol.* 6(7): 939-949.

Kim Y, Kim SH, Whang KY, Kim YJ, Oh S (2008). Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18 :1278-1285.

Kim Y, Oh S, Park S, Kim SH (2009) Interactive transcriptome analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 and intestinal epithelial HT-29 cells after bacterial attachment. *Int. J. Food. Microbiol.* 131: 224-232.

Kim YS, Ho SB (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12: 319-330.

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

Klaenhammer TR (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70(3): 337-349.

Klaenhammer TR (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* 12(1-3): 39-85.

Klayraung S, Okonogi S (2009). Antimicrobial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of *Lactobacillus fermentum* isolated from maing. *B. J. M.* 40: 757-766.

Kochan P, Chmielarczyk A, Szymaniak L, Brykczynski M, Galant K, Zych A, Pakosz K, Giedrys-Kalemba S, Lenouvel E, Heczko PB (2011). *Lactobacillus rhamnosus* administration causes sepsis in a cardiosurgical patient--is the time right to revise probiotic safety guidelines. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:1589-1592.

Köll P, R. Mandar R, H. Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarstrom L (2008). Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol. Immunol.* 23: 139-147

Köll P, Mandar R, Smidt I, Hutt P, Truusalu K, Mikelsaar RH, Shchepetova J, Krogh-Andersen K, Marcotte H, Hammarstrom L, Mikelsaar M (2010). Screening and Evaluation of Human Intestinal Lactobacilli for the Development of Novel Gastrointestinal Probiotics. *Curr. Microbiol.* 61(6): 560-566.

Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 6955-6959.

Lankaputhra EV, Shah NP (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy. Prod. J.* 30: 2-7.

Lavermicocca P, Valerio F, Lonigro SL, Di Leo A, Visconti A (2008). Antagonistic activity of potential probiotic lactobacilli against the ureolytic pathogen *Yersinia enterocolitica*. *Curr. Microbiol.* 56: 175-181.

Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:171-184.

Lee YK, Puong KY, Ouwehand AC, Salminen S (2003). Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J. Med. Microbiol.* 52: 925-930.

Lee YK, Mazmanian SK (2010). Has the microbiota played a critical role in the evolution

of the adaptive immune system? *Science*. 330: 1768-1773.

Lemberg DA, Ooi CY, Day AS (2007). Probiotics in paediatric gastrointestinal diseases. *J. Paediatr. Child. Health*. 43: 331–336.

Leroy F, De Vuyst L (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends. Food. Sci Technol*. 15: 67–78.

Liévin-Le Moal V, Servin (2006). The front line of enteric host defence against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucin, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(2): 315-337.

Lim EM, Ehrlich SD, Maguin E (2000). Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Electrophoresis*. 21 :2557-2561.

Lorca GL, Font de Valdez G, Ljungh A (2002). Characterization of the protein-synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 4: 525-532.

Luquet FM ; Correiu G (2005). Bactériocines de Bactéries lactiques. *In: « Bactéries lactique et probiotiques »*. TEC 1 DOC éd., Paris. France. pp. 113-194.

Mack DR, Michail S, Wei S, Mcdougall L, Hollingsworth MA (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adhérence in vitro inducing intestinal mucin gène expression. *A. J. Physiol*. 276: 941-950.

Mack DR, Lebel S (2003). Rôle of probiotics in the modulation of intestinal infections and inflammation. *Cur. Opi. Gastroenterol*. 20: 22-26.

Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr*. 69: 1035-1045.

Madigan M, Martinko J (2007). *Biologie des micro-organismes*. 11ème edition. Pearson éd., France. pp. 1-1047.

Madsen, K., A. Cornish, P. Soper, C. McKaigney, H. Jijon, C. Yachimec, J. Doyle, L. Jewell, and C. De Simone (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal

epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 121:580-591.

Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy. J.* 16: 189-199.

Marraffini LA, Dedent AC, Schneewind O (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 192-221.

Mathur S, Singh R (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *Int. J. Food. Microbiol.* 105: 281–295.

Matilla-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *Inter. Dairy. J.* 12 :173-182.

Mattar AF, Teitelbaum DH, Drongowski RA, Yongyi F, Harmon CM, Coran AG (2002). Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cellculture model. *Ped. Surg. Int.* 18: 586-590.

Michail S, Sylvester F, Fuchs G, Issenman R (2006). Clinical efficacy of probiotics: review of the evidence with focus on children. NASPGHAN Nutrition Report Committee. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 43: 550-557.

Mombelli B, Gismondo MR (2000). The use of probiotics in medical practice. *Inter. J. Antimicrobiol. Agents.* 16: 531–536.

Myers D (2007). Probiotics : Therapeutic Review. *J. Exot. Pet. Med.* 16 (3): 195-197.

Nagpal R, Kumar A, Kumar M, Behare PV, Jain S, Yadav H (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *Fems. Microbiol. Lett.* 334(1): 1-15.

Nanatani K, Abe K (2011). Energy generation coupled with decarboxylation reaction in lactic acid bacteria. In « *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research* » Sonomoto and Yokota/ Caister Academic Press éd., Norfolk. United kingdom. pp. 67-88

Nomoto K (2005). Review prevention of infections by probiotics. *J. Biosci. Bioeng.* 100: 583–59.

Oelschlaeger TA (2010). Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int. J. Med. Microbiol.* 300: 57-62.

Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Takahashi M, Watanuki M, Tanaka R, Tanaka T, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda Y (2001). Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infect. Immun.* 69: 1101-1108.

O’Hara AM, Shanahan F (2007). Gut microbiota: mining for therapeutic potential. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5:274-284.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé (2013). Les maladies diarrhéiques. Aide-mémoire n°330. Site internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/fr/>.

Otero MC, Nader-Macias ME (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Anim. Reprod. Sci* 96: 35-46.

Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Ant. Van. Leeuw.* 82: 279–289.

Ouwehand AC, Saxelin M, Salminen S (2004). Phenotypic Differences between Commercial *Lactobacillus rhamnosus* GG and *L. rhamnosus* Strains Recovered from Blood. *Clin. Inf. Dis.* 39: 1858–1860.

Ozgun D, Vural HC (2011). Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *J.M.G.G.* 3(3): 46-49.

Pagnini C, Saeed R, Bamias G, Arseneau KO, Pizarro TT, Cominelli F (2010). Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 107:454-459.

Parasad J, Gill H, Smart J, Gopal PK (1998). Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy. J.* 8: 993-1002.

Parracho H, McCartney AL, Gibson R (2007). Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 66: 405–411.

Patel RM, Lin PW (2010). Developmental biology of gut-probiotic interaction. *Gut. Microbes.* 1:186-195.

Perry JJ, Staley JT, Lory S (2004). Bactéries Gram-Positives: Firmicutes et Actinobacteria. In: « Microbiologie ». Dunod éd., Paris. France. pp. 471-50.

Pfeiler EA, Klaenhammer TR (2009). Role of transporter proteins in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 6013-6016.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 47:323–330.

Poolman B, Molenaar D, Smid EJ, Ubbink T, Abee T, Renault PP, Konings WN (1991). Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J. Bacteriol.* 173: 6030-6037.

Preidis GA, Hill C, Guerrant RL, Ramakrishna BS, Tannock GW, Versalovic J

(2011). Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health. *Gastroenterology*. 140: 8-14.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA (2003). Les bactéries: les Gram positif pauvre en GC. In : « Microbiologie ». 2^{ème} édition Française. Paris, pp. 529-572.

Pridmore RD, B. Berger, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, Pittet AC, Zwahlen MC, Rouvet M, Altermann E, Barrangou R, Mollet B, Mercenier A, Klaenhammer T, Arigoni F, Schell MA (2004). The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 2512-2517.

Pridmore RD, Pittet AC, Praplan F, Cavadini C (2008). Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity. *FEMS. Microbiol. Lett.* 283: 210-215.

Quigley EMM (2011). Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Cur. Opi. Pharm.* 11:593–603.

Rammelsberg M, Muller E, Rader F (1990). Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Arc. Microbiol.* 154(3): 249-252.

Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK (2003). Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clin. Micro. Rev.* 16(4): 658–672.

Ren D, Li C, Qin Y, Yin R, Li X, Tian M. Du S. Guo H. Liu C. Zhu N. Sun D. Li Y. Jin N(2012). Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to Caco-2 cells by lactobacilli and cell surface properties that influence attachment. *Anaerobe.* 18: 508-515.

Reuter G (2001). The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Microflora of the Human intestine: Composition and Succession. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* 2(2): 43-53.

Rishi P, Preet S, Kaur P (2011). Effect of *L. plantarum* cell-free extract and co-

trimoxazole against *Salmonella Typhimurium*: a possible adjunct therapy. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 10:9. <http://www.ann-clinmicrob.com/content/10/1/9>.

Roger LC, McCartney (2005). Prebiotics and the infant microbiota. *In*: « Probiotics and prebiotics, scientific aspects ». Caister. Academic Press éd., Wymondham. pp.196 -211.

Roissart H, Luquet FM (1994). Méthodes d'Identification des Bactéries Lactiques. *In* : « Bactéries Lactiques ; Aspects fondamentaux et technologiques ». Vol 2. Coquand éd., Grenoble. France. pp. 141-167.

Roos S, Jonsson H (2002). A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*. 148: 433-442.

Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jakobsen M, Larsen CN, Moller PL, Pedersen P, Tvede M, Weyrehter H, Valerius NH, Paerregaard A (2002). Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21: 411-416.

Rosslund E, Langsrud T, Granum PE, Sorhaug T (2005). Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *Int. J. Food. Microbiol.* 98(2): 193-200.

Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84: 197–215.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA(1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239: 487-491.

Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T (1998). Demonstration of safety of probiotics - A review. *Int. J. Food. Microbiol.* 44(1-2): 93-106.

Salyers AA, Gupta A, Wang Y (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotics genes. *Trends. Microbiol.* 12:412-416.

Sami M, Yamashita H, Hirono T, Kadokura H, Kitamoto K, Yoda K, Yamasaki M (1997). Hop-resistant *Lactobacillus brevis* contains a novel plasmid harboring a multidrug resistance-like gene. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 1-6.

Sanders ME (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr.* 130(Suppl): 384-390.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.

Servin AL, Coconnier MH (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17(5): 741-754.

Servin AL (2004). Antagonistic activity of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS. Microbiol. Rev.* 28: 405-440.

Shanahan F (2011). Molecular mechanisms of probiotic action: it's all in the strains! *Gut.* 60:1026-1027.

Siuta-Cruce P, Goulet J (2001). Improving probiotic microorganisms in food systems. *Food. Technol.* 55: 36-42.

Standardisation de l'Antibiogramme à l'Echelle Nationale (Médecine Humaine et Vétérinaire) avec collaboration de l'OMS (2011). 6^{ème} Edition. Réseau Algérien de Surveillance des Bactéries aux Antibiotiques. pp. 1-179.

Sugimura Y, Hagi T, Hoshino T (2011). Correlation between in vitro mucus adhesion and the in vivo colonization ability of lactic acid bacteria: screening of new candidate carp probiotics. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75(3): 511-515.

Sutra L, Federighi M, Jouve JL (1998). Bactéries lactiques. In: « *Manuel de*

bactériologie alimentaire ». Polytechnica éd., Paris. France. pp. 235-260.

Szajewska H, Skórka A, Ruszczyński M, Gieruszczak-Bialek D (2007). Meta-analysis: *Lactobacillus* GG for treating acute diarrhoea in children. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 25: 871–881.

Tailliez P (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitat, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques.* 6(1): 35-41.

Tannock GW, Fuller R, Smith SL, Hall MA (1990). Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1225-1228.

Tannock GW(2003). Probiotics: Time for a Dose of Realism. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* 4: 33-42.

Tejero-Sarinena S, Barlow SJ, Costabile A, Gibson GR, Rowland I (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe.* 18(5): 530-538.

Temmerman R, Pot B, Huys G, Swings J (2002). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food. Microbiol.* 81:1-10.

Tham CSC, Peh KK, Bhat R, Liong MT (2011). Probiotic properties of bifidobacteria and lactobacilli isolated from local dairy products. *Ann. Microbiol.* 62(3): 1079-1087.

Thornton GM (1996). Probiotic bacteria. Selection of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from the healthy human gastrointestinal tract; characterization of a novel *Lactobacillus*-derived antibacterial protein. PhD thesis. National University of Ireland, Cork, Ireland.

Todorov SD, Dicks LMT (2005). Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic. Microbiol.* 45: 312-322.

Tong JL, Ran ZH, Shen J, Zhang CX, Xiao SD (2007). Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during

Helicobacter pylori eradication therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 25: 155–168.

Ton-That H, Marraffini LA, Schneewind O (2004). Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694: 269-278.

Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *D. D. T.* 8(15): 692-700.

Tuomola EM, Salminen SJ (1998). Adhesion of some probiotics and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food. Microbiol.* 41: 45-51.

UNICEF/OMS: United Nations Children’s Fund/ Organisation Mondiale de la Santé (2009). Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. *Lancet.* 14: 1-2

Vamanu E, Vamanu A (2010). Viability of the *Lactobacillus rhamnosus* IL1 strain in simulated gastrointestinal conditions. *Int. J. Pharmacol.* 6: 732-737.

Vamanu E, Vamanu A, Nita S, Rusu N (2011). The viability of the *Lactobacillus paracasei* IL2 and *Lactobacillus plantarum* IL3 strains in simulated gastrointestinal conditions. *A. J. M. R.* 5(9): 1029-1036.

Van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Ant. Van. Lee.* 82: 187-216.

Vasiljevic T, Shah NP (2008). Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy. J.* 18: 714–728.

Vaughan EE, Mollet B, Devos WM (1999). Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Cur. Opin. Biotechnol.* 10: 505-510.

Velez MP, De Keersmaecker SC, Vanderleyden J (2007). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS. Microbiol. Lett.* 276: 140-148.

Ventura M, Elli M, Reniero R, Zink R (2001). Molecular microbial analysis of *bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS. Microbiol. Ecol.* 36: 113–121.

Verdenelli MC, Guelfi F, Silvi S, Orpianisi C, Cecchini C, Cresci A (2009). Probiotic

properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *Eur. J. Nut.* 48(6): 355-363.

Vesterlund S, Paltta J, Karp M, Ouwehand AC (2005). Measurement of bacterial adhesion: in vitro evaluation of different methods. *J. Microbiol. Meth.* 60: 225-233.

Walter J (2008). Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4985-4996.

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

Whitehead K, Versalovic J, Roos S, Britton RA (2008). Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC55730. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1812-1819.

Woese CR (1985). Why study evolutionary relationships among bacteria. *In:* « Evolution of procaryotes ». Academic Press éd., London. UK. pp. 1-30.

Woese CR, Fox GE, Zablen L, Uchida T, Bonen L, Pechman K, Lewis BJ, Stahl DA (1985). Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature.* 254: 83-86.

Xiaodong P, Fenqin C, Tianxing W, Honggang T, Zhanyu (2009). The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food. Control.* 20: 598–602.

Site web

www.inra.fr

ANNEXE 1

Coloration de Gram

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;
- Prélever un ose d'une colonie et mélanger avec la goutte d'eau physiologique, strier et fixer à la chaleur par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène ;
- Ajouter le Violet de Gentiane pendant 1mn, jeter le colorant ;
- Ajouter le Lugol pendant 1mn ;
- Décolorer avec de l'alcool pendant 30 secondes ;
- Ajouter le deuxième colorant, la Fushine et laisser 1 mn puis laver à l'eau ;
- Sécher la lame et mettre une goutte d'huile à immersion puis passer à l'observation microscopique au grossissement X100.

ANNEXE 2

Composition des milieux de culture

Milieu MRS (g/l)

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de Levure	5 g
Glucose	20 g
Phosphate dipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Tween 80 (polysorbate 80)	1 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de manganèse	0,1 g
Agar	15 g

pH $5,7 \pm 0,1$. Stérilisation à 120°C

Milieu Gibson Abdelmalek (pour un litre)

Extrait de levure	2,5 g
Glucose	50 g
Jus de tomate	100 g
Lait écrémé	50 ml
Gélose nutritive	200 ml

pH 7.

Gélose Columbia (g/l)

Peptone	23 g
Amidon de maïs	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	10 g
Sang humain	5%
pH 7,3	

Eau peptonée (g/l)

Peptone exempte d'indole	10 g
Chlorure de sodium	5 g
pH 7,2	

Bouillon nutritif (g/l)

Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de sodium	5 g
pH 7	

Gélose Muller - Hinton (pour un litre)

Infusion de viande de bœuf	300 ml
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar	17 g
pH = 7,4	

ANNEXE 3

Composition des tampons

Tampon phosphate pH 7,2

- Phosphate dipotassique 1M : K_2HPO_4 , pm $174g\ mol^{-1}$; peser 87,09g pour 500 ml ;
- Phosphate monopotassique 1M : $KHPO_4$, pm 68,045 ; peser 68,045 g pour 500 ml.

Le tampon phosphate 0,1M pH 7,4 à 25°C est obtenu par mélange de 80,02 ml de phosphate dipotassique et 19,08 ml de phosphate monopotassique.

Tampon Tris Acétate EDTA (TAE)

Pour la préparation d'un litre de solution stock concentrée cinquante fois (50X) de tampon TAE pH 8,0 :

- 242 g Tris Base
- 57,1 mL acide acétique glacial 100 %
- 100 mL EDTA 0,5M
- quantité suffisante pour 1000 ml d'eau distillée (~800mL) et ajuster le pH 8

Tampon Tris Borate EDTA (TBE)

Pour la préparation d'un tampon TBE (1X) pH 8,0:

- 10,78 g (89 mM) TRIS,
- 5,50 g (89 mM) Acide borique,
- 0,58 g (2 mM) EDTA disodium salt ;

Mettre dans une fiole jaugée et mettre la quantité suffisante pour 1000 ml d'eau distillée.
Pour une concentration 10X, multiplier les quantités par 10.

Tampon de la Taq polymérase : KCL-Mg Cl₂ (concentration 10X)

- 100 mM Tris-HCl
 - 500 mM KCl
 - 15 mM MgCl₂
- (pH 8.3 à 20°C)

ANNEXE 5

Séquences des souches de *Lactobacillus*

Séquence de la souche *L. brevis* (G6)

1162 paires de base

TGCCCCCTGTCATTATTTCCCCGGAGGGAACGTCTTATCTGTAAGATTGGCAGA
AGATGTTCGAGACCTGGTAAGGTTCTTCGGGTAGCTTCGAATTAACCACATGC
TCCACCGCTTGGGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTTCG
TACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAA
CCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAAT
CCTGTTTCGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGC
CGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATG
GAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCATGCAGTTTCCGATGCACTT
CTCCGTGTTAAGCCGAAGGCTTCTCACATCAGTACTTAAAAAACCGCACTGCG
CTCCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACTCTACGGTATTGAC
CGCGGCTGCTGGCACGTAGTGTAGCCTGTGGCTTATCTGGTAAATACCGTCGA
CCCTTGAACAGTTACTCTCAAAGGTGTTCTGTCAATCTTAGACAACAGACGTTT
TACGAGCCGAAACCCTTCTTCAGCTCACGCGGCATTGCTCCATCAGACTCGTGT
CGTGCAATGTTGGGTGAAGTCCCGCACGTGCTGCCTCCCGTATGAGTTTGTGGC
CAGTGTCTCAGTTGCCACTGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACCGTAT
GATCGTCTTGGTGGGCCTTTACCTCACCAACTAATAACGCCGCGGGATCAT
CCAGAAGTGATAGCCGAAGCCACCTTTCAAACAAAATCCATGCGGAGTTTTGA
TGTTATACGGTATTAGCACCTGTTGCCAAGTGTTATCCCCTGCTTGTGGGCTGA
CTCCCCACGTGTTGGACTCACTAGTAATCGCCACTCAGCATTTCATCGGTGAAAT
CAGTGCAGGCACGTTCGTACAACGGACGCTCGTTCGACCATGAGAGTGTGTAAC
CCAAAGCCGGCAGATTACCTCCGAGCAAGGTCAACCGTCTAAGGTGGGACAG
ATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAGGGTAGCCGTAAA

Séquence de la souche *L. plantarum* (F12)

1117 paires de base

AAAAGTCTGATGGAGCAACCCCGCGTGAGAAAAAAGGGTTTCGGCTTGTA
AA
ACTCTGTTTTTAAAGAAGAACATATTTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGT
ATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTT
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAAGAAGTGCATCGGAAACT
GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC
TGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCATACCAGTAAACGATGCAATGCTAAGTGTTAGCCGAGGGTTTCCGCCCTTC
AGTGCTGCAGCTAACGCATGTGAACGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGCTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGGTGGTAGCAT
GTGGCTTAATTCGTAAGCTACGCGAAAAACCTTACCAGGTA
CTTGACATACTA
TGCAAATCTAAAAGATTAGACGTTCCCTTGCGGGACATGGATACAGGTGGTGC
ATGGTTGCTCCATCAGCTCGTGTGCAATGTTGGGTTATGTCCCGTAACGAG
TGCCACCCTTATTAGTCAGTGGCCATGATTCAGTTGCCCAATGTGGCCGATTAC
CGTCTCAGGTCGGCTACCTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCCACCATCTA
GCTAATGACGCCGCGGGACACACGTCCAAAAGTGGATAGCCGAAGCCATCTGT
TGCAA
ACTCGGACCATGCGTGTCTAATTTGTTATGCGGTATTATCAGTTCTGT
TTGCAGGCTGTTATCCCCCGCTTCTGAGGTCAGGTTTCCCACGTGGTACTCACC
AGTTCGCCATCTCACTCAA
AAGTAATTCCTGGGGCAAGCACCAATCAATACCA
GATTCGTTCGACTTGCAAGACCAAAGACGCCGCCAGCGTTCTTCCGGAGCAGG

Séquence de la souche *L. paracasei* (B13)

1460 paires de base

TTGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACAT
GCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCTACAT
GGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCTTAAGTGG
GGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATG
GTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGT
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCCCCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAC
TGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGATTGAGACCCGGCCAAATTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATTTCCCAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCC
GCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATG
GTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAT
TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
TCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGA
GGACAGTGGA ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
ATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAA
TGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGC
ATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC
CTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGG
GGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTT
GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGT
TGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATG
GTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTC
AGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
CGCGAATCAGCACGCCGCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
CGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCGAAGCC.

Nom : BAHRI
Prénom : Fathia
Doctorat en sciences : option microbiologie

Isolement et caractérisation des souches de lactobacilles à caractères probiotiques à partir de selles d'enfants

Résumé

Au cours de cette étude, 120 souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir de selles d'enfants Algériens. Leur identification phénotypique, selon le profil morphologique et biochimique, a conduit à 52 souches appartenant au genre *Lactobacillus*. L'identification par API CH 50 a abouti à différentes espèces réparties comme suit : *L. fermentum* (10 souches) *L. casei* (8 souches) *L. gasseri* (8 souches), *L. salivarius* (5 souches), *L. plantarum* (5 souches), *L. vaginalis* (4 souches), *L. paracasei* sp (4 souches), *L. brevis* (2 souches), *L. reuteri* (2 souches), *L. acidophilus* (2 souches) et *L. ruminis* (2 souches). Le pouvoir probiotique des souches de lactobacilles a été examiné, *in vitro*, afin d'évaluer leur intérêt pour une éventuelle utilisation dans les diarrhées infectieuses infantiles. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à l'étude de leur habilité à survivre dans les conditions gastriques et intestinales simulées, leur adhérence aux cellules de lignée humaine Caco-2 et leur activité antibactérienne contre un groupe d'entéropathogènes. Leur aspect sécuritaire a été, également, examiné par l'activité hémolytique et la résistance aux antibiotiques. À la fin, trois souches, à haut profil probiotique, caractérisées par une forte activité antibactérienne, ont été sélectionnées. En outre, l'étude de leur aspect sécuritaire a révélé qu'elles étaient non hémolytiques et dépourvues de résistance acquise vis-à-vis des antibiotiques testés ; ce qui renforce leur choix en tant que probiotiques « surs » pour une éventuelle utilisation dans la lutte et le contrôle des diarrhées infectieuses infantiles. Leur identification a été confirmée par le séquençage du gène ADN_r 16S. Il s'agit de : *L. paracasei* (B13), *L. brevis* (G6) et *L. plantarum* (F12), elles ont été déposées à la GenBank.

Mots clés : Probiotiques, *Lactobacillus*, Critères de sélection, Diarrhées infantiles.

Nom : BAHRI

Prénom : Fathia

Doctorat en sciences : option microbiologie

Isolation and Characterization of lactobacilli strains from Algerian children faeces for their probiotic properties

ABSTRACT

In this study, 120 strains of lactic acid bacteria were isolated from Algerian children faeces. The phenotypic identification by morphological and biochemical tests showed that fifty two strains belonged to the genus *Lactobacillus*. The identification by API 50 CH led to different species as : *L. fermentum* (10 strains), *L. casei* (8 strains), *L. gasseri* (8 strains), *L. salivarius* (5 strains), *L. plantarum* (5 strains), *L. vaginalis* (4 strains), *L. paracasei* sp (4 strains), *L. brevis* (2 strains), *L. reuteri* (2 strains), *L. acidophilus* (2 strains) et *L. ruminis* (2 strains). The probiotic profile of lactobacilli strains was examined, *in vitro*, in a purpose of possible use in children infectious diarrhoea. To do this, we were interested to evaluate their ability to survive in gastric and intestinal simulated conditions, the adherence to human epithelial cells Caco-2 and the antibacterial activity against a range of enteropathogenic bacteria. Their safety aspect was also examined by hemolytic activity and antibiotic resistance. At the end three strains, with high probiotic profile characterized by a strong antibacterial activity, were selected. In addition, the study of their security aspect revealed that were non hemolytic and free of acquired resistance against tested antibiotics which reinforces their choice as "safe" probiotics for possible use in the fight and control of children infectious diarrhea. The identification of screened probiotic bacteria was confirmed by DNAr 16S sequencing as *L. paracasei* (B13), *L. brevis* (G6) and *L. plantarum* (F12). They were deposited in the GenBank.

Key words: Probiotics, *Lactobacillus*, Selection criteria, Infant diarrhoea.

الاسم : فتحية

اللقب : بحري

عزل و تشخيص سلالات اللاكتوباسيلوس ذات خصائص بروبيوتيكية من براز أطفال جزائريين

ملخص

من خلال هذه الدراسة لقد تم عزل 120 بكتيريا لبنية من براز أطفال جزائريين ، 52 منها كانت من جنس *Lactobacillus* بعد التعرف عليها وفقا للمعيار المورفولوجي والبيوكيميائي. لقد تم التعرف بواسطة API CH50 على عدة أنواع تتوزع كالتالي :

(10) *L. fermentum*, (8) *L. casei*, (8) *L. gasseri*, (5) *L. salivarius*, (5) *L. plantarum*, (4) *L. vaginalis*, (4) *L. paracasei* sp), (2) *L. brevis*, (2) *L. reuteri*, (2) *L. acidophilus*, (2) *L. ruminis*.

وقد تم تقييم قدراتها البروبيوتيكية من خلال دراسة مقاومتها للظروف المحاكية للمعدة والأمعاء و الالتصاق بالخلايا الظهارية البشرية Caco-2 و نشاطها المضاد للميكروبات وذلك من اجل استعمالها في التحكم و مقاومة الإسهال المعدي عند الأطفال.

في النهاية، تم اختيار ثلاث سلالات ذات طابع بروبيوتيك هام بالإضافة إلى ذلك كشفت الدراسة على أنها آمنة وليست محللة للكريات الحمراء وخالية من المقاومة المكتسبة للمضادات الحيوية التي تم اختبارها. لقد تم التأكد من هويتها بواسطة تسلسل القواعد لجين DNAr 16S و يتعلق الامر ب *L. casei* B13, *L. plantrum* F12, *L. brevis* G6 لقد تم وضعها في بنك الجينات

الكلمات المفتاحية: البروبيوتيك ، *Lactobacillus*، معايير الاختيار، الإسهال لدى الأطفال