

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME  
D'INGENIEUR ET MASTER EN SCIENCES DE LA MER

OPTION: BIOTECHNOLOGIE MARINE

Thème :

**Etude du potentiel probiotique de bactéries  
isolées à partir d'animaux aquatiques**

Présenté par :

➤ ZAI DAT Med Lotfi & BENKHALED Amine

Soutenu le 29/10/2019 devant la commission du jury suivant :

|                   |                         |           |               |
|-------------------|-------------------------|-----------|---------------|
| Mme. AMAR I.      | Maître assistante A     | (ENSSMAL) | Présidente    |
| Mme. BOURABAIN F. | Maître assistante A     | (ENSSMAL) | Examinatrice  |
| Mme. CHAOU N.     | Maître assistante A     | (ENSSMAL) | Examinatrice  |
| Mme. ALOUACHE S.  | Maître de conférences A | (ENSSMAL) | Promotrice    |
| Mme. BOUACHA CH.  | Doctorante              | (ENSSMAL) | Co-Promotrice |

Année Universitaire : 2018/2019

# Remerciements

*Au terme de ce travail, nous remercions **Dieu** le tout puissant pour nous avoir donnés la santé, le courage et la volonté, pour réaliser ce travail.*

*Ce travail a été réalisé dans le cadre de la thématique de recherche de l'équipe Microbiologie et biotechnologie marine- Laboratoire CVRM-ENSSMAL. Il rentre dans le cadre d'un projet de recherche PRFU et la préparation de la thèse de doctorat de Mme BOUACHA Chahrazed.*

*Qu'il nous soit tout d'abord permis d'exprimer notre profonde gratitude à nos encadreurs, **Madame ALOUACHE S.** maitre de conférences à l'ENSSMAL qui a accepté de nous encadrer nous la remercions infiniment pour son aide, ses orientations, ses conseils précieux, sa patience merci pour tout. Et **Madame BOUACHA C.** qui a accepté de codiriger notre travail, nous la remercions pour son aide ainsi que ses orientations et conseils.*

*Nous tenons à remercier les enseignantes qui ont accepté de faire part de notre jury, nous remercions vivement **Mme BOURABAIN F.** et **Mme CHAOU N.** d'avoir accepté d'examiner ce travail, **Mme AMAR I.** pour nous 'avoir honorés de présider ce jury.*

*Ce travail a été rendu possible grâce au soutien qui nous a été accordé par l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (ENSSMAL). Au niveau des laboratoires, Nous voudrions remercier tous le personnel de L'ENSSMAL. Notamment les ingénieurs de laboratoire : Monsieur **Djerai NourEdinne**, madame **Refes Nadia** et Madame **GUEROUMI Houda** pour leur aide et leurs caractères humains.*

*Nous exprimons notre gratitude à l'ensemble des enseignants du département des ressources vivantes qui ont contribué à notre formation.*

*Nous tenons aussi à remercier nos collègues de la promotion qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.*

*Nos plus profonds remerciements vont à nos parents. Tout au long de notre cursus, ils nous 'ont toujours soutenu, encouragé et aidé. Ils ont su nous donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de nos plus affectueuses grâces.*

# *Dédicaces*

*Tout au début, je tiens à remercier le bon Dieu de m'avoir  
donné du courage et de patience afin de réaliser ce modeste travail que  
je dédie à :*

*Mes très chers parents pour leur soutien et leur sacrifice tout au long  
de mon parcours et qui ont cru en moi, spécialement Maman qu'elle trouve  
ici le témoignage de ma profonde reconnaissance, que Dieu leur accorde  
une  
longue vie, encore une fois  
Merci !!*

*Mes chers Sœurs RACHA et RIANE qui ont chaleureusement partagé avec  
moi tous  
les émotions lors de la réalisation de ce travail*

*Ma grande mère et ma tante SAMIA*

*Mon très cher binôme LOTFI qui m'a motivé et soutenue tout le long de  
ce  
Travail ainsi que sa famille ;*

*Mes chères enseignantes et promotrices Mme ALOUACHE .S & Mme  
BOUACHA. CH*

*Mes amies et à tous ceux qui me sont chers.*

*Merci du fond du cœur!!*

**AMINE**

# ***Dédicace***

*Je dédie ce modeste travail*

*Aux plus chers êtres de ma vie, mes parents **Ferhat et Razika** c'est grâce à eux que je suis arrivée à ce stade. Ils n'ont jamais cessé de m'encourager et de me motiver. Si je dois consacrer toute ma vie pour eux je ne peux pas leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, que Dieu les garde et leur accorde une longue vie.*

*À Mes chers frères : **Amine, Sabri et Akram***

*À Mes chères cousins : **Fethi, Khaled, Zinou, Marouan, Mounir, Youcef, Anis, Majid, Housse***

***em** Hacene et son épouse **Asma, Atmane, Moumouh,***

***Imad et son épouse **Yamina*****

*A Mes chères cousines : **Mejda, Nesrine, Meriem, Hadjer, Mounia***

*À Toute la famille **ZAIDAT***

*A mon précieux binôme **Benkhaled Amine***

*A tous mes camarades de la promotion 2014/2019 en particulier mes camarades du département ressources vivantes Pour ceux que j'aime et qui me connaissent.*

*À tous mes amis : **Imad, Idris, Chemssou, Ayoub, Hamza, Oussama, Abdellah, Housse***

***m** Lotfi, Zaki, Abdesslam, Ahmed, Anis, massyia, Sérine,*

***Yasmine, Salima, Sana, Fatiha***

**MOHAMED LOTFI**

## **TABLE DES MATIERES**

### **LISTE DES ABREVIATIONS**

### **LISTE DES FIGURES**

### **LISTE DES TABLEAUX**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>CHAPITRE I : GÉNÉRALITES.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>I.1. Les Probiotiques .....</b>   | <b>4</b>  |
| I.1.1. Définition.....   | 4         |
| I.1.2. Critères de sélection .....   | 4         |
| I.1.3. Espèces utilisées comme probiotiques : .....  | 6         |
| I.1.4. Modes d'action des probiotiques : .....   | 7         |
| I.1.4.1. Propriétés anti bactériennes .....  | 8         |
| I.1.4.2. La survie des isolats tout au long du tractus gastro-intestinal .....             | 9         |
| I.1.4.3. Adhésion bactérienne .....  | 10        |
| I.1.4.4. Stimulation immunitaire .....   | 10        |
| I.1.4.5. Innocuité des souches .....   | 11        |
| <b>I.2. Les probiotiques en aquaculture .....</b>  | <b>12</b> |
| I.2.1. Définition.....   | 12        |
| I.2.2. Propriétés et critères de sélection des bactéries probiotiques en aquaculture ..... | 13        |
| <b>I.3.La flore bactérienne des poissons, mollusques, crustacés .....</b>                  | <b>15</b> |
| I.3.1. Flore bactérienne des poissons :.....   | 16        |
| I.3.2. Flore bactérienne des mollusques .....  | 17        |
| I.3.3. Flore bactérienne des crustacés.....  | 17        |
| <b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>II.1. Matériel .....</b>  | <b>19</b> |
| II.1.1. Matériel biologique.....   | 19        |
| <b>II.2. Méthodes .....</b>  | <b>24</b> |
| II.2.1. Echantillonnage .....  | 24        |
| II.2.2. Préparation des suspensions mères et isolement des bactéries .....                 | 25        |
| II.2.3. Enrichissement et isolement des bactéries lactiques .....                          | 26        |
| II.2.4. Identification.....  | 27        |
| II.2.4. 1. Aspect Macroscopique .....  | 27        |
| II.2.4. 2.Coloration de Gram.....  | 27        |
| II.2.4.3. Test catalase.....   | 27        |

|   |           |
|---|-----------|
| II.2.5. L'étude du potentiel probiotique des bactéries .....  | 28        |
| II.2.5.1 Tests de bioactivité.....  | 28        |
| II.2.5.1. 1. Le test du pouvoir antagoniste par la méthode des spots (FLEMING et <i>al.</i> 1975) ..... | 28        |
| II.2.5.1. 2. Dosage de l'acide lactique produit.....  | 29        |
| II.2.5.1.3 Test de la résistance au pH gastrique.....   | 31        |
| II.2.5.1.4 Test de la résistance aux sels biliaires .....   | 31        |
| II.2.5.1.5 Test de la production de biofilm.....  | 31        |
| II.2.5.2. Tests de Biosécurité .....  | 31        |
| II.2.5.2.1. Test d'anti bio-résistance .....  | 31        |
| II.2.5.2.2. Test d'Hémolyse.....  | 32        |
| <b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>III.1. Isolement et Identification des isolats .....</b>   | <b>34</b> |
| III.1.1 Caractères cultureux .....  | 34        |
| III.1.2 Caractères microscopiques.....  | 35        |
| III.1.3 Caractère biochimique : Test catalase.....  | 36        |
| <b>III.2. Tests de bio activité.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>III.2.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne .....</b>                                    | <b>38</b> |
| III.2.2. Dosage de l'acide lactique produit .....   | 43        |
| <b>III.3. Test de la résistance au pH gastrique et Sels biliaires .....</b>                             | <b>44</b> |
| <b>III.4. Test de production de biofilm .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>III.5. Tests de Biosécurité .....</b>  | <b>50</b> |
| III.5.1. test d'antibiorésistance.....  | 50        |
| III.5.2. Production d'hémolyse .....  | 52        |
| <b>CONCLUSION.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>ANNEXES</b>  |           |

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN: Acide ribonucléique

AUG 30: Amoxicillin + clavunalic acide.

BHI: Brain Heart Infusion

BN: Bouillon

C30: Chloramphenicol

CN10: Gentamicine

CTX30: Céfotaxime

DO: Densité optique

DVLO: l'acronyme Derjaguin – Landau –  
Verwey – Overbeek

FAO: Food and Agriculture Organization

IL: Interleukine

IU: Unité international

kDa: KiloDalton

LTh: lymphocytes T helper

McF: McFarland

MH: Mueller-Hinton

MRS: de De Man, Rogosa et Sharpe

OMS: Organisation mondiale de la santé

OX 1: Oxacillin

OXGAL: sels biliaires oxgal

P: poids

P10: Penicillin

PBS: Tampon phosphate salin

pH: Potentiel hydrogène

SAIF: Saccharomyces Anti Inflammatory  
Factor

SM: solution mère

TE30: Tetracycline

Th: T helper

UFC: Unité Formant Colonie

V: Volume

VA30: Vancomycin

WHO: World Health Organization

## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : Les étapes et les critères nécessaires pour la sélection d'un probiotique comme agent de contrôle en aquaculture (BALCAZAR et <i>al.</i> 2006). ..... | 14 |
| <b>Figure 2</b> : Lieu de vie des produits de la pêche (Ifremer, 2011) .....  | 16 |
| <b>Figure 3</b> : <i>Metapenaeus monoceros</i> .....  | 19 |
| <b>Figure 4</b> : <i>Serranus cabrilla</i> .....  | 20 |
| <b>Figure 5</b> : <i>Pagellus acarne</i> .....  | 20 |
| <b>Figure 6</b> : <i>Aristeus antennatus</i> .....  | 21 |
| <b>Figure 7</b> : <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....  | 21 |
| <b>Figure 8</b> : <i>Diplodus vulgaris</i> .....  | 22 |
| <b>Figure 9</b> : <i>Artemia salina</i> .....   | 22 |
| <b>Figure 10</b> : <i>Mullus barbatus</i> .....   | 23 |
| <b>Figure 11</b> : <i>Sardinella aurita</i> .....   | 23 |
| <b>Figure 12</b> : Diagramme détaillé des étapes de prélèvement à partir du poisson. ....   | 26 |
| <b>Figure 13</b> : Méthode de spots (FLEMING et <i>al.</i> 1975).....   | 29 |
| <b>Figure 14</b> : Méthode de dosage de l'acide lactique .....  | 30 |
| <b>Figure 15</b> : Aspects des bactéries isolées sur le milieu MRS.....   | 35 |
| <b>Figure 16</b> : Aspect microscopique d'une des souches testées à la forme Cocci (Gx100). ....  | 35 |
| <b>Figure 17</b> : Photo représentative au résultat négative du test de catalase. ....  | 36 |
| <b>Figure 18</b> : Dosage de l'acide lactique des souches isolées sur milieu MRS et M17.....  | 43 |
| <b>Figure 19</b> : Résultats de l'effet du pH sur les souches testées. ....   | 45 |
| <b>Figure 20</b> : Résultats de l'effet des sels biliaries (SB) sur les souches testées. ....   | 45 |
| <b>Figure 21</b> : photo représentatif de la méthode suivis lors du test du pouvoir d'adhésion. ....  | 47 |
| <b>Figure 22</b> : Résultats du test de production de biofilm des souches isolées sur milieu MRS.....   | 48 |
| <b>Figure 23</b> : Résultats du test de production de biofilm des souches isolées sur milieu M17.....   | 48 |
| <b>Figure 24</b> : illustration de résultats du Test d'antibiorésistance sur les souches testées. ....  | 51 |

## LISTE DES TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1</b> : Principaux critères de sélection des probiotiques. (FAO/WHO, 2002).....   | 5  |
| <b>Tableau 2</b> : Les micro-organismes ayant un intérêt probiotique (KERRY, 2018). .....  | 7  |
| <b>Tableau 3</b> : Présentation et répartition des espèces aquatiques utilisées pour cette étude. ....   | 24 |
| <b>Tableau 4</b> : Répartition des souches isolées pour chaque espèce. ....  | 34 |
| <b>Tableau 5</b> : Représentation de l'identification des souches isolées du milieu MRS.....   | 37 |
| <b>Tableau 6</b> : Représentation de l'identification des souches isolées du milieu M17. ....  | 38 |
| <b>Tableau 7</b> : les diamètres des zones d'inhibition en mm des souches testées à pouvoir antagoniste positif vis-à-vis les souches pathogènes sur milieu MRS..... | 39 |
| <b>Tableau 8</b> : les diamètres des zones d'inhibition en mm des souches testées à pouvoir antagoniste positif vis-à-vis les souches pathogènes sur milieu M17..... | 40 |
| <b>Tableau 9</b> : Résultats de test d'antibiorésistance aux antibiotiques des souches isolées sur milieu MRS et M17.....  | 50 |
| <b>Tableau 10</b> : Résultats de test hémolyse des souches isolées sur milieu MRS.....   | 53 |

# **INTRODUCTION**

## **Introduction**

Les probiotiques ont été définis comme des suppléments alimentaires microbiens vivants qui améliorent la santé de l'homme et du bétail terrestre. La recherche de probiotiques pour les animaux aquatiques augmente avec la demande pour une aquaculture respectueuse de l'environnement.

Le microbiote gastro-intestinal des poissons et des mollusques et crustacés est particulièrement dépendant de l'environnement extérieur, en raison de microbes provenant de l'eau et de la nourriture. Certains produits commerciaux sont appelés probiotiques, bien qu'ils aient été conçus pour traiter le milieu d'élevage et non pour compléter l'alimentation. Cette notion de probiotique est pertinente lorsque les microbes sont administrés, et puis survivent dans le tractus gastro-intestinal. Sinon, des termes plus généraux sont suggérés, comme biocontrôle lorsque le traitement est antagoniste aux pathogènes, ou biorestauration lorsque la qualité de l'eau est améliorée.

La plupart des tentatives pour proposer des probiotiques ont été entreprises en isolant et en sélectionnant des souches du milieu aquatique. Ces microbes étaient des *Vibrionaceae*, des *Pseudomonas*, des bactéries lactiques, *Bacillus sp*, levures.... Trois caractéristiques principales ont été recherchées dans les microbes en tant que candidats pour améliorer la santé de leur hôte :

- ✓ L'antagonisme aux agents pathogènes, mis en évidence *in vitro* dans la plupart des études.
- ✓ Le potentiel de colonisation de certains candidats a également été étudié.
- ✓ pouvoir de certaines souches à augmenter la résistance de leur hôte à la maladie.

Beaucoup d'autres ont pu confirmer à ce que les probiotiques aient des effets bénéfiques, par exemple la stimulation du système immunitaire, et la concurrence avec les agents pathogènes pour les nutriments ou pour les sites d'adhésion, mais des efforts considérables de recherche seront nécessaires pour mettre au point les applications en aquaculture. **ELSEVIER SCIENCE 1999.**

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'isolement et à la caractérisation de bactéries provenant des tubes digestifs de différentes espèces aquatiques ayant un fort potentiel probiotique. Pour ce faire nous avons adopté le plan suivant :

- isolement de bactéries
- tests de bioactivité
- tests de biosécurité
- tests technologique

# **CHAPITRE I : GÉNÉRALITES**

## **I.1. Les Probiotiques**

### **I.1.1. Définition**

Cette notion de probiotique a été développée principalement grâce aux travaux de Metchnikoff. La définition des probiotiques a été élargie à des « microorganismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». Cette définition inclut potentiellement des produits métaboliques microbiens y compris les antibiotiques. **(PARKER, 1974)**

Selon **FULLER (1989)** une proposition d'une définition très proche du sens actuel : «supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ».

**GATESOUBE (1999)** a défini les probiotiques comme étant des microorganismes vivants (bactéries ou levures) qui, ingérés en quantité convenable, peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte et sa croissance. Ces microorganismes, présents ou non dans la microflore intestinale naturelle de l'hôte, peuvent agir à différents niveaux : équilibre hôte/pathogène, immunité, ou encore nutrition.

Par opposition aux précédentes définitions, la définition suivante introduit la notion de souche définie bien caractérisée d'un point de vue taxonomique ainsi que la notion de quantité apporté à l'homme. La FAO (Food and Agricultural Organization) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé ; appelée WHO en anglo-saxon : World Health Organization) ont établi des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotique » dans les aliments **(FAO/WHO, 2002)** et formulent la définition suivante : «microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère ».

### **I.1.2. Critères de sélection**

Les micro-organismes doivent posséder diverses propriétés de survie pour répondre à la définition des probiotiques **(GAGNON, 2007)**. Ils doivent présenter une activité bénéfique et persister durant leur passage dans le tractus digestif. Ces propriétés sont propres à chaque souche et ne peuvent pas être extrapolables d'une souche à l'autre même au sein d'une même espèce **(DUNNE et al. 2001)**. Plusieurs critères majeurs de sélection ont été établis par différents auteurs dans le but de sélectionner les souches potentiellement probiotiques. Ces critères ont été résumés dans le tableau **(1)** sont réparties en trois catégories à savoir les critères de sécurité, fonctionnels et technologiques.

**Tableau 1 : Principaux critères de sélection des probiotiques. (FAO/WHO, 2002).**

---

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Critères de sécurité    | <ul style="list-style-type: none"><li>• Identification taxonomique précise.</li><li>• Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques.</li><li>• Historique de non pathogénicité et non-invasion de l'épithélium intestinal.</li><li>• Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques.</li></ul>   |
| Critères fonctionnels   | <ul style="list-style-type: none"><li>• Tolérance de l'acidité à la bile et aux enzymes digestives.</li><li>• Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus intestinal.</li><li>• Production de substances antimicrobiennes (bactériocines, acides organiques, peroxyde d'hydrogène ou autres composés inhibiteurs) et antagonisme envers les pathogènes.</li><li>• Immuno-modulation.</li><li>• Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte.</li></ul> |
| Critères technologiques | <ul style="list-style-type: none"><li>• Stabilité au cours des procédés de fabrication et dans le produit fini.</li><li>• Conservation des propriétés probiotiques après production.</li><li>• Non modification des qualités organoleptiques du produit fini.</li></ul>  |

---

**L'identification taxonomique de la souche :** est une étape importante dans l'établissement de nouvelles souches potentiellement probiotiques. Chaque souche doit être identifiée par des techniques moléculaires fiables et confrontée à une nomenclature actualisée (**FAO/WHO 2002**). Actuellement, le séquençage de la région 16S est la méthode moléculaire de référence pour identifier l'espèce d'une souche, mais cette méthode est longue et requiert une large collection de souches de référence (**FAO/WHO 2002**). Le séquençage de l'ARN 16S est une méthode très fiable couramment utilisée pour l'identification des souches probiotiques. Dans ce dernier cas, il est recommandé que la technique soit combinée avec des tests biochimiques et phénotypiques pour s'assurer de la conformité de la souche. L'origine de la souche est également une condition importante car l'interaction spécifique avec l'hôte est maximisée lorsqu'elle provient du même habitat (**ALVAREZ-OLMOS et OBERHELMAN, 2001**).

D'un point de vue technologique, les souches probiotiques doivent posséder plusieurs critères tels que la facilité à être cultivée tout en conservant leurs propriétés biologiques et leur stabilité au cours des procédés de production et d'entreposage (**CHAMPAGNE, GARDNER et al. 2005**)

### **I.1.3. Espèces utilisées comme probiotiques :**

Comme on le sait, les diverses caractéristiques des probiotiques ont été reconnus comme des promoteurs clés de la santé. Les recherches dans ces dernières années ont été principalement consacrées à la recherche sur la culture, conditions et viabilité des souches probiotiques pendant le traitement et stockage, sensibilité aux faibles pH, liquide gastrique, sels biliaires, fluides pancréatiques et intestinaux ou respiratoires, adhésion à des cellules isolées ou cultures de cellules et interactions avec d'autres microorganismes (pathogènes). Une liste sélective des différentes espèces bactériennes activement utilisées comme probiotique sont listées dans le tableau (2) ci-dessous :

**Tableau 2** : Les micro-organismes ayant un intérêt probiotique (KERRY, 2018).

|    | Genre                      | Espèce   |
|----|----------------------------|--|
| 1  | <i>Lactobacillus</i>       | <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. bulgaricus</i> |
| 2  | <i>Propioni bacterium</i>  | <i>P. jensenii</i> , <i>P. freudenreichii</i>  |
| 3  | <i>Pepto streptococcus</i> | <i>P. productus</i>  |
| 4  | <i>Bacillus</i>            | <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. laterosporus</i>  |
| 5  | <i>Lactococcus</i>         | <i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i>  |
| 6  | <i>Enterococcus</i>        | <i>E. faecium</i>  |
| 7  | <i>Pediococcus</i>         | <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>   |
| 8  | <i>Streptococcus</i>       | <i>S. sanguis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. salivarius</i>   |
| 9  | <i>Bifidobacterium</i>     | <i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i>  |
| 10 | <i>Bacteroides</i>         | <i>B. uniformis</i>  |
| 11 | <i>Akkermansia</i>         | <i>A. muciniphila</i>  |
| 12 | <i>Saccharomyces</i>       | <i>S. boulardii</i>  |

#### I.1.4. Modes d'action des probiotiques :

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le mode d'action des probiotiques. Ils sécrètent diverses substances antimicrobiennes telles que des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines. De plus, ils entrent en compétition avec les agents pathogènes pour les sites d'adhésion situés sur les muqueuses. Les probiotiques peuvent également modifier l'environnement où ils se retrouvent en modulant le pH et/ou le potentiel d'oxydo-réduction, ce qui

peut compromettre l'établissement de pathogènes. Enfin, les probiotiques peuvent procurer des effets bénéfiques en stimulant l'immunité non spécifique et en modulant la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Il n'est pas rare de trouver des préparations où les souches probiotiques sont associées dans le but d'amplifier ces effets bénéfiques (**BONIFAIT et al. 2009 ; SANDERS, 2008**).

#### **I.1.4.1. Propriétés anti bactériennes**

Les bactéries visant à obtenir le statut de probiotiques doivent posséder de nombreuses propriétés dirigées contre la croissance des organismes pathogènes. Différentes molécules antibactériennes sont produites par les probiotiques. Les composés antimicrobiens décrits sont des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et des peptides portant le nom de bactériocines.

Les acides organiques produits notamment lors de la fermentation (essentiellement l'acide lactique et l'acide acétique) semblent jouer un rôle antimicrobien important bien que, pour certains, ils agiraient principalement en perméabilisant la paroi bactérienne permettant le passage d'autres molécules antibactériennes (**SERVIN, 2004; MARKAS et DE VUYST, 2006 ; TEJERO-SARINENA et al. 2012**).

Les bactériocines sont des protéines ou des complexes de protéines avec une activité bactéricide généralement dirigée contre des espèces proches de la souche productrice. Les variations décrites au niveau des propriétés biochimiques, des poids moléculaires, des spectres et modes d'action a donné lieu à une classification proposée par (**KLAENHAMMER, 1993**)

- La classe I ou l'antibiotique : ce sont des peptides de petites tailles (inférieure à 5kDa), thermostables et qui contiennent des acides aminés soufrés inhabituels ou des groupes déshydratés (lanthionine, déhydroalanine, ...). Ils sont de deux types : la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes et la classe Ib qui comprend des peptides chargés négativement ou sans charge nette (**MCAULIFFE et al. 2001; TWOMEY et al. 2002**). Certains antibiotiques sont constitués de deux peptides agissant ensemble comme la thermophiline 13 de *Streptococcus thermophilus* (**MARCISSET et al. 1997**).
- La classe II : elle comprend des peptides de taille inférieure à 10kDa, thermostables, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. La classe II est divisée en trois sous-classes : la sous-classe IIa, la sous-classe IIb et la sous-classe IIc. Les bactériocines de la sous-classe IIa ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV et possèdent toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Les bactériocines de la sous-classe IIb ont besoin de deux peptides pour avoir une activité ; le deuxième peptide agit soit en

augmentant l'action du premier soit en lui étant complémentaire (synergie). La sous-classe IIc contient toutes les bactériocines ne pouvant être classées dans les autres sous-classes.

- La classe III : qui comprend des protéines de taille supérieure à 30kDa et thermolabiles. Les bactériocines de cette classe agissent en hydrolysant les liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles.
- La classe IV se compose de peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a encore été décrite (**DORTU et THONART, 2009**).

Les bactériocines sont d'un grand intérêt notamment pour l'industrie agro-industrielle. En effet, la gestion de la contamination des aliments est un défi et dans les stratégies de bioconservation, les probiotiques ont toute leur place. Actuellement, seule la nisine (un lantibiotique largement étudié et produit par *Lactococcus lactis*) est acceptée en tant que conservateur comme additif alimentaire sous la référence E234 (**DORTU et THONART, 2009 ; GUINANE et al, 2005**).

#### **I.1.4.2. La survie des isolats tout au long du tractus gastro-intestinal**

- **Résistance à l'acidité gastrique :**

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les bas pH.

Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime .par conséquent, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2.5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (**AMMOR et MAYO, 2007**).

- **Résistance aux sels biliaires :**

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après l'ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leurs solubilité (**AMMOR et MAYO, 2007 ; GU et al. 2008**).

- **Résistance aux enzymes gastriques :**

Les enzymes exogènes produites par les probiotiques ne représenteraient, tout au plus, qu'une faible contribution à l'activité enzymatique totale de l'intestin (**DING et al. 2004 ; ZIAEI-NEJAD et al. 2006**), et la présence des probiotiques pourrait stimuler la production des enzymes endogènes par la crevette.

### **I.1.4.3. Adhésion bactérienne**

Un phénomène important pour l'étape d'adhésion des bactéries à un support est le conditionnement des surfaces à coloniser. Si on considère la surface d'un matériau solide vierge de tout composé, plongée dans un milieu aqueux, elle va se couvrir, en quelques minutes, des molécules présentes en suspension dans ce milieu. L'adsorption de ces molécules va grandement modifier les propriétés de surface initiales du matériau (**CARPENTIER et CERF, 1993**). Il semblerait également que la concentration des molécules à cette interface solide-liquide soit plus élevée que dans le milieu aqueux environnant ce qui multiplierait localement les molécules. Ceci a deux conséquences principales : la concentration de molécules facilitant l'adhésion des bactéries à la surface est augmentée, tout comme le nombre de nutriments, permettant l'amélioration de la croissance des organismes exigeants. (**SAMOT, 2012**)

La deuxième étape après le conditionnement de la surface va être le mouvement bactérien vers cette surface. Les bactéries vont alors entrer en contact avec celle-ci par deux moyens :

- Des mouvements passifs (diffusion passive avec implication des mouvements browniens, sédimentation ou encore convection)
- Ou des mouvements actifs (motilité bactérienne impliquant éventuellement de la chimiotaxie).

Il faut noter que les mouvements passifs de cette phase d'approche sont dépendants de la rhéologie du liquide dans lequel les bactéries sont en suspension. Mais d'autres caractéristiques du milieu aqueux environnant comme le pH, la force ionique ou la température peuvent influencer sur la quantité de bactéries s'attachant à la surface.

### **I.1.4.4. Stimulation immunitaire**

L'environnement est déterminant pour que certains microorganismes exercent leur activité immunogène spécifique ou leurs interactions cellulaires chez un hôte donné (**LEBEER et al. 2010**). Les mécanismes impliqués dans la modulation et la stimulation immunitaire par les probiotiques semblent variés.

Les bactéries probiotiques peuvent moduler les populations cellulaires de l'immunité. Par exemple, certains probiotiques seraient en mesure de faire pencher la balance lymphocytes T helper (LTh) en faveur des lymphocytes Th1 (au détriment des Th2), ce qui aurait un effet positif sur la diminution des réponses allergiques médiées par les Th2 (**EZENDAM et VAN LOVEREN, 2006**).

Les probiotiques agissent également en modulant la production de cytokines. **PATHMAKANTHAN et al (2004)** Ont montré, par exemple, une action sur l'augmentation de la sécrétion de cytokines anti inflammatoires comme IL-10 par des macrophages et les lymphocytes T isolées de la muqueuse d'un colon inflammatoire (**PATHMAKANTHAN et al. 2004**).

Les probiotiques pourraient renforcer la barrière épithéliale via l'amélioration des interactions intercellulaires, ceci a été notamment montré au niveau intestinal (**EWASCHUK et al, 2008; MADSEN et al. 2001; NG et al. 2009**).

Bien que la définition actuelle retenue pour les probiotiques concerne des organismes vivants, les effets immuno-modulateurs bénéfiques sont aussi observés avec des cellules bactériennes mortes (**ADAMS, 2010 ; OU et al. 2011**). Ceci amène à se poser la question des structures bactériennes impliquées dans ces mécanismes d'immuno-modulation. De nombreuses études s'y sont intéressées mais aucune réponse définitive n'a été apportée. L'ADN comme de nombreux composants de surface (peptidoglycane, acide lipotéichoïque, exopolysaccharides) ont été évoqués (**AMROUCHE et al. 2006 ; GHADIMI et al. 2008 ; JIJON et al. 2004**). Les exopolysaccharides de surface des lactobacilles ont montré des capacités à moduler la production de cytokines par les macrophages murins (**CISZEK-LENDA et al. 2011 ; KANG et al. 2011 ; LIU et al. 2011**).

L'effet immunomodulateur pourrait être également induit par la sécrétion de molécules par des probiotiques. *Saccharomyces boulardii* produit une petite molécule anti-inflammatoire (de moins d'1 kDa), thermostable et hydrosoluble. Cette molécule isolée du surnageant de culture fongique est nommée Saccharomyces Anti Inflammatory Factor (SAIF) (**SOUGIOULTZIS et al. 2006**).

#### **I.1.4.5. Innocuité des souches**

Les probiotiques sont des organismes vivants. De ce fait, ils peuvent être responsables théoriquement de plusieurs types d'effets secondaires comme un risque d'infection systémique, un risque d'activités métaboliques délétères, des risques de transfert génétique (**SALMINEN et al. 1998**). Les souches utilisées doivent être non pathogènes et peu infectieuses et l'isolement croissant de bactéries lactiques dans des infections cliniques pose la question de leur réelle innocuité (**ISHIBASHI et YAMAZAKI, 2001 ; KOCHAN et al. 2011**).

L'indication d'utilisation des probiotiques doit donc être bien posée et il serait judicieux de limiter leur consommation chez les individus à risque.

## **I.2. Les probiotiques en aquaculture**

### **I.2.1. Définition**

La nature des espèces aquatiques et leur interaction intime avec l'environnement contraignent à une définition plus compliquée et plus précise des probiotiques, chez les hôtes aquatiques, il n'y a pas de ligne de démarcation entre la communauté microbienne à l'intérieur et à l'extérieur de l'hôte, cela est dû à l'interaction constante avec l'écosystème et les fonctions d'accueil. **(IBRAHEM, 2015)**

**CAHILL (1990)** a démontré que les bactéries présentes dans le milieu aquatique influent sur la composition du microbiote intestinal et inversement. Dans les environnements aquatiques, les probiotiques doivent être définis pour faire face à la nature de ce secteur.

L'interaction intensive entre le milieu de culture et l'hôte en culture implique que de nombreux probiotiques sont obtenus à partir de la culture du milieu et, d'une certaine manière, à partir de nourriture, comme le suggère la définition de **FULLER (1989)**.

**VERSCHUERE et al. (2000)** a défini Un probiotique comme un complément microbien vivant qui incorpore un impact utile sur l'hôte en modifiant la communauté microbienne associée à l'hôte ou proche, en améliorant l'utilisation de l'aliment ou en améliorant sa valeur nutritionnelle, en renforçant la réaction de l'hôte face à la maladie, ou par la hauteur de son environnement proche.

Un probiotique a été décrit comme une cellule vivante, morte ou faisant partie d'une cellule microbienne, qui, une fois administrée par le biais de l'alimentation animale ou de l'eau d'élevage, favorise la résistance aux maladies, les normes de santé, les performances de croissance, l'optimisation de l'alimentation, le stress et la tolérance. **(IBRAHEM, 2015)**

La viabilité des microorganismes probiotiques peut être un facteur clé pour induire des effets potentiels supplémentaires des probiotiques utilisés pour la production de poisson **(IBRAHEM, 2015)**.

Il est important d'indiquer que les micro-organismes qui fournissent des nutriments essentiels aux espèces d'ornement sans exercer de performance vive chez l'hôte ou dans son environnement ne doivent pas être considérés comme des probiotiques **(LEE et al. 1999)**.

Une fois que l'hôte ou son environnement entoure une communauté de micro-organismes bien stable, l'application du micro-organisme probiotique choisi doit typiquement être appliquée sur une base quotidienne afin d'obtenir les effets positifs souhaités. Les probiotiques contribuent considérablement à la santé et aux performances zootechniques d'un point de vue nutritionnel, et il n'est généralement pas possible de séparer l'alimentation des organismes aquatiques de la gestion environnementale **(IBRAHEM, 2015)**.

### I.2.2. Propriétés et critères de sélection des bactéries probiotiques en aquaculture

Pour utiliser un microorganisme comme probiotique en aquaculture, il est nécessaire de le caractériser et de le sélectionner par un processus adapté (**Figure 1**) (**BALCAZAR et al. 2006**).

D'après **BALCAZAR et al. (2006)**, il est essentiel de connaître l'origine des candidats probiotiques, en partant du principe que les souches qui proviennent d'un animal sain ne sont généralement ni pathogènes, ni toxiques. De plus, ces bactéries doivent être capables de survivre dans les conditions du tractus gastro-intestinal et de résister au passage dans l'estomac, aux enzymes pancréatiques, aux sels biliaires et à l'acidité. Une fois la souche bactérienne isolée, elle doit subir deux type de tests d'antagonisme contre les pathogènes.

**Le premier type** concerne les tests in vitro. Un premier test est appliqué contre des bactéries pathogènes sur des milieux de culture gélosé ou liquide. D'autres tests de caractérisation de probiotiques in vitro peuvent évaluer :

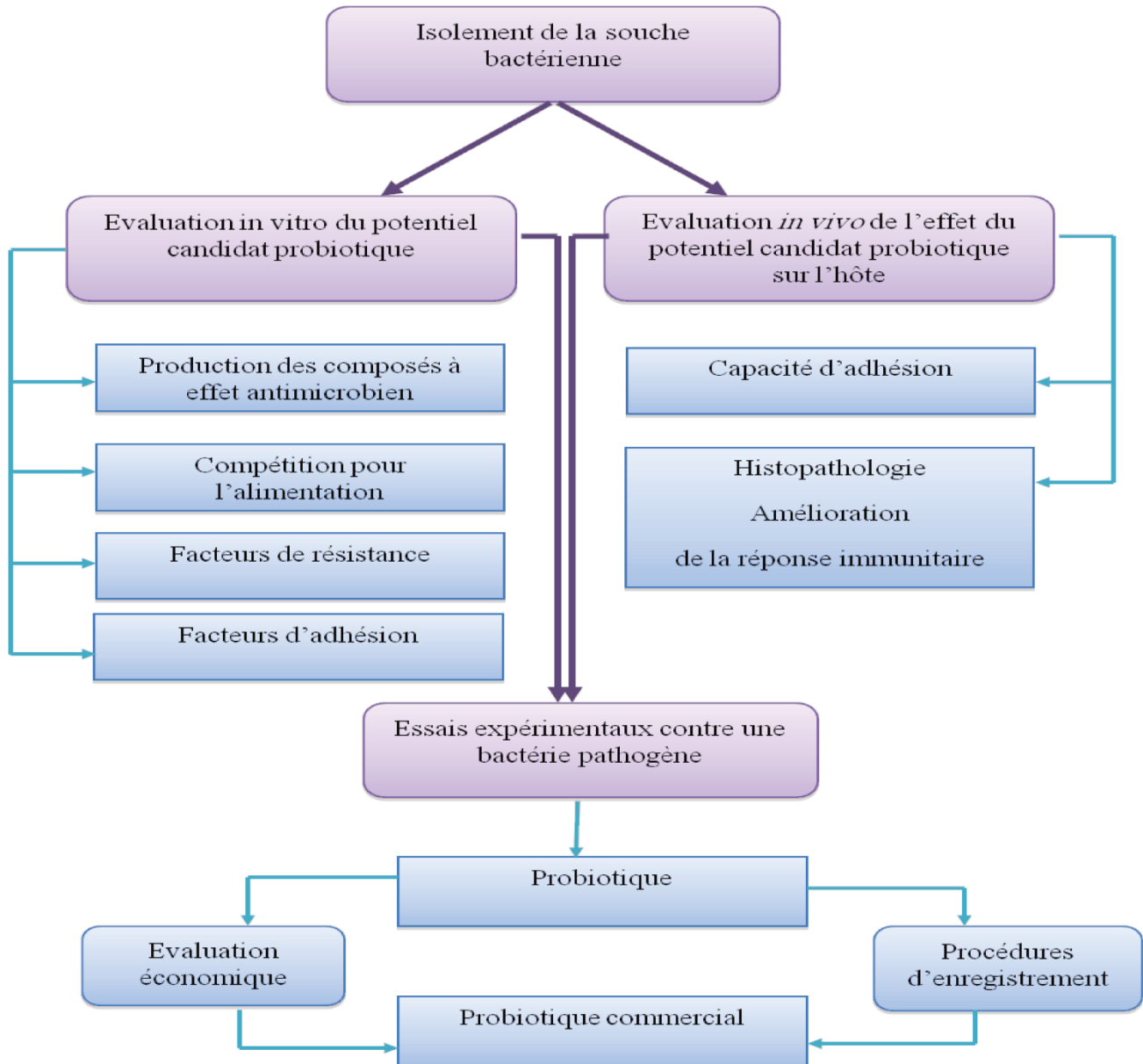
- ✓ La capacité de produire des composés à effet antimicrobien. On peut citer : les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le di-acétyle, et les bactériocines.
- ✓ La capacité à entrer en compétition avec les bactéries pathogènes vis-à-vis des éléments nutritifs et des sites d'adhésion, et par conséquent à survivre et à se multiplier pendant le transit dans le tractus.

**Le second type** de test concerne l'antagonisme in vivo contre les pathogènes. Ce type de test peut être appliqué tout d'abord à des organismes utilisés comme proies vivantes (*Artémia* ou rotifères) en tant que modèles expérimentaux, car ils sont faciles et rapides à cultiver. Puis le test d'antagonisme in vivo doit être appliqué aux larves de poissons.

Les probiotiques sont évalués in vivo pour leur capacité à coloniser le tractus intestinal. Le processus de la colonisation est caractérisé par l'adhésion des bactéries à la surface muqueuse. Au niveau de la muqueuse intestinale, l'adhésion des probiotiques est dépendante entre autres, du flux de matière dans la lumière intestinale, de la compétition pour les éléments nutritifs, de la disponibilité des sites d'adhésion et des propriétés physico-chimiques de surface de la paroi des probiotiques (**WADSTRÖM et al. 1987; FRETER, 1992 ; SCHILLINGER et al. 2005**). L'adhérence et la colonisation des probiotiques font partie des mécanismes de protection contre les microbes pathogènes (**VINE et al. 2004**).

De plus, les probiotiques doivent être caractérisés pour leurs effets immuno-modulateurs sur l'hôte. Par exemple, ils peuvent modifier la réponse immunitaire de l'hôte en interagissant avec les cellules

épithéliales et en modulant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, ce qui peut entraîner une réduction de l'inflammation (KIM et AUSTIN, 2006).



**Figure 1** : Les étapes et les critères nécessaires pour la sélection d'un probiotique comme agent de contrôle en aquaculture (BALCAZAR et al. 2006).

### **I.3.La flore bactérienne des poissons, mollusques, crustacés**

La flore bactérienne non pathogène présente dans les produits aquatiques est peu décrite dans la littérature scientifique. Les quelques travaux ont montré que l'environnement (température, salinité, ...) influence la composition de cette flore bactérienne. Il a été établi que les saisons influent la composition des flores bactériennes des poissons. En hiver, la flore digestive des saumons est dominée par les bactéries à Gram positif et, en été, elle est dominée par les *Vibrionaceae* (TARNECKI *et al.* 2017).

Par ailleurs, la position de l'animal dans la colonne d'eau peut également avoir un impact sur sa flore bactérienne. Les espèces benthiques comme les poissons plats et les mollusques bivalves sont en contact avec la flore bactérienne sédimentaire, alors que les espèces pélagiques comme le thon ne le sont pas (**Figure 2**).

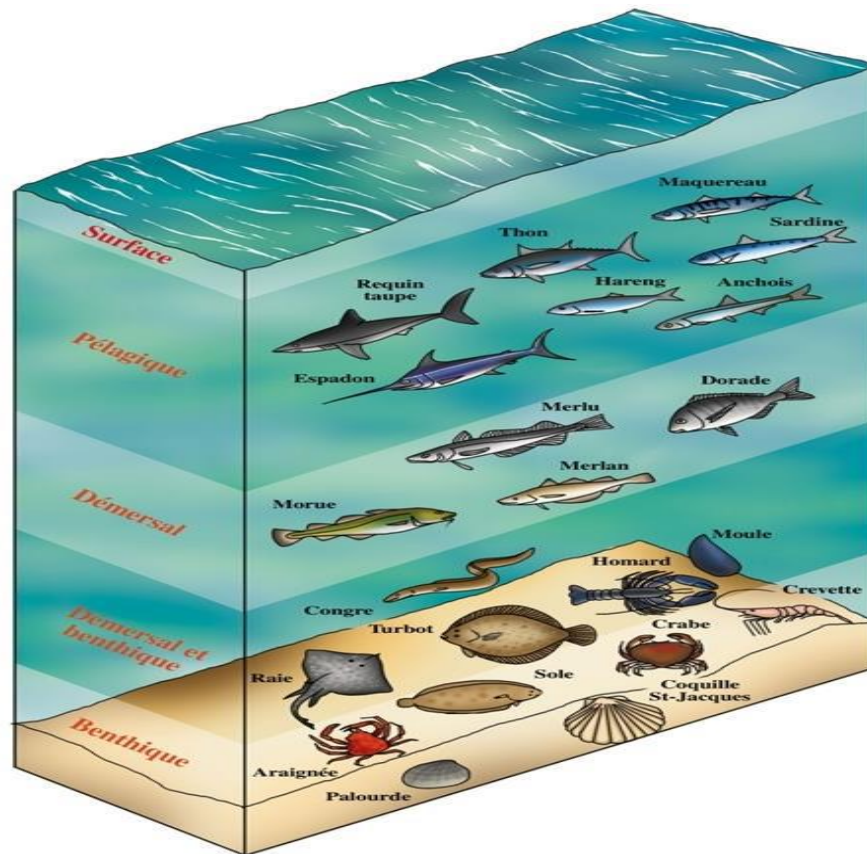


Figure 2 : Lieu de vie des produits de la pêche (Ifremer, 2011)

### I.3.1. Flore bactérienne des poissons :

La plupart des études se concentrent sur le tube digestif des poissons d'élevage et de son rôle en aquaculture sur la croissance des poissons (LEROI, 2010). Pourtant, la chair des poissons est considérée stérile et la contamination bactérienne se fait par contamination croisée avec la peau, les branchies et/ ou le tube digestif lors de leur manipulation. Quelques études également ont décrit la flore bactérienne isolée de la peau et des branchies des poissons issus de la pêche :

Des bactéries des genres *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Proteus*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Vagococcus*, *Staphylococcus*, *Oceanisphaera*, *Synechococcus*, *BizonietBacillus* ont été isolées de la peau, des branchies et des intestins de maquereaux d'Atlantique Nord (SVANEVIK et LUNESTAD, 2011).

L'ensemble de ces flores décrites sont dominées par les bactéries à Gram négatif : *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, et les genres appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Toutefois dans d'autres travaux des bactéries à Gram positif appartenant

aux genres *Micrococcus*, *Bacillus* et *Corynebacterium* ont été également isolées (CAHILL, 1990; AUSTIN, 2006 ; LEROI ,2010).

### **I.3.2. Flore bactérienne des mollusques**

Une étude microbiologique sur des moules *Mytilus galloprovincialis* collecté a la Sardaigne, Italie, la composition des groupes bactériens dominants isolés à partir de ces moules sur milieu gélose BHI étaient : *Vibrio*, *Aeromonas*, *Actinobacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Bacillus*. (FULVIO et al. 1999)

Une autre étude plus récente de la flore bactérienne des mollusques bivalves, les genres bactériens fréquemment isolés étaient *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Bacillus* La présence d'*Enterobacteriaceae* était également fréquente dans la flore bactérienne des mollusques bivalves. Des souches d'*E. Coli* et de *Proteus* spp étaient notamment identifiées dans des huîtres (AMADI, 2015).

### **I.3.3. Flore bactérienne des crustacés**

Les études décrivant la flore bactérienne des crustacés sont peu nombreuses et ne concernent que les crevettes. Cependant, les bactéries des genres *Bacillus* et *Staphylococcus* étaient systématiquement isolées, comme les bactéries appartenant aux bactéries lactiques (*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*) et aux *Enterobacteriaceae* (*Proteus*, *Serratia*, *Escherichia*, *Enterobacter*) (HEINSZ et al. 1988 ; LINTON et al. 2003 ; BROEKAERT et al. 2013 ; DABADE et al. 2016). Les genres *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Exiguobacterium* étaient également fréquemment isolés dans les crevettes (HEINSZ et al. 1988 ; LINTON et al. 2003 ; BROEKAERT et al. 2013 ; DABADE et al. 2016). Les bactéries des genres *Aeromonas*, *Vibrio*, *Alcaligenes* ont été isolées plus spécifiquement de crevettes pêchées en mer d'Irlande (LINTON et al. 2003), *Chryseobacterium*, *Loktanella*, *Planococcus*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter* de crevettes pêchées en Mer du nord (BROEKAERT et al. 2013) et *Kurthia*, *Macrocooccus*, de crevettes d'élevage Béninois (DABADE et al. 2016).

# **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

## **Objectifs du travail**

Le travail réalisé a pour but de caractériser quelques propriétés probiotiques de souches isolées des espèces aquatiques à savoir l'activité antibactérienne et la résistance aux conditions du tube digestif : l'acidité gastrique, les sels biliaires, pouvoir d'adhésion cellulaire.... et d'arriver à mettre en place une collection de souches bactériennes à potentiel probiotique performantes en vue de les utiliser à des fins technologiques dans différents domaines.

## **II.1. Matériel**

### **II.1.1. Matériel biologique**

Notre étude a été menée sur des espèces aquatiques collectées durant le mois de Février 2019. Il s'agit de :

**Embranchement** : Arthropoda

**Sous-embranchement** : Crustacea

**Super classe** : Multicrustacea

**Classe** : Malacostraca

**Sous-classe** : Eumalacostraca

**Super ordre** : Eucarida

**Ordre** : Decapoda

**Sous-ordre** : Dendrobranchiata

**Famille** : Penaeidae

**Genre** : *Aristeus* (DUVETNOY, 1840)

**Espèce** : *Metapenaeus monoceros*,  
(FABRICIUS, 1798).



**Figure 3** : *Metapenaeus monoceros*

**Embranchement :** Chordata  
**Sous-embranchement :** Vertebrata  
**Super classe :** Osteichthyes  
**Classe :** Actinopterygii  
**Sous-classe :** NeopterygiiTeleostei  
**Super ordre :** Acanthopterygii  
**Ordre :** Perciformes  
**Sous-ordre :** Percoidei  
**Famille :** Serranidae  
**Genre :** Serranus  
**Espèce :** *Serranus cabrilla* (LINNAEUS, 1758).



**Figure 4 :** *Serranus cabrilla*

**Embranchement :** Chordata  
**Sous-embranchement:** Vertebrata  
**Classe :** Actinopterygii  
**Ordre :** Perciformes  
**Famille :** Sparidae  
**Genre :** Pagellus  
**Espèce :** *Pagellus acarne* (RISSO, 1827).



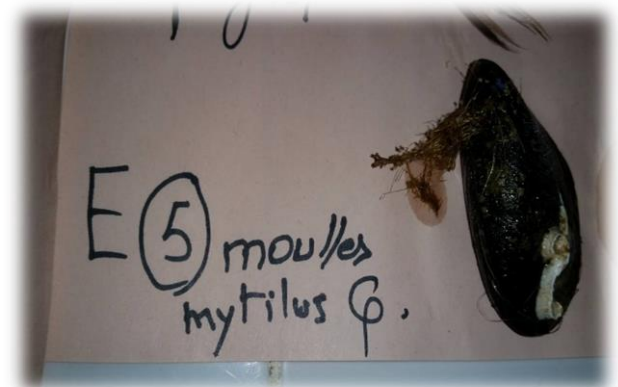
**Figure 5 :** *Pagellus acarne*

**Embranchement :** Arthropoda  
**Sous-embranchement :** Crustacea  
**Super classe :** Multicrustacea  
**Classe :** Malacostraca  
**Sous-classe :** Eumalacostraca  
**Super ordre :** Eucarida  
**Ordre :** Decapoda  
**Sous-ordre :** Dendrobranchiata  
**Famille :** Aristeidae  
**Genre :** *Aristeus* (Duvernoy, 1840)  
**Espèce :** *Aristeus antennatus* (RISSO, 1816)



**Figure 6 :** *Aristeus antennatus*

**Embranchement :** Mollusca  
**Classe :** Bivalvia / Lamellibranchia /  
Pelecypoda  
**Sous classe :** Pteriomorphia  
**Ordre :** Mytilida  
**Famille :** Mytilidae  
**Genre :** *Mytilus* (Linnaeus, 1758).  
**Espèce :** *Mytilus galloprovincialis*



**Figure 7 :** *Mytilus galloprovincialis*

**Embranchement :** Chordata  
**Sous-embranchement:** Vertebrata  
**Superclasse :** Osteichthyes  
**Classe :** Actinopterygii  
**Sous-classe :** NeopterygiiTeleostei  
**Super ordre :** Acanthopterygii  
**Ordre :** Perciformes  
**Sous-ordre :** Percoidei  
**Famille :** Sparidae  
**Genre :** Diplodus  
**Espèce :** *Diplodus vulgaris* (**Geoffroy Saint Hilaire, 1817**).



**Figure 8 :** *Diplodus vulgaris*

**Règne :** Animalia  
**Embranchement :** Arthropoda  
**Sous-embranchement:** Crustacea  
**Classe :** Branchiopoda  
**Sous-classe:** *Sarsostraca*  
**Ordre :** Anostraca  
**Sous-ordre:** Artemiina  
**Famille :** Artemiidae (**LEACH, 1819**).  
**Genre :** Artemia  
**Espèce :** *Artemia salina* (**LINNAEUS, 1758**).



**Figure 9 :** *Artemia salina*

**Phylum : Chordata**

**Sous-phylum : Vertebrata (Craniata)**

**Superclasse : Gnathostomata**

**Classe : Actinopterygii**

**Subclasse : Neopterygii**

**Superordre : Acanthopterygii**

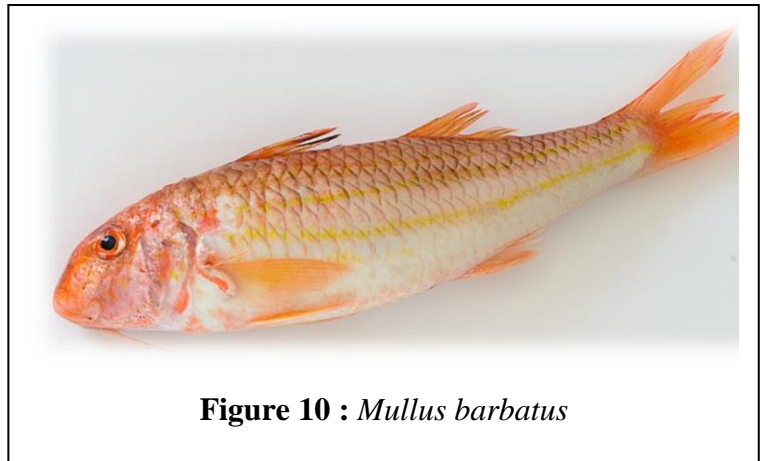
**Ordre : Percomorphi (Perciformes)**

**Sous-ordre : Percoidei**

**Famille : Mullidae**

**Genre : Mullus**

**Espèce : *Mullus barbatus* (Linnaeus, 1758)**



**Figure 10 : *Mullus barbatus***

**Embranchement : Vertébrés**

**Sous embranchement : Gnathostomes**

**Super classe : Poissons**

**Classe : Osteichthyens**

**Sous classe : Actinoptérygiens**

**Super ordre : Téléostéens**

**Ordre : Clupéiforme**

**Sous ordre : Clupéoïdés**

**Famille : Clupéidés**

**Genre : Sardinella**

**Espèce : *Sardinella aurita* (Valenciennes, 1847)**



**Figure 11 : *Sardinella aurita***

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Echantillonnage

Au cours de cette étude, des échantillons d'espèces aquatiques (poissons et crustacés) frais ont été prélevés, durant la période allant du 22/02/2019 au 23/02/2019, de différents points de vente (poissonneries et marchés) et au petit port de pêche artisanal, situés à Ziama Mansouriah et ses alentours (wilaya de Jijel) et au niveau de la baie d'Alger. Au total 13 échantillons d'espèces diverses ont été prélevés, à raison de 2 échantillons par espèce saisis et déposés par le vendeur ou le personnel lui-même dans un sac en plastique. Ces échantillons ont été directement acheminés, dans une glacière contenant des paillettes de glace, au laboratoire de Microbiologie de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral. Leur répartition est mentionnée dans le **tableau 3**.

**Tableau 3** : Présentation et répartition des espèces aquatiques utilisées pour cette étude.

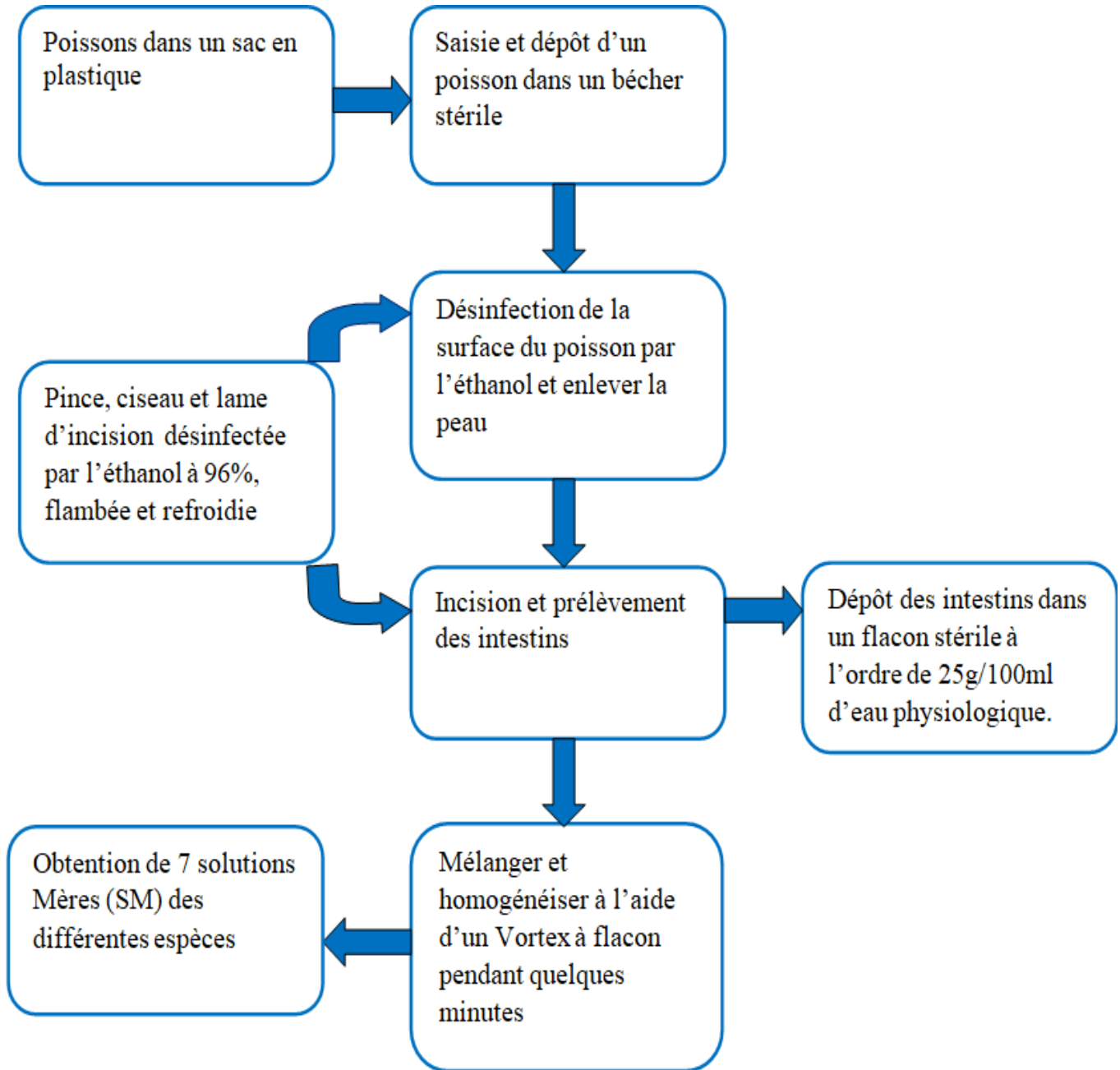
| Lieu d'échantillonnage | Date de l'échantillonnage                | Endroit de d'échantillonnage | Nombre d'échantillons | Espèces                        |
|------------------------|--|------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Ziama Mansouriah       | 22/02/2019                               | Poissonnerie                 | 02                    | Crevette blanche               |
| Ziama Mansouriah       | 22/02/2019                               | Petit port                   | 02                    | Saran                          |
| Ziama Mansouriah       | 22/02/2019                               | Petit port                   | 02                    | Pageot                         |
| Ziama Mansouriah       | 22/02/2019                               | Poissonnerie                 | 02                    | Crevette royale                |
| Sablette (Baie Alger)  | 23/02/2019<br>Collection de<br>L'ENSSMAL | Collecté                     | 02                    | Moule, Sardinelle,<br>Rouget   |
| Ziama Mansouriah       | 23/02/2019                               | Petit port                   | 02                    | Sar                            |
| Ouargla                | 23/02/2019                               | Chott sidi khouiled          | 1g de cystes          | Cystes d'Artémie<br>déshydraté |

### II.2.2. Préparation des suspensions mères et isolement des bactéries

A leur arrivés, les échantillons ont été manipulés dans la zone de stérilité avec du matériels stériles, pour obtenir des solutions mères (SM).

La méthodologie du prélèvement du poisson est détaillée dans **la figure 12**, un isolement des bactéries a été effectué à partir des tubes digestifs des poissons sur le milieu MRS selon le protocole d'**IDOUI et al. (2009)**.

Le même protocole a été suivi par rapport aux crustacés (Crevette et Artémie), l'opération très délicate de prélever le tube digestif des crevettes nous a mené a utilisé l'individu complet, tandis que les artémies, les cystes ont été bien hydratés et de cela des solutions mères ont été préparé, En revanche chez les moules tous le contenu (chair +liquide intervalvaire) a été utilisé pour préparer la solution mère en restant toujours à l'ordre de 25g/100ml d'eau physiologique.



**Figure 12 :** Diagramme détaillé des étapes de prélèvement à partir du poisson.

### II.2.3. Enrichissement et isolement des bactéries lactiques

A partir des solutions mères de chaque échantillon, 1ml a été mis dans des milieux d'enrichissement (des tubes contenant 9ml de MRS bouillon) puis incubés à 37°C pendant 24 heures. L'isolement des souches a été effectué sur deux milieux sélectifs des bactéries lactiques MRS et M17. À partir des cultures obtenues sur les milieux d'isolements précédents, un repiquage du deux fois a été effectué sur les mêmes milieux pour obtenir des cultures pures. La conservation des souches a été effectuée dans une solution de 50% de MRS bouillon et 50% de glycérol dilué à 50% dans des microtubes, à une température de -18°C.

## II.2.4. Identification

### II.2.4. 1. Aspect Macroscopique

La première étape du diagnostic bactérien et du biotypage d'une souche est la description macroscopique des colonies isolées ; parfois cette seule étude permet de connaître le germe qu'on a en présence. On s'intéresse dans ce cas à plusieurs caractères tels que : la forme, la couleur, le contour, le relief et la taille.

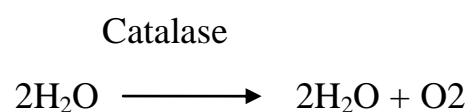
### II.2.4. 2. Coloration de Gram

Les cultures pures ont été caractérisées par coloration de Gram, selon des procédures standard (SHARPE, 1979 )

- **On réalise un frottis fixé** sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne: On dépose une goutte de la suspension bactérienne au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage sur flamme du bec Bunsen.
- **La coloration au violet de Gentiane** la lame est plongée pendant 1 minute dans la coloration au violet de gentiane. Après l'écoulement du temps on rince la lame à l'eau distillée.
- **Mordantage au lugol** : verser le lugol et laisser agir 1min ; Rincer à l'eau distillée.
- **Décoloration à l'alcool**: Surveiller la décoloration à l'alcool de 10 à 15 secondes. Rincer sous un filet d'eau distillée.
- **Contre coloration avec de la Fuchsine**: laisser agir 1 minute. Laver doucement à l'eau distillée. Sécher la lame à l'aide du papier joseph et passer à la lecture sous microscope optique aux grossissements 100X avec l'huile d'immersion.

### II.2.4.3. Test catalase

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase, celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



La méthode de recherche de la catalase consiste à mettre une goutte de suspension bactérienne sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz une réaction d'effervescence (**LARPENT et LARPENT, 1990**)

## **II.2.5. L'étude du potentiel probiotique des bactéries**

### **II.2.5.1 Tests de bioactivité**

#### **II.2.5.1. 1. Le test du pouvoir antagoniste par la méthode des spots (FLEMING et al. 1975)**

Le présent test a concerné les souches bactériennes isolées à partir du milieu MRS et M17, vis-à-vis une collection de bactéries pathogènes: *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio anguillarum*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio fluvialis*, *Escherichia coli* ATCC29522.

10 µl du inoculum de chaque souche de bactérie tests ont été ensemencés en spots sur des boites de Pétri et laissés sécher, puis incubées à 37°C pendant 24 heures (**FERNANDEZ et al. 2007**).

A partir d'une suspension jeune de 18h, 1ml de chaque souche pathogène (une densité optique de (DO) 0,4 à une longueur d'onde de 570 nm (10<sup>6</sup> UFC/ml)) (**ZHOU et al. 2000**), cette suspension a été inoculé dans des tubes à essais rempli avec 9 ml de BHI gélose en surfusion. Après homogénéisation, la gélose sera coulée dans les boites de gélose MRS contenant les spots de bactéries formées et ensuite ces derniers seront incubés à 37°C pendant 24 heures (**Figure 13**).

A la fin de la période d'incubation, les boites sont examinées par l'apparition des zones d'inhibition de la croissance du germe pathogène autour des emplacements des spots.

Le diamètre des zones d'inhibition produites ont été mesuré (le diamètre d'inhibition calculé correspond à la différence entre le diamètre de la zone d'inhibition et le diamètre du spot de la souche test) (**FLEMING et al. 1975**).

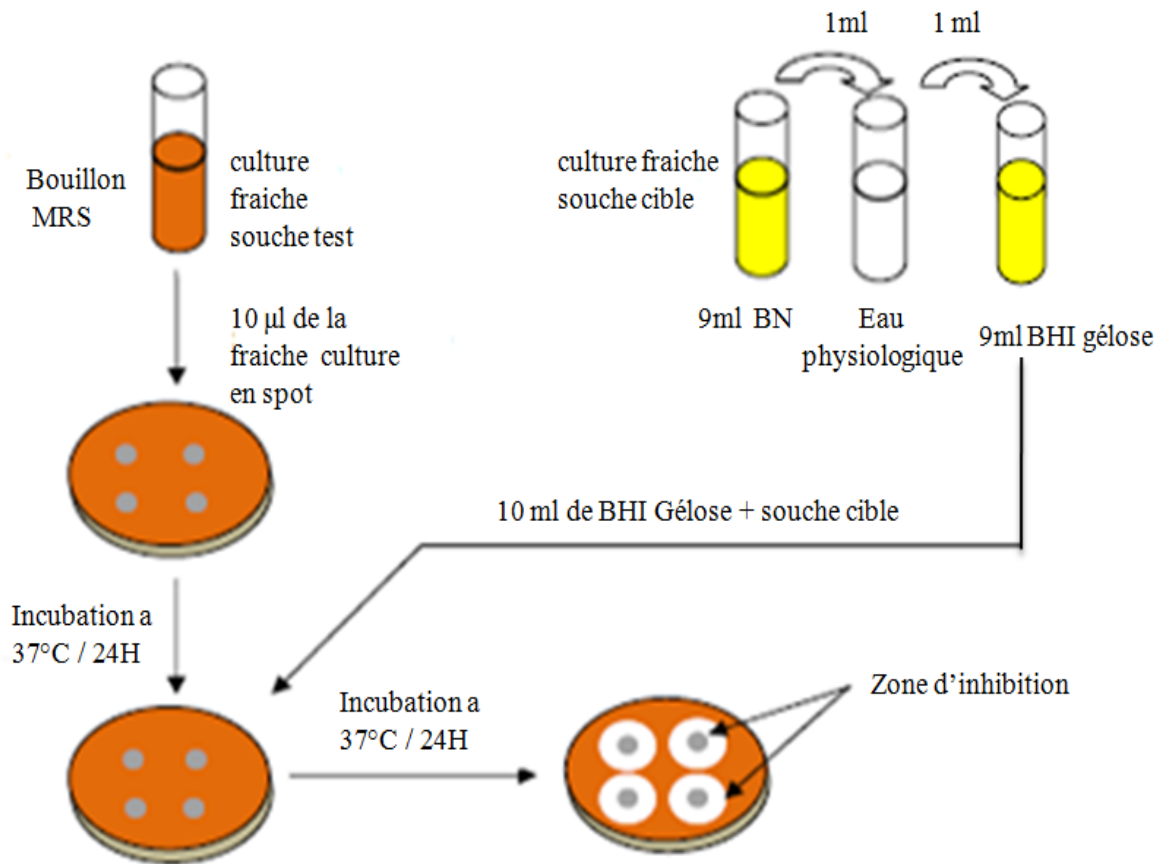


Figure 13 : Méthode de spots (FLEMING et al. 1975)

### II.2.5.1. 2. Dosage de l'acide lactique produit

La production de l'acide lactiques de nos souches est estimé par un dosage acide base. Un ml d'une suspension bactérienne de  $DO = 0,3$  à une longueur d'onde de 570 nm ( $10^{-6} - 10^{-7}$  UFC /ml) a été ajouté à 100 ml de bouillon MRS. L'ensemble a été incubé à 37°C pendant 24 h. Les pH initiaux (6,52) et finaux ont été mesurés à l'aide d'un pH-mètre électronique après 24H, 48H et 72H. 10 ml de culture sont dosés par une solution de NaOH 0,1 N en présence de deux gouttes de phénolphtaléine à 1% comme indicateur coloré jusqu'au virage du couleur perceptible par comparaison avec un témoin constitué de même culture.

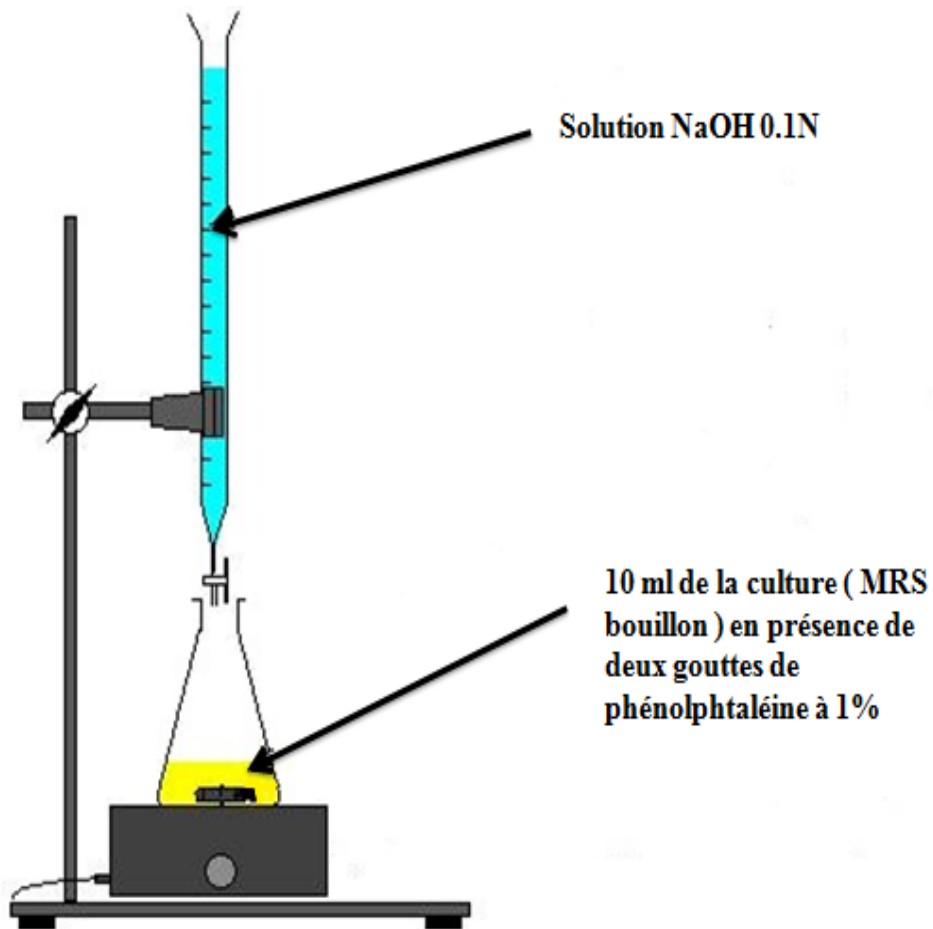


Figure 14 : Méthode de dosage de l'acide lactique

La masse de l'acide lactique produit dans 100 ml de culture est obtenue par la formule :

$$M = Nb \times Vb \times 90g \times 10$$

Dont le :

**Nb:** normalité de la soude (0,1 N)

**Vb:** volume en litre de soude ayant servi à neutraliser l'acidité contenue dans 10 ml de la culture

**90g** = masse molaire de l'acide lactique (BOUZIANE et al. 2004)

### **II.2.5.1.3 Test de la résistance au pH gastrique**

Après revivification des souches tests, 1 ml a été suspendue dans une solution de MRS bouillon ajusté à pH 2, pH 3 et pH 4, et incubés à 37°C. **(El-JENI et al. 2015)**

Après 3h d'incubation le taux de survie des bactéries dans le bouillon d'MRS acide est estimé par un dénombrement en surface. **(MUTHUKUMAR et KANDEEPAN, 2015)**

### **II.2.5.1.4 Test de la résistance aux sels biliaries**

Après une revivification des souches tests, 1 ml a été suspendue dans une solution de MRS bouillon ajusté à pH 8 avec une concentration d'Oxgall de 0.5% et incubés à 37°C. **(El-JENI et al. 2015)**

Après 3h d'incubation dans les sels biliaries le taux de survie des bactéries dans le bouillon d'MRS est estimé par un dénombrement en surface **(MUTHUKUMAR et KANDEEPAN, 2015)**

### **II.2.5.1.5 Test de la production de biofilm**

Une culture bactérienne de 18h à 37°C, est vortexée pendant 5min, ajusté à une densité optique entre 0.56 – 0.64 à une longueur d'onde de 540 nm. Un volume de 250µl de chaque suspension est incubé sur les plaques de 96 puits stériles pendant 6h à 37°C, après incubation chaque puits reçoit un volume de 25µl de cristal violet à 1% , ensuite 15 min d'incubation , chaque puits est lavé trois fois avec 200 µl de PBS stérile , les puits seront par la suite lavés deux fois avec un volume de 200µl d'éthyle alcool .le contenu inoculum est introduit dans un tube à essai contenant un volume de 1.2 ml d'alcool , après une simple agitation la DO est mesurée à une longueur d'onde de 540 nm. Les souches bactériennes sont quantifiées forts producteurs si la DO est supérieur à 0,500, des producteurs moyens si la DO est entre 0.500 et 0.100 et des faibles producteurs si la DO est inférieure à 0.100 **(MALDONADO et al. 2007).**

## **II.2.5.2. Tests de Biosécurité**

### **II.2.5.2.1. Test d'anti bio-résistance**

Les bactéries isolées sur MRS et M17 ont été testées vis-à-vis de 8 disques antibiotiques : les inhibiteurs de la paroi bactérienne : penicillin (10 µg), oxacillin (1µg), vancomycin (30µg) ; les inhibiteurs de la synthèse protéique : Gentamycin (10µg), chloramphenicol (30µg), tetracyclin (30 µg), streptomycin (10µg), clindomycin (2µg). Pour réaliser ce test, les souches ont été

ensemencées sur gélose MH et incubées pendant 24h à 37°C. A partir de ces cultures pures, des colonies ont été prélevées afin de préparer des suspensions sur le bouillon MRS à une concentration de 0,5 McF ( $10^6$  -  $10^7$  cellules.ml<sup>-1</sup>). L'ensemencement des souches a été réalisé, par stries serrées en utilisant un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne et bien essoré. Ensuite les disques d'antibiotiques sont déposés sur les boites déjà ensemencé, les boites ont été incubées pendant 24 h à 37 °C.

Les diamètres des zones d'inhibitions de croissance autour de chaque disque ont été mesurés. Les résultats sont interprétés selon les recommandations du Comité de la Société Française de l'Antibiogramme (2017). Les résultats sont exprimés par (S) sensible, (I) intermédiaire et (R) résistant.

#### **II.2.5.2.2. Test d'Hémolyse**

Des cultures des bactéries bioactives ont été ensemencées en stries sur des boites de gélose Columbia contenant 5% (P/V) de sang frais, et incubées pendant 48 h à 37°C. Après incubation, les boites ont été examinées pour la présence de  $\beta$ -hémolyse (zones claires autour des colonies),  $\alpha$ -hémolyse (zones avec reflets verdâtres autour des colonies). (**MARAGKOUDAKIS et al. 2006**)

# **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

### III.1. Isolement et Identification des isolats

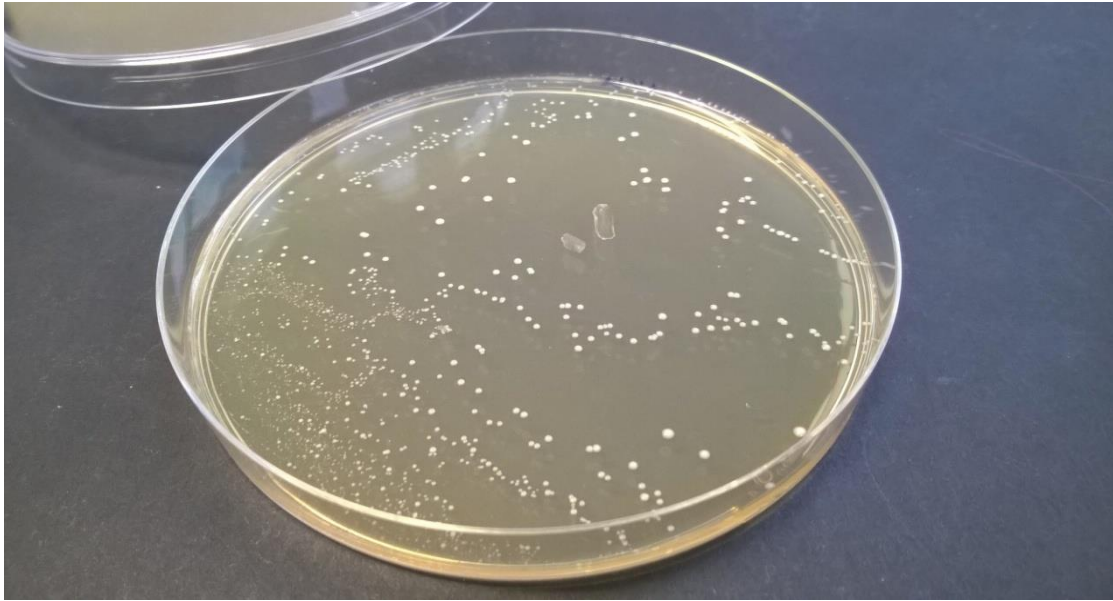
A partir des 13 échantillons frais, prélevés et analysés, 70 souches ont été identifiées dont celles isolées sur MRS et M17. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le **tableau 4**

**Tableau 4** : Répartition des souches isolées pour chaque espèce.

| Milieu d'isolement    | Origine Espèces  | Nombre de souches isolées |
|-----------------------|------------------|---------------------------|
| <b>MRS<br/>(n=35)</b> | Crevette blanche | <b>3</b>                  |
|                       | Saran            | <b>9</b>                  |
|                       | Pageot           | <b>3</b>                  |
|                       | Crevette royale  | <b>4</b>                  |
|                       | Moule            | <b>6</b>                  |
|                       | Sar              | <b>3</b>                  |
|                       | Artémie          | <b>4</b>                  |
|                       | Autres           | <b>3</b>                  |
| <b>M17<br/>(n=35)</b> | Crevette blanche | <b>3</b>                  |
|                       | Saran            | <b>10</b>                 |
|                       | Pageot           | <b>3</b>                  |
|                       | Crevette royale  | <b>6</b>                  |
|                       | Moule            | <b>8</b>                  |
|                       | Sar              | <b>5</b>                  |
|                       | Artémie          | <b>0</b>                  |
|                       | <b>Totale</b>    | <b>70</b>                 |

#### III.1.1 Caractères cultureux

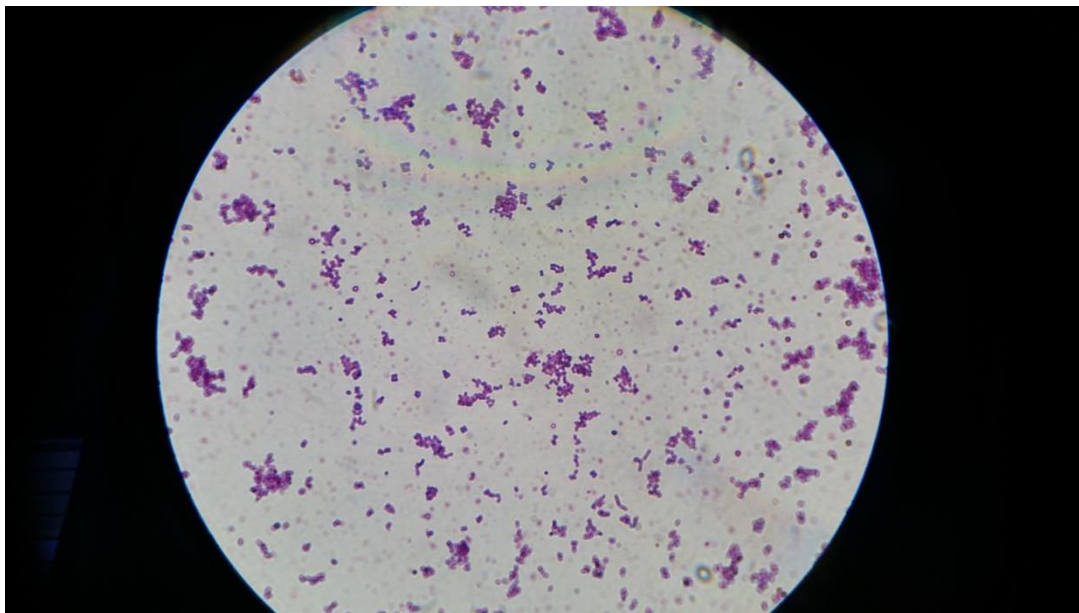
Sur gélose MRS, ces bactéries apparaissent en petites colonies muqueuses de tailles variables arrondies de forme lenticulaire avec une couleur blanchâtre à jaunâtre (**Figure 15**), elles donnent un trouble homogène sur milieu MRS bouillon.



**Figure 15** : Aspects des bactéries isolées sur le milieu MRS.

### III.1.2 Caractères microscopiques

Après la coloration de Gram, l'aspect microscopique des souches a révélé deux formes de cellules coques et bâtonnets, 66 souches sur 70 ont été Gram positif, une seule souche Gram négatif (15). **La figure (16)** présente l'aspect d'une souche de bactérie sous microscope optique (G×100).



**Figure 16** : Aspect microscopique d'une des souches testées à la forme Cocci (Gx100).

### III.1.3 Caractère biochimique : Test catalase

Le test catalase a été négatif sur toutes les 70 souches testées. Les bactéries à Gram positif et catalase négatif sont supposés être des bactéries lactiques.



**Figure 17** : Photo représentative au résultat négative du test de catalase.

Les *Enterococcus* sont des cocci Gram positive, généralement catalase négatifs. Certaines espèces présentent une activité pseudo-catalase. Ils sont généralement des anaérobies facultatifs et non mobiles. Les cellules sont ovoïdes et se présentent sous forme de cellules isolées, par paire ou encore sous forme de chaînette, la plupart font partie intégrante de la flore intestinale de nombreux animaux (SCHLEIFER *et al.* 1984). Généralement, les entérocoques produisent des colonies de couleur blanche. Toutefois, quelques-unes sont de couleur jaune comme *E. mundtii*, *E. casseliflavus* et *E. sulfureus* (HIGASHIDE *et al.* 2005).

Ces caractéristiques sont probablement identiques aux résultats d'isolement obtenus dans la présente étude pour un départ de confirmation que la majorité de nos isolats appartiennent au genre *Enterococcus sp.*

Les résultats de l'identification macroscopique, microscopique et les tests biochimiques des 70 souches isolées sur milieu MRS et M17 sont représentés dans les **Tableaux 5** et **6** ci-dessous :

Tableau 5 : Représentation de l'identification des souches isolées du milieu MRS.

| Souche code | Origine de la souche | Aspect microscopique                                | Coloration de Gram | Test catalase |
|-------------|----------------------|---|--------------------|---------------|
| 1           | pageot               | Cocci, diplocoque                                   | +                  | -             |
| 2           | Artémie              | Cocci, diplocoque                                   | +                  | -             |
| 3           | Artémie              | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 4           | pageot               | Coccobacille  | +                  | -             |
| 5           | pageot               | Cocci, diplocoque                                   | +                  | -             |
| 6           | Artémie              | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 7           | Sarran               | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 8           | Sarran               | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 9           | Sarran               | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 10          | Sarran               | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 11          | Sarran               | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 12          | Sarran               | Négatif, souche non pure                            | /                  | -             |
| 13          | Sar                  | Cocci, diplocoque                                   | +                  | -             |
| 14          | Sar                  | Négatif, souche non pure                            | +                  | -             |
| 15          | Sarran               | Cocci   | -                  | -             |
| 16          | Sar                  | Cocci, diplocoque en chaînette                      | +                  | -             |
| 17          | Sarran               | Cocci, diplocoque                                   | +                  | -             |
| 18          | Sarran               | diplocoque, diplocoque en chaînette                 | +                  | -             |
| 19          | Crevette B           | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette, en amas | +                  | -             |
| 20          | Sardinella           | Cocci   | +                  | -             |
| 21          | Artémie              | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 22          | Rouget (Gonade 2)    | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 23          | Rouget (Gonade 1)    | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 24          | Crevette B           | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 25          | Crevette B           | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 26          | Crevette R           | Cocci   | +                  | -             |
| 27          | Crevette R           | Cocci, diplocoque                                   | +                  | -             |
| 28          | Crevette R           | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 29          | Crevette R           | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 30          | Moule                | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 31          | Moule                | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 32          | Moule                | Cocci, diplocoque                                   | +                  | -             |
| 33          | Moule                | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette          | +                  | -             |
| 34          | Moule                | Négatif, souche non pure                            | /                  | -             |
| 35          | Moule                | Négatif, souche non pure                            | /                  | -             |

Tableau 6 : Représentation de l'identification des souches isolées du milieu M17.

| Souche | Origine de la souche | Aspect microscopique                       | Coloration de Gram | Test catalase |
|--------|----------------------|--|--------------------|---------------|
| 1'     | Crevette R           | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 2'     | Sarran               | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 3'     | Crevette B           | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 4'     | Sarran               | Bacille, coccobacille                      | +                  | -             |
| 5'     | Sarran               | Bacille, coccobacille                      | +                  | -             |
| 6'     | Crevette R           | Bacille, coccobacille                      | +                  | -             |
| 7'     | Crevette R           | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 8'     | Sarran               | Bacille, coccobacille                      | +                  | -             |
| 9'     | Crevette R           | diplocoque                                 | +                  | -             |
| 10'    | Sarran               | Cocci, diplocoque                          | +                  | -             |
| 11'    | Sarran               | Cocci, diplocoque                          | +                  | -             |
| 12'    | Crevette R           | Négatif, souche non pure                   | +                  | -             |
| 13'    | Moule                | Cocci, diplocoque                          | +                  | -             |
| 14'    | Moule                | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 15'    | Pageot               | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 16'    | Crevette R           | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 17'    | Sarran               | Négatif, souche non pure                   | +                  | -             |
| 18'    | Sar                  | Cocci, diplocoque                          | +                  | -             |
| 19'    | Pageot               | Cocci, diplocoque                          | +                  | -             |
| 20'    | Pageot               | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 21'    | Moule                | Négatif, souche non pure                   | +                  | -             |
| 22'    | Sar                  | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 23'    | Sarran               | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 24'    | Moule                | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 25'    | Sarran               | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 26'    | Crevette B           | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 27'    | Sar                  | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 28'    | Sarran               | Bacille, coccobacille                      | +                  | -             |
| 29'    | Sar                  | Bacille, coccobacille                      | +                  | -             |
| 30'    | Moule                | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 31'    | Crevette B           | Négatif, souche non pure                   | +                  | -             |
| 32'    | Moule                | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 33'    | Sar                  | Cocci, diplocoque                          | +                  | -             |
| 34'    | Moule                | Cocci, diplocoque, diplocoque en chaînette | +                  | -             |
| 35'    | Moule                | Bacille, coccobacille                      | +                  | -             |

### III.2. Tests de bio activité

#### III.2.1. Le test du pouvoir antagoniste par la méthode des spots (FLEMING et al. 1975)

L'activité antimicrobienne est l'un des critères de sélection les plus importants pour les probiotique, le test de spots a été réalisé pour les 70 souches isolées de différentes sources dont le but est de sélectionner les souches qui ont une activité antimicrobienne importante, les résultats obtenus présentent la répartition des zones d'inhibition des souches isolées appartenant

à la classification des bactéries lactiques en tant que Gram positif, catalase négative ( **SHARPE, 1979** ) à pouvoir antagoniste positif vis-à-vis les 10 souches pathogènes, les diamètres des zones d'inhibitions sont représentés en mm dans les **tableaux 7 et 8**.

**Tableau 7** : les diamètres des zones d'inhibition en mm des souches testées à pouvoir antagoniste positif vis-à-vis les souches pathogènes sur milieu MRS.

| souche | Origine           | Pouvoir Antagoniste (Zone d'inhibition en mm) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------|-------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|        |                   | A   | B    | C    | D    | E    | F    | G    | H    | I    | J    |
| 1      | pageot            | 2   | 15   | 20   | 19   | 30   | N    | 23   | 26   | 28   | 18   |
| 2      | Artémie           | 20  | 19   | 12.5 | 16   | 15   | 16   | 22   | 13   | 13   | 16   |
| 3      | Artémie           | 2   | 16   | 11.5 | 17   | 18   | 8    | 14   | 12.5 | 20   | 12   |
| 4      | pageot            | 12  | 18   | 12   | 17   | 18   | 18   | 28   | 13.5 | 20   | 14   |
| 5      | pageot            | 18  | 19   | 10   | 19   | 16   | 16   | 24   | 12   | 14   | 13   |
| 6      | Artémie           | 14  | 18   | 10   | 22   | 18   | 18   | 27   | 16   | 15   | 17   |
| 7      | Sarran            | 16  | 12   | 17   | 20   | 22   | 20   | 16   | 14   | 18   | 11   |
| 8      | Sarran            | N   | N    | 16   | 24   | N    | 20   | N    | 13.5 | 11   | 13.5 |
| 9      | Sarran            | 7   | 10   | 16   | 20   | 20   | 30   | 13   | 14   | 11   | 13   |
| 10     | Sarran            | 2   | 11.5 | 20   | 24   | 26   | 22   | 25   | 18   | 19   | 18   |
| 11     | Sarran            | 17  | 11   | 7    | 10   | 20   | 13   | 18   | 10   | 8    | 9    |
| 12     | Sarran            | 18  | 19   | 5    | 8    | 20   | 5    | 12   | 4    | 4    | 4    |
| 13     | Sar               | 8   | 18   | 9    | 6    | 10   | 23   | 12   | 19   | 18   | 20   |
| 14     | Sar               | 22  | 14   | 17   | 34   | 12   | 19   | 26   | 18   | 18   | 17   |
| 15     | Sarran            | N   | 9    | 18   | 8    | 18   | 13   | 12   | 10   | 12   | 14   |
| 16     | Sar               | 20  | 14   | 11   | 38   | 16   | 20   | 16   | 2    | 14   | 18   |
| 17     | Sarran            | N   | 10   | 18   | 10   | 28   | 17   | 11   | 15   | 12   | 14   |
| 18     | Sarran            | 14  | 12   | 17.5 | 22   | 14.5 | 17   | 14   | 8    | 10   | 20   |
| 19     | Crevette B        | N   | 21   | 14   | 17   | 17   | 10   | 24   | 14   | 18   | 14   |
| 20     | Sardinella        | N   | 12   | 11   | 15   | 10   | 14   | 14   | 12.5 | 11   | 28   |
| 21     | Artémie           | N   | 16   | 6    | 20   | 16   | 12   | 6    | 2    | 11.5 | 14   |
| 22     | Rouget (Gonade 2) | N   | 8    | 12   | 26   | 20   | 18   | 12   | 20   | 14   | 26   |
| 23     | Rouget (Gonade 1) | N   | 16   | N    | 6    | 5    | 4    | 8    | N    | N    | 15.5 |
| 24     | Crevette B        | N   | 13   | N    | 23   | 18.5 | N    | 13   | 6    | 4    | 17   |
| 25     | Crevette B        | N   | 15.5 | 4    | 17   | 9    | 8    | 19   | 6    | 8    | N    |
| 26     | Crevette R        | N   | 7.5  | 8    | 12   | 8    | 11   | 12   | 8    | 6    | 7    |
| 27     | Crevette R        | N   | N    | 7    | 10   | 10   | 12   | 6    | 7    | 5    | 7    |
| 28     | Crevette R        | N   | 11   | 10   | 17   | 12   | 12   | 14   | 12.5 | 6    | 7.5  |
| 29     | Crevette R        | N   | 13   | 10   | 13.5 | 14   | 13   | 20   | 10   | 10   | 10   |
| 30     | Moule             | N   | 14   | 9    | 12   | 12   | 12   | 14   | 7.5  | 7    | 9    |
| 31     | Moule             | 6   | 15   | 11   | 13   | 12   | 12   | 21   | 13   | 11   | 16   |
| 32     | Moule             | N   | 15.5 | 8    | 9.5  | 12   | 12.5 | 13.5 | 11   | 7    | 14   |
| 33     | Moule             | N   | 20   | 8.5  | 9    | 11   | 9.5  | 10   | 8.5  | 4    | 10   |
| 34     | Moule             | N   | 11   | 8.5  | 10   | 11   | 7    | 12   | 7.5  | 10   | 11   |
| 35     | Moule             | N   | N    | 10   | 12   | 12   | 9.5  | 11   | 8    | 10   | 9    |

**Légende Tableau 7 :** **A** : *E. Coli* ATCC 29522, **B** : *Vibrio fluvialis*, **C** : *Pseudomonas Aeruginosa*, **D**: *Vibrio Anguillarum*, **E**: *S. aureus*, **F** : *Vibrio alginolyticus*, **G** : *Pseudomonas Fluorescens*, **H** : *Aeromonas hydrophila*, **I** : *K. pneumoniae*, **J** : *Listeria monocytogenes*, **N** : *Resultats negatifs* (Absence de zone d'inhibition)

**Tableau 8 :** les diamètres des zones d'inhibition en mm des souches testées à pouvoir antagoniste positif vis-à-vis les souches pathogènes sur milieu M17.

| Souche | Origine    | Pouvoir Antagoniste (Zone d'inhibition en mm) |     |   |   |      |   |      |     |    |     |
|--------|------------|---|-----|---|---|------|---|------|-----|----|-----|
|        |            | A   | B   | C | D | E    | F | G    | H   | I  | J   |
| 1'     | Crevette R | 4.5   | 9   | 4 | 4 | N    | 8 | 4    | N   | 6  | 6   |
| 2'     | Sarran     | 11  | 5   | 6 | N | N    | N | N    | N   | 8  | N   |
| 3'     | Crevette B | 11.5  | 9   | N | N | 12   | N | 13   | N   | N  | 4   |
| 4'     | Sarran     | 12  | N   | N | N | 8    | N | N    | N   | N  | N   |
| 5'     | Sarran     | 4   | 4   | N | 4 | N    | N | 6    | N   | N  | N   |
| 6'     | Crevette R | 2   | 7.5 | 4 | 2 | 4    | 5 | 2    | N   | 5  | 4   |
| 7'     | Crevette R | 8   | 6   | 4 | N | 7    | N | 8    | 8   | 6  | 6   |
| 8'     | Sarran     | 6   | 6   | 5 | 6 | 5    | 4 | N    | 6   | N  | 7   |
| 9'     | Crevette R | N   | N   | N | N | 5    | N | 11   | 9   | 10 | N   |
| 10'    | Sarran     | 7.5   | 6   | 6 | 2 | N    | N | 6    | 10  | 8  | 6   |
| 11'    | Sarran     | 6   | N   | N | 4 | 4    | N | 10   | 7   | 6  | 5   |
| 12'    | Crevette R | 4   | 6   | 3 | 6 | 4    | 3 | 8    | N   | 3  | 6   |
| 13'    | Moule      | 3.5   | 7   | 6 | 4 | 4    | 6 | 5    | 4   | 4  | 7   |
| 14'    | Moule      | 4   | 4   | 7 | 4 | 2    | 3 | 4    | N   | 5  | 5   |
| 15'    | Pageot     | 10  | 6   | 4 | N | 13   | N | 12   | 12  | 8  | 4   |
| 16'    | Crevette R | 4.5   | N   | N | N | 4    | N | 13   | 3   | N  | 4   |
| 17'    | Sarran     | 6   | 5   | N | 4 | N    | 2 | N    | N   | N  | N   |
| 18'    | Sar        | 7   | N   | N | 4 | N    | N | 4    | N   | N  | N   |
| 19'    | Pageot     | 6   | N   | N | N | 4    | 4 | 6    | N   | 8  | N   |
| 20'    | Pageot     | 12  | N   | N | N | 6    | N | 11   | 9.5 | 8  | N   |
| 21'    | Moule      | 8   | N   | N | N | N    | N | N    | N   | N  | N   |
| 22'    | Sar        | 7   | N   | 4 | 4 | 7    | 3 | 8    | N   | 6  | N   |
| 23'    | Sarran     | 4   | N   | 3 | N | N    | N | 6    | N   | 4  | 3.5 |
| 24'    | Moule      | 8   | N   | 4 | 5 | 3.5  | 4 | 4.5  | N   | 4  | N   |
| 25'    | Sarran     | N   | N   | 5 | 4 | 4    | 4 | 6    | 6   | 5  | N   |
| 26'    | Crevette B | N   | N   | 6 | 4 | 12.5 | N | 12   | 8   | N  | N   |
| 27'    | Sar        | N   | N   | 4 | N | 3    | N | N    | N   | N  | N   |
| 28'    | Sarran     | N   | N   | N | N | 4    | N | 6    | N   | N  | N   |
| 29'    | Sar        | N   | N   | 4 | 2 | N    | N | 8    | N   | N  | N   |
| 30'    | Moule      | 8   | N   | 4 | N | 10   | N | 13   | N   | N  | N   |
| 31'    | Crevette B | 1,1   | N   | N | N | 12   | N | 12   | N   | N  | N   |
| 32'    | Moule      | N   | N   | 4 | N | N    | N | 10.5 | N   | N  | N   |
| 33'    | Sar        | 5   | N   | 4 | N | N    | N | 4    | N   | N  | N   |
| 34'    | Moule      | 9.5   | N   | 6 | N | 9    | N | 1    | N   | N  | N   |
| 35'    | Moule      | 11  | N   | 6 | N | N    | N | 10.5 | N   | N  | N   |

**Légende Tableau 8 :** **A :** *E. Coli ATCC 29522*, **B :** *Vibrio fluvialis*, **C :** *Pseudomonas Aeruginosa*, **D:** *Vibrio Anguillarum*, **E:** *S. aureus*, **F :** *Vibrio alginolyticus*, **G :** *Pseudomonas Fluorescens*, **H :** *Aeromonas hydrophila*, **I :** *K. pneumoniae*, **J :** *Listeria monocytogenes*, **N :** *Resultats negatifs (Absence de zone d'inhibition)*

Sur les 70 souches isolées 70.85% des isolats ont montré une activité inhibitrice contre les agents pathogènes avec des diamètres d'inhibition qui varient entre : 2 mm et 38 mm.

Les résultats obtenus sur milieu MRS montrent que 34.28 % des bactéries lactiques ont présentées une activité antibactérienne contre les 10 souches pathogènes testées, 42.85% ont réagi contre 9 souches pathogènes et 22.85 % ont réagi avec au moins 3 souches pathogènes avec des zones d'inhibition de diamètres différents allant de 4 mm à 38 mm comme mentionnée dans le **Tableau 7** au-dessus, avec un taux de 89.71 % de réponse positif contre les souches pathogènes.

Par contre les souches isolées sur milieu M17 ont montré un taux de 52 % de réponse positif contre les souches pathogènes, on peut noter aussi que seulement 2.85 % des bactéries lactiques sont douées d'une activité antibactérienne contre les 10 souches pathogènes testées, 8.57 % ont réagi contre 9 souches pathogènes et 74.28 % ont réagi avec au moins 3 des souches pathogènes avec des zones d'inhibition de diamètres différents et restreints par rapport au isolats du milieu MRS allant de 2 mm à 13 mm **Tableau 8**.

Les souches pathogènes peuvent être classées en fonction de leur sensibilité aux bactéries lactiques isolées comme suit : *Vibrio alginolyticus* et *E.coli ATCC29522* étaient sensibles à 44 souches, *Aeromonase hydrophila* et *Vibrio fluvialis* à 45 souches, *Klebsiella pneumoniae* et *Vibrio anguillarum* à 51 souches, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* à 57 souches, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* étaient sensible à 55 et 63 des isolats respectivement.

Dans notre cas d'étude nous avons pu isoler des souches qui ont la capacité d'inhiber un large spectre de bactérie hautement pathogène pour les espèces d'intérêt aquacole (poissons et crustacés), Une Sélection de 22 souches les plus performantes des 70 isolats testés a été effectuée pour examiner d'autres critères probiotiques tels que la tolérance à la bile, aux pH, pouvoir de production de biofilm et d'autres critères . Les souches sont codées par les chiffres **20, 14, 28, 7, 9, 13, 31, 24, 6, 32, 5, 19, 2, 22, 4, 29, 15', 6', 8', 26', 13' et 22'**

Le pouvoir antagoniste semble être courant chez les bactéries marines. Par exemple, Plus de 60% des isolats provenant du zooplancton étaient bactériolytiques (**NAIR et al. 1986**), et jusqu'à 75% des isolats d'éponges ont produit des composés antibactériens (**MARTY et MARTIN, 1992**).

Nos souches isolées à partir de la crevette blanche (*Metapenaeus monoceros*) et la crevette rouge (*Aristeus antennatus*) ont présenté une activité antimicrobienne vis-à-vis *Vibrio fluvialis*, *Vibrio Anguillarum* et *Vibrio alginolyticus*, avec un diamètre d'inhibition de 23mm et 13mm contre *V. Anguillarum* et *V. alginolyticus* respectivement, chose qui a été confirmé par les travaux menés par **PRAFUL TANK et al. 2018**, ils ont rapporté que deux souches de bactéries lactiques isolées à partir du tube digestif de la crevette à pattes blanches (*Litopenaeus vannamei*), ont présenté une activité anti-vibrio plus élevée, contre *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*. Avec des diamètres d'inhibition maximale de 11,33 contre *V. harveyi* et *V. parahaemolyticus*, 10,67 contre *V. parahaemolyticus*, suivie de 10,33 mm contre *V. harveyi*.

Une autre étude effectuée sur les poissons par **OLSSON et al. (1992)** a montré que plus de 89 bactéries sur 400 provenant du turbot (*Scophthalmus maximus*) sont déjà révélées efficaces pour inhiber la croissance *in vitro* de l'agent pathogène du poisson *Vibrio anguillarum* avec des diamètres d'inhibition de 10 mm et 25 mm, nos souches isolées à partir du *Diplodus vulgaris* révèlent un pouvoir antibactérien important d'un diamètre de 8 mm et 38 mm, cette similarité des résultats est affirmée par **WESTERDAHL et al. (1991)**, là où la plupart des bactéries inhibitrices isolées du tractus gastro-intestinal du turbot (*Scophthalmus maximus*) ont un effet inhibiteur sur trois autres souches pathogènes pour le poisson : *V. anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* et *Aeromonas hydrophila*.

Il est important de rappeler que l'effet d'antagonisme est peut être provoqué par la production des bactériocines, mais aussi par d'autres facteurs d'inhibitions, tel que : la production des acides organiques, le peroxyde d'hydrogène examiné par **RINGO et GATESOUBE, 1998**. L'inhibition due à ces composés dépend fortement aux conditions expérimentales, qui sont différentes *in vitro* et *in vivo*. Par conséquent, l'expression d'antagonisme *in vitro* n'est pas un critère suffisant pour sélectionner le candidat probiotique (**RIQUELEME et al. 1997 ; RICO – MORA et al. 1998**).

Parmi les Entérocoques qui ont été proposées comme probiotiques on trouve *E. faecium* possédant une activité antimicrobienne contre *Listeria* spp. (**MARCINAKOVA et al. 2004**) également *E. mundtii* ST4V (**TODOROV et al. 2009**). Ces souches sont déjà commercialisées dans une préparation probiotique appelée Causido®.

### III.2.2. Dosage de l'acide lactique produit

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques (BEAL et al. 2008), elle a été déterminée en mesurant la quantité d'acide lactique produite et le pH du milieu entre 24 h et 72 h. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure (18) qui montre la quantité d'acide lactique produite des 22 souches isolées sur MRS et M17 séparément.

La méthode que nous venons de décrire précédemment repose sur la relation linéaire existant entre la production d'acide lactique d'une suspension bactérienne en un temps donné ; On obtient de cette façon des valeurs, exprimées en degrés de pH de la suspension, correspondant à la production d'acide lactique. Les volumes obtenus sont ensuite exprimés en masse suite à une conversion *via* la formule citée précédemment. La figure (18) présente les Masses d'acide lactique produites par les souches testées après 72h.

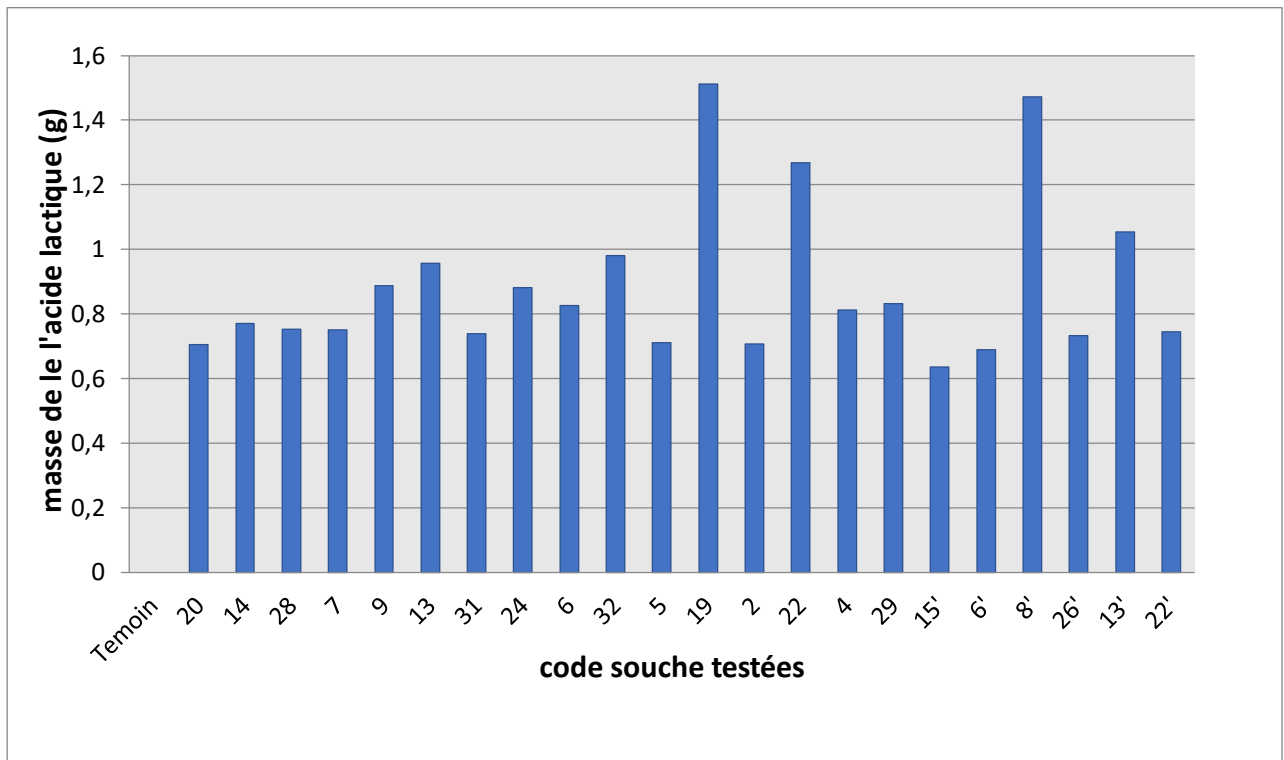


Figure 18 : Dosage de l'acide lactique des souches isolées sur milieu MRS et M17.

L'acidité produite par les souches bioactives a montré que la totalité des souches bactériennes isolées sur MRS et M17 ont la capacité de produire de l'acide lactique, le suivi de la variation de pH et le dosage de ce dernier avec l' NaOH à 0,1N, ont montré que la quantité d'acide produite par les isolats du milieu MRS varie entre **0,7 g /100ml** et **1,51g/100ml**, par contre sur celles de M17 varie entre **0.63 g /100ml** et **1.47 g /100ml** (figure 18)

Les résultats obtenus révèlent que la production d'acide lactique augmente avec le temps d'incubation entre 24h jusqu'à 72h , et que le pH du milieu diminue avec l'augmentation de la production d'acide. D'après **tableau 2 (annexe)** des résultats, l'acidité la plus élevée est observé chez la souche 19 isolée sur milieu MRS , avec une valeur de 1.51g / 100 ml.

En général chez les bactéries lactiques, la production d'acides organiques tel que l'acide lactique permet d'acidifier le milieu, ce qui peut limiter la croissance de certaines bactéries indésirables ou bien de les tuer (si ces bactéries sont exposées à l'acidité pendant une longue durée) (**CHAMPAGNE et MOLLGAARD. 2008**). Ces bactéries lactiques peuvent faire l'objet d'une exploitation biotechnologique dans le domaine aquacole, L'addition combinée d'acide lactique permet de retarder la croissance de la flore pathogène sur les produits de la mer, Ce qui confère à ces dernières le pouvoir antimicrobien et caractéristique de sélection en tant que probiotique. Cela entraîne comme résultat l'extension de la durée de conservation d'une dizaine de jours à 3 °C (**NYKÄNEN et al. 1998a ; 1999b**), actuellement des modèles scandinave envisage la fermentation lactique dans un but exclusif de conservation prolongée des produits de la mer en rayons frais (**DIOP et al. 2010**).

### **III.3. Test de la résistance au pH gastrique et Sels biliaires**

Comme les probiotiques sont généralement administrés par voie orale, ils doivent avoir la capacité de survivre au passage dans l'estomac et dans l'intestin grêle. Par conséquent, la résistance au faible pH du suc gastrique dans l'estomac et au sel biliaire dans l'intestin grêle est l'une des critères de sélection les plus importantes ( **OLEJNIK et al. 2005** )

La sélection des 4 souches pour le test suivant a été basée sur leur large pouvoir d'activité antimicrobienne suite aux résultats obtenus précédemment.

Les résultats du test de résistance à l'acidité montrent que la charge bactérienne inoculée au préalable varie selon la nature de chaque souche, les résultats sont mentionnés dans le **tableau 1 (annexe)**.

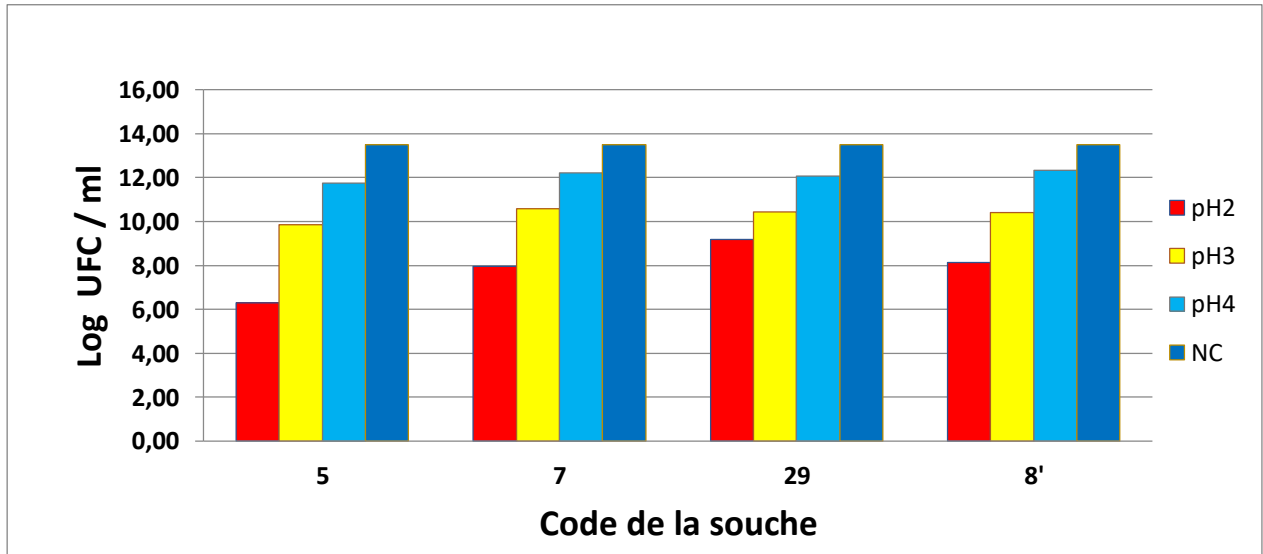


Figure 19 : Résultats de l'effet du pH sur les souches testées.

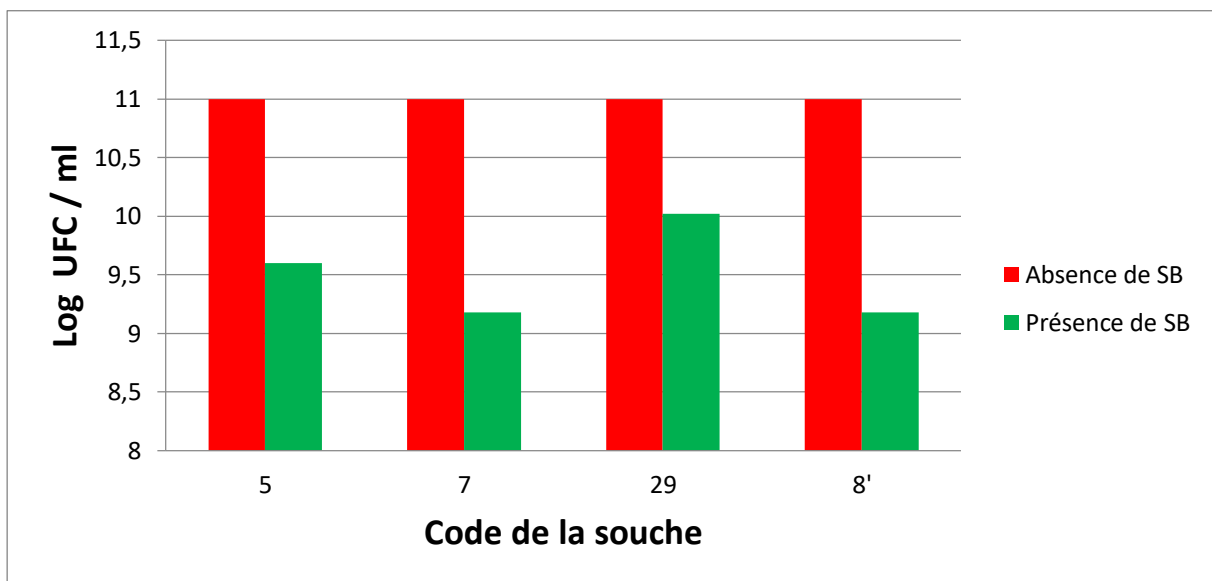


Figure 20 : Résultats de l'effet des sels biliaires (SB) sur les souches testées.

Dans notre cas d'étude tous les isolats ont montré une résistance aux différents pH 2, 3 et 4.

Les souches 7, 29 et 8' ont montré une bonne résistance aux trois différents pH tandis que le taux le plus faible de croissance a été observé pour la souche 5.

Toutefois, toutes les souches testées présentaient une tolérance à la bile avec une légère différence. Parmi les bactéries lactiques isolées dans notre cas d'étude, la souche 29 a montré la plus grande tolérance au sel biliaire suivi par les souches 7 et 8'.

Le pH naturel d'un estomac vide est de 1,5 après un repas, le pH augmente pour atteindre 5-6 afin d'empêcher l'entrée et la survie de bactéries indésirables dans le tractus intestinal.

Pour exercer leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, les micro-organismes probiotiques doivent survivre à ces conditions en nombre suffisant dans le tractus gastro-intestinal. Ainsi, des changements du pH de 1 à 5 ont été pris en compte pour évaluer la tolérance à l'acide *in vitro* décrite pour *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, qui ont un potentiel probiotique (**HUANG et ADAMS, 2004**). Dans le présent travail, nous avons constaté que la simulation du milieu gastrique acide ne provoquait pas un grand changement dans la croissance des souches isolées et peuvent tolérer un large spectre de pH acide (2 à 4) comme c'est illustré dans (**Fig. 19**). Nous recommandons donc que ces souches survivent probablement dans un environnement acide tel que l'estomac et que les bactéries lactiques résistent au faible pH.

Les sels biliaires sont des substances inhibitrices qui peuvent inhiber la croissance de certains types de bactéries présentes dans les environnements gastriques, les organismes probiotiques doivent résister impérativement à une concentration élevée de ces sels biliaires (**GRACIELA et MARIA, 2001 ; FAO, 2001**).

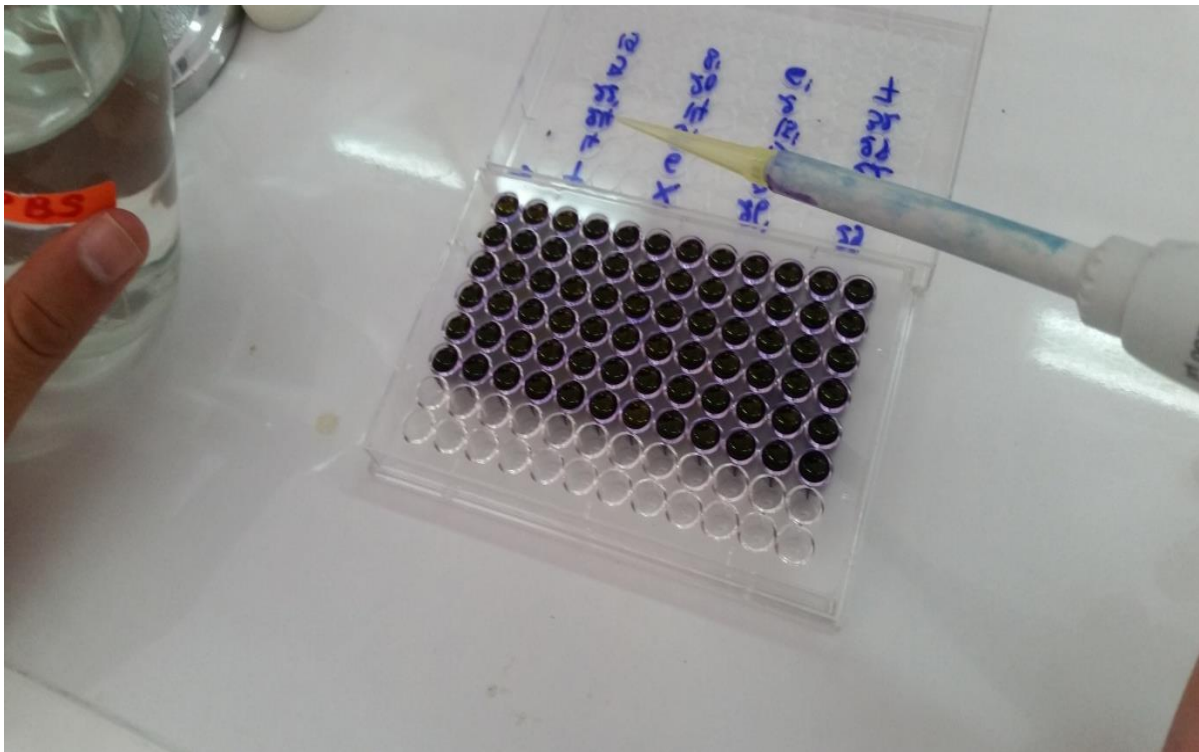
Dans notre étude 0,5 % de sel biliaire ont été ajoutés dans le milieu de croissance MRS, en simulation à l'environnement du tractus gastro-intestinal sachant que 0,5% est la concentration maximale présente chez l'homme (**QUZEHAUD et VESTERLUND, 2004**). Les bactéries lactiques isolées dans notre étude étaient résistantes à 0,5% de sel biliaire et que tous les isolats sont capables de survivre et de croître avec une concentration en sel biliaire de 0,5% (**Fig. 20**). Chose qui a été confirmée par les travaux menés par **EI JENI et al. (2015)** selon une étude effectuée sur des souches appartenant au genre *Enterococcus sp* isolées à partir des intestins du mullet cabot (*Mugil cephalus*) qui montre une viabilité bactérienne qui a été détectée après 3h d'exposition à faible pH 3.0 et 4.0, avec une carence signalée au pH extrême de 2.0 et une résistance importante à une concentration de 0.5% de sels biliaires, ou les mêmes résultats ont été apportés par **HUANG et ADAMS, (2004)** et **PARAMITHIOTIS et al. (2006)**.

D'après **BALCAZAR et al. 2008**, la tolérance aux sels biliaires et au faible pH est importante pour la croissance et la survie des souches probiotiques dans l'intestin du poisson, après une exposition des souches de bactéries lactiques (*L. Lactis*, *L. plantarum* et *L. fermentum*) isolées de la truite arc-en-ciel à un intervalle de pH compris entre 2.5 et 6.5 et une concentration de bile de 2.5 et 10 %, les résultats obtenus ont montré des taux de résistance élevés au pH et à la bile. Toutes les souches ont survécu à la large gamme de pH et aucun changement n'a été observé dans le compte des viables. Chose confirmée par **KLINGBERG et al. (2005)** où une tolérance

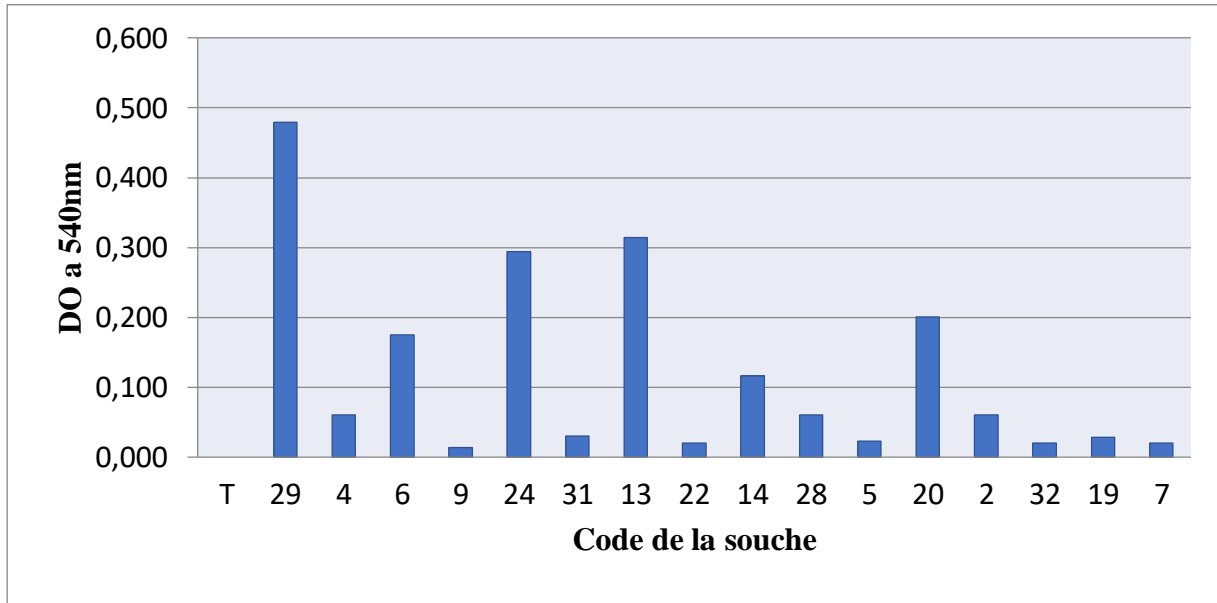
des bactéries lactiques au faible pH de 2.0 et 2.5 et aux sels biliaires à une concentration de 0.3% a été notée.

### III.4. Test de production de biofilm

Les résultats du test de production de biofilm sont présentés dans les **figures 22** et **23** suivantes, des résultats différents ont été observés :

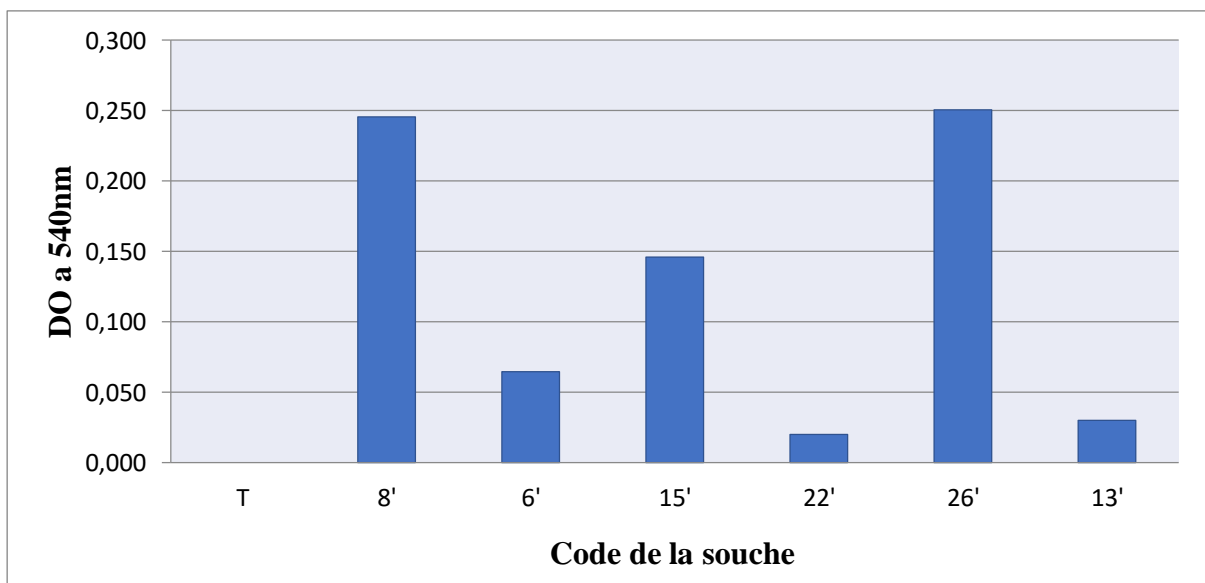


**Figure 21** : photo représentatif de la méthode suivis lors du test du pouvoir d'adhésion.



**Figure 22 :** Résultats du test de production de biofilm des souches isolées sur milieu MRS.

Concernant les souches isolées sur milieu MRS, elles sont dans la majorité des faibles productrices de biofilm (les souches 4, 9, 31, 22, 28, 5, 2, 32, 19, 7 ;  $0.1 > DO$ ), à l'exception des souches 29, 6, 24, 13, 14, 20 qui ont manifesté une production moyenne de biofilm ( $0.1 < DO < 0.5$ ).



**Figure 23 :** Résultats du test de production de biofilm des souches isolées sur milieu M17.

Les souches isolées sur milieu M17 ont montré aussi une absence d'une forte production de biofilm, ils sont des souches moyennement productrices de biofilm telles que 8', 15', 26' et ainsi que des faibles productrices telle que 6', 22', 13'.

L'adhésion aux surfaces, en particulier au mucus intestinal, est un paramètre important permettant aux bactéries probiotiques de coloniser le tractus gastro-intestinal comme les espèces

des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* et certaines espèces d'*Enterococcus*. Ces espèces contribuent à bloquer l'accès des pathogènes aux sites d'adhésion et exercent un effet de barrière (RASTALL et al. 2005 ; MAHDHI et al. 2011)

D'après MOURINO et al. (2016), une étude *in vivo* où on introduisait des probiotiques tel que *W. cibaria* dans l'alimentation des poissons, les résultats obtenus présentaient une valeur plus élevée de bactéries lactiques totales ( $3,72 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>) par rapport aux poissons non supplémentés ( $10^1$  UFC g<sup>-1</sup>). Ces résultats ont démontré que *W. cibaria* pouvait rester viable dans l'intestin des poissons supplémentés, ce pouvoir est dû à la capacité de ces bactéries lactiques à s'attacher aux cellules épithéliales des intestins des poissons.

Des isolats de bactéries lactiques tels que *Carnobacterium* et *L.plantrum* isolés du tractus gastro-intestinal du saumon atlantique, (*Salmosalar* L) semblent être capables de survivre plusieurs jours dans l'intestin des poissons comme la Morue de l'Atlantique *Gadus morhua* et chez le turbot *scophthalmusmaximus*(STROM et RINGO, 1993 ; JOBORN et al. 1997) Où les *Vibrionaceae* peuvent également persister pendant des jours ou des semaines dans le tube digestif des poissons (AUSTIN et al. 1995 ; MUNRO et al. 1995; RINGO et VADESTEIN, 1998) et chez les larves d'huîtres du Pacifique (GIBSON et al. 1998).

L'étude *in vitro* mené par BALCAZAR et al. (2008) sur le pouvoir d'adhérence des bactéries lactiques à la peau et à la muqueuse intestinal, dans le but d'inhiber l'adhérence de plusieurs pathogènes de poisson (*Aeromonas hydrophilia*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*), les bactéries lactiques utilisées durant cette étude appartiennent au genre *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, et *Lactobacillus fermentum*, isolées des intestins de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) en bonne santé. Les résultats ont démontré que Les souches *L. Lactis*, *L. plantarum* et *L. fermentum* étaient très capables d'adhérer à la muqueuse intestinal de poisson (adhérence de 11,6 à 17,4%) et que seule la souche *L.lactis*, avait le pouvoir de réduire l'adhésion de toutes les souches pathogènes. Ce qui révèle que la souche *L. lactis*, réponds aux caractéristiques du pouvoir d'adhésion en tant que souche à potentiel probiotique.

Il a été également rapporté, que *Carnobacterium sp* adhère indifféremment à la muqueuse de la truite arc-en-ciel ou à une surface témoin traitée avec du sérum albumine bovine (JOBORN et al. 1997).

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré que parmi les 22 souches isolées de différentes espèces aquatiques, 9 souches ont présenté une capacité d'adhérence moyenne et 13 souches ont montré un faible pouvoir d'adhésion. Ces résultats corroborent ceux obtenus par NAMBA et al.

(2006) qui montrent la capacité d'adhésion des isolats intestinaux de la carpe (*Cyprinus carpio*), suite à une lecture spectrométrique à 450 nm, parmi les isolats ayant un pouvoir adhésif faible constitués de 3 souches de *Micrococcus*.

### III.5. Tests de Biosécurité

#### III.5.1. test d'antibiorésistance

Le test d'antibiorésistance nous a permis de déterminer le profil de la résistance aux antibiotiques des bactéries testées, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 9 suivant :

**Tableau 9** : Résultats de test d'antibiorésistance aux antibiotiques des souches isolées sur milieu MRS et M17.

| Souche | Origine           | Antibiotiques |      |      |      |       |     |        |      |
|--------|-------------------|---------------|------|------|------|-------|-----|--------|------|
|        |                   | P10           | TE30 | VA30 | CN10 | CTX30 | C30 | AUG 30 | OX 1 |
| 6      | Artémie           | R             | S    | I    | S    | R     | S   | S      | R    |
| 20     | Sardinella        | S             | S    | S    | S    | R     | S   | S      | R    |
| 2      | Artémie           | S             | S    | S    | S    | S     | S   | S      | S    |
| 28     | Crevette R        | R             | R    | S    | S    | R     | S   | I      | R    |
| 24     | Crevette B        | S             | S    | I    | S    | S     | S   | S      | R    |
| 19     | Crevette B        | R             | S    | I    | R    | R     | S   | S      | R    |
| 22     | Rouget (Gonade 2) | S             | S    | S    | S    | R     | S   | S      | R    |
| 31     | Moule             | S             | S    | S    | S    | R     | S   | S      | R    |
| 5      | Pageot            | R             | R    | S    | S    | R     | S   | S      | R    |
| 7      | Sarran            | R             | S    | S    | S    | I     | I   | S      | R    |
| 14     | Sar               | R             | S    | S    | S    | R     | S   | S      | R    |
| 4      | Pageot            | R             | S    | S    | S    | S     | S   | S      | R    |
| 32     | Moule             | S             | S    | S    | S    | R     | I   | S      | R    |
| 13     | Sar               | R             | S    | S    | S    | R     | S   | S      | R    |
| 29     | Crevette R        | R             | S    | S    | S    | R     | S   | I      | R    |
| 9      | Sarran            | R             | S    | S    | S    | R     | S   | S      | R    |
| 22'    | Sar               | R             | S    | S    | S    | R     | S   | S      | R    |
| 8'     | Sarran            | R             | S    | S    | S    | S     | S   | S      | S    |
| 26'    | Crevette B        | R             | R    | S    | S    | R     | S   | S      | R    |
| 6'     | Crevette R        | R             | S    | S    | S    | R     | S   | S      | R    |
| 15'    | Pageot            | R             | R    | S    | S    | R     | S   | S      | R    |
| 13'    | Moule             | R             | S    | S    | S    | R     | S   | S      | R    |

**R** : Résistant, **S** : Sensible, **I** : Intermédiaire

Les résultats montrent que tous les isolats étaient sensibles aux : chloramphenicol (à l'exception des souches 7 et 32 qui sont intermédiaires), gentamycine (à l'exception de la souche 19 qui était

résistante), vancomycin (à l'exception des souches **6**, **24** et **19** qui sont intermédiaire), l'amoxicillin + acide clavunalique (à l'exception des souches **28** et **29** qui sont intermédiaires) et aux tétracyclines (à l'exception des souches **28**, **26'**, **5** et **15'** qui sont résistantes)

La majorité des souches bactériennes lactiques été résistantes à l'oxacillin (à l'exception de la souche **8'** et **2** qui est sensible), cefotaxime (à l'exception des souches **2**, **24**, **4** et **8'** qui sont sensible et la **7** qui est intermédiaire) et à la pénicilline (à l'exception des souches **20**, **2**, **24**, **22**, **31** et **32** qui sont sensibles).



**Figure 24 :** Illustration des résultats du Test d'antibiorésistance sur les souches testées.

Tous les produits bactériens destinés à être utilisés comme additifs dans l'alimentation animale prenons le cas de l'élevage en aquaculture, doivent être examinés afin de déterminer la sensibilité des souches à la gamme appropriée d'antibiotiques (**VANKERCKHOVEN et al. 2008**).

Afin d'assurer l'absence de résistance aux antibiotiques dans l'une des souches probiotiques testées, nous avons évalué le profil de résistance aux antibiotiques. Les résultats nous ont révélé que toutes les souches étaient sensibles aux antibiotiques testés (à l'exception de pénicilline, cefotaxime et de l'oxacilline), validant ainsi leur innocuité en tant que souches probiotiques.

La sensibilité aux antibiotiques est considérée comme la caractéristique probiotique la plus essentielle. La sensibilité des bactéries lactiques à de nombreux inhibiteurs de la synthèse des parois cellulaires, tels que la pénicilline et l'ampicilline, ainsi que des inhibiteurs de la synthèse protéique tels que le chloramphénicol, l'érythromycine et la clindamycine a été rapportée. Les espèces bactériennes utilisées dans notre étude ont déjà été reconnues comme résistantes à l'oxacilline (**DANIELSEN 2003 ; VANKERCKHOVEN et al. 2008**)

Dans une étude réalisée par **El JENI et al. (2015)**, 10 antibiotiques, le chloramphénicol, la pénicilline, la streptomycine, la tétracycline, la céfazoline, la gentamycine, l'oxacilline, la rifampicine, la vancomycine et la clindomycine ont été utilisés pour évaluer la sensibilité de bactéries lactiques *Enterococcus sp* isolées à partir des intestins du mulot cabot (*Mugil cephalus*) à ces antibiotiques. Tous les isolats testés étaient sensibles à la plupart des antibiotiques courants (par exemple, rifampicine, le chloramphénicol, la gentamycine et la vancomycine), et résistants à l'oxacilline, streptomycine, céfazoline et clindomycine, pénicilline.

D'après **SARRA et al. (2013)** le test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé pour l'ensemble des trois souches d'*Enterococcus sp*. Potentiellement probiotiques isolées à partir du pageot (*pagellus bogaraveo*) contre 6 antibiotiques constituaient différents groupes, les isolats ont été sensibles à l'ampicilline, pénicilline, tétracycline, vancomycine, gentamicine ainsi que tous les isolats ont été résistants à la rifampicine, nous pouvons dire que nos résultats concordent avec les résultats des études obtenus cités précédemment confirmant la résistance des *Enterococcus sp*. À l'oxacilline et à la pénicilline. Des résultats similaires ont été apportés par (**RAMESH et al. 2015**).

Le profil biochimique de nos souches plus l'étude du profil d'antibiorésistance des isolats, nous donne une pré-identification de nos souches, il est probable que nos isolats appartiennent au genre d'*Enterocoque sp*. Par ailleurs, un réel problème de santé publique se pose sur les entérocoques résistants à la vancomycine, car elles sont habituellement multi-résistantes à d'autres antibiotiques (INOUE NOUE et al. 2006) de cela on peut conclure que nos souches qui se présentent comme des vancomycine sensibles ne sont pas nocives à n'importe quelle utilisation technologique humaine ou animale.

### **III.5.2. Production d'hémolyse**

Ce test a montré que 16 souches testées parmi les 22 n'ont pas la capacité d'hémolyser le sang humain indiquant un pouvoir non hémolytique, tandis que 8 souches ont présenté une hémolyse

partielle du sang, qui se manifeste par des zones verdâtres autour des colonies ce qui nous renseigne sur le type d'hémolyse (alpha  $\alpha$ ). Les résultats sont présentés dans le tableau (10).

**Tableau 10** : Résultats de test hémolyse des souches isolées sur milieu MRS.

| Souche | Résultats d'hémolyse                 |
|--------|--------------------------------------|
| 7      | <b>Négatif</b>                       |
| 4      | <b>Négatif</b>                       |
| 13     | <b>Négatif</b>                       |
| 31     | <b>Négatif</b>                       |
| 6      | <b>Hémolyse <math>\alpha</math>.</b> |
| 28     | <b>Hémolyse <math>\alpha</math>.</b> |
| 32     | <b>Négatif</b>                       |
| 14     | <b>Négatif</b>                       |
| 5      | <b>Négatif</b>                       |
| 22     | <b>Négatif</b>                       |
| 24     | <b>Négatif</b>                       |
| 9      | <b>Négatif</b>                       |
| 20     | <b>Hémolyse <math>\alpha</math>.</b> |
| 2      | <b>Hémolyse <math>\alpha</math>.</b> |
| 29     | <b>Négatif</b>                       |
| 19     | <b>Négatif</b>                       |
| 26'    | <b>Hémolyse <math>\alpha</math>.</b> |
| 22'    | <b>Hémolyse <math>\alpha</math>.</b> |
| 6'     | <b>Négatif</b>                       |
| 13'    | <b>Négatif</b>                       |
| 15'    | <b>Négatif</b>                       |
| 8'     | <b>Négatif</b>                       |

L'hémolyse est un facteur de virulence connu chez les microorganismes pathogènes, l'absence d'activité hémolytique est considérée comme une condition préalable à la sélection de la souche probiotique (FAO/WHO 2002).

Une observation similaire a été rapportée par RAMESH *et al.* (2015) sur des souches isolées du poisson *Labeorohita* où tous les isolats ont révélé une activité non hémolytique. Les travaux menés par EI JENI (2015) ont montré que toutes les bactéries lactiques isolées du système intestinal du mulot cabot (*Mugil cephalus*) n'ont pas la capacité d'hydrolyser le sang du mouton prouvant une activité hémolytique négative.

Ces résultats sont en corrélation avec nos résultats obtenus et affirme l'innocuité des souches isolées dans la présente étude, et réponds positivement à l'un des critères de sélection de probiotique. Avec un pouvoir alpha hémolytique est déjà mentionné dans la littérature chez les entérocoques (LEBLANC, 2006).

# **CONCLUSION**

## Conclusion

Cette étude préliminaire met en évidence le potentiel probiotique de bactéries lactiques associées à la flore gastro-intestinales des animaux aquatiques méditerranéens, poissons, mollusques et crustacés. Les propriétés les plus intéressantes en vue d'une éventuelle utilisation biotechnologique ont concerné l'activité antimicrobienne, la production des acides organiques (acide lactique), de facteurs de croissance au pH faible et de résistance aux sels biliaires ainsi que le pouvoir de colonisation et adhérence aux tissus.

De souches bactériennes ont été isolées du système gastro-intestinal de différentes espèces, elles ont été partiellement identifiées en la majorité comme étant des *Enterococcus sp.* L'étude *in vitro* effectué sur 70 souches a révélé de bonnes performances au plan de pouvoir antimicrobien même contre des agents pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* et *Vibrio sp* avec une réponse positif importante de 70.85 % et une sélection de 22 candidats les plus performants a été effectué.

L'ensemble de la sélection présentaient un pouvoir acidifiant assez important, en revanche des résultats moyens ont été marqués sur leur pouvoir d'adhésion et de colonisation suite à l'absence d'une production forte de biofilm signalée par toutes les souches.

Les souches 5, 7, 28 et 8' isolées dans notre étude ont révélé une résistance aux différentes concentrations pH 2, 3 et 4 et une tolérance à la bile.

Les tests de biosécurité se montrent rassurants où l'ensemble des souches étaient sensibles à une large gamme d'antibiotiques spécialement la Vancomycine et ne présentaient pas un pouvoir hémolytique.

Ce travail nous a permis d'isoler une 20 aine de souches à potentiel probiotiques dont quatre sont très performantes. Ce travail doit être complété:

- ✓ Réalisation d'une identification moléculaire des souches.
- ✓ Déterminer le mécanisme d'action (les substance/s inhibitrice) responsable du pouvoir probiotique.
- ✓ Mise en évidence du potentiel probiotique *in vivo* particulièrement dans le domaine de l'aquaculture ou l'industrie.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- ADAMS C-A., 2010.** The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev* 23:37-46.
- ALVAREZ-OLMOS M-I et OBERHELMAN R-A., 2001.** "Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy" .*Clinical Infectious Diseases* 32(11): 1567-1576.
- AMADI L-O., 2015.** "Mortality and microbial diversity of raw, processed and storage of mangrove oysters (*Crassostrea gasar*)." *Int. Res. J. Public Environ. Health* 3: 7-13.
- AMMOR M-S., FLÓREZ A-B. et MAYO B., 2007.** Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food microbiology*, 24(6), 559-570.
- AMMOR M-S et MAYO B., 2007.** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat science*, 76(1), 138-146.
- AMROUCHE T., BOUTIN Y., PRIOULT G. et FLISS I., 2006.** Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production. *Int Dairy J* 16:70-80.
- AUSTIN B., 2006.** "The bacterial microflora of fish, revised." *ScientificWorldJournal* 6: 931-945.
- AUSTIN B., STUCKEY L-F., ROBERTSON P-A-W., EFFENDI-I. et GRIFFITH D-R-W., 1995.** A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish. Dis.* 18, 93–96.
- BALCAZAR J-L., de BLAS I., RUIZ-ZARZUELA I., CUNNINGHAM D., VENDRELL D. et MUZQUIZ JL., 2006.** The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114: 173-186.
- BALCAZAR J- L., VENDRELL D., BLAS I., MUZQUIZ J-L. et GIRONES O., 2008.** caractérisation des propriétés probiotiques de bactéries lactique isolées du microbiote intestinal de poisson, *Aquaculture*, -Elsevier:188-191p.
- BEAL C et al., 2008.** Paris, Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In Corrieu G. et Luquet F.M. *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments.* Tec & Doc, Lavoisier : 661-765 p.
- BONIFAIT L., CHANDAD F. et GRENIER D., 2009.** Probiotics for oral health: myth or reality? *J Can Dent Assoc* 75:585-90.
- BOUZAIN T, ELMAJDOUB T., THONART PH., ET DAMDI M. (2004):** Sélection des bactéries lactiques probiotiques d'origine animale. *Microbio. Hyg. Alim.* 16: 28.
- BROEKAERT K., HEYNDRIKX M., HERMAN L., DEVLIEGHIERE F. et VLAEMYNCK G., 2013.** "Molecular identification of the microbiota of peeled and unpeeled brown shrimp (*Crangon crangon*) during storage on ice and at 7.5 °C." *Food Microbiology* 36(2): 123-134.
- CAHILL M-M., 1990.** "Bacterial flora of fishes: a review." *Microbial ecology* 19(1): 21-41.
- CARPENTIER B et CERF O., 1993.** Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 75:499-511.
- CHAMPAGNE C et MOLLGAARD H., 2008.** Production de cultures probiotiques et leur addition dans les aliments fermentés. In : Farnworth E., ed. *Manuel des aliments fonctionnels fermentés.* Boca Raton, FL, USA : CRCPressTaylor&FrancisGroupe 71-88p

- CHAMPAGNE C-P., GARDNER N-J. et al., 2005.** "Challenges in the addition of probiotic cultures to foods." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45(1): 61-84.
- CISZEK-LENDA M., NOWAK B., SROTEK M., GAMIAN A. et MARCINKIEWICZ J., 2011.** Immunoregulatory potential of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KL37: effects on the production of inflammatory mediators by mouse macrophages. *Int J Exp Pathol* 92:382-91.
- COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE (2017).** Recommandation 2017 Mai.
- DABADÉ D-S., WOLKERS-ROOIJACKERS J-C-M., AZOKPOTA P., HOUNHOUGAN D-J., ZWIETERING M-H., NOUT M-J-R. et den BESTEN H-M-W., 2016.** "Bacterial concentration and diversity in fresh tropical shrimps (*Penaeus notialis*) and the surrounding brackish waters and sediment." *International Journal of Food Microbiology* 218: 96-104.
- DANIELSEN M et WIND A., 2003.** Susceptibilité de *Lactobacillus* spp. aux agents antimicrobiens. *Journal international de microbiologie alimentaire*, 82 : 1-11p
- DING X., LI Z-J., CHEN Y-Q., LIN H-Z., YANG Y-Y. et YANG K., 2004.** Effects of probiotics on growth and activities of digestive enzymes. *Of Pennaus vannamei*. *J. Fish. Sci. China* 11, 580–584.
- DIOP M-B., DESTAIN J., TINE E. et THONART P., 2010.** Les produits de la mer au Sénégal et le potentiel des bactéries lactiques et des bactériocines pour la conservation. *Base*.
- DORTU C et THONART P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol Agron Soc Environ* 13:143-154.
- DUNNE C., O'MAHONY L. et al., 2001.** "In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings." *American Journal of Clinical Nutrition* 73(2): 386s-392s.
- EI JENI R., 2015** CARACTERISATION IN VITRO DU POTENTIEL PROBIOTIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES DES POISSONS D'EAUX DOUCES *Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô*, Vol. 42, (*Numéro Spécial*).
- EL-JENI R., EL BOUR M., CALO-MATA P., BÖHME K., FERNANDEZ-NO I-C., BARROS-VELAZQUEZ J. et BOUHAOUALA-ZAHAR B., 2015.** In vitro probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Canadian journal of microbiology*, 62(1), 60-71.
- EWASCHUK J-B., DIAZ H., MEDDINGS L., DIEDERICHS B., DMYTRASH A., BACKER J., LOOIJER-VAN L-M. et MADSEN K-L., 2008.** Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295:G1025-34.
- EZENDAM J et VAN-LOVEREN H., 2006.** Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. *NutrRev*64:1-14.

**FAO., 2001.** Rome .Evaluation FAO / OMS des propriétés nutritionnelles et sanitaires du lait en poudre et des bactéries lactiques vivantes Rapport de consultation d'experts organisé par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'Organisation mondiale de la santé.

**FICHES FAO, 1987.** identification des especes pour les besoins de la pêche mediterrannee è t mernire, vegetaux et invertèbres, zone de peche 37, révision 1, volume i, Rome.

**FAO/WHO 2002.**Rapport du groupe de travail sur la rédaction de lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques dans les aliments (London, Ontario, Canada ; 30)

**FERNANDEZ M-R., PORTE S., CROSAS E., BARBERA N., FARRES J., BIOSCA J-A. et PARES X., 2007.** Human and yeast crystallins bind AU-rich elements in RNA. *Cellular and molecular life sciences*, 64(11), 1419-1427

**FLEMING H-P., ETHELLES J- L. et COSTILOW R-N., 1975.** Microbial Inhibition by an Isolate of *Pediococcus* from Cucumber Brines applied and environmental microbiology, Vol. 30, No. 6 p. 1040-1042.

**FRETER R., 1992.** Factors affecting the microecology of the gut. In: Fuller R (ed) Probiotics. The scientific basis, Chapman and Hall, London, pp 355-376.

**FULLER R., 1989.** Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*; 66:365-78.

**FULVIO S-I., ANTONELLA M., EDOARDO M. et RIICHI K., 1999.** Microbiological Study on the Flora of Mussel, *Mytilus galloprovincialis*, Cultured in Tortoli Lagoon, South-East Sardinia, Italy, *Fisheries Science* 65(4), 657-658.

**GAGNON M., 2007.** Rôle des probiotiques lors d'infection entériques d'origine bactérienne et virale : analyses in vitro et études in vivo chez des modèles murins. Département des sciences des aliments et de nutrition Québec. Université Laval. Ph.D: 155.

**GHADIMI D., FOLSTER-HOLST R., de VRESE M., WINKLER P., HELLER K-J. et SCHREZENMEIR J., 2008.** Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. *Immunobiology* 213:677-92.

**GATESOUBE F-J., 1999.** The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 180:147-165.

**GIBSON L-F., WOODWORTH J. et GEORGE A M., 1998.** "Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*." *Aquaculture* 169(1-2): 111-120.

**GRACIELA FVD et MARIA PT., 2001.** Protocoles de microbiologie alimentaire propriétés probiotiques des *Lactobacilles* Spencer Humana Press Inc , Totowa.

**GU R-X., YANG Z-Q., LI Z-H., CHEN S-L. et 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.

**GUINANE C-M., COTTER P-D., HILL C. et ROSS R-P., 2005.** Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J Appl Microbiol* 98:1316-25.

**HEINSZ L-J., HARRISON M-A. et LEITING V-A., 1988.** "Microflora of brown shrimp (*Penaeus aztecus*) from Georgia coastal waters." *Food Microbiology* 5(3): 141-145

- HIGASHIDE T., TAKAHASHI M., KOBAYASHI A., OHKUBO S., SAKURAI M., SHIRAO Y., TAMURA T. et SUGIYAMA K., 2005.** Endophtalmie à *Enterococcus mundtii*, *journal de microbiologie clinique*. 43(3):1475-1476p.
- HUANG Y et ADAMS M-C., 2004.** In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **91**: 253–260.
- IBRAHEM, M-D., 2015.** Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent perspectives. *Journal of advanced research*, 6(6), 765-791
- IDOU T., BOUDJERDA J., LEGHOUCHE E., 2009.** Lactic acid bacteria from " Sheep's Dhan", a traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas y aceites*, vol. 60, p 177-183.
- IFREMER., 2011.** "aquaculture: filière des crustacés." Retrieved 31/07/2018, 2018, from <http://aquaculture.ifremer.fr/les-Filières/Filière-Crustacés/Presentation>.
- INOUE et al., 2006** .effet synergique de polyoxométalates en association avec l'oxacilline contre staphylococcus aureus résistant à la méthicilline et à la vancomycine : un inoculum initial elve de  $1 \times 10^8$  cfu/ml pour un test in vitro , *biomedicine & pharmacothérapie* (60)5 : 220-226 p.
- ISHIBASHI, N., and S. YAMAZAKI. 2001.** Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr* 73:465S-470S.
- JJON H., BACKER J., DIAZ H., YEUNG H., THIEL D., MCKAIGNEY C., de SIMONE C. et MADSEN K., 2004.** DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 126:1358-73.
- JOBORN A., OLSSON J-C., WESTERDAHL A., CONWAY P-L. et KJELLEBERG S., 1997.** Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases*, 20(5), 383-392
- KANG H., CHOI H-S., KIM J-E. et HAN N-S., 2011.** Exopolysaccharide-overproducing *Lactobacillus paracasei* KB28 induces cytokines in mouse peritoneal macrophages via modulation of NF-kappabeta and MAPKs. *J Microbiol Biotechnol* 21:1174-8.
- KERRY R-G., PATRA J-K., GOUDA S., PARK Y., SHIN H S. et DAS G., 2018.** Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 26(3), 927-939
- KIM D-H et AUSTIN B., 2006.** Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), induced by probiotics. *Vet. Immunol. Immunop.* **114**: 297-304.
- KLAENHAMMER T-R., 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12:39-85.
- KLINGBERG T-D., PEDERSEN M-H., CENCIC A. et BUDDÉ B-B., 2005.** Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7528–7530.
- KOCHAN P., CHMIELARCZYK A., SZYMANIAK L., BRYKCYNSKI M., GALANT K., ZYCH A., PAKOSZ K., GIEDRYS-KALEMBA S., LENOUEVEL E. et HECZKO P-B., 2011.** *Lactobacillus rhamnosus* administration causes sepsis in a cardio-surgical patient--is the time right to revise probiotic safety guidelines? *Clin Microbiol Infect* 17:1589-92.
- LARPENT J-P ET LARPENT M-G., 1990.** Memento technique de microbiologie. Second Ed. technique et documentaire Lavoisier.417
- LEBEER S., VANDERLEYDEN J. et DE KEERSMAECKER S-C., 2010.** Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol* 8:171-84.

**LEBLANC DJ., 2006.** Les procaryotes : 175-204p

**LEE Y-K., NOMOTO K., SALMINEN S., GORBACH S-L., 1999.** Handbook of probiotics John Wiley & Sons Inc, New York.

**LEROI F., 2010.** "Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products." Food Microbiol 27(6): 698-709.

**LINTON M., MC CLEMENTS J-M-J. et PATTERSON M-F., 2003.** "Changes in the microbiological quality of shellfish, brought about by treatment with high hydrostatic pressure." International Journal of Food Science & Technology 38(6): 713-727.

**LIU C-F., TSENG K-C., CHIANG S-S., LEE B-H., HSU W-H. et PAN T-M., 2011.** Immunomodulatory and antioxidant potential of Lactobacillus exopolysaccharides. J Sci Food Agric 91:2284-91.

**MADSEN K., CORNISH A., SOPER P., MCKAIGNEY C., JIJON H., YACHIMEC C., DOYLE J., JEWELL L. et DE-SIMONE C., 2001.** Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. Gastroenterology 121:580-91.

**MAHDHI A., BAHY A., HMILA Z. et BAKHROUF A., 2011.** Utilisation de la levure et des bactéries pour le contrôle des vibriens pathogènes dans les cultures d'Artémia.

**MAKRAS L et DE-VUYST L., 2006.** The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. Int Dairy J 16:1049-1057.

**MALDONADO N-C., SILVA de RUIZ C., CECILIA M. et NADERMACIAS M-E., 2007.** A simple technique to detect Klebsiella biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of Lactobacillus fermentum CRL 1058 whole cells and products. Comm. Curr. Res. Edu. Topics Trends Appl. Microbiol., 52– 59.

**MARAGKOUidakis PA, ZOUMPOPOULOU G, MIARIS C, KALANTZOPOULOS G, POT B, TSAKALIDOU E (2006).** Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. Int. Dairy. J. 16: 189-199.

**MARCINAKOVÁ M., SIMONOVÁ M. et LAUKOVÁ A., 2004.** Propriétés probiotiques de la souche EF9296 d' *Enterococcus faecium* isolée de l'ensilage Acta Veterinaria Brno, 73, 513-519

**MARCISET O., JERONIMUS-STRATINGH M-C., MOLLET B. et POOLMAN B., 1997.** Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. J Biol Chem 272:14277-84.

**MARTY et MARTIN., 1992 .**bactéries hétérotrophes aérobies isolées d'invertébrés benthique des eaux côtières méditerranéennes : caractéristique des souches, production d'exoenzyme et d'agent antibactérien, Marine life 1 (1):1-8 p.

**MCAULIFFE O., ROSS R-P. et HILL C., 2001.** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiol Rev 25:285-308.

**MOURINO J-L ., PEREIRA G-V ., VIEIRA F-N., USHIZIMA T-T ., DA SILVA B-C., SEIFFERT W-Q ., ALVES JESUS G-F. et MARTINS M-L., 2016.** isolement de bactéries probiotique chez le poisson chat hybride et américain *Pseudoplatystoma reticulatum* \* *pseudoplatystoma corruscans* (siluriformes : *Pimelodidae* ) : approche hématologique :166-171.

**MUNRO P-D., MCLEAN H-A., BARBOUR H. et BIRKBERCK H., 1995.** Stimulation or inhibition of growth of the unicellular alga Pavlova lutheri by bacteria isolated from larval turbot culture systems. J. Appl. Bacteriol. 79, 519–524.

- MUTHUKUMAR P and KANDEEPAN C., 2015** Isolation, Identification and Characterization of Probiotic Organisms From Intestine of Fresh Water Fishes, International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, Volume 4 Number 3 (2015) pp. 607-616
- NAIR R-S., 1986.** Evaluation of teratogenic potential of paranitroaniline and para-nitrochlorobenzene in rats and rabbit. *Toxicity of nitroaromatic compounds*, 61-85
- NAMBA A., MANO N. et HIROSE H., 2006.** Analyse phylogénétique des bactéries intestinales et de leur capacité adhésive vis-à-vis du mucus intestinal de la carpe, journal de microbiologie appliqué.
- NG S-C., HART A-L., KAMM M-A., STAGG A-J. et KNIGHT S-C., 2009.** Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis* 15:300-10.
- NYKÄNEN A., LAPVETÄINEN A., HIETANEN R-M. et KALLIO H., 1998.** Effects of whey, whey-derived lactic acid and sodium lactate on the surface microbial counts of rainbow trout packed in vacuum pouches. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **31**, 361-365.
- NYKÄNEN A., LAPVETÄINEN A., HIETANEN R-M. et KALLIO H., 1999.** Applicability of lactic acid and nisin to improve the microbiological quality of cold-smoked rainbow trout. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, **208**(2), 116-120.
- OLEJNIK A., LEWANDOWSKA M., OBARSKA M. et GRAJEK W., 2005.** Tolérance des souches de *Lactobacillus* et de *Bifobacterium* aux bas pH, aux sels biliaries et aux enzymes digestives, EJPAU, science et technologie de l'alimentation (8)1
- OLSSON J-C., WESTERDAHL A., CONWAY PL et KJELLEBERG S., 1992.** Potentiel de colonisation intestinale des bactéries associées au turbot (*Scophthalmus maximus*) et au limbe limande (*Limanda limanda*) ayant des effets inhibiteurs sur *Vibrio anguillarum*. *Microbiologie appliqué et environmental*. (58)2: 551-556 p.
- OU C-C., LIN S-L., TSAI J-J. et LIN M-Y., 2011.** Heat-killed lactic acid bacteria enhance immunomodulatory potential by skewing the immune response toward Th1 polarization. *J Food Sci* 76:M260-7.
- PARAMITHIOTIS S., GIOULATOS S., TSAKALIDOU E. et KALANTZOPOULOS G., 2006.** Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochemistry*, *41*(12), 2429-2433
- PARKER R., 1974.** "Probiotic: the other half of the antibiotic story." *Anim Nutr Health* 29: 4-8.
- PATHMAKANTHAN S., Li C-K., COWIE J. et HAWKEY C-J., 2004.** *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. *J Gastroenterol Hepatol* 19:166-73.
- QUZEHAND AC et VESTERLUND S., 2004.** Composants antimicrobiens provenant de bactéries lactiques Seppo Salminen Atte von Wright , Arthur Ouwehand (Eds.) , Bactéries lactiques, aspects microbiologiques et fonctionnels , p. 375 – 396
- RAMESH D., VINOCHKANNA A., RAI A. K. et VIGNESH V-S., 2015.** Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, *45*(2), 268-276
- RASTALL R-A., GIBSON G-R., GILL H-S., GUARNER F., KLAENHAMMER T-R., POT B., REID G., ROWLAND I-R. et SANDERS M-E., 2005.** Modulation de l'écologie microbienne du côlon humain par des probiotiques, des prébiotiques et des synbiotiques destinés à améliorer la santé humaine: aperçu des sciences de base et de ses applications potentielles. *FEMS microbiologie écologique*, *52* (2) : 145–152p.
- RICO-MORA R., VOLTOLINA D. et VILLAESCUSA-CELAYA J., 1998.** Contrôle biologique de *Vibrio alginolyticus* dans *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures, aquaculture engineering, (19) : 1-6 p.

- RINGØ E et VADSTEIN O., 1998.** Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Journal of Applied Microbiology*, 84(2), 227-233
- RINGO E et GATESOUBE F-J., 1998.** Bactéries lactiques dans les poissons : un bilan, aquaculture : 177-203 p.
- RIQUELME C., RUBEN A., VERGARA N., ROJAS A., GUAITA M. et CANDIA M., 1997.** Souches probiotiques potentielles dans la culture du pétoncle chilien *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) *Aquaculture* 1997 – Elsevier (154)1:17-26 p.
- SARRA M., TAOUFIK G., BENJAMIN B., YANNICK F. et KHALED H., 2013.** Isolation and characterization of enterococci bacteriocin strains from Tunisian fish viscera. *Food and Nutrition Sciences*, 4(06), 701.
- SALMINEN S., VON WRIGHT A., MORELLI L., MARTEAU P., BRASSART D., de VOS W-M., FONDEN R., SAXELIN M., COLLINS K., MOGENSEN G., BIRKELAND S-E. et MATTILA-SANDHOLM T., 1998.** Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int J Food Microbiol* 44:93-106.
- SAMOT J, 2012.** *Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux* (Doctoral dissertation, Bordeaux 2).
- SANDERS M-E., 2008.** Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis* 46 Suppl 2: S58-61; discussion S144-51.
- SCHLEIFER K-H et RENATE K-B., 1984.** Transfert de *Streptococcus faecalis* et de *Streptococcus faecium* au genre *Enterococcus* nom. rev. comme *Enterococcus faecalis* comb. nov. et *Enterococcus faecium* comb. nov. *Revue internationale de microbiologie systématique et évolutive* , 34(1).
- SCHILLINGER U., GUIGAS C. et HOLZAPFEL WH., 2005.** In vitro adherence and other properties of Lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int. Dairy J.* **15**: 1289-1297.
- SERVIN A-L., 2004.** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28:405-40.
- SHARPE M-E., 1979.** Identification of the lactic acid bacteria. In Skinner, F.A., Lovelock, D.W. (Eds.), *Identification Methods for Microbiologists*. Academic Press, London: 233–259 p.
- SOUGIOULTZIS S., SIMEONIDIS S., BHASKAR K-R., CHEN X., ANTON P-M., KEATES S., POTHOUKAKIS C. et KELLY C-P., 2006.** *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 343:69-76.
- STROM E et RINGO E., 1993.** Modifications de la flore bactérienne chez les larves de morue en développement, *Gadus morhua* L , après inoculation de *Lactobacillus plantarum* dans l'eau. In : Walther, B., Fyhn, H.J. *Aspects physiologiques et biochimiques du développement des larves de poissons*. Université de Bergen. ISBN 82-992402-0-4 :226-228p.
- SVANEVIK C-S et LUNESTAD B-T., 2011.** "Characterisation of the microbiota of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*)." *International Journal of Food Microbiology* 151(2): 164-170.
- TARNECKI A-M., BURGOS F-A., RAY C-L. et ARIAS C-R., 2017.** "Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics." *Journal of Applied Microbiology* 123(1): 2-17.
- TEJERO-SARINENA S., BARLOW J., COSTABILE A., GIBSON G-R. et 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* in press.
- TODOROV S-D., MOLLENDROFF J-V., MOELICH E., MULLER N., WITTHUHN R-C. et DICKS L., 2009.** Évaluation des propriétés probiotiques potentielles d' *Enterococcus mundtii*, sa survie à Boza et production in situ de bactériocine. *Food Technol. Biotechnol.*, 47(2), 178-191 p.

**TWOMEY D., ROSS R-P., RYAN M., MEANEY B. et HILL C., 2002.** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:165-85.

**VANKERCKHOVEN V., HUYS G., VANCANNEYT M., VAELE C., KLARE I., ROMOND M-B., ENTENZA J-M., MOREILLON P., WIND R-D., KNOL J., WIERTZ E., POT B., VAUGHAN E., KAHLMETER G. et GOOSSENS H., 2008.** Évaluation de la biosécurité des probiotiques utilisés pour la consommation humaine: recommandations du projet EU-PROSAFE *Trends Food Sci Technol*, 19 (2008):102 – 114p

**VERSCHUERE L., ROMBAUT G., SORGELOOS P et VERSTRAETE W., 2000.** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, pp. 655-671

**VINE N-G., LEUKES W-D., KAISER H., DAYA S., BAXTER J. et HECHT T., 2004.** Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. Fish Dis.* 27: 319-326.

**WADSTRÖM T., ANDERSSON K., SYDOW M., AXELSSON L., LINDGREN S. et GULLMAR B., 1987.** Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J. Appl. Bacteriol.* 62: 513-520.

**WESTERDAHL A., OLSSON JC. KJELLEBERG S. et CONWAY PL., 1991.** Isolement et caractérisation de bactéries associées au turbot (*Scophthalmus maximus*) ayant des effets inhibiteurs sur *Vibrio anguillarum*. *Microbiologie appliqué et environmental.* 57 (8):2223-2228 p.

**ZHOU WM, LIU W., ET WU DG. (2000):** Isolation and characterization of new *Lactobacillus gasseri* KT7. *J Appl Microbiol.* 88: 877-886.

**ZIAEI-NEJAD S., REZAEI M-H., TAKAMI G-A., LOVETT D-L., MIRVAGHEFI A-R. et SHAKOURI M., 2006.** The effect of Bacillus spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 252, 516–524.

# **ANNEXES**

## Annexe 1 :

Tableau 1 : Résultats de la résistance et la croissance des bactéries lactiques sélectionnées dans des différents pH bas 2,3 et 4, et en présence de 0,5% de sels biliaires. (Les résultats sont exprimés en log CFU ml-1.).

| Code de la souche | Echantillon a pH neutre (NC) | pH 2 | pH 3  | pH4   | Echantillon SB neutre | Sels biliaires |
|-------------------|------------------------------|------|-------|-------|-----------------------|----------------|
| 5                 | 13,5                         | 6,30 | 9,85  | 11,75 | 11                    | 9,6            |
| 7                 | 13,5                         | 7,96 | 10,59 | 12,20 | 11                    | 9,18           |
| 29                | 13,5                         | 9,18 | 10,45 | 12,08 | 11                    | 10,02          |
| 8'                | 13,5                         | 8,15 | 10,41 | 12,32 | 11                    | 9,18           |

Tableau 2 : Résultats du Dosage de l'acide lactique des souches isolées sur milieu MRS et M17

| Souche        | Masse de l'acide lactique produite après 24h, 48h et 78h /100ml |       |       | Moyenne des Masses | Moyenne - témoin |
|---------------|---|-------|-------|--------------------|------------------|
|               | 24 H  | 48 H  | 72 H  |                    |                  |
| <b>Témoin</b> | 0,333   | 0,333 | 0,333 | 0,333              | <b>0</b>         |
| <b>20</b>     | 0,99  | 1,044 | 1,08  | 1,038              | <b>0,705</b>     |
| <b>14</b>     | 0,927   | 1,17  | 1,215 | 1,104              | <b>0,771</b>     |
| <b>28</b>     | 0,981   | 1,08  | 1,197 | 1,086              | <b>0,753</b>     |
| <b>7</b>      | 1,035   | 1,098 | 1,116 | 1,083              | <b>0,75</b>      |
| <b>9</b>      | 1,134   | 1,251 | 1,278 | 1,221              | <b>0,888</b>     |
| <b>13</b>     | 1,161   | 1,413 | 1,296 | 1,29               | <b>0,957</b>     |
| <b>31</b>     | 0,891   | 1,089 | 1,233 | 1,071              | <b>0,738</b>     |
| <b>24</b>     | 1,098   | 1,161 | 1,386 | 1,215              | <b>0,882</b>     |
| <b>6</b>      | 1,098   | 1,116 | 1,26  | 1,158              | <b>0,825</b>     |
| <b>32</b>     | 1,071   | 1,323 | 1,548 | 1,314              | <b>0,981</b>     |
| <b>5</b>      | 0,909   | 1,062 | 1,161 | 1,044              | <b>0,711</b>     |
| <b>19</b>     | 1,683   | 1,908 | 1,944 | 1,845              | <b>1,512</b>     |
| <b>2</b>      | 0,945   | 1,098 | 1,08  | 1,041              | <b>0,708</b>     |
| <b>22</b>     | 1,08  | 2,07  | 1,656 | 1,602              | <b>1,269</b>     |
| <b>4</b>      | 1,143   | 1,179 | 1,116 | 1,146              | <b>0,813</b>     |
| <b>29</b>     | 0,99  | 1,233 | 1,269 | 1,164              | <b>0,831</b>     |
| <b>15'</b>    | 0,882   | 0,99  | 1,035 | 0,969              | <b>0,636</b>     |
| <b>6'</b>     | 0,801   | 1,044 | 1,224 | 1,023              | <b>0,69</b>      |
| <b>8'</b>     | 1,665   | 1,827 | 1,926 | 1,806              | <b>1,473</b>     |
| <b>26'</b>    | 0,891   | 1,233 | 1,071 | 1,065              | <b>0,732</b>     |
| <b>13'</b>    | 1,107   | 1,449 | 1,602 | 1,386              | <b>1,053</b>     |
| <b>22'</b>    | 0,846   | 1,089 | 1,296 | 1,077              | <b>0,744</b>     |

Tableau 3 : les diamètres d'inhibition en (mm) de l'antibiogramme des souches isolées sur milieu MRS et M17

| souche | Antibiotiques |      |      |      |       |      |        |      |
|--------|---------------|------|------|------|-------|------|--------|------|
|        | P10           | TE30 | VA30 | CN10 | CTX30 | C30  | AUG 30 | OX 1 |
| 6      | 2             | 1,9  | 1,8  | 1,6  | 0,8   | 2,65 | 1,8    | 0,7  |
| 22'    | 2,5           | 2,8  | 2,1  | 1,5  | 2     | 2,9  | 2,8    | 1    |
| 20     | 3,3           | 2,8  | 1,9  | 1,7  | 1,8   | 2,45 | 2,6    | R    |
| 8'     | 2,6           | 2,2  | 2,6  | 2    | 2,7   | 2,5  | 2,6    | 1,8  |
| 2      | N             | N    | N    | N    | N     | N    | N      | N    |
| 28     | 1,5           | 0,9  | 2,1  | 1,65 | R     | 2,8  | 1,6    | R    |
| 24     | N             | 2,7  | 1,85 | 1,55 | N     | 3    | 2,6    | 1,1  |
| 19     | R             | 2,8  | 1,8  | 1,2  | 2,1   | 2,5  | 2      | 1,1  |
| 26'    | 1,8           | 0,95 | 2,6  | 1,8  | 1,3   | 3,2  | 1,9    | R    |
| 22     | 3,2           | 3,2  | 2,1  | 1,6  | 2     | 2,9  | 2,1    | 1,1  |
| 31     | 3,2           | 2,8  | 2    | 1,7  | 2     | 2,7  | 3      | R    |
| 5      | 2,3           | R    | 2,4  | 2,2  | 1,9   | 3,4  | 2,4    | R    |
| 6'     | 2,5           | 2,65 | 2    | 1,7  | 1,4   | 2,5  | 2,3    | 0,75 |
| 7      | 1,1           | 2,1  | 2,35 | 1,9  | 2,3   | 1,3  | 1,1    | R    |
| 14     | 2,3           | 2,5  | 1,9  | 1,7  | 1,1   | 2,6  | 2,6    | 1,4  |
| 4      | 2,3           | N    | 2,4  | N    | N     | 2,5  | N      | 1,2  |
| 32     | 3,2           | 2,5  | 2    | 1,7  | 1,5   | 1,5  | 3,1    | R    |
| 13     | 2             | 2,7  | 2,1  | 1,9  | 1,2   | 2,8  | 2,1    | R    |
| 29     | 1,3           | 2,7  | 2,3  | 2    | 0,9   | 2,5  | 1,7    | R    |
| 15'    | 2,4           | 1,2  | 2,8  | 2,4  | 1,3   | 2,4  | 2,2    | R    |
| 9      | 2,5           | 3    | 2,2  | 1,7  | 1,5   | 2,2  | 2,2    | R    |
| 13'    | 2,7           | 3    | 1,9  | 2,1  | R     | 2,6  | 2,7    | R    |

Tableau 4 : Résultats de production de biofilm des souches isolées sur milieu MRS et M17

| <b>Code de la souche</b> | <b>DO a 540 nm</b> |
|--------------------------|--------------------|
| <b>Témoin</b>            | 0.000              |
| <b>29</b>                | 0.479              |
| <b>4</b>                 | 0.060              |
| <b>6</b>                 | 0.175              |
| <b>9</b>                 | 0.013              |
| <b>24</b>                | 0.294              |
| <b>31</b>                | 0.030              |
| <b>13</b>                | 0.314              |
| <b>22</b>                | 0.020              |
| <b>14</b>                | 0.116              |
| <b>28</b>                | 0.060              |
| <b>5</b>                 | 0.022              |
| <b>20</b>                | 0.200              |
| <b>2</b>                 | 0.061              |
| <b>32</b>                | 0.020              |
| <b>19</b>                | 0.029              |
| <b>7</b>                 | 0.020              |
| <b>8'</b>                | 0.246              |
| <b>6'</b>                | 0.064              |
| <b>15'</b>               | 0.146              |
| <b>22'</b>               | 0.020              |
| <b>26'</b>               | 0.251              |
| <b>13 '</b>              | 0.030              |

## RESUME

L'isolement de 70 souches de bactéries lactiques du tractus gastro-intestinal de divers espèces aquatiques poisson, crustacés et mollusques et leur sélection en tant que probiotique a été réalisé dans ce travail. Aux termes d'une batterie de tests, nous avons démontré que les isolats ont des profils probiotiques importants. Ces isolats ont été caractérisés in vitro en ce qui concerne l'antagonisme, adhérence au mucus, résistance à la bile et au pH, production d'acide organique, résistance aux antibiotiques et propriétés hémolytiques.

Suite à une identification en tant que *Entereococcus sp*, Les isolats présentaient une activité inhibitrice élevée contre les agents pathogènes et comme ils survivent à un faible intervalle de pH de 2,0 à 4.0 et en présence de sels biliaires de 0.5%, sans aucune activité hémolytique détectable. De plus, une production modérée de l'acide organique, une capacité acceptable d'adhésion et production de biofilm et une sensibilité à une gamme d'antibiotiques ont été révélées pour tous les isolats. Ces résultats in vitro ont mis en évidence la propriété probiotique spécifique des souches et ont permis de mettre en avant une collection de 22 candidats les plus performants pour une suite d'étude in vivo et une application biotechnologique.

## ABSTRACT

The isolation of 70 strains of lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract of various aquatic species of fish, crustaceans and molluscs and their selection as probiotics was performed in this work. Under a battery of tests, we have demonstrated that isolates have significant probiotic profiles. These isolates were characterized in vitro for antagonism, mucus adherence, bile and pH resistance, organic acid production, antibiotic resistance and haemolytic properties.

Following identification as *Entereococcus sp*, the isolates exhibited high inhibitory activity against pathogens and as they survive a low pH range of 2.0 to 4.0 and in the presence of bile salts of 0.5%, without any detectable haemolytic activity. In addition, moderate organic acid production, acceptable adhesion and biofilm production capacity and sensitivity to a range of antibiotics were found for all isolates. These in vitro results highlighted the specific probiotic properties of the strains and highlighted a collection of 22 top performers for in vivo study and biotechnological application.

## ملخص

تم عزل 70 سلالة من بكتيريا حمض اللبنيك عن الجهاز الهضمي لمختلف الأنواع المائية من الأسماك والقشريات والرخويات وتم اختيارهم كأحد الكائنات الحية المجهرية في هذا العمل. استنادًا إلى مجموعة من الاختبارات ، أظهرنا أن العزلات لها ملفات تعريف بروبيوتيك مهمة. تم تمييز هذه العزلات في المختبر من حيث الخصومة ، التصاق المخاط ، مقاومة الصفراء ودرجة الحموضة ، إنتاج الأحماض العضوية ، مقاومة المضادات الحيوية وخصائص الانحلال. بعد تحديد الهوية على أنها *Entereococcus sp* ، أظهرت العزلات نشاطًا مثبطًا عاليًا ضد مسببات الأمراض ونجت في نطاق درجة حموضة منخفضة من 2.0 إلى 4.0 وبحضور أملاح صفراء بنسبة 0.5% ، دون أي نشاط على الإطلاق. للكشف عن الانحلال. بالإضافة إلى ذلك ، تم الكشف عن إنتاج معتدل للحمض العضوي ، والقدرة على التصاق مقبولة وإنتاجية الأغشية الحيوية ، وحساسية لمجموعة من المضادات الحيوية لجميع العزلات. أظهرت هذه النتائج في المختبر الخصائص بروبيوتيك محددة من سلالات وجعلت من الممكن تسليط الضوء على مجموعة من 22 مرشحًا أفضل أداء لمجموعة الدراسة في الجسم الحي وتطبيق التكنولوجيا الحيوية.