

UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à
l'Environnement « LAMAABE »

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par :

BENHELLI Nour El Houda & HAMIDI Amal Bochra

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie Fondamentale

Thème

***Evaluation de l'activité antibactérienne de Lactobacillus sp.
isolées de la matière fécale des nouveau-nés vis-à-vis des souches
pathogènes gastro-intestinales***

Soutenu le **20/06/2024** devant le jury composé de :

Président	BELYAGOUBI Larbi	Pr	Univ. de Tlemcen
Examineur	LEMIRINI Wafaa	MCA	Univ. de Tlemcen
Encadrant	MEZIANI Zahira	MAB	Univ. de Tlemcen

Année Universitaire : 2023-2024

Remerciements

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail de fin d'études.

Tout d'abord, nous remercions **DIEU** Tout-Puissant pour nous avoir accordée la force et la patience nécessaires pour mener à bien ce mémoire.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements à notre encadrante, **Mme MEZIANI Zahira**, pour sa guidance précieuse, ses conseils avisés et son soutien constant tout au long de cette étude.

Nous souhaitons également exprimer notre gratitude aux membres du jury **Mme LEMRINI Wafaa** et **Mr BELYAGOUBI Larbi** pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour leurs commentaires constructifs qui nous ont permis d'améliorer sa qualité.

Nos remerciements vont également au laboratoire **LAMAABE** de l'université **Abou bekr - Belkaid** pour avoir mis à disposition les ressources nécessaires à la réalisation de nos recherches.

Nous n'oublions pas de remercier **Mr ZOUARI Mohammed**, **Mme NAS Fatima**, **Mme M'HAMED I Imen**, et le doctorant **BOUSSHABA Sofiane** pour leur aide précieuse, pour nous avoir fourni les produits nécessaires pour notre travail, ainsi que pour leur soutien continu et leurs conseils avisés.

Enfin, nous souhaitons remercier chaleureusement tous nos collègues du laboratoire pour leur soutien, leur camaraderie et les nombreux échanges enrichissants que nous avons partagés.

Merci à tous.

Dédicace

À mon cher père, pour ton soutien inébranlable et tes sacrifices remarquables. Chaque moment passé à m'attendre dans ta voiture pendant que je suivais mes cours témoigne de ton soutien inconditionnel et de ta confiance en mes capacités. Cher papa, grâce à toi, j'ai pu surmonter les défis et réaliser mes rêves, qu'ils soient académiques ou personnels.

À ma chère maman, pour ton amour infini, tes encouragements constants et tes sacrifices silencieux. Ta présence bienveillante a été ma source de réconfort et de force à chaque étape de ma vie. Grâce à toi, j'ai trouvé le courage de relever les défis et d'embrasser les opportunités qui se sont présentées à moi, dans toutes les dimensions de mon existence.

À mes deux sœurs, Ikram et Samira, pour votre soutien constant et votre amour inconditionnel.

À ma famille, surtout à ma grand-mère Benhelli Zahra et à ma cousine Zineb.

À mes amis, en particulier mes meilleures amies Amel, Chorouk et Imen. Votre amour et votre présence ont enrichi ma vie d'une manière indescriptible.

Enfin, à moi-même, pour avoir cru en mes capacités, pour avoir surmonté tous les obstacles avec persévérance et pour avoir travaillé avec acharnement pour atteindre mes objectifs.

Nour el houda...

Dédicace

À Mon Cher Grand-père et à Ma Maman,

Votre soutien indéfectible et votre amour infini ont été les phares qui ont guidé mon parcours académique.

Grand-père, votre sagesse et vos encouragements ont façonné ma voie, tandis que Maman, Vos sacrifices incessants et vos encouragements ont alimenté ma détermination. Avec une gratitude profonde, je dédie mes réalisations à vous deux, sachant que votre amour a été la pierre angulaire de mon succès. Merci de croire en moi, même lorsque je doutais de moi-même.

A mes chères amies Houda, Chourouk et Imen grâce à vous mon parcours était plein d'amour, soutien et d'ambition

Enfin, à la petite fille qui a toujours aspiré à faire une différence dans le monde et à laisser sa marque, et qui a finalement réussi.

Amel

Liste des figures

Figure 1: Colonisation naturelle de l'intestin d'un nouveau-né au cours des dix premiers jours de vie.....	12
Figure 2: Pourcentages d'isolement des <i>Lactobacillus</i> en fonction de l'âge	13
Figure 3: Pourcentages des différentes espèces isolées de lactobacilles à partir de la matière fécale des nourrissons	14
Figure 4 : Contraste de phase (A–E) et d'électron (F) illustrant les différentes morphologies cellulaires des <i>Lactobacillus</i> . A, <i>Lactobacillus gasseri</i> ; B, <i>Lactobacillus agilis</i> ; C, <i>Lactobacillus curvartus</i> ; D, <i>Lactobacillus minor</i> ; E, <i>Lactobacillus fermentum</i> ; et F, involution de <i>Lactobacillus</i> dans une section mince de grain de kéfir.....	17
Figure 5 : Observation de <i>Lactobacillus plantarum</i> avec microscope électronique à balayage (Parlindungan et al., 2018).....	17
Figure 6 : Adhésion des lactobacilles dans l'intestin ; (a) spécifique, (b) non spécifique.....	21
Figure 7 : Mode d'action des acides organiques sur les pathogènes	22
Figure 8 : Mode d'action du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés sur les pathogènes	23
Figure 9 : Mode d'action des bactériocines sur les pathogènes.....	24
Figure 10 : Schéma illustrant la méthode des puits.....	35
Figure 11 : Aspect macroscopique des colonies pures de deux souches de lactobacilles sur milieu MRS.	38
Figure 12 : Observation microscopique des <i>Lactobacillus</i> isolées de la matière fécale du premier nourrisson après coloration de gram (Gx100). a) après 24h d'incubation. b) après enrichissement.....	38
Figure 13 : Observation microscopique des <i>Lactobacillus</i> isolées de la matière fécale du deuxième nourrisson après coloration de gram (Gx100). c) après 24h d'incubation, d) après enrichissement.....	39
Figure 14 : Observation microscopique d'une souche de lactobacilles par MEBE.....	39
Figure 15 : Résultat négative du test catalase.....	40
Figure 16 : Résultat négative du test d'oxydase.....	41
Figure 17 : Résultats du Test TSI pour des Souches de <i>Lactobacillus</i> : Fermentation Acide Totale Indiquée par une coloration jaune uniforme.....	42
Figure 18 : Résultats des zones d'inhibitions de l'activité antibactériennes des lactobacilles vis à vis à des pathogènes gastro-intestinales.....	46
Figure 19 : analyse comparative des résultats des zones d'inhibitions de l'activité antibactériennes des lactobacilles isolées de la matière fécales vis à vis des souches pathogènes.....	47

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des souches pathogènes gastro-intestinale.....	33
Tableau 2 : Caractéristiques cliniques des nourrissons avec la charge des lactobacilles détectés.....	43
Tableau 3 : Résultats des zones d'inhibitions de l'activité antibactériennes des lactobacilles isolées de la matière fécales vis à vis a des souches pathogènes.....	47

Liste des abréviations

- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- **ADNr-16S** : Acide Désoxyribonucléique ribosomal 16S
- **API** : Appareils et Procédés d'Identification
- **BHIB** : Bouillon cœur-cervelle
- **CT** : Toxine cholérique
- **Fe²⁺** : L'ion ferreux
- **G** : Grossissement
- **Glc** : Glucose
- **H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène
- **IgA** : Immunoglobuline A
- **IgG** : Immunoglobuline G
- **Lb** : *Lactobacillus*
- **LPS** : Lipopolysaccharide.
- **LRA ZYM**: Ligand Receptor Capture Zymography
- **Mg²⁺**: Magnesium
- **MH**: Muller Hinton
- **MEBE** : Microscopie électronique à balayage environnemental
- **Mn²⁺** : Manganèse
- **MRS** : Man, Rogosa et Sharpe
- **NaCl** : Chlorure de sodium
- **nm** : Nanomètre
- **O₂⁻** : Anion superoxyde
- **pH** : Potentiel Hydrogène
- **sp.** : Espèce non précisée
- **subsp.** : Sous sous-espèce
- **spp.** : Toutes les espèces d'un genre
- **TCP** : Toxin-coregulated pilus
- **TSI** : Triple Sugar Iron
- **µl** : Microlitre
- **UFC** : Unité Formant Colonies

Table des matières

Liste des figures.....	v
Liste des tableaux	vi
Liste des abréviations	vii
Table des matières	viii
<i>Introduction</i>	1
Partie Bibliographique	5
<i>Chapitre 1 : Exploration du Microbiote intestinal</i>	6
I.1 Microbiote intestinal.....	6
I.1.1 Généralités	6
I.1.2 La flore pathogène	6
I.1.3 Flore commensale.....	9
I.2 Microbiote intestinal néonatal.....	11
I.2.1 Implantation et diversité des souches de <i>Lactobacillus sp.</i> dans le microbiote néonatal.....	12
<i>Chapitre 2 : Exploration des Propriétés Antibactériennes des Lactobacillus sp.</i>	15
II.1 Introduction au genre <i>Lactobacillus</i>	16
II.1.1 Taxonomie.....	16
II.1.2 Caractères morphologiques	16
II.1.3 Caractères biochimiques	17
II.1.4 Caractères culturels et exigences nutritionnelles.....	18
II.1.5 Identification	19
II.2 Propriétés Antibactériennes des <i>Lactobacillus sp.</i>	20
II.2.1 Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion	20
II.2.2 Production de substances antibactériennes.....	21
II.2.3 Concurrence pour l'utilisation des nutriments	25
II.2.4 Stimulation des mécanismes de défense immunitaire.....	25
Partie expérimentale	26
<i>Chapitre 3 : Matériel et méthodes</i>	27

III.1	Matériel.....	28
III.1.1	Matériel biologique.....	28
III.1.2	Milieux de cultures	28
III.1.3	Appareillage	28
III.1.4	Réactifs, colorants et autres	29
III.2	Méthodes.....	30
III.2.1	Échantillonnage et isolement.....	30
III.2.2	Purification	30
III.2.3	Identification des lactobacilles	31
III.2.4	Conservation.....	33
III.2.5	Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	33
<i>Chapitre 4 :</i>		36
<i>Résultats et discussion</i>		36
IV.1	Échantillonnage et isolement	37
IV.2	Purification des lactobacilles.....	37
IV.3	Identification des lactobacilles	37
IV.3.1	Caractérisation phénotypique	37
IV.3.2	Caractérisation biochimique et physiologique.....	40
IV.4	Fréquence des lactobacilles dans les selles des nourrissons	42
IV.5	Activité antibactérienne des lactobacilles	46
<i>Conclusion et perspectives</i>		52
<i>Références bibliographiques</i>		55

Introduction

Introduction

Le microbiote intestinal composé de trillions de micro-organismes incluant des bactéries, des champignons, des virus et des archaea joue un rôle fondamental dans la santé humaine en aidant à la digestion, en modulant le système immunitaire et en protégeant contre les pathogènes **(Valdes et al., 2018)**.

L'établissement du microbiote intestinal chez les nouveau-nés est un processus crucial qui commence à la naissance et évolue de manière significative au cours des premiers mois de la vie. Initialement, l'intestin du nourrisson est rapidement colonisé par des microbes acquis de la mère et de l'environnement, y compris le microbiote vaginal, fécal et cutané puis la composition du microbiote intestinal est influencée considérablement par l'allaitement favorisant la croissance des bactéries bénéfiques telles que *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* qui sont essentielles pour le développement d'un intestin sain et à un bon fonctionnement du système immunitaire **(Palmer et al., 2007 ; Van den Elsen et al., 2019)**.

Le microbiote intestinal chez les nourrissons se caractérise par un degré élevé de variabilité et d'unicité individuelle. Au fil du temps, le microbiote intestinal se développe devenant plus stable et ressemblant à la communauté microbienne semblable à celle des adultes dominés par les Bactéroïdes et les Firmicutes **(Palmer et al., 2007)**.

Les bactéries du genre *Lactobacillus*, revêt une immense importance dans le développement précoce de microbiote intestinale des nourrissons en jouant des rôles cruciaux dans leur bien-être ; dont les espèces de *Lactobacillus* favorisent un environnement intestinal sain, aident à la digestion et peuvent inhibées les agents pathogènes gastro-intestinaux en rivalisent avec ces derniers pour l'accès aux ressources et aux sites de fixation, ou par la libérations des substances inhibitrices renforçant ainsi les défenses immunitaires.

De plus, l'établissement de *Lactobacillus* pendant l'enfance peut avoir des implications à long terme pour la santé influençant la fonction immunitaire et les processus métaboliques jusqu'à l'âge adulte, ce qui est en accord avec les recherches suggèrent qu'une population diversifiée des souches des *Lactobacillus* chez les nourrissons est associée à une réduction du risque d'infections, d'allergies et de troubles gastro-intestinaux **(Kalliomäki et al., 2003 ; Zhang et al., 2020)**.

Introduction

Selon **Houghteling et al. (2015)** et **Martín et al. (2019)** les souches des lactobacilles isolées des nourrissons présentent un potentiel prometteur en tant que défenseurs naturels contre les pathogènes gastro-intestinaux. Ces bactéries, présentes naturellement dans le microbiote intestinal des nourrissons possèdent des propriétés uniques qui leur permettent de concurrencer les pathogènes nocifs et de rétablir l'équilibre microbien, dont certaines espèces produisent des substances antimicrobiennes telles que l'acide lactique et les bactériocines qui inhibent la croissance des bactéries pathogènes, de plus elles peuvent moduler la réponse immunitaire renforçant ainsi la capacité du corps à lutter contre les infections (**Kalliomäki et al., 2003 ; Garcia-Gutierrez et al., 2019**).

En exploitant les propriétés bénéfiques des souches de *Lactobacillus*, nous avons défini comme objectif de cette étude :

- ✓ Exploration du pouvoir antibactérien de ces souches isolées des selles des nourrissons, dans le but d'élucider leur impact sur les pathogènes gastro-intestinales.

Partie Bibliographique

*Chapitre 1 : Exploration du
Microbiote intestinal*

Chapitre 1 : Exploration du microbiote intestinal

I.1 Microbiote intestinal

I.1.1 Généralités

Le microbiote intestinal, anciennement appelé flore intestinale, est défini comme l'ensemble des micro-organismes de l'écosystème digestif qui assurent des relations symbiotiques avec l'hôte. Le tube digestif humain abrite aussi bien des bactéries et des virus que des organismes eucaryotes. De toute cette communauté microbienne, les bactéries constituent le groupe le plus largement représenté. Ainsi, on peut considérer que le microbiote intestinal correspond à l'ensemble des bactéries qui colonisent notre tube digestif **(Quevrain et Seksik, 2013)**.

Il s'agit d'une biomasse importante, car elle pèse 1 à 2 kg et constitue 50 % des selles. Le microbiote intestinal humain est constitué de 100 000 milliards de bactéries, soit 10 à 100 fois plus de cellules de notre corps. Selon l'estimation la plus basse ; la composition génétique unique d'un être humain est principalement bactérienne avec une proportion de 99 % et seulement 1% d'origine humaine ; autrement dit, il y a autant de bactéries dans un gramme de selles que de cellules de notre cerveau **(Leclerc, 2007)**.

La diversité qualitative et quantitative du microbiote intestinal crée un équilibre qui être considéré comme unique pour chaque personne, presque comme une empreinte digitale **(Sommer et Backhed, 2013)**.

La composition de la flore varie tout au long du tube digestif et le gradient augmente vers la bouche et l'anus, ainsi qu'entre la cavité transverse et la muqueuse intestinale **(Seignalet, 2004)**.

I.1.2 La flore pathogène

La contamination par les bactéries pathogènes se produit généralement par voie orale en consommant des aliments contaminés, en buvant de l'eau contaminée ou en portant des mains contaminées à la bouche. Un déséquilibre du microbiote intestinal peut aussi favoriser la prolifération de ces bactéries potentiellement dangereuses, augmentant ainsi le risque de diverses maladies **(Fontenille et al., 2009)**. Lorsque les bactéries pathogènes prédominent dans le microbiote intestinal en raison de conditions favorables, cela crée un déséquilibre dit dysbiose ; qui perturbe la fonction intestinale normale et affaiblit la barrière intestinale. Cette perturbation peut avoir des conséquences néfastes sur la santé générale, entraînant des symptômes tels que diarrhées, vomissements, douleurs abdominales, ballonnements ou fièvre, et dans certains cas nécessitant une intervention médicale **(Bien et al., 2013)**.

Chapitre 1 : Exploration du microbiote intestinal

- **Les bactéries entérotoxigènes** : Telles que *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* qui colonisent l'intestin supérieur et provoquent une diarrhée aqueuse en produisant une entérotoxine qui stimule les cellules de la muqueuse à sécréter du liquide via une augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire **(Gorbach, 1996)**.
- **Les bactéries invasives** : Telles que *Shigella* et *Campylobacter* pénètrent la muqueuse intestinale ; en entraînant la production des selles diarrhéiques sanglante et mucoïdes avec un exsudat inflammatoire. Un exemple de la dysbiose, la prolifération de *Clostridium difficile* entraîne une inflammation sévère du côlon avec diarrhée (colite pseudomembraneuse). Les principaux agents pathogènes de ce groupe sont *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *E. coli* invasif et *Yersinia*. Les virus entériques envahissent également les cellules épithéliales intestinales, mais l'étendue de la destruction de la muqueuse est considérablement moins importante que celle causée par les agents pathogènes bactériens invasifs **(Gorbach, 1996)**.

Parmi les bactéries dangereuses, on retrouve :

- a) ***Escherichia coli*** : Est une bactérie à Gram négative fréquemment présente en tant que commensale et inoffensive dans le microbiote humain **(Rojas-Lopez et al., 2018)**. Cependant, plusieurs clones commensaux hautement adaptatifs ont été découverts comme capables d'acquérir des attributs de virulence spécifiques et de devenir des agents pathogènes hautement virulents, souvent mortels. Actuellement, un éventail de maladies intestinales et extra intestinales chez l'homme est associé à *Escherichia coli* pathogènes, notamment *E. coli* entéropathogène, *E. coli* entérohémorragique, *E. coli* entérotoxigène, *E. coli* entéroinvasif. **(Peng et al., 2024)**.
- b) ***Vibrio sp.*** : Est un groupe de pathogènes gastro-intestinaux majeurs. Parmi ceux-ci, *Vibrio cholerae* est une bactérie à Gram négative en forme de virgule, dotée d'un flagelle polaire, appartenant au genre *Vibrio*. Les sérogroupes *O1* et *O139* sont responsables des épidémies de choléra. Les principaux facteurs de virulence incluent la toxine cholérique (CT), qui provoque une sécrétion massive d'eau et d'électrolytes dans l'intestin, et les pili TCP, essentiels à la colonisation intestinale. *V. cholerae* provoque une diarrhée aqueuse sévère, entraînant une déshydratation rapide et potentiellement fatale si elle n'est pas traitée. La transmission se fait principalement par l'eau et les aliments contaminés **(Harris et al., 2012)**. D'autre part, *Vibrio fluvialis* est également une pathogène gastro-intestinal majeur, cette bactérie halophile à Gram négative est souvent trouvée dans les environnements côtiers. Les infections causées par *V. fluvialis* surviennent fréquemment dans les pays où les fruits de mer crus

Chapitre 1 : Exploration du microbiote intestinal

sont largement consommés. Cette bactérie est associée à des épidémies de diarrhée et des cas sporadiques extra-intestinaux. Dans de nombreux cas, *V. fluvialis* provoque une diarrhée similaire à celle causée par le choléra (Allton et al., 2006). Comparé à d'autres *Vibrio* cliniques, *V. fluvialis* montre une résistance aux antimicrobiens largement rapportée (Ramamurthy et al., 2014).

- c) *Pseudomonas aeruginosa* : Est une pathogène opportuniste largement répandu, Gram négative qui peut coloniser l'intestin des patients immunodéprimés (Von Klitzing et al., 2017), ou chez les individus souffrant de certaines pathologies telles que le syndrome du côlon irritable ou la colite ulcéreuse (Kerckhoffs et al., 2011 ; Shukla et al., 2015 ; Chong et al., 2019). Le transport intestinal de *P. aeruginosa* peut entraîner des syndromes diarrhéiques chez les sujets exposés à une thérapie antibiotique prolongée (Von Klitzing et al., 2018), ou des maladies intestinales accompagnées de septicémie, telles que la "fièvre de Shanghai" (Hoff et al., 2020). Chez les patients malades et immunodéprimés, la colonisation intestinale par *P. aeruginosa* seule a été associée à une augmentation de trois fois du taux de mortalité (Chuang et al., 2013). De plus, la forte capacité à former des biofilms dans de nombreux environnements rend les thérapies antibiotiques inefficaces et conduit à l'apparition de conditions chroniques (Zaborina et al., 2006 ; Von Klitzing et al., 2017). *Pseudomonas aeruginosa* peuvent également développer une résistance aux antibiotiques qui peut être acquise par différentes voies, notamment les mutations génétiques et le transfert horizontal des gènes de résistance dont la sélection de souches résistantes peut être favorisée par l'utilisation excessive ou inappropriée d'antibiotiques, ainsi que par d'autres facteurs environnementaux et cliniques (Barbier et Wolff, 2010).
- d) *Staphylococcus aureus* : Est une bactérie Gram positive pathogène opportuniste humain et résilient, responsable d'infections graves aiguës et chroniques, qui colonise les surfaces muqueuses et est souvent impliqué dans des co-infections polymicrobiennes (Sharma et al., 2019), elle peut interagir de manière coopérative avec d'autres espèces telles que *Candida albicans* (Peters et Noverr, 2013 ; Nair et al., 2014), *Enterococcus faecalis* (Peters et al., 2010), *Haemophilus influenzae* (Madhi et al., 2007 ; Weigel et al., 2007), et le virus de la grippe (Margolis et al., 2010). *S. aureus* est également l'un des agents pathogènes d'origine alimentaire les plus courants, responsable de plus de 240 000 infections gastro-intestinales par an (Cukrowska et al., 2020). Son potentiel pathogène a augmenté ces dernières années avec l'émergence de souches multi-résistantes, telles que la souche SARM

Chapitre 1 : Exploration du microbiote intestinal

(*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline) qui représente un problème de santé publique important car elle est facilement isolée dans les milieux communautaires (Scallan et al., 2011).

- e) ***Klebsiella*** : Est une bactérie à Gram négative appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* souvent inoffensive, est une cause courante d'infections opportunistes résistantes aux antimicrobiens chez les patients hospitalisés (Zhang et al., 2023). Ces pathogènes présentent fréquemment une résistance aux carbapénèmes et à d'autres antibiotiques critiques en raison de la production de bêta-lactamases à spectre étendu et de carbapénémases (Karampatakis et al., 2023). Les espèces de *Klebsiella* sont également isolées des selles des individus atteints de colite hémorragique et de diarrhée (Joainig et al., 2010 ; Kaur et al., 2018) et peuvent également coloniser le tractus gastro-intestinal humain, en particulier celle des patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (Tiwana et al., 1998 ; Paczosa et Meccas, 2016) en entraînant un cycle continu de lésions de la muqueuse colique par diverses cytokines aboutissant éventuellement au développement de la maladie de Crohn (Podschun et Ullmann, 1998).
- f) ***Bacillus sp*** : Telles que *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* sont des bactéries à Gram positive, formant des spores, mobiles, aérobies et anaérobies facultatifs, mais présentant des différences notables en termes de pathogénicité. *Bacillus cereus* provoque deux types d'intoxications alimentaires : le type diarrhéique et le type émétique. Le type diarrhéique est causé par des entérotoxines complexes (Beecher et Wong, 1997 ; Lund et Granum, 1997) produites pendant la croissance végétative de *B. cereus* dans l'intestin grêle (Granum, 1994). La toxine émétique est produite par les cellules en croissance dans les aliments (Kramer et Gilbert, 1989). *Bacillus subtilis*, bien que moins pathogène que *B. cereus*, est également impliqué dans des maladies d'origine alimentaire. Les symptômes les plus courants sont les vomissements, mais des cas de diarrhée ont aussi été fréquemment signalés (Logan, 2012). De plus, *B. subtilis* peut présenter une résistance aux antibiotiques telles que les bêtalactamines (Fiedler et al., 2019).

I.1.3 Flore commensale

Un microbiote intestinal sain et équilibré composé d'un écosystème de bonnes bactéries intestinales riches et diversifiés est essentiel pour notre bonne santé. L'écosystème du côlon humain seul est estimé contenir plus de 400 espèces bactériennes, appartenant à un nombre limité de divisions taxonomiques larges (Eckburg et al., 2005). Les bactéries du genres anaérobies *Bactéroïdes*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Faecalibacterium* ; généralement constituent la grande majorité de la communauté

Chapitre 1 : Exploration du microbiote intestinal

microbienne intestinale adulte humaine. Néanmoins, la communauté microbienne de chaque adulte semble être unique avec une structure qui reste stable pour plusieurs mois (**Zoetendal et al., 1998 ; Eckburg et al., 2005 ; Ley et al., 2006**). Parmi ces bonnes bactéries, également appelées “bactéries probiotiques”, on retrouve notamment les lactobacilles ou encore les bifidobactéries qui jouent un rôle crucial dans le maintien de la santé intestinale, leur présence équilibrée dans le microbiote intestinal assure le bon fonctionnement physiologique de l'organisme (**Zhang et al., 2020**). L'émergence de résistance aux médicaments parmi les isolats bactériens a contraint la communauté scientifique à développer de nouvelles alternatives naturelles telles que les probiotiques pour prévenir et traiter les maladies. Ces probiotiques en particulier les lactobacilles ont la capacité d'inhiber la croissance d'agents pathogènes microbiens intestinaux courants : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Jamalifar et al., 2011 ; Hawal et al., 2023**).

Les bactéries constituant la flore commensale ont plusieurs rôles dans :

- 1. La digestion des aliments et la production d'enzymes :** Les bactéries intestinales bénéfiques, telles que les lactobacilles et les bifidobactéries participent activement à la dégradation des aliments, notamment des fibres alimentaires et en produisant des enzymes qui décomposent les aliments en éléments plus simples favorisant ainsi leur absorption et leur utilisation par le corps (**Zhang et al., 2020**).
- 2. Production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) :** certaines bactéries du microbiote intestinale ont la capacité de produire des acides gras à chaîne courte (AGCC) ; qui nourrissent les cellules de la paroi intestinale, ces composés renforcent la barrière intestinale, régulent l'état inflammatoire et contribuent à maintenir une fonction intestinale saine (**Biddle et al., 2013 ; Herrmann et al., 2018**).
- 3. Protection contre les agents pathogènes :** Les bonnes bactéries intestinales comme les lactobacilles ; occupent les sites de fixation dans l'intestin, empêchant ainsi les agents pathogènes de s'y fixer et de se développer. De plus, elles produisent des substances antimicrobiennes qui inhibent la croissance des agents pathogènes réduisant ainsi le risque d'infections (**Garcia-Gutierrez et al., 2019**).
- 4. Soutien du système immunitaire :** Un microbiote intestinal équilibré est essentiel pour renforcer le système immunitaire et réduire les risques d'infections, d'allergies et de maladies et certaines bactéries

Chapitre 1 : Exploration du microbiote intestinal

interagissent avec le système immunitaire en stimulant la production de cellules immunitaires et en renforçant la réponse immunitaire (Mazziotta et al., 2023).

- 5. Production de vitamines essentielles** : Les bactéries intestinales bénéfiques contribuent à la production de vitamines essentielles telles que la vitamine K et certaines vitamines du groupe B qui sont importantes pour divers processus métaboliques dans l'organisme (Hill, 1997).

I.2 Microbiote intestinal néonatal

Durant la grossesse, le fœtus est dans un environnement stérile et à la naissance le tube digestif du nouveau-né est rapidement et massivement colonisé par un microbiote peu diversifié dès les premiers instants de la vie à l'extérieur. En effet, lors de la naissance le nouveau-né absorbe les bactéries fécales vaginales et cutanées de la mère ainsi que toutes les bactéries du milieu environnant (Grondlund et al., 1999).

Le microbiote initial prédominant qui persiste pendant la lactation est constitué de *Bifidobactéries*. Plus tard, le sevrage et l'introduction d'une alimentation spécifique modifient profondément la flore néonatale qui se constitue alors progressivement par un microbiote de type adulte, c'est-à-dire les *Firmicutes* et les *Bactéroïdes* dominant (Evrard et al., 2018).

La cinétique d'implantation de la flore suit un schéma relativement organisé. Les premières bactéries à coloniser dans les 24 à 48 heures après la naissance sont des bactéries aérobies anaérobies facultatives : les entérobactéries principalement *Escherichia coli*, les staphylocoques et les entérocoques. La consommation d'oxygène par ces bactéries aérobies-anaérobies facultatives, avec des taux atteignant rapidement 10^{10} à 10^{11} unités formant colonie (UFC) par gramme de contenu colique réduit le potentiel redox de la lumière gastro-intestinale. Cette modification permet la translocation de bactéries anaérobies strictes appartenant aux genres *Bifidobacterium*, *Bactéroïdes*, *Clostridium* et *Lactobacillus* au deuxième ou troisième jour de la vie. Au contraire, lorsque l'oxygène diminue, le niveau de formation de genres aérobies diminue (Cilieborg et al., 2012) (Figure 1).

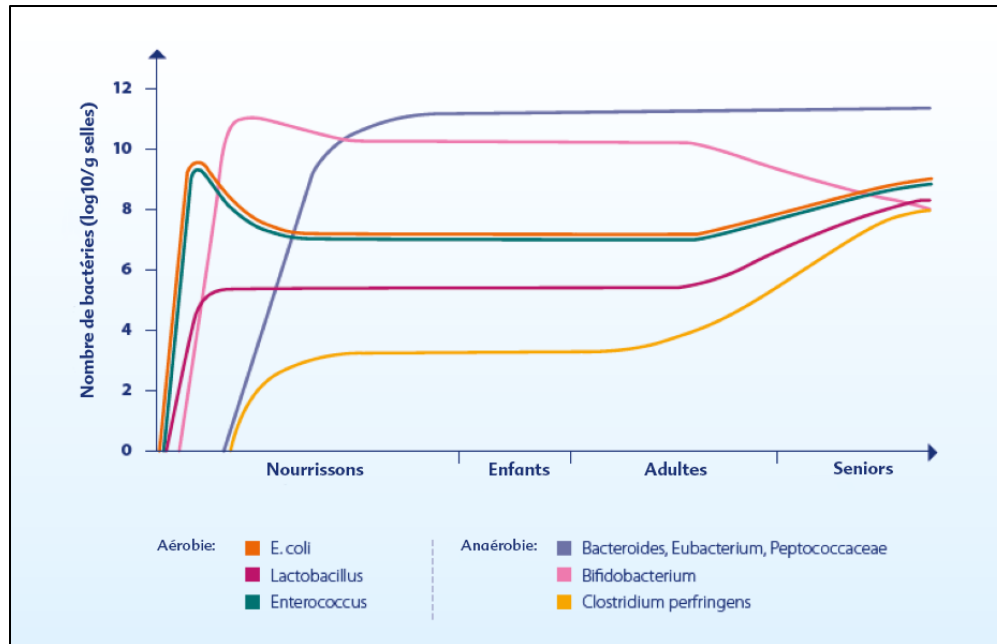


Figure 1: Colonisation naturelle de l'intestin d'un nouveau-né au cours des dix premiers jours de la vie (Schulze J et al., 2008).

De nombreux facteurs influencent la cinétique d'implantation et la composition de la flore intestinale du nouveau-né, notamment le mode d'accouchement, l'environnement, le type de régime alimentaire, l'âge gestationnel et l'antibiothérapie (Harmsen, 2000 ; Affsa, 2005 ; Goulet, 2009). Les altérations dans le processus d'établissement de la flore intestinale et le décalage dans l'implantation des bactéries intestinales d'origine maternelle est en raison de pratiques d'hygiène strictes pendant les accouchements ; ainsi que les implications cliniques de ces changements ne sont pas entièrement comprises mais pourraient inclure l'absence du développement d'une flore protectrice ou une stimulation insuffisante du système immunitaire intestinal (Campeotto et al., 2007).

I.2.1 Implantation et diversité des souches de *Lactobacillus sp* dans le microbiote néonatal

Les bactéries lactiques sont présentes dans l'intestin des nourrissons, bien qu'elles ne soient pas les microorganismes prédominants. Leur origine dans la colonisation intestinale des nouveau-nés suscite des débats (Wang et al., 2010).

Chapitre 1 : Exploration du microbiote intestinal

Le développement et la composition des bactéries lactiques varient d'une personne à l'autre, influencés par divers facteurs notamment le type d'alimentation tel que le lait maternel, le mode d'accouchement (vaginal ou césarienne), ainsi que l'environnement et les conditions d'hygiène (Birri et al., 2013). Les enfants nés par voie basse ont une flore bactérienne similaire à celle du vagin maternel, telles que les espèces du *Lactobacillus* et *Prevotella*, tandis que ceux nés par césarienne présente une composition bactérienne plus semblable à celle de la peau avec certaines espèces du *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium* (Dominguez-Bello et al., 2010). Les nourrissons sont colonisés par différents types de bactéries notamment les entérobactéries, les bifidobactéries, les entérocoques et les lactobacilles. La colonisation par les lactobacilles et les bifidobactéries est plus tardive chez les nourrissons nés par césarienne que chez ceux nés par voie vaginale (Birri et al., 2013) (Figure 2).

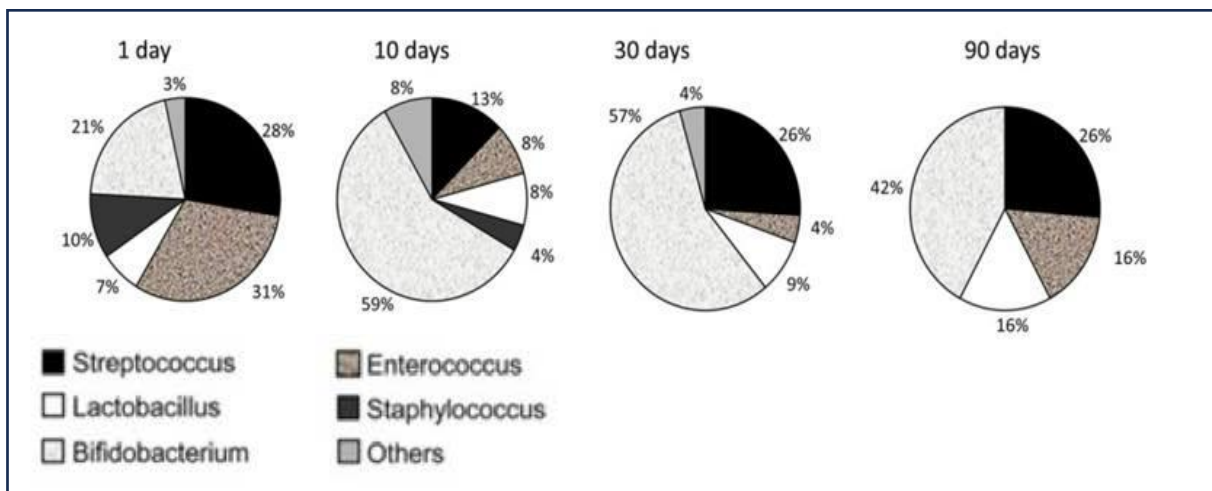


Figure 2 : Pourcentages d'isolement des *Lactobacillus* au niveau des selles des nourrissons en fonction de l'âge (Solís et al., 2010).

Le mode d'alimentation du nourrisson exerce une influence significative sur la composition de sa flore digestive ; au cours du temps les nourrissons allaités au sein présentent une abondance significative des bactéries lactiques telles que les lactobacilles dans leur flore intestinale, ce qui contribue à une diversité bactérienne favorable et à un équilibre sain dans leur microbiote intestinal (Cibik et al., 2004).

Les genres bactériens les plus abondants chez les nourrissons exclusivement allaités au sein, sont *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* (Moore et Townsend, 2019), une variété des espèces de *Lactobacillus* sont rencontrées aux selles d'un enfant notamment : *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* et d'autres (Bahri et al., 2014) (Figure 3).

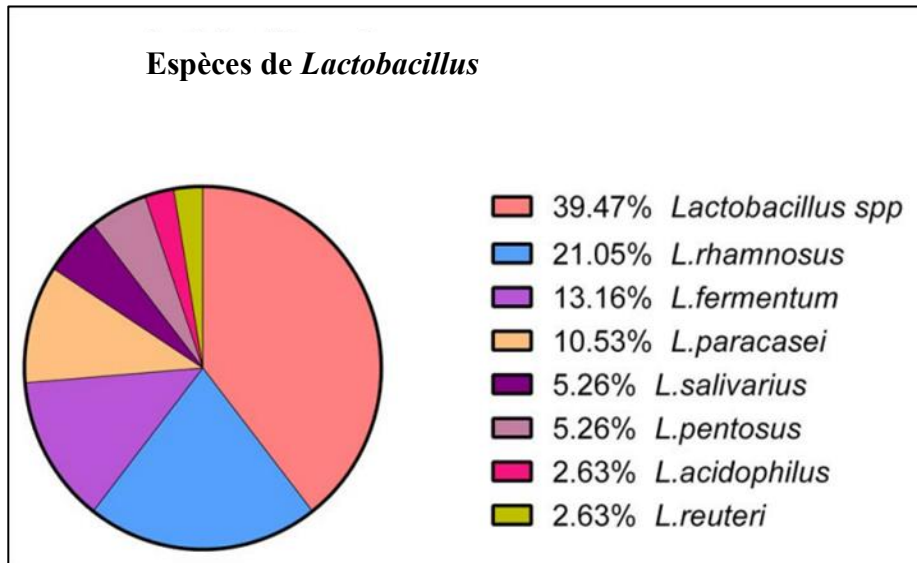


Figure 3: Pourcentage des différentes espèces isolées de lactobacilles à partir de la matière fécale des nourrissons (Al Kassaa et al., 2019).

***Chapitre 2 : Exploration des
Propriétés Antibactériennes des
Lactobacillus sp.***

II.1 Introduction au genre *Lactobacillus*

II.1.1 Taxonomie

Le genre *Lactobacillus* est prédominant parmi les bactéries lactiques en termes de quantité (**Huanget al., 2018 ; Belkheziz, 2020**). Les lactobacilles comprennent diverses espèces bactériennes présentes partout dans la nature, mais qui sont rarement pathogènes (**Denis et al., 2007**).

L'histoire de *Lactobacillus* commence avec la proposition de **Beijerinck. (1901)** pour ce genre ; plus tard **Horla-Jensen. (1919)** a proposé de classer les espèces de ce genre en trois sous familles en fonction de leur métabolisme et de leur température de croissance : *Streptobacterium*, *Thermobacterium* et *Betabacterium* (**Holzpfel et al., 2001 ; Gatti et al., 2004**). Dans l'ouvrage "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" ; les bactéries de ce genre sont classées dans la section 14 « Bâtonnets non sporulés communs à Gram positive » et sont divisés en trois groupes similaires aux groupes d'**Orla-Jensen** : **A** - homofermentaires obligatoires, **B** - hétérofermentaires facultatifs et **C** – hétérofermentaires (**Kandler et Weiss, 1986**)

Le genre *Lactobacillus* (*Lb*) appartient aux phylums des *Firmicutes* à la classe des *Bacilli*, l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae* ; c'est le genre principal de cette famille (**Sneath et al., 1986**). En 2006, le genre a été divisé en sept groupes phylogénétiques : *Lb. casei*, *Lb. debrueekii*, *Lb. buchleri*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. sakei* et *Lb. salivarius* (**Hammes et Hertel, 2006**) avec 196 d'autres espèces (**Huang et al., 2018**).

II.1.2 Caractères morphologiques

Les *Lactobacillus* varient en apparence, allant des bacilles longs et minces aux coccobacilles, en passant par un bâtonnet court ou une forme légèrement flexible (**Figure 4, 5**). Ils sont Gram positives, non sporulés souvent associés à des chaînes et généralement non mobiles (**Sneath et al., 1986 ; Hammes et Hertel, 2006**).

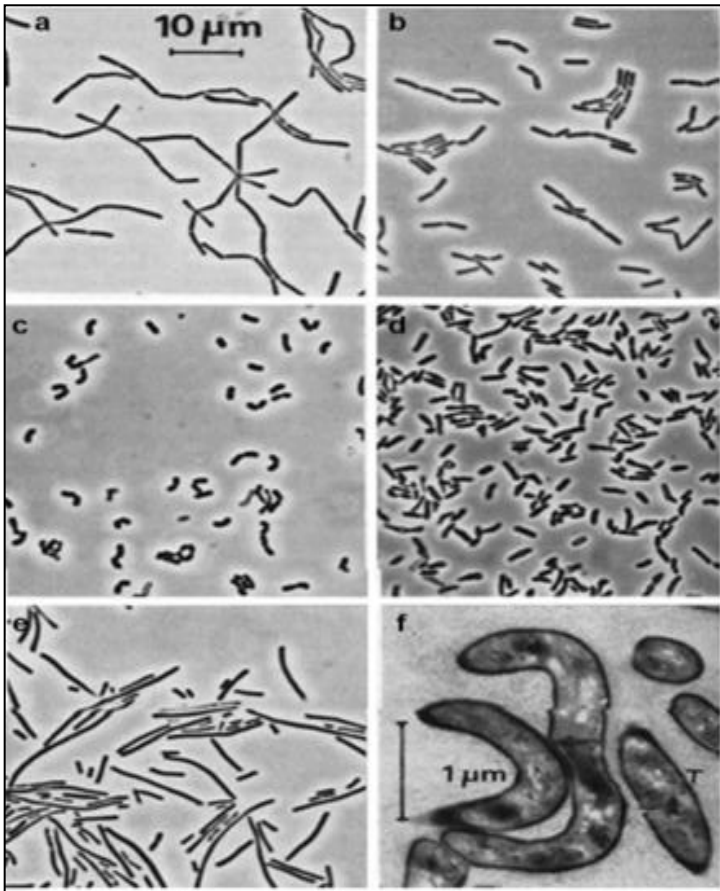


Figure 4 : Contraste de phase (A–E) et d'électron (F) illustrant les différentes morphologies cellulaires des *Lactobacillus*. A, *Lactobacillus gasseri* ; B, *Lactobacillus agilis* ; C, *Lactobacillus curvartus* ; D, *Lactobacillus minor* ; E, *Lactobacillus fermentum* ; et F, involution de *Lactobacillus* dans une section mince de grain de kéfir (Vos et al., 2009).

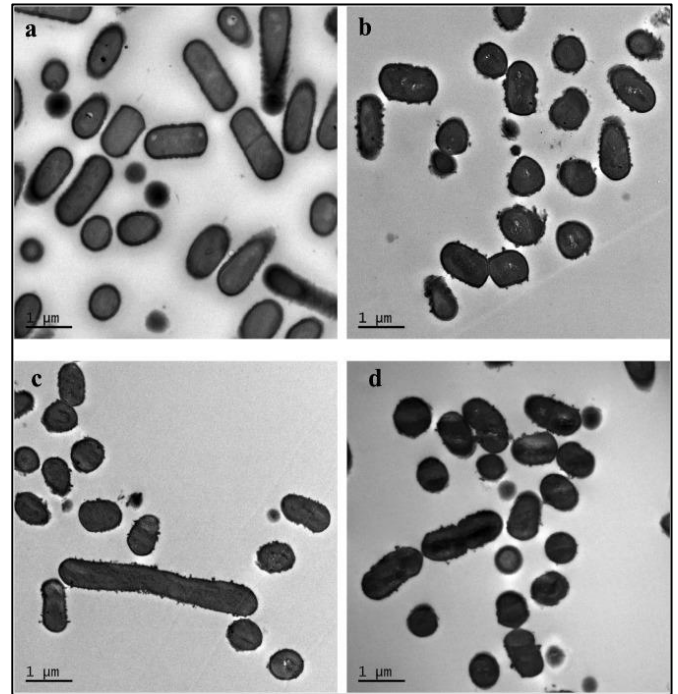


Figure 5 : Observation de *Lactobacillus plantarum* sous microscope électronique à balayage (Parlindungan et al., 2018)

II.1.3 Caractères biochimiques

Les lactobacilles sont catalase négative, certains ont une pseudo catalase ; ils manquent de cytochrome. Ils sont généralement négatifs à la nitrate réductase, à la gélatinase et peuvent être micro aérophiles ou anaérobies (Prescott et al., 2003) avec un métabolisme énergétique exclusivement fermentaire. Le métabolisme des *Lb* est soit homofermentaire produisant uniquement de l'acide lactique à partir du glucose, soit hétérofermentaire avec la production d'acide lactique, d'acide acétique et de CO₂ (Desai, 2008). Selon le type de fermentation, les lactobacilles sont répartis en trois groupes selon la classification d'Orla-Jensen révisée par Kandler et Weiss (De vos et al., 2009).

- **Groupe I « Thermobacterium »** : Comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire ceux qui produisent uniquement de l'acide lactique à partir du glucose et ne peuvent pas fermenter les pentoses ou le gluconate. Ils contiennent de la fructose-1,6-diphosphate aldolase et de la phosphofructokinase. Ce groupe comprend principalement des espèces présentes chez l'homme et l'animal qui participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme (exemple : *Lb. acidophilus* et *Lb. gasseri*).
- **Groupe II « Streptobacterium »** : Comprend les espèces à métabolisme hétérofermentaire facultatif ; ces derniers utilisent la voie homofermentaire mais sont capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions telles qu'une concentration limitée en glucose, ces espèces possèdent également la fructose-1,6-diphosphate-aldolase et une 6-phosphogluconate déshydrogénase (exemple : *Lb. casei*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus* et *Lb. plantaru*).
- **Groupe III « Betabacterium »** : Comprend les espèces hétérofermentaires obligatoires qui produisent des quantités équimolaires de CO₂, d'acide lactique, d'acide acétique et/ou d'éthanol ; les pentoses sont fermentés en acide lactique et acétique par la voie de la phosphocétolase car ces bactéries possèdent de la phosphocétolase mais pas d'aldolase. Certaines espèces de ce groupe font partie de la microflore du lait et des produits carnés et se développent même dans le système digestif humain en participant à l'équilibre de la flore intestinale (exemple : *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*).

II.1.4 Caractères culturels et exigences nutritionnelles

La plupart des lactobacilles se développent dans un intervalle de température comprise entre 15 et 42°C, et certaines souches dites « thermophiles » restent viables à 55°C (Adams et Moss, 2000 ; Tailliez, 2004). Ils se développent mieux dans des conditions acides avec un pH d'environ 4,5 à 6,4 mais leur croissance s'arrête à un pH d'environ 3,5 (De Vos et al., 2009). Ce sont des anaérobies facultatifs mais ils poussent mieux dans une atmosphère contenant 5 à 10 % de dioxyde de carbone (Laprent, 2000).

Le milieu le plus adapté à leur culture est le milieu Man, Rogosa et Sharpe (MRS) ; les colonies se forment sur gélose MRS dans les 24 à 48 heures, et elles sont généralement petites, incolores, blanches ou jaunâtres, lisses ou rugueuses, rondes ou lenticulaires (De Vos et al., 2009). Généralement ce milieu stimule la croissance des bacilles longs et minces (parfois légèrement incurvés) ou des coques isolées ou en chaîne, leur longueur et leur degré de courbure dépendent de l'âge de la culture, de la composition de

Chapitre 2 : Exploration des Propriétés Antibactériennes des Lactobacillus sp.

l'environnement et du niveau d'oxygène (Axelsson, 2004). La propriété Gram positive peut être perdue dans les cultures anciennes (Collins et al., 2009).

En plus de la source de carbone et d'azote, les lactobacilles présentent diverses exigences nutritionnelles, qui peuvent être catégorisées selon les classifications de De Man et al. (1960) et De Vos et al. (2009). :

- a) **Exigences en vitamines** : Toutes les espèces de lactobacilles ont un besoin important en vitamines telles que la pantothenate (B5), la niacine (B3) et la cobalamine (B12). Les carences en vitamine B12 peuvent conduire à une diminution de la synthèse de l'ADN, entraînant des changements morphologiques tels que l'allongement des cellules par exemple une telle élongation cellulaire chez *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti* en cas de carence en cobalamine (B12) ou en acide folique.
- b) **Exigences en bases azotées** : Dans les milieux de culture synthétiques, les lactobacilles ont besoin d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile pour leur croissance ; ces besoins peuvent varier selon les espèces.
- c) **Exigences en cations** : Les ions Mg^{2+} , Mn^{2+} et Fe^{2+} sont essentiels à la croissance des lactobacilles, le manganèse et le magnésium agissent comme activateurs de nombreuses réactions enzymatiques et stabilisent la structure des acides nucléiques, des ribosomes et de la membrane cellulaire des lactobacilles.

II.1.5 Identification

Les milieux de cultures sélectifs sont largement utilisés pour différencier les lactobacilles en fonction de leur phénotype. Les tests phénotypiques classiques pour leur identification sont basés sur des caractéristiques physiologiques telles que la motilité, la température de croissance, le type respiratoire et la croissance dans le chlorure de sodium ainsi que sur diverses caractéristiques biochimiques telles que le type de fermentation, le métabolisme des substrats glucidiques, la production d'isomères de l'acide lactique, la coagulation du lait et la présence d'enzymes spécifiques comme l'arginine dihydrolase. Il existe également trois tests API (API 50 CH, LRA Zym et API Zym) pour une identification plus précise (Charteris et al., 2001). L'identification des espèces de lactobacilles peut être difficile avec les méthodes biochimiques ce qui repose principalement sur des expériences de fermentation de sucre car il existe un grand nombre d'espèces, donc la galerie API 50 CH est considéré comme la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (Roissart et Luquet, 1994 ; Ozgun et Vural, 2011).

Chapitre 2 : Exploration des Propriétés Antibactériennes des Lactobacillus sp.

L'utilisation d'outils taxonomiques moléculaires tels que l'hybridation quantitative ADN/ADN et le séquençage du gène ADNr-16S ont permis de lever les ambiguïtés et dénommer avec précision les espèces de lactobacilles ; présentant un intérêt sanitaire et nutritionnel (**Dellaglio et Felis, 2005**).

II.2 Propriétés Antibactériennes des *Lactobacillus sp.*

II.2.1 Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion

Les lactobacilles probiotiques empêchent l'attachement des agents pathogènes aux cellules intestinales (**Isolauri et al., 2004 ; Kim et al., 2009 ; Kim et Ho, 2010**), parce que la plupart des infections intestinales commencent par l'adhésion d'un pathogène aux cellules entérocytaires de l'hôte ; certains d'entre eux sont capables d'empêcher physiquement les agents pathogènes de pénétrer dans les entérocytes (**Gueimond et al., 2006 ; Kim et al., 2008 ; Lebeer et al., 2010**). Ce mode d'action serait comparable à celui observé chez le microbiote intestinal lorsqu'il fait face aux infections bactériennes (**O'Hara et Shanahan, 2007**).

Les mécanismes de compétition d'adhésion se produisent généralement de deux manières (**Servin et Cocconier, 2003**) (**Figure 6**) :

- Compétition spécifique par les adhésines (**Gueimond et al., 2006**).
- Compétition non spécifique impliquant des interactions de liaison faibles (forces De Van Der Waals, forces électrostatiques et liaisons hydrogène) (**Kim et al., 2008 ; Shanahan, 2011**).

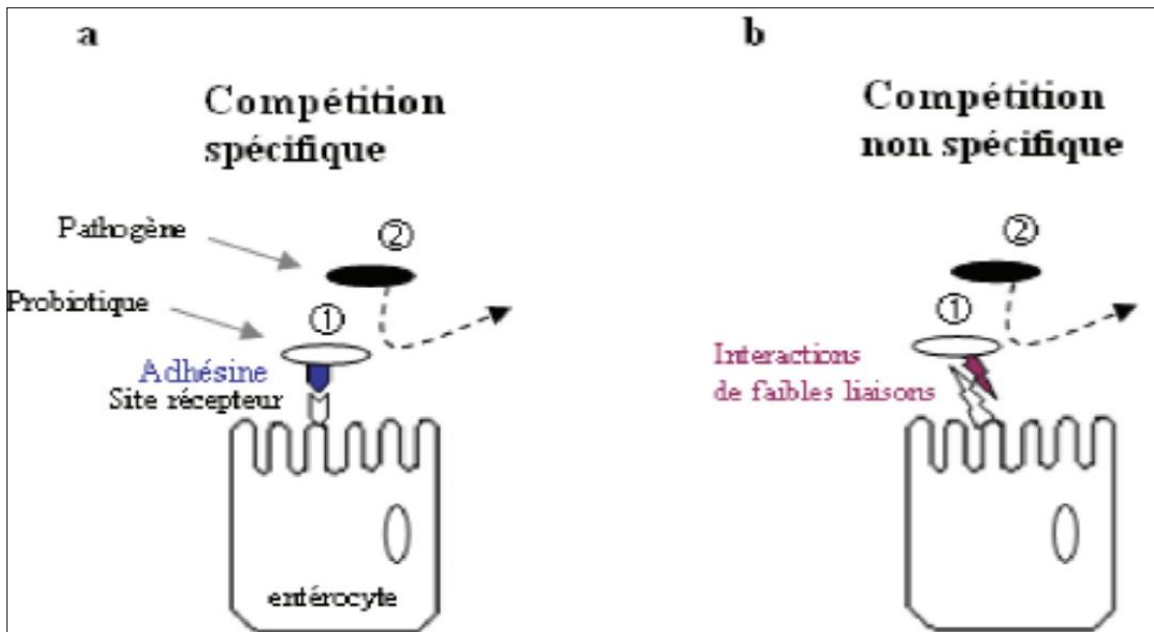


Figure 6 : Adhésion des lactobacilles dans l'intestin ; (a) spécifique, (b) non spécifique (Servin, 2004).

II.2.2 Production de substances antibactériennes

Les lactobacilles d'origine humaine peuvent produire des agents antibactériens qui agissent sur les pathogènes in vitro et in vivo, ces substances peuvent être des acides, des substances organiques (lactique, acétique et diacétyle), du peroxyde d'hydrogène ou des protéines appelées bactériocines (Servin, 2004).

a) Les acides organiques

L'acide lactique et l'acide acétique sont actifs contre les micro-organismes pathogènes de l'intestin impliqués dans la diarrhée (Servin, 2004) et sont produits pendant la fermentation lactique. Leur effet antibactérien contre les bactéries pathogènes se manifeste en deux manières :

- Un effet direct, 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 des cellules d'agents pathogènes sensibles aux acides ; cette diminution du pH peut donc affecter la viabilité des bactéries pathogènes (Aiba et al., 1998 ; Alakomi et al., 2000 ; Lavermicoccaet al., 2008). Le mécanisme d'action est décrit dans la figure 7.

- Un effet indirect résultant de la tolérance des lactobacilles à l'acidité, en milieu acide, la compétitivité de ces bactéries est meilleure par rapport aux autres bactéries (Servin, 2004 ; Tejero-Sarinena et al., 2012).

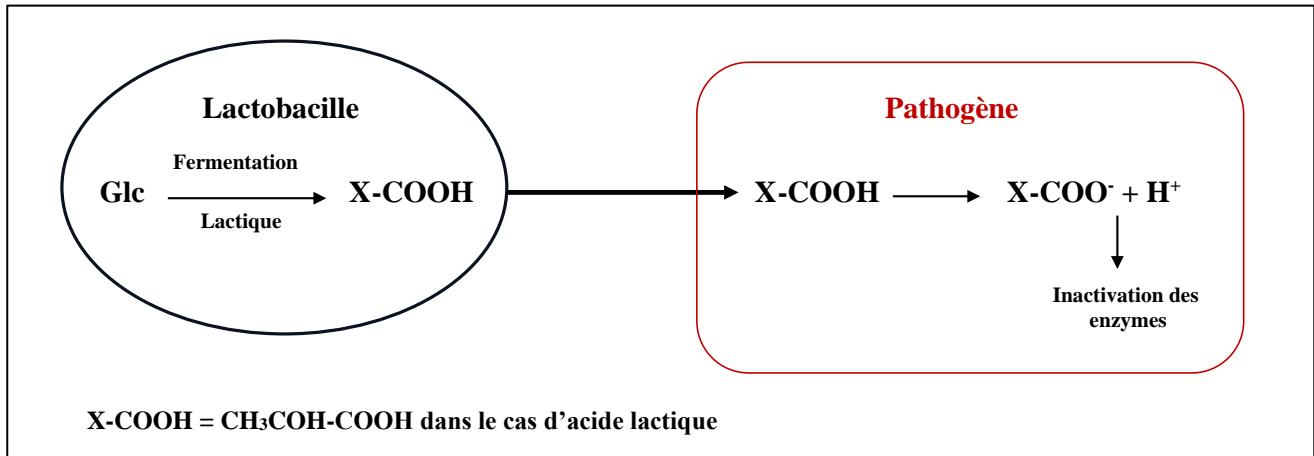


Figure 7 : Mode d'action des acides organiques sur les pathogènes comme décrit par Rousseau. (2004).

b) Peroxyde d'hydrogène

Les lactobacilles sont catalase négative mais 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 et son activité antimicrobienne découle de son effet oxydant sur la cellule bactérienne et la destruction des protéines cellulaires (Šuško^{vi}ć et al., 2010). Sa toxicité provient du pouvoir oxydant de la molécule elle-même ainsi que de ses métabolites, tels que le radical hydroxyle (OH[•]) et l'anion superoxyde (O₂⁻), générés par des agents réducteurs et des enzymes peroxydases. Ces substances peuvent altérer les protéines, notamment en inactivant les enzymes cytoplasmiques. Les réactions sont décrites dans la **figure 8**.

Toutefois, les lactobacilles et les lactocoques évitent l'autodestruction grâce à la présence de la NADH peroxydase, qui convertit le peroxyde d'hydrogène (Migdal et Serres, 2011).

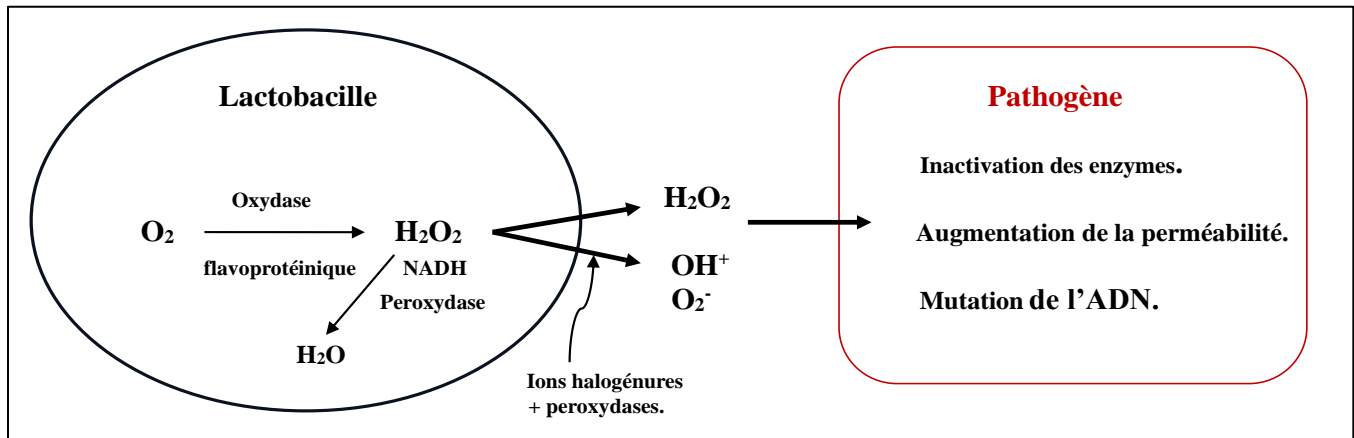


Figure 8 : Mode d'action du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés sur les pathogènes décrit par **Rousseau. (2004).**

c) Les bactériocines

Les bactériocines sont des peptides synthétiques ribosomiques produits par certaines bactéries avec un effet antimicrobien qui est soit bactéricide provoquant la mort des bactéries cibles, soit bactériostatique empêchant la croissance des bactéries. Les plus étudiées sont les bactériocines produites par les bactéries lactiques connues pour leur rôle dans la bonne conservation des aliments (**Lagha et al., 2017**). Ils ont un effet inhibiteur qui cible les bactéries proches de la souche bactérienne, dont les plus connues sont : la nisine, la diploxine, l'azidophylline et la Bulgarican (**Samedi et Charles, 2019**) (**Figure 9**).

D'après **Dortu et Thonart. (2009)**, toutes les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont efficaces contre les bactéries Gram positive mais ne présentent pas d'activité contre les bactéries Gram négative, en raison de la barrière constituée par la membrane externe de ces dernières qui empêche l'accès des bactériocines à leur site d'action sur la membrane interne.

La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques ont le même mécanisme d'action, en affectant principalement la membrane externe des bactéries cibles, formant des pores qui conduisent à la libération du contenu intracellulaire et à la mort des bactéries affectées (**Figure 9**) (**Samedi et Charles, 2019**).

L'efficacité des bactériocines produites par les bactéries lactiques est principalement due à l'interaction électrostatique avec des groupes phosphate chargés négativement sur les membranes cellulaires cibles via

Chapitre 2 : Exploration des Propriétés Antibactériennes des *Lactobacillus* sp.

la liaison initiale, la formation de pores et la destruction cellulaire provoquant des dommages mortels et l'activation de l'autolysine pour cliver la paroi cellulaire (Singh, 2018).

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

d) Le diacétyle

Les bactéries lactiques hétérofermentaires produisent de l'acétaldéhyde actif par décarboxylation du

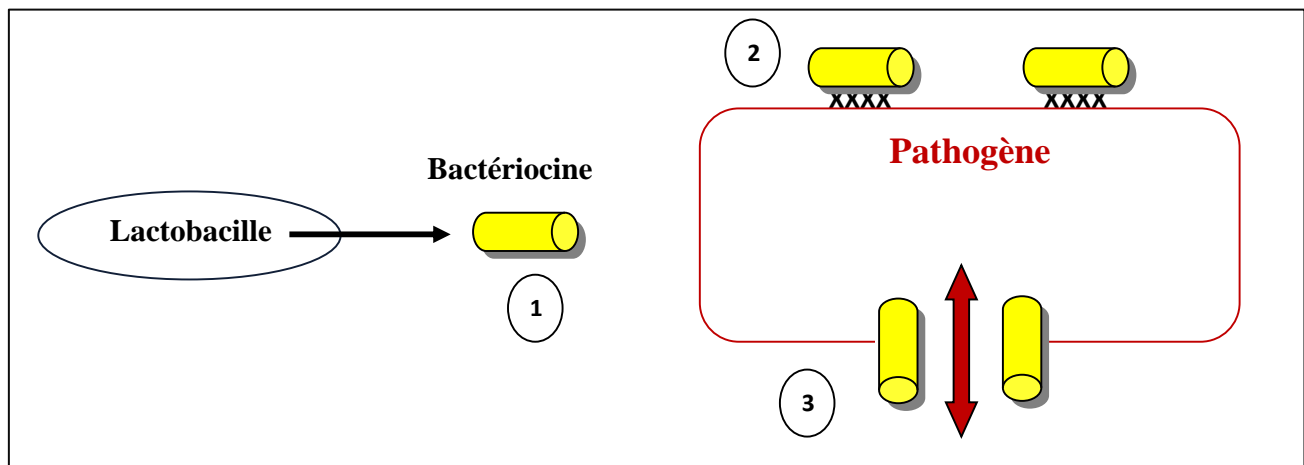


Figure 9 : Mode d'action des bactériocines sur les pathogènes (Rousseau, 2004).

pyruvate, qui se condense ensuite avec le pyruvate pour former l' α -acétolactate et est converti en diacétyle par l' α -acétolactate synthétase (Šuškočić et al., 2010).

Le diacétyle ($C_4H_6O_2$) est l'un des composants aromatiques les plus importants, une forte production de ce dernier conduit à un pH légèrement acide. Il possède des propriétés antibactériennes et un effet inhibiteur plus important sur la croissance des bactéries Gram négative que sur les bactéries Gram positive (Jay, 1982).

II.2.3 Concurrence pour l'utilisation des nutriments

L'inhibition de la croissance des agents pathogènes peut être également obtenue grâce au processus de limitation des nutriments (**Fuller, 1991**). Ce facteur détermine la composition du microbiote intestinal, par conséquent une augmentation du nombre de lactobacilles obtenus à partir de la consommation de probiotiques réduit les substrats disponibles nécessaire pour la transplantation de bactéries pathogènes (**Oelschlaeger, 2010**).

II.2.4 Stimulation des mécanismes de défense immunitaire

Ce mécanisme implique l'interaction des lactobacilles avec le système immunitaire, pour augmenter la réponse immunitaire de l'hôte contre les agents pathogènes. Parmi les effets observés, certains auteurs soulignent la stimulation de l'immunité adaptative (IgA, IgG) et innée (macrophages, basophiles, monocytes) (**Lee et Mazmanian, 2010**).

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

- a) La co-agrégation : l'isolement des pathogènes sous forme d'agrégats (des *Lactobacillus* collées les unes aux autres) empêche leur formation dans l'intestin (**Pagnini et al., 2010**).
- b) L'activation des cellules de la muqueuse et du système immunitaire par des micro-organismes peut conduire à la production de molécules antibactériennes (défensines et lysozymes) ou d'antitoxines (par exemple, phosphatase alcaline) dans les cellules hôtes (**Madsen et al., 2001**).
- c) L'exposition des cellules humaines aux probiotiques peut augmenter la force des Jonctions serrées, ce qui limite les dommages induits par l'inflammation et le recrutement des macrophages vers le site de l'infection tout en empêchant la translocation des agents pathogènes (**Oelschlaeger, 2010**).

Partie expérimentale

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée dans le Laboratoire de Microbiologie Appliqué à l'Agroalimentaire, Au Biomédical et à l'Environnement (**LAMAABE**) de l'Université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen durant la période février -mai de l'année 2024. L'objectif de ce travail repose sur :

- ✓ L'isolement et l'identification des souches de lactobacilles à partir de la matière fécale des nourrissons.
- ✓ L'étude de leurs potentiel antibactérien vis-à-vis des souches pathogènes gastro-intestinales.

III.1 Matériel

III.1.1 Matériel biologique

III.1.1.1 Bactéries

a) Les souches isolées

Les souches des lactobacilles ont été isolées à partir des échantillons prélevés de la matière fécale des nourrissons et identifier par les techniques de microbiologie classique.

b) Les souches à tester pour l'activité antibactérienne

Pour la mise en évidence des activités antibactériennes de lactobacilles, Sept (07) souches pathogènes incriminées dans les intoxications gastrointestinales ont été utilisées : *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Vibrio fluvialis*.

III.1.2 Milieux de cultures

- Milieu MRS bouillon et gélose.
- Bouillon nutritif.
- Gélose Mueller-Hinton.
- TSI (Triple Sugar Iron).

III.1.3 Appareillage

- Agitateur électrique
- Autoclave
- Bain marie
- Balance

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

- Centrifugeuse
- DiluPhotometer
- Étuve
- Micropipette
- Microscope électronique à balayage environnemental.,
- Microscope optique
- pH-mètre
- Réfrigérateur
- Vortex.

III.1.4 Réactifs, colorants et autres

- Bandelette d'oxydase.
- Eau oxygénée 10vol.
- Eau physiologique.
- Ethanol 96%
- Fuchsine.
- Glycérol.
- Huile à immersion.
- Lugol.
- NaCl.
- Violet de Gentiane.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

III.2 Méthodes

III.2.1 Échantillonnage et isolement

Un ensemble de trois échantillons des selles des trois nourrissons ont été prélevés à l'aide des cuillères et d'écouvillons stériles, ces derniers sont placés dans des pots stériles puis acheminés dans les 30 minutes au Laboratoire de Microbiologie (**LAMAABE**) pour être étudiés. Cette collecte a été réalisée au sein de la maternité du Centre Hospitalo Universitaire de Tlemcen ; un questionnaire a été réalisé (**Annexe 3**).

Après avoir réalisé une pesée aseptique de 1 gramme d'échantillon, celui-ci est transféré dans 9 ml d'eau physiologique stérile pour réaliser une dilution à partir de la dilution mère. Après homogénéisation, 1 ml de cette dernière est mélangé avec 9 ml d'eau physiologie stérile pour obtenir une dilution de 10^{-1} , répétant ce processus de dilution jusqu'à la dilution 10^{-9} (**Guiraud, 1998**).

Chaque dilution est ensemencée sur des boîtes de Petri contenant le milieu de culture MRS, optimisé pour la croissance des lactobacilles, en déposant 100 μ l de chaque dilution à la surface du milieu de culture, puis en étalant uniformément la suspension avec un râteau constitué à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, avant d'incuber les boîtes à 37°C pendant 24 à 72 heures.

Il est recommandé de sceller hermétiquement les boîtes de Pétri avec du ruban adhésif, selon **Leveau et al. (1991)** pour réduire l'exposition des lactobacilles à l'oxygène, car elles sont relativement sensibles à celui-ci.

III.2.2 Purification

Afin d'isoler les souches de *Lactobacillus*, des repiquages successifs ont été effectués sur gélose MRS. Les prélèvements et la remise en suspension ont été réalisés exclusivement pour des colonies distinctes, homogènes et bien développées. La pureté des souches est confirmée par l'observation macroscopique des colonies et aussi par l'observation microscopique, en s'assurant que la forme des cellules est uniforme sur toute la lame en utilisant la méthode de coloration de Gram.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

III.2.3 Identification des lactobacilles

III.2.3.1 Caractérisation phénotypique

a) Examen macroscopique

Consiste à décrire les colonies obtenues après culture bactérienne de la souche sur milieu solide MRS pendant 24 à 48 heures. Cette description se base sur des critères tels que la taille, la pigmentation, le contour et l'aspect des colonies.

b) Examen microscopique

- **Observation par microscope optique**

Dans le cadre de notre étude visant à cibler exclusivement les lactobacilles, nous utilisons un frottis préparé à partir d'une colonie isolée, soumis ensuite à la coloration de Gram et observé par microscope optique (**Annexe 4**). Cette méthode permet de distinguer les bactéries en deux principales catégories : les bactéries Gram positive, qui conservent une coloration violette après décoloration par l'alcool, et les bactéries Gram négative, qui prennent une coloration rose. La coloration de Gram permet également de visualiser la morphologie des cellules et leur mode de regroupement (**Coico, 2001**). Les lactobacilles, en tant que bactéries Gram positive, maintiennent la coloration violette caractéristique du violet de gentiane.

- **Observation par microscope électronique à balayage environnemental (MEBE)**

Pour confirmer les observations initiales obtenues à l'aide du microscope optique, nous avons procédé à un examen complémentaire en utilisant la microscopie électronique à balayage environnemental (MEBE). Les frottis des échantillons sont placés sous microscope électronique à balayage, où un faisceau d'électrons a balayé leur surface, produisant des images à haute résolution des structures microbiennes présentes. Ce processus nous permis d'obtenir des détails ultra structuraux précis des lactobacilles, confirmant et complétant les observations faites sous microscope optique.

III.2.3.2 Caractérisation biochimique et physiologique

a) Test catalase

Le test de catalase consiste à détecter la présence de l'enzyme catalase en émulsionnant la colonie bactérienne à tester sur une lame dans de l'eau oxygénée à 10 volumes. Les lactobacilles sont dépourvus de cette enzyme qui est capable de décomposer l'eau oxygénée, qui est indiquée par la formation abondante

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

de bulles d'oxygène dans l'émulsion qui vont s'échapper sous forme de mousses (Stiles et Holzapfel, 1997). La réaction biochimique réalisée est la suivante :



b) Test oxydase

Le test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase est réalisé chez les bactéries Gram négative qui produisent cette enzyme, comme *Neisseria* ou *Pseudomonas*. Cette enzyme a la capacité d'oxyder un réactif appelé « N-Diméthyle Paraphénylène Diamine ». L'activité de l'oxydase est évaluée selon le protocole décrit par Kovacs (1956), où une colonie pure est déposée sur une bandelette d'oxydase. Si une couleur bleue se développe, le test est positif indiquant la présence de l'enzyme ; il est à noter que les lactobacilles sont négatifs pour ce dernier.

c) Métabolisme des sucres

Selon le protocole de Denkova et al. (2017) ; la gélose TSI (Triple Sugar Iron.) en tube, est utilisée pour l'identification des bactéries en mettant en évidence leur capacité à fermenter trois sucres : le lactose, le glucose et le saccharose avec ou sans production de gaz et/ou de sulfure d'hydrogène (H₂S). L'ensemencement est réalisé par une inoculation profonde du culot sur le même milieu avec strie médiane sur la pente, un tube témoin non inoculé est également utilisé pour observer le changement de couleur (Annexe 6), après 24h d'incubation à 30°C, les résultats observés sont les suivants :

- ✓ Fermentation du glucose : le culot devient jaune.
- ✓ Fermentation du lactose et/ ou saccharose : la pente inclinée prend une teinte jaune.
- ✓ Production de gaz : apparition de gaz qui est visible dans le culot.
- ✓ Formation de H₂S : une coloration noire se forme entre le culot et la pente, ou le long de la piqûre.

d) Croissance a différents intervalles de températures

Ce test permet de distinguer les lactobacilles thermophiles des lactobacilles mésophiles. Les différentes cultures sont incubées à des températures différentes : 30°, 37° et 55°C pendant 48h sur

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

bouillon MRS. La croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

III.2.4 Conservation

- ✓ **A court terme** : La conservation à court terme des souches pures est effectuée dans un milieu solide sur tube incliné. La croissance des cultures est maintenue à 4°C.
- ✓ **A long terme** : Cette conservation est effectuée dans des tubes Eppendorf à une température de -20°C, d'où 0.5ml de la culture bactérienne est ajoutée à 0.5ml de glycérol (50% /50%).

III.2.5 Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Les souches de lactobacilles sont testées pour leur pouvoir antibactérien à partir des cultures jeunes en phase de croissance vis-à-vis des bactéries pathogènes gastro-intestinales (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Origine des souches pathogènes gastro-intestinales

Souches	Origine
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC11778
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633
<i>Escherichia coli</i>	LAMAABE
<i>Klebsiella sp.</i>	LAMAABE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pieds des diabétiques
<i>Staphylococcus aureus</i>	LAMAABE
<i>Vibrio fluvialis</i>	Pacemaker

Le principe de la détection de l'activité antibactérienne est basé sur la diffusion de l'agent antibactérien sur milieu de culture solide pour inhiber la croissance des bactéries pathogènes ; la confirmation de l'activité antagoniste de nos souches de lactobacilles est réalisée par des méthodes basées sur la diffusion d'agent antibactérien (Spots et Puits).

Pour réaliser le test d'antagonisme, il est nécessaire de disposer une préculture pure de lactobacille de 18h dans le bouillon MRS ayant une densité optique de 0.08 d'une part, et des souches pathogènes dont la densité optique est comprise entre 0.08 et 0.1 à 600 nm d'autre part. A partir des colonies de lactobacilles

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

et des souches pathogènes, nous avons ensemencé ces derniers dans des tubes à essai contenant 10 ml du bouillon nutritif et du bouillon MRS respectivement ; ensuite incubés à 37°C pendant 24 heures.

III.2.5.1 Méthode des spots (double couche)

La méthode décrite par **Fijan. (2016)** a été appliquée ; après avoir coulé les boîtes de Pétri avec de la gélose MRS (solidifiée et séchée), des volumes de 3µl des suspensions bactériennes des souches de lactobacilles sont déposées en spots sur la surface, les boîtes sont séchées près du bec benzène pendant 30 minutes ensuite, les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 heures afin de permettre la diffusion culture dans la gélose puis incubées à 37°C pendant 18 h à 24h.

Après incubation la gélose MRS contenant les spots est recouverte d'une couche de 10 ml d'une gélose Mueller-Hinton (MH) en surfusion ensemencée avec 1 ml d'une culture jeune des souches pathogènes, puis les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h. Une zone claire de plus de 1 mm autour du spot est considérée comme positive.

III.2.5.2 Méthode des puits (surnageant)

Selon **Fijan. (2016)**, ce test permet de mettre en contact le surnageant des lactobacilles producteurs de substances antibactériennes avec les souches pathogènes de références. Les boîtes de pétri contenant le MH sont ensemencées par écouvillonnage avec les souches pathogènes, puis des puits de 6 mm de diamètre sont creusés à l'aide d'une pipette pasteur stérile dans la gélose, ensuite 100µl du surnageant obtenue après la centrifugation de la culture jeune des lactobacilles est déposées dans les puits ; les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 heures afin de permettre la diffusion du surnageant de culture dans la gélose ensuite incubés à 37°C pendant 18h (**Figure 10**).

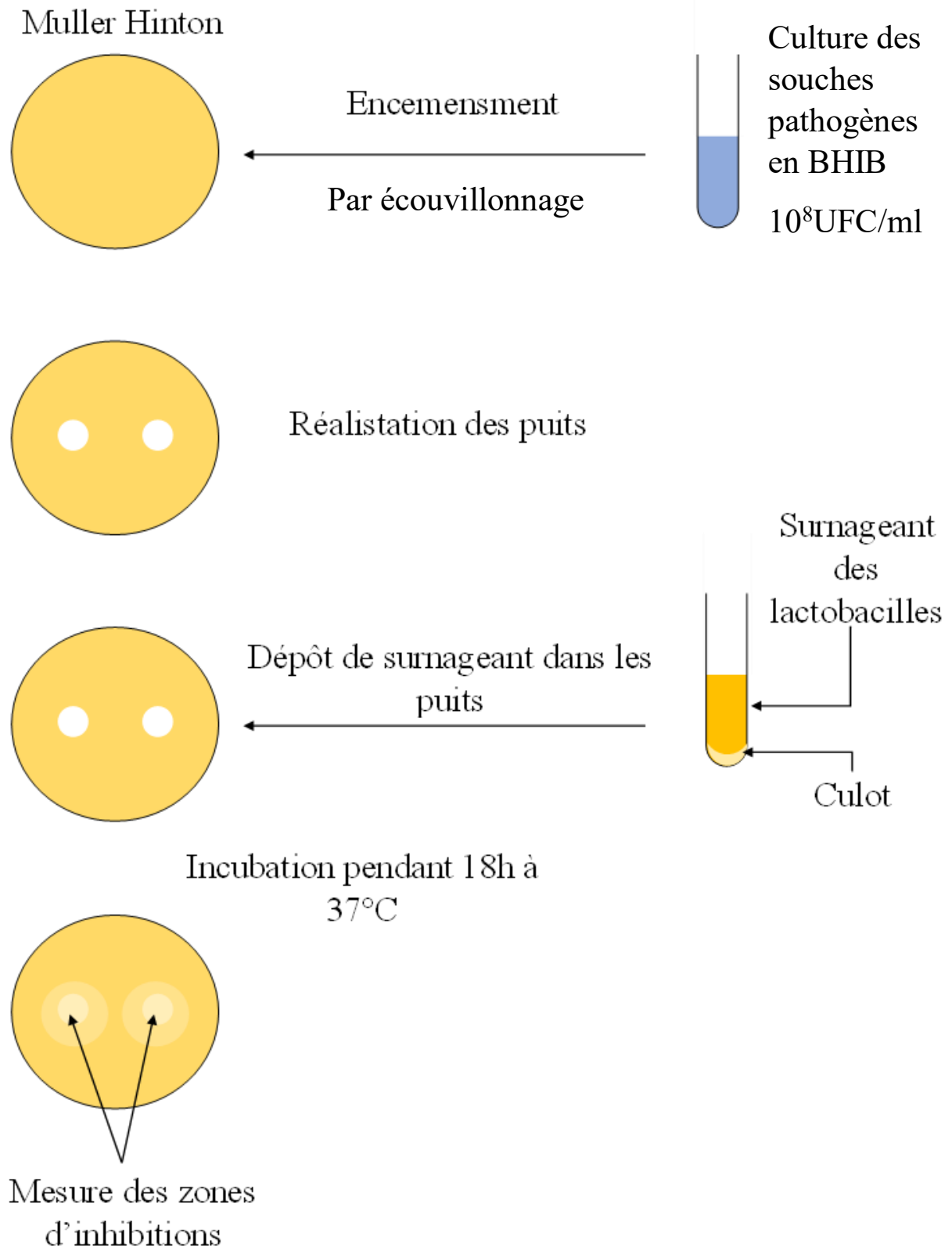


Figure 10 : Schéma illustrant la méthode des puits.

Chapitre 4 :
Résultats et discussion

Chapitre 4 : Résultats et discussion

IV.1 Échantillonnage et isolement

Dans le cadre de cette étude, trois échantillons de selles ont été prélevés auprès de trois nourrissons. Pour chaque échantillon ; une série de dilutions décimale a été réaliser afin d'isoler les souches du genre *Lactobacillus*. Après culture sur gélose MRS, 2 souches de *Lactobacillus* ont été isolées jusqu'à la 6^{ème} dilution à partir de la matière fécale des nourrissons avec une charge importante au niveau du 2^{ème} échantillon ; à l'exception de l'échantillon du 3ème nourrisson où la culture été négative.

IV.2 Purification des lactobacilles

Les souches de *Lactobacillus* isolées à partir de la matière fécale des nourrissons étaient purifiées par plusieurs repiquages successifs sur le milieu MRS, ce qui a permis d'obtenir deux isolats de souche pure des *Lactobacillus*.

IV.3 Identification des lactobacilles

Des colonies de morphologie similaire ont été isolées à partir des échantillons de selles des nourrissons 1 et 2. Les souches ont été caractérisées par la coloration de Gram, les tests de catalase et d'oxydase. La morphologie cellulaire a été déterminée par microscopie optique et électronique à balayage environnemental. De plus, des tests de fermentation des sucres et de croissance à différentes températures ont été réalisés

IV.3.1 Caractérisation phénotypique

a) Examen macroscopique

Après 24 à 48 heures d'incubation, la croissance bactérienne dans le milieu MRS est observable à l'œil nu, avec des colonies bactériennes visibles à la fois à la surface et en profondeur du milieu gélosé. Les colonies isolées de *Lactobacillus* mesurent généralement environ 0.5 à 1 mm de diamètre. Elles sont principalement de couleur blanche, parfois légèrement transparentes. Les colonies peuvent avoir une forme ronde avec un contour régulier ou parfois irrégulier. Les isolats présentent des variations dans leur aspect qui peut être soit lisse soit rugueux (**Figure 11**).

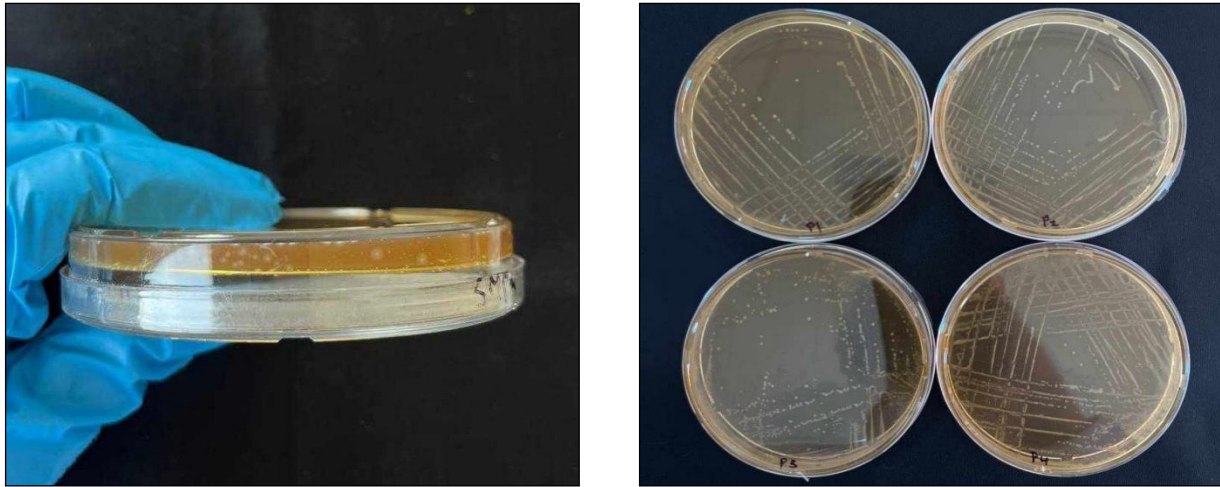


Figure 11 : Aspect macroscopique des colonies pures de deux souches de lactobacilles sur milieu MRS.

Nos observations sont en accord avec les caractéristiques macroscopiques décrites par **Badis et al. (2005)** ainsi que par **Denis et al. (2007)** et aussi par **Chidre et al. (2016)**.

b) Examen microscopique

- **Observation par microscope optique**

L'examen microscopique des deux souches isolées a révélé qu'elles étaient positives à la coloration de Gram avec deux formes dominantes : bacillaires et coccobacilles observés à la fois sous forme isolée et en chaînettes (**Figure 12 et 13**).

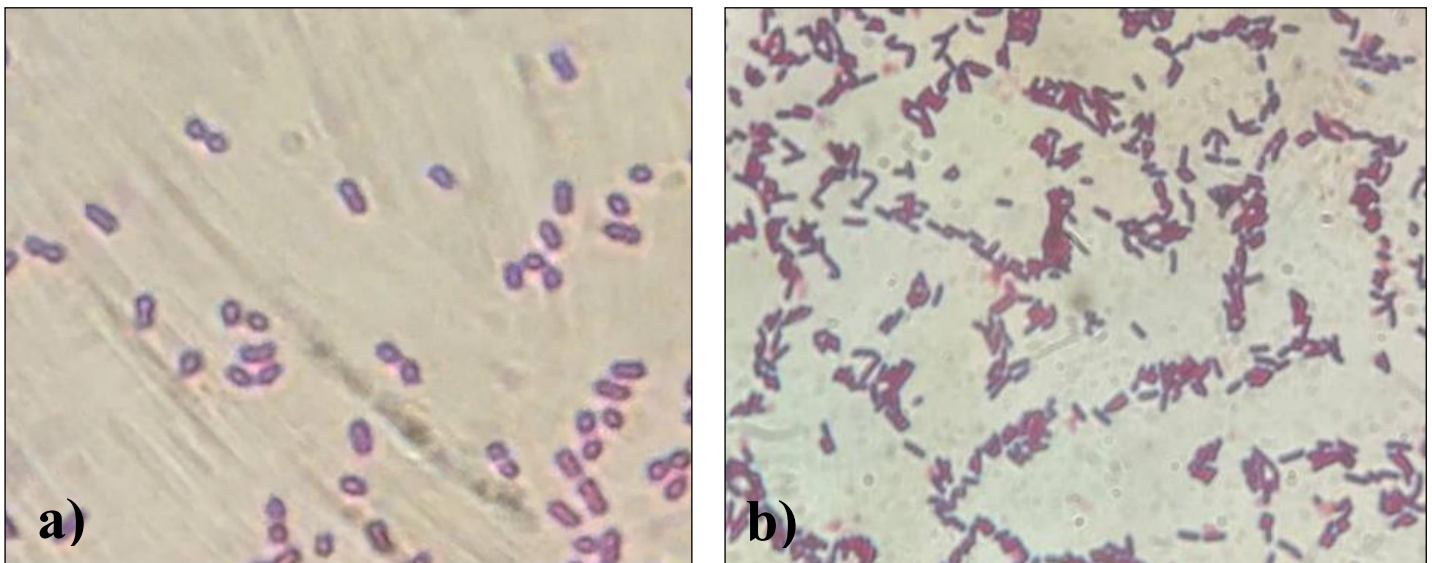


Figure 12 : Observation microscopique des *Lactobacillus* isolées de la matière fécale du premier nourrisson après coloration de gram (Gx100). **a)** après 24h d'incubation. **b)** après enrichissement.

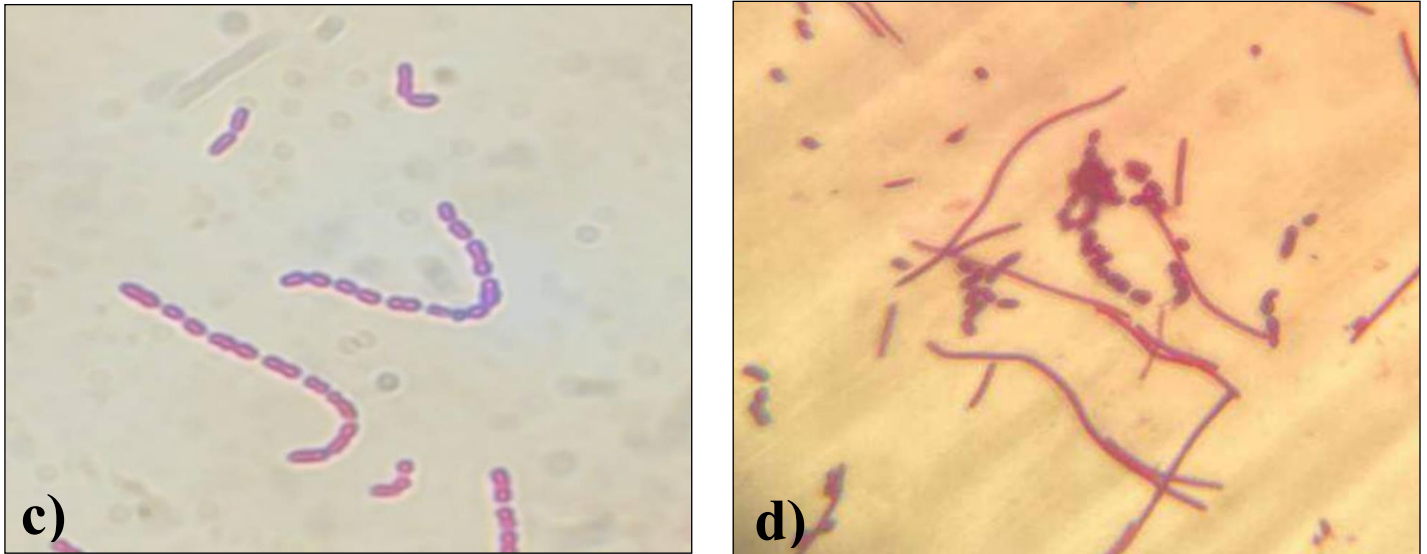


Figure 13 : Observation microscopique des *Lactobacillus* isolées de la matière fécale du deuxième nourrisson après coloration de gram (Gx100). **c)** après 24h d'incubation, **d)** après enrichissement.

Nos résultats sont en accord avec les études menées par **Kandler et Weise. (1986)** ainsi que par **Axelsson. (1993)**, qui indiquent que les souches de *Lactobacillus* sont classées parmi les bactéries à Gram positive et sont principalement composées de bacilles longs et fins ou de coccobacilles, ce qui confirme nos propres observations.

- **Observation par microscope électronique à balayage environnemental (MEBE)**

L'observation au microscope électronique à balayage environnemental a révélé des images en haute résolution des lactobacilles, mettant en évidence leur morphologie bacillaire alignée en chaînettes (**Figure 14**)

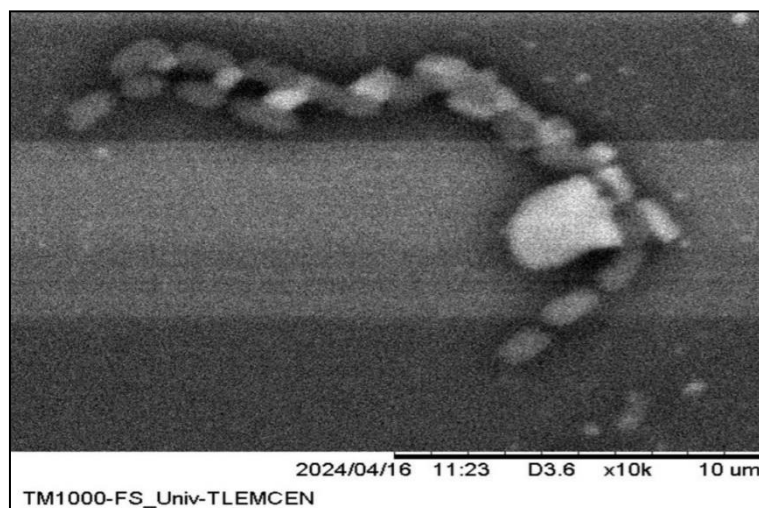


Figure 14 : Observation microscopique d'une souche de lactobacilles par MEBE (Gx10000).

Chapitre 4 : Résultats et discussion

Après nos observations à la fois macroscopique et microscopique et après chaque enrichissement ; les lactobacilles sont passés d'une forme isolée à une forme en chaînette, avec une augmentation remarquable de leurs quantités.

Selon **Leroi. (2009)**, le passage du *Lactobacillus* d'une forme isolée à une forme en chaînette ; et leurs capacités à se reproduire et à former est favorisé par leur capacité à proliférer dans des conditions de croissance favorables et à interagir spécifiquement entre eux.

IV.3.2 Caractérisation biochimique et physiologique

a) Test de catalase

L'absence de formation de bulles d'air après l'application de peroxyde d'hydrogène sur les colonies cibles indique que les deux souches de *Lactobacillus* ne possède pas la catalase (**Figure 15**).

Ce qui a été constaté par les résultats de **Kihal. (1996)** et **Carr et al. (2002)** que les bactéries Gram positive et dépourvu de la catalase sont généralement considérées comme des bactéries lactiques.

Selon le *Manuel de la Systématique Bactérienne de Bergey*, les *Lactobacillus* sont classés parmi les Firmicutes à catalase négative (**De Vos et al., 2009**).

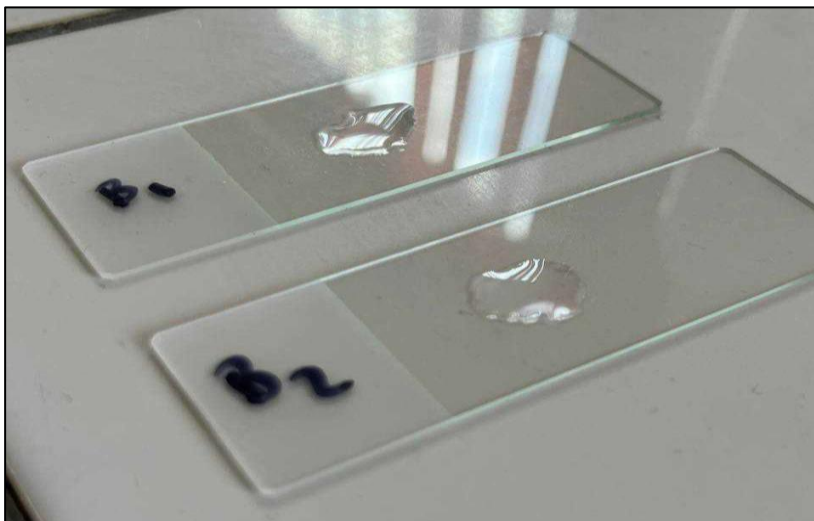


Figure 15 : Résultat négatif du test catalase

Chapitre 4 : Résultats et discussion

b) Test d'oxydase

Les deux souches étudiées n'ont pas montré de couleur violette et n'ont pas réagi avec les bandelettes d'oxydase (oxalate de N-diméthyle-paraphénylène-diamine), ce qui indique l'absence de cette enzyme (**Figure 16**). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Bernier et al. (2012)**.

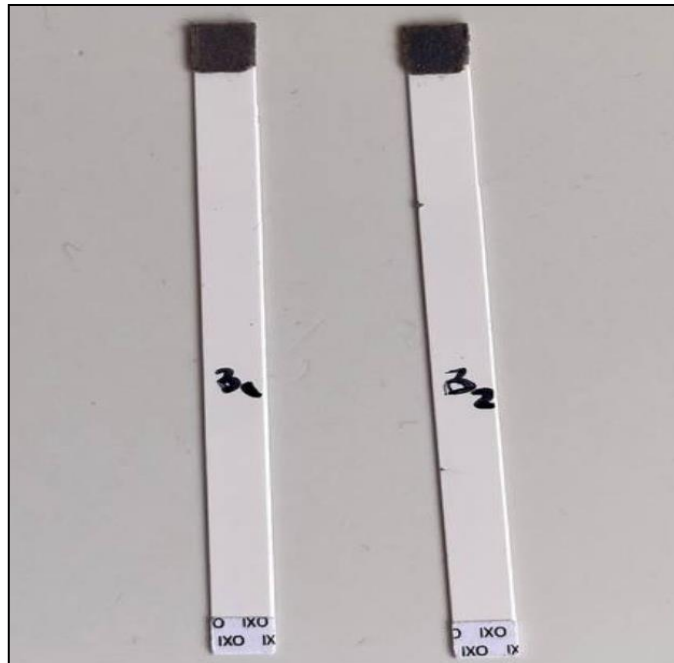


Figure 16 : Résultat négative du test d'oxydase.

c) Métabolisme des sucres

Selon **Denkova et al. (2017)** nos résultats obtenus dans la **figure 17**, la coloration jaune obtenue sur l'agar Triple Sugar Iron (TSI) pour les lactobacilles indiquent que les bactéries ont fermenté le glucose, le lactose et/ou le saccharose présents dans le milieu. Le changement de couleur signifie que la production d'acide a baissé le pH, résultant en une acidification du milieu. Ceci est cohérent avec le métabolisme fermentatif des lactobacilles, qui produisent des acides lors de la fermentation des sucres. Il n'y a pas de production de gaz (absence de bulles ou fissures) ni de H₂S (absence de noircissement).



Figure 17 : Résultats du Test TSI pour des Souches de *Lactobacillus* : Fermentation Acide Totale Indiquée par une coloration jaune uniforme.

d) Croissance à différents intervalles de température

Après 48h d'incubation ; la présence de trouble a été observé pour les lactobacilles incubés à 30°C et 37°C avec une croissance significative des souches à ces températures. Aucune croissance n'a été détectée à 55°C.

Selon **Yang et al. (2018)** les lactobacilles sont des bactéries mésophiles, ce qui signifie qu'elles croissent le mieux à des températures modérées optimalement entre 30°C et 37°C. Cette étude a mise en évidence la croissance de diverses souches de bactéries lactiques à différents intervalles de températures : confirmant que 37°C est une température idéale pour leur croissance, alors que à des températures plus élevées leur développement est inhibé à 55°C, ce qui est en accord avec nos résultats.

IV.4 Fréquence des lactobacilles dans les selles des nourrissons

Après avoir isolées et identifiées nos souches de *Lactobacillus* ; le **tableau 2** présente la détection de ces souches chez les trois nourrissons ainsi leurs caractéristiques cliniques respectives, permettant une analyse détaillée des corrélations entre les souches et les manifestations cliniques observées.

Chapitre 4 : Résultats et discussion

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques des nourrissons avec la charge des lactobacilles détectés.

Nourrisson	1	2	3
Age	48h	17 semaines	24h
Sexe	Femelle	Male	Male
Mode d'accouchement	Naturel	Naturel	Naturel
Allaitement	Maternel	Maternel et artificiel	Non allaité
Traitement antibiotique	Non	Non	Non
Détection des lactobacilles	Présence	Présence	Absence
Charge des lactobacilles	Moyenne	Importante	Absence

Selon **Birri et al. (2013)** le développement et la composition du microbiote intestinal varient d'une personne à l'autre et est influencés par divers facteurs, notamment le type d'alimentation, le mode d'accouchement (vaginal ou césarienne) ainsi que l'environnement et les conditions d'hygiène.

Nos souches de lactobacilles sont isolées à partir des nourrissons et né par voie basse ce qui en accord avec **Dominguez-Bello et al. (2010)** et **Birri et al. (2013)** de qui ont démontré que les nourrissons nés par voie basse présentent une prévalence plus élevée des lactobacilles dans leurs microbiote intestinal.

Zhang et al. (2020) avaient montré que la composition du microbiote intestinal en *Lactobacillus* des nourrissons âgés de 7 à 242 jours, leur présence est étroitement liée à celle du lait maternel et/ou du microbiote intestinal de leurs mères, suggérant un transfert direct de microflore entre les mères et les nourrissons.

Une recherche menée par le département de biologie de **Puerto Rico** a révélé des différences significatives dans la composition du méconium prélevé dans les premières 24 heures entre les nouveau-nés nés par césarienne et ceux nés par voie basse. Les enfants nés par voie basse avaient une flore bactérienne similaire à celle du vagin maternel, comprenant des espèces telles que *Lactobacillus* et

Chapitre 4 : Résultats et discussion

Prevotella, tandis que ceux nés par césarienne présentaient une composition bactérienne plus semblable à celle de la peau avec des espèces telles que : *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium* (Dominguez-Bello et al., 2010).

Pannaraj et al. (2017) a révélé que près de 40% des bactéries fécales chez les nourrissons allaités provenaient du lait maternel et de la peau de l'aréole ; le lait maternel représentant près de 30%. En outre, selon Cilieborg et al. (2012) la colonisation des lactobacilles dans le microbiote intestinal des nourrissons se produit généralement au deuxième ou au troisième jour de la vie. Tous ces facteurs peuvent expliquer la présence de nos souches ; dont le 1^{er} allaité naturellement avait une charge modérée de lactobacilles dans sa matière fécale tandis que le 2^{ème} de 17 semaines allaité de manière mixte (maternelle et artificielle) avait une charge importante et leur absence dans le 3^{ème} nourrisson.

Nos résultats sont similaires aux recherches de Zhang et al. (2020) qui ont montré que le lait maternel agit comme un vecteur pour le transfert des lactobacilles, et aussi la communauté de *Lactobacillus* observée été complexe, avec une grande variabilité en fonction de la croissance des nourrissons. La richesse spécifique en espèces et la diversité de la population des *Lactobacillus* dans le microbiote intestinal du nourrisson étaient similaires à celles de la population des *Lactobacillus* dans le lait maternel.

Zhang et al. (2020) ont également montré que la durée d'exposition à l'allaitement augmente la charge de lactobacilles ce qui pourrait expliquer les différences observées en fonction de l'âge du 1^{er} et du 2^{ème} nourrisson.

Le 2^{ème} nourrisson âgé de 17 semaines avait présenté une charge microbienne importante par rapport à l'autre, ce qui a été prouvé par (Cilieborg et al., 2012) ; qu'au septième jour, les nourrissons allaités au sein présentent une abondance significative de bactéries lactiques telles que les lactobacilles dans leur flore intestinale, ce qui contribue à une diversité bactérienne favorable et à un équilibre sain dans leur microbiote intestinal, cette observation peut être expliquée par une exposition prolongée aux lactobacilles maternels pendant l'accouchement et l'allaitement.

De plus, l'alimentation artificielle peut également influencer la présence des lactobacilles dans le microbiote intestinal, les probiotiques tels que les lactobacilles peuvent être introduits par des laits enrichis en probiotiques contribuant ainsi à maintenir une population saine de bactéries dans l'intestin.

Chapitre 4 : Résultats et discussion

Bien que des études suggèrent une variabilité de la composition de la flore intestinale entre les sexes à la naissance (**Cong et al., 2016**) et une prédominance de *Lactobacillus* chez les nouveau-nés de sexe féminin à la naissance (**Martin et al., 2016**), l'influence directe de sexe féminin du 1^{er} nourrisson et le sexe masculin du 2^{ème} nourrisson à cet âge précoce peut-être moins significative que d'autres facteurs tels que l'âge, la durée et le type d'alimentation semblent d'être des déterminants plus significatifs dans la charge des lactobacilles chez les nourrissons à un stade plus avancé du développement.

Le lien entre le microbiote intestinal et le sexe reste encore largement méconnu, peu d'études se sont penchées sur les différences de composition de la flore intestinale entre les sexes, mais les résultats semblent variés. **Gomez et al. (2016)** ont postulé que les hormones spécifiques à chaque sexe pourraient influencer la composition du microbiote en favorisant certaines souches bactériennes au détriment d'autres.

L'antibiothérapie est généralement déconseillée pour les nourrissons car cette dernière peut avoir un impact significatif sur le microbiote intestinal des nourrissons dont des études ont montré que sa peut réduire la diversité microbienne globale ; altérer la composition du microbiote intestinal et peut réduire les avantages associés à l'allaitement (**Vuillermin et al., 2015**).

Nos trois nourrissons n'ayant jamais pris des antibiotiques révèlent que leur microbiote intestinal est sain et équilibré. Selon une revue systématique décrite par **Zimmermann et Curtis. (2020)** ; une exposition aux antibiotiques mène à des diminutions significatives des bactéries bénéfiques telles que *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, ce qui est similaires aux résultats de **Korpela et al. (2018)**, qui ont observés une diminution marquée des populations microbiennes bénéfiques telles que les *Lactobacillus* suite à l'exposition des nourrissons aux antibiotiques ; cette réduction peut être dû à l'utilisation des antibiotiques à large spectre d'action qui ne font souvent pas de distinction entre les bactéries pathogènes et bénéfiques.

Chapitre 4 : Résultats et discussion

IV.5 Activité antibactérienne des lactobacilles

Afin de mieux comprendre comment nos bactéries lactiques « *Lactobacillus* » inhibent l'activité des souches pathogènes gastro-intestinales, nous avons utilisé la méthode de diffusion en puits et la méthode des spots. L'activité inhibitrice se manifeste par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits, ce qui nous permet de déterminer l'effet antibactérien des lactobacilles. Les résultats sont illustrés dans la figure 18.

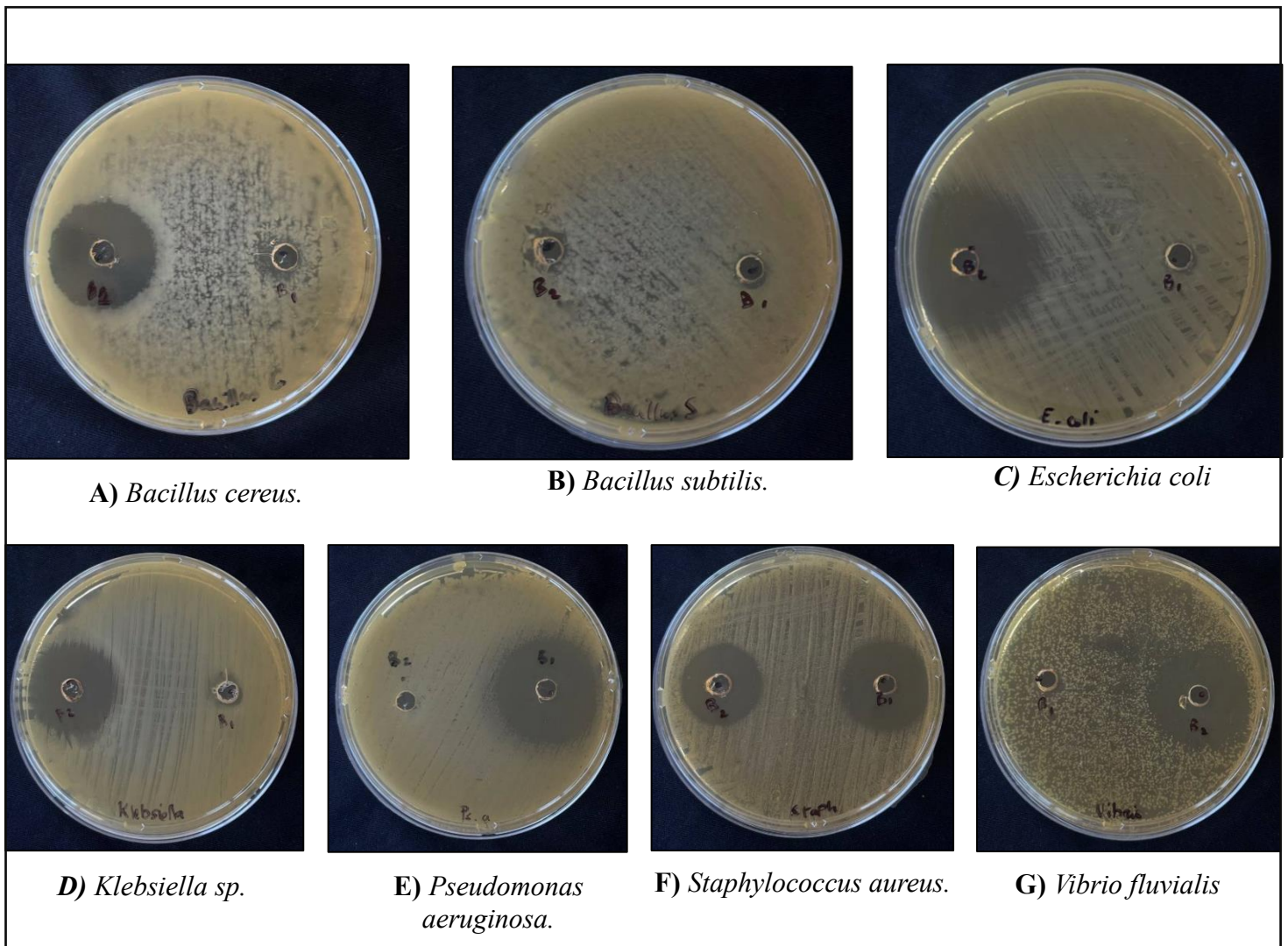


Figure 18 : Résultats des zones d'inhibitions de l'activité antibactériennes des lactobacilles vis à vis à des pathogènes gastro-intestinales. *Lb1* : à droite / *Lb2* : à gauche

Chapitre 4 : Résultats et discussion

La souche isolée à partir du 1^{er} nourrisson (*Lb1*) possède une bonne activité antibactérienne vis-à-vis des souches : *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* avec un spectre d'action entre 29 - 36 mm, une faible activité a été observée sur *Bacillus cereus* avec un spectre d'action de 7mm et sans effet sur : *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella sp.* et *Vibrio fluvialis* (**Tableau 3, Figure 19**).

La souche isolée à partir du 2^{ème} nourrisson (*Lb2*) possède une bonne activité antibactérienne vis-à-vis des souches : *E. coli* et *Vibrio fluvialis* avec un spectre d'activité de 32mm, une activité moyenne a été observée sur les souches : *Bacillus cereus*, *Klebsiella sp.* et *Staphylococcus aureus* avec un spectre d'action entre 26 - 28mm ; et une faible activité sur *Bacillus subtilis* de 3mm et sans effet sur *Pseudomonas aeruginosa* (**Tableau 3, Figure 19**).

Tableau 3 : Résultats des zones d'inhibitions de l'activité antibactériennes des lactobacilles isolées de la matière fécales vis à vis a des souches pathogènes

Souches	Gram	Lb1	Interprétation	Lb2	Interprétation
<i>B. Cereus</i>	Positive	13mm	Sensible	28mm	Sensible
<i>B. Subtilis</i>	Positive	X	Résistante	9mm	Intermédiaire
<i>E. coli</i>	Négative	X	Résistante	32mm	Sensible
<i>Klebsiella sp.</i>	Négative	X	Résistante	27mm	Sensible
<i>P. aeruginosa</i>	Négative	36mm	Sensible	X	Résistante
<i>S. aureus</i>	Positive	29mm	Sensible	26mm	Sensible
<i>Vibrio fluvialis</i>	Négative	X	Résistante	32mm	Sensible

Chapitre 4 : Résultats et discussion

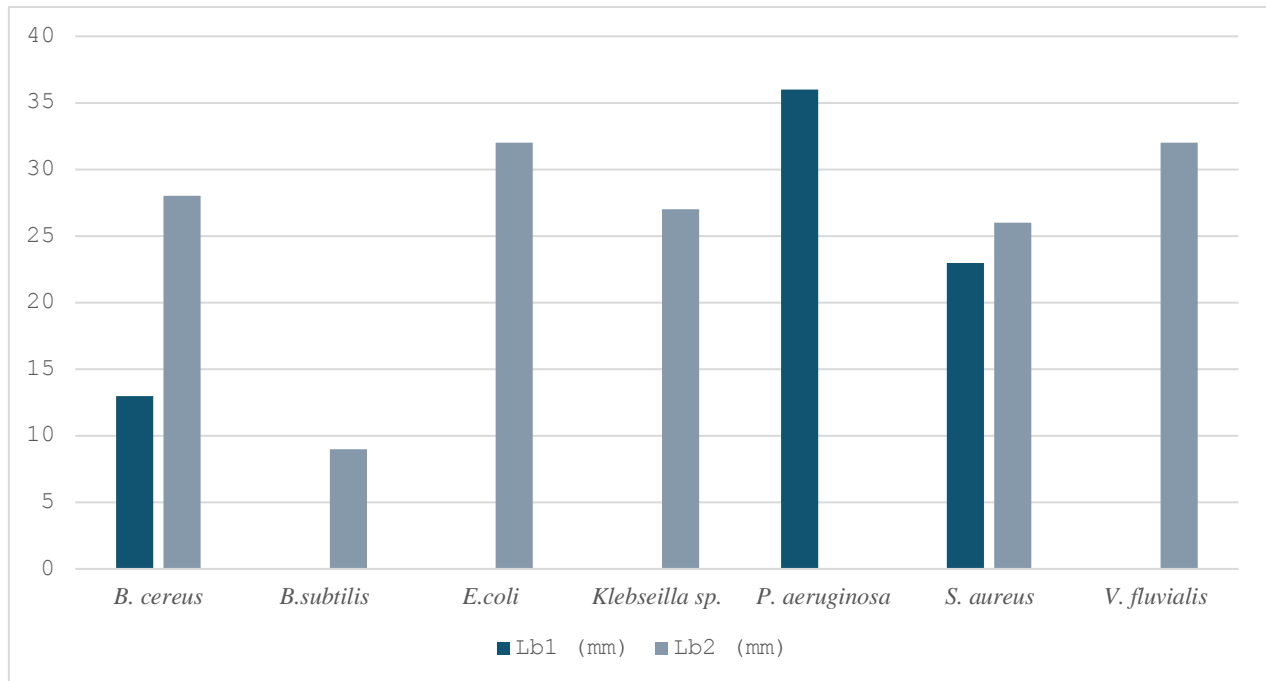


Figure 19 : Analyse comparative des résultats des zones d'inhibitions de l'activité antibactérienne des lactobacilles isolées de la matière fécales vis à vis des souches

Ces résultats indiquent que nos bactéries sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne.

Nos constatant que la souche *Lb2* est considérée comme étant la plus performante pour sa large activité antagoniste vis-à-vis des souches pathogènes gastro-intestinales testées soit un pourcentage de 86% (6/7) à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*. Tandis que la souche *Lb1* était active sur seulement trois des sept souches pathogènes soit un pourcentage de 43%.

Les travaux de **Kaur et al. (2018)** ont évalué l'activité antibactérienne des *Lactobacillus* isolées à partir de la matière fécale des nourrissons, dont le surnageant a inhibé spécifiquement les pathogènes gastro-intestinal et n'avait aucune action antimicrobienne contre les lactobacilles commensaux de l'intestin d'où les zones d'inhibition sur *E. coli* observées était d'environ à 14 mm, ce qui est nettement inférieur à nos résultats pour (*Lb2*) où nous avons marqué une zone d'inhibition de 32 mm, pareil pour l'activité sur *Staphylococcus aureus* a marqué des zones d'inhibition d'environ 19 à 22mm ce qui est inférieur à nos résultats qui dépasse les 25mm.

Chapitre 4 : Résultats et discussion

Aussi L'étude de **Demirok et al. (2021)** a constaté que de nombreuses souches de *Lactobacillus* ont marquées des effets antagonistes élevés vis-à-vis des souches pathogènes d'*E. coli* et de *Staphylococcus aureus*.

Les études de **Kaur et al. (2018)** ont montré que les lactobacilles avaient aussi une forte activité antibactérienne sur les souches de *Vibrio sp.* notamment *Vibrio Cholerae* productrices de biofilm où les zones d'inhibition observées étaient comprises entre 16 et 26 mm, ce qui est inférieure à nos résultats pour *Vibrio fluvialis*. Les souches de *Lactobacillus* produisent du peroxyde d'hydrogène qui présente une activité antimicrobienne contre diverses bactéries Gram négatives (**Pridmore et al., 2008**) ce qui peut expliquer l'inhibition de *Vibrio fluvialis* par (Lb2).

Shokryazdan et al. (2014) ont mise en évidence l'inhibition de *Klebsiella pneumoniae* par des lactobacilles avec des zones d'inhibition proche à 10mm ce qui est inferieure a nous résultats qui dépassait les 25mm.

Nos résultats sont aussi similaires à ceux de **Tulumoglu et al. (2013)**, **Bahri et al. (2014)** et **Halimi et Mirsalehian. (2016)**, qui ont rapporté une bonne activité antibactérienne pour toutes les souches de *Lactobacillus* testés et isolées à partir de la matière fécale des nourrissons vis-à-vis des bactéries pathogènes gastro-intestinales : *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, et *B. cereus*.

Une étude similaire a été rapporter sur l'isolement des lactobacilles probiotiques à partir de 30 échantillons de selles des nourrissons allaités au sein en bonne santé (âgés de 1 à 3 mois) ; les lactobacilles ont inhibé la croissance des agents pathogènes gastro-intestinaux telles : *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* (**Hawal et al., 2023**).

Concernant la souche *Bacillus subtilis* nous ayons observé une inhibition marginale de seulement 3mm par la souche Lb2, cela soulève des questions importantes sur la résistance de *Bacillus subtilis* aux probiotiques. Ces résultats s'alignent avec l'étude de **Dabiré et al. (2022)** qui ont identifié des souches de *Bacillus subtilis* dans les condiments traditionnels fermentés, qui ont présentées un potentiel pathogène, notamment une activité β -hémolytique. Cette activité pathogène peut expliquer la faible sensibilité de *Bacillus subtilis* à nos souches de lactobacilles.

Conformément aux rapports précédents, presque toutes les cultures de *Lactobacillus* ont montré des effets antimicrobiennes sur la majorité des bactéries pathogènes gastro-intestinales ; l'activité antibactérienne des *Lactobacillus* est de grande importance pour une colonisation réussie des muqueuses

Chapitre 4 : Résultats et discussion

intestinales, ces organismes peuvent fonctionner comme des barrières microbiennes contre les pathogènes gastro-intestinaux par exclusion compétitive, modulation du système immunitaire de l'hôte et production de composés inhibiteurs (Al-Dhabi et al., 2020 ; Barzegar et al., 2021).

L'étude de l'activité antibactérienne des lactobacilles, en particulier leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes gastro-intestinales, révèle des mécanismes essentiels qui sous-tendent leur potentiel en tant qu'agents probiotiques. Plusieurs études ont suggéré que cette activité antimicrobienne de ces bactéries lactiques pouvait être attribuée à divers facteurs ; notamment à la réduction du pH, l'adhérence compétitive à l'épithélium, la compétition pour les substrats et la production des composés inhibiteurs tels que les acides organiques, peroxyde d'hydrogène, et de substances bactéricides ou bactériostatiques telles que les bactériocines (Servin, 2004 ; Kirtzalidou et al., 2011).

Selon Juven et Pierson. (1996) le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) libéré par les lactobacilles intestinaux affecte principalement les bactéries Gram négatives plus que les bactéries Gram positives. Les bactéries Gram positives possèdent une couche de peptidoglycane plus épaisse qui leur confère une meilleure protection contre les dommages oxydatifs. Bien que le peroxyde d'hydrogène puisse inhiber la croissance des deux types de bactéries dans une certaine mesure, les bactéries Gram négatives sont généralement plus sensibles au stress oxydatif provoqué par la molécule en raison de leur couche de peptidoglycane plus mince et la présence des lipopolysaccharides (LPS) dans leur membrane externe.

Les bactériocines ont généralement une spécificité et une efficacité plus élevées contre les bactéries Gram positives qui ne possèdent pas la membrane externe protectrice présente chez les bactéries Gram négatives qui agit comme une barrière ; ce qui les rend plus vulnérables dont cette membrane externe empêche les bactériocines d'atteindre leur site cible (Cotter et al., 2005), le même mécanisme a été observé pour l'acide lactique libéré par les lactobacilles (Reid et al., 2003).

L'activité antimicrobienne des lactobacilles est principalement attribuée à la production d'acides organiques, notamment l'acide lactique ; en abaissant le pH du milieu environnant, créant ainsi un environnement hostile pour les pathogènes tout en préservant les lactobacilles commensaux ; cela confirme le rôle crucial de l'acidité dans l'activité antibactérienne des lactobacilles. Les souches de lactobacilles montrent une activité antimicrobienne significative contre plusieurs bactéries Gram

Chapitre 4 : Résultats et discussion

positives, telles que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* ; qui est probablement dû à la production des bactériocines et d'autres substances inhibitrices.

Malgré que les deux isolats avaient inhibés des souches Gram + et Gram - et que la souche *Lb2* avait une forte activité antibactérienne vis-à-vis la majorité des souches, cet isolat n'avait aucun effet contre *Pseudomonas aeruginosa* initialement inhibé par la souche *Lb1* ; ce qui suggèrent que y a-t-il d'autres facteurs qui contrôle les différents mécanismes d'inhibitions telles que les facteurs génétique ou environnementaux et chaque souche a ses propres caractéristiques.

Le potentiel probiotique des souches de lactobacilles naturellement isolées du tractus gastro-intestinal des nourrissons doit être souligné. Les bactéries lactiques tels que les lactobacilles d'origine humaine ont un potentiel probiotique actuellement efficace et plus important que les bactéries lactiques provenant d'autres sources en raison de leurs adaptation à l'environnement gastro-intestinal humain (**Gu, Yang, et al., 2008 ; Kirtzalidou et al., 2011**), et des études récents indique que la microflore fécale des nourrissons en bonne santé constitue une bonne origine pour l'isolement de différentes espèces de *Lactobacillus* présentant un potentiel probiotique (**Davoodabadi, 2015**).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le microbiote intestinal des nourrissons joue un rôle crucial dans leur développement et leur santé, en contribuant à la maturation du système immunitaire et à la protection contre les infections gastro-intestinales.

Cette étude a permis d'isoler et d'identifier deux souches de *Lactobacillus sp.* à partir de la matière fécale des nourrissons dans la région de Tlemcen, tout en étudiant les facteurs qui influent leur implantation dans le microbiote intestinal ; nos souches étaient isolées à partir des nourrissons qui dépassaient les 24h de naissance, nés par voie basse et allaités au sein.

Les résultats de cette étude ont mis en évidence l'importance du microbiote intestinal dans la protection contre les infections gastro-intestinales, en mettant en avant l'activité antibactérienne de ces souches de *Lactobacillus sp.* Les tests de l'activité antibactériennes ont montré une inhibition notable contre plusieurs pathogènes gastro-intestinaux majeurs, notamment *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Vibrio fluvialis*.

L'isolat *Lb2* s'est particulièrement distingué en inhibant 86% des souches dont *V. fluvialis* et *S. aureus* sont forte formatrice de biofilm. Et malgré que l'isolat *Lb1* a inhibé que 43% des souches ; ce dernier a marqué une haute inhibition vis-à-vis *P. aeruginosa* qui est fortement formatrice de biofilm.

Cette étude souligne le potentiel thérapeutique des souches de *Lactobacillus sp.* en tant qu'agents probiotiques. L'intégration de ces souches dans les traitements pourrait permettre de réduire la dépendance aux antibiotiques, minimisant ainsi le risque de résistance bactérienne et les effets secondaires associés.

Pour consolider ces avancées et explorer leur application clinique, plusieurs perspectives de recherche se dessinent :

- Études sur un plus grand nombre d'échantillons pour garantir la robustesse des conclusions.
- Identification précise des souches isolées à l'aide de tests biochimiques comme plaque API 50 CH, ainsi des tests moléculaires.
- Répétition des tests antibactériens dans le but de confirmer les résultats obtenus.
- Caractérisation des mécanismes d'action des lactobacilles pour une meilleure compréhension de leur efficacité contre les pathogènes gastro-intestinaux.
- Évaluation de leur effets anti-biofilms sur les pathogènes gastro-intestinaux.

Conclusion et perspectives

- Mise en place d'essais cliniques rigoureux pour l'évaluation de l'efficacité et la sécurité des probiotiques chez les nourrissons.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Adams, M. R., & Moss, M. O.** (2000). *Food Microbiology* (2nd ed.). The Royal Society of Biochemistry, Cambridge, UK, pp. 318-323.
2. **Afssa.** (2005). *Effects of probiotics and prebiotics on flora and immunity in adults* (Vol. 1, p. 126).
3. **Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A. M., Takagi, A., & Koga, Y.** (1998). Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *American Journal of Gastroenterology*, 93(11), 2097-2101.
4. **Al Kassaa, I., Mechemchani, S., Zaylaa, M., Ismail, M. B., El Omari, K., Dabboussi, F., & Hamze, M.** (2019). Characterization of lactobacilli strains isolated from baby's feces for their potential immunobiotic application. *Iranian Journal of Microbiology*, 11(5), 379–388.
5. **Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M.** (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2001-2005.
6. **Al-Dhabi, N. A., Valan Arasu, M., Vijayaraghavan, P., Esmail, G. A., Duraipandiyar, V., Kim, Y. O., Kim, H., & Kim, H. J.** (2020). Probiotic and Antioxidant Potential of *Lactobacillus reuteri* LR12 and *Lactobacillus lactis* LL10 Isolated from Pineapple Puree and Quality Analysis of Pineapple-Flavored Goat Milk Yoghurt during Storage. *Microorganisms*, 8(10), 1461.
7. **Allton, D. R., Forgione, M. A., Jr., & Gros, S. P.** (2006). Cholera-like presentation in *Vibrio fluvialis* enteritis. *Southern Medical Journal*, 99, 765–767.
8. **American Society for Microbiology.** (2005). *Triple Sugar Iron (TSI) Agar Protocols*.
9. **Axelsson, L.** (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In S. Salminen & A. Von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria* (pp. 1-63). Marcel Dekker Inc.
10. **Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R.** (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle". *Science and Technologie*, 23, 30-37.
11. **Bahri, F., Lejeune, A., Dubois, R., Elmejdoub, T., Boulahrouf, A., & Thonart, P.** (2014). Characterization of *Lactobacillus* strains from Algerian children feces for their probiotic properties. *African Journal of Microbiology Research*, 8(3), 297–303.

Références bibliographiques

12. **Barbier, F., & Wolff, M.** (2010). Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*: vers l'impasse thérapeutique? *Medecine sciences : M/S*, 26(11), 960–968.
13. **Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Falah, F.** (2021). Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian raw milk cheeses. *Food Science & Nutrition*, 9(8), 4094–4107.
14. **Beecher, D. J., & Wong, A. C. L.** (1997). Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interaction and model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 233-239.
15. **Beijerinck, M.** (1901). Anhäufungsversuche mit ureumbakterien. Ureumspaltung durch urease und durch katabolismus. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene II Abteilung*, 7, 33–61.
16. **Belkheziz, L.** (2020). *Les Lactobacilles : Rôle physiologique et intérêt en santé humaine* (Thèse de doctorat en pharmacie). Université Mohammed V de Rabat, Maroc, 13-14.
17. **Bernier, M., Njomnang Soh, P., Lochet, A., Prots, L., Félice, R., Senescau, A., Fabre, R., & Philippon, A.** (2010). *Lactobacillus delbrueckii*: Agent probable des infections des voies urinaires chez les femmes très âgées. *Pathologie Biologie*, 60(2), 140-142.
18. **Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J., & Leschine, S.** (2013). Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity*, 5, 627-640.
19. **Bien, J., Palagani, V., & Bozko, P.** (2013). The intestinal microbiota dysbiosis and *Clostridium difficile* infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(1), 53-68.
20. **Birri, D. J., Brede, D. A., Tessema, G. T., & Nes, I. F.** (2013). Bacteriocin production, antibiotic susceptibility and prevalence of haemolytic and gelatinase activity in faecal lactic acid bacteria isolated from healthy Ethiopian infants. *Microbial Ecology*, 65(2), 504-516.
21. **Campeotto, F., Waligora-Dupriet, A. J., Doucet-Populaire, F., Kalach, N., Dupont, C., & Butel, M. J.** (2007). Establishment of the intestinal microflora in neonates. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 31(5), 533–542.

Références bibliographiques

22. Carr, F., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281-370.
23. Celandroni, F., Salvetti, S., Gueye, S. A., Mazzantini, D., Lupetti, A., Senesi, S., & Ghelardi, E. (2016). Identification and pathogenic potential of clinical Bacillus and Paenibacillus isolates. *PLOS ONE*, 11(3), e0152831.
24. Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (2001). Quality control *Lactobacillus* isolates for use with the API50 CH and API ZYM systems at 37 °C. *Journal of Basic Microbiology*, 41, 241–251.
25. Chidre, P., & Kelmani, C. R. (2018). Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic Lactobacilli strains isolated from commercial Yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental*, 23, 1-7.
26. Chong, P. P., Chin, V. K., Looi, C. Y., Wong, W. F., Madhavan, P., & Yong, V. C. (2019). The microbiome and irritable bowel syndrome: A review on the pathophysiology, current research and future therapy. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1136.
27. Chuang, C. H., Wang, Y. H., Chang, H. J., Chen, H. L., Huang, Y. C., Lin, T. Y., Ozer, E. A., Allen, J. P., Hauser, A. R., & Chiu, C. H. (2014). Shanghai fever: A distinct *Pseudomonas aeruginosa* enteric disease. *Gut*, 63(5), 736-743.
28. Cibik, R., Marcille, F., Corthier, G., & Dore, J. (2004). [Intestinal flora: development, characteristics, and influence of the type of feeding]. *Archives de Pédiatrie*, 11, 573-575.
29. Cilieborg, M. S., Boye, M., & Sangild, P. T. (2012). Bacterial colonization and gut development in preterm neonates. *Early Human Development*, 88, S41–S49.
30. Coico, R. (2001). Gram staining. *Current Protocols in Immunology*, Appendix 3, Appendix 3O.
31. Collins, J. W., La Razione, R. M., Woodward, M. J., & Searle, L. E. J. (2009). Application of prebiotics and probiotics in livestock. In Charalampopoulos, D., & Rastall, R. A. (Eds.), *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* (pp. 1123–1192). Springer, New York, NY.
32. Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Letters*, 46, 269-280.

Références bibliographiques

33. Cong, X., Xu, W., Janton, S., Henderson, W. A., Matson, A., McGrath, J. M., Maas, K., & Graf, J. (2016). Gut microbiome developmental patterns in early life of preterm infants: Impacts of feeding and gender. *PLOS ONE*, 11, e0152751.
34. Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(10), 777–788.
35. Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(10), 777–788.
36. Cukrowska, B., Bierła, J. B., Zakrzewska, M., Klukowski, M., & Maciorkowska, E. (2020). The relationship between the infant gut microbiota and allergy: The role of *Bifidobacterium breve* and prebiotic oligosaccharides in the activation of anti-allergic mechanisms in early life. *Nutrients*, 12(4), 946.
37. Dabiré, Y., Somda, N. S., Somda, M. K., et al. (2022). Molecular identification and safety assessment of *Bacillus* strains isolated from Burkinabe traditional condiment “soubala”. *Annals of Microbiology*, 72, 10.
38. Davoodabadi, A., Soltan Dallal, M. M., Rahimi Foroushani, A., Douraghi, M., Sharifi Yazdi, M. K., & Amin Harati, F. (2015). Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. *Anaerobe*, 34, 53–58.
39. De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130-135.
40. De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (2009). Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes* (Vol. 3, pp. 19-511). Springer, New York.
41. Dellaglio, F., & Felis, G. E. (2005). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. In *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects* (pp. 25-49). Caister Academic Press, Norfolk, UK.
42. Demirok, N. T., Durak, M. Z., & Arici, M. (2022). Probiotic lactobacilli in faeces of breastfed babies. *Food Science and Technology*, 42, e24821.
43. Denis, F., Poly, M. C., Bengen, E., & Quentin, R. (2007). *Bactériologie médicale, techniques usuelles* (2ème éd., 417 p.). Elsevier Masson, Paris.
44. Denkova, R., Goranov, B., Teneva, D., Denkova, Z., & Kostov, G. (2017). Antimicrobial activity of probiotic microorganisms: Mechanisms of interaction and methods of examination.

Références bibliographiques

45. **Desai, A.** (2008). Strain identification, viability and probiotic properties of *Lactobacillus casei* (Thèse de doctorat). School of Biomedical and Health Sciences, Victoria University, Werribee campus, Victoria, Australia.
46. **Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R.** (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971–11975.
47. **Dortu, C., & Thonart, P.** (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 3(1), 143-154.
48. **Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A.** (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728), 1635–1638.
49. **Evrard, B., Bonnet, B., Jubelin, G., & Bernalier-Donadille, A.** (2019, April 1). Le microbiote comme outil thérapeutique dans l'allergie alimentaire. *Revue Française D'allergologie*.
50. **Fiedler, G., Schneider, C., Igbinsosa, E. O., Kabisch, J., Brinks, E., Becker, B., Bulla, J., Klein, G., Huch, M., & Franz, C. M. A. P.** (2019). Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. *BMC Microbiology*, 19(1), 1.
51. **Fijan, S.** (2016). Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(4), 474.
52. **Fontenille, D., Lagneau, C., Lecollinet, S., Lefait Robin, R., Setbon, M., Tirel, B., & Yébakima, A.** (Éds.). (2009). Modes de transmission des agents infectieux / La dynamique de la maladie versus celle de l'infectiosité. In *La lutte antivectorielle en France* (1st ed.). IRD Éditions.
53. **Fuller, R.** (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*, 32, 439–442.
54. **Garcia-Gutierrez, E., O'Connor, P. M., Colquhoun, I. J., Vior, N. M., Rodríguez, J. M., Mayer, M. J., Cotter, P. D., & Narbad, A.** (2020). Production of multiple bacteriocins, including the novel bacteriocin *gassericin M*, by *Lactobacillus gasseri* LM19, a strain isolated from human milk. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(9), 3869–3884.

Références bibliographiques

55. **Gatti, M., Trivisano, C., Fabrizi, E., Neviani, E., & Gardini, F.** (2004). Biodiversity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from different natural whey starter cultures as revealed by classification trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 70.
56. **Gomez, A., Luckey, D., & Taneja, V.** (2015). The gut microbiome in autoimmunity: Sex matters. *Clinical Immunology*, 159, 154–162.
57. **Gorbach, S. L.** (1996). Microbiology of the gastrointestinal tract. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed., Chapter 95). Galveston, TX: University of Texas Medical Branch at Galveston.
58. **Goulet, O.** (2009). La flore intestinale : un monde à préserver. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 22, 102–106.
59. **Granum, P. E.** (1994). *Bacillus cereus* and its toxins. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*, 23, 61S–66S.
60. **Gröndlund, M. M., Lehtonen, O. P., Eerola, E., & Kero, P.** (1999). Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: Permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 28, 19–25.
61. **Gu, R. X., Yang, Z. Q., Li, Z. H., Chen, S. L., & Luo, Z. L.** (2008). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe*, 14(6), 313–317.
62. **Gueimonde, M., Jalonen, L., He, F., Hiramatsu, M., & Salminen, S.** (2006). Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Research International*, 39, 467–471.
63. **Guiraud, J. P.** (1998). Techniques d'analyse microbiologique. In « Microbiologie alimentaire ». Dunod éd., Paris, France, pp. 171-246.
64. **Halimi, S., & Mirsalehian, A.** (2016). Assessment and comparison of probiotic potential of four *Lactobacillus* species isolated from feces samples of Iranian infants. *Microbiology and Immunology*, 60(2), 73–81.
65. **Hammes, W. P., & Hertel, C.** (2006). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes, A Handbook of*

Références bibliographiques

- the Biology of Bacteria* (3rd ed., Vol. 4, pp. 320-403). Springer Science + Business Media, LLC, NY, USA. ISBN-10: 0-387-25494-3.
66. **Harmsen, H. J., Gibson, G. R., Elfferich, P., Raangs, G. C., Wildeboer-Veloo, A. C., & Argaiz, A.** (2000). Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *183*(1), 125–129.
67. **Harris, J. B., LaRocque, R. C., Qadri, F., Ryan, E. T., & Calderwood, S. B.** (2012). Cholera. *Lancet*, *379*(9835), 2466–2476.
68. **Hawal, A.I.M, Hussin F.E.T., Gad, S.M.H., & Mohamed, G.I.M** (2023). Recent emerging gut microbiota management modalities in acute cases of diarrhea in children: A comparative study review about use of probiotics. *Journal of probiotics & health*, 11.330.
69. **Herrmann, E., Young, W., Reichert-Grimm, V., Weis, S., Riedel, C. U., Rosendale, D., Stoklosinski, H., Hunt, M., & Egert, M.** (2018). In Vivo Assessment of Resistant Starch Degradation by the Caecal Microbiota of Mice Using RNA-Based Stable Isotope Probing-A Proof-of-Principle Study. *Nutrients*, *10*(2), 179.
70. **Hill, M. J.** (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, *6*(Suppl 1), S43–S45.
71. **Hoff, R. T., Patel, A., & Shapiro, A.** (2020). *Pseudomonas aeruginosa*: An Uncommon Cause of Antibiotic-Associated Diarrhea in an Immunocompetent Ambulatory Adult. *Case Reports in Gastrointestinal Medicine*, 2020, 6261748.
72. **Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U.** (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, *73*(2 Suppl), 365S-373S.
73. **Hoogkamp-Korstanje, J.A., Linder, J. G., Marcelis, J. H., den Daas-Slagt, H., & de Vos, N. M.** (1979). Composition of the human intestinal flora. *Antonie van Leeuwenhoek* , *45* (1), 35- 40.

Références bibliographiques

74. **Houghteling, P. D., & Walker, W. A.** (2015). Why is initial bacterial colonization of the intestine important to infants' and children's health? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 60(3), 294–307.
75. **Huang, C.-H., Li, S. W., Huang, L., & Watanabe, K.** (2018). Identification and Classification for the *Lactobacillus casei* Group. *Frontiers in Microbiology*, 9.
76. **Hyršlova, I., Drab, V., Cihlar, J., Krausova, G., Mrvikova, I., Kana, A., Stetina, J., & Musilova, S.** (2023). Functional and probiotic characterization of newly isolated strains from infant feces and breast milk. *Fermentation*, 9(11), 960.
77. **Isolation of Probiotic Lactobacilli.** (2023). *Journal of Probiotics & Health*, 11(3), 376.
78. **Isolauri, E., Salminen, S., & Ouwehand, A. C.** (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18, 299-313.
79. **Jamalifar, H., Rahimi, H., Samadi, N., Shahverdi, A. R., Sharifian, Z., Hosseini, F., Eslahi, H., & Fazeli, M.** (2011). Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi-drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(1), 21-25.
80. **Jay, J. M.** (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 525–532.
81. **Joainig, M. M., Gorkiewicz, G., Leitner, E., et al.** (2010). Cytotoxic effects of *Klebsiella oxytoca* strains isolated from patients with antibiotic-associated hemorrhagic colitis or other diseases caused by infections and from healthy subjects. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 817–824.
82. **Juven, B. J., & Pierson, M. D.** (1996). Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *Journal of Food Protection*, 59(11), 1233-1241.
83. **Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H., & Isolauri, E.** (2003). Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*, 361(9372), 1869–1871.
84. **Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H., & Isolauri, E.** (2003). Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 361(9372), 1869–1871.

Références bibliographiques

85. **Kandler, O., & Weiss, N.** (1986). Genus *Lactobacillus*. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol. 2, pp. 1209-1220). Williams and Wilkins, Baltimore, M.D.
86. **Karampatakis, T., Tsergouli, K., & Behzadi, P.** (2023). Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(2), 234.
87. **Kassaa, I. A., Mechemchani, S., Zaylaa, M., Ismail, M. B., Omari, K. E., Dabboussi, F., & Hamze, M.** (2019). Characterization of lactobacilli strains isolated from baby's feces for their potential immunobiotic application. *Iranian Journal of Microbiology*.
88. **Kaur, C. P., Vadivelu, J., & Chandramathi, S.** (2018). Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases. *Journal of Digestive Diseases*, 19(5), 262–271.
89. **Kerckhoffs, A. P. M., Ben-Amor, K., Samsom, M., van der Rest, M. E., de Vogel, J., Knol, J., & Akkermans, L. M. A.** (2011). Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome. *Journal of Medical Microbiology*, 60(Pt 2), 236-245.
90. **Kihal, M.** (1996). Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, élément d'application en technologie fromagère type fromage bleu (Thèse de doctorat d'État). Université d'Oran. 167p.
91. **Kim, Y. S., & Ho, S. B.** (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, 12, 319-330.
92. **Kim, Y., Oh, S., Park, S., & Kim, S. H.** (2009). Interactive transcriptome analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 and intestinal epithelial HT-29 cells after bacterial attachment. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 224-232.
93. **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.
94. **Korpela, K., Salonen, A., Vepsäläinen, O., et al.** (2018). Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic-treated and in caesarean-born infants. *Microbiome*, 6, 182.

Références bibliographiques

95. **Kovacs, N.** (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178, 703.
96. **Kramer, J. M., & Gilbert, R. J.** (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In M. P. Doyle (Ed.), *Foodborne bacterial pathogens* (pp. 21-50). Marcel Dekker, Inc.
97. **Lagha, A. B., Haas, B., Gottschalk, M., & Grenier, D.** (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary Research*, 48(1), 22.
98. **Larpent, J. P.** (2000). *Introduction à la nouvelle classification bactérienne: Les principaux groupes bactériens*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France, pp. 174-182.
99. **Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S. L., Di Leo, A., & Visconti, A.** (2008). Antagonistic activity of potential probiotic lactobacilli against the ureolytic pathogen *Yersinia enterocolitica*. *Current Microbiology*, 56, 175–181.
100. **Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C.** (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 171–184.
101. **Leclerc, M., Juste, C., Blottière, H., & Doré, J.** (2007). Microbiote intestinal: un univers méconnu. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42(1), 22–27.
102. **Lee, Y. K., & Mazmanian, S. K.** (2010). Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*, 330, 1768–1773.
103. **Leroi, F.** (2009). Bactéries lactiques et applications alimentaires. In D. Drider & H. Prévost (Eds.), *Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications Industrielles des bactéries lactiques* (pp. 459-474). Économica.
104. **Leveau, J. Y., Bouix, M., & Deroissart, H.** (1991). La flore lactique: technique d'analyser et de contrôle dans les I.A.A (2ème éd., Vol. III). Tec et Doc, Lavoisier.
105. **Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I.** (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023.
106. **Logan, N. A.** (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology*, 112(3), 417-429.

Références bibliographiques

107. **Lund, T., & Granum, P. E.** (1997). Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology (Reading, England)*, 143 (Pt 10), 3329–3336.
108. **Madhi, S. A., Adrian, P., Kuwanda, L., Cutland, C., Albrich, W. C., & Klugman, K. P.** (2007). Long-term effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*--and associated interactions with *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* colonization--in HIV-infected and HIV-uninfected children. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(11), 1662–1666.
109. **Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., & De Simone, C.** (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*, 121, 580–591.
110. **Margolis, E., Yates, A., & Levin, B. R.** (2010). The ecology of nasal colonization of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Staphylococcus aureus*: the role of competition and interactions with host's immune response. *BMC Microbiology*, 10, 59.
111. **Martín, R., Heilig, G. H., Zoetendal, E. G., Smidt, H., & Rodríguez, J. M.** (2007). Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2638-2644.
112. **Martin, R., Makino, H., Cetinyurek Yavuz, A., Ben-Amor, K., Roelofs, M., Ishikawa, E., Kubota, H., Swinkels, S., Sakai, T., Oishi, K., Kushiro, A., & Knol, J.** (2016). Early-life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. *PLOS ONE*, 11, e0158498.
113. **Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R. D., & Fernández, L.** (2012). Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Hum Lact*, 28(1), 36-44.
114. **Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., & Rotondo, J. C.** (2023). Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. *Cells*, 12(1), 184.
115. **Migdal, C., & Serres, M.** (2011). Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *Médecine Sciences*, 27(4), 405-412.

Références bibliographiques

116. **Moore, R. E., & Townsend, S. D.** (2019). Temporal development of the infant gut microbiome. *Open Biology*, 9(9), 190128.
117. **Murphy, K., Curley, D., O'Callaghan, T. F., O'Shea, C. A., Dempsey, E. M., O'Toole, P. W., Ross, R. P., Ryan, C. A., & Stanton, C.** (2017). The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. *Scientific Reports*, 7, 40597.
118. **Nair, N., Biswas, R., Götz, F., & Biswas, L.** (2014). Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. *Infection and Immunity*, 82(6), 2162–2169.
119. **O'Hara, A. M., & Shanahan, F.** (2007). Gut microbiota: mining for therapeutic potential. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5, 274–284.
120. **Oelschlaeger, T. A.** (2010). Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 57-62.
121. **Orla-Jensen, S.** (1919). *The lactic acid bacteria*. Copenhagen: Andr Fred Høst and Son.
122. **Ozgun, D., & Vural, H. C.** (2011). Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 3(3), 46-49.
123. **Paczosa, M. K., & Mecsas, J.** (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 80(3), 629–661.
124. **Pagnini, C., Saeed, R., Bamias, G., Arseneau, K. O., Pizarro, T. T., & Cominelli, F.** (2010). Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 454–459.
125. **Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O.** (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(7), e177.
126. **Pannaraj, P. S., Li, F., Cerini, C., Bender, J. M., Yang, S., Rollie, A., Adisetiyo, H., Zabih, S., Lincez, P. J., Bittinger, K., Bailey, A., Bushman, F. D., Sleasman, J. W., & Aldrovandi, G. M.** (2017). Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatrics*, 171(7), 647-654.

Références bibliographiques

127. **Parlindungan, E., Dekiwadia, C., Tran, K. T. M., Jones, O. A. H., & May, B. K.** (2018). Morphological and ultrastructural changes in *Lactobacillus plantarum* B21 as an indicator of nutrient stress. *LWT - Food Science and Technology*, *92*, 556–563.
128. **Peng, Z., Wang, X., Huang, J., & Li, B.** (2024). *Pathogenic Escherichia coli*. In Y.-W. Tang, M. Y. Hindiyeh, D. Liu, A. Sails, P. Spearman, & J.-R. Zhang (Eds.), *Molecular Medical Microbiology (Third Edition)* (pp. 1065-1096). Academic Press.
129. **Peters, B. M., & Noverr, M. C.** (2013). *Candida albicans-Staphylococcus aureus* polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. *Infection and Immunity*, *81*(6), 2178–2189
130. **Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., Scheper, M. A., Leid, J. G., Costerton, J. W., & Shirtliff, M. E.** (2010). Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus-Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *59*(3), 493–503.
131. **Podschun, R., & Ullmann, U.** (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(4), 589–603.
132. **Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A.** (2003). Les bactéries: les Gram positif pauvre en GC. In *Microbiologie* (2ème édition française, pp. 529-572). Paris.
133. **Quévrain, E., & Seksik, P.** (2013). Microbiote intestinal : de la diarrhée post-antibiotique aux maladies inflammatoires intestinales. *La Presse Médicale*, *42*(1), 45–51.
134. **Ramamurthy, T., Chowdhury, G., Pazhani, G. P., & Shinoda, S.** (2014). *Vibrio fluvialis*: an emerging human pathogen. *Frontiers in Microbiology*, *5*.
135. **Rammelsberg, M., Müller, E., & Räder, F.** (1990). Caseicin 80: Purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Archives of Microbiology*, *154*(3), 249–252.
136. **Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., & McCormick, J. K.** (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(4), 658-672.

Références bibliographiques

137. **Roissart, H., & Luquet, F. M.** (1994). Méthodes d'identification des bactéries lactiques. In H. Roissart & F. M. Luquet (Eds.), *Bactéries lactiques; Aspects fondamentaux et technologiques* (Vol. 2, pp. 141-167). Grenoble, France: Coquand éd.
138. **Rojas-Lopez, M., Monterio, R., Pizza, M., Desvaux, M., & Rosini, R.** (2018). Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: Insights for vaccine development. *Frontiers in Microbiology*, 9, 440.
139. **Rousseau, V.** (2004). Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale (Doctoral dissertation). Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France. pp. 33.
140. **Samedi, L., & Charles, A. L.** (2019). Evaluation of technological and probiotic abilities of local lactic acid bacteria. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 7(1), 9-19.
141. **Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M.** (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7-15.
142. **Seignalet, J.** (2004). *L'alimentation ou la troisième médecine*. Paris: François-Xavier de Guibert. In *Probiotique: Application thérapeutique et effet secondaire* (Thèse de doctorat, Université de Mohammed V de Rabat).
143. **Servin, A. L.** (2004). Antagonistic activity of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 405-440.
144. **Shanahan, F.** (2011). Molecular mechanisms of probiotic action: It's all in the strains! *Gut*, 60, 1026-1027.
145. **Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U.** (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8, 76.
146. **Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Faseleh Jahromi, M., & Ho, Y. W.** (2014). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Research International*, 2014, 927268.
147. **Shukla, R., Ghoshal, U., Dhole, T. N., & Ghoshal, U. C.** (2015). Fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome compared with healthy controls using real-time polymerase chain reaction: An evidence of dysbiosis. *Digestive Diseases and Sciences*, 60, 2953-2962.

Références bibliographiques

148. **Singh, V. P.** (2018). Recent approaches in food bio-preservation - a review. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 104-111.
149. **Śliżewska, K., & Chlebicz-Wójcik, A.** (2020). Growth kinetics of probiotic *Lactobacillus* strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium. *Biology*, 9(12), 423.
150. **Sneath, P. H., & Mair, N. S.** (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore and London: Williams and Wilkins.
151. **Solís, G., de los Reyes-Gavilan, C. G., Fernández, N., Margolles, A., & Gueimonde, M.** (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* microbiota in breast milk and the infant gut. *Anaerobe*, 16(3), 307–310.
152. **Sommer, F., & Bäckhed, F.** (2013). The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227–238.
153. **Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H.** (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
154. **Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., & Matošić, S.** (2010). Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296-307.
155. **Tailliez, P.** (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitat, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques*, 6(1), 35-41.
156. **Tejero-Sarinena, S., Barlow, S. J., Costabile, A., Gibson, G. R., & Rowland, I.** (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18(5), 530–538.
157. **Tiwana, H., Walmsley, R. S., Wilson, C., et al.** (1998). Characterization of the humoral immune response to *Klebsiella* species in inflammatory bowel disease and ankylosing spondylitis. *British Journal of Rheumatology*, 37(5), 525–531.
158. **Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T.** (2005). Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *Journal of Basic Microbiology*, 45, 312-322.

Références bibliographiques

159. **Tripathi, N., & Sapra, A. (2023).** *Gram staining*. In StatPearls. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing.
160. **Tulumoglu, S., Yuksekdog, Z. N., Beyatli, Y., Simsek, O., Cinar, B., & Yaşar, E. (2013).** Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe*, *24*, 36-42.
161. **Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D. (2018).** Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ. British Medical Journal*, k2179.
162. **Van Den Elsen, L. W. J., Garssen, J., Burcelin, R., & Verhasselt, V. (2019).** Shaping the gut microbiota by breastfeeding: the gateway to allergy prevention? *Frontiers in Pediatrics*, *7*.
163. **Von Klitzing, E., Ekmekciu, I., Bereswill, S., & Heimesaat, M. M. (2017).** Intestinal and systemic immune responses upon multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization of mice harboring a human gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2590.
164. **Von Klitzing, E., Ekmekciu, I., Köhl, A. A., Bereswill, S., & Heimesaat, M. M. (2018).** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* aggravates inflammatory responses in murine chronic colitis. *Scientific Reports*, *8*(1), 6685.
165. **Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, L., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., & Whitman, W. (Eds.). (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 3, 2nd ed.). New York: Springer-Verlag.
166. **Vuillermin, P., Saffery, R., Allen, K. J., Carlin, J. B., Tang, M. L., Ranganathan, S., Burgner, D., Dwyer, T., Collier, F., Jachno, K., Sly, P., Symeonides, C., McCloskey, K., Molloy, J., Forrester, M., & Ponsonby, A. L. (2015).** Cohort Profile: The Barwon Infant Study. *International Journal of Epidemiology*, *44*(4), 1148–1160.
167. **Wang, C. Y., Lin, P. R., Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2010).** Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, *16*(6), 578–585.
168. **Weigel, L. M., Donlan, R. M., Shin, D. H., Jensen, B., Clark, N. C., McDougal, L. K., Zhu, W., Musser, K. A., Thompson, J., Kohlerschmidt, D., Dumas, N., Limberger, R. J., & Patel, J. B. (2007).** High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(1), 231–238.

Références bibliographiques

169. **Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., & Fillmore, S.** (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8, 153.
170. **Zaborina, O., Kohler, J. E., Wang, Y., Bethel, C., Shevchenko, O., Wu, L., Turner, J. R., & Alverdy, J. C.** (2006). Identification of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates that are highly disruptive to the intestinal epithelial barrier. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5, 14.
171. **Zhang, C., Jiang, J., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W.** (2020). Meta-analysis of randomized controlled trials of the effects of probiotics on functional constipation in adults. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 39(10), 2960-2969.
172. **Zhang, Q., Su, X., Zhang, C., Chen, W., Wang, Y., Yang, X., Liu, D., Zhang, Y., & Yang, R.** (2023). *Klebsiella pneumoniae* induces inflammatory bowel disease through caspase-11-mediated IL18 in the gut epithelial cells. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 15(3), 613–632.
173. **Zhang, X., Mushajiang, S., Luo, B., Tian, F., Ni, Y., & Yan, W.** (2020). The composition and concordance of *Lactobacillus* populations of infant gut and the corresponding breast milk and maternal gut. *Frontiers in Microbiology*, 11.
174. **Zimmermann, P., & Curtis, N.** (2019). Effect of intrapartum antibiotics on the intestinal microbiota of infants: A systematic review. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 105.
175. **Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., & De Vos, W. M.** (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

Tableau 1 : Bouillon MRS.

Composant	Quantité
Glucose	20g
Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
Peptone	10g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.05g
Tween 80	1ml
Phosphate bi potassique	2g
Eau distillée	1000ml
pH final	6.5 +/- 0.1
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.	

Remarque : La composition de la gélose MRS : Bouillon MRS + 15g d'agar.

Tableau 2 : Bouillon BHIB

Composant	Quantité
Extrait cœur-cerveille	17.5g
Peptone pancréatique de gélatine	10g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	2.5g
Glucose	2g
Eau distillée	1000ml
pH final	7.4 +/- 0.2
Autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.	

Tableau 3 : Gélose nutritive

Composant	Quantité
Peptone	5g
Extrait de viande	3g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH final	7.3 +/- 0.2
Autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.	

Tableau 4 : Muller-Hinton

Composant	Quantité
Peptone	17.5g
Extrait de viande	2g

Annexes

Amidon	1.5g
Agar	17g
Eau distillée	1000ml
pH final	7.3 +/- 0.2
Autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.	

Annexe 2 : Composition des solutions utilisées

Tableau 1 : Eau physiologique

Composant	Quantité
Chlorure de sodium	9g
Eau distillée	1000ml
pH final	7.2

Annexe 3 : Questionnaire

Questionnaire et renseignement sur le nourrisson	
Nom :	Prénom :
Date de naissance :	Age :
Sexe : F <input type="checkbox"/>	M <input type="checkbox"/>
Type d'allaitement : Maternel exclusif <input type="checkbox"/>	Artificiel <input type="checkbox"/> Mixte <input type="checkbox"/>
Etat de santé de votre bébé :	
Prise récente d'antibiotiques : OUI <input type="checkbox"/>	NON <input type="checkbox"/>

Annexe 4 : Coloration de Gram

1. Déposer une petite quantité d'eau physiologique stérile sur une lame parfaitement propre.
2. Prélever une colonie bactérienne et la mélanger avec l'eau sur la lame, puis étaler rapidement en passant sur la flamme d'un bec bunsen.
3. Appliquer du cristal violet sur le frottis pendant une minute.
4. Rincer l'excès de colorant avec de l'eau distillée.
5. Appliquer du Lugol pendant 30 secondes.
6. Rincer à l'eau distillée pendant 5 secondes.
7. Utiliser le mélange alcool-acétone pour enlever le colorant violet en inclinant la lame et en ajoutant goutte à goutte jusqu'à ce que la couleur disparaisse complètement.
8. Rincer à l'eau distillée pendant 5 secondes.
9. Appliquer de la fuchsine pendant 15 secondes.
10. Rincer à l'eau distillée pendant 10 secondes.
11. Ajouter une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à fort grossissement. Les bactéries Gram- apparaîtront rosées, tandis que les bactéries Gram+ resteront bleu-violet (**Tripathi et Sapro, 2023**)

Annexe 6 : Illustrations de certaines étapes expérimentales et résultats additionnels



Figure 20 : Revivification des souches de références



Figure 21 : Souches isolées à partir des dilutions.



Figure 22 : TSI témoin.



Figure 23 : Résultat de la méthode de Spot (Double Couche).

• ملخص

في هذه الدراسة، نستكشف الخصائص المضادة للبكتيريا لسلاسلات *العصية اللبنية* المعزولة من براز الرضع والتي تظهر نشاطاً مضاداً للبكتيريا بشكل ملحوظ. تركز هذه الأبحاث على عزل وتحديد سلالات *العصية اللبنية* بالإضافة إلى تحليل الآليات التي تثبط بها هذه السلالات البكتيريا المسببة للأمراض المعوية. قمنا بتقييم فعالية هذه السلالات في تثبيط مسببات الأمراض المعوية الشائعة. وتكشف نتائجنا أن بعض سلالات *العصية اللبنية* تنتج مواد مضادة للميكروبات، مثل حمض اللاكتيك والبكتريوسينات، التي تثبط نمو هذه المسببات المرضية بشكل ملحوظ. تؤكد هذه الاكتشافات على إمكانيات هذه البروبيوتيك الطبيعية في تطوير استراتيجيات علاجية جديدة للوقاية وإدارة العدوى المعوية، خاصة بين الفئات السكانية الضعيفة. تساهم هذه الأبحاث في تعزيز الأدلة المتزايدة التي تدعم الفوائد الصحية لسلاسلات *العصية اللبنية* ودورها الحيوي في تعزيز صحة الجهاز الهضمي. تعد هذه النتائج خطوة مهمة نحو تحسين صحة الجهاز الهضمي وتعزيز الوقاية من الأمراض المعوية باستخدام سلالات *العصية اللبنية* يمكن أن تساهم هذه السلالات في تطوير علاجات طبيعية وفعالة ضد مسببات الأمراض المعوية، مما يقلل من الاعتماد على المضادات الحيوية التقليدية.

الكلمات مفتاحية: *العصية اللبنية* ، براز الرضع، مضاد للبكتيريا، مسببات الأمراض المعوية، الجهاز الهضمي.

• Summary

In this research, we delve into the antibacterial properties of *Lactobacillus* strains isolated from infant fecal matter and their potential applications against gastrointestinal pathogens. This study focuses on the isolation and identification of *Lactobacilli* strains exhibiting significant antibacterial activity, along with an analysis of the mechanisms by which they inhibit gastrointestinal pathogenic bacteria. We assess the efficacy of these strains in suppressing common pathogens. Our findings reveal that certain *Lactobacillus* strains produce antimicrobial substances, such as lactic acid and bacteriocins, which markedly inhibit the growth of these pathogens. These insights underscore the potential of these natural probiotics in developing innovative therapeutic strategies for the prevention and management of gastrointestinal infections, particularly among vulnerable populations. This research enriches the expanding body of evidence supporting the health benefits of *Lactobacillus* and their vital role in promoting gastrointestinal health.

Keywords: *Lactobacillus*, infant fecal matter, antibacterial properties, gastrointestinal pathogens, therapeutic strategies, vulnerable populations,

• Résumé

Dans le cadre de cette recherche, nous explorons les propriétés antibactériennes des souches de *Lactobacillus* isolées à partir des matières fécales de nourrissons et leur potentiel d'application contre les agents pathogènes gastro-intestinaux. L'étude se focalise sur l'isolement et l'identification des Lactobacilles présentant une activité antibactérienne notable, ainsi que sur la compréhension des mécanismes par lesquels elles inhibent les bactéries pathogènes gastro-intestinales. Nous évaluons l'efficacité de ces souches à inhiber des pathogènes courants. Nos résultats montrent que certaines souches de *Lactobacillus* produisent des substances antimicrobiennes, comme l'acide lactique et les bactériocines, qui réduisent significativement la croissance de ces pathogènes. Ces découvertes soulignent le potentiel de ces probiotiques naturels dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à prévenir et à gérer les infections gastro-intestinales, en particulier chez les populations vulnérables. Cette recherche contribue à l'enrichissement des preuves soutenant les bienfaits des *Lactobacillus* pour la santé et leur rôle crucial dans le maintien de la santé gastro-intestinale.

Mots-clés : *Lactobacillus*, matières fécales de nourrissons, propriétés antibactériennes, agents pathogènes gastro-intestinaux, stratégies thérapeutiques.